



You have downloaded a document from
RE-BUŚ
repository of the University of Silesia in Katowice

Title: Mapowanie genów i QTL związanych z reakcją na stres niedoboru wody z wykorzystaniem wysokorozdzielczej mapy genetycznej *Hordeum vulgare* L.

Author: Kornelia Gudyś

Citation style: Gudyś Kornelia. (2017). Mapowanie genów i QTL związanych z reakcją na stres niedoboru wody z wykorzystaniem wysokorozdzielczej mapy genetycznej *Hordeum vulgare* L.. Praca doktorska. Katowice : Uniwersytet Śląski

© Korzystanie z tego materiału jest możliwe zgodnie z właściwymi przepisami o dozwolonym użytku lub o innych wyjątkach przewidzianych w przepisach prawa, a korzystanie w szerszym zakresie wymaga uzyskania zgody uprawnionego.



UNIWERSYTET ŚLĄSKI
W KATOWICACH



Biblioteka
Uniwersytetu Śląskiego



Ministerstwo Nauki
i Szkolnictwa Wyższego

UNIwersytet Śląski
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska
Katedra Genetyki

Kornelia Gudyś

**Mapowanie genów i QTL związanych z reakcją
na stres niedoboru wody z wykorzystaniem
wysokorozdzielczej mapy genetycznej
Hordeum vulgare L.**

Promotor:
prof. dr hab. Iwona Szarejko

Promotor pomocniczy:
dr Justyna Guzy-Wróbelska

Katowice, 2017



UNIA EUROPEJSKA
EUROPEJSKI FUNDUSZ
ROZWOJU REGIONALNEGO



Praca wykonana w ramach Projektu w Programie Innowacyjna Gospodarka 2007-2013, WND-POIG.01.03.01-00-101/08 POLAPGEN-BD „Narzędzia biotechnologiczne służące do otrzymywania zbóż o zwiększonej odporności na suszę”, zadanie 4 „Mapy markerów DNA oraz mapowanie genów-kandydatów związanych z tolerancją jęczmienia na suszę i identyfikacja ich alleli w odmianach jęczmienia z krajowego rejestru”.

Składam serdeczne podziękowania

***prof. dr hab. Iwonie Szarejko**
za opiekę naukową, okazaną życzliwość
oraz inspirujące i konstruktywne uwagi,*

***dr Justynie Guzy-Wróbelskiej**
za cenne wskazówki, przekazaną wiedzę
oraz nieustającą motywację do pracy,*

***Koleżankom i Kolegom z Katedry Genetyki**
za bezwarunkową pomoc i przyjacielską atmosferę,*

*mojej **Rodzinie**, a w szczególności **Mężowi**
za wyrozumiałość, cierpliwość i nieocenione wsparcie.*

Spis treści

1. Wstęp i cele pracy	1
2. Przegląd literatury	3
2.1. Mechanizmy reakcji roślin na stres niedoboru wody oraz parametry stosowane do oceny ich efektywności	3
2.2. Molekularne podłoże odpowiedzi roślin na stres niedoboru wody.....	9
2.2.1. Geny regulatorowe	9
2.2.2. Geny funkcjonalne	12
2.3. Tworzenie wysokorozdzielczych map genetycznych	14
2.3.1. Wybór populacji mapującej	16
2.3.2. Najważniejsze systemy markerów molekularnych	18
2.3.3. Analiza sprzężeń markerów i konstrukcja mapy genetycznej	20
2.4. Strategia genów kandydackich (ang. candidate genes – CG) w analizie QTL...	22
2.4.1. Źródła genów kandydackich	23
2.4.2. Weryfikacja potencjalnego zaangażowania zidentyfikowanych genów w wykształcenie badanej cechy	26
2.5. Wykorzystanie molekularnych map funkcjonalnych w identyfikacji genów kandydackich dla loci cech ilościowych związanych z reakcją na stres niedoboru wody u zbóż	29
3. Materiał i metody	35
3.1. Materiał roślinny	35
3.2. Izolacja genomowego DNA.....	35
3.2.1. Pomiar koncentracji i czystości wyizolowanego DNA	37
3.3. Markery SSR.....	37
3.3.1. Amplifikacja loci SSR	37
3.3.2. Wizualizacja produktów PCR.....	38
3.4. Markery SNP.....	39
3.5. Konstruowanie map genetycznych	40
3.5.1. Analiza segregacji alleli polimorficznych markerów wśród linii populacji mapujących	40
3.5.2. Analiza sprzężeń markerów i tworzenie indywidualnych map genetycznych	41
3.5.3. Tworzenie mapy konsensusowej	42
3.6. Strategia identyfikacji i mapowania funkcjonalnych genów kandydackich.....	42

3.6.1. Wybór genów kandydackich związanych z tolerancją na stres niedoboru wody.....	43
3.6.2. Identyfikacja jęczmiennej sekwencji genomowej analizowanych CG.....	43
3.6.3. Projektowanie starterów, opracowanie warunków amplifikacji oraz wizualizacja produktów PCR.....	52
3.6.4. Sekwencjonowanie ampikonów i identyfikacja polimorfizmów.....	53
3.6.5. Opracowanie technik genotypowania polimorficznych CG w populacjach mapujących.....	54
3.6.5.1. Technika STS.....	54
3.6.5.2. Technika CAPS.....	54
3.6.5.3. Technika dCAPS.....	55
3.6.6. Lokalizowanie CG na mapach genetycznych.....	55
3.7. Strategia mapowania loci cech ilościowych.....	56
3.7.1. Charakterystyka układu doświadczalnego oraz analizowanych cech.....	56
3.7.2. Statystyczne opracowanie wyników.....	60
3.7.3. Identyfikacja QTL dla cech związanych z odpowiedzią na niedobór wody.....	60
3.8. Adnotacja funkcjonalna pozycyjnych genów kandydackich.....	61
4. Wyniki.....	63
4.1. Markery molekularne.....	63
4.1.1. Analiza jakości oraz poziomu polimorfizmu markerów SSR i SNP wśród genotypów rodzicielskich populacji mapujących.....	63
4.1.1.1. Markery SSR.....	63
4.1.1.2. Markery SNP.....	64
4.1.2. Wybór markerów i linii RIL do tworzenia map genetycznych.....	65
4.2. Konstruowanie map genetycznych.....	66
4.2.1. Charakterystyka szkieletowych map genetycznych skonstruowanych w oparciu o markery SSR.....	66
4.2.2. Charakterystyka map genetycznych wysyconych markerami SNP.....	67
4.2.3. Analiza segregacji alleli polimorficznych markerów SSR i SNP wśród linii populacji mapujących.....	70
4.2.4. Identyfikacja oraz charakterystyka regionów SDR.....	71
4.3. Strategia identyfikacji i mapowania funkcjonalnych genów kandydackich.....	72
4.3.1. Analiza polimorfizmów zidentyfikowanych w sekwencjach CG.....	72
4.3.2. Lokalizowanie polimorficznych CG na mapach genetycznych skonstruowanych dla populacji mapujących M _{Cam} i GH.....	80

4.4. Charakterystyka wysokorozdzielczej, konsensusowej mapy funkcjonalnej ze zmapowanymi CG związanymi z tolerancją jęczmienia na stres niedoboru wody.....	81
4.5. Mapowanie loci cech ilościowych	84
4.5.1. Charakterystyka fenotypowa populacji RIL	84
4.5.2. Identyfikacja QTL dla parametrów fizjologicznych i biochemicznych	92
4.5.3. Adnotacja funkcjonalna pozycyjnych genów kandydackich zidentyfikowanych w przedziałach ufności QTL dla cech związanych z reakcją na stres suszy	105
5. Dyskusja.....	120
5.1. Wysokorozdzielcza funkcjonalna mapa konsensusowa	120
5.2. Fenotypowe skutki stresu suszy	124
5.3. Lokalizowanie QTL dla cech związanych z reakcją na stres niedoboru wody	128
5.4. Identyfikacja pozycyjnych genów kandydackich kontrolujących zmienność analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych w stresie suszy	135
6. Wnioski	144
7. Literatura	146
8. Streszczenie.....	172
9. Summary	174
10. Aneksy	176
Aneks 1. Składy zastosowanych odczynników.....	176
Aneks 2. Sekwencje starterów, chromosomowa lokalizacja oraz jakość markerów SSR	177
Aneks 3. Programy PCR dla amplifikacji markerów SSR.....	186
Aneks 4. Analiza polimorfizmów w sekwencjach funkcjonalnych genów kandydackich	187
Aneks 5. Protokoły genotypowania polimorficznych CG w populacjach mapujących.	195
Aneks 6. Procesy biologiczne zidentyfikowane w oparciu o analizę wzbogacania terminów GO w grupach genów dla warunków optymalnego nawodnienia oraz wspólne dla warunków optymalnego nawodnienia i stresu suszy	200
Aneks 7. Lista 143 pozycyjnych genów kandydackich zidentyfikowanych w wyniku analizy wzbogacania terminów GO związanych z odpowiedzią na stres suszy202	

1. Wstęp i cele pracy

Jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.) jest jednym z najwcześniej udomowionych gatunków zbóż i obecnie zajmuje czwartą pozycję pod względem wielkości produkcji rolnej na świecie. Ze względu na duże zdolności adaptacyjne jest chętnie uprawiany w niesprzyjających warunkach klimatycznych oraz na glebach o słabych wartościach użytkowych. Obserwowanym skutkiem trwającego tysiące lat procesu udomowienia jęczmienia jest znaczne obniżenie różnorodności genetycznej współczesnych odmian, co zwiększyło ich wrażliwość na abiotyczne i biotyczne stropy środowiskowe, spośród których najbardziej dotkliwym jest niedobór wody.

Reakcją roślin na deficyt wody w środowisku jest zamykanie aparatów szparkowych oraz spadek efektywności procesu fotosyntezy, co w znaczący sposób ogranicza ich prawidłowy wzrost i w konsekwencji obniża potencjał plonotwórczy. Rośliny wykształciły różnego rodzaju mechanizmy pozwalające na zminimalizowanie niekorzystnych skutków, jakie wywiera na nie stres niedoboru wody. Poznanie ich molekularnego podłoża jest trudne ze względu na złożony, ilościowy charakter dziedziczenia tolerancji na suszę, będący wynikiem łącznej ekspresji wielu genów, modyfikowanej dodatkowo wpływem środowiska. Jedną z metod identyfikacji genetycznych determinantów tolerancji na deficyt wody jest tworzenie map genetycznych i mapowanie loci cech ilościowych (ang. quantitative trait loci – QTL). W ostatnich latach opracowano systemy markerów molekularnych wykorzystujących polimorfizm wewnątrzgenowy, metody wysokoprzepustowego genotypowania populacji mapujących oraz techniki pozwalające na precyzyjne fenotypowanie zróżnicowanego materiału roślinnego. Umożliwiło to konstrukcję wysokorozdzielczych map genetycznych oraz identyfikację genów kandydackich dla QTL związanych z reakcją na niedobór wody u wielu gatunków roślin użytkowych.

W niniejszej pracy podjęto próbę poznania molekularnych podstaw odpowiedzi jęczmienia na stres suszy poprzez mapowanie loci cech ilościowych kontrolujących zmienność cech fizjologicznych i biochemicznych związanych z reakcją na niedobór wody oraz identyfikację nowych genów w przedziałach ufności wyznaczonych QTL.

Prezentowane badania obejmowały:

- 1) Konstrukcję wysokorozdzielczej, konsensusowej mapy genetycznej markerów SSR i SNP dla trzech populacji RIL wyprowadzonych z krzyżówek europejskich oraz syryjskich odmian jęczmienia jarego.
- 2) Identyfikację i mapowanie funkcjonalnych genów kandydackich, których źródłem były geny roślin modelowych o eksperymentalnie potwierdzonym zaangażowaniu w odpowiedź na niedobór wody oraz wyniki różnicowej analizy transkryptomów badanych w pracy genotypów jęczmienia.
- 3) Identyfikację QTL dla parametrów fizjologicznych i biochemicznych charakteryzujących bilans wodny, wydajność procesu fotosyntezy, zawartość osmoprotektantów i hormonów oraz aktywność antyoksydantów, zaangażowanych w odpowiedź na stres suszy u analizowanych genotypów.
- 4) Integrację skonstruowanej mapy genetycznej i fizycznej mapy genomu jęczmienia oraz identyfikację pozycyjnych genów kandydackich w przedziałach ufności dla zmapowanych QTL.
- 5) Priorytetyzację pozycyjnych genów kandydackich z wykorzystaniem narzędzia wzbogacania terminów Ontologii Genów (ang. GO enrichment) w celu wytypowania genów o największym prawdopodobieństwie ich potencjalnego zaangażowania w wykształcenie analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych w warunkach stresu suszy.

2. Przegląd literatury

2.1. Mechanizmy reakcji roślin na stres niedoboru wody oraz parametry stosowane do oceny ich efektywności

Susza jest jednym z najgroźniejszych stresów środowiskowych obniżających produktywność upraw i głównym czynnikiem powodującym straty w rolnictwie. Podłożem jej występowania jest sezonowa fluktuacja ilości opadów atmosferycznych oraz niekorzystne efekty działalności człowieka, przyczyniające się do okresowego obniżania dostępności wody w glebie. Ponadto, od połowy XX wieku obserwowane jest globalne podwyższenie rocznej temperatury powierzchni Ziemi, spowodowane głównie zwiększeniem emisji gazów cieplarnianych do atmosfery (Cattivelli i in., 2008). Negatywny efekt, jaki susza wywiera na uprawy rolne, zależy od jej intensywności i czasu trwania oraz fazy wzrostu roślin w momencie jej zaistnienia. W obliczu niekorzystnych prognoz dotyczących zmian klimatycznych, koniecznością staje się poznanie mechanizmów leżących u podstaw tolerancji roślin na stres suszy, co w przyszłości pozwoli na stworzenie odmian lepiej plonujących w warunkach deficytu wody (Tester i Langridge, 2010; Anjum i in., 2011a).

Rośliny na drodze ewolucji wykształciły szereg różnych strategii pozwalających na ich przystosowanie do niekorzystnych warunków środowiska. Wyróżniono trzy główne mechanizmy zapobiegania negatywnym skutkom, jakie wywiera na organizm rośliny stres niedoboru wody: ucieczkę przed suszą, unikanie odwodnienia oraz tolerancję stresu suszy. Realizowanie tak złożonego i wieloczynnikowego procesu, jakim jest odpowiedź roślin na suszę możliwe jest dzięki istnieniu korelacji w zmianach gospodarki wodnej na poziomie morfologicznym, anatomicznym, fizjologicznym, biochemicznym oraz molekularnym, na różnych etapach rozwoju rośliny (Farooq i in., 2009; Kooyers, 2015).

Ucieczka przed suszą jest strategią typową dla roślin rosnących w klimacie śródziemnomorskim, który charakteryzuje się cyklicznymi okresami ograniczenia dostępności wody oraz występowania wysokiej temperatury. Polega na skróceniu cyklu życiowego, umożliwiając roślinie reprodukcję przed nastaniem niekorzystnych warunków wzrostu i rozwoju. Fenologiczne dostosowanie do krótkiego sezonu wegetacyjnego skutkuje często obniżeniem wydajności plonowania, związanym z przyspieszeniem etapu wypełniania i dojrzewania nasion (Cattivelli i in., 2008).

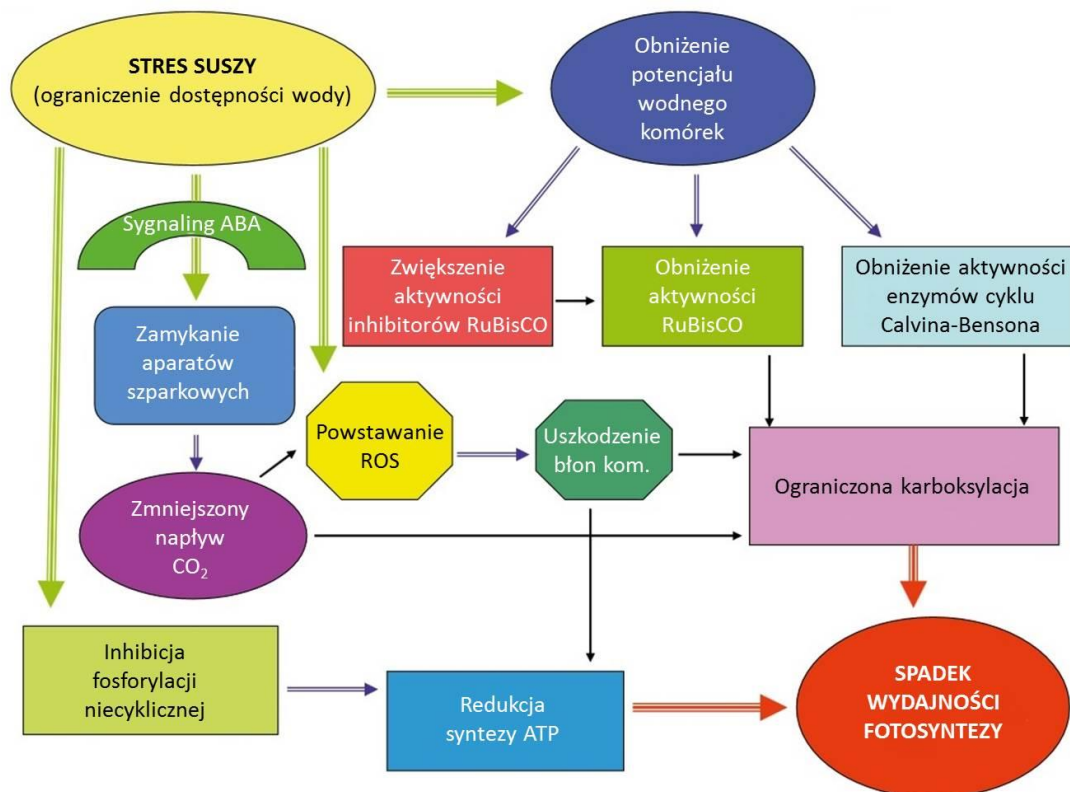
Najważniejszym parametrem wykorzystywanym w ocenie zdolności do ucieczki przed suszą jest termin kwitnienia (ang. flowering time), a także w przypadku zbóż, termin kłoszenia (ang. days to heading; Schmalenbach i in., 2014; Trijatmiko i in., 2014).

Unikanie odwodnienia jest zdolnością roślin do utrzymania podstawowych procesów życiowych w okresie niedoboru wody poprzez modyfikację tempa wzrostu oraz wykształcenie lub zmianę morfologii organów wegetatywnych, w celu zwiększenia poboru wody z gleby oraz zredukowania jej utraty. Ograniczenie transpiracji realizowane jest poprzez zmniejszenie liczby i stopnia otwarcia aparatów szparkowych, zwijanie się i okresowe zrzucanie liści, zmniejszenie powierzchni blaszki liściowej oraz obecność warstwy kutykularnej (Fang i Xiong, 2015). Obniżenie turgoru w komórkach szparkowych, związane z odebraniem sygnału o malejącym potencjale wodnym w roślinie, powoduje zamykanie szparek, co zapobiega utracie wody z rośliny do atmosfery. Mechanizm zamykania i otwierania szparek jest ściśle związany z aktywnym transportem jonów K^+ przez błony komórek przyszparkowych oraz z sygnalizacją kwasu abscysynowego (ang. abscisic acid – ABA). Wraz z zahamowaniem transpiracji ograniczony zostaje proces wymiany gazowej, umożliwiającą dyfuzję dwutlenku węgla do wnętrza liścia, co znacząco obniża wydajność procesu fotosyntezy. Intensywność wymiany gazowej szacowana jest najczęściej pomiarem przewodności szparkowej (ang. stomatal conductance), temperatury powierzchni liścia (ang. canopy temperature) oraz wielkości i gęstości rozmieszczenia szparek w epidermie (Khazaei i in., 2014; Liu i in., 2015). Unikanie odwodnienia poprzez intensyfikację pobierania wody z gleby związane jest głównie z modyfikacjami architektury systemu korzeniowego. Deficyt wody wpływa na ograniczenie wzrostu organów nadziemnych w celu zminimalizowania utraty wody przez parowanie, z jednoczesną stymulacją wzrostu organów podziemnych. Dlatego zwiększony stosunek suchej masy korzeni do suchej masy części nadziemnej (ang. root to shoot ratio) jest wskaźnikiem odzwierciedlającym reakcję wielu gatunków roślin na stres suszy (Comas i in., 2013). Innymi cechami systemu korzeniowego, których morfologia ulega zmianie w odpowiedzi na ograniczenie dostępności wody w glebie są: długość, liczba, objętość i średnica korzenia zarodkowego oraz korzeni bocznych, a także ogólna powierzchnia i masa systemu korzeniowego (Forster i in., 2005; Kano-Nakata i in., 2012). Kolejny parametr to bilans wodny, będący wypadkową intensywności pobierania wody oraz jej straty na drodze transpiracji, który wyrażany jest w sposób pośredni. Najważniejszym wskaźnikiem określającym wpływ stresu suszy na ogólną kondycję rośliny jest względna zawartość wody (ang. relative water content – RWC),

definiowana jako stosunek aktualnej zawartości wody w tkance do jej zawartości w tkance w pełni uwodnionej (Anjum i in., 2011a). Najwyższa wartość RWC jest charakterystyczna dla liści we wczesnym etapie rozwoju i spada wraz z ich dojrzewaniem oraz w przypadku ekspozycji rośliny na stres suszy (Nayyar i Gupta, 2006). Innymi cechami określającymi bilans wodny są: zawartość wody w liściu, utrata wody z liścia oraz efektywność wykorzystania wody (ang. water use efficiency – WUE), odzwierciedlająca stosunek efektywności fotosyntezy netto do intensywności transpiracji (Monclus i in., 2006; Farooq i in., 2009).

Tolerancja stresu suszy jest zdolnością roślin do utrzymania podstawowych procesów życiowych poprzez uruchomienie i regulację licznych ścieżek metabolicznych, w celu redukcji bądź naprawy szkodliwych zmian, będących skutkiem niedoboru wody w organizmie na poziomie fizjologicznym i biochemicznym (Fang i Xiong, 2015). Stres suszy w znaczący sposób wpływa na fotosyntezę, która u roślin jest kluczowym procesem warunkującym prawidłowy wzrost i rozwój. Wiele badań wskazuje na pozytywną korelację między obniżeniem aktywności fotosyntetycznej oraz spadkiem plonowania, z uwagi na mniejszą produkcję asymilatów. W warunkach stresu niedoboru wody obserwowane jest zmniejszenie zawartości związków węglowych w liściach, będących głównym produktem fotosyntezy. Zmianie ulega metabolizm i wykorzystanie asymilatów, które kierowane są do komórek korzeni o zwiększonej aktywności metabolicznej, kosztem zahamowania rozwoju części nadziemnej rośliny (Farooq i in., 2009). Główną przyczyną spadku aktywności fotosyntetycznej jest obniżenie potencjału wody w liściach, prowadzące do zamykania aparatów szparkowych i ograniczenia asymilacji dwutlenku węgla. Na skutek absorpcji energii świetlnej przy jednoczesnym ograniczonym dostępie CO₂, akceptory elektronów w fotosystemie II (PSII) pozostają trwale w stanie zredukowanym i nie mogą przyjąć elektronów wybitych z cząsteczek chlorofilu w centrach aktywnych, co prowadzi do nagromadzenia energii wzbudzenia w antenach fotosyntetycznych. Skutkiem fotoinhibicji jest zaburzenie transportu elektronów w błonach tylakoidów gran chloroplastów oraz zmniejszenie aktywności enzymów szlaku karboksylacji Calvina-Bensona. Nagromadzenie energii wzbudzenia prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu (ang. reactive oxygen species – ROS), które przyczyniają się do uszkodzenia białkowych komponentów fotosystemów, degradacji i fotooksydacji barwników fotosyntetycznych oraz peroksydacji lipidów błon komórkowych chloroplastów (Rysunek 2.1.; Farooq i in., 2009; Kalaji i in., 2011a). Do określenia aktywności fotosyntetycznej wykorzystuje się pomiar zawartości oraz

fluorescencji chlorofilu *a*. Wysoka zawartość chlorofilu (cecha ang. „stay green”) jest pozytywnie skorelowana z wydajnością fotosyntetyczną oraz lepszym plonowaniem w warunkach niedoboru wody (Guo i in., 2008). Pomiar *in vivo* fluorescencji chlorofilu *a* jest miarą energii świetlnej wyemitowanej głównie przez fotosystem II, szczególnie wrażliwy na szkodliwy wpływ suszy. Najczęściej stosowanymi metodami pomiaru są analiza krzywej szybkiej kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* (test OJIP) oraz pomiar fluorescencji modulowanej. Można wyróżnić szereg parametrów opisujących fotochemiczną aktywność fotosystemu II, np. fluorescencja początkowa (F_0), fluorescencja maksymalna (F_m), fotochemiczna wydajność kwantowa fotosystemu II (Φ_{PSII}), fotochemiczne wygaszanie fluorescencji (qP), ilość energii rozproszanej z fotosystemu II w przeliczeniu na centrum reakcji (DI_0/RC), ilość energii wykorzystanej do transportu elektronów w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia (ET_0/CS), czy też wskaźnik wydajności obliczony na podstawie absorpcji energii (PI_{abs} ; Baker, 2008; Kalaji i in., 2011b).



Rysunek 2.1. Mechanizmy wpływające na spadek wydajności procesu fotosyntezy w czasie stresu suszy (Farooq i in., 2009; zmienione).

Kluczowym mechanizmem biochemicznym zwiększającym adaptację roślin do stresu suszy jest dostosowanie osmotyczne (ang. osmotic adjustment – OA), które polega na akumulacji nieorganicznych i organicznych substancji rozpuszczalnych w cytozolu, zmniejszając potencjał osmotyczny komórek w celu utrzymania turgoru (Sanders i Arndt, 2012). Dostosowanie osmotyczne opóźnia proces starzenia się liści oraz umożliwia wzrost korzeni i utrzymanie aktywności fotosyntetycznej w obliczu ograniczonej dostępności wody. Akumulacja nieorganicznych jonów, głównie K^+ , Na^+ , Ca^{2+} i Cl^- w wakuoli, powoduje obniżenie ciśnienia osmotycznego i przepływ wody z otoczenia do komórki zgodnie z gradientem stężeń. Do organicznych osmoprotektantów należą niskocząsteczkowe aminokwasy i ich pochodne (prolina, glicyna), cukry (fruktoza, glukoza, trehaloza), alkohole cukrowe (mannitol, sorbitol, glicerol) oraz czwartorzędowe związki amonowe (betaina; Fang i Xiong, 2015). Najlepiej poznanym osmoprotektantem jest prolina, która ze względu na dużą hydrofilowość bierze udział w stabilizacji struktury błon komórkowych oraz ochronie białek strukturalnych i enzymów przed denaturacją. Kontroluje również pH cytozolu, pełni rolę antyoksydanta, unieszkodliwiając reaktywne formy tlenu oraz stanowi rezerwuar węgla i azotu, podtrzymując metaboliczną aktywność komórek po zadziałaniu czynnika stresowego (Szabados i Savoure, 2010; Sharma i in., 2011). Z kolei podwyższone stężenie cukrów prostych oraz sacharozy, maltozy i rafinozy stwierdzono w liściach tolerancyjnych odmian m.in. jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) i pszenicy (*Triticum aestivum* L.; Qayyum i in., 2011; Filek i in., 2015). Ze względu na ograniczoną aktywność fotosyntetyczną spowodowaną stresem suszy, zwiększenie akumulacji cukrów w tkankach jest wynikiem hydrolitycznego procesu rozkładu skrobi (Bartels i Sunkar, 2005). U roślin potwierdzono rolę zarówno cukrów prostych, jak i złożonych w ochronie komórek przed szkodliwym skutkiem działania stresu oksydacyjnego przez unieszkodliwianie wolnych rodników tlenowych (Couée i in., 2006) oraz przez regulację ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę enzymów z grupy przeciwutleniaczy (Xu i in., 2009a). Ponadto dowiedziono, że dwucukier trehaloza stabilizuje dwuwarstwę lipidową budującą błony komórkowe oraz uczestniczy w regulacji mechanizmu otwierania i zamykania aparatów szparkowych (Delorge i in., 2014).

Jedną z pierwszych biochemicznych odpowiedzi komórek eukariotycznych na odebranie sygnału o zaistnieniu czynnika stresowego jest powstawanie reaktywnych form tlenu. Pojawienie się stresu oksydacyjnego jest sygnałem do uruchomienia kaskady reakcji, mających na celu przeciwdziałanie szkodliwym skutkom, jakie wywiera na

organizm czynnik stresowy (Fang i Xiong, 2015). Do reaktywnych form tlenu powstałych na skutek stresu suszy należą: anionorodnik ponadtlenkowy ($O_2^{\cdot-}$), nadtlenek wodoru (H_2O_2), rodnik hydroksylowy (OH^{\cdot}) oraz tlen singletowy (1O_2). Związki te są naturalnymi produktami metabolizmu tlenowego, wytwarzanymi przede wszystkim na terenie chloroplastów, mitochondriów i peroksysomów, stanowiącymi ważny element wielu szlaków sygnałowych. Czynniki stresowe wywołują zachwianie równowagi między powstawaniem i usuwaniem ROS oraz nagłą ich akumulacją, co prowadzi do peroksydacji lipidów, karbonylacji białek oraz uszkodzeń struktury DNA. Procesy te wpływają w sposób bezpośredni na wyciek elektrolitów z błon komórkowych, zwiększając ich przepuszczalność, a także na degradację białek i barwników fotosyntetycznych oraz inaktywację enzymów, co w znaczący sposób upośledza podstawowe procesy życiowe, prowadząc do śmierci komórki (Choudhury i in., 2013). Stres oksydacyjny prowadzi do wzrostu stężenia w komórkach dialdehydu malonowego (MDA), który jest biologicznym markerem oceny stanu peroksydacji lipidów (Møller i in., 2007). Organizmy żywe wytworzyły szereg enzymatycznych i nieenzymatycznych mechanizmów obrony przed szkodliwym działaniem ROS, w celu utrzymania wewnątrzkomórkowej homeostazy redoks. Do najważniejszych enzymów antyoksydacyjnych, których podwyższoną aktywność stwierdzono w tkankach roślin poddanych stresowi suszy, należą: dysmutaza ponadtlenkowa (SOD), katalaza (CAT), peroksydaza (POD), peroksydaza askorbinianowa (APX), peroksydaza glutationowa (GPX) oraz reduktaza glutationowa (GSR). SOD katalizuje reakcję dysmutacji bardzo reaktywnego anionorodnika ponadtlenkowego do bardziej stabilnej cząsteczki H_2O_2 , która z kolei jest usuwana przez system katalaz i peroksydaz (Noctor i in., 2014). Do nieenzymatycznych przeciwutleniaczy zaliczane są m.in. kwas askorbinowy, glutation oraz związki z grupy karotenoidów, tokoferoli i tokotrienoli. Kwas askorbinowy jest substratem reakcji redukcji H_2O_2 do H_2O , katalizowanej przez peroksydazę askorbinianową. α -tokoferol stabilizuje wielonienasycone grupy acylowe lipidów, redukując szkodliwy efekt oddziaływania ROS na błony komórkowe. Z kolei β -karoten jest barwnikiem obecnym w chloroplastach, który stabilizuje funkcjonowanie fotosystemów poprzez zdolność do wiązania tlenu singletowego (Smirnoff, 2007; Choudhury i in., 2013).

2.2. Molekularne podłoże odpowiedzi roślin na stres niedoboru wody

Reakcja roślin na stres suszy związana jest z podwyższeniem lub obniżeniem ekspresji wielu genów oraz uruchomieniem lub modyfikacją różnych ścieżek metabolicznych. Odpowiedź na niedobór wody w środowisku zapoczątkowana jest odebraniem sygnału o zaistnieniu stresu przez receptory błonowe, a następnie kaskadą jego transdukcji, zakończoną ekspresją genów indukowanych deficytem wody i adaptacją rośliny do nowych, niekorzystnych warunków środowiska (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Geny, których aktywność skorelowana jest ze stresem suszy, można podzielić na dwie kategorie. Do pierwszej z nich zaliczane są geny regulatorowe, zaangażowane w ścieżkę transdukcji sygnału oraz regulację ekspresji innych genów odpowiedzi na stresy. Najważniejszymi nośnikami informacji o stresie w komórce są jony Ca^{2+} , ROS, ABA oraz fosfoglicerol, których zmiana stężenia uruchamia proces przekazywania sygnału, obejmujący fosforylację i defosforylację białek przez kinazy i fosfatazy białkowe oraz aktywację czynników transkrypcyjnych. Geny regulatorowe kodują również enzymy zaangażowane w biosyntezę ABA oraz metabolizm fosfolipidów (Golldack i in., 2011). Drugą grupę stanowią geny funkcjonalne, których produkty białkowe zaangażowane są bezpośrednio w ochronę komponentów komórki przed szkodliwymi skutkami odwodnienia. Należą do nich białka opiekuńcze, białka LEA (ang. late embryogenesis abundant), osmoprotektanty oraz antyoksydanty. Wśród genów funkcjonalnych można wyróżnić także te, które kodują białka uczestniczące w pobieraniu wody i jonów, np. akwaporyny i kanały jonowe oraz zaangażowane w transport cukrów i innych metabolitów komórkowych (Hadiarto i Tran, 2011; Fang i Xiong, 2015).

2.2.1. Geny regulatorowe

Wiele czynników transkrypcyjnych oraz innych białek odpowiedzi na stresy, w celu nabycia pełnej aktywności przechodzi przez proces obróbki posttranslacyjnej, obejmujący przyłączanie lub odszczepianie reszty fosforanowej. Do najważniejszych typów kinaz przeprowadzających reakcję fosforylacji należą kinazy białkowe aktywowane mitogenami (ang. mitogen-activated protein kinase – MAPK), kinazy białkowe zależne od Ca^{2+} (ang. calcium-dependent protein kinase – CDPK), kinazy białkowe oddziałujące z białkami podobnymi do kalcyneuryny B (ang. calcineurin B-like protein interacting protein kinase – CIPK) oraz receptorowe kinazy białkowe (ang. receptor-like kinases – RLK; Hu i Xiong, 2014). U ryżu (*Oryza sativa* L.), najlepiej poznanym genem kodującym kinazę z rodziny MAPK jest *OsMPK5*, którego ekspresja

indukowana jest niedoborem wody, wzrostem stężenia ABA oraz H₂O₂. Transformanty z nadekspresją genu *OsMPK5* wykazywały podwyższoną tolerancję na stres suszy, zasolenia i niskiej temperatury (Xiong i Yang, 2003). Z kolei ekspresja genu *DSMI* kodującego kinazę kinazy aktywującej MAPK (ang. MAP kinase kinase kinase – MAPKKK) indukowana jest wysokim zasoleniem i suszą, natomiast nie zależy od stresu niskiej temperatury (Ning i in., 2010). Mutanty tego genu typu *knock-out* u ryżu poddane stresowi suszy traciły wodę szybciej w porównaniu do typu dzikiego oraz charakteryzowały się obniżoną ekspresją dwóch genów kodujących peroksydazy, co sugeruje udział genu *DSMI* w mechanizmie usuwania ROS. Również linie ryżu z nadekspresją genów *OsCDPK7* i *OsCIPK12* wykazywały wyższy poziom tolerancji na suszę. Dodatkowo, podwyższona ekspresja genu *OsCIPK12* skorelowana była ze zwiększoną zawartością rozpuszczalnych cukrów i proliny (Saijo i in., 2000; Xiang i in., 2007). Natomiast linie z nadekspresją genu *OsSIK1*, kodującego kinazę z rodziny RLK, charakteryzowały się zwiększoną tolerancją na stresy suszy i zasolenia, redukcją stężenia ROS oraz zmniejszoną gęstością aparatów szparkowych w epidermie liścia, w porównaniu z typem dzikim (Ouyang i in., 2010).

W regulacji ekspresji wszystkich genów odpowiedzi na stres suszy nadrzędną rolę pełnią czynniki transkrypcyjne. Są to białka wiążące się z elementami *cis* sekwencji promotorowych genów docelowych, regulujące proces transkrypcji poprzez jej aktywację lub represję. Analiza sekwencji promotorowych genów aktywowanych stresem niedoboru wody wykazała obecność dwóch podstawowych miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych. Ekspresja genów, które w promotorze posiadają element ABRE (ang. ABA-responsive element) regulowana jest na drodze zależnej od ABA, natomiast regulacja ekspresji genów z elementem DRE/CRT (ang. dehydration-responsive element/C-Repeat) przebiega niezależnie od akumulacji kwasu abscysynowego (Shinozaki i Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Wśród genów kodujących czynniki transkrypcyjne regulujące ekspresję podczas stresu suszy na drodze zależnej od ABA można wyróżnić rodziny AREB/ABF oraz bZIP, a także niektóre geny z rodziny WRKY. Nadekspresja genów *AREB1* i *AREB2* u *Arabidopsis thaliana* zwiększyła wrażliwość na ABA oraz tolerancję na stres suszy (Kang i in., 2002; Fujita i in., 2005), natomiast Jin i in. (2009) u roślin *A. thaliana* transformowanych genem *OsAREB1* stwierdzili dodatkowo opóźnienie kwitnienia. Ekspresja genu *OsZIP23* jest silnie i szybko indukowana stresem suszy, zasolenia, PEG (ang. polyethylene glycol) i ABA. Około 800 genów kodujących dehydryny, białka LEA, kinazy białkowe, fosfatazy, białka

stabilizujące błonę komórkową i białka transportujące lipidy ulegało podwyższonej ekspresji w liniach ryżu z nadekspresją *OsZIP23* (Xiang i in., 2008). Analiza czynników transkrypcyjnych z rodziny WRKY pozwoliła na identyfikację 103 kodujących je genów u ryżu (Ramamoorthy i in., 2008). Yu i współpracownicy (2010) wykazali, że ekspresja genu *WRKY72* indukowana jest przez PEG, NaCl, wysoką temperaturę i ABA. Linie *A. thaliana* z nadekspresją *WRKY72* wykazywały większą wrażliwość na mannitol, NaCl i ABA w porównaniu z typem dzikim.

Do genów dla czynników transkrypcyjnych, regulujących ekspresję na drodze niezależnej od kwasu abscysynowego, należy rodzina AP2/ERF oraz niektóre geny z rodziny NAC (Bakshi i Oelmüller, 2014; Nakashima i in., 2014). Wśród AP2/ERF wyróżniono dwie podrodziny: DREB i ERF. U *A. thaliana* zidentyfikowano 6 genów *DREB1* oraz 8 loci z grupy *DREB2* (Rehman i Mahmood, 2015). Ich nadekspresja zwiększała tolerancję transgenicznych roślin *A. thaliana* na stres suszy, niskiej temperatury i zasolenia. Wykazano wzrost poziomu ekspresji genu *HvDREB1* w liściach jęczmienia po zadziałaniu stresem suszy, niskiej temperatury i zasolenia (Xu i in., 2009b) oraz zwiększony poziom transkryptu genu *HvDRF1*, będącego aktywatorem ekspresji genu *HVA1* (Xue i Loveridge, 2004). Z kolei, mutanty ryżu typu *knock-out* w genie *OsERF109* charakteryzowały się podwyższoną tolerancją na niedobór wody oraz większą zawartością etylenu w tkankach, co wskazuje na udział tego genu w negatywnej regulacji odpowiedzi na stres suszy i biosyntezy etylenu (Yu i in., 2017). Wykazano indukowaną stresem suszy ekspresję genu *SNAC1* w komórkach przysparkowych epidermy liścia u ryżu, a rośliny z jego nadekspresją charakteryzowały się zwiększoną tolerancją na niedobór wody. Zidentyfikowano ponad 80 genów docelowych dla *SNAC1*, kodujących m.in. osmoprotektanty i antyoksydanty (Hu i in., 2006).

Ważnym regulatorem w indukcji odpowiedzi na stres suszy jest kwas abscysynowy. Jego akumulacja w komórkach spowalnia procesy wzrostowe, wprowadza nasiona i pąki w stan spoczynku, indukuje wytwarzanie warstwy odcinającej w ogonkach liści, co powoduje ich opadanie, wpływa na zamykanie aparatów szparkowych, ograniczając transpirację oraz pełni rolę mediatora w kaskadzie procesów modyfikujących ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres suszy (Sah i in., 2016). Kluczowymi enzymami biorącymi udział w syntezie *de novo* ABA są epoksydaza zeaksantyny (ZEP), dioksygenaza 9-cis-epoksykarotenoidowa (NCED) oraz oksydaza aldehydu ABA (AAO). Zwiększoną akumulację ABA oraz wzrost tolerancji na stres suszy stwierdzono w liniach ryżu stransformowanych genem *AtNCED2* oraz genem

AtLOS5, którego produkt białkowy uaktywnia enzym AAO (Xiao i in., 2009) oraz u transformantów *A. thaliana* z nadekspresją genu *AtZEP* (Park i in., 2008). Wykazano również zwiększoną tolerancję na niedobór wody oraz stres oksydacyjny wśród linii ryżu z nadekspresją genu *DSM2*, kodującego hydroksylazę β -karotenu, enzym biorący udział w syntezie prekursora ABA – zeaksantyny (Du i in., 2010).

2.2.2. Geny funkcjonalne

Istotną rolę w regulacji bilansu wodnego w warunkach stresowych pełnią akwaporyny, czyli integralne białka błonowe tworzące kanały transportujące wodę i inne niskocząsteczkowe substancje przez błony komórkowe. Zmiany w poziomie ekspresji genów kodujących akwaporyny, wywołane stresem niedoboru wody oraz stresem zasolenia, wykazano m.in. u tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.), bawełny (*Gossypium hirsutum* L.), ryżu oraz *A. thaliana* (Mahdieh i in., 2008; Li i in., 2009; Alexandersson i in., 2010; Gao i in., 2010). U ryżu stwierdzono obecność dziesięciu genów kodujących akwaporyny, należących do dwóch podrodzin OsPIP1 i OsPIP2. Wykazano zwiększoną ekspresję genów *OsPIP1-1*, *OsPIP2-5* i *OsPIP2-7* w komórkach korzeni oraz genu *OsPIP2-3* w liściach, a także obniżoną ekspresję genów *OsPIP2-1*, *OsPIP2-5* i *OsPIP2-6* w liściach po zadziałaniu PEG, będącym stymulatorem stresu suszy (Guo i in., 2006).

W tkankach roślin poddanych stresowi niedoboru wody obserwowane jest nagromadzenie białek LEA, które w optymalnych warunkach akumulowane są przez nasiona w czasie ostatniej fazy dojrzewania, zabezpieczając zarodki przed wysychaniem. Białka LEA stabilizują struktury błon komórkowych oraz pełnią funkcję białek opiekuńczych poprzez translokację, degradację i regulację fałdowania innych białek. Ze względu na silną hydrofilowość mają wysokie powinowactwo do wiązania cząsteczek wody, wykazując tolerancję na wysokie temperatury (Hand i in., 2011). U jęczmienia zidentyfikowano gen *HVA1*, kodujący białko z tej grupy, którego poziom ekspresji wzrasta gwałtownie w młodych siewkach po traktowaniu stresem suszy, wysokiej temperatury i ABA (Checker i in., 2012). Linie ryżu oraz pszenicy z nadekspresją genu *HVA1* charakteryzowały się lepszą efektywnością wykorzystania wody (WUE) oraz silniejszym wzrostem w warunkach stresu suszy w stosunku do roślin o fenotypie dzikim (Sivamani i in., 2000; Babu i in., 2004). Xiao i współpracownicy (2007) wykazali większy potencjał plonotwórczy transformantów ryżu z nadekspresją genu *OsLEA3-1* narażonych na deficyt wody w warunkach polowych. Do białek LEA zaliczane są również dehidryny. U jęczmienia opisanych zostało trzynaście genów dla dehidryn

(*Dhn1-Dhn13*) o potwierdzonej roli w indukowaniu tolerancji na stres suszy oraz niskiej temperatury (Rodríguez i in., 2005). Inną grupą białek opiekuńczych, których ilość wzrasta po zadziałaniu stresem suszy oraz wysokiej temperatury są białka szoku cieplnego (ang. heat shock proteins – HSP), które stabilizują strukturę innych białek, zapobiegając ich denaturacji. Sato i Yokoya (2008) wykazali zwiększoną tolerancję na stres suszy wśród linii ryżu z nadekspresją genu *sHSP17.7*.

Dużą grupę białek funkcjonalnych indukowanych stresem suszy stanowią enzymy szlaku biosyntezy osmoprotektantów. U ryżu w warunkach stresu osmotycznego, suszy oraz zasolenia stwierdzono zwiększoną ekspresję genu *OsTPPI*, kodującego kluczowy enzym syntezy dwucukru trehalozy. Ponadto, nadekspresja *OsTPPI* skorelowana była z aktywacją transkrypcji dwóch genów dla kinaz *OsMPK3* i *OsMPK4*, a także genu kodującego czynnik transkrypcyjny *OsDREB1B* (Ge i in., 2008; Li i in., 2011). Aktywacja szlaku syntezy proliny w warunkach suszy zależna jest głównie od ekspresji genu *P5CS*, kodującego syntazę δ -pirolino-5-karboksylanu. Transformanty soi (*Glycine max* L.) z nadekspresją genu *AtP5CS* charakteryzowały się zwiększoną względną zawartością wody w liściach (RWC) w odpowiedzi na stres suszy oraz wysokiej temperatury (De Ronde i in., 2004). Zhang i współpracownicy (2013) wykazali, że w warunkach deficytu wody wzrost poziomu ekspresji genów szlaku biosyntezy proliny, *P5CS* i *OAT*, związany jest z demetylacją DNA, co sugeruje epigenetyczną kontrolę tego procesu. Z dostosowaniem osmotycznym związana jest także zwiększona ekspresja genu *mtlD* kodującego enzym z grupy dehydrogenaz, katalizujący syntezę mannitolu. Stwierdzono zwiększoną tolerancją na stres deficytu wody linii pszenicy z nadekspresją genu *mtlD* (Abebe i in. 2003). Z kolei dehydrogenaza argininy, kodowana przez gen *Adc1*, jest zaangażowana w syntezę poliamin. Poliaminy stabilizują błony cytoplazmatyczne dzięki oddziaływaniom dodatnio naładowanych grup aminowych z ujemnie naładowanymi grupami fosfolipidów. Ich działanie w indukowaniu zwiększonej tolerancji na niedobór wody zostało potwierdzone u ryżu na podstawie analizy profili ekspresji genów *OsAdc1* i *OsAdc2* (Peremarti in., 2010).

Istotnym mechanizmem przeciwdziałania negatywnym skutkom stresu suszy jest ekspresja genów związanych z procesem usuwania reaktywnych form tlenu. W wyniku transformacji genomu chloroplastowego ryżu konstruktem zawierającym wyizolowany z grochu (*Pisum sativum* L.) gen *MnSOD*, kodujący manganową dysmutazę ponadtlenkową, pod promotorem SWPA2, pochodzącym ze słodkiego ziemniaka (*Ipomoea batatas* L.) oraz indukowanym stresem oksydacyjnym, otrzymano linie

z nadekspresją analizowanego genu o zwiększonej tolerancji na stres suszy (Wang i in., 2005). Z kolei, Koussevitzky i współpracownicy (2008) wykazali akumulację peroksydazy askorbinianowej w tkankach *A. thaliana* po zadziałaniu stresem suszy oraz wysokiej temperatury. Mutanty wykazujące *knock-out* w genie *APX1* (*ascorbate peroxidase 1*), kodującym ten enzym, charakteryzowały się zwiększoną koncentracją nadtlenu wodoru w tkankach oraz większą wrażliwością na zadane stropy w porównaniu z typem dzikim. Rośliny *A. thaliana* z nadekspresją genu *AtGPX3*, kodującego peroksydazę glutationową, charakteryzowały się mniejszą wrażliwością na stres suszy oraz redukcją utraty wody na drodze transpiracji. Linie niosące mutację w analizowanym genie charakteryzowały się większą wrażliwością na traktowanie nadtlakiem wodoru i wzmożoną produkcją H₂O₂ w komórkach przysparkowych. Ponadto wykazano, że mutacja *atgpx3* skorelowana jest z obniżeniem aktywności genów dla czynników transkrypcyjnych *ABI1* i *ABI2* z rodziny AP2/ERF, które regulują ekspresję innych genów związanych z odpowiedzią na niedobór wody na drodze niezależnej od ABA (Miao i in., 2006). Innym przykładem genu zaangażowanego w kontrolę metabolizmu ROS jest *OsSRO1c*, zidentyfikowany w genomie ryżu ortolog genu *RCD1* (*radical-induced cell death 1*) opisanego pierwszy raz u *A. thaliana*. *OsSRO1c* jest genem docelowym dla czynnika transkrypcyjnego SNAC1, kontrolującym mechanizm otwierania i zamykania aparatów szparkowych oraz stężenie H₂O₂ w komórkach przysparkowych (You i in., 2014).

2.3. Tworzenie wysokorozdzielczych map genetycznych

Wysokorozdzielcze mapy genetyczne charakteryzujące się znacznym stopniem pokrycia genomu znalazły szereg zastosowań we współczesnej genetyce roślin. W przypadku gatunków, których genomy nie zostały dotąd zsekwencjonowane, mapy genetyczne stanowią doskonały punkt wyjścia do mapowania porównawczego z mapami genetycznymi lub sekwencjami genomów spokrewnionych gatunków. Pozwala to na analizę syntenicznych zależności ułożenia genów oraz do przewidywania funkcji, jakie prawdopodobnie pełnią w badanym gatunku. Mapy genetyczne stanowią również znakomite narzędzie do analizy wielu istotnych gospodarczo cech, których wykształcenie jest wynikiem łącznej ekspresji kilku genów, umożliwiając genomową lokalizację determinujących je czynników (mapowanie loci cech ilościowych, ang. quantitative trait loci – QTL). Wykorzystywane są również w klonowaniu pozycyjnym do izolacji genów o ekspresji powodującej widoczną zmianę fenotypu, gdy brak jest informacji na temat

kodowanych przez nie produktów białkowych. Wysokorozdzielcze mapy genetyczne tworzone są również dla gatunków, których genom został zsekwencjonowany. Stanowią one w tym przypadku punkt odniesienia, na podstawie którego szeregowane są poszczególne kontigi i przypisywane do określonych chromosomów, czego doskonałym przykładem było tworzenie fizycznej mapy genomu jęczmienia (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). Innym zastosowaniem wysokorozdzielczych map genetycznych stworzonych dla gatunków, których pełna sekwencja genomowa została poznana, jest bezpośrednia identyfikacja genów kandydackich warunkujących wykształcenie cech ilościowych, zmapowanych w regionach QTL. Geny zidentyfikowane w ten sposób mogą być następnie wprowadzone w inne tło genetyczne na drodze selekcji w oparciu o markery (ang. marker assisted selection – MAS), co znacznie skraca proces wyprowadzania nowych form o lepszych walorach agronomicznych (Semagn i in., 2006; Cheema i Dicks, 2009).

Mapowanie genetyczne polega na ustaleniu pozycji oraz względnej odległości genetycznej między genami lub markerami molekularnymi w chromosomach określonego gatunku. W konstruowaniu map genetycznych wysokiej rozdzielczości wykorzystywane są dane o segregacji nawet kilkudziesięciu tysięcy polimorficznych loci w pokoleniu potomnym, zwanym populacją mapującą, otrzymanym poprzez kontrolowane krzyżowanie zróżnicowanych genetycznie form rodzicielskich (Wu i in., 2008). Podstawą mapowania genetycznego jest zasada, że geny lub markery molekularne segregują w wyniku procesu meiotycznej rekombinacji (ang. crossing-over), co umożliwia ich analizę w pokoleniu potomnym. Zgodnie z drugim prawem Mendla, allele w loci zlokalizowanych w różnych chromosomach dziedziczą się niezależnie od siebie, w sposób losowy tworząc w gametach wszystkie możliwe kombinacje. Geny lub markery molekularne, które są zlokalizowane w tym samym chromosomie są sprzężone i dziedziczą się zależnie od siebie. Im mniejsza odległość między nimi w chromosomie, tym mniejsze prawdopodobieństwo zajścia crossing-over i większe prawdopodobieństwo wspólnego dziedziczenia. Populacja mapująca jest zatem zbiorem genotypów rodzicielskich i zrekombinowanych pod względem segregujących loci. Częstotliwość rekombinacji, obliczana na podstawie liczby występujących w populacji rekombinantów, wykorzystywana jest do kalkulacji genetycznych odległości między parami loci sprzężonych. Dystans dzielący sprzężone geny lub markery molekularne na mapie genetycznej wyrażony jest w centymorganach (cM), gdzie 1 cM definiuje się jako

odległość między dwoma loci, dla której prawdopodobieństwo zajścia crossing-over wynosi 1% (Collard i in., 2005; Semagn i in., 2006).

Na konstrukcję wysokorozdzielczych map genetycznych składa się kilka etapów, mianowicie: wyprowadzenie populacji mapującej poprzedzone wyborem form rodzicielskich, wybór odpowiedniego systemu markerowego do analizy populacji mapującej oraz analiza sprzężeń, przeprowadzona z wykorzystaniem programów komputerowych. W obliczu coraz bardziej powszechnego stosowania metod wysokiej przepustowości w genotypowaniu populacji mapujących, koniecznym staje się tworzenie nowych metod, umożliwiających efektywną analizę danych o segregacji tysięcy markerów molekularnych, które często są niekompletne lub obarczone pewną dozą błędów genotypowania. Tylko wysokorozdzielcze mapy genetyczne charakteryzujące się wysoką jakością mogą znaleźć praktyczne zastosowanie, szczególnie w mapowaniu loci cech ilościowych oraz identyfikacji genów leżących u podstawy wykształcenia analizowanych cech fenotypowych, reprezentowanych przez zmapowane QTL (Semagn i in., 2006; Wu i in., 2008).

2.3.1. Wybór populacji mapującej

Pierwszym krokiem w tworzeniu populacji mapującej, czyli rozszczepiającego się pod względem wielu markerów potomstwa przeprowadzonego krzyżowania, jest wybór genetycznie odmiennych form rodzicielskich, różniących się pod względem jednej bądź wielu istotnych cech. Dystans genetyczny między genotypami wyselekcjonowanymi do krzyżowania powinien być na tyle duży, by uwidocznili wysoki polimorfizm na poziomie molekularnym. Jednocześnie zbyt duże zróżnicowanie genetyczne może prowadzić do sterylności potomstwa oraz występowania zaburzeń segregacji alleli w wielu polimorficznych loci. W przypadku gatunków samopylnych, takich jak jęczmień, formami rodzicielskimi są zazwyczaj wysoce homozygotyczne linie o niskim stopniu pokrewieństwa (Semagn i in., 2006). W mapowaniu loci cech ilościowych kontrolujących złożone cechy, takie jak tolerancja na niedobór wody, często wykorzystywane są populacje mapujące wyprowadzone z krzyżowań form dobrze plonujących w warunkach kontrolnych z blisko spokrewnionymi gatunkami dzikimi, charakteryzującymi się lepszym przystosowaniem do przeżycia w trudnych warunkach klimatycznych. Przykładem dla jęczmienia jest krzyżowanie z gatunkiem *Hordeum spontaneum* K. Koch, najbliższym dzikim krewnym obecnie uprawianych odmian, który stanowi doskonałe

źródło nowych alleli w kreowaniu form lepiej plonujących w warunkach stresowych (Tuberosa i Salvi, 2006).

Do najczęściej wykorzystywanych typów populacji mapujących u gatunków samopylnych zalicza się pokolenie F_2 , populacje otrzymane poprzez krzyżowanie wsteczne (ang. backcross – BC), rekombinacyjne linie wsobne (ang. recombinant inbred lines – RIL) oraz populacje podwojonych haploidów (ang. doubled haploids – DH; Schneider, 2005; Semagn i in., 2006). Populacja F_2 uzyskiwana jest przez samozapylenie mieszańców z pokolenia F_1 otrzymanych przez skrzyżowanie linii rodzicielskich, natomiast populacja BC wyprowadzana jest z pokolenia F_1 , poprzez skrzyżowanie wsteczne z jednym z rodziców. Zaletami obu typów populacji mapujących jest prostota otrzymywania oraz krótki czas wyprowadzenia, natomiast główną ich wadą jest nietrwałość, gdyż ze względu na wysoką heterozygotyczność kolejne pokolenia nie są genetycznie identyczne w stosunku do populacji wyjściowej. Populacja mapująca RIL otrzymywana jest przez samozapylenie osobników pokolenia F_2 z zastosowaniem metody SSD (ang. single seed descent), która polega na wysiewie jednego ziarna z każdej rośliny przez 6-8 pokoleń, co prowadzi do prawie całkowitej homozygotyzacji populacji w ósmym pokoleniu. Każda linia RIL zawiera unikalną kombinację fragmentów chromosomów pochodzących od obojga rodziców. Cechą populacji rekombinacyjnych linii wsobnych, wyróżniającą ją spośród pozostałych typów populacji mapujących, jest wysoki stopień rekombinacji, będący wynikiem wielu rund mejozy, przez które muszą przejść rośliny zanim osiągną stan homozygotyczności. Dzięki temu, odpowiednio liczne populacje RIL stosowane są w tworzeniu map o wysokiej rozdzielczości oraz w mapowaniu blisko sprzężonych ze sobą loci. Linie RIL są genetycznie utrwalone, mogą zatem być wykorzystywane do wielu analiz w różnych warunkach środowiska. Jest to cecha szczególnie pożądana w mapowaniu loci cech ilościowych, które wymaga fenotypowania osobników populacji mapującej w kilku powtórzeniach w różnych lokalizacjach, często na przestrzeni wielu lat. Główną wadą linii RIL jest długi czas wymagany do ich wytworzenia. Ostatnim, bardzo popularnym typem populacji mapującej są linie DH. Podwojone haploidy uzyskiwane są drogą kultury *in vitro* poprzez androgenezę, gynogenezę lub krzyżowanie oddalone i eliminację chromosomów (Murovec i Bohanec, 2012). Linie DH są całkowicie homozygotyczne, gdyż ich genomy składają się z dwóch identycznych zestawów chromosomów, charakterystycznych dla gamet, z których powstały. Nasiona osobników populacji DH, podobnie jak w przypadku linii RIL, stanowią trwałe źródło materiału genetycznego, umożliwiające ich wielokrotne

wykorzystanie w różnych analizach. Zaletą tego typu populacji jest możliwość otrzymania linii w ciągu jednego pokolenia. Główną wadą populacji DH jest konieczność posiadania efektywnej metody regeneracji roślin haploidalnych w warunkach kultury *in vitro* (Schneider, 2005; Semagn i in., 2006).

Istotnym czynnikiem przy wyprowadzaniu populacji mapującej jest jej finalny rozmiar. W praktyce, liczba osobników większości analizowanych populacji mapujących waha się od 50 do 250. Im bardziej liczna populacja, tym większa szansa na otrzymanie mapy o wysokiej rozdzielczości. Zastosowanie zbyt małych populacji mapujących prowadzi często do konstrukcji map genetycznych charakteryzujących się wieloma grupami sprzężeń, znacznie przewyższającymi haploidalną liczbę chromosomów analizowanego gatunku oraz nieprawidłową kolejnością ułożenia loci w chromosomach. Stwierdzono, że dla większości typów populacji mapujących, optymalna liczebność dla otrzymania mapy genetycznej dobrej jakości wynosi 200 osobników (Ferreira i in., 2006; Semagn i in., 2006).

2.3.2. Najważniejsze systemy markerów molekularnych

Na przestrzeni ostatnich trzech dekad powstało wiele systemów markerów molekularnych, których źródłem polimorfizmu są różnice w liczbie kopii sekwencji tandemowo powtórnego DNA, brak lub wstawienie grupy nukleotydów (ang. insertion/deletion – INDEL) oraz polimorfizm pojedynczych nukleotydów (ang. single nucleotide polymorphism – SNP). Systemy markerów ewoluowały w kierunku opracowania metod wysokoprzepustowych, umożliwiających jednoczesną analizę tysięcy loci, relatywnie tanich i niewymagających technicznie oraz charakteryzujących się dużą powtarzalnością wyników. Pierwsze mapy genetyczne opierały się na systemach RFLP (ang. restriction fragments length polymorphism) oraz AFLP (ang. amplified fragment length polymorphism). Następnie, markery SSR (ang. simple sequence repeats) zrewolucjonizowały proces tworzenia map genetycznych od lat 90 do początku XXI wieku, ze względu na kodominacyjny charakter dziedziczenia, wysoki poziom polimorfizmu oraz możliwość zautomatyzowania analizy. Wymienione typy markerów są wykorzystywane w tworzeniu współczesnych map genetycznych głównie jako znaczniki pomagające w określeniu właściwego porządku ułożenia nowo zmapowanych loci w chromosomach oraz ułatwiające tworzenie map konsensusowych, integrujących kilka map genetycznych skonstruowanych dla różnych populacji mapujących (Agarwal i in., 2008; Mammadov i in., 2012). W tworzeniu map genetycznych, których głównym

przeznaczeniem jest mapowanie QTL, szczególnie atrakcyjne są systemy markerowe oparte na polimorfizmie wewnątrzgenowym (ang. gene-targeted markers – GTM), czego przykładem są markery EST-SSR i EST-SNP. Źródłem tego typu systemów są kolekcje EST (ang. expressed sequence tags), otrzymywane w wyniku sekwencjonowania końców transkryptów mRNA reprezentujących geny ulegające ekspresji w określonych warunkach fizjologicznych. W przypadku sprzężenia tego typu markera z badaną cechą można przypuszczać, że zmapowany gen jest czynnikiem determinującym wykształcenie analizowanego fenotypu (Poczai i in., 2013).

Wysokorozdzielcze mapy genetyczne o dużej gęstości oparte są obecnie na markerach DArT (ang. diversity arrays technology) oraz SNP. Metoda DArT polega na: (1) stworzeniu reprezentacji genomowej fragmentów DNA, za pomocą enzymatycznego trawienia i selekcji produktów cięcia poprzez amplifikację przy użyciu starterów selekcyjnych, oraz (2) detekcji polimorfizmów z wykorzystaniem hybrydyzacji z sondami na mikromacierzy (Jaccoud i in., 2001). Technika DArT jest wydajną metodą w tworzeniu dużej liczby markerów w relatywnie krótkim czasie dla gatunków pozbawionych wystarczających zasobów informacji na temat ich sekwencji genomowych (Wenzl i in., 2006). Obecnie uważa się, że przyszłością tworzenia map wysokorozdzielczych są wysokoprzepustowe techniki oparte na markerach SNP. Podstawowym wyzwaniem dla badaczy jest identyfikacja loci SNP występujących w dużych i złożonych, często poliploidalnych genomach roślin, które charakteryzują się dużą frakcją sekwencji powtarzalnych. Rozwiązanie tego problemu przyniosło opracowanie nowych technik identyfikacji polimorfizmów pojedynczych nukleotydów, tj. RAD (ang. restriction site associated DNA) oraz GBS (ang. genotyping by sequencing), wykorzystujących metodę sekwencjonowania następnej generacji (ang. next-generation sequencing – NGS). Cechą wspólną wymienionych metod jest redukcja złożoności genomu przeprowadzana za pomocą enzymów restrykcyjnych, amplifikacja fragmentów zdeponowanych w stworzonej bibliotece genomowej oraz masowe równoległe sekwencjonowanie przeprowadzone na wybranej z kilku komercyjnie dostępnych platform, np. HiSeq (Illumina), 454 (Roche), Sequel (Pacific Biosciences), czy też SOLiD i IonTorrent (ThermoFisher). Obecnie ze względu na wysoką przepustowość i dokładność odczytów oraz malejące koszty analiz, najczęściej stosowane są systemy sekwencjonowania NGS oferowane przez firmę Illumina (Davey i in., 2011; Mammadov i in., 2012; Van Dijk i in., 2014).

2.3.3. Analiza sprzężeń markerów i konstrukcja mapy genetycznej

Zasadniczym etapem tworzenia mapy genetycznej jest analiza segregacji polimorficznych markerów w populacji mapującej, wstępna ocena wygenerowanego zestawu danych pod kątem identyfikacji potencjalnych błędów genotypowania oraz analiza sprzężeń z wykorzystaniem programów komputerowych. Dostępne programy różnią się między sobą zastosowanymi testami statystycznymi oraz algorytmami, jednakże analiza przeprowadzona z wykorzystaniem każdego z nich obejmuje ten sam schemat, na który składa się: ustalenie grup sprzężeń, określenie porządku ułożenia loci w wyszczególnionych grupach oraz określenie genetycznych odległości między nimi, determinujących finalną długość skonstruowanej mapy (Semagn i in., 2006; Cheema i Dicks, 2009).

Pierwszym etapem w wyznaczaniu grup sprzężeń jest obliczenie częstości rekombinacji między parami markerów. Grupy sprzężeń są tworzone poprzez sekwencyjne dodawanie kolejnych loci, które prezentują najmniejszą wartość rekombinacji względem markerów dodanych wcześniej. Do oceny prawdopodobieństwa sprzężenia loci wykorzystywany jest test wiarygodności zwany LOD (ang. logarithm of odds), definiowany jako logarytm ilorazu prawdopodobieństwa sprzężenia do niezależnego dziedziczenia dwóch cech. LOD równy 3 uznaje się za wartość krytyczną współczynnika, na podstawie której dwa markery uważane są za sprzężone, co oznacza tysiąckrotnie większe prawdopodobieństwo wspólnego dziedziczenia, w stosunku do jego braku. Im większa progowa wartość LOD, tym bardziej rygorystycznie formowane są grupy sprzężonych markerów. Opisana strategia tworzenia grup sprzężeń po raz pierwszy została zastosowana w programach MapMaker i JoinMap (Lander i in., 1987; Van Ooijen i Voorrips, 2001). Dostępne są również inne programy, tj. MadMapper i MST_{MAP}, które grupują loci poprzez podział grafu ważonego, którego węzły reprezentują markery, a krawędzie wartości rekombinacji (Cheema i Dicks, 2009). Problemem w tworzeniu map wysokorozdzielczych, gdzie analizowane są dane o segregacji dużej liczby markerów, jest zjawisko fałszywie pozytywnego sprzężenia, gdy wartości rekombinacji między grupami markerów należących do różnych chromosomów są mniejsze, niż dla loci zlokalizowanych w tym samym chromosomie. Sytuacja ta jest źródłem przypisania markerów z różnych chromosomów do jednej grupy sprzężeń, nawet przy zastosowaniu wysokich wartości krytycznych współczynnika LOD. Zjawisko to występuje często w przypadku markerów, dla których obserwuje się istotne statystycznie odchylenia od prawidłowej segregacji alleli (3:1 dla F₂; 1:1 dla BC, RIL

i DH), wyliczone z wykorzystaniem testu χ^2 . Jednym z zaproponowanych rozwiązań tego problemu, zaimplementowanym w programie MultiPoint, jest kilkietapowy proces grupowania loci. W pierwszym etapie, przy zastosowaniu bardzo restrykcyjnych wartości progowych, czyli wysokiej wartości współczynnika LOD oraz małej wartości rekombinacji między parami loci, minimalizowane jest prawdopodobieństwo grupowania loci z różnych chromosomów, czego wynikiem jest stworzenie wielu małych grup sprzężeń. W kolejnych etapach, przy zastosowaniu mniej rygorystycznych wartości progowych, grupy sprzężeń reprezentujące odcinki tego samego chromosomu są scalane, tworząc jedną grupę sprzężonych loci (Semagn i in., 2006; Ronin i in., 2010).

Kolejnym krokiem w konstruowaniu mapy genetycznej jest ustalenie kolejności ułożenia loci w wyłonionych grupach sprzężeń. Proces szeregowania markerów polega na dodawaniu kolejno po sobie loci, zaczynając od pary, która wykazuje największe prawdopodobieństwo sprzężenia. Dostępne programy komputerowe korzystają z różnych kryteriów optymalizacyjnych zwanych funkcjami celu (ang. objective functions), np. ważonej metody najmniejszych kwadratów (ang. weighted least squares), maksymalnego prawdopodobieństwa (ang. maximum likelihood – ML), czy też maksymalnej liczby w pełni informatywnych mejoz (ang. maximum number of fully informative meioses – SALEQ). Wygenerowane z ich wykorzystaniem mapy mogą różnić się nieznacznie kolejnością ułożenia loci, szczególnie w przypadku danych o segregacji tysięcy markerów, których liczba przewyższa maksymalną możliwą rozdzielczość mapowania dla stosunkowo niewielkich populacji mapujących (Cheema i Dicks, 2009). Strategią ułatwiającą analizę tego typu danych jest identyfikacja tzw. binów, definiowanych jako grupy markerów charakteryzujących się identycznym wzorem segregacji alleli, oddzielonych od pozostałych loci/binów pojedynczym zdarzeniem rekombinacji. Następnie wyłaniane są najbardziej reprezentatywne markery zastępujące poszczególne biny, tzw. delegaci, na podstawie których tworzone są mapy szkieletowe, wysycane pozostałymi loci w ostatniej fazie konstrukcji mapy (Ronin i in., 2010; Liu i in., 2014). Istotny wpływ na poprawność szeregowania loci mają również błędy genotypowania, powodujące często wprowadzenie do danych o segregacji alleli podwójnych rekombinantów, co błędnie sugeruje zajście dwóch zdarzeń rekombinacji między trzema sąsiadującymi loci, oraz brak danych o genotypie pod względem określonego markera dla wielu linii populacji mapującej. Niektóre programy komputerowe, np. JoinMap, MadMapper, czy HighMap oferują narzędzia do identyfikacji loci generujących lokalną

niestabilność mapy, które po wnikliwej analizie mogą zostać wykluczone (Cheema i Dicks, 2009).

Ostatnim etapem konstrukcji mapy genetycznej jest określenie genetycznych odległości między parami sprzężonych loci. Dla niewielkich odległości mapowych, mniejszych niż 10 cM, przyjmuje się, że odcinek między parą markerów na mapie równy 1 cM odpowiada 1% częstości zachodzenia rekombinacji. Dla większych odległości genetycznych konieczne jest zastosowanie funkcji mapujących, ze względu na możliwość zajścia wielokrotnego crossing-over lub zjawiska interferencji, czyli wpływu wystąpienia crossing-over w jednym miejscu na rekombinację w sąsiedztwie. Najczęściej stosuje się funkcje Haldane'a lub Kosambiego. Obie uwzględniają możliwość wystąpienia wielokrotnego crossing-over, a funkcja Kosambiego dodatkowo bierze pod uwagę możliwość zajścia interferencji (Semagn i in., 2006).

2.4. Strategia genów kandydackich (ang. candidate genes – CG) w analizie QTL

Jednym z głównych celów genetyki roślin jest identyfikacja i izolacja genów zaangażowanych w wykształcenie istotnych gospodarczo cech, z których zdecydowana większość to cechy złożone, będące wynikiem łącznej ekspresji wielu genów, w których determinację zaangażowanych jest wiele ścieżek metabolicznych. Istnieją dwa główne podejścia do poznania molekularnej podstawy dziedziczenia cech ilościowych. Podejście genetyki klasycznej 'forward genetics', dotyczące klonowania genów i QTL w oparciu o różnice fenotypowe między rodzicami populacji mapującej, umożliwia izolację genów zmapowanych w interwale QTL poprzez mapowanie wysokorozdzielcze (ang. fine mapping) oraz analizę mapy fizycznej dla badanego rejonu. Ponieważ mapowanie QTL charakteryzuje się stosunkowo niewielką rozdzielczością, jego wynikiem jest identyfikacja fragmentów genomu o długości około 10-30 cM, mogących zawierać nawet setki genów potencjalnie zaangażowanych w wykształcenie badanej cechy (Salvi i Tuberosa, 2005). W celu identyfikacji najbardziej prawdopodobnych determinantów określonego fenotypu konieczne jest zawężenie zidentyfikowanych fragmentów genomu poprzez analizę rekombinantów. Technika ta jest jednak bardzo pracochłonna, wymaga licznej populacji linii blisko izogenicznych (ang. near isogenic lines – NIL), segregujących tylko w obrębie fragmentu obejmującego zmapowany QTL. Konieczna jest także dostępność przynajmniej fragmentarycznej mapy fizycznej dla analizowanego gatunku (Xing i Zhang, 2010).

Poznanie sekwencji genomowej wielu roślin modelowych, rozwój technik genomiki funkcjonalnej oraz postęp w adnotacji genomów gospodarczo istotnych gatunków, umożliwił wdrożenie alternatywnej strategii genów kandydackich (ang. candidate genes – CG), reprezentującej podejście genetyki odwrotnej ‘reverse genetics’, opartej na hipotezie, że polimorfizm zidentyfikowany w obrębie genu, może odpowiadać za zmiany fenotypowe badanej cechy. Genem kandydackim nazywany jest każdy gen o znanej biologicznej funkcji, który bezpośrednio lub pośrednio może być zaangażowany w wykształcenie cechy będącej przedmiotem analiz (Zhu i Zhao, 2007). Potencjalny udział wybranych genów w determinacji określonego fenotypu testowany jest na drodze analizy kolokalizacji zmapowanych CG oraz rejonów dla zidentyfikowanych QTL na mapie genetycznej, w oparciu o statystyczną analizę asocjacji zmienności na poziomie DNA w sekwencjach zidentyfikowanych genów i zmienności fenotypowej cechy w obrębie kolekcji odmian lub linii hodowlanych (mapowanie asocjacyjne) oraz przez priorytetyzację z zastosowaniem aplikacji komputerowych, wykorzystujących najnowsze zasoby genomowe dostępne dla badanego gatunku w celu stworzenia rankingu najbardziej prawdopodobnych determinantów analizowanego fenotypu (Pardo-Diaz i in., 2015).

2.4.1. Źródła genów kandydackich

Ze względu na sposób identyfikacji, wyróżniono dwa typy genów kandydackich: pozycyjne oraz funkcjonalne (Zhu i Zhao, 2007; Diab i in., 2008). Pozycyjnymi genami kandydackimi nazywane są wszystkie markery oparte na polimorfizmie wewnątrzgenowym, które zidentyfikowane zostały w rejonach mapy genetycznej reprezentowanych jako QTL. W przypadku dostępności fizycznej mapy genomu analizowanego gatunku, kandydatami pozycyjnymi są również wszystkie geny zidentyfikowane we fragmentach chromosomów odpowiadających przedziałom ufności dla wyznaczonych QTL (Monclus i in., 2012; de Miguel i in., 2014). Nowoczesne wysokorozdzielcze mapy markerów TDM (ang. transcript derived markers), powstałe poprzez pozycjonowanie na mapie genetycznej sond mikromacierzowych reprezentujących geny ulegające zróżnicowanej ekspresji, oraz mapy oparte o markery wykorzystujące polimorfizm SNP, uzyskane z sekwencjonowania transkryptomu z wykorzystaniem metody NGS, umożliwiają kolokalizację zmapowanych QTL nawet z tysiącami markerów, co znacznie zwiększa rozdzielczość mapowania i prawdopodobieństwo zidentyfikowania genów warunkujących badaną cechę (Potokina

i in., 2008; Mammadov i in., 2012). Pewnym ograniczeniem podejścia pozycyjnych genów kandydackich jest fakt, że w przypadku fałszywie pozytywnych QTL, zidentyfikowany gen może być zaangażowany w wykształcenie zupełnie innego fenotypu (de Miguel i in., 2014).

Funkcjonalnymi kandydatami nazywane są geny wybrane do analiz *a priori*, w przypadku kiedy znana jest biochemiczna lub fizjologiczna podstawa badanego procesu. Geny kandydackie tego typu, mogą być wówczas wybrane z grupy sklonowanych genów o dobrze scharakteryzowanej roli w badanej ścieżce metabolicznej (Diab i in., 2008; Monclus i in., 2012). Podstawowym źródłem wiedzy o funkcjonalnych genach kandydackich, które mogą być zaangażowane w wykształcenie badanej cechy, są informacje zgromadzone w licznych publikacjach naukowych oraz ogólnodostępnych bazach danych. Szczególnie wartościowe są kolekcje mutantów, spośród których można wybrać te rośliny, dla których mutacja w badanym genie powoduje interesującą, w odniesieniu do badanej cechy, zmianę fenotypu (Lloyd i Meinke, 2012). Czynnikiem limitującym wybór funkcjonalnych kandydatów do analiz jest fakt, że większość dobrze scharakteryzowanych genów pod względem roli, jaką pełnią w komórce, zidentyfikowano w genomach roślin modelowych. W tym przypadku, wykorzystywane są możliwości genomiki porównawczej dla identyfikacji ortologów scharakteryzowanych funkcjonalnie genów w genomach gatunków spokrewnionych. Na podstawie wysokiej homologii sekwencji możliwa jest identyfikacja genów wywodzących się od wspólnego przodka, konserwowanych ewolucyjnie, co pozwala przypuszczać, że w genomach porównywanych gatunków mogą one pełnić tę samą funkcję (Carrier i in., 2013). Wadą analiz porównawczych jest fakt, iż podobieństwo fenotypowe analizowanej cechy u różnych gatunków może mieć zupełnie inne podłoże genetyczne, a wyselekcjonowane geny kandydackie, mimo strukturalnej homologii, w wyniku procesu specjacji mogły zyskać nowe funkcje.

Innym cennym źródłem funkcjonalnych genów kandydackich jest analiza transkryptomu. Konstruowanie bibliotek cDNA oraz tworzenie kolekcji sekwencji EST, charakterystycznych dla różnych organów, faz rozwojowych oraz czynników środowiskowych, połączone z różnicową analizą przesiewową, umożliwiły identyfikację wielu genów kandydackich u różnych gatunków roślin. Zastosowanie mikromacierzy umożliwiło wysokoprzepustowe profilowanie transkryptomów roślin poddanych różnym stresom biotycznym i abiotycznym. Różnice w poziomie ekspresji genów między rodzicami populacji mapującej, mogą być wykorzystane w określaniu ilości mRNA

wśród wszystkich osobników populacji w celu mapowania tzw. ekspresyjnych QTL (ang. expression QTL – eQTL). W przeciwieństwie do klasycznego mapowania QTL, ze względu na znajomość sekwencji analizowanych genów o zróżnicowanej ekspresji, można wyznaczyć ich pozycję na mapie genetycznej. Zidentyfikowane eQTL mogą być zmapowane w locus analizowanego genu, co określane jest jako pozycja *cis*, lub w oddalonych rejonach genomu, umożliwiając w ten sposób zidentyfikowanie innych genów regulujących obserwowane zmiany ekspresji, będących względem analizowanego genu w pozycji *trans* (Druka i in., 2010). Jedną z najnowszych technik analizy aktywnych transkrypcyjnie genów jest metoda RNA-seq, wykorzystująca wysokoprzepustowe sekwencjonowanie RNA za pomocą NGS. Metoda ta pozwala na analizę dziesiątek tysięcy transkryptów, charakteryzując się przy tym wyższą czułością i dokładnością w porównaniu do alternatywnych metod. Takie podejście umożliwia zidentyfikowanie wielu nowych genów, o nieznanym dotąd funkcji, o obniżonej lub podwyższonej ekspresji w odpowiedzi na zadany czynnik środowiskowy, ponieważ metoda RNA-seq nie wymaga genomu referencyjnego i umożliwia sekwencjonowanie transkryptów *de novo* (Mir i in., 2012).

Najnowszym podejściem do identyfikacji funkcjonalnych genów kandydackich jest metoda *in silico*, polegająca na przeszukiwaniu genomowych baz danych z zastosowaniem aplikacji komputerowych, które w kolejnych krokach umożliwiają filtrowanie zidentyfikowanych rekordów oraz kompleksową analizę statystyczną wygenerowanych wyników. Analizie poddawane są eksperymentalne dane zdeponowane w bazach sekwencji nukleotydowych i aminokwasowych, dane z analiz ekspresji i koekspresji genów, mapowania genomów, Ontologie Genów (ang. Gene Ontology – GO), dane z analiz oddziaływań białko-DNA oraz białko-białko oraz bazy ścieżek metabolicznych i sieci regulatorowych. W obliczu ciągłego dodawania do baz nowych informacji oraz modyfikacji już istniejących, konieczne jest stałe opracowywanie różnych metod obliczeniowych oraz zaawansowanych algorytmów w celu identyfikacji zależności między analizowanymi źródłami, efektywnego filtrowania danych według zadanych parametrów oraz integracji zebranych informacji (Shaik i Ramakrishna, 2014; Rawat i in., 2015).

2.4.2. Weryfikacja potencjalnego zaangażowania zidentyfikowanych genów w wykształcenie badanej cechy

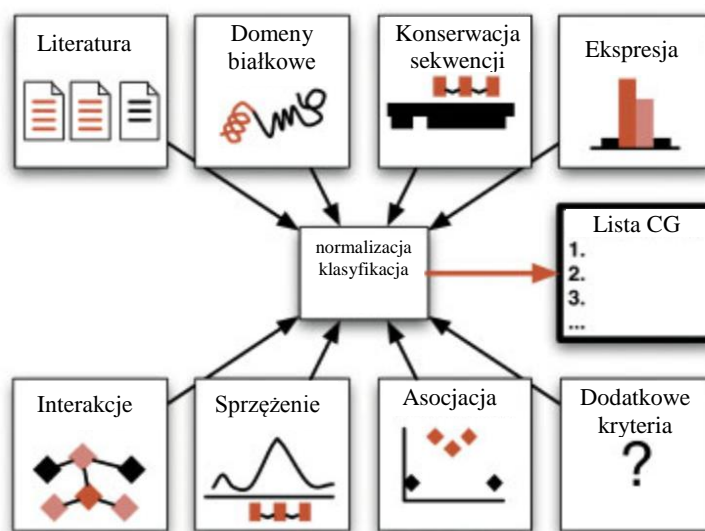
Kluczowym etapem strategii genów kandydackich jest zawężenie liczby zidentyfikowanych genów do grupy, która z największym prawdopodobieństwem odpowiedzialna jest za wykształcenie analizowanej cechy. W genetyce roślin powszechnie stosowane są dwie strategie. Obie metody wymagają analizy sekwencji wyselekcjonowanych CG pod względem identyfikacji polimorfizmów różnicujących między sobą analizowane genotypy (Pflieger i in., 2001).

Pierwsza z metod polega na pozycjonowaniu zidentyfikowanych, funkcjonalnych genów kandydackich na mapie genetycznej oraz analizie ich kolokalizacji ze zmapowanymi QTL dla analizowanych cech. Podstawą tego podejścia jest konstruowanie wysokorozdzielczych molekularnych map funkcjonalnych (ang. molecular-function maps), wysyconych markerami opartymi o polimorfizm wewnątrzgenowy, na których dodatkowo lokalizowane są zidentyfikowane polimorficzne geny kandydackie (Tondelli i in., 2006). Geny wykazujące istotne statystycznie sprzężenie z fenotypem badanej cechy ilościowej, reprezentowanym na mapie genetycznej przez region QTL, z dużym prawdopodobieństwem kontrolują wykształcenie tej cechy. W przypadku zidentyfikowanych w rejonach QTL kandydatów pozycyjnych, stosowane są narzędzia mające na celu wyłonienie genów bezpośrednio zaangażowanych w badany proces, np. analiza Ontologii Genów. Mapowanie QTL nie jest jednak pozbawione wad. Wykorzystanie populacji mapujących o ograniczonej liczbie osobników redukuje rozdzielczość mapowania, czego wynikiem jest identyfikacja dużych fragmentów chromosomów reprezentujących zmapowane QTL, które mogą zawierać wiele genów. Inną niedogodnością jest fakt, że te same cechy w różnych populacjach mapujących mogą być reprezentowane przez QTL zlokalizowane w różnych rejonach genomu (Pflieger i in., 2001; Mir i in., 2012).

Druga strategia polega na identyfikacji istotnych statystycznie asocjacji między polimorfizmami zidentyfikowanymi w sekwencjach CG, a zmiennością fenotypową wśród populacji niespokrewnionych osobników. Strategia mapowania asocjacyjnego umożliwia mapowanie loci cech ilościowych, opierając się na zjawisku nielosowej asocjacji alleli w różnych loci (ang. linkage disequilibrium – LD). Zaletą mapowania asocjacyjnego jest wykorzystanie potencjału wszystkich zdarzeń rekombinacyjnych, które miały miejsce w trakcie ewolucji analizowanego gatunku, brak konieczności wyprowadzania populacji mapującej, co skraca czas prowadzonych badań, a także

możliwość zastosowania tego samego panelu niespokrewnionych osobników do analizy różnych cech fenotypowych oraz możliwość identyfikacji rzadkich alleli, mogących mieć wpływ na wykształcenie badanej cechy (Thudi i in., 2014; Hallingbäck i in., 2016).

Najnowszą metodą, stosowaną dotychczas głównie w identyfikacji genetycznych determinantów chorób u ludzi, jest priorytetyzacja genów kandydackich (ang. CG prioritization) zidentyfikowanych poprzez przeszukiwanie dostępnych baz danych (Moreau i Tranchevent, 2012). Strategia ta opiera się na stworzeniu rankingu zidentyfikowanych *in silico* genów przez sklasyfikowanie ich według potencjalnego znaczenia w wykształceniu analizowanej cechy (Rysunek 2.2.). Powstało wiele aplikacji do klasyfikacji głównie ludzkich i zwierzęcych genów kandydackich, aczkolwiek stworzono również narzędzie AraNet zaimplementowane dla modelowej rośliny *Arabidopsis thaliana* (Lee i in., 2010). Obecnie dostępne aplikacje szeregują zidentyfikowane geny kandydackie na podstawie homologii ich sekwencji z genami dobrze scharakteryzowanymi funkcjonalnie, biorąc pod uwagę również dane o ich ekspresji, białkowych domenach funkcjonalnych, przypisanych ontologiach oraz inne dane eksperymentalne. W procesie tym stosuje się modele matematyczne do analizy statystycznej interakcji analizowanych genów z zadaniem kryterium fenotypowym (Masoudi-Nejad i in., 2012).



Rysunek 2.2. Diagram ilustrujący strukturę działania programu do priorytetyzacji genów kandydackich CANDID. Analizowane geny są klasyfikowane według ośmiu różnych kryteriów, następnie otrzymane wyniki są normalizowane oraz ważone według zadanych przez użytkownika parametrów, czego wynikiem jest lista genów kandydackich uszeregowanych pod względem największego prawdopodobieństwa zaangażowania w analizowany proces (Hutz i in., 2008; zmienione).

Finalnym etapem strategii genów kandydackich jest przeprowadzenie eksperymentów, mających na celu potwierdzenie zaangażowania zidentyfikowanych genów w wykształcenie analizowanego fenotypu. Tylko geny o udowodnionym wpływie na zmienność badanej cechy tłumaczą jej podłoże genetyczne i mogą być wykorzystane w programach hodowlanych, w celu introgresji pożądaných alleli w nowe tło genetyczne. Metodami wykorzystywanymi w tym celu są m.in. TILLING (ang. targeting induced local lesions in genomes), interferencja RNA (ang. RNA interference – RNAi) oraz transformacja genetyczna (Kumar i in., 2017). Wybór odpowiedniej metody zależy od analizowanej cechy oraz gatunku będącego przedmiotem badań. TILLING polega na zastosowaniu klasycznej mutageny chemicznej w celu stworzenia licznej populacji osobników badanego gatunku, niosących w genomie indukowane mutacje punktowe. W kolejnym etapie, z wykorzystaniem wysokoprzepustowych technik, przeprowadzana jest identyfikacja mutacji w analizowanym genie kandydackim wśród roślin po traktowaniu mutagenicznym, a także analiza wpływu znalezionych polimorfizmów na funkcję białka oraz fenotyp mutantów. Zaletą strategii jest możliwość jej zastosowania dla każdego gatunku, bez względu na poziom ploidalności oraz wielkość jego genomu, aczkolwiek TILLING nie jest wystarczająco informatywny w przypadku przynależności badanego genu do rodziny wielogenowej (Kurowska i in., 2011; Taheri i in., 2017). Interferencja RNA jest metodą posttranskrypcyjnego wyciszania ekspresji genów, polegającą na specyficznej degradacji powstałego mRNA. Do komórek roślinnych wprowadzane są cząsteczki dwuniciowego RNA (ang. double stranded RNA – dsRNA), o sekwencji komplementarnej do transkryptu genu kandydackiego, które stają się substratem dla enzymu Dicer, tnącego je na krótkie 21-24 nukleotydowe małe interferujące RNA (ang. small interfering RNA – siRNA). Następnie, siRNA wiążą się z białkowym kompleksem RISC, stając się matrycą dla degradacji komplementarnych cząsteczek mRNA badanego genu (Kola i in., 2015). Szeroko stosowaną metodą jest transformacja genetyczna, polegająca na wprowadzeniu obcego DNA do sekwencji badanego genu kandydackiego, co powoduje jego inaktywację (*knock-out*) i zablokowanie syntezy białka, co w bezpośredni sposób przekłada się na zmianę fenotypu transformantów. U roślin, najczęściej wykorzystuje się mutagenezę insercyjną, polegającą na transformacji z wykorzystaniem wektora zawierającego elementy transpozycyjne lub fragment T-DNA plazmidu *Ti Agrobacterium tumefaciens*. Ograniczeniem transformacji genetycznej jest konieczność stworzenia licznej populacji transformantów, ze względu na małą efektywność wprowadzenia transgeny w swoistym

locus. Ponadto, metody wydajnej regeneracji roślin w warunkach kultury *in vitro* nie są dostępne dla wszystkich gatunków (Duangpan i in., 2013; Liu i in., 2016). Najnowszą techniką inżynierii genetycznej, wykorzystywaną m.in. w inaktywacji badanych genów, jest edycja genomu z wykorzystaniem systemu CRISPR/Cas9 (ang. clustered regularly interspaced short palindromic repeats/Cas9), stanowiącego naturalny mechanizm nabytej odporności bakterii na infekcje wirusowe (Xing i in., 2014). Metoda ta polega na wprowadzeniu do badanego genomu konstruktów zawierających geny dla syntetycznej cząsteczki sgRNA (ang. single-guide RNA), komplementarnej do fragmentu DNA w obrębie genu kandydackiego, oraz dla enzymu nukleolitycznego Cas9, pochodzącego z bakterii *Streptococcus pyogenes*. Cząsteczki sgRNA odpowiadają za precyzyjne rozpoznanie docelowej sekwencji DNA, będącej substratem dla enzymu Cas9, który generuje w tym miejscu genomu podwójne pęknięcie nici DNA. Następnie, w wyniku komórkowego mechanizmu niehomologicznego łączenia końców (ang. non-homologous end joining – NHEJ), dochodzi do insercji lub delecji krótkiego fragmentu DNA oraz zmiany ramki odczytu, co implikuje powstanie niefunkcjonalnego białka lub przedwczesnego kodonu stop, kończącego translację. Główną zaletą metody CRISPR/Cas9 jest wysoka specyficzność, pozwalająca na wprowadzenie pęknięć DNA w ściśle określonych miejscach w obrębie docelowych genów. Ponadto, możliwa jest jednoczesna edycja kilku miejsc genomu w jednym eksperymencie (Liu i in., 2016; Joung i in., 2017).

2.5. Wykorzystanie molekularnych map funkcjonalnych w identyfikacji genów kandydackich dla loci cech ilościowych związanych z reakcją na stres niedoboru wody u zbóż

Zastosowanie w mapowaniu QTL wysokorozdzielczych map genetycznych wysyconych markerami opartymi o polimorfizm wewnątrzgenowy, na których dodatkowo zlokalizowano szereg funkcjonalnych genów kandydackich związanych z reakcją na deficyt wody, umożliwiło kompleksowe podejście do poznania molekularnych podstaw tolerancji zbóż na stres suszy. Molekularne mapy funkcjonalne nie tylko umożliwiły wytypowanie genów, które z dużym prawdopodobieństwem zaangażowane są w regulację badanego procesu, ale były również źródłem markerów funkcjonalnych dla analizowanych cech. Markery tego typu prezentują polimorfizm w obrębie sekwencji kodujących zidentyfikowanych genów, który w sposób bezpośredni wpływa na zmienność analizowanego fenotypu (Cattivelli i in., 2008; Poczai in., 2013).

Markery funkcjonalne są zatem idealnym narzędziem dla MAS, umożliwiającym precyzyjne wprowadzenie do genomu roślin uprawnych alleli warunkujących wykształcenie pożądanых cech, unikając niebezpieczeństwa rozsegregowania genu i sprzężonego z nim markera w procesie mejotycznej rekombinacji (Salgotra i in., 2014).

Opublikowano wiele prac związanych z mapowaniem QTL u istotnych gospodarczo przedstawicieli rodziny *Poaceae*, co umożliwiło identyfikację chromosomowych rejonów kontrolujących zmienność cech charakteryzujących odpowiedź na deficyt wody oraz kształtowanie się plonu w czasie suszy (Cattivelli i in., 2008; Hu i Xiong, 2014). Zestawienie zmapowanych u jęczmienia QTL dla cech związanych z reakcją na stres suszy przedstawiono w Tabeli 2.1. Najwięcej uwagi poświęcono analizom komponentów bilansu wodnego oraz morfologii liści i korzeni. Ukazały się tylko dwie prace dotyczące mapowania QTL dla wielu parametrów szybkiej kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* oraz wydajności reakcji fotochemicznych PSII (Guo i in., 2008; Wójcik-Jagła i in., 2013). Niewiele uwagi poświęcono mapowaniu QTL dla zawartości związków chemicznych. Zidentyfikowano jedynie chromosomowe rejony kontrolujące poziom cukrów rozpuszczalnych w wodzie (ang. water soluble carbohydrates – WSC) oraz zawartość proliny (Teulat i in., 2001; Diab i in., 2004; Sayed i in., 2012; Fan i in., 2015). Najnowsze publikacje, wydane w 2017 roku, dotyczą mapowania mQTL (ang. metabolomic QTL) dla zawartości metabolitów wtórych. Wyznaczono chromosomowe rejony kontrolujące zawartość glutationu, skrobi, glicyny, bursztynianów, γ -tokoferolu oraz % α -tokoferolu w puli tokoferoli (Templer i in., 2017), a także mQTL dla zawartości metabolitów wtórnych, głównie z grupy glikozydów flawonowych i kwasów ferulowych (Piasecka i in., 2017).

Osobną kategorię stanowią prace mające na celu analizę QTL dla cech związanych ze zdolnością plonotwórczą. Przedmiotem badań u jęczmienia były takie parametry, jak: wysokość roślin, masa tysiąca ziaren, liczba i długość kłosów, plon, wyleganie, masa ziarna z rośliny, czy też masa ziarna z kłosa (Ren i in., 2013; Mansour i in., 2014; Mikołajczak i in., 2016). Analizy struktury plonu z roślin poddanych stresowi suszy nie służą zazwyczaj poznaniu mechanizmów leżących u podstawy tolerancji, lecz jedynie identyfikacji tych rejonów genomu, które mogą być następnie na drodze MAS wprowadzone w inne tło genetyczne, celem kreowania odmian lepiej plonujących w niesprzyjających warunkach (Salvi i Tuberosa, 2005; Fang i Xiong, 2015).

Przykładem wykorzystania mapy funkcjonalnej u jęczmienia jest praca Diab'a i zespołu (2004), którzy do mapy genetycznej stworzonej przez zespół Teulat'a (2002)

dołączyli 33 nowe markery oparte o sekwencje genów kandydackich i dEST (ang. differentially expressed sequence tags) oraz zidentyfikowali 68 QTL dla cech charakteryzujących bilans wodny analizowanych genotypów w czasie suszy. Materiał badawczy stanowiła populacja 167 linii RIL otrzymana z krzyżówki tolerancyjnej na suszę odmiany ‘Tadmor’ z odmianą ‘Er/Apm’, charakteryzującą się adaptacją do warunków umiarkowanego nawodnienia. Zidentyfikowano 12 genów kandydackich kolokalizujących z 19 rejonami genomu dla QTL w chromosomach 2H, 3H i 7H. Przykładem jest gen *Acl3* kodujący białkowy nośnik grup acylowych uczestniczący w syntezie kwasów tłuszczowych, zmapowany w przedziale ufności QTL dla względnej zawartości wody oraz zawartości rozpuszczalnych cukrów w stanie maksymalnego uwodnienia liścia.

Tondelli i współpracownicy (2014), na mapie genetycznej jęczmienia zawierającej 543 markery DArT, SNP i SSR, stworzonej dla populacji mapującej linii DH uzyskanej z krzyżowania odmian ‘Nure’ x ‘Tremois’, zlokalizowali 35 genów kandydackich, związanych głównie z kontrolą czasu kwitnienia oraz kodujących czynniki transkrypcyjne, a także szereg QTL dla struktury plonu. Fenotypowanie osobników populacji mapującej przeprowadzono w osiemnastu różnych lokalizacjach rejonu basenu Morza Śródziemnego różniących się warunkami nawodnienia. Wykazano kolokalizację genu *HvCEN* z chromosomu 2H oraz genu *VRN-H1* z chromosomu 5H z loci cech ilościowych dla m.in. plonu ziarna, masy tysiąca ziaren, wysokości roślin oraz czasu kwitnienia. Ekspresja ortologów analizowanych genów u roślin modelowych związana jest z regulacją procesu wernalizacji oraz terminu dojrzewania ziarniaków w warunkach krótkiego i długiego dnia.

Populacja mapująca 110 linii RIL pszenicy twardej (*Triticum durum* Desf.), otrzymana z krzyżowania odmian ‘Tamgurt’ x ‘Cham 1’ stanowiła materiał badawczy do analizy QTL dla cech związanych z bilansem wodnym, transpiracją oraz wydajnością procesu fotosyntezy w trzech różnych wariantach nawodnienia (Diab i in., 2008). Podstawą pozycjonowania 335 loci cech ilościowych była mapa genetyczna zawierająca łącznie 422 markery RFLP, AFLP, SSR oraz 37 sekwencji dEST i 9 genów kandydackich. Analiza kolokalizacji pozwoliła na identyfikację 6 genów kandydackich oraz 19 sekwencji dEST w regionach genomu reprezentowanych przez QTL dla takich cech, jak: zawartość chlorofilu, indeks fluorescencji, wydajność kwantowa fotosystemu II, potencjał osmotyczny i wydajność transpiracji. Wśród produktów zidentyfikowanych genów wyróżniono m.in. kinazy białkowe, dekarboksylazę argininy, oksydazę

glutationową, białko wczesnego kwitnienia, białko transportujące cukry, fosfatazę oraz lipooksygenazę.

Sehgal i współpracownicy (2012) podjęli próbę wysokorozdzielczego mapowania regionu DT-QTL zidentyfikowanego w grupie sprzążeń LG2 na mapie genetycznej rozplenicy perłowej (*Pennisetum glaucum* L.). Jest to gatunek z rodziny *Poaceae*, pod względem wielkości areалу upraw zajmujący szóstą pozycję na świecie wśród zbóż, uprawiany głównie w warunkach skrajnego niedostatku wody i wysokiej temperatury na terenie krajów rozwijających się Afryki i Półwyspu Indyjskiego. Zidentyfikowano 75 markerów SNP i CISP (ang. conserved intron spanning primer) na podstawie analizy syntenii z genomem ryżu oraz homologii sekwencji EST rozplenicy z genami roślin modelowych, zaangażowanymi w wykształcenie tolerancji na stres suszy. Następnie, markery te włączono do istniejącej mapy genetycznej tego gatunku. Rejon DT-QTL dla cech związanych z potencjałem plonotwórczym w warunkach niedoboru wody został wysycony 18 markerami GTM, kodującymi m.in. białko wiążące chlorofil *a/b*, kinazę serynowo-treoninową, aminotransferazę alaninową, oksydazę oraz karboksylazę acetylo-CoA.

Tabela 2.1. Zestawienie QTL zmapowanych dla cech związanych z tolerancją na stres suszy u jęczmienia

Kategoria fenotypowa	Mapowane cechy	Chromosom	Rodzice populacji mapującej	Wielkość populacji mapującej	Typ populacji mapującej	Literatura
Parametry wzrostu i morfologia liści	RWC, NT, NL, TSFM, TSDM	1H, 2H, 5H, 6H, 7H	'Tadmor' x 'ER/Apm'	187	RIL	Teulat i in., 1997
Bilans wodny	RWC, OP, OP ₁₀₀	1H, 2H, 6H, 7H	'Tadmor' x 'ER/Apm'	187	RIL	Teulat i in., 1998
Bilans wodny i zawartość cukrów rozpuszczalnych w wodzie	RWC, OP, OP ₁₀₀ , OA, WSC, WSC ₁₀₀ , CWC, SA	1H, 2H, 4H, 5H, 7H	'Tadmor' x 'ER/Apm'	167	RIL	Teulat i in., 2001
Bilans wodny	RWC	2H, 5H, 6H, 7H	'Tadmor' x 'ER/Apm'	167	RIL	Teulat i in., 2003
Bilans wodny i zawartość cukrów rozpuszczalnych w wodzie	RWC, OP, OP ₁₀₀ , WSC, WSC ₁₀₀ , Δ	1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H	'Tadmor' x 'ER/Apm'	167	RIL	Diab i in., 2004
Zawartość chlorofilu i parametry fluorescencji chlorofilu <i>a</i>	F ₀ , F _v , F _v '/F _m ', F _m , Chl	1H, 2H, 4H, 5H, 6H, 7H	'Arta' x <i>H. spontaneum 41-1</i>	194	RIL	Guo i in., 2008
Struktura plonu, parametry wzrostu i fluorescencja chlorofilu <i>a</i>	DH, DM, FP, GV, GY, KW, LDG, PED, PEDEX, PH, SL, DOR, SPD, WILT	1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H	'Tadmor' x 'ER/Apm'	158	RIL	Von Korff i in., 2008
Bilans wodny, morfologia liści i korzeni	TW, RER, RCR, REG, OSM, RWC, L1L, L2L, RL	1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H	'WQ23-38' x 'MA10-30'	134	F ₄	Chen i in., 2010
Struktura plonu, bilans wodny, czas kwitnienia, morfologia liści i korzeni	Y/PI, SL, TGW, RL, FT, DW, OP, OP ₁₀₀ , RWC, OA	1H, 2H, 3H, 5H, 6H, 7H	'OWB _{DOM} ' x 'OWB _{REC} '	94	DH	Szira i in., 2011
Zawartość proliny i morfologia liści	PC, WS	1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H	'Scarlett' x 'ISR42-8'	301	BC ₂ DH	Sayed i in., 2012
Parametry fluorescencji chlorofilu <i>a</i> , wydajność fotosystemu II, bilans wodny i integralność błon komórkowych	WC, EL, A, F _v '/F _m , qP, Φ _{PSII} , ABS/CS, ET ₀ /CS, TR ₀ /CS, DI ₀ /CS, RC/CS, PI	2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H	'STH836' x 'STH754'	183	F ₂	Wójcik-Jagła i in., 2013
Struktura plonu i termin kłoszenia	YLD, DH, PH, MAT, TGW, HEC, WID, ARE, POW	1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H	'Orria' x 'Plaisant'	120	RIL	Mansour i in., 2014
Morfologia korzeni i parametry wzrostu	RL, RDW, RV, TIL, GH	1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H	'Scarlett' x 'ISR42-8'	40	BC ₂ DH	Naz i in., 2014
Bilans wodny, struktura plonu i wydajność fotosystemu II	BMD, BMF, PH, TIL, PAM, RWC, SPAD, WC	1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H	'Scarlett' x 'ISR42-8'	47	IL	Honsdorf i in., 2014

Tabela 2.1. cd.

Kategoria fenotypowa	Mapowane cechy	Chromosom	Rodzice populacji mapującej	Wielkość populacji mapującej	Typ populacji mapującej	Literatura
Bilans wodny i zawartość proliny	DT, RWC, PC	2H, 3H, 5H	'TX9425' x 'Franklin'	72	DH	Fan i in., 2015
Parametry wzrostu i morfologia liści	Mat, Ev, Lrol, Lwax, SPAD, NDVI	1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H	'Commander' x 'Fleet'	229	DH	Obsa i in., 2016
			'Commander' x 'WI4304'	228		
			'Fleet' x 'WI4304'	229		
Bilans wodny, struktura plonu i fluorescencja chlorofilu <i>a</i>	PL, PE, SL, PH, TN, DWT, BY, HW, HI, KS, TKW, GY, RWC, IPAR, F _v '/F _m '	1H, 2H, 3H, 4H, 5H, 6H, 7H	<i>H. spontaneum</i> Caeserea 26-2 x 'Harrington'	137	RCSL	Mora i in., 2016
Metabolity wtórne	Zawartość glutationu, skrobi, glicyny, bursztynianów, γ -tokoferolu oraz % α -tokoferolu w puli tokoferoli	2H, 3H, 5H, 6H, 7H	–	81	Zestaw różnych genotypów jęczmienia jarego	Templer i in., 2017
Metabolity wtórne	Ogółem zawartość 98 związków, w tym glikozydy flawonowe i kwasy ferulowe	1H, 2H, 3H, 5H, 6H, 7H	'Maresi' x Cam/B1/CI	100	RIL	Piasecka i in., 2017
			'Georgie' x 'Harmal'	100		
			'Lubuski' x Cam/B1/CI	100		

Alfabetyczne objaśnienie skrótów: A – intensywność fotosyntezy netto, ABS/CS - ilość energii zaabsorbowanej przez anteny PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia, ARE – powierzchnia ziaren, BMD – sucha biomasa, BMF – świeża biomasa, BY – plon, Chl – zawartość chlorofilu, CWC – udział dostosowania osmotycznego w zmianie zawartości wody, DH – termin kłoszenia, DI₀/CS - ilość energii rozproszonej z PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia, DM – termin dojrzałości ziaren, DOR – spoczynek nasion, DT – tolerancja suszy, DW – sucha masa, DWT – sucha masa w stadium krzewienia, EL – wyciek elektrolitów, ET₀/CS - ilość energii wykorzystanej do transportu elektronów w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia, F₀ – fluorescencja początkowa, F_m – fluorescencja maksymalna, FP – okres wypełniania ziaren, FT – czas kwitnienia, Ev – wczesna witalność, F_v – fluorescencja zmienna, F_v'/F_m' – efektywność przechwycenia energii wzbudzenia przez centra aktywne PSII, GH – pokrój wzrostu, GV – witalność fazy wczesnego wzrostu, GY – plon ziarna, HEC – masa hektolitra, HI – współczynnik plonu, HW – masa hektolitra ziaren, KS – liczba ziaren z kłosa, KW – masa ziaren, IL – linie introgresywne, IPAR – przechwycona energia świetlna, L1L – długość pierwszego liścia, L2L – długość drugiego liścia, LDG - wyleganie, Lrol – związanie się liści, Lwax – woskowość liści, MAT – termin dojrzałości ziaren, NDVI – znormalizowany wskaźnik różnicowanej vegetacji, NL – liczba liści, NT – liczba źdźbeł, OA – dostosowanie osmotyczne, OP – potencjał osmotyczny, OP₁₀₀ – potencjał osmotyczny w pełnym turgorze, OSM - osmolarność, PAM – wydajność PSII, PC – zawartość proliny, PE – odłamywanie dokłosa, PED – długość dokłosa, PEDEX – obłamywanie dokłosa, PH – wysokość roślin, PI – wskaźnik wydajności PSII obliczony na podstawie absorpcji energii, PL – długość dokłosa, POW – wrażliwość na mączniaka prawdziwego, qP – fotochemiczne wygaszanie fluorescencji, RC/CS – liczba aktywnych centrów reakcji, RCR – wskaźnik regeneracji roślin po suszy, RCSL – linie substytucyjne zrekombinowanych chromosomów, RDW – sucha masa korzeni, REG – odrastanie pędu, RER – względne tempo wydłużania liścia, RL – długość korzeni, RV – objętość korzeni, RWC – względna zawartość wody, SA – zawartość substancji rozpuszczalnych w wodzie, SL – długość pędu, SPAD – zawartość chlorofilu w liściach, SPD – fluorescencja chlorofilu, TGW – masa tysiąca ziaren, TIL – liczba rozkrzewień, TKW – masa tysiąca ziaren, TN – liczba rozkrzewień, TR₀/CS - ilość energii zatrzymanej w PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia, TSDM – całkowita sucha masa pędów, TSFM – całkowita świeża masa pędów, TW – czas do wędnięcia, WC – zawartość wody, WID – szerokość ziaren, WILT – współczynnik wędnięcia, WS – wędnięcie liści, WSC – zawartość cukrów rozpuszczalnych w wodzie, WSC₁₀₀ - zawartość cukrów rozpuszczalnych w wodzie w pełnym turgorze, YLD – plon ziarna, Y/PI – plon/roślinę, Δ – dyskryminacja izotopu węgla, Φ_{PSII} – maksymalna wydajność kwantowa PSII

3. Materiał i metody

3.1. Materiał roślinny

Materiał badawczy wykorzystany w niniejszej pracy stanowiły trzy populacje rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL) pokolenia F₈, liczące po 100 linii każda oraz ich formy rodzicielskie. Populacje mapujące wyprowadzone zostały z krzyżowań odmian europejskich oraz syryjskich odmian i linii hodowlanych jęczmienia jarego: ‘Maresi’ x Cam/B1/CI08887//CI05761 (populacja MCam), ‘Georgie’ x ‘Harmal’ (populacja GH) oraz ‘Lubuski’ x Cam/B1/CI08887//CI05761 (populacja LCam). Uzyskane zostały metodą SSD w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk (IGR PAN) w Poznaniu. Odmiany rodzicielskie wybrane zostały na podstawie wyników badań prowadzonych przez Górnego i współpracowników (Krzemińska i Górny, 2003; Górny i Ratajczak, 2008) pod kątem wrażliwości na stres suszy. Polska odmiana ‘Lubuski’, półkarłowa niemiecka odmiana ‘Maresi’ oraz brytyjska ‘Georgie’, charakteryzują się dobrym plonowaniem w klimacie europejskim. Natomiast syryjska odmiana ‘Harmal’ oraz linia Cam/B1/CI08887//CI05761 (nazywana dalej Cam/B1/CI), wyhodowane w ośrodku ICARDA, wykazują zwiększoną tolerancją na deficyt wody. Charakteryzują się szybkim tempem wzrostu i wyklaszania, bujnym systemem korzeniowym oraz efektywnym pobieraniem składników pokarmowych z gleby, a także lepszym wykorzystaniem azotu i fosforu. Ponadto, w porównaniu z odmianami europejskimi, wydajniej wykorzystują wodę oraz wykazują zwiększoną aktywność fotosyntetyczną liści w warunkach stresu. Populacje RIL MCam i GH analizowane były w ramach niniejszej pracy doktorskiej, natomiast populacja LCam badana była w IGR PAN, a uzyskane wyniki posłużyły do skonstruowania mapy konsensusowej.

3.2. Izolacja genomowego DNA

Do izolacji DNA wykorzystano liście zebrane z dwutygodniowych siewek roślin uprawianych w kontrolowanych warunkach pokoju hodowlanego, w temperaturze 20°C dla dnia oraz 18°C dla nocy, fotoperiodzie 16/8 godzin oraz natężeniu światła 200 $\mu\text{Em}^{-2}\text{s}^{-1}$. Liście zebrane z trzech osobników każdej linii RIL populacji MCam i GH oraz odmian rodzicielskich zostały umieszczone w woreczkach strunowych, zawierających żel krzemionkowy (Sigma-Aldrich), w celu wysuszenia tkanki. Po upływie tygodnia od umieszczenia materiału w żelu krzemionkowym pobrano po jednocentymetrowym fragmencie każdego z trzech liści, które następnie umieszczono wraz z sześcioma

szklanymi kulkami (Sigma-Aldrich) w próbówce typu eppendorf o pojemności 2,2 ml. Tkanę ucierano w młynie elektrycznym FastPrep®-24 (MP Biomedicals) przez 60 sekund z prędkością 4 m/s aż do uzyskania homogennego proszku.

Genomowy DNA izolowano z poszczególnych linii RIL oraz genotypów rodzicielskich z zastosowaniem metody micro C-TAB (Doyle i Doyle, 1987) zmodyfikowanej w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego, według następującego protokołu:

1. W łaźni wodnej o temperaturze 60°C podgrzewano bufor ekstrakcyjny C-TAB (Aneks 1. Tabela 10.1.) w próbówce typu conical o pojemności 50 ml.
2. Do utartych próbek dodawano 1 ml buforu C-TAB i delikatnie mieszano.
3. Próbkę inkubowano w temperaturze 60°C przez 30 min., delikatnie mieszając co 10 min.
4. Do próbek dodawano 800 µl roztworu chloroform – alkohol izoamyłowy (24:1) i dokładnie mieszano.
5. Całość wirowano 20 min. w temperaturze 4°C przy 18 000 g.
6. Fazę górną przepipetowano do nowej próbki typu eppendorf o pojemności 2,2 ml.
7. Do próbek ponownie dodano po 700 µl roztworu chloroform – alkohol izoamyłowy (24:1) i wymieszano.
8. Próbkę wirowano 10 min. w temperaturze 4°C przy 18 000 g.
9. Fazę wodną przeniesiono do nowych probówek typu eppendorf o pojemności 1,5 ml i dodano 1 ml 96% etanolu w celu wytrącenia osadu kwasów nukleinowych.
10. Wirowano 20 min. w temperaturze 4°C przy 18 000 g.
11. Delikatnie usunięto supernatant.
12. Osad przemyto poprzez dodanie 1 ml 70% etanolu i mieszanie poprzez kilkukrotne odwrócenie probówek.
13. Wirowano 3 min. w temperaturze 4°C przy 18 000 g, po czym usunięto supernatant.
14. Powtórzono punkty 12-13.
15. Osad suszono z wykorzystaniem próżniowego koncentratora SpeedVac (Savant) przez 5 min.
16. Osad rozpuszczono w 100 µl buforu TE (Aneks 1. Tabela 10.2.) w temperaturze 4°C przez noc.

17. Do osadu dodano 1 μ l RNAzy (10 mg/ml, Sigma-Aldrich) i inkubowano w łaźni wodnej w temperaturze 37°C przez 40 min.

18. Wyizolowany DNA przechowywano w temperaturze -20°C.

3.2.1. Pomiar koncentracji i czystości wyizolowanego DNA

Koncentrację i jakość wyizolowanego DNA określano przy pomocy spektrofotometru Uv-Vis NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific). Koncentracja wyrażona w ng/ μ l szacowana była na podstawie pomiaru absorbancji światła przez cząsteczki DNA przy fali o długości 260 nm. Natomiast współczynnik uzyskany z ilorazu stosunku absorbancji światła przy długości fal 260 nm do 280 nm pozwolił na określenie ilości zanieczyszczeń białkowych i RNA w próbkach DNA.

3.3. Markery SSR

Wyboru markerów SSR do badań dokonano po przeanalizowaniu dostępnych dla jęczmienia map genetycznych stworzonych przede wszystkim w oparciu o markery mikrosatelitarne. Była to mapa skonstruowana dla populacji mapującej linii DH z krzyżówki ‘Lina’ x *H. spontaneum* (Ramsay i in., 2000) oraz mapa konsensusowa stworzona dla sześciu różnych populacji jęczmienia, w tym czterech populacji linii DH z krzyżówek ‘Steptoe’ x ‘Morex’, ‘OWBrec’ x ‘OWBdom’, ‘Igri’ x ‘Franka’ i ‘Lina’ x *H. spontaneum* oraz dwóch populacji RIL z krzyżówek ‘L94’ x ‘Vada’ i ‘SusPtrit’ x ‘Vada’ (Varshney i in., 2007). Łącznie do analizy wybrano 276 par starterów flankujących loci SSR. Przy wyborze markerów do badań kierowano się następującymi kryteriami: równomiernym rozmieszczeniem loci we wszystkich siedmiu chromosomach jęczmienia, dobrą jakością produktu (wyrażoną w skali 1-5; Smulders i in., 1997), wysokim indeksem zróżnicowania genetycznego (ang. diversity index – DI; Weir, 1990) oraz wysoką wartością informatywności polimorfizmu (ang. polymorphism information content – PIC; Anderson i in., 1993), pozwalającymi wstępnie określić zdolność markerów do rozróżniania genotypów. Analizę przeprowadzono dla populacji RIL MCam i GH oraz ich form rodzicielskich.

3.3.1. Amplifikacja loci SSR

Standardową mieszaninę do amplifikacji PCR dla poszczególnych loci mikrosatelitarnych przygotowywano w sposób przedstawiony poniżej (skład dla jednej próbki):

• ddH ₂ O	6,65 μl
• 10 x PCR bufor	1,00 μl
• dNTPs (5mM, Promega)	0,40 μl
• starter <i>forward</i> (50 ng/μl, Sigma-Aldrich)	0,30 μl
• starter <i>reverse</i> znakowany IRDye 800 (50 ng/μl, IBB PAN, Warszawa)	0,30 μl
• DyNAzyme II DNA Polimeraza (2 U/μl, Finnzymes)	0,10 μl
Całkowita objętość	<hr/> 8,75 μl

Mieszaninę reakcyjną rozdzielano do sterylnych próbek PCR i dodawano po 1,25 μl odpowiedniego DNA rozcieńczonego w sterylnej wodzie do koncentracji 50 ng/μl. Następnie próbki zwirowano i umieszczano w termocyklerze T-Gradient (Biometra), gdzie prowadzono reakcję amplifikacji każdego locus SSR według odpowiedniego programu PCR, w zależności od wykorzystanej pary starterów.

Dla wszystkich wybranych par starterów optymalizowano lub tworzono od nowa programy do ich amplifikacji, w zależności od tego czy dostępne były informacje o warunkach PCR stosowanych przez autorów poszczególnych publikacji. Temperatury przyłączania starterów umożliwiające otrzymanie specyficznego produktu ustalano przeprowadzając amplifikację PCR w gradiencie temperatur. Modyfikacje już istniejących programów polegały głównie na skróceniu czasów poszczególnych etapów PCR.

3.3.2. Wizualizacja produktów PCR

Produkty amplifikacji wizualizowane były w 6% denaturującym żelu poliakrylamidowym (Aneks 1. Tabela 10.3.) o grubości 0,2 mm z wykorzystaniem automatycznego sekwenatora 4300 (Li-Cor) w obecności buforu 1 x TBE (Aneks 1. Tabela 10.4.). Do próbek po amplifikacji PCR dodawano po 4 μl buforu do ładowania z formamidem (Aneks 1. Tabela 10.5.), po czym denaturowano je w termocyklerze w temperaturze 94°C przez 3 minuty, a następnie schładzano na lodzie. Przygotowane w ten sposób próbki oraz marker wielkości 350 pz (Li-Cor) nakładano do żelu w objętości 1 μl. Elektroforezę prowadzono przez 1-3 godziny, w zależności od wielkości analizowanych produktów PCR, przy średniej prędkości skanowania lasera oraz następujących parametrach: 1200 V, 30 mA oraz 30 W.

W celu obniżenia kosztów oraz przyspieszenia genotypowania populacji mapujących zastosowano technikę multiplex, polegającą na wizualizacji kilku loci SSR w jednym żelu. Multiplex stosowano na etapie składania PCR, tworzenia puli produktów po amplifikacji oraz w trakcie elektroforezy. Multiplex na etapie PCR polegał na jednoczesnej amplifikacji dwóch loci SSR w tej samej próbówce, pod warunkiem prowadzenia PCR w tych samych warunkach oraz wyraźnych różnic w wielkości otrzymanych produktów. Mieszanina reakcyjna przygotowywana była w sposób analogiczny do standardowej metody, z tą różnicą, że dodawano tę samą objętość starterów drugiego locus, zmniejszając objętość wody. Możliwym było również tworzenie puli DNA poprzez zmieszanie równych objętości produktów PCR dla maksymalnie pięciu różniących się wielkością loci mikrosatelitarnych. Ostatnim sposobem, stosowanym na etapie elektroforezy, było powtórne ładowanie zarówno próbek z amplifikacji tego samego locus SSR, jak i próbek pochodzących z amplifikacji różnych loci. W tym przypadku wykonywano maksymalnie 3-krotne nałożenie próbek do żelu w 5-20 min. odstępach czasu. Powtórne umieszczanie próbek w żelu poprzedzone było zatrzymaniem bieżącej elektroforezy i przepłukaniem kieszonek żelu buforem.

3.4. Markery SNP

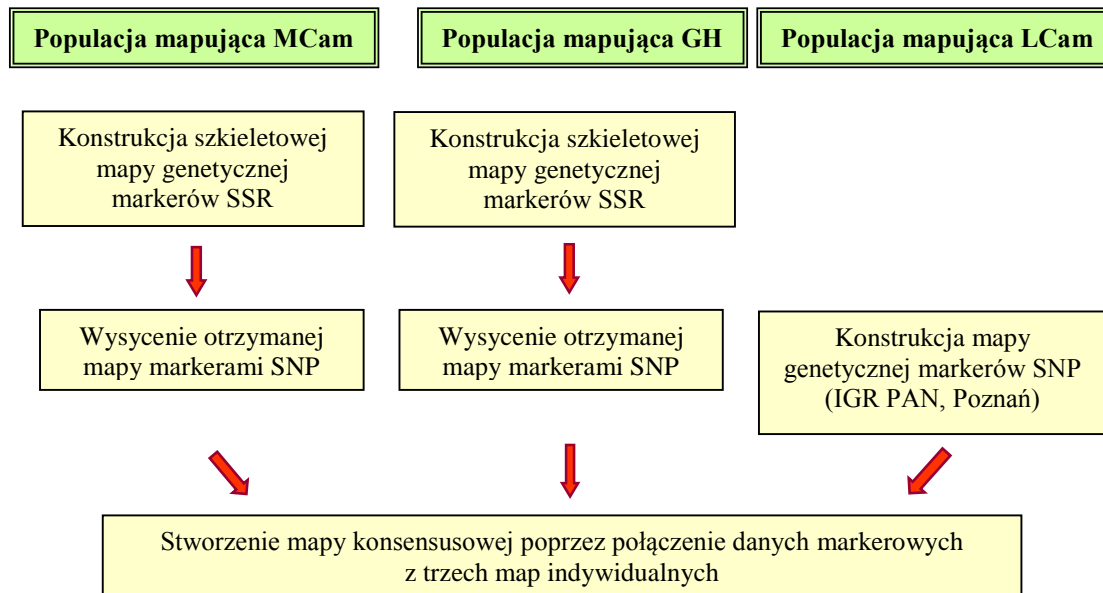
Genotypowanie markerów SNP przeprowadzono, korzystając z komercyjnej platformy GoldenGate firmy Illumina, przy użyciu zestawu markerów BOPA1 (ang. barley oligonucleotide pool assay 1; Close i in., 2009) dedykowanego dla jęczmienia. Platforma ta pozwoliła na przeprowadzenie analizy 1536 loci SNP. Materiał roślinny do genotypowania stanowiły 94 linie RIL populacji M_{Cam} oraz 100 linii RIL populacji G_H, a także ich odmiany rodzicielskie. W przypadku populacji M_{Cam}, konieczne było wykluczenie 6 genotypów z powodu ograniczeń technicznych. Wykluczono linie nr 19, 29, 96, 99, 116 i 127 na podstawie wyników z genotypowania markerów SSR, m.in. zrezygnowano z linii prezentujących wysoki stopień heterozygotyczności. Genotypowanie populacji L_{Cam} oraz analizę wyników przeprowadzono w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk (IGR PAN) w Poznaniu (zadanie nr 2 projektu POLAPGEN-BD).

Zamrożone DNA z wybranych linii RIL populacji M_{Cam} i G_H oraz z form rodzicielskich, wysłano do The Southern California Genotyping Consortium (SCGC), Illumina BeadLab, na Uniwersytecie Kalifornijskim w Los Angeles (UCLA). Otrzymane wyniki genotypowania dokładnie przeanalizowano w celu wytypowania markerów SNP

dobrej jakości. W pierwszej fazie usunięto markery, dla których nie udało się określić genotypu wśród wielu linii RIL oraz loci heterozygotyczne. Następnie wyłoniono markery polimorficzne, różnicujące między sobą formy rodzicielskie populacji mapujących. Wszystkie polimorficzne markery przypisano do poszczególnych chromosomów na podstawie referencyjnej mapy genetycznej jęczmienia (Close i in., 2009).

3.5. Konstruowanie map genetycznych

Pierwszym etapem było skonstruowanie szkieletowych map genetycznych markerów SSR dla populacji mapujących MCam i GH. Z uwagi na fakt, iż stworzone mapy sprzężeń markerów w sposób niedostateczny pokrywały genom jęczmienia, w kolejnym etapie badań zostały one wysyczone markerami SNP, w celu otrzymania lepszego pokrycia genomu oraz zwiększenia rozdzielczości. Mapa genetyczna dla populacji LCam została stworzona przez zespół badawczy z IGR PAN, w oparciu wyłącznie o markery SNP. Finalnym etapem konstruowania map genetycznych było stworzenie mapy konsensusowej, integrującej dane markerowe z trzech map indywidualnych otrzymanych dla każdej z populacji mapujących (Rysunek 3.1.).



Rysunek 3.1. Schemat konstruowania map genetycznych.

3.5.1. Analiza segregacji alleli polimorficznych markerów wśród linii populacji mapujących

Analizę rozpoczęto od wprowadzenia do programu MS Excel 2010 danych o segregacji alleli każdego z polimorficznych markerów SSR oraz SNP. Poszczególnym

genotypom w badanych populacjach mapujących przypisano odpowiednie symbole, mianowicie 'A' dla homozygoty pod względem allelu jak u odmiany europejskiej oraz 'B' dla homozygoty pod względem allelu jak u odmiany syryjskiej. Heterozygoty oznaczano jako 'H', natomiast brak danych o genotypie jako '-'. Markery uszeregowano w kolejności według ich położenia w chromosomach, na podstawie innych map genetycznych jęczmienia. Następnie, manualnie zweryfikowano zarchiwizowane dane w celu wykluczenia potencjalnych błędów genotypowania, występujących głównie pod postacią singletonów (singletonem określano locus, dla którego w określonej linii, stwierdzono inny allel niż dla sąsiadujących loci). W przypadku markerów SSR wszystkie zidentyfikowane singletony zostały powtórnie zgenotypowane. W obu populacjach mapujących wyliczono także częstotliwość pojawiania się heterozygot. Tak przygotowane dane przetworzono w edytorze tekstu na plik wsadowy dla programu JoinMap 3.0 (Van Ooijen i Voorrips, 2001), w którym tworzone były wszystkie mapy genetyczne. Następnie, dla każdego locus określono stosunek rozszczepień alleli i odchylenie od prawidłowej segregacji 1:1 testem χ^2 na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Markery, które prezentowały istotne statystycznie odchylenia od oczekiwanej segregacji alleli 1:1, charakteryzowały się wyraźną tendencją do występowania w grupach, wyraźnie oddzielonych od sąsiadujących rejonów o innym wzorze segregacji. Pozwoliło to na wyodrębnienie regionów SDR (ang. segregation distortion region), gdy co najmniej trzy blisko sprzężone ze sobą markery prezentowały istotne statystycznie odchylenie od oczekiwanej segregacji alleli 1:1 w kierunku tego samego genotypu rodzicielskiego (Li i in., 2010).

3.5.2. Analiza sprzężeń markerów i tworzenie indywidualnych map genetycznych

Analizę rozpoczęto od obliczenia częstości rekombinacji między parami loci, po czym przystąpiono do grupowania markerów według prawdopodobieństwa istnienia między nimi sprzężenia wyrażonego współczynnikiem LOD. Analizowano grupy sprzężeń wyodrębnione na podstawie wartości LOD w zakresie od 3 do 15. W przypadku tworzenia map w oparciu dodatkowo o markery SNP, gdzie analizowano dużą liczbę loci, zmieniona została strategia mapowania, ponieważ nawet przy bardzo wysokiej wartości współczynnika LOD (>10) markery z różnych chromosomów były kwalifikowane do jednej grupy sprzężeń. Aby wyeliminować zjawisko fałszywie pozytywnego sprzężenia loci (ang. pseudo linkage) stworzono nowe pliki wsadowe dla programu JoinMap. Każdy z plików zawierał dane o segregacji alleli oddzielne dla markerów zlokalizowanych

w poszczególnych chromosomach jęczmienia z wykluczeniem markerów z pozostałych chromosomów (na podstawie informacji o ich lokalizacji z referencyjnych map jęczmienia: Ramsay i in., 2000; Varshney i in., 2007; Close i in., 2009). Odległości genetyczne między markerami wyliczono z wykorzystaniem funkcji mapującej Kosambiego, natomiast kolejność ułożenia loci w poszczególnych grupach sprzężeń określano przy następujących parametrach programu $LOD > 1$ i $REC < 0,4$. Finalnie, przypisano grupy sprzężeń do poszczególnych chromosomów oraz weryfikowano poprawność otrzymanej kolejności ułożenia markerów, w oparciu o mapy referencyjne. Wszystkie loci, które mapowały się w nieprawidłowym położeniu bądź zaburzały układ sąsiadujących z nimi markerów zostały wykluczane i procedura szeregowania markerów była powtarzana aż do otrzymania grupy sprzężeń cechującej się poprawną kolejnością ułożenia wszystkich loci. W przypadku kilku grup sprzężeń, dla których ustalenie prawidłowej kolejności markerów było utrudnione, korzystano z funkcji 'fixed order'. Pozwalała ona na zdefiniowanie *a priori* kolejności ułożenia kilku wybranych markerów w grupie sprzężeń, co pozwoliło na stworzenie szkieletu, do którego następnie dołączano pozostałe loci. Skonstruowane mapy genetyczne wizualizowane były w programie MapChart 2.2 (Voorrips, 2002).

3.5.3. Tworzenie mapy konsensusowej

Po skonstruowaniu map indywidualnych stworzono mapę konsensusową integrującą dane markerowe z wszystkich trzech populacji mapujących. Grupy sprzężeń wyodrębnione dla różnych populacji, ale reprezentujące te same odcinki chromosomu oraz zawierające co najmniej dwa wspólne markery zostały połączone z wykorzystaniem funkcji 'combine groups for map integration' programu JoinMap. Kolejność ułożenia loci w grupach sprzężeń oraz genetyczne odległości między markerami zostały wyliczone wg tych samych parametrów oraz tym samym sposobem jak w przypadku map indywidualnych.

3.6. Strategia identyfikacji i mapowania funkcjonalnych genów kandydackich

W niniejszej pracy zidentyfikowane zostały geny kandydackie związane z tolerancją na stres niedoboru wody, które w kolejnym etapie badań były mapowane, w celu stworzenia wysokorozdzielczej mapy funkcjonalnej. Wszystkie analizowane geny poddane zostały sekwencjonowaniu, w celu identyfikacji polimorfizmów różnicujących między sobą rodziców populacji mapujących M_{Cam} lub GH. Następnie, dla

polimorficznych genów opracowano metody genotypowania oraz przeanalizowano segregację ich alleli w populacjach mapujących. Finalnym etapem było określenie chromosomowej lokalizacji zidentyfikowanych genów na stworzonej wysokorozdzielczej mapie jęczmienia.

3.6.1. Wybór genów kandydackich związanych z tolerancją na stres niedoboru wody

Geny do lokalizacji na mapie genetycznej typowano na podstawie dwóch różnych strategii. Pierwszą grupę stanowiło 17 genów wybranych na podstawie literatury, zidentyfikowanych u roślin modelowych, o eksperymentalnie potwierdzonym zaangażowaniu w odpowiedź na stres niedoboru wody (Tabela 3.1.). Geny te kodują białka funkcjonalne oraz regulatorowe o aktywności skorelowanej z wystąpieniem deficytu wody. Drugą grupę stanowiło 39 genów wytypowanych na podstawie wyników różnicowej analizy transkryptomów liści i korzeni dwóch genotypów jęczmienia: odmiany 'Maresi' i linii Cam/B1/CI w odpowiedzi na stres suszy (Janiak, A., niepublikowane, zadanie nr 19 projektu POLAPGEN-BD; Tabela 3.2.). Przy wyborze genów analizowano wyniki pochodzące z eksperymentu mikromacierzowego, dotyczące poziomu ich ekspresji u odmian rodzicielskich populacji MCam w warunkach optymalnego nawodnienia oraz stresu suszy. Wytypowane geny nie były przedmiotem wcześniejszych badań, a prawdopodobnie pełniona przez nie funkcja została określona na podstawie podobieństwa sekwencji w stosunku do genów dobrze scharakteryzowanych pod względem funkcjonalnym u roślin modelowych.

Do lokalizowania na mapie genetycznej włączono również grupę 24 genów jęczmiennych, które wybrano i analizowano we wcześniejszych badaniach prowadzonych w Katedrze Genetyki Uniwersytetu Śląskiego. Dla genów tych zidentyfikowano polimorfizmy, opracowano metody genotypowania oraz przeprowadzono analizę segregacji ich alleli w populacjach RIL w ramach dwóch prac magisterskich (Tabela 3.3 a i b). Źródłem tych genów były zarówno dane literaturowe, jak i wyniki profilowania transkryptomów odmian rodzicielskich populacji MCam.

3.6.2. Identyfikacja jęczmiennej sekwencji genomowej analizowanych CG

Analizę podobieństwa sekwencji, w celu identyfikacji jęczmiennych ortologów genów o potwierdzonym zaangażowaniu w odpowiedź na deficyt wody u roślin modelowych przeprowadzono z zastosowaniem algorytmu BLAST (ang. basic local

Tabela 3.1. Wytypowane z danych literaturowych geny związane z reakcją na stres niedoboru wody, dla których zidentyfikowano jęczmienne ortologi

Lp.	Gen	Pełna nazwa genu	Numer akcesyjny (GenBank)	Gatunek	Charakterystyka pełnionej funkcji	Literatura	Ortolog u ryżu		Ortolog u jęczmienia	
							Numer akcesyjny (GenBank)	Identyfikator genu (Ensemble Plants)	Kontig	Długość sekwencji genomowej (pz)
Geny regulatorowe										
1	<i>FRY1</i>	<i>bifunctional 3(2),5-bisphosphate nucleotidase and inositol polyphosphate 1-phosphatase</i>	NM_125794.4	<i>A. thaliana</i>	Negatywny regulator sygnalingu ABA. Mutanty tego genu charakteryzują się zwiększoną ekspresją genów indukowanych ABA i stresem oraz podwyższoną zawartością fosforanu inozytolu, co może wskazywać na udział tego związku w sygnalingu ABA.	Xiong i in., 2001a	NM_001072858.1	MLOC_34838	contig_244738	2172
2	<i>AREB1</i>	<i>ABA-responsive element binding protein 1</i>	NM_001063653.1	<i>O. sativa</i>	<i>OsAREB1</i> koduje czynnik transkrypcyjny zawierający motyw palca cynkowego, który wiąże się z domeną ABRE w obrębie promotorów genów, których ekspresja indukowana jest przez ABA. Linie z nadekspresją charakteryzują się zwiększoną tolerancją na suszę, opóźnieniem kwitnienia oraz podwyższoną ekspresją genów indukowanych stresem tj. <i>RD29A</i> i <i>RD29B</i>	Jin i in., 2009	—	MLOC_20326	contig_1589181	4508
3	<i>NAC6</i>	<i>NAC domain transcription factor 6</i>	NM_001051551.1	<i>O. sativa</i>	<i>OsNAC6</i> koduje czynnik transkrypcyjny zawierający N-terminalną domenę wiążącą DNA. Ekspresja genu jest indukowana stresem suszy, wysokim zasoleniem oraz ABA. W liniach z nadekspresją stwierdzono podwyższoną ekspresję genów kodujących m.in. kinazy białkowe, peroksydazy oraz czynniki transkrypcyjne.	Nakashima i in., 2007	—	MLOC_59162	contig_43328	2258
4	<i>MPK5</i>	<i>Mitogen activated protein kinase 5</i>	NM_001056305.1	<i>O. sativa</i>	Koduje białko z grupy kinaz aktywowanych mitogenami, które odgrywają rolę w odpowiedzi na dochodzące do komórki czynniki zewnętrzne. Linie z nadekspresją genu charakteryzują się zwiększoną tolerancją na stres suszy oraz zasolenie.	Xiong i Yang, 2003	—	MLOC_17814	contig_1578150	2911

Tabela 3.1. cd.

Lp.	Gen	Pełna nazwa genu	Numer akcesyjny (GenBank)	Gatunek	Charakterystyka pełnionej funkcji	Literatura	Ortolog u ryżu		Ortolog u jęczmienia	
							Numer akcesyjny (GenBank)	Identyfikator genu (Ensemble Plants)	Kontig	Długość sekwencji genomowej (pz)
5	<i>SAD1</i>	<i>Supersensitive to ABA and drought 1</i>	NM_124264.4	<i>A. thaliana</i>	Koduje białko o aktywności małych jądrowych nukleoprotein (snRNP), prawdopodobnie zaangażowane w splicing mRNA, jego transport i degradację. Mutacja w tym genie zwiększa wrażliwość na ABA i stres suszy oraz ekspresję indukowanych stresem genów.	Xiong i in., 2001b	NM_001061967.1	MLOC_44823	contig_275467	2112
6	<i>SIK1</i>	<i>Salt-inducible kinase 1</i>	NM_001063222.1	<i>O. sativa</i>	Koduje białko z grupy kinaz receptorowych (receptor-like kinase - RLK). Ekspresja genu indukowana jest stresem suszy, wysokim zasoleniem oraz H ₂ O ₂ . Linie z nadekspresją genu charakteryzują się zwiększoną tolerancją na suszę, podwyższoną ekspresją genów kodujących peroksydazy, dysmutazy ponadtlenkowe i katalazy oraz zmniejszoną liczbą aparatów szparkowych w epidermie liścia.	Ouyang i in., 2010	—	MLOC_63726	contig_47899	6664
7	<i>bZIP23</i>	<i>Basic leucine-zipper 23</i>	NM_001054760.1	<i>O. sativa</i>	<i>OsZIP23</i> koduje czynnik transkrypcyjny zawierający domenę palca cynkowego. Ekspresja genu jest indukowana stresem suszy, wysokim zasoleniem oraz ABA. W liniach z nadekspresją stwierdzono podwyższoną ekspresję genów kodujących dehidryny, białka z grupy LEA, kinazy białkowe, fosfatazy oraz białka regulujące metabolizm aminokwasów	Xiang i in., 2008	—	MLOC_53580	contig_38488	4988
Geny funkcjonalne										
8	<i>P5CS1</i>	<i>Pyrroline-5-carboxylate synthase</i>	NM_129539.2	<i>A. thaliana</i>	Koduje enzym zaangażowany w syntezę proliny, która pełni funkcję osmoprotektanta komórki chroniąc ją głównie przed reaktywnymi formami tlenu (ROS). Ekspresja genu jest indukowana stresem suszy, wysokim zasoleniem oraz ABA.	Yoshida i in., 1999; Zhu i in., 1998	NM_001062258.1	MLOC_57545	contig_41855	3544

Tabela 3.1. cd.

Lp.	Gen	Pełna nazwa genu	Numer akcesyjny (GenBank)	Gatunek	Charakterystyka pełnionej funkcji	Literatura	Ortolog u ryżu		Ortolog u jęczmienia	
							Numer akcesyjny (GenBank)	Identyfikator genu (Ensemble Plants)	Kontig	Długość sekwencji genomowej (pz)
9	<i>CSD1</i>	<i>Copper/zinc superoxide dismutase 1</i>	NM_100757.3	<i>A. thaliana</i>	Koduje enzym dysmutazę nadadtlenkową zależną od Cu/Zn, który jest zaangażowany w procesy detoksykacyjne komórki. Znana jest ścieżka posttranskrypcyjnej regulacji ekspresji genu przez aktywność miRNA - miR398.	Sunkar i in., 2006	NM_001056653.1	MLOC_22278	contig_160480	1507
10	<i>DHODH 1</i>	<i>Dihydroorotate dehydrogenase 1</i>	NM_001054588.1	<i>O. sativa</i>	Koduje enzym zaangażowany w syntezę nukleotydów pirymidynowych. Ekspresja <i>OsDHODH1</i> indukowana jest zasoleniem, ABA oraz stresem suszy. W tkankach linii z nadekspresją genu stwierdzono podwyższoną zawartość monofosforanu urydyny, który zaangażowany jest w syntezę osmoprotektantów. Linie z nadekspresją charakteryzuje podwyższona zawartość proliny w tkankach.	Liu i in., 2009	—	MLOC_62551	contig_46689	5318
11	<i>HVA22</i>	<i>Hordeum vulgare abscisic acid and stress inducible gene 22</i>	L19119.1	<i>H. vulgare</i>	Ekspresja genu indukowana jest ABA oraz stresem suszy, inhibitor giberelino – zależnego powstawania wakuoli trawiennych w programowanej śmierci komórki	Shen i in., 1993	—	MLOC_73911	contig_64727	1327
12	<i>ADC1</i>	<i>Arginine decarboxylase 1</i>	NM_001063230.1	<i>O. sativa</i>	Koduje enzym zaangażowany w syntezę poliamin pełniących rolę osmoprotektantów. Linie z nadekspresją genu charakteryzują się zwiększoną tolerancją na suszę oraz akumulacją poliamin.	Capell i in., 2004; Peremarti i in., 2010	—	MLOC_39205	contig_2552582	2289
13	<i>AVP1</i>	<i>H⁺-Pyrophosphatase</i>	NM_101437.4	<i>A. thaliana</i>	Koduje pompę protonową zlokalizowaną w błonie komórkowej wakuoli, która uczestniczy w transporcie jonów wodorowych, regulując pH w apoplacie. Linie transgeniczne charakteryzują się zwiększoną tolerancją na stres suszy oraz zasolenie.	Gaxiola i in., 2001	NM_001064719	MLOC_6480	contig_137615	4002

Tabela 3.1. cd.

Lp.	Gen	Pełna nazwa genu	Numer akcesyjny (GenBank)	Gatunek	Charakterystyka pełnionej funkcji	Literatura	Ortolog u ryżu		Ortolog u jęczmienia	
							Numer akcesyjny (GenBank)	Identyfikator genu (Ensemble Plants)	Kontig	Długość sekwencji genomowej (pz)
14	<i>ALDH3</i>	<i>Aldehyde dehydrogenase 3</i>	NM_119588.5	<i>A. thaliana</i>	Koduje enzym zaangażowany w procesy detoksykacyjne aldehydów wytwarzanych przez rośliny w warunkach stresowych. Linie transgeniczne charakteryzują się zwiększoną tolerancją na stres suszy oraz stres oksydacyjny.	Kotchoni i in., 2006	NM_001072858.1	MLOC_12946	contig_1564471	2174
15	<i>PIP1</i>	<i>Plasma membrane intrinsic protein 1</i>	NM_001054207.1	<i>O. sativa</i>	Koduje akwaporynę, czyli białko błonowe zaangażowane w transport wody przez błony komórkowe. Linie transgeniczne charakteryzują się zwiększoną tolerancją na stres suszy oraz zasolenie.	Guo i in., 2006	—	MLOC_10855	contig_1559936	3279
16	<i>TPP1</i>	<i>Trehalose-6-phosphate phosphatase 1</i>	NM_001054180.1	<i>O. sativa</i>	Koduje enzym biorący udział w syntezie osmoprotektantów komórki. Ekspresja genu indukowana jest stresem suszy, wysokim zasoleniem oraz ABA. Linie z nadekspresją <i>OsTPP1</i> charakteryzują się podwyższoną tolerancją na suszę oraz ekspresją genów kodujących kinazy MPK3 i MPK4 oraz czynnik transkrypcyjny DREB1B, co może świadczyć o zaangażowaniu genu w regulację odpowiedzi na stres abiotyczny.	Ge i in., 2008	—	MLOC_53783	morex_contig_38641	3977
17	<i>sHSP17.7</i>	<i>Small heat shock protein 17.7</i>	NM_001056197.1	<i>O. sativa</i>	Koduje białko szoku cieplnego, ekspresja genów z grupy HSP wzrasta w wyniku działania czynników stresowych. sHSP17.7 pełni w komórce funkcję białka opiekuńczego (chaperone). Linie z nadekspresją genu charakteryzują się zwiększoną tolerancją na stres suszy.	Sato i Yokoya, 2008	—	MLOC_74019	morex_contig_64954	1047

Tabela 3.2. Wytypowane na podstawie wyników eksperymentu mikromacierzowego geny o zróżnicowanej ekspresji podczas stresu suszy, dla których zidentyfikowano jęzmienną sekwencję genomową

Lp.	Nr akcesyjny (GenBank)	Identyfikator genu (Ensemble Plants)	Kontig	Długość sekwencji genomowej (pz)	Ekspresja		Prawdopodobny produkt białkowy
					Organ	Zmiana	
1	AK364695.1	MLOC_5973	contig_136941	2978	L	↑	Enzym katalizujący syntezę kwasu 1-karboksy-1-aminocyklopropanowego
2	AF307145.1	MLOC_63089	contig_47260	8886	L	↑	Syntetaza asparaginy
3	AK248508.1	MLOC_73638	contig_64074	1680	L	↑	UDP-glikozylotransferaza
4	AK250959.1	MLOC_70346	contig_57809	464	L	↑	Inhibitor subtilizyny-chymotrypsyny (inhibitor peptydaz)
5	AK366970.1	MLOC_66700	contig_51984	1589	L	↑	Białko zaangażowane w transport ADP/ATP
6	AK375617.1	MLOC_54734	contig_39347	593	L	↑	Białko z rodziny LEA
7	AK373077.1	MLOC_53324	contig_38252	2162	L	↑	Białko zaangażowane w transport cukrów
8	AK248413.1	MLOC_64719	contig_49235	1489	L	↑	Białko o aktywności reduktazy progesteronu
9	AK373549.1	MLOC_17049	contig_1575414	2102	L	↑	Białko antyrodnoustrojowe
10	AK376769.1	MLOC_51183	contig_368665	1450	L	↑	Akwaporyna TIP3-1 (białko błonowe)
11	AK355834.1	MLOC_10916	contig_1560028	2327	L	↑	Fosfogliceromutaza
12	AK354606.1	MLOC_18586	contig_1581110	1563	L	↑	NAD-NADP-zależna oksydoreduktaza
13	BM816765.1	MLOC_37304	contig_2548137	3193	L	↓	Białko uczestniczące w transporcie cynku
14	DQ201158.1	MLOC_81684	contig_9764	3778	L	↓	Fitochrom A (fotoreceptor błonowy)
15	AK376707.1	MLOC_59863	contig_43978	4091	L	↓	Syntetaza tryptofanu
16	AK252018.1	MLOC_3462	contig_130981	2373	L	↓	Liaza kwasu izocytrynowego
17	AK369200.1	MLOC_56819	contig_41178	2376	L	↓	Białko należące do rodziny AUX/IAA
18	AK250034.1	MLOC_58753	contig_42961	5199	K	↓	Oksydaza poliaminowa
19	AK365529.1	MLOC_51427	contig_369207	1591	K	↓	Białko z rodziny o-metylotransferaz
20	AK367041.1	MLOC_58420	contig_42646	2523	K	↓	Białko zaangażowane w metabolizm lipidów
21	AK358114.1	MLOC_53950	contig_38769	5102	K	↓	Białko z rodziny glikozylotransferaz
22	AK364080.1	MLOC_18612	contig_158122	1602	K	↓	Proteaza cysteiny

L – liść; K – korzeń; ↑/↓ - wzrost/spadek ekspresji genu w odniesieniu do warunków optymalnego nawodnienia

Tabela 3.2. cd.

Lp.	Nr akcesyjny (GenBank)	Identyfikator genu (Ensemble Plants)	Kontig	Długość sekwencji genomowej (pz)	Ekspresja		Prawdopodobny produkt białkowy
					Organ	Zmiana	
23	AK374300.1	MLOC_70877	contig_58727	3902	K	↓	Cyklina B
24	AK249171.1	MLOC_44678	contig_275150	1620	K	↓	Białko z rodziny oksydoreduktaz
25	AK251637.1	MLOC_70963	contig_5885	5046	K	↓	Białko błonowe odpowiedzialne za zachowanie równowagi pH
26	AK355062.1	MLOC_76936	contig_73588	2302	K	↓	Białko magazynujące
27	AY188394.1	MLOC_28370	contig_191212	1108	K	↓	Białko zaangażowane w transport fosforanów
28	AK365725.1	MLOC_17220	contig_157599	1568	K	↓	Transferaza glutationu
29	M60733.1	MLOC_68999	contig_55732	3301	K	↓	Białko zaangażowane w degradację RNA
30	AK369380.1	MLOC_44888	contig_1564222	1083	K	↓	Produkt nieznan
31	AK248326.1	MLOC_12837	contig_1564222	1083	K	↓	Białko będące homologiem białka CASP-like
32	AK250811.1	MLOC_74605	contig_66186	1588	K	↓	Białko z rodziny peroksydaz
33	AK366003.1	MLOC_6194	contig_137196	670	K	↓	Inhibitor trypsyny typu Bowman-Birk
34	AK356650.1	MLOC_67752	contig_53572	1985	K	↓	Transferaza acylowa
35	AK365167.1	MLOC_11897	contig_1562103	3330	K	↓	Białko katalizujące reakcję redoks
36	AK376206.1	MLOC_52193	contig_37358	750	L/K	↑	Białko z rodziny glioksylaz
37	AK250206.1	MLOC_10408	contig_1559008	1451	L/K	↑	Białko błonowe, którego aktywność indukowana jest stresem
38	AK372760.1	MLOC_67581	contig_53297	3403	L/K	↑	Białko szoku cieplnego o masie 70 kDa
39	AK358848.1	MLOC_11583	contig_1561399	3166	L/K	↓	Białko zawierające domenę BURP

L – liść; K – korzeń; ↑/↓ - wzrost/spadek ekspresji genu w odniesieniu do warunków optymalnego nawodnienia

Tabela 3.3 a. Wytypowane na podstawie danych literaturowych geny, analizowane w ramach wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Genetyki UŚ i włączone do lokalizowania na mapie genetycznej

Lp.	Gen	Identyfikator genu (Ensemble Plants)	Charakterystyka pełnionej funkcji	Rodzaj polimorfizmu	Metoda genotypowania	Populacja mapująca	Źródło
Geny regulatorowe							
1	<i>HvABI5</i>	MLOC_66546	Koduje czynnik transkrypcyjny ABI5 należący do podrodziny bZIP w rodzinie AREB/ABF; odpowiedzialny m.in. za ABA-zależną aktywację genów <i>HVA1</i> i <i>HVA22</i>	INDEL	STS	GH	Śróbka, 2012; Urban, 2014
2	<i>HvHsd4</i>	MLOC_43556	Koduje białko Hsd4 długości 250 aminokwasów aktywujące GTP-azę z rodziny Rho, biorącą udział m.in. w zamykaniu szparek podczas stresu niedoboru wody	SNP	CAPS	GH	Śróbka, 2012; Urban, 2014
3	<i>HvCBP20</i>	MLOC_17939	Koduje wysoce konserwowane ewolucyjnie białko CBP20, wchodzące razem z białkiem CBP80 w skład kompleksu CBC, który stabilizuje transkrypty na końcu 5' oraz bierze udział w formowaniu ich końca 3'; kompleks CBP zwiększa też wydajność splicingu oraz bierze udział w syntezie pre-miRNA i prawdopodobnie uczestniczy w sygnalingu ABA podczas stresu niedoboru wody (negatywny regulator ABA)	SNP	CAPS	GH	Śróbka, 2012; Urban, 2014
4	<i>HvERA1</i>	MLOC_67140	Koduje podjednostkę β transferazy farnesylowej, która jest odpowiedzialna za katalizę prenylacji białek. β transferaza farnesylowa wiąże białka biorące udział w transdukcji sygnału kwasu abscysynowego, a tym samym wpływa na regulację transpiracji	SNP	CAPS	GH	Urban, 2014
5	<i>HvWRKY38</i>	MLOC_60890	Koduje czynnik transkrypcyjny należący do klasy III rodziny WRKY; białko WRKY38 zawiera charakterystyczną domenę WRKY, która wiąże się do motywu W-box w DNA i jest zaangażowane w odpowiedź na niską temperaturę oraz niedobór wody na drodze niezależnej od ABA	SNP	CAPS	GH	Śróbka, 2012; Urban, 2014
6	<i>HvAHG2</i>	MLOC_4021	Gen ten u <i>Arabidopsis</i> koduje poli(A)rybonukleazę, która bierze udział w degradacji mRNA, która ma na celu utrzymanie właściwego stanu homeostazy, ulegają jej głównie wadliwe cząsteczki mRNA	SNP	CAPS	GH	Urban, 2014
7	<i>HvCBP80</i>	MLOC_7192	Koduje białko CBP80, mające wysoce uporządkowaną strukturę złożoną w całości z α -helis i pętli. Jest ono słabo konserwowane ewolucyjnie, wchodzi wraz z CBP20 w skład kompleksu CBC wiążącego się do końca 3' transkrypty i spełniające takie same funkcje jak CBP20	SNP	CAPS	MCam	Urban, 2014
8	<i>HvDRF1</i>	MLOC_77405	Koduje białko DRF1, będące czynnikiem transkrypcyjnym należącym do grupy DREB2 w rodzinie AP2/ERF, które może m.in. aktywować ekspresję genu <i>HVA1</i>	SNP	EcoTilling	MCam	Urban, 2014
9	<i>HvSNAC1</i>	MLOC_37104	Koduje białko należące do rodziny czynników transkrypcyjnych NAC, do grupy SNAC -A, które reguluje ekspresję wielu genów związanych ze stresem suszy i zasolenia oraz ma związek z zamykaniem szparek podczas stresu niedoboru wody	SNP	CAPS	MCam	Urban, 2014
Geny funkcjonalne							
10	<i>HvDhn5</i>	—	Koduje białko dehydrynę 5, które należy do rodziny białek LEA grupy II, ma ono charakter kwasowy i jest produkowane w warunkach niedoboru wody oraz niskiej temperatury	SNP	CAPS	GH	Śróbka, 2012; Urban, 2014

Tabela 3.3 a. cd.

Lp.	Gen	Identyfikator genu (Ensemble Plants)	Charakterystyka pełnionej funkcji	Rodzaj polimorfizmu	Metoda genotypowania	Populacja mapująca	Źródło
11	<i>HVA1</i>	—	Koduje białko należące do grupy III białek LEA, jego ekspresja jest indukowana czynnikiem stresowym (np. stresem niedoboru wody) lub obecnością ABA produkowanego w roślinie w warunkach stresowych	SNP	CAPS	MCam	Urban, 2014
12	<i>HvPpdH1</i>	MLOC_81154	Koduje białko związane z reakcją na fotoperiod. Dominujący allel genu <i>HvPpdH1</i> warunkuje wczesne zakwitanie roślin w warunkach wzrostu w długim fotoperiodzie	SNP	CAPS	MCam	Urban, 2014

Tabela 3.3 b. Wytypowane na podstawie wyników eksperymentu mikromacierzowego geny o zróżnicowanej ekspresji podczas stresu suszy, analizowane w ramach wcześniejszych badań prowadzonych w Katedrze Genetyki UŚ i włączone do lokalizowania na mapie genetycznej

Lp.	Gen	Identyfikator genu (Ensemble Plants)	Charakterystyka pełnionej funkcji	Ekspresja		Rodzaj polimorfizmu	Metoda genotypowania	Populacja mapująca	Źródło
				Organ	Zmiana				
1	X71362.1	—	Białko z grupy dehydryn	L	↑	SNP	CAPS	GH	Urban, 2014
2	AJ304793.1	—	Oksydaza flawinowa	L	↑	INDEL	STS	GH	Urban, 2014
3	AF043090.1	—	Białko z grupy dehydryn	L	↑	SNP	CAPS	GH	Urban, 2014
4	BQ467580.1	MLOC_14295	Białko z grupy LEA	L	↑	SNP	CAPS	MCam	Urban, 2014
5	AK250700.1	MLOC_79567	Białko z grupy peroksydaz	L	↓	SNP	CAPS	GH	Urban, 2014
6	AK249682.1	MLOC_14218	Homolog białka PVR3-like	L	↓	SNP	CAPS	GH	Urban, 2014
7	BM444414.1	MLOC_14732	Inhibitor transferazy lipidowej	L	↓	SNP	CAPS	GH	Urban, 2014
8	AK353596.1	MLOC_65477	Białko z grupy peroksydaz	L	↓	INDEL	STS	MCam	Urban, 2014
9	AK356764.1	MLOC_21709	Transketolaza	K	↑	SNP	CAPS	GH	Urban, 2014
10	AK372008.1	—	Białko związane z transportem cukrów	K	↓	SNP	CAPS	GH	Urban, 2014
11	AK373247.1	MLOC_10116	Syntaksyna	K	↓	SNP	CAPS	MCam	Urban, 2014
12	AK354316.1	MLOC_5618	Białko szoku cieplnego	L/K	↑	INDEL	STS	MCam	Urban, 2014

L – liść; K – korzeń; ↑/↓ - wzrost/spadek ekspresji genu w odniesieniu do warunków optymalnego nawodnienia

alignment search tool). Do analiz wykorzystano sekwencję kodującą (ang. coding DNA sequence – CDS), którą pobrano z zasobów bazy GenBank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) na serwerze NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA). Posłużyła ona jako zapytanie (ang. query) do przeszukiwania baz danych na serwerze IPK Gatersleben (IPK Barley BLAST Server; <http://webblast.ipk-gatersleben.de/barley/viroblast.php>), w których zdeponowano wyniki pochodzące z projektu sekwencjonowania genomu jęczmienia (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). Wykorzystano m.in. bazę danych zawierającą informacje o nukleotydowej sekwencji genomu referencyjnej odmiany ‘Morex’ (assembly_WGSMorex), a także bazę obejmującą dane o modelach genów jęczmiennych opracowanych na podstawie wyników sekwencjonowania RNA oraz flcDNA (ang. full-length cDNA; HC_genes_CDS_Seq and LC_genes_CDS_Seq). Dla grupy genów wytypowanych na podstawie analizy transkryptomu, sekwencją zapytania dla algorytmu BLAST była jęczmienna sekwencja mRNA komplementarna do sekwencji sondy z mikromacierzy. Szczegółowe dane o zidentyfikowanych genach jęczmiennych, obejmujące m.in. informacje o ich strukturze oraz chromosomowej lokalizacji, pobrano z zasobów bazy Ensembl Plants (<http://plants.ensembl.org/index.html>; ver. 082214v1).

3.6.3. Projektowanie starterów, opracowanie warunków amplifikacji oraz wizualizacja produktów PCR

Startery do specyficznej amplifikacji wybranych fragmentów sekwencji genomowej zidentyfikowanych genów jęczmiennych projektowano w programie Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). Długość amplifikowanych fragmentów wahała się od około 800 do 1200 pz, co dawało optymalną długość matrycy do reakcji sekwencjonowania. Do analiz wybierano fragment genu zawierający intron lub jego fragment w celu zwiększenia prawdopodobieństwa zidentyfikowania polimorfizmu. Startery projektowano tak, aby ich długość mieściła się w przedziale 18-25 pz, a ich temperatura topnienia (T_m) wynosiła od 57 do 63°C, z dopuszczalną różnicą 1°C między starterem *forward* i *reverse*.

Profil temperaturowy dla poszczególnych par starterów dostosowywano na podstawie sugerowanej przez producenta (Sigma-Aldrich) temperatury topnienia. Amplifikacje fragmentów genów przeprowadzano z wykorzystaniem nieznakowanych starterów w termocyklerze T-Gradient (Biometra). W przypadku niezyskania

specyficznego produktu o pożądanej koncentracji, optymalne temperatury przyłączania starterów ustalano, przeprowadzając reakcje PCR w gradiencie temperatur.

W skład mieszaniny reakcyjnej dla jednej próbki wchodziły:

• ddH ₂ O	13,5 μl
• 10 x bufor B	2,0 μl
• dNTPs (5mM, Promega)	1,0 μl
• starter <i>forward</i> (50 ng/μl, Sigma-Aldrich)	0,5 μl
• starter <i>reverse</i> (50 ng/μl, Sigma-Aldrich)	0,5 μl
• Color Taq DNA Polimeraza (2 U/μl, EUR _x)	0,5 μl
• DNA (50 ng/μl)	2,0 μl
Całkowita objętość	20,0 μl

Wizualizację produktów amplifikacji PCR prowadzono przez rozdział elektroforetyczny. Elektroforezę wykonywano w 1,5% żelu agarozowym w środowisku buforu 0,5 x TBE (Aneks 1. Tabela 10.4.) przy stałym napięciu prądu 5V/cm. Do kieszonek żelu nakładano po 5 μl próbek oraz 1 μl markera wielkości 100 pz (Fermentas). DNA znakowano przy użyciu bromku etydyny (10 mg/ml, Bio-Rad Laboratories) dodawanego bezpośrednio do mieszaniny żelowej i obserwowano w świetle UV w transiluminatorze (Vilber Lourmat). Analizę produktów PCR prowadzono w programie do dokumentacji żeli BioCapt (Vilber Lourmat).

3.6.4. Sekwencjonowanie ampikonów i identyfikacja polimorfizmów

Po potwierdzeniu efektywności amplifikacji w wyniku rozdziału elektroforetycznego, produkty PCR poddawane były dwukierunkowemu sekwencjonowaniu w pracowni sekwencjonowania (Genomed, Warszawa). Matrycę stanowiły sekwencje fragmentów zidentyfikowanych genów pochodzące z odmian rodzicielskich populacji mapujących M_{Cam} i GH. Wyniki analizowane były w programie CodonCode Aligner (CodonCode Corporation). Końce sekwencji skracano do miejsca, gdzie jakość wygenerowanych odczytów pozwalała na poprawną identyfikację nukleotydów. Niepewne nukleotydy analizowane były w oparciu o fluorogram oraz wynik sekwencjonowania z przeciwnego kierunku. Przygotowane w ten sposób sekwencje składano w kontigi i porównywano z sekwencją referencyjną genu. Następnie poszukiwano zmian pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz krótkich insercji/delecji (INDEL) różnicujących między sobą pary rodziców populacji mapujących. Dla każdej

zidentyfikowanej zmiany określany był jej rodzaj oraz położenie w analizowanym fragmencie.

3.6.5. Opracowanie technik genotypowania polimorficznych CG w populacjach mapujących

Metody genotypowania populacji mapujących RIL pod względem miejsc polimorficznych między rodzicami populacji mapujących w wytypowanych genach kandydackich były opracowywane w zależności od rodzaju wykrytej zmiany sekwencji.

3.6.5.1. Technika STS

W przypadku zmiany typu INDEL opracowano technikę opartą na amplifikacji metodą PCR krótkiego fragmentu genu (100-300 pz), obejmującego miejsce występowania zidentyfikowanej insercji/delecji. Startery projektowano w taki sposób by insercja/delecja stanowiła minimum 5% długości amplifikowanego fragmentu. Dla zaprojektowanych starterów dopracowywano warunki amplifikacji, a następnie prowadzono rozdział elektroforetyczny produktów PCR w 2,5% żelu agarozowym przy stałym napięciu prądu 5V/cm. Linie populacji mapujących były genotypowane na podstawie ich zróżnicowania pod względem długości ampliconu. Geny kandydackie, w sekwencjach których zidentyfikowano polimorfizm typu INDEL mapowane były jako markery STS (ang. sequence tagged site).

3.6.5.2. Technika CAPS

Wszystkie zidentyfikowane polimorfizmy typu SNP analizowane były w aplikacji NEBcutter V2.0 (New England Biolabs; <http://nc2.neb.com/NEBcutter2/>) pod kątem poszukiwania miejsc cięcia DNA dla enzymów restrykcyjnych. Do dalszych analiz kwalifikowano tylko te enzymy, które w rozpatrywanej sekwencji posiadały jedno lub dwa miejsca cięcia. W przypadku identyfikacji odpowiedniego enzymu, polimorficzne geny były genotypowane z zastosowaniem techniki CAPS (ang. cleaved amplified polymorphic sequence). Produkty PCR były poddawane trawieniu restrykcyjnemu, przy czym skład mieszaniny restrykcyjnej oraz warunki cięcia były indywidualnie dopracowywane dla każdego enzymu. Optymalizacji podlegały takie parametry jak ilość enzymu i DNA w przeliczeniu na jedną próbkę oraz czas inkubacji w łaźni wodnej. Produkty cięcia, do których po restrykcji dodawano bufor obciążający z sacharozą (2 µl/10 µl próbki; Aneks 1. Tabela 10.6.) identyfikowano poprzez elektroforezę w 2% żelu agarozowym przy stałym napięciu prądu 5V/cm.

3.6.5.3. Technika dCAPS

W przypadku, gdy dla żadnego zidentyfikowanego SNP w analizowanym fragmencie genu nie znaleziono enzymu restrykcyjnego, stosowano technikę dCAPS (ang. derived cleaved amplified polymorphic sequence). Jest to modyfikacja techniki CAPS, która polega na użyciu startera zawierającego 1 lub 2 nukleotydy niedopasowane do matrycy (ang. mismatch) w celu wprowadzenia do amplifikowanej sekwencji miejsca cięcia dla enzymu restrykcyjnego. Startery typu mismatch projektowano w programie dCAPS Finder 2.0. (<http://helix.wustl.edu/dcaps/dcaps.html>) na podstawie fragmentu sekwencji genomowej o długości 50 nukleotydów, w połowie której zlokalizowany był zidentyfikowany SNP. Kolejnym krokiem była reakcja PCR ze starterem typu mismatch oraz starterem standardowym zaprojektowanym tak, aby amplifikowany fragment nie przekraczał 500 pz. W przypadku braku produktu amplifikacji lub w przypadku obecności niespecyficycznych prążków stosowano wewnętrzny PCR (ang. nested PCR). Metoda polegała na dwuetapowej reakcji amplifikacji. W pierwszym etapie prowadzono amplifikację fragmentu analizowanego genu z wykorzystaniem starterów zaprojektowanych do sekwencjonowania. Następnie produkt PCR rozcieńczano 50-cio krotnie, w celu uzyskania matrycy dla drugiej reakcji PCR, ze starterami dedykowanymi dla amplifikacji fragmentu dCAPS. W kolejnym etapie amplikony były poddawane restrykcji, po wcześniejszym dopracowaniu warunków cięcia. Detekcję produktów po enzymatycznym trawieniu przeprowadzano przez elektroforezę w 4% żelu agarozowym przy stałym napięciu prądu 4V/cm.

3.6.6. Lokalizowanie CG na mapach genetycznych

Wyniki genotypowania polimorficznych genów kandydackich w populacjach mapujących dołączono do danych o segregacji alleli polimorficznych markerów SSR i SNP celem przeprowadzenia analizy sprzężeń w programie JoinMap oraz określenia chromosomowej lokalizacji genów kandydackich na uprzednio stworzonych mapach genetycznych. Wybór grup sprzężonych loci, ustalanie kolejności markerów w poszczególnych grupach sprzężeń oraz określenie odległości genetycznych przeprowadzono w analogiczny sposób i przy takich samych parametrach programu jak przy konstrukcji map opartych wyłącznie o markery SSR i SNP. Finalnym etapem pracy było stworzenie mapy konsensusowej, łączącej mapy uzyskane dla populacji mapujących MCam i GH, na których zlokalizowano wytypowane geny kandydackie związane z reakcją na deficyt wody oraz mapę dla populacji LCam.

3.7. Strategia mapowania loci cech ilościowych

W niniejszej pracy przeprowadzono identyfikację chromosomowych rejonów kontrolujących zmienność cech charakteryzujących bilans wodny, wydajność procesu fotosyntezy oraz zawartość związków chemicznych związanych z odpowiedzią na niedobór wody w warunkach optymalnego nawodnienia oraz stresu suszy w populacji mapującej M_{Cam}. Fenotypowanie materiału roślinnego, w ramach którego wykonano doświadczenie szklarniowe oraz pomiar parametrów fizjologicznych i biochemicznych charakteryzujących badane genotypy, przeprowadzono przez inne zespoły badawcze projektu POLAPGEN-BD (zadania nr 8, 9, 10, 11 i 12) w Instytucie Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk (IFR PAN) oraz w Katedrze Fizjologii Roślin na Wydziale Rolniczo-Ekonomicznym Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie.

3.7.1. Charakterystyka układu doświadczalnego oraz analizowanych cech

W doświadczeniu wykonanym przez wymienione powyżej zespoły badawcze projektu POLAPGEN-BD, ziarna osobników populacji M_{Cam} oraz form rodzicielskich wysiano do wazonów o pojemności 9 dm³, które zawierały ziemię wymieszaną z piaskiem. Doświadczenie prowadzono w kontrolowanych warunkach szklarniowych (temperatura 25/16⁰C, fotoperiod 16/8 godzin, natężenie światła 650 μmol m⁻² s⁻¹ oraz wilgotność powietrza 50%), regularnie monitorując zawartość wody w glebie na podstawie kontroli wagowej wazonów oraz analizy krzywej retencji wodnej (pF) wyznaczonej dla zastosowanego podłoża. W pierwszym wariacie nawadniania, przez cały okres wzrostu roślin utrzymywana była optymalna wilgotność gleby na poziomie 11% wagowych (3,2 pF). W wariacie drugim, stres suszy zadany został w stadium siewki, po pojawieniu się czwartego liścia i trwał przez 10 dni. W tym czasie wilgotność podłoża utrzymywana była na poziomie 5,7% wagowych (4,0 pF), czyli tuż przed punktem trwałego wędnięcia (4,2 pF).

Pomiary wykonane zostały dla trzeciego liścia analizowanych genotypów w ostatnim dniu suszy oraz po podlaniu roślin w przypadku wariantu optymalnego nawodnienia. Przedmiotem dalszych badań wykonanych w ramach prezentowanej pracy doktorskiej były 43 parametry fizjologiczne i biochemiczne, które scharakteryzowano w Tabeli 3.4. Analizowane cechy pogrupowano na cztery kategorie fenotypowe: bilans wodny, fotosynteza, zawartość osmoprotektantów i hormonów oraz aktywność antyoksydantów, ze względu na proces biologiczny związany z odpowiedzią jęczmienia na niedobór wody, który charakteryzują.

Parametrami zastosowanymi do opisanego bilansu wodnego były: zawartość (WC) i utrata wody z liścia (WL), względna zawartość (RWC) i efektywność wykorzystania wody (WUE) oraz wyciek elektrolitów (EL), który odzwierciedla integralność błon komórkowych. Wydajność procesu fotosyntezy scharakteryzowano poprzez 22 fizjologiczne wskaźniki. Na podstawie przeprowadzonego testu OJIP wyznaczono parametry szybkiej kinetyki fluorescencji chlorofilu *a*, będące miarą aktywności fotosyntetycznej liści. Obliczono specyficzne przepływy strumieni energii: zaabsorbowanej przez cząsteczki chlorofilu (AB_0), zatrzymanej (TR_0) oraz rozproszonej z fotosystemu II (DI_0), a także wykorzystanej do transportu elektronów (ET_0), w odniesieniu do centrum reakcji (RC) oraz wzbudzonej powierzchni liścia (CS). Ponadto wyznaczono wydajności przepływów energii (ϕ_{po} , ψ_o , ϕ_{eo}) oraz zagęszczenie aktywnych centrów reakcji w odniesieniu do CS (RC/CS). Powyższe parametry wykorzystane zostały do obliczenia wskaźników witalności: PI_{abs} i $(1-B)av$, opisujących stan fizjologiczny roślin na podstawie funkcjonalnych i strukturalnych własności PSII. Fotochemiczną aktywność fotosystemu II, odzwierciedlającą wrażliwość na fotoinhibicję wywołaną stresem oksydacyjnym, wyrażono za pomocą sześciu parametrów wyznaczonych na podstawie pomiaru fluorescencji modulowanej. Określono wydajność przechwytywania energii wzbudzenia przez centra reakcji PSII (F_v'/F_m'), fotochemiczną wydajność kwantową PSII (Φ_{PSII}), współczynnik fotochemicznego wygaszania fluorescencji (qP) oraz komponenty termicznego rozpraszania nadmiaru wzbudzonej energii świetlnej w PSII (qE , qT , qI). Sprawność wymiany gazowej opisano poprzez intensywność transpiracji (E) oraz fotosyntezy netto (P_n).

Osobną grupę stanowiły cechy związane z zawartością związków chemicznych zaangażowanych w biochemiczną odpowiedź na niedobór wody. Wśród osmoprotektantów i hormonów, oznaczono zawartość proliny, pięciu cukrów (glukozy, fruktozy, maltozy, sacharozy i rafinozy) oraz etylenu. Wydajność systemu antyoksydacyjnego wyrażono poprzez analizę aktywności trzech enzymów (dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy i peroksydazy) oraz sześciu nieenzymatycznych przeciwutleniaczy należących do tokoferoli i tokotrienoli (witaminy z grupy E), a także karotenoidów. Szczegółowy opis prowadzonych doświadczeń przedstawiono w monografii metodycznej wydanej w ramach projektu POLAPGEN-BD (Biesaga-Kościelniak i in., 2014; Hura i in., 2014; Filek i in., 2014).

Tabela 3.4. Charakterystyka fizjologicznych i biochemicznych parametrów będących przedmiotem analizy QTL

Kategoria fenotypowa	Skrót	Parametr	Jednostka
Bilans wodny	WC	Zawartość wody w liściu	g H ₂ O g suchej masy ⁻¹
	WL	Utrata wody z liścia	g H ₂ O g suchej masy ⁻¹
	RWC	Względna zawartość wody	%
	WUE	Efektywność wykorzystania wody	μmol CO ₂ mmol H ₂ O ⁻¹
	EL	Wyciek elektrolitów	%%
Fotosynteza	ABS/RC	Ilość energii zaabsorbowanej przez cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na centrum reakcji	%
	TR ₀ /RC	Ilość energii zatrzymanej w PSII w przeliczeniu na centrum reakcji	%
	ET ₀ /RC	Ilość energii wykorzystanej do transportu elektronów w przeliczeniu na centrum reakcji	%
	DI ₀ /RC	Ilość energii rozproszonej z PSII w przeliczeniu na centrum reakcji	%
	RC/CS	Liczba aktywnych centrów reakcji	%
	ABS/CS	Ilość energii zaabsorbowanej przez cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia	%
	TR ₀ /CS	Ilość energii zatrzymanej w PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia	%
	ET ₀ /CS	Ilość energii wykorzystanej do transportu elektronów w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia	%
	DI ₀ /CS	Ilość energii rozproszonej z PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia	%
	φ _{po}	Maksymalna wydajność kwantowa pierwotnych reakcji fotochemicznych fotosyntezy	%%
	ψ _o	Wydajność przekazania wybitego z centrum reakcji PSII elektronu na łańcuch transportu elektronów	%%
	φ _{eo}	Wydajność kwantowa transportu elektronów	%%
	(1-B) _{av}	Średni odsetek otwartych centrów reakcji w czasie potrzebnym do zamknięcia wszystkich centrów reakcji	%
	PI _{abs}	Wskaźnik wydajności fotochemicznej PSII obliczony na podstawie absorpcji energii	%

Tabela 3.4. cd.

Kategoria fenotypowa	Skrót	Parametr	Jednostka
Fotosynteza	F_v'/F_m'	Wydajność przechwytywania energii wzbudzenia przez centra reakcji PSII	% %
	qP	Współczynnik fotochemicznego wygaszania fluorescencji	% %
	Φ_{PSII}	Fotochemiczna wydajność kwantowa PSII	% %
	qE	Energetycznie uwarunkowane wygaszanie fluorescencji	%
	qT	Wygaszanie fluorescencji zależne od zmian stanów	%
	qI	Wygaszanie fluorescencji zależne od fotoinhibicji	%
	Pn	Intensywność fotosyntezy netto	$\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
	E	Intensywność transpiracji	$\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$
Zawartość osmoprotektantów i hormonów	Pro	Zawartość proliny	$\mu\text{g/g}$ świeżej masy
	Glu	Zawartość glukozy	$\mu\text{g/mg}$ suchej masy
	Fru	Zawartość fruktozy	$\mu\text{g/mg}$ suchej masy
	Sach	Zawartość sacharozy	$\mu\text{g/mg}$ suchej masy
	Raf	Zawartość rafinozy	$\mu\text{g/mg}$ suchej masy
	Mal	Zawartość maltozy	$\mu\text{g/mg}$ suchej masy
	Ety	Zawartość etylenu	nl/g świeżej masy
Aktywność antyoksydantów	SOD	Aktywność dysmutazy ponadtlenkowej	U/mg
	CAT	Aktywność katalazy	U/mg
	POX	Aktywność peroksydazy	U/mg
	GTt	Zawartość γ -tokotrienolu	$\mu\text{g/mg}$
	ATt	Zawartość α -tokotrienolu	$\mu\text{g/mg}$
	DTf	Zawartość δ -tokoferolu	$\mu\text{g/mg}$
	GTf	Zawartość γ -tokoferolu	$\mu\text{g/mg}$
	ATf	Zawartość α -tokoferolu	$\mu\text{g/mg}$
	BK	Zawartość β -karotenu	$\mu\text{g/mg}$

3.7.2. Statystyczne opracowanie wyników

Analizy statystyczne wyników obserwacji fenotypowych linii populacji M_{Cam} przeprowadzono w programie Statistica 12 oraz MS Excel 2010. W ramach statystyki opisowej obliczono średnie arytmetyczne, minima, maksima, odchylenia standardowe oraz współczynniki zmienności (CV). Między średnimi wartościami analizowanych parametrów wyznaczono współczynnik korelacji liniowej Pearsona (r). Zgodność rozkładu wartości poszczególnych cech z rozkładem normalnym zweryfikowano za pomocą testu Shapiro-Wilka ($\alpha = 0,00001$). Dla porównania istotności różnic analizowanych parametrów między warunkami optymalnego nawodnienia oraz stresu suszy zastosowano test t-Studenta ($\alpha = 0,05$), poprzedzony testem F dla zweryfikowania hipotezy o równości wariancji ($\alpha = 0,05$). Dla wszystkich cech wyznaczono wskaźnik stresu (ang. stress index – SI), odzwierciedlający wrażliwość na niedobór wody, ze wzoru $SI [\%] = (S/K) \times 100\%$, gdzie ‘S’ jest wartością parametru zmierzoną po zastosowaniu stresu suszy, natomiast ‘K’, w warunkach optymalnego nawodnienia. Wskaźniki stresu zostały włączone do mapowania QTL jako dodatkowe cechy fenotypowe.

3.7.3. Identyfikacja QTL dla cech związanych z odpowiedzią na niedobór wody

Wyniki z fenotypowania osobników populacji M_{Cam} pod względem 43 parametrów wyznaczonych w warunkach obu reżimów wodnych oraz wartości wskaźników stresu (SI) poddano analizie z wykorzystaniem programu MapQTL 5 (Van Ooijen, 2004). Pierwszym etapem identyfikacji QTL było zastosowanie mapowania interwałowego (ang. interval mapping – IM), polegającego na ustaleniu sprzężenia między locus cechy ilościowej i flankującymi je markerami na mapie genetycznej poprzez ocenę maksymalnej wiarygodności. Prawdopodobieństwo występowania QTL w określonym przedziale mapowym weryfikowane było na podstawie analizy krzywej wartości LOD wykreślanej wzdłuż wszystkich grup sprzężeń. QTL były identyfikowane w obszarach mapy genetycznej, gdzie maksima krzywej LOD przewyższały wartość krytyczną, którą wyznaczono dla wszystkich cech w teście 1000 permutacji. Wahala się ona w granicach 2,8-3,5 na przyjętym poziomie istotności $\alpha = 0,05$. W drugim etapie analizy, dla cech w przypadku których zidentyfikowano co najmniej jeden QTL zastosowano mapowanie MQM (ang. multiple QTL-model). Celem metody MQM było wykluczenie silnych, lecz niestabilnych QTL (ang. ghost QTL) oraz redukcja możliwości zafałszowania wyników mapowania wynikającej z wpływu innych, sprzężonych jak

i niesprzężonych loci cech ilościowych. W analizie tej, identyfikacja QTL wykonywana była z wykorzystaniem kofaktorów, czyli markerów zmapowanych w pobliżu maksimum krzywej LOD w rejonach zlokalizowanych QTL. Metoda MQM pozwoliła na wykrycie dodatkowych loci cech ilościowych, których obecność mogła zostać zamaskowana przez zidentyfikowane w ramach mapowania interwałowego silne QTL, określające dużą część zmienności analizowanych cech.

Zidentyfikowane QTL charakteryzowano, wykorzystując następujące parametry: pozycję markera znajdującego się najbliżej maksimum krzywej LOD, przedział ufności QTL wytyczony przez miejsca przecięcia krzywej LOD z linią wyznaczającą wartość krytyczną, współczynnik determinacji (R^2), wyrażający procentową część zmienności cechy pozostającą pod kontrolą zidentyfikowanego QTL oraz efekt addytywny allelu pochodzącego od matecznej linii rodzicielskiej (a), określający jego wpływ na wykształcenie cechy w analizowanej populacji. Efekt addytywny wyrażony był w jednostkach pomiaru badanego parametru i w zależności od znaku ('+' lub '-') wskazywał, o ile allel odmiany 'Maresi' podwyższa lub obniża wartość cechy. Loci cech ilościowych, których przedziały ufności częściowo lub całkowicie się pokrywały, przedstawiane były na mapie genetycznej pod postacią jednego regionu definiowanego jako tzw. hotspot. Finalnie, przeprowadzono analizę kolokalizacji zmapowanych funkcjonalnych genów kandydackich z rejonami dla zidentyfikowanych loci cech ilościowych.

3.8. Adnotacja funkcjonalna pozycyjnych genów kandydackich

Celem adnotacji funkcjonalnej było określenie oraz biologiczna interpretacja prawdopodobnej funkcji, jaką pełnią produkty białkowe pozycyjnych genów kandydackich zidentyfikowanych we fragmentach fizycznej mapy genomu jęczmienia, odpowiadających regionom dla zmapowanych QTL.

Integrację mapy genetycznej i fizycznej przeprowadzono na podstawie pozycji w genomie jęczmienia markerów definiujących początek i koniec przedziałów ufności QTL. W tym celu ich sekwencje nukleotydowe zmapowano w genomie przy użyciu algorytmu BLAST, a geny zidentyfikowane w obrębie fizycznych interwałów QTL pozyskano, wykorzystując narzędzie BioMart w bazie danych Ensembl Plants. Wyodrębnione zestawy genów ze wszystkich zidentyfikowanych regionów QTL pogrupowano pod względem czterech analizowanych kategorii fenotypowych: bilans wodny, fotosynteza, zawartość osmoprotektantów i hormonów oraz aktywność

antyoksydantów, a także trzech wariantów doświadczenia: susza, kontrola oraz wskaźnik stresu (SI). Zastosowane podejście opierało się na założeniu, że wśród genów zidentyfikowanych w przedziałach ufności QTL dla cech charakteryzujących poszczególne kategorie fenotypowe, istnieją loci zaangażowane w przebieg procesów biologicznych charakterystycznych dla tych kategorii. W celu weryfikacji istnienia procesów biologicznych (ang. biological processes – BP) statystycznie nadreprezentowanych w analizowanych grupach genów w stosunku do częstości ich występowania w genomie jęczmienia oraz wytypowania genów o największym prawdopodobieństwie ich potencjalnego zaangażowania w wykształcenie analizowanych cech, przeprowadzono bioinformatyczną analizę wzbogacenia terminów Ontologii Genów (ang. Gene Ontology enrichment) wykorzystując zasoby bazy Plaza Monocots w wersji 3.0 (http://bioinformatics.psb.ugent.be/plaza/versions/plaza_v3_monocots/). Istotność każdego analizowanego terminu GO dla poszczególnych grup genów testowano metodą Bonferroniego, przy założeniu rozkładu hipergeometrycznego na poziomie istotności $\alpha=0,05$. Szczególną uwagę poświęcono tym genom, które zidentyfikowano w przedziałach ufności dla cech w warunkach stresu suszy oraz wskaźników stresu (SI). Baza Plaza Monocots wykorzystana została również do identyfikacji ortologów analizowanych genów jęczmiennych w genomie *Arabidopsis thaliana*, ze względu na większy zasób informacji na temat funkcji genów dostępny dla tego gatunku.

4. Wyniki

4.1. Markery molekularne

4.1.1. Analiza jakości oraz poziomu polimorfizmu markerów SSR i SNP wśród genotypów rodzicielskich populacji mapujących

4.1.1.1. Markery SSR

W celu opracowania zestawu markerów SSR do mapowania genetycznego wybrano 276 par starterów flankujących loci mikrosatelitarne z aktualnie dostępnych map genetycznych jęczmienia. Dla 243 par starterów (88%) opracowano warunki amplifikacji metodą PCR uzyskując 254 markery SSR, ponieważ osiem z nich flankowało więcej niż jeden locus mikrosatelitarny. Produkty PCR dla 244 markerów SSR zakwalifikowano jako dobrej jakości, natomiast pozostałe 10 loci SSR ulegało słabej amplifikacji, co nie pozwalało na ich ewentualne wykorzystanie w genotypowaniu populacji mapujących. Dla 15 markerów uzyskano skomplikowany wzór prążkowy w postaci wielu produktów PCR. W 13 loci mikrosatelitarnych zidentyfikowano dla niektórych genotypów rodzicielskich allele typu *null*, będące wynikiem braku amplifikacji spowodowanej najprawdopodobniej mutacją w miejscu przyłączenia któregoś ze starterów. Szczegółowe zestawienie informacji o jakości produktów amplifikacji, sekwencjach starterów oraz programach amplifikacji PCR dla każdego z analizowanych markerów SSR zestawiono w Aneksach 2. i 3.

Wśród markerów, dla których opracowano warunki amplifikacji przeprowadzono analizę polimorfizmu, porównując między sobą formy rodzicielskie populacji mapujących. Stwierdzono, że 47,1% markerów SSR różnicuje między sobą genotypy rodzicielskie obydwu populacji mapujących (Tabela 4.1.). Najwięcej polimorficznych markerów (>20) zlokalizowano w chromosomach 3H i 7H dla obu populacji oraz w chromosomie 5H dla populacji MCam, natomiast najmniej (<10) w chromosomie 1H dla obu populacji oraz chromosomie 6H dla populacji MCam (Tabela 4.2.).

Tabela 4.1. Poziom polimorfizmu markerów SSR między badanymi genotypami jęczmienia

Porównywane genotypy	Liczba loci analizowanych	Liczba loci polimorficznych	Poziom polimorfizmu [%]
'Maresi' i Cam/B1/CI	244	115	47,1
'Georgie' i 'Harmal'	244	115	47,1

Tabela 4.2. Liczba markerów SSR różnicujących genotypy rodzicielskie populacji mapujących zidentyfikowanych dla poszczególnych chromosomów jęczmienia

Chromosom	Liczba polimorficznych markerów SSR	
	‘Maresi’ i Cam/B1/CI	‘Georgie’ i ‘Harmal’
1H	9	7
2H	14	19
3H	25	25
4H	16	12
5H	23	12
6H	6	16
7H	22	24
Razem	115	115

4.1.1.2. Markery SNP

Jakość oraz poziom polimorfizmu markerów SNP określone zostały indywidualnie dla obydwu analizowanych populacji mapujących na podstawie wyników z platformy GoldenGate firmy Illumina. Dla populacji MCam dobre jakościowo wyniki uzyskano dla 1441 markerów SNP (93,8%), natomiast w przypadku populacji GH dla 1392 loci (90,6%). Stwierdzono, że poziom polimorfizmu markerów SNP był niższy od tego określonego dla markerów SSR i wynosił 36,9% oraz 37,6%, odpowiednio, dla populacji mapującej MCam i GH (Tabela 4.3.). Dla populacji LCam wykazano polimorfizm na zbliżonym poziomie 30,1% (Mikołajczak, 2015). Najwięcej polimorficznych markerów SNP (>100) zlokalizowano w chromosomie 3H dla obu populacji oraz chromosomie 5H dla populacji MCam, a najmniej (<40) w chromosomie 1H dla populacji GH oraz chromosomie 7H dla populacji MCam (Tabela 4.4.).

Tabela 4.3. Poziom polimorfizmu markerów SNP między badanymi genotypami jęczmienia

Porównywane genotypy	Liczba loci analizowanych	Liczba loci polimorficznych	Poziom polimorfizmu [%]
‘Maresi’ i Cam/B1/CI	1441	533	36,9
‘Georgie’ i ‘Harmal’	1392	523	37,6

Tabela 4.4. Liczba markerów SNP różnicujących genotypy rodzicielskie populacji mapujących zidentyfikowanych dla poszczególnych chromosomów jęczmienia

Chromosom	Liczba polimorficznych markerów SNP	
	'Maresi' i Cam/B1/CI	'Georgie' i 'Harmal'
1H	46	31
2H	86	96
3H	113	112
4H	67	48
5H	115	83
6H	66	78
7H	38	75
Nieznana lokalizacja	2	–
Razem	533	523

4.1.2. Wybór markerów i linii RIL do tworzenia map genetycznych

W wyniku analizy segregacji alleli polimorficznych markerów SSR w populacji MCam, dla dwóch loci z dystalnego odcinka długiego ramienia chromosomu 7H, stwierdzono w wielu liniach RIL obecność nowego allelu, innego niż te obecne u genotypów rodzicielskich 'Maresi' i Cam/B1/CI. Z uwagi na wysoki odsetek nowego allelu w segregującej populacji (27% i 33%), loci te nie zostały uwzględnione podczas analizy sprzężeń i tworzenia mapy genetycznej. Z dalszych analiz wykluczone zostały również trzy linie RIL. Linia nr 116 została usunięta z uwagi na wysoki udział (20%) alleli innych niż rodzicielskie, natomiast linie nr 96 i 99 wykluczono ze względu na wysoką, odpowiednio 27% i 33%, heterozygotyczność. W przypadku markerów SNP, z dalszych analiz usunięto osiem loci, dla których stwierdzono wysoki odsetek heterozygot w populacji (23-66%). Dodatkowo, wykluczono dwa markery SNP o nieznannej chromosomowej lokalizacji, z uwagi na brak możliwości weryfikacji ich potencjalnej pozycji na stworzonej mapie genetycznej.

W wyniku analizy segregacji alleli polimorficznych markerów w populacji GH, do dalszych badań wykorzystano wszystkie markery SSR. Wykluczone zostały dwa markery SNP, dla których nie określono genotypu dla, odpowiednio, 18% i 34% linii RIL. Z dalszych analiz wykluczonych zostało również sześć linii RIL. Linie nr 27, 59 i 114 usunięto ze względu na wysoki (18-30%) udział heterozygot, natomiast linie nr 16, 24 i 58 wykluczono ze względu na brak genotypu dla 20-30% markerów SNP.

Procentowy udział heterozygot wśród wszystkich alleli markerów SSR i SNP pozostałych w analizie wynosił 1,2 oraz 1,8, odpowiednio, dla populacji MCam i GH, co stanowi wynik nieznacznie przekraczający teoretyczną wartość dla ósmego pokolenia populacji RIL (0,75%).

4.2. Konstruowanie map genetycznych

4.2.1. Charakterystyka szkieletowych map genetycznych skonstruowanych w oparciu o markery SSR

Dla populacji mapującej MCam, otrzymano mapę genetyczną złożoną z 21 grup sprzężeń, zawierających od 2 do 10 loci SSR (Rysunek 4.3 a). Poszczególne grupy zostały wydzielone na podstawie relatywnie wysokiej wartości współczynnika LOD w zakresie 6-8, przy czym zdecydowana większość grup sprzężonych markerów (17) została wyodrębniona dla LOD równego 8. Przy niższych wartościach współczynnika, markery z różnych chromosomów były kwalifikowane do tej samej grupy sprzężeń. Ogółem zmapowano 89 markerów SSR, co stanowi 77% polimorficznych loci dla tej populacji mapującej. Siedemnaście markerów nie zostało zakwalifikowanych do żadnej grupy sprzężeń. Łączna długość wyodrębnionych grup sprzężonych markerów wynosiła 248,2 cM, ze średnią odległością między loci równą 2,8 cM. Chromosomy 2H, 3H i 4H zostały rozbite na trzy osobne grupy sprzężeń, natomiast chromosomy 5H i 7H na pięć fragmentów. Pomędzy poszczególnymi grupami sprzężeń stwierdzono rejony niepokryte markerami. W przypadku chromosomów 1H i 6H zmapowano jedynie ich rejony okołocentromerowe. Potwierdzona została zgodność kolejności ułożenia loci SSR w poszczególnych grupach sprzężeń z mapami referencyjnymi jęczmienia. Wyjątek stanowiły rejony okołocentromerowe, gdzie ze względu na duże zagęszczenie loci układ markerów odbiegał nieznacznie od stwierdzonego dla innych map jęczmienia.

W populacji GH otrzymano 22 grupy sprzężeń markerów SSR, zawierające od 2 do 16 loci (Rysunek 4.3 b). Ogółem zmapowano 68% markerów SSR polimorficznych dla tej populacji. Łączna długość grup sprzężeń wynosiła 244,8 cM, a średnia odległość między markerami 2,9 cM. Szesnaście markerów nie zostało zakwalifikowanych do żadnej z grup sprzężeń, natomiast pozostałe loci pogrupowano według wartości współczynnika LOD w zakresie 3-9. Chromosomy 2H i 3H zostały podzielone na trzy grupy sprzężeń, 5H na dwie grupy sprzężeń, a chromosomy 6H i 7H zostały rozbite na odpowiednio, cztery i pięć grup sprzężeń. W przypadku chromosomów 1H i 4H, dla których wyróżniono po dwie grupy sprzężeń, zmapowano jedynie ich rejony

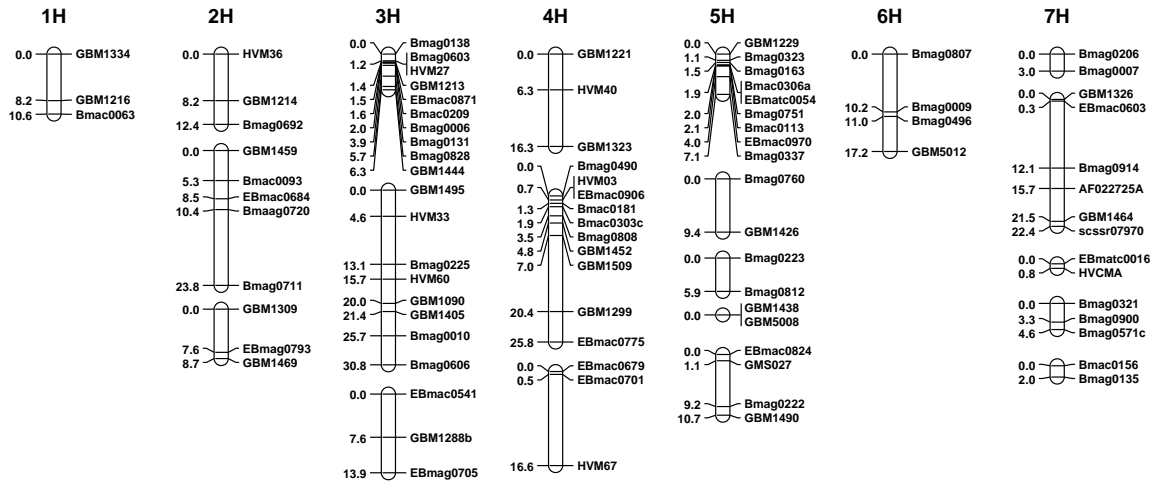
okołocentromerowe. Pomędzy poszczególnymi grupami sprzężeń, tak jak w przypadku mapy stworzonej dla populacji MCam, stwierdzono odcinki chromosomów niepokryte markerami. W wyniku porównania uzyskanej w niniejszej pracy mapy dla populacji GH z mapami referencyjnymi, odnotowano nieznacznie zmienioną kolejność ułożenia markerów jedynie w rejonach okołocentromerowych.

Otrzymane mapy markerów SSR, posiadające w populacji MCam i GH, odpowiednio, aż 21 i 22 grup sprzężeń, pokrywały jedynie około 25% genomu w porównaniu do innych map genetycznych jęczmienia (Ramsay i in., 2000; Varshney i in., 2007). Ponieważ wyróżnione grupy sprzężeń charakteryzują się układem markerów zgodnym z porównywanymi mapami referencyjnymi, w kolejnym etapie badań posłużyły one jako szkielet, który wysycono markerami SNP w celu stworzenia map w pełni pokrywających genom jęczmienia.

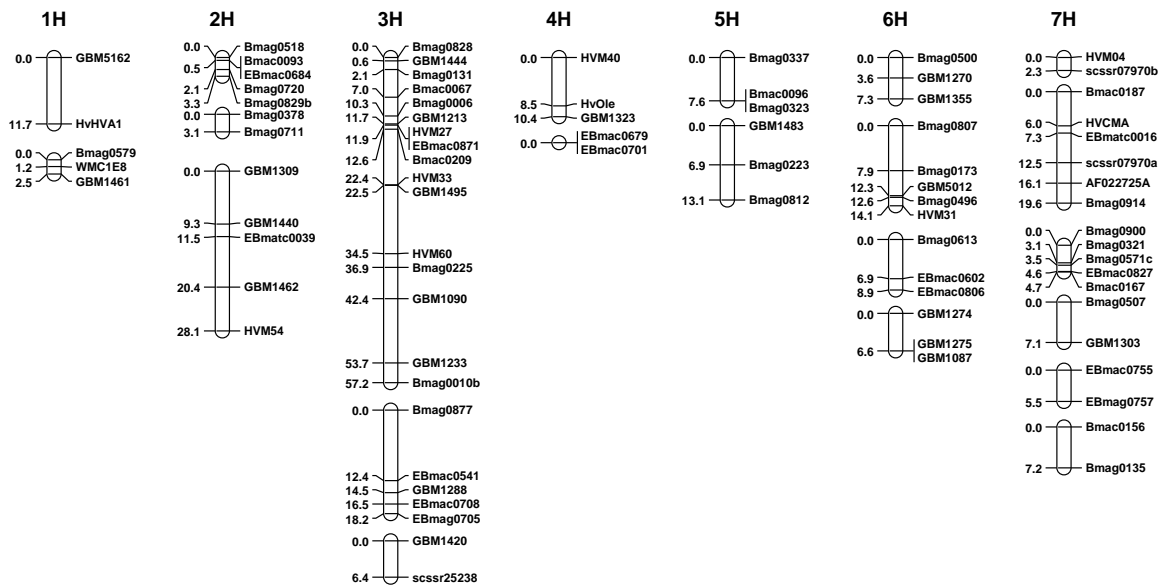
4.2.2. Charakterystyka map genetycznych wysyconych markerami SNP

Dla populacji mapującej MCam otrzymano mapę genetyczną złożoną z 15 grup sprzężeń, zawierających od 4 do 108 markerów każda (Rysunek 4.4., Tabela 4.6.). Chromosomy 2H, 3H, 4H oraz 6H zmapowano jako pojedyncze grupy sprzężeń, chromosom 5H został rozdzielony na 3 grupy, natomiast chromosomy 1H i 7H na cztery grupy sprzężeń. Przy wyodrębnianiu grup sprzężonych markerów zastosowano LOD z zakresu 3-5. Ogółem zmapowano 548 markerów, w tym 100 SSR, co stanowi 86,2% polimorficznych loci zidentyfikowanych dla tej populacji. Pozostałe 83 markery nie zostały zakwalifikowane do żadnej z grup sprzężeń bądź zostały wykluczone, ponieważ znacznie zaburzały układ sąsiadujących z nimi loci. Łączna długość wyłonionych grup sprzężeń wynosiła 873,92 cM, a średnia odległość między loci w grupach to 1,6 cM. Najdłuższa grupa sprzężeń odpowiadała chromosomowi 2H (161,75 cM), a najkrótsza to fragment chromosomu 7H, grupujący 5 markerów zlokalizowanych w tej samej pozycji. Kolejność ułożenia loci w grupach sprzężeń, podobnie jak w przypadku mapy szkieletowej opartej na markerach SSR, jest zgodna z innymi mapami jęczmienia. Wyjątek stanowiły rejony okołocentromerowe oraz fragment długiego ramienia chromosomu 6H. Skonstruowana mapa genetyczna charakteryzowała się dobrym pokryciem markerami. Na podstawie porównania z mapami referencyjnymi niezmapowane rejony genomu zidentyfikowano jedynie w obu ramionach chromosomu 1H oraz we fragmentach długich ramion chromosomów 3H, 6H i 7H.

a)



b)



Rysunek 4.3. Grupy sprzężeń markerów SSR uzyskane dla populacji a) MCam oraz b) GH.

Tabela 4.6. Cechy mapy genetycznej markerów SSR i SNP dla populacji MCam

Chromosom	Liczba grup sprzężeń	Wartość współczynnika LOD	Liczba zmapowanych markerów	Łączna długość grup sprzężeń [cM]	Średnia odległość między markerami [cM]
1H	4	4-5	50	104,71	2,1
2H	1	3	82	161,75	2,0
3H	1	3	108	109,79	1,0
4H	1	4	71	109,05	1,5
5H	3	5	128	158,36	1,2
6H	1	5	56	77,82	1,4
7H	4	4-5	53	152,44	2,9
Razem	15	3-5	548	873,92	1,6

Dla populacji mapującej GH wyodrębniono 25 grup sprzężeń zawierających od 3 do 91 markerów każda (Rysunek 4.4., Tabela 4.7.). Pięć grup, które stanowiły fragmenty chromosomów 1H i 2H wyłoniono na podstawie współczynnika LOD w zakresie 3-5. Zdecydowana większość grup sprzężonych markerów (20), które odpowiadały fragmentom pozostałych chromosomów, została wyodrębniona na podstawie wysokiej wartości LOD, w zakresie 9-14. Wybór tak wysokich wartości współczynnika podyktowany był trudnością w ustaleniu prawidłowej kolejności markerów w obrębie większych grup sprzężeń. Chromosom 6H został zmapowany jako pojedynczy fragment, pozostałe chromosomy zostały rozbite na 2-6 indywidualnych grup. Zmapowanych zostało 562 markerów, w tym 98 SSR, co stanowi 88,4% polimorficznych loci zidentyfikowanych dla tej populacji. Łączna długość wyodrębnionych grup sprzężeń wynosiła 787,80 cM ze średnią odległością między sąsiadującymi markerami równą 1,4 cM. Najdłuższa grupa sprzężeń odpowiadała chromosomowi 6H (120,75 cM), natomiast najkrótsza to fragment chromosomu 4H (3,43 cM). Kolejność ułożenia loci w poszczególnych grupach sprzężeń była zgodna z mapami referencyjnymi, za wyjątkiem rejonów w pobliżu centromerów. Stworzona mapa genetyczna charakteryzowała się dobrym pokryciem. Wyjątek stanowiły chromosom 1H, gdzie zmapowano jedynie długie ramię, a krótkie reprezentowane było przez niewielką grupę sprzężeń złożoną z trzech markerów oraz chromosom 4H, gdzie nie zmapowano rejonu okołocentromerowego, ze względu na eliminację alleli jednego z rodziców.

Tabela 4.7. Cechy mapy genetycznej markerów SSR i SNP dla populacji GH

Chromosom	Liczba grup sprzężeń	Wartość współczynnika LOD	Liczba zmapowanych markerów	Łączna długość grup sprzężeń [cM]	Średnia odległość między markerami [cM]
1H	2	3-4	31	53,02	1,7
2H	3	4-5	107	118,60	1,1
3H	4	10	127	164,46	1,3
4H	6	10-14	38	52,02	1,4
5H	5	11	89	132,94	1,5
6H	1	9	77	120,75	1,6
7H	4	10	93	146,01	1,6
Razem	25	3-14	562	787,80	1,4

4.2.3. Analiza segregacji alleli polimorficznych markerów SSR i SNP wśród linii populacji mapujących

Dla każdego z polimorficznych loci SSR i SNP, które zakwalifikowano do dalszych analiz (636 markerów w każdej z populacji mapujących), wyliczono rozszczepienia i odchylenie od prawidłowej segregacji alleli testem χ^2 . Stwierdzono, że 42,9% markerów SSR i SNP w populacji MCam oraz 36,6% markerów w populacji GH wykazywało istotne statystycznie odchylenia od przewidywanej segregacji alleli 1:1. Stosunkowo wysoki poziom odchylenia markerów od przyjętego wzoru segregacji (61,7%) wykazano dla populacji LCam (Mikołajczak, 2015). Zdecydowana większość markerów prezentujących w populacjach mapujących istotne statystycznie odchylenie od przewidywanej segregacji, wykazywała nadmiar allelu odmiany europejskiej. W populacji MCam, 76,2% loci o zaburzonym wzorze segregacji wykazywało przewagę allelu odmiany 'Maresi', natomiast w populacji GH, 79,8% markerów prezentowało nadmiar allelu odmiany 'Georgie'. Markery o nieprawidłowej segregacji zidentyfikowano we wszystkich siedmiu chromosomach (Tabela 4.5.). W populacji MCam najwięcej markerów o zaburzonej segregacji zlokalizowano w chromosomach 1H, 5H i 7H (>50%), natomiast najmniej w chromosomie 4H (12,2%). W populacji GH najwięcej loci o nieprawidłowej segregacji zlokalizowano w chromosomach 2H i 4H (>50%), a najmniej w chromosomie 7H (20,4%).

Tabela 4.5. Wyniki analizy χ^2 dla markerów SSR i SNP w populacjach MCam i GH

Chromosom	Markery SSR i SNP o zaburzonym wzorze segregacji [%]		Nadmiar allelu z odmiany	
	MCam	GH	MCam	GH
1H	67,3	34,2	M	H
2H	32,0	69,6	M	G
3H	45,2	24,1	M	G
4H	12,2	53,3	M i C	G
5H	54,4	34,7	M i C	G i H
6H	42,9	23,7	M	G i H
7H	50,0	20,4	M i C	G i H

$\alpha=0,05$; M – ‘Maresi’, C – Cam/B1/CI, G – ‘Georgie’, H – ‘Harmal’; Kolumna ‘Nadmiar allelu z odmiany’ informuje o tym, który z alleli rodzicielskich przeważa wśród markerów o istotnym statystycznie odchyleniu od prawidłowej segregacji

4.2.4. Identyfikacja oraz charakterystyka regionów SDR

Markery o istotnym statystycznie odchyleniu od przewidywanej segregacji 1:1 zostały zidentyfikowane we wszystkich siedmiu chromosomach w obu analizowanych populacjach mapujących. Dodatkowo, markery o zaburzonym wzorze segregacji na korzyść jednego z genotypów rodzicielskich miały tendencję do występowania w grupach, wyraźnie oddzielonych od sąsiadujących rejonów, w których segregacja alleli była prawidłowa bądź zaburzona na korzyść allelu drugiego rodzica. Zaobserwowano, że w przypadku większości chromosomów, tego typu regiony zostały rozdzielone na mapach genetycznych na osobne grupy sprzężeń (Rysunek 4.4.). Ogółem, dla markerów prezentujących istotne statystycznie odchylenie od prawidłowej segregacji 1:1 zidentyfikowano w populacjach MCam i GH odpowiednio, 13 i 17 regionów SDR (ang. segregation distortion region). Zakwalifikowano do nich większość markerów o zaburzonym wzorze segregacji, mianowicie 93,9% w populacji MCam oraz 89,3% w populacji GH (Tabela 4.8.). Regiony SDR w obydwu populacjach mapujących stanowiły ok. 30% całkowitej długości mapy genetycznej. W populacji MCam najdłuższe regiony SDR zidentyfikowano w chromosomach 1H, 3H i 5H, które charakteryzowały się największą liczbą markerów o nieprawidłowym wzorze segregacji. W populacji GH najdłuższe regiony tego typu wyróżniono w chromosomach 2H oraz 3H. Stwierdzono, że wyróżnione regiony SDR obejmowały około połowę regionów okołocentromerowych na mapach genetycznych dla populacji MCam i GH. Po porównaniu położenia

wyróżnionych regionów SDR na analizowanych mapach genetycznych stwierdzono, że 10 z nich było wspólnych dla obu analizowanych populacji mapujących. Wspólne regiony SDR stanowiły odpowiednio 77 i 59% ogólnej liczby zidentyfikowanych SDR w populacjach MCam i GH.

Tabela 4.8. Charakterystyka regionów SDR w populacjach MCam i GH

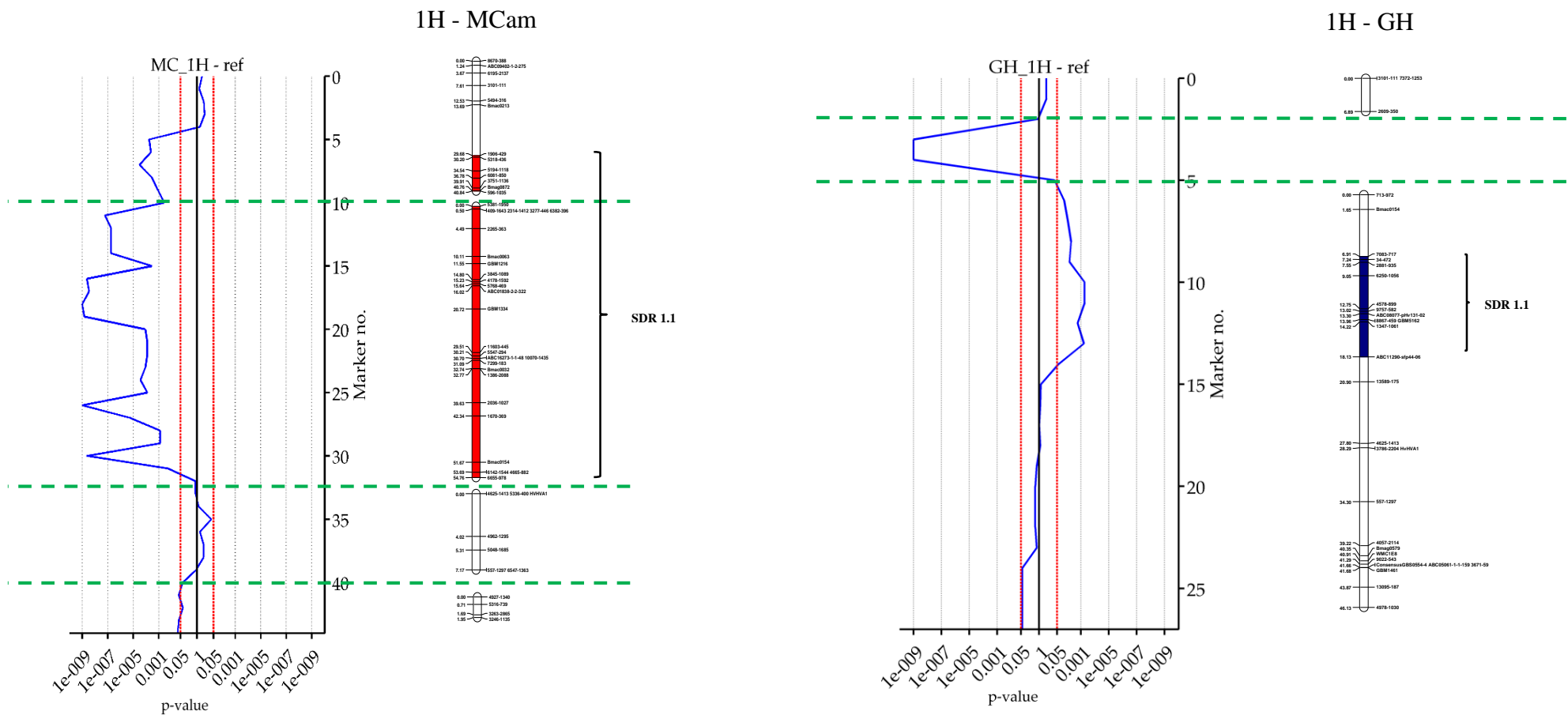
Chr.	Liczba regionów SDR		Liczba markerów w regionach SDR		% markerów o zaburzonej wzorze segregacji zakwalifikowanych do regionów SDR		Długość regionów SDR [cM]		% jaki stanowią regiony SDR w stosunku do długości chromosomu	
	MC	GH	MC	GH	MC	GH	MC	GH	MC	GH
1H	1	1	33	11	94,3	100	65,9	11,2	62,9	21,2
2H	2	4	25	75	92,6	100	42,2	63,5	26,1	53,6
3H	2	3	40	29	100	90,6	58,1	54,2	52,9	32,9
4H	1	4	4	12	44,4	92,3	1,1	18,6	0,9	35,7
5H	3	2	70	29	97,2	87,9	70,2	17,5	44,3	13,2
6H	2	2	20	8	100	57,1	13,0	6,4	16,7	5,3
7H	2	1	24	12	88,9	63,1	38,4	25,8	25,2	17,6
Razem	13	17	216	176	93,9	89,3	288,8	220,5	33,0	27,9

MC – populacja MCam; GH – populacja GH

4.3. Strategia identyfikacji i mapowania funkcjonalnych genów kandydackich

4.3.1. Analiza polimorfizmów zidentyfikowanych w sekwencjach CG

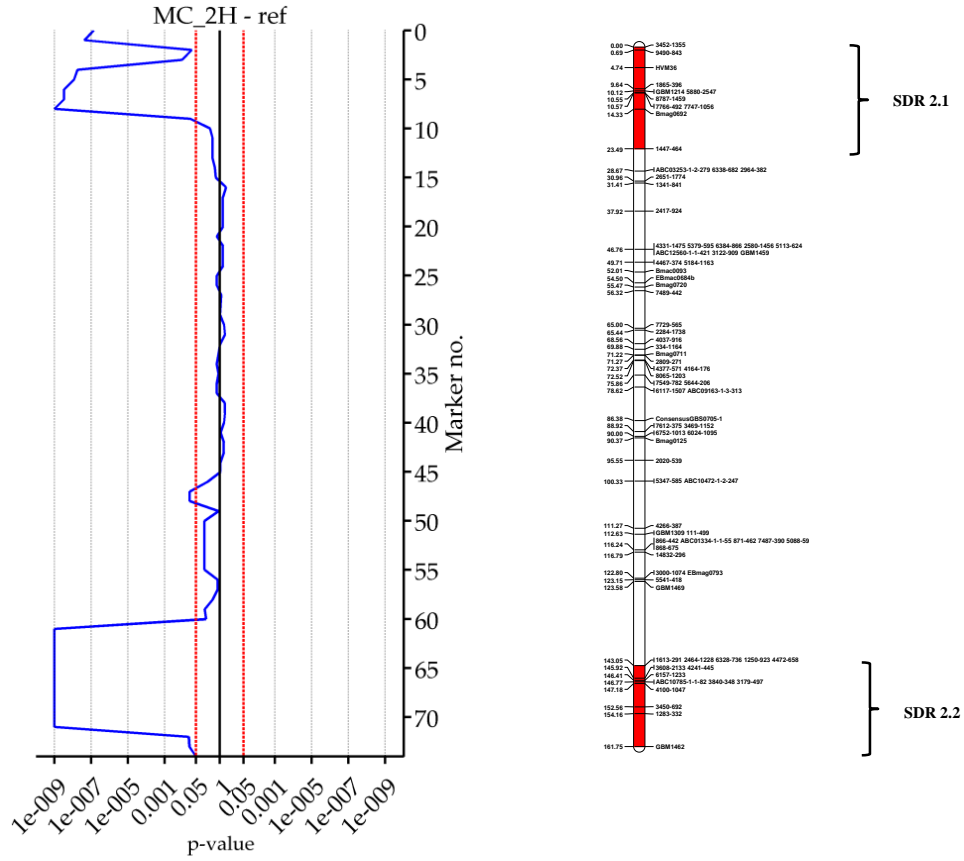
Ogółem przeanalizowano wyniki dwukierunkowego sekwencjonowania amplikonów dla 94 fragmentów pochodzących z 56 funkcjonalnych genów kandydackich, związanych z odpowiedzią na stres niedoboru wody (Tabela 3.2.; Tabela 3.3.; Aneks 4. Tabela 10.8.) o łącznej długości 91,21 kpz, wśród odmian rodzicielskich populacji mapujących (Tabela 4.10.). Polimorfizmy zidentyfikowano w sekwencjach 45 (80%) genów kandydackich, wybranych na podstawie danych literaturowych (13 genów) oraz z wyników różnicowej analizy transkryptomów odmian ‘Maresi’ i Cam/B1/CI (32 geny). Łącznie zidentyfikowano 313 zmian sekwencji, z czego 295 (94%) stanowiły polimorfizmy typu SNP, a 18 (6%) polimorfizmy typu INDEL. Wśród zmian o charakterze SNP większość (186; 63%) stanowiły tranzycje, natomiast 109 (37%) stanowiły transwersje. Wśród zmian typu INDEL zidentyfikowano 10 delecji o długości od 1 do 36 nukleotydów oraz 8 insercji o długości od 1 do 12 nukleotydów. W wyniku analizy układu polimorficznych alleli w poszczególnych genach kandydackich między czterema genotypami rodzicielskimi populacji mapujących wyróżniono 105 haplotypów, w liczbie od 2 do 4 na gen (Aneks 4. Tabela 10.9.).



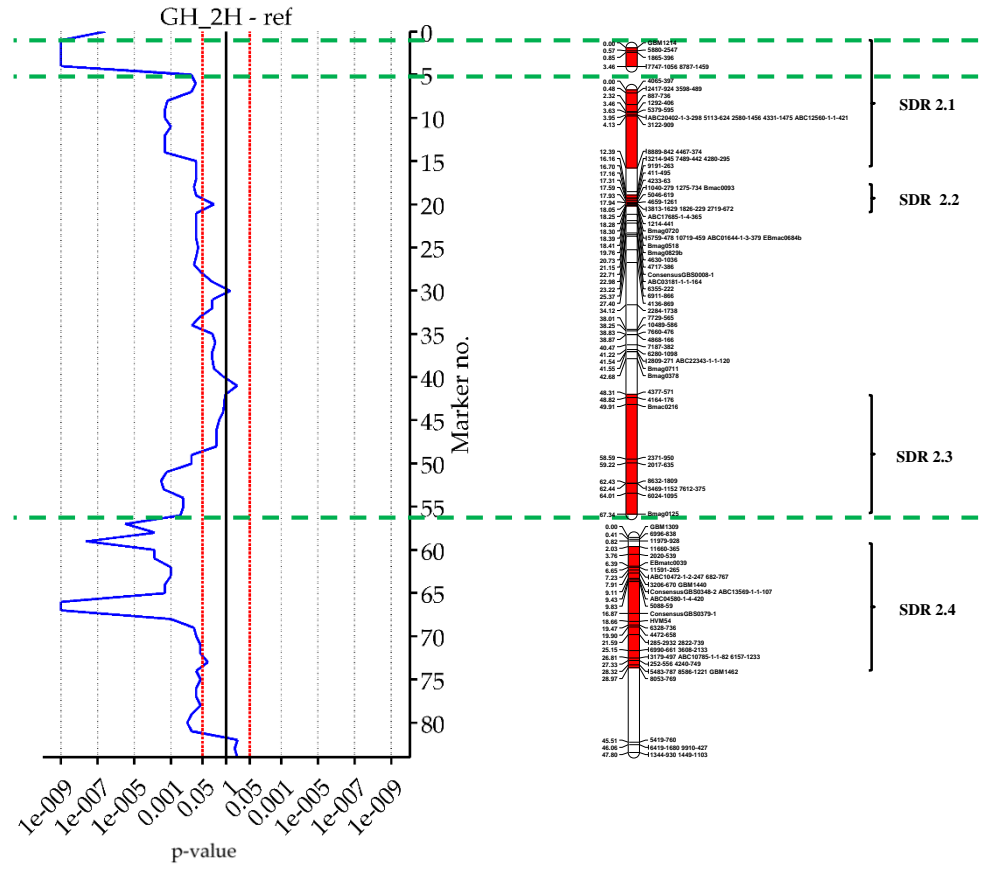
Rysunek 4.4. Zależność między wzorem segregacji alleli polimorficznych markerów a liczbą wyznaczonych grup sprzężeń w populacjach MCam i GH.

Wykres z lewej strony mapy każdego chromosomu przedstawia segregację alleli wszystkich polimorficznych markerów uszeregowanych w kolejności wg map referencyjnych: środkowa pionowa linia (p-value 1) przedstawia oczekiwaną segregację alleli 1:1, natomiast pionowe czerwone przerywane linie oznaczają odchylenie od teoretycznej segregacji 1:1 na poziomie istotności $\alpha = 0,05$. Zaburzenie segregacji w lewą stronę przedstawia nadmiar allelu odmiany europejskiej, natomiast w prawą stronę, allelu odmiany syryjskiej. Z prawej strony wykresów, przedstawiono mapy genetyczne skonstruowane dla każdego z chromosomów w populacjach MCam i GH. Zidentyfikowane regiony SDR wyróżniono kolorem, gdzie kolor czerwony symbolizował region SDR z przewagą allelu odmiany europejskiej, natomiast niebieski z przewagą allelu odmiany syryjskiej.

2H - MCam

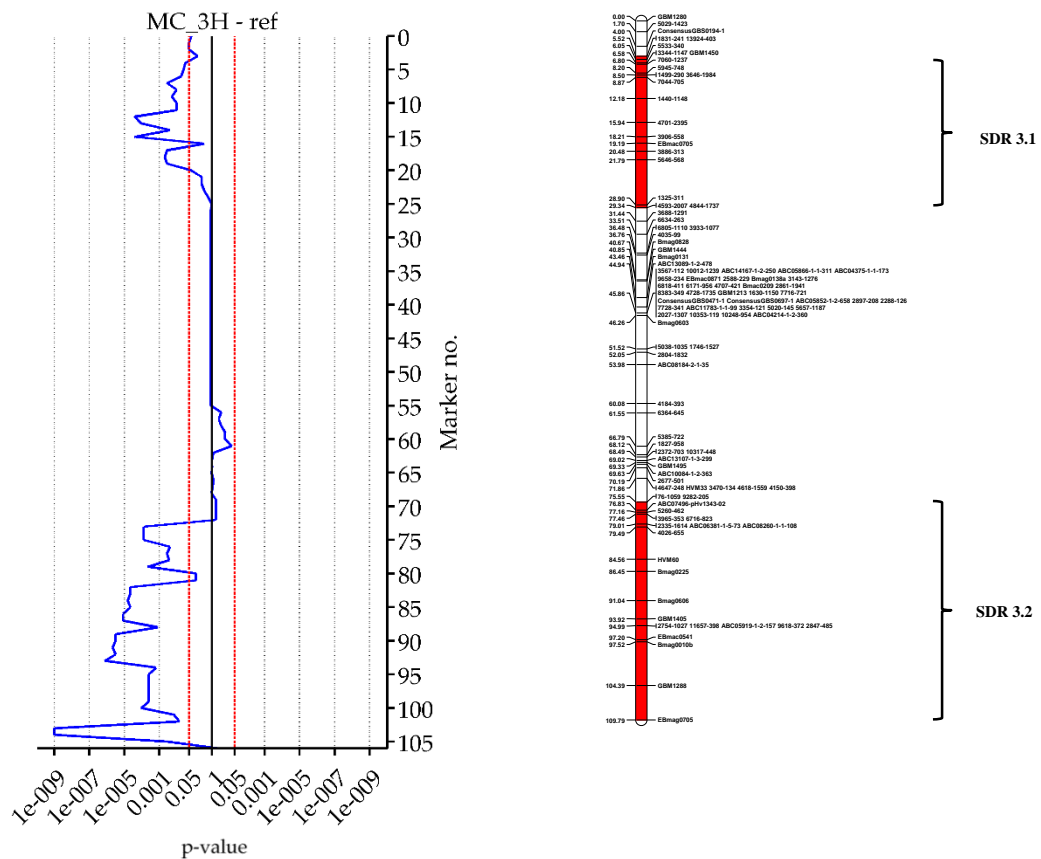


2H - GH

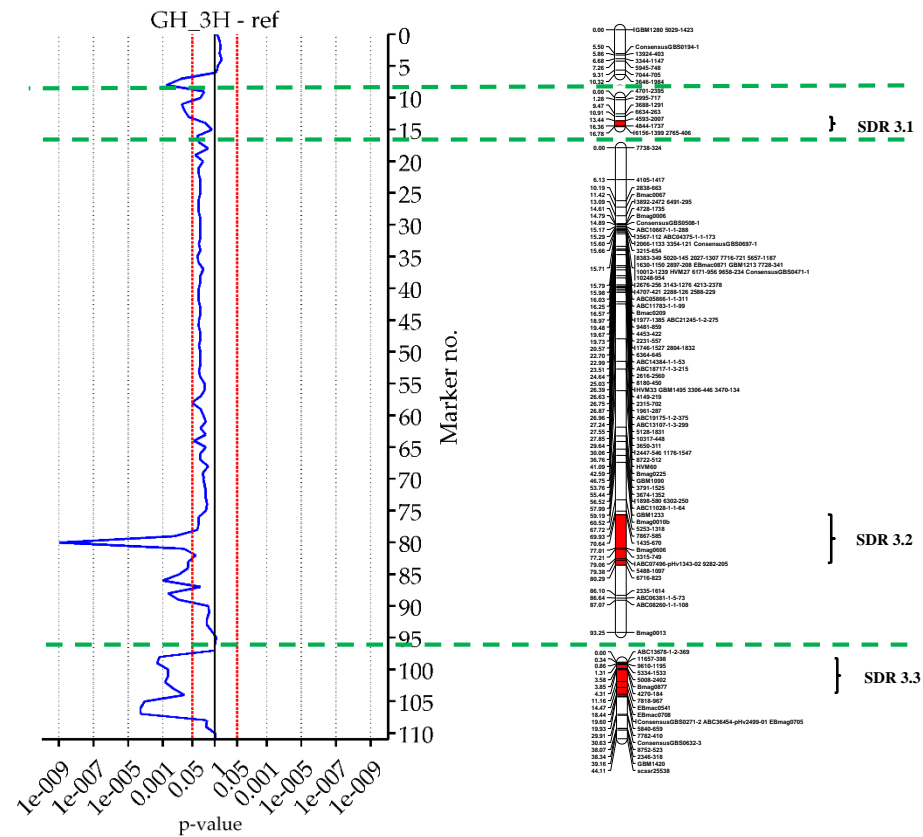


Rysunek 4.4. cd.

3H - MCam

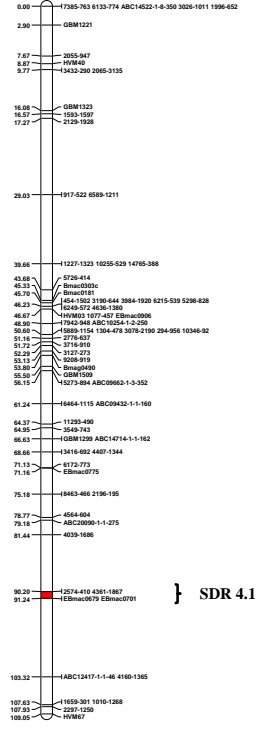
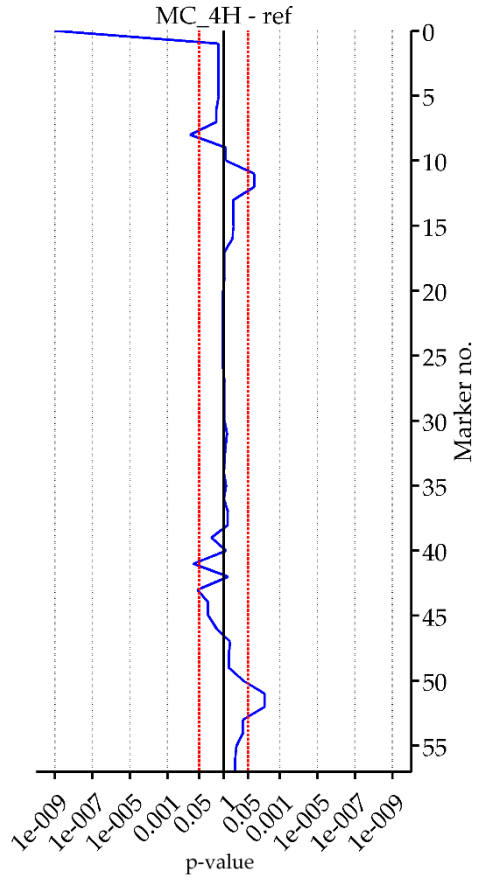


3H - GH



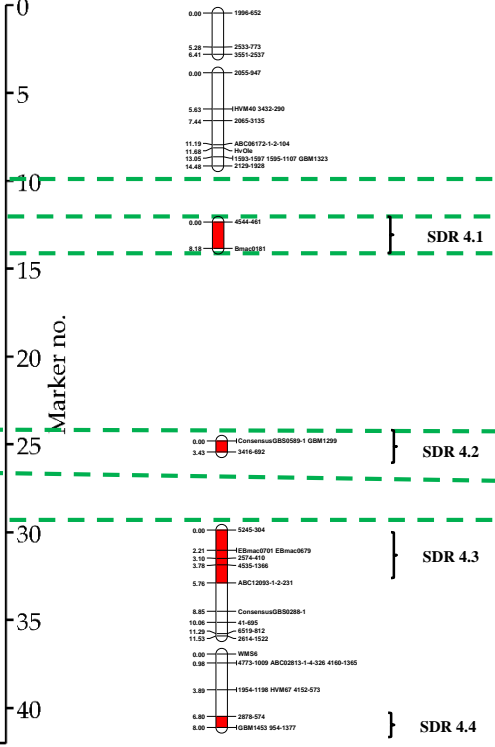
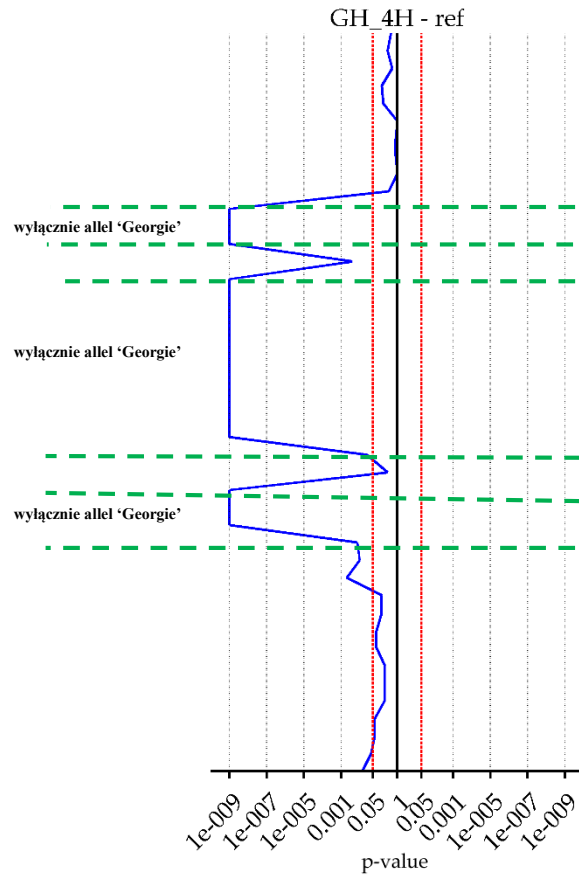
Rysunek 4.4. cd.

4H - MCam



} SDR 4.1

4H - GH

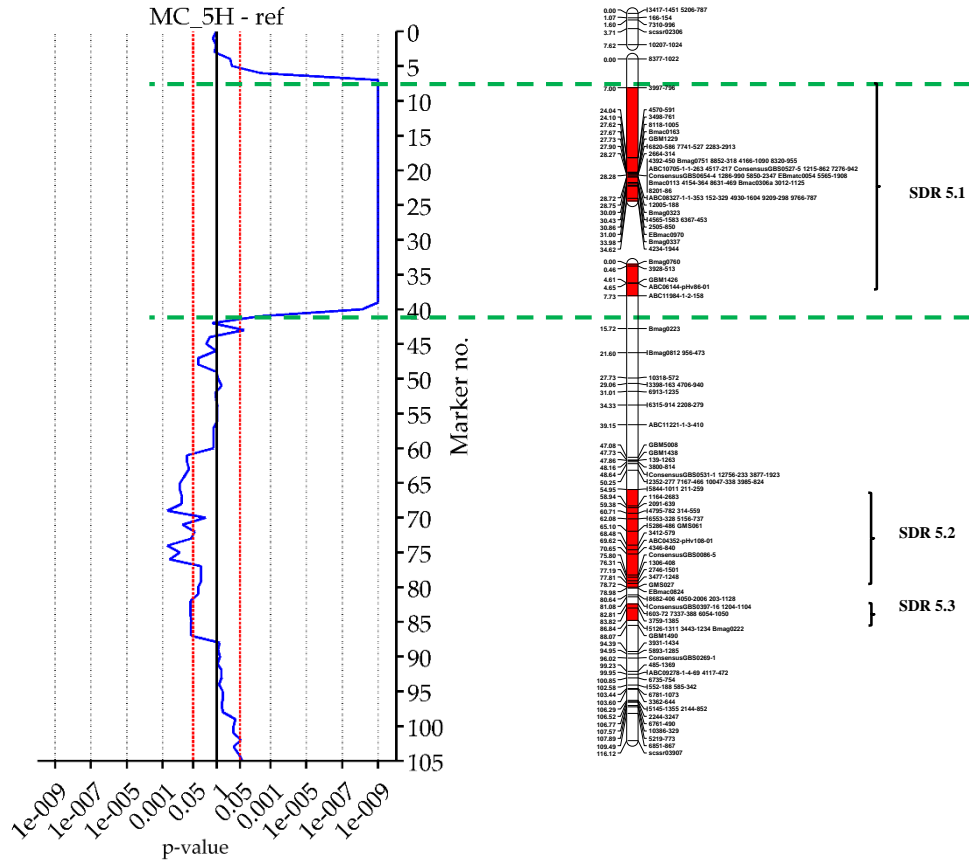


} SDR 4.1

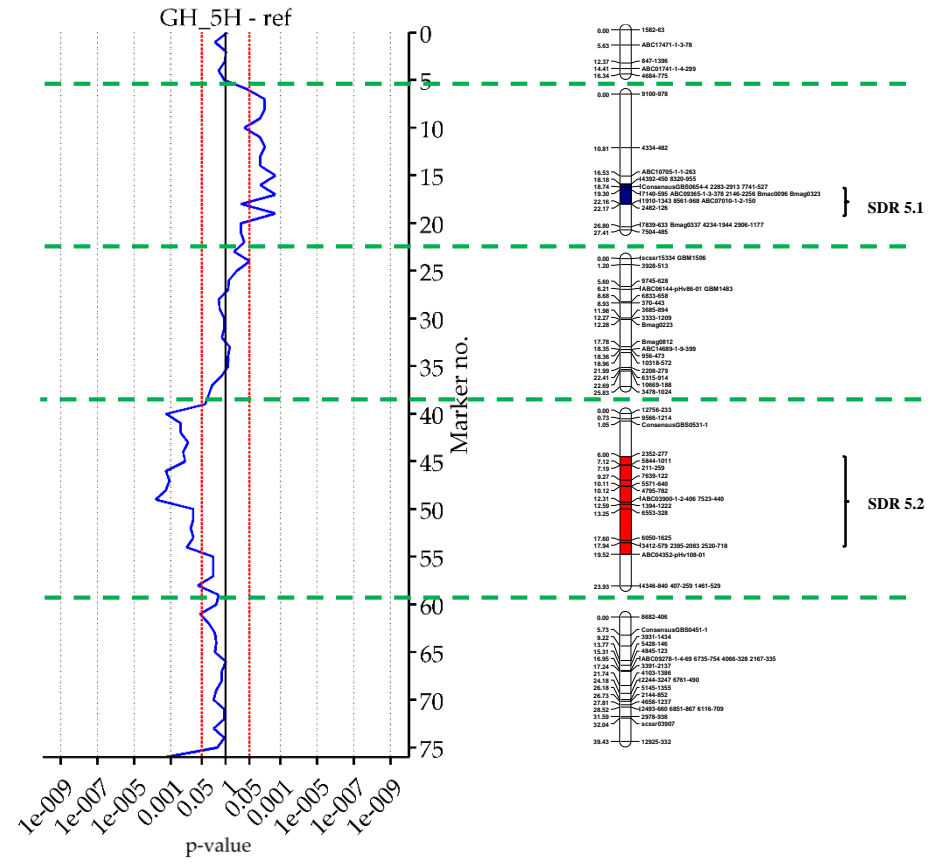
} SDR 4.4

Rysunek 4.4. cd.

5H - MCam

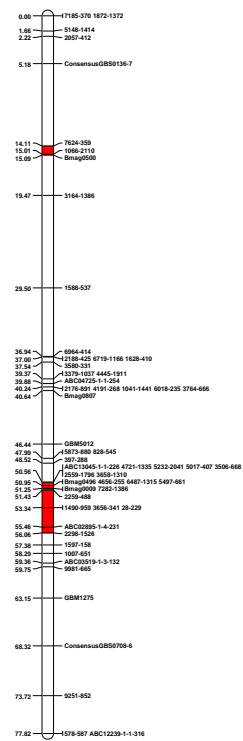
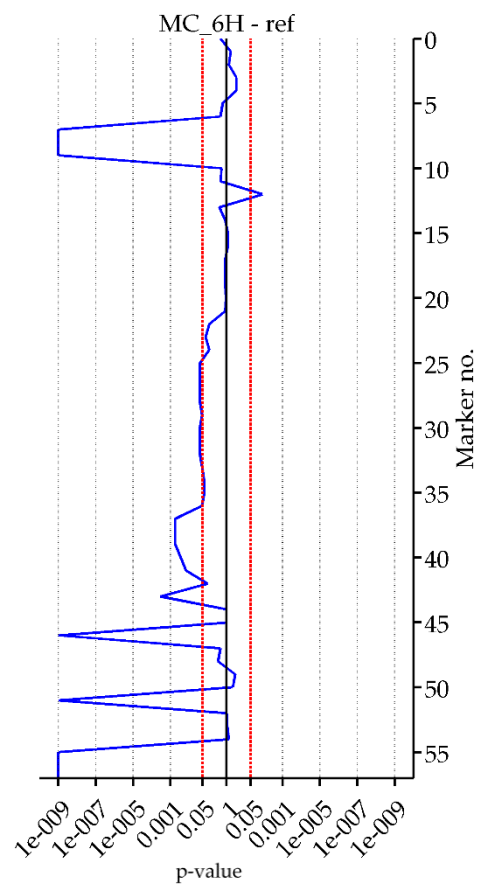


5H - GH



Rysunek 4.4. cd.

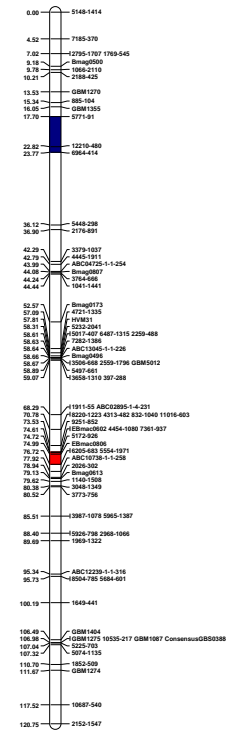
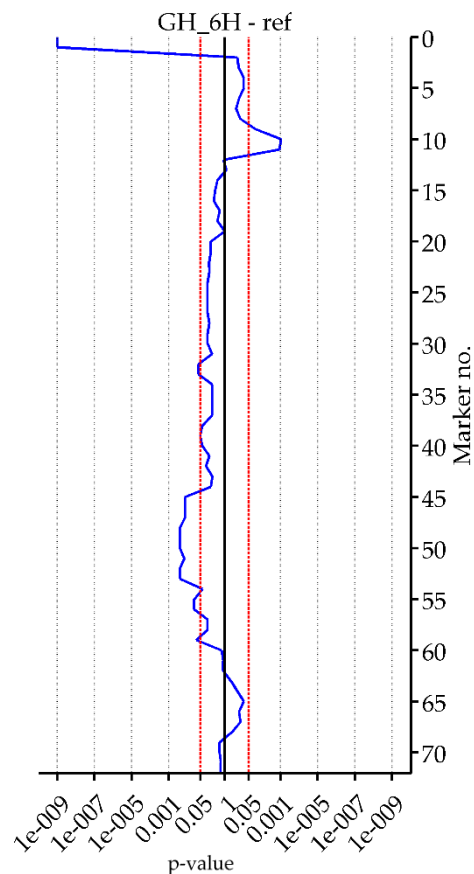
6H - MCam



} SDR 6.1

} SDR 6.2

6H - GH

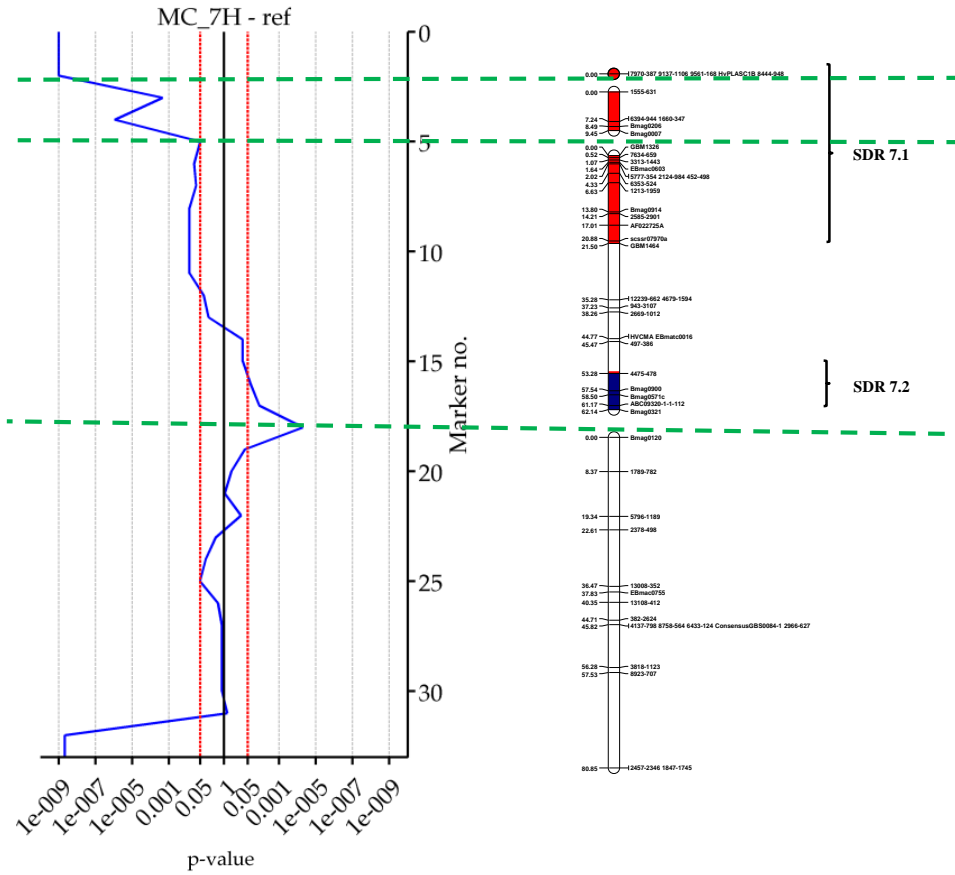


} SDR 6.1

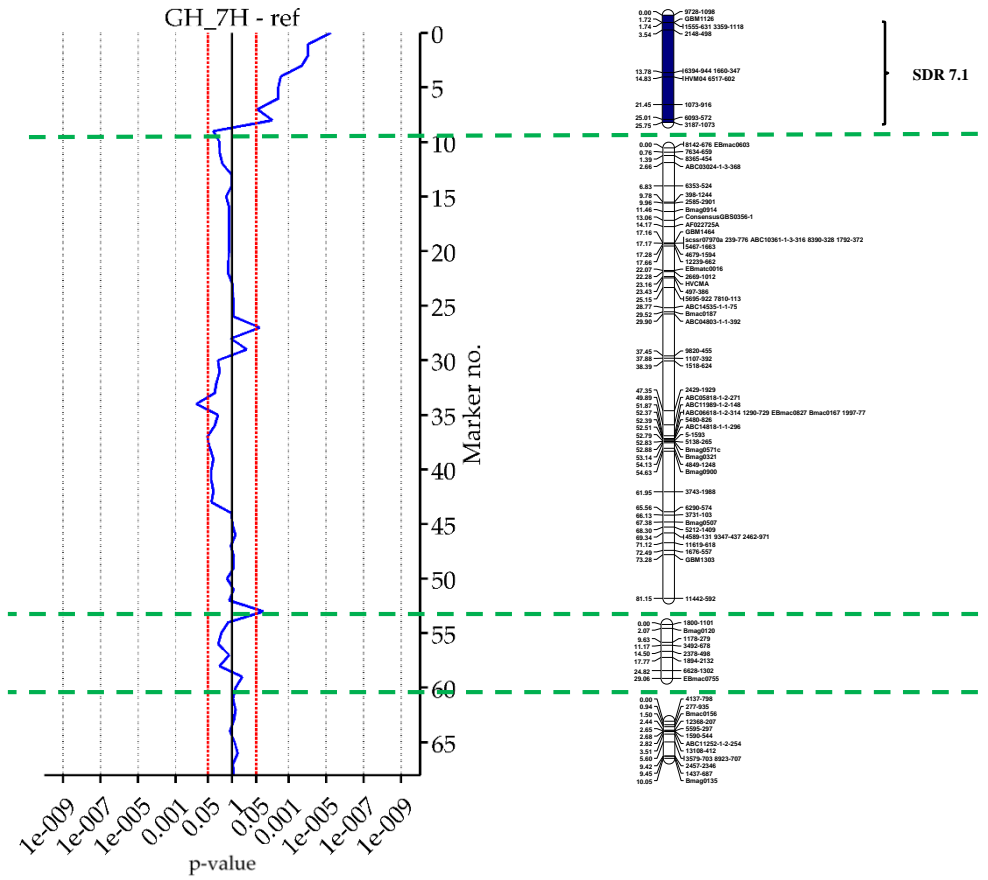
} SDR 6.2

Rysunek 4.4. cd.

7H - MCam



7H - GH



Rysunek 4.4. cd.

Tabela 4.10. Charakterystyka polimorfizmów sekwencji zidentyfikowanych w analizowanych fragmentach genów kandydackich związanych z tolerancją na stres niedoboru wody

Analizowane geny			Zidentyfikowane polimorfizmy		
Liczba genów	Łączna liczba przeanalizowanych fragmentów	Łączna długość przeanalizowanych fragmentów [kpz]	Liczba zmian sekwencji	Częstotliwość* zmian sekwencji na 1kpz	Gęstość** zmian sekwencji 1/kpz
56	94	91,21	313	3,43	1/0,29

*Częstotliwość zmian sekwencji określona jako ich liczba w przeliczeniu na 1 kpz

**Gęstość zmian sekwencji określona jako długość fragmentów genów w kpz, w których wystąpiła 1 zmiana

Odmianą, w której najczęściej wykrywano odmienny allel był ‘Harmal’ (167 zmian sekwencji), natomiast odmianą, w której najrzadziej wykrywano allel inny niż w pozostałych genotypów była ‘Maresi’ (48 zmian sekwencji). Wśród pozostałych odmian zidentyfikowano 63 polimorfizmy w ‘Georgie’ oraz 73 w linii Cam/B1/CI. Porównując między sobą genotypy stanowiące formy rodzicielskie populacji mapujących RIL stwierdzono, że najwięcej polimorfizmów sekwencji (232) w 27 genach wystąpiło między odmianami ‘Georgie’ i ‘Harmal’, natomiast prawie dwa razy mniej (121), w 18 genach między odmianą ‘Maresi’ i linią Cam/B1/CI.

W celu pozycjonowania polimorficznych genów kandydackich na skonstruowanej mapie genetycznej opracowano metody ich genotypowania w populacjach mapujących. Dla największej liczby genów (26) opracowano technikę CAPS. Najmniej genów (6) zgenotypowano w populacjach mapujących z wykorzystaniem techniki STS, a dla pozostałych 13 zastosowano technikę dCAPS. Opracowane protokoły genotypowania wszystkich polimorficznych genów w populacjach MCam i GH zestawiono w Aneksie 5. W populacji, której formami rodzicielskimi były odmiany ‘Georgie’ i ‘Harmal’ przeanalizowano segregację alleli dla 27 polimorficznych genów, natomiast w populacji wyprowadzonej z krzyżówki odmiany ‘Maresi’ i linii Cam/B1/CI przeanalizowano polimorfizmy w sekwencjach 18 loci.

4.3.2. Lokalizowanie polimorficznych CG na mapach genetycznych skonstruowanych dla populacji mapujących MCam i GH

W ramach niniejszej pracy doktorskiej zidentyfikowano 45 polimorficznych genów kandydackich, dla których opracowano markery oraz przeprowadzono genotypowanie w badanych populacjach mapujących. Do grupy tej włączono 24 geny, które przeanalizowano pod względem polimorfizmu we wcześniejszych badaniach

prowadzonych w Katedrze Genetyki UŚ. Ogółem, w obu badanych populacjach mapujących prześlędzono segregację alleli 69 polimorficznych funkcjonalnych genów kandydackich. Do lokalizowania na mapie genetycznej skonstruowanej dla populacji GH włączono 42 geny kandydackie, a dla populacji MCam grupę 27 genów. Dwadzieścia pięć mapowanych genów pochodziło z danych literaturowych, natomiast pozostałe 44 z eksperymentu mikromacierzowego.

Po przeprowadzeniu analizy segregacji alleli genów kandydackich za pomocą testu χ^2 stwierdzono, że 44,4% genów w populacji MCam oraz 40,5% genów w populacji GH wykazywało istotne statystycznie odchylenia od przewidywanej segregacji alleli 1:1. Otrzymany wynik jest porównywalny z uzyskanym dla segregacji alleli polimorficznych markerów SSR i SNP (42,9% w populacji MCam oraz 36,6% w populacji GH). Podobnie jak w przypadku markerów, większość analizowanych genów (79%) prezentujących w populacjach mapujących istotne statystycznie odchylenie od wzoru segregacji 1:1, wykazywała nadmiar allelu odmiany europejskiej.

W wyniku analizy sprzężeń genów oraz markerów SSR i SNP, na mapach genetycznych MCam i GH umieszczono 67 genów (97%). Na mapie genetycznej stworzonej dla populacji MCam zmapowano 26 genów kandydackich. Najwięcej genów zlokalizowanych zostało w chromosomie 4H – 8. Po 6 genów przypisano do chromosomów 2H i 5H. W chromosomach 1H oraz 3H zmapowane zostały po 2 geny, natomiast w chromosomach 6H i 7H po jednym. Z kolei na mapie genetycznej skonstruowanej dla populacji GH zmapowano 41 genów kandydackich. Geny kandydackie zostały zlokalizowane we wszystkich siedmiu chromosomach. Najwięcej genów zmapowano w chromosomie 7H (13). Do chromosomu 6H przypisano 7 genów, natomiast do chromosomu 2H – 6. Po 5 genów zlokalizowano w chromosomach 3H i 5H. Najmniej genów zmapowano w chromosomach 4H – 3 geny oraz 1H – 2.

4.4. Charakterystyka wysokorozdzielczej, konsensusowej mapy funkcjonalnej ze zmapowanymi CG związanymi z tolerancją jęczmienia na stres niedoboru wody

Wysycenie szkieletowych map markerów SSR skonstruowanych dla populacji MCam i GH markerami typu SNP, znacząco zwiększyło stopień pokrycia genomu, aczkolwiek w dalszym ciągu obserwowana była duża liczba grup sprzężeń wyodrębnionych dla obu populacji (15 dla populacji MCam i 25 dla GH). Ponadto, skonstruowane mapy charakteryzowały się występowaniem odcinków chromosomów,

w których nie zmapowano żadnego markera. W celu uzyskania pełnego pokrycia genomu jęczmienia oraz zredukowania liczby grup sprzężonych markerów skonstruowano mapę konsensusową, poprzez połączenie ze sobą map indywidualnych. Zintegrowano dwie mapy genetyczne stworzone w ramach niniejszej pracy doktorskiej dla populacji MCam oraz GH, zawierające markery SSR, SNP i zmapowane funkcjonalne geny kandydackie, oraz mapę genetyczną opartą o markery SNP, skonstruowaną dla populacji LCam w IGR PAN w Poznaniu. Mapę genetyczną dla populacji LCam, która w pierwotnej wersji składała się z 30 grup sprzężeń, zmodyfikowano na potrzeby integracji, rozbijając niektóre grupy sprzężeń na mniejsze, co finalnie stworzyło 38 grup sprzężonych markerów. Zabieg ten podyktowany był problemami w ustaleniu poprawnej kolejności ułożenia markerów na mapie konsensusowej.

Ogółem, do mapowania zakwalifikowano 1085 polimorficznych markerów (w co najmniej jednej populacji mapującej), z czego 922 stanowiły markery SNP, a 163 markery SSR. Konstruując mapę konsensusową, integrowano ze sobą te grupy sprzężeń, które miały co najmniej dwa wspólne markery, zwane markerami kotwiczącymi (ang. anchor markers). Stwierdzono, że 134 markery SNP były polimorficzne we wszystkich trzech populacjach, natomiast 449 loci zidentyfikowano w co najmniej dwóch populacjach mapujących. W populacjach mapujących MCam i GH, zlokalizowano 65 wspólnych polimorficznych markerów SSR. Do mapy konsensusowej włączono 70 grup sprzężeń z 78 wyodrębnionych dla wszystkich populacji mapujących w trakcie tworzenia map indywidualnych.

Otrzymana mapa konsensusowa zawiera łącznie 875 loci, w tym 696 markerów SNP i 115 SSR (Rysunek 4.5., Tabela 4.12.). 596 markerów (73%), które wykazały sprzężenie na skonstruowanej mapie genetycznej zlokalizowanych jest w obrębie sekwencji 590 genów. Liczba zmapowanych loci w przeliczeniu na chromosom mieści się w zakresie od 68 dla chromosomu 1H do 190 dla chromosomu 5H. We wszystkich siedmiu chromosomach zlokalizowano ogółem 64 funkcjonalne geny kandydackie, z których 23 zostały wytypowane na podstawie danych literaturowych, natomiast 41 to geny, które w eksperymencie mikromacierzowym wykazywały istotne statystycznie różnice w ekspresji między odmianami rodzicielskimi populacji MCam podczas stresu suszy. Najwięcej genów kandydackich zmapowano w chromosomie 7H (14), natomiast najmniej w chromosomie 1H (4). Finalna długość powstałej mapy wynosi 941,86 cM, a średnia odległość między markerami jest równa 1,1 cM. Znacząco zredukowano liczbę grup sprzężeń otrzymaną dla map indywidualnych, otrzymując 13 grup sprzężonych

markerów, co jednak w dalszym ciągu stanowi o 6 więcej niż wynosi haploidalna liczba chromosomów jęczmienia. Chromosomy 2H, 4H i 6H zostały zmapowane jako pojedyncze grupy sprzężeń, chromosomy 1H i 3H zostały rozbite na dwie grupy sprzężeń, a chromosomy 5H i 7H na trzy grupy. Najdłuższa grupa obejmuje chromosom 2H i pokrywa 147,97 cM, a najkrótsza o długości 29,07 cM odpowiada fragmentowi chromosomu 5H. Potwierdzona została poprawność określenia chromosomowej lokalizacji genów kandydackich poprzez porównanie z pozycją analizowanych genów na mapie fizycznej jęczmienia, która dostępna jest w bazie Ensembl Plants. Podobnie, jak w przypadku indywidualnych map genetycznych skonstruowanych w ramach niniejszej pracy, wykazano zgodność kolejności ułożenia markerów w poszczególnych grupach sprzężeń, na podstawie porównania do innych opublikowanych map jęczmienia. Nieznacznie zmieniony układ markerów w stosunku do map referencyjnych obserwowano w pobliżu większości centromerów, ze względu na występowanie zagęszczenia loci w tym rejonie chromosomów. Otrzymana mapa genetyczna charakteryzuje się stosunkowo równomiernym pokryciem markerami. Największy niewysycony markerami fragment zidentyfikowano między 2 i 3 grupą sprzężeń w chromosomie 5H o długości około 30 cM wg mapy referencyjnej (Close i in., 2009). Mniejsze niewysycone markerami rejony o długości około 10 cM zidentyfikowano przede wszystkim w obu ramionach chromosomów 1H i 7H, które charakteryzują się zarazem największą średnią odległością między zmapowanymi markerami.

Tabela 4.12. Cechy wysokorozdzielczej konsensusowej mapy funkcjonalnej ze zmapowanymi genami kandydackimi

Chromosom	Liczba grup sprzężeń	Liczba zmapowanych loci ogółem	Liczba zmapowanych genów kandydackich	Łączna długość grup sprzężeń [cM]	Średnia odległość między markerami [cM]
1H	2	68	4	107,89	1,6
2H	1	122	11	147,97	1,2
3H	2	158	6	165,08	1,0
4H	1	114	11	101,89	0,9
5H	3	190	11	156,69	0,8
6H	1	113	7	99,86	0,9
7H	3	110	14	162,48	1,5
Razem	13	875	64	941,86	1,1

4.5. Mapowanie loci cech ilościowych

4.5.1. Charakterystyka fenotypowa populacji RIL

Najważniejsze parametry statystyczne, charakteryzujące badane cechy fizjologiczne i biochemiczne w analizowanych wariantach doświadczenia, zestawiono w Tabeli 4.13. Wykazano, że zdecydowana większość z nich (72%) segregowała zgodnie z rozkładem normalnym. Wśród linii populacji RIL obserwowano genotypy prezentujące średnie wartości przekraczające zakres zmienności występujący w pokoleniu rodzicielskim, w odniesieniu do większości badanych parametrów. Efektów transgresji nie odnotowano jedynie w odniesieniu do ilości energii zatrzymanej w PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia (TR_0/CS), ilości energii wykorzystanej do transportu elektronów w przeliczeniu na CS (ET_0/CS), wygaszania fluorescencji zależnego od zmian stanów (qT) oraz zawartości rafinozy w warunkach optymalnego nawodnienia, a także zawartości β -karotenu w warunkach suszy. Istotnie statystycznie różnice między średnimi wartościami cech w obrębie populacji RIL między warunkami optymalnego nawodnienia i stresu suszy wykazano dla wszystkich cech, za wyjątkiem ilości energii zatrzymanej w PSII w przeliczeniu na centrum reakcji (TR_0/RC), aktywności katalazy oraz aktywności α -tokotrienolu. Skutkiem stresu niedoboru wody było obniżenie średnich wartości większości parametrów fizjologicznych charakteryzujących bilans wodny, specyficzne przepływy strumieni energii, wydajności przepływów energii, fotochemiczną aktywność PSII oraz intensywność wymiany gazowej. Największą różnicę między średnimi w populacji dla analizowanych reżimów wodnych stwierdzono w przypadku intensywności fotosyntezy netto (P_n) oraz intensywności transpiracji (E), których wartości w warunkach stresu suszy zostały obniżone odpowiednio 6- i 4-krotnie w stosunku do kontroli. Negatywne skutki niedoboru wody wykazano również w przypadku fotochemicznej wydajności kwantowej PSII (Φ_{PSII}), względnej zawartości wody (RWC) oraz zawartości i utraty wody z liścia (WC i WL), dla których odnotowano co najmniej dwukrotny spadek średnich wartości w stosunku do warunków kontrolnych. Dla czterech parametrów fizjologicznych wykazano podwyższenie średnich wartości w odpowiedzi na niedobór wody. Wśród nich, około dwukrotny wzrost zaobserwowano dla wycieku elektrolitów (EL) oraz wygaszania fluorescencji zależnego od fotoinhibicji (qI). W liściach siewek po stresie suszy stwierdzono aż 300-krotny wzrost zawartości proliny w stosunku do warunków optymalnego nawodnienia oraz 2-krotny wzrost zawartości etylenu. Analizowana

Tabela 4.13. Statystyka opisowa analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych w populacji MCam

Kategoria fenotypowa	Cecha	Wariant dośw.	Formy rodzicielskie		Populacja RIL			
			'Maresi'	Cam/B1/CI	Średnia	Min.	Max.	CV [%]
			Średnia	Średnia				
Bilans wodny	WC	K ^a	5,91	7,01	6,12 ^b	3,98	8,08	14,97
		S ^a	2,45	3,38	2,98	1,03	5,27	21,72
		SI ^a	41,42	48,18	49,49	21,03	85,15	24,67
	WL	K ^a	3,15	4,15	2,85 ^b	1,49	4,72	23,42
		S ^a	1,00	2,61	1,31	0,76	2,78	26,44
		SI ^a	31,62	63,01	47,49	25,30	90,49	28,48
	RWC	K	93,11	93,01	89,73 ^b	70,59	98,02	6,83
		S ^a	26,73	34,06	35,32	16,51	75,50	23,73
		SI ^a	28,70	36,61	39,79	17,14	88,13	27,37
	WUE	K ^a	5,65	6,79	5,42 ^b	3,44	9,40	23,96
		S	4,25	4,59	3,45	1,74	6,96	37,01
		SI ^a	75,13	67,67	63,54	24,03	93,94	24,64
	EL	K	10,83	10,45	10,71 ^b	6,76	20,83	18,19
		S ^a	42,05	26,71	27,92	12,38	49,61	32,22
		SI ^a	388,26	255,51	262,21	117,64	480,18	29,38
Fotosynteza	ABS/RC	K ^a	2,76	2,71	2,83 ^b	2,40	3,54	8,34
		S ^a	3,13	3,10	2,95	2,52	3,71	6,43
		SI ^a	113,15	114,25	104,59	81,62	128,87	8,60
	TR ₀ /RC	K ^a	2,11	2,08	2,13	1,89	2,56	6,59
		S ^a	2,15	2,32	2,10	1,88	2,60	5,25
		SI ^a	101,96	111,34	98,91	83,06	113,76	5,90
	ET ₀ /RC	K ^a	1,09	1,05	1,07 ^b	0,88	1,25	6,19
		S ^a	0,88	1,00	0,95	0,69	1,10	8,58
		SI ^a	80,23	95,68	88,31	69,00	105,71	8,83
	DI ₀ /RC	K ^a	0,65	0,63	0,70 ^b	0,51	1,06	14,54
		S ^a	0,97	0,78	0,85	0,63	1,20	14,63
		SI ^a	149,58	123,96	122,60	72,95	208,11	19,99
	RC/CS	K	2260,35	1392,54	1428,66 ^b	942,06	2294,29	18,30
		S ^a	566,04	781,59	832,66	446,25	1248,51	19,37
		SI ^a	25,04	56,13	60,43	19,70	91,86	26,27
	ABS/CS	K	6204,34	3754,55	3993,32 ^b	2922,42	6482,04	16,77
		S ^a	1757,57	2390,78	2407,97	1352,56	3319,21	16,53
		SI ^a	28,33	63,68	62,20	23,22	91,58	23,48
	TR ₀ /CS	K	4753,47	2889,66	3012,01 ^b	2198,79	4723,33	17,12
		S ^a	1218,82	1803,31	1736,46	893,62	2482,18	18,33
		SI ^a	25,64	62,41	59,63	19,90	90,16	25,47
	ET ₀ /CS	K	2465,28	1458,33	1526,95 ^b	1081,43	2405,19	16,72
		S ^a	497,84	795,22	797,71	308,71	1269,52	23,47
		SI ^a	20,19	54,53	54,20	13,97	92,34	30,12
DI ₀ /CS	K	1450,87	864,89	981,31 ^b	723,64	1862,78	17,44	
	S ^a	538,76	587,47	671,51	457,33	909,14	14,77	
	SI ^a	37,13	67,92	70,33	29,21	97,98	20,80	
Ψ _{po}	K ^a	0,77	0,77	0,75 ^b	0,71	0,79	1,98	
	S ^a	0,69	0,75	0,72	0,65	0,77	3,75	
	SI ^a	90,07	97,57	94,94	83,58	103,10	4,21	
Ψ _o	K ^a	0,52	0,50	0,51 ^b	0,45	0,56	3,85	
	S ^a	0,41	0,43	0,45	0,34	0,52	8,09	
	SI ^a	78,64	86,12	89,37	69,36	103,15	7,69	
φ _{eo}	K ^a	0,40	0,39	0,38 ^b	0,33	0,44	5,02	
	S ^a	0,28	0,33	0,33	0,23	0,39	10,07	
	SI ^a	70,80	84,27	85,03	59,31	105,88	10,42	

Tabela 4.13. cd.

Kategoria fenotypowa	Cecha	Wariant dośw.	Formy rodzicielskie		Populacja RIL			
			'Maresi'	Cam/B1/CI	Średnia	Min.	Max.	CV [%]
			Średnia	Średnia				
Fotosynteza	(1-B)av	K ^a	7,68	6,38	7,26 ^b	6,05	9,23	8,80
		S ^a	4,82	5,64	5,50	3,78	6,79	12,43
		SI ^a	62,75	88,37	76,31	45,15	99,81	14,76
	PI _{abs}	K ^a	13,38	12,78	11,99 ^b	7,13	20,06	17,64
		S ^a	5,09	8,00	7,75	3,68	12,03	24,64
		SI ^a	38,04	62,58	65,96	28,36	99,52	25,40
	F _v '/F _m '	K ^a	0,50	0,50	0,48 ^b	0,37	0,53	6,00
		S ^a	0,35	0,41	0,39	0,31	0,48	8,79
		SI ^a	71,04	82,09	81,20	62,12	105,90	9,10
	qP	K ^a	0,35	0,25	0,32 ^b	0,23	0,45	16,53
		S ^a	0,17	0,17	0,18	0,13	0,28	12,60
		SI ^a	48,89	68,78	58,98	35,83	89,70	19,97
	Φ _{PSII}	K ^a	0,18	0,12	0,15 ^b	0,11	0,21	14,71
		S ^a	0,06	0,07	0,07	0,05	0,10	15,29
		SI ^a	35,05	56,97	47,94	29,66	76,66	22,68
	qE	K ^a	0,23	0,25	0,25 ^b	0,11	0,39	22,83
		S	0,06	0,15	0,08	0,02	0,23	47,70
		SI ^a	25,02	60,37	34,60	8,61	100,46	48,86
	qT	K ^a	0,51	0,45	0,42 ^b	0,24	0,64	16,45
		S ^a	0,12	0,33	0,18	0,06	0,32	35,07
		SI ^a	24,37	72,55	42,62	11,99	83,36	35,93
	qI	K ^a	0,28	0,36	0,37 ^b	0,20	0,56	20,10
		S ^a	0,72	0,52	0,66	0,47	0,86	14,67
		SI ^a	258,20	145,18	184,57	119,88	309,35	23,32
Pn	K ^a	13,97	9,44	10,92 ^b	7,13	15,54	18,41	
	S	1,50	1,79	1,82	1,15	4,59	24,43	
	SI ^a	10,74	18,99	17,05	8,45	39,86	26,43	
E	K ^a	2,47	1,39	2,14 ^b	1,08	4,34	31,53	
	S	0,35	0,39	0,62	0,20	2,63	53,05	
	SI	14,30	28,06	29,19	10,71	85,67	44,47	
Zawartość osmoprotektantów i hormonów	Pro	K	0,24	0,23	0,22 ^b	0,03	0,27	11,77
		S	75,69	75,89	65,32	33,20	76,53	13,56
		SI	31537,5	32995,6	31137,4	13833	21290	60,24
	Glu	K	12,70	33,60	18,24 ^b	8,80	76,10	44,73
		S ^a	41,80	94,90	62,26	8,80	125,50	37,61
		SI ^a	329,13	282,44	372,61	40,93	878,13	45,47
	Fru	K ^a	14,10	38,10	17,67 ^b	10,40	34,00	25,06
		S ^a	24,50	20,30	21,07	11,10	38,80	24,49
		SI ^a	173,76	53,28	125,92	59,12	283,21	35,29
	Sach	K ^a	12,00	24,00	27,10 ^b	4,40	70,60	49,41
		S ^a	22,50	37,00	39,20	8,40	77,00	35,97
		SI	187,50	154,17	195,63	21,24	716,07	72,09
	Raf	K ^a	1,30	4,80	2,03 ^b	0,70	3,90	33,01
		S ^a	0,30	1,50	1,06	0,01	2,90	60,24
		SI ^a	23,08	31,25	58,72	14,28	181,82	70,47
	Mal	K	2,50	17,70	4,42 ^b	1,30	22,50	112,35
		S	1,30	1,70	1,60	0,90	4,60	44,39
		SI ^a	52,00	9,60	64,25	4,89	218,75	67,29
	Ety	K	1,02	1,03	1,00 ^b	0,86	1,04	2,68
		S ^a	2,05	1,88	2,19	1,80	2,60	7,60
		SI ^a	200,98	182,52	219,86	178,22	268,60	7,84

Tabela 4.13. cd.

Kategoria fenotypowa	Cecha	Wariant dośw.	Formy rodzicielskie		Populacja RIL			
			'Maresi'	Cam/B1/CI	Średnia	Min.	Max.	CV [%]
			Średnia	Średnia				
Aktywność antyoksydantów	SOD	K	1,19	2,06	2,05 ^b	0,16	7,56	70,35
		S ^a	4,82	0,61	3,89	0,33	7,73	44,19
		SI	403,67	29,54	372,28	14,54	2913,86	127,49
	CAT	K	25,50E-4	57,99E-4	69,04E-4	4,78E-4	19,67E-3	57,73
		S ^a	20,87E-4	59,69E-4	70,86E-4	20,87E-4	20,66E-3	45,52
		SI	81,70	102,94	147,14	22,63	1809,62	128,30
	POX	K	0,22	17,84E-2	0,19 ^b	01,19E-2	1,00	35,97
		S	0,29	17,74E-2	0,24	02,01E-2	0,99	32,44
		SI	134,53	99,45	186,07	167,96	99,77	140,16
	GTt	K ^a	59,00E-4	72,00E-4	40,91E-4 ^b	0,00	10,22E-3	49,32
		S ^a	60,68E-4	22,94E-4	52,77E-4	0,00	15,00E-3	52,30
		SI	102,84	31,87	107,52	0,00	701,50	111,64
	ATt	K	45,03E-4	54,78E-4	81,74E-4	31,23E-4	137,3E-3	91,35
		S	61,06E-4	39,81E-4	103,8E-4	18,49E-4	1355E-3	101,71
		SI	135,58	72,67	137,41	13,22	945,50	119,88
	DTf	K	101,6E-4	113,2E-4	109,3E-4 ^b	81,00E-4	151,4E-4	8,58
		S	121,1E-4	104,6E-4	128,6E-4	18,49E-4	227,9E-4	18,02
		SI	127,04	92,44	118,88	16,87	229,52	20,62
	GTf	K	20,06E-3	17,87E-3	22,66E-3 ^b	13,08E-3	64,01E-3	29,02
		S ^a	86,08E-3	45,01E-3	74,08E-3	1,84E-3	152,7E-3	40,04
		SI ^a	429,17	252,48	340,46	7,61	767,34	41,84
	ATf	K ^a	0,09	0,08	0,10 ^b	0,05	0,17	23,75
		S ^a	0,11	0,05	0,15	0,06	0,28	28,74
		SI ^a	120,38	63,15	159,46	53,46	304,25	33,24
BK	K ^a	276,55	209,65	186,32 ^b	43,21	509,66	38,05	
	S ^a	125,71	45,22	166,69	46,61	361,62	33,17	
	SI	45,46	21,57	105,62	17,50	338,18	58,72	

K – warunki optymalnego nawodnienia, S – warunki stresu suszy, SI – wskaźnik stresu [%], CV – współczynnik zmienności; średnie wartości analizowanych parametrów otrzymano od zespołów IFR PAN i KFR UR

^a – oznacza istotną statystycznie zgodność rozkładu wartości cech w badanych wariantach doświadczenia z rozkładem normalnym wg testu Shapiro-Wilka ($\alpha = 0,00001$)

^b – oznacza istotne statystycznie różnice między średnimi wartościami cech w populacji RIL między warunkami optymalnego nawodnienia i stresu suszy ($\alpha = 0,05$)

WC - zawartość wody w liściu, WL - utrata wody z liścia, RWC - względna zawartość wody, WUE - efektywność wykorzystania wody, EL - wyciek elektrolitów, ABS/RC - ilość energii zaabsorbowanej przez cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na centrum reakcji, TR₀/RC - ilość energii zatrzymanej w PSII w przeliczeniu na centrum reakcji, ET₀/RC - ilość energii wykorzystanej do transportu elektronów w przeliczeniu na centrum reakcji, DI₀/RC - ilość energii rozproszonej z PSII w przeliczeniu na centrum reakcji, RC/CS - liczba aktywnych centrów reakcji, ABS/CS - ilość energii zaabsorbowanej przez cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia, TR₀/CS - ilość energii zatrzymanej w PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia, ET₀/CS - ilość energii wykorzystanej do transportu elektronów w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia, DI₀/CS - ilość energii rozproszonej z PSII w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia, ϕ_{po} - maksymalna wydajność kwantowa pierwotnych reakcji fotochemicznych fotosyntezy, ψ_0 - wydajność przekazania wybitego z centrum reakcji PSII elektronu na łańcuch transportu elektronów, ϕ_{eo} - wydajność kwantowa transportu elektronów, (1-B)av - średni odsetek otwartych centrów reakcji w czasie potrzebnym do zamknięcia wszystkich centrów reakcji, PI_{abs} - wskaźnik wydajności fotochemicznej PSII obliczony na podstawie absorpcji energii, Fv'/Fm' - wydajność przechwytywania energii wzbudzenia przez centra reakcji PSII, qP - współczynnik fotochemicznego wygaszania fluorescencji, Φ_{PSII} - fotochemiczna wydajność kwantowa PSII, qE - energetycznie uwarunkowane wygaszanie fluorescencji, qT - wygaszanie fluorescencji zależne od zmian stanów, qI - wygaszanie fluorescencji zależne od fotoinhibicji, Pn - intensywność fotosyntezy netto, E - intensywność transpiracji, Pro - zawartość proliny, Glu - zawartość glukozy, Fru - zawartość fruktozy, Sach - zawartość sacharozy, Raf - zawartość rafinozy, Mal - zawartość maltozy, Ety - zawartość etylenu, SOD - aktywność dysmutazy ponadtlenkowej, CAT - aktywność katalazy, POX - aktywność peroksydazy, GTt - zawartość γ -tokotrienolu, ATt - zawartość α -tokotrienolu, DTf - zawartość δ -tokoferolu, GTf - zawartość γ -tokoferolu, ATf - zawartość α -tokoferolu, BK - zawartość β -karotenu

populacja mapująca była zróżnicowana pod względem zawartości węglowodanów. W tkankach po okresie ograniczonej dostępności wody wykazano istotną statystycznie akumulację cukrów prostych, przy czym największy wzrost zawartości charakteryzował glukozę. Wśród oligosacharydów odnotowano zwiększenie ilości sacharozy, przy jednoczesnym spadku zawartości maltozy i rafinozy. Skutkiem stresu suszy był wzrost aktywności wszystkich analizowanych enzymów antyoksydacyjnych oraz nieenzymatycznych przeciwutleniaczy, przy czym najwyższy stwierdzono dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD) oraz γ -tokoferolu. Względny rozrzut wartości cech w populacji w stosunku do średnich wyrażony współczynnikiem zmienności (CV) był dla większości z nich wyższy w warunkach stresu niedoboru wody w porównaniu do kontroli.

Współczynniki korelacji między parametrami w obu analizowanych reżimach wodnych zestawiono w Tabelach 4.14 a i b. W warunkach optymalnego nawodnienia silne korelacje ($|r| \geq 0,5$) stwierdzono jedynie wśród parametrów opisujących bilans wodny oraz fotosyntezę. Silne pozytywne zależności wykazano między:

- intensywnością fotosyntezy netto (P_n) i intensywnością transpiracji (E); $r = 0,72$,
- fotochemiczną wydajnością kwantową PSII (Φ_{PSII}) i wskaźnikiem fotochemicznego wygaszaniem fluorescencji (qP); $r = 0,91$,
- wskaźnikiem wydajności fotochemicznej PSII obliczonym na podstawie absorpcji energii (PI_{abs}) i parametrami wydajności przepływów energii (φ_{po} , ψ_o , φ_{eo}); $0,73 \leq r \leq 0,9$,
- liczbą aktywnych centrów reakcji (RC/CS) i parametrami przepływów strumieni energii w odniesieniu do wzbudzonej powierzchni liścia (ABS/CS, TR_0/CS , ET_0/CS); $0,7 \leq r \leq 0,94$.

Zidentyfikowano też grupy cech wzajemnie skorelowanych, obejmujących parametry:

- przepływów strumieni energii w odniesieniu do wzbudzonej powierzchni liścia (ABS/CS, TR_0/CS , ET_0/CS , DI_0/CS); $0,79 \leq r \leq 0,99$,
- przepływów strumieni energii w odniesieniu do centrum reakcji (ABS/RC, TR_0/RC , ET_0/RC , DI_0/RC); $0,65 \leq r \leq 0,98$,
- wydajności przepływów energii (φ_{po} , ψ_o , φ_{eo}); $0,73 \leq r \leq 0,94$.

Silne negatywne korelacje wykazano między:

- intensywnością transpiracji (E) i efektywnością wykorzystania wody (WUE); $r = -0,91$,

- wygaszaniem fluorescencji zależnym od fotoinhibicji (qI) i wskaźnikami niefotochemicznego wygaszania fluorescencji (qE i qT); $r = -0,57$; $r = -0,7$,
- parametrami przepływów strumieni energii w odniesieniu do centrum reakcji (ABS/RC, TR₀/RC, DI₀/RC) i:

- wydajnością przechwytywania energii wzbudzenia przez centra reakcji PSII (F_v'/F_m'); $-0,67 \leq r \leq -0,64$,

- wskaźnikiem wydajności fotochemicznej PSII obliczonym na podstawie absorpcji energii (PI_{abs}); $-0,82 \leq r \leq -0,68$,

- parametrami wydajności przepływów energii (ϕ_{po} , ϕ_{eo}); $-0,91 \leq r \leq -0,52$.

Nieliczne i słabe zależności stwierdzono w grupie cech biochemicznych oraz między cechami biochemicznymi i fizjologicznymi.

W stresie suszy zaobserwowano kilkukrotne zwiększenie liczby istotnych statystycznie zależności, zarówno w obrębie cech fizjologicznych, jak i między cechami fizjologicznymi i biochemicznymi. Parametry charakteryzujące bilans wodny i wydajność fotosyntezy były na ogół skorelowane pozytywnie. Najsilniejsze związki nieobserwowane w warunkach kontrolnych wykazano między:

- względną zawartością wody (RWC) i:

- intensywnością fotosyntezy netto (Pn); $r = 0,74$,

- intensywnością transpiracji (E); $r = 0,73$,

- wydajnością przechwytywania energii wzbudzenia przez centra reakcji PSII (F_v'/F_m'); $r = 0,59$,

- fotochemiczną wydajnością kwantową PSII (Φ_{PSII}); $r = 0,59$,

- wskaźnikami niefotochemicznego wygaszania fluorescencji (qE i qT); $r = 0,68$ i $r = 0,55$,

- fotochemiczną wydajnością kwantową PSII (Φ_{PSII}) i:

- liczbą aktywnych centrów reakcji (RC/CS), przepływami strumieni energii w odniesieniu do wzbudzonej powierzchni liścia (ABS/CS, TR₀/CS, ET₀/CS); $0,58 \leq r \leq 0,63$,

- wskaźnikami witalności (1-B)_{av} i PI_{abs}; $r = 0,55$,

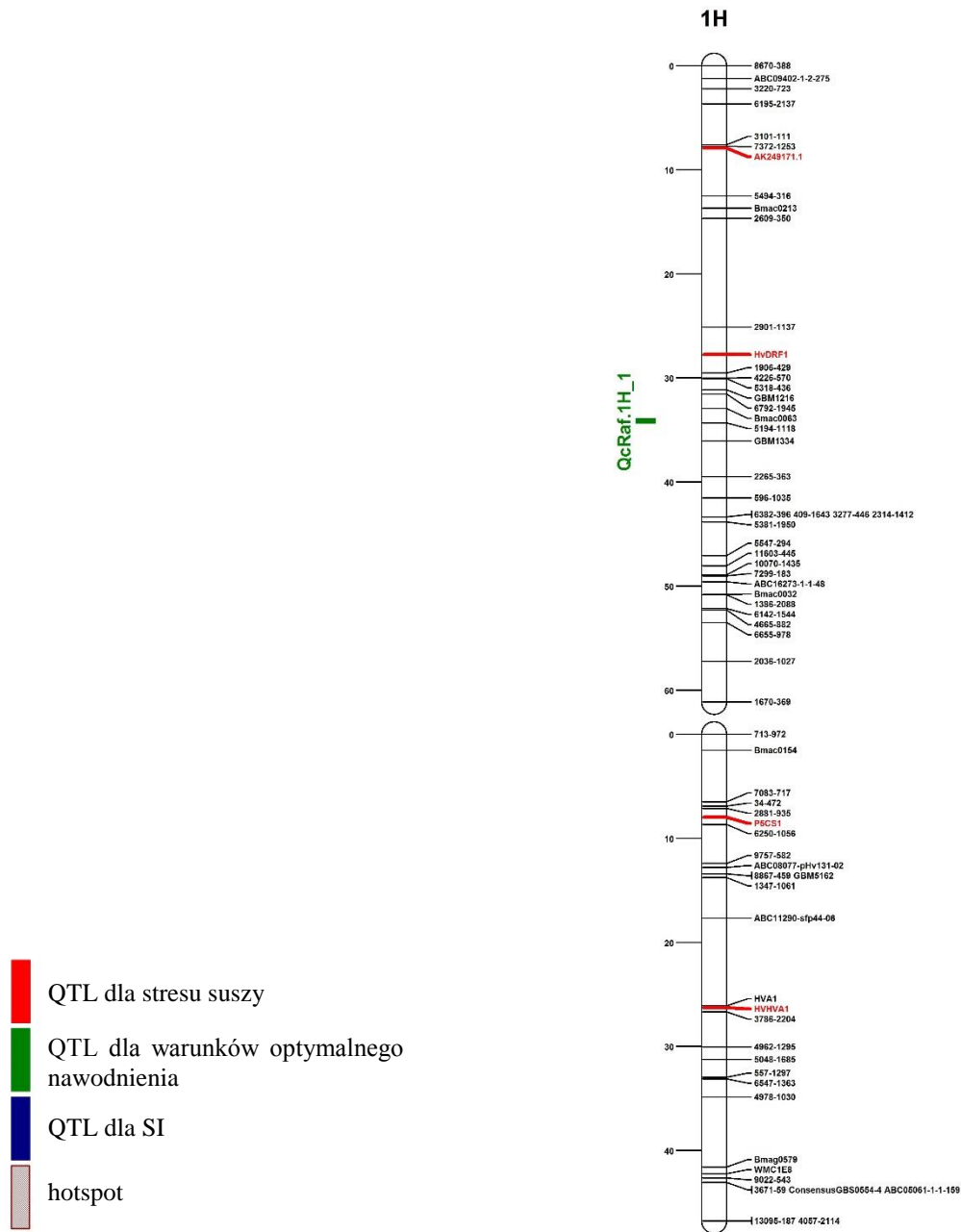
- wskaźnikiem wydajności fotochemicznej PSII obliczonym na podstawie absorpcji energii (PI_{abs}) i:

– liczbą aktywnych centrów reakcji (RC/CS), przepływami strumieni energii w odniesieniu do wzbudzonej powierzchni liścia (ABS/CS, TR_0/CS , ET_0/CS);
 $0,63 \leq r \leq 0,81$.

Jedynie pięć spośród cech fizjologicznych (EL, ABS/RC, DI_0/RC , WUE i qI) było skorelowanych negatywnie z pozostałymi parametrami opisującymi bilans wodny i wydajność fotosyntezy. Zależności te były jednak silne. W odróżnieniu od warunków optymalnego nawodnienia, zaobserwowano liczne korelacje między cechami fizjologicznymi i biochemicznymi, zazwyczaj o charakterze negatywnym. Najwięcej zależności tego typu stwierdzono dla aktywności dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy (POX) oraz γ - i δ -tokoferolu.

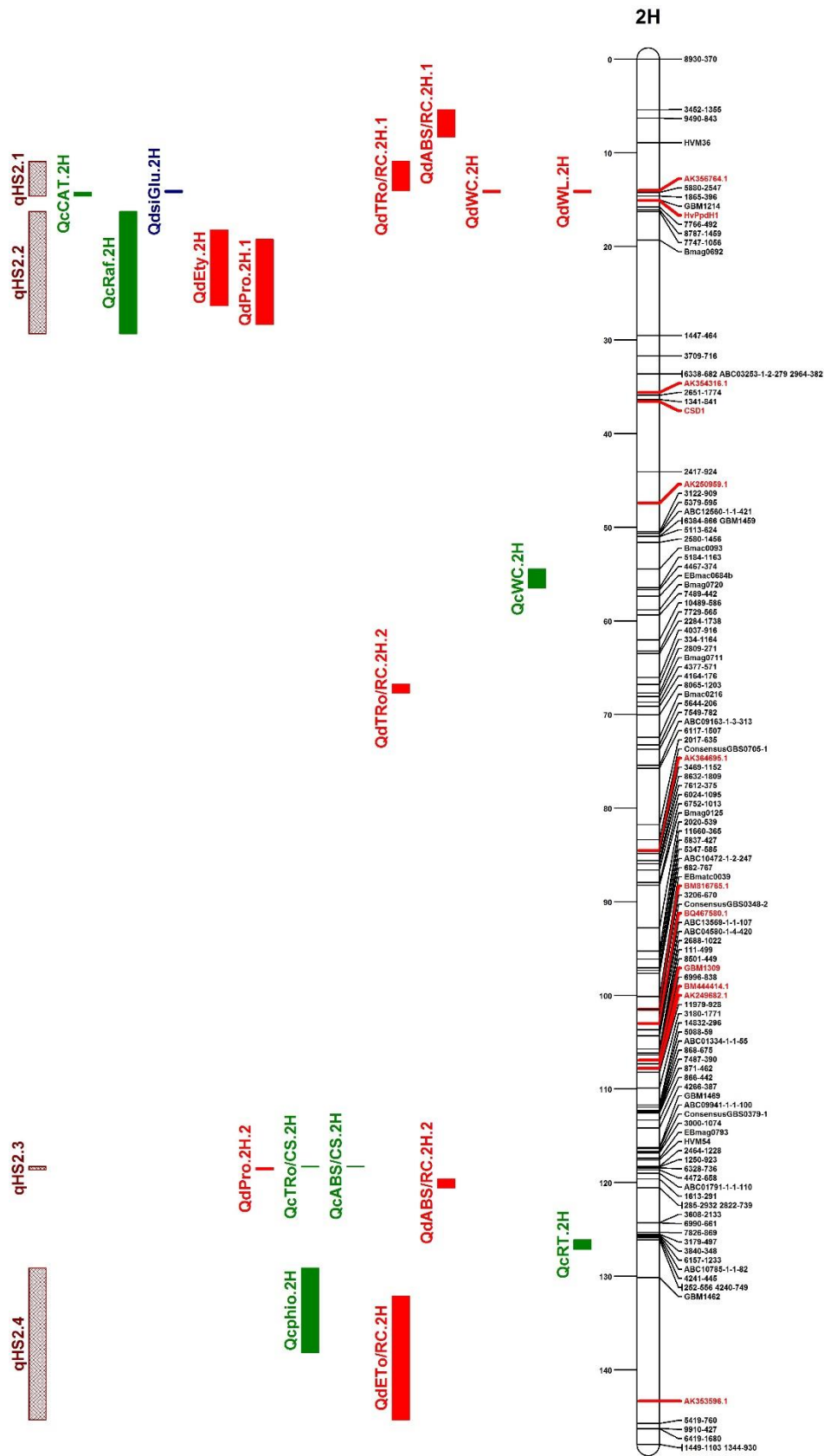
4.5.2. Identyfikacja QTL dla parametrów fizjologicznych i biochemicznych

Przeprowadzona analiza identyfikacji QTL pozwoliła na wykrycie 66 chromosomowych rejonów kontrolujących zmienność 26 cech związanych z odpowiedzią na stres suszy spośród ogółu 43 analizowanych w niniejszej pracy doktorskiej (Rysunek 4.5.). Liczba zmapowanych QTL wahała się od 1 do 4 w zależności od cechy i wariantu doświadczenia. Loci cech ilościowych zidentyfikowano we wszystkich chromosomach jęczmienia za wyjątkiem 4H. Najwięcej QTL wyznaczono w chromosomach 2H i 3H (po 18) oraz 5H (12), natomiast najmniej (1) w 1H. W chromosomach 6H i 7H zidentyfikowano odpowiednio 8 i 9 loci cech ilościowych dla analizowanych parametrów. Maksymalne wartości krzywej LOD w rejonach zidentyfikowanych QTL wahały się od 3,0 do 20,76. Procentowy udział zmienności cech pozostających pod kontrolą zidentyfikowanych QTL określony współczynnikiem determinacji (R^2) zawierał się w przedziale od 1,3 do 87,5. Stwierdzono, że najwięcej loci cech ilościowych o wysokiej wartości R^2 zlokalizowanych było w chromosomie 3H (14 z 25 QTL wyjaśniających co najmniej 30% zmienności cech). Podobne proporcje efektów addytywnych o różnych znakach wśród zidentyfikowanych QTL (allel odmiany ‘Maresi’ podwyższał lub obniżał wartości poszczególnych parametrów), świadczą o równym wpływie obu alleli rodzicielskich na wykształcenie analizowanych cech w populacji. Wynik ten znajduje potwierdzenie w efekcie transgresji wykazanym wśród linii RIL na poziomie fenotypowym, gdzie obserwowano rośliny o średnich wartościach cech przekraczających lepszą lub gorszą z form rodzicielskich.

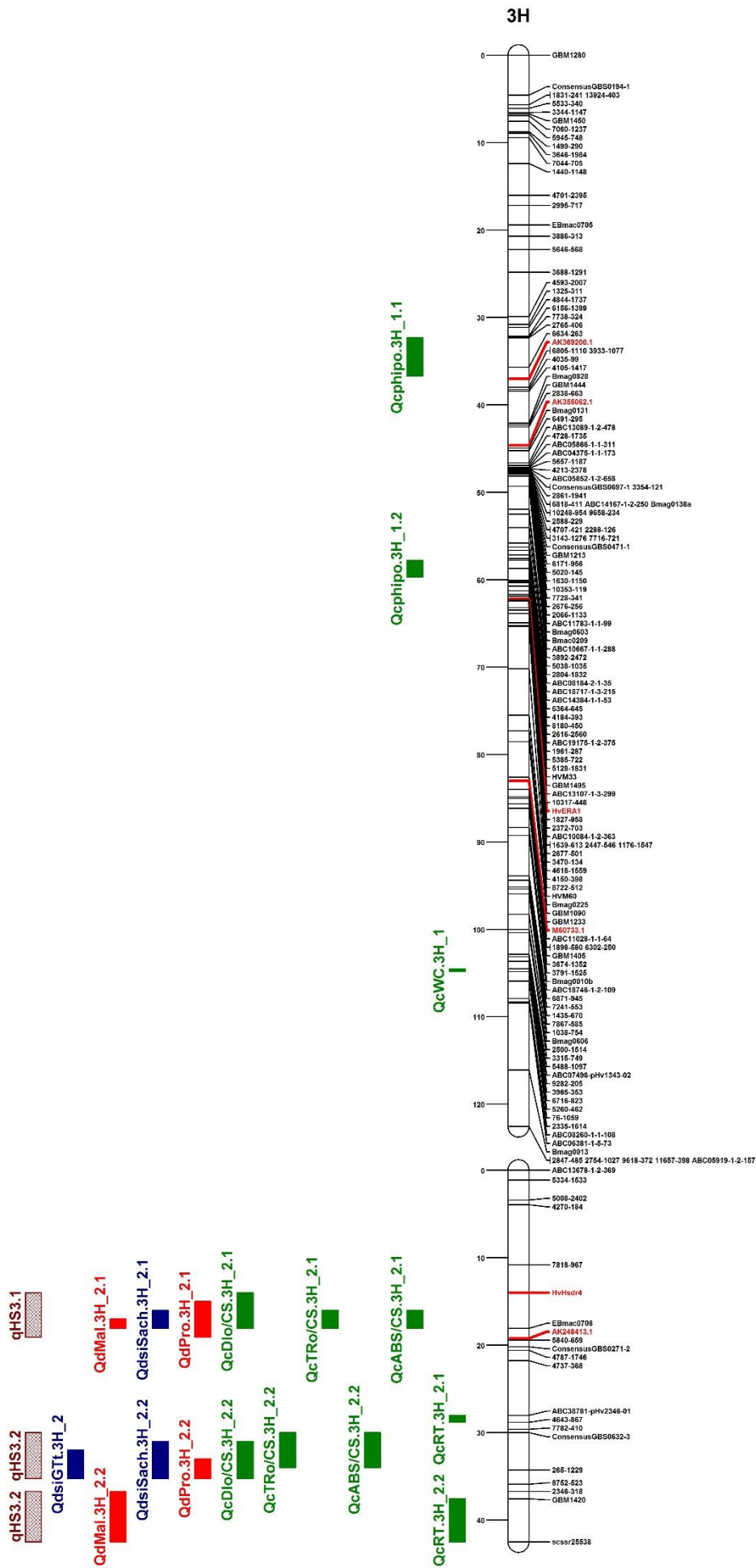


Rysunek 4.5. Wysokorozdzielcza konsensusowa mapa funkcjonalna ze zmapowanymi CG uzyskana dla populacji MCam, GH i LCam wraz z pozycjami QTL zlokalizowanymi dla cech związanych z odpowiedzią na stres suszy u jęczmienia.

Kolorem czerwonym na mapie genetycznej wyróżniono funkcjonalne geny kandydackie

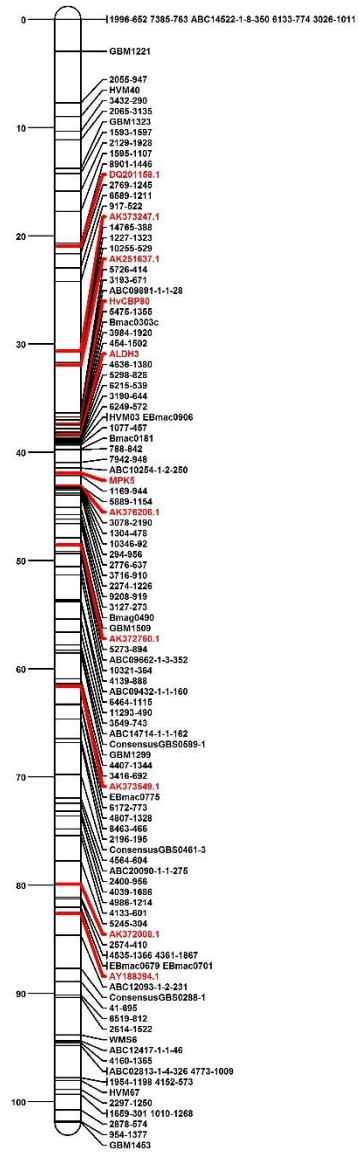


Rysunek 4.5. cd.

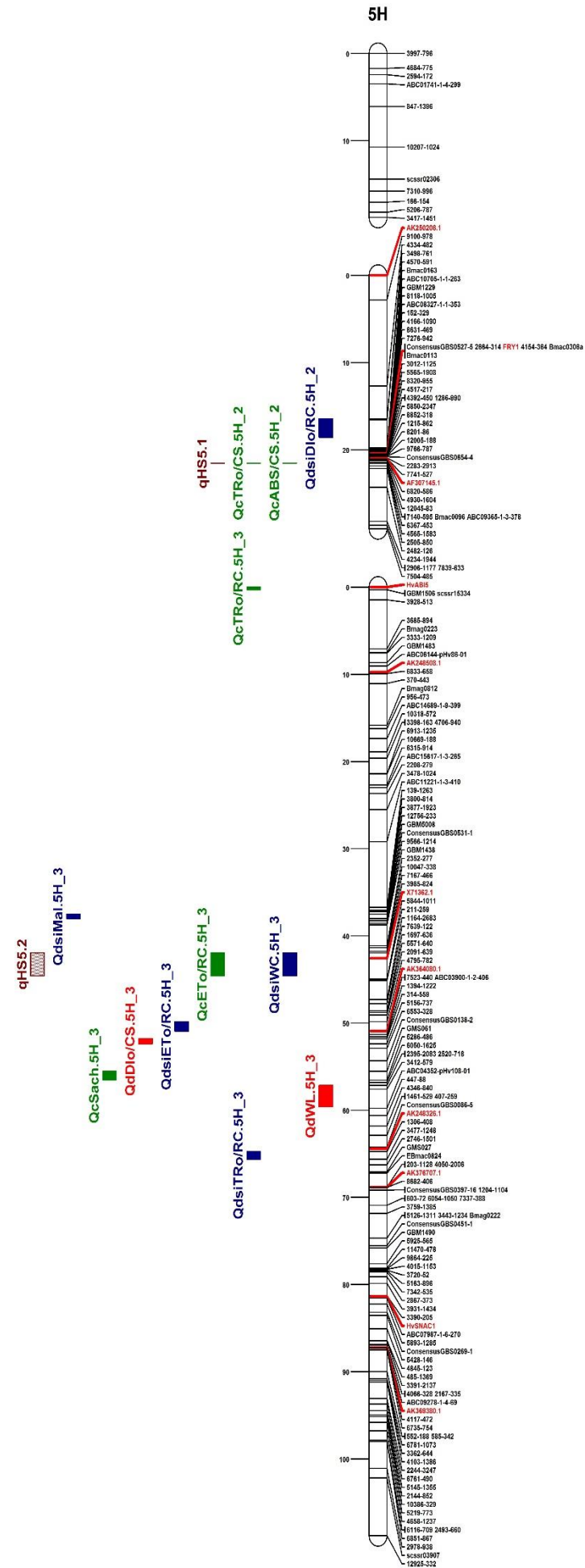


Rysunek 4.5. cd.

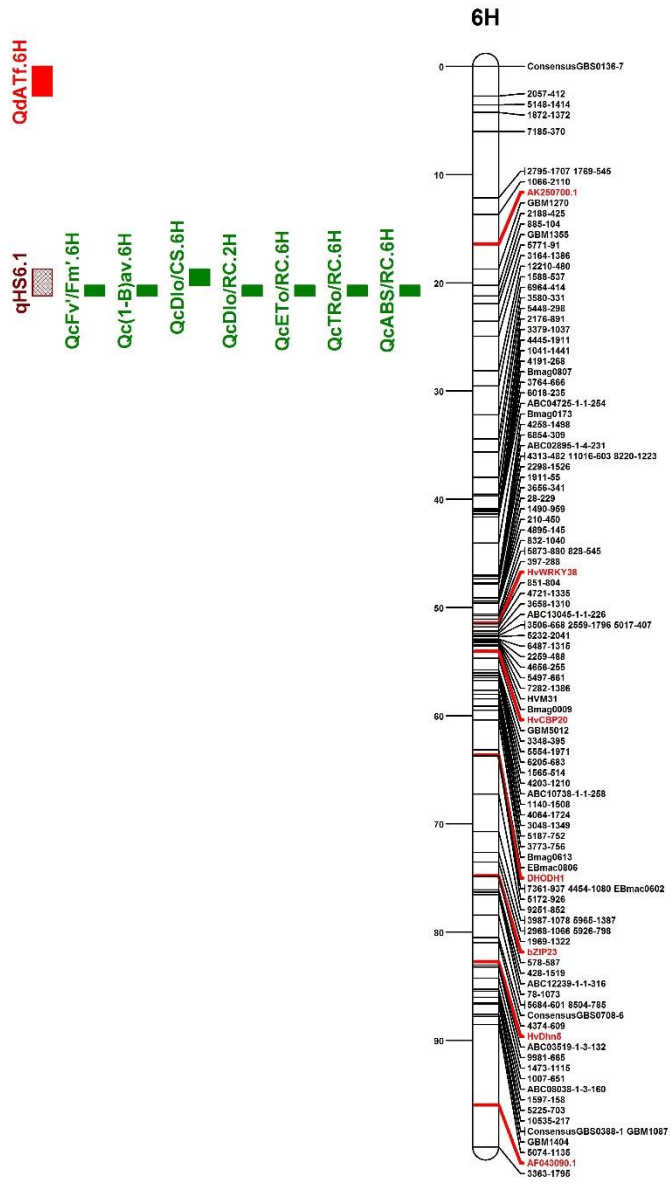
4H



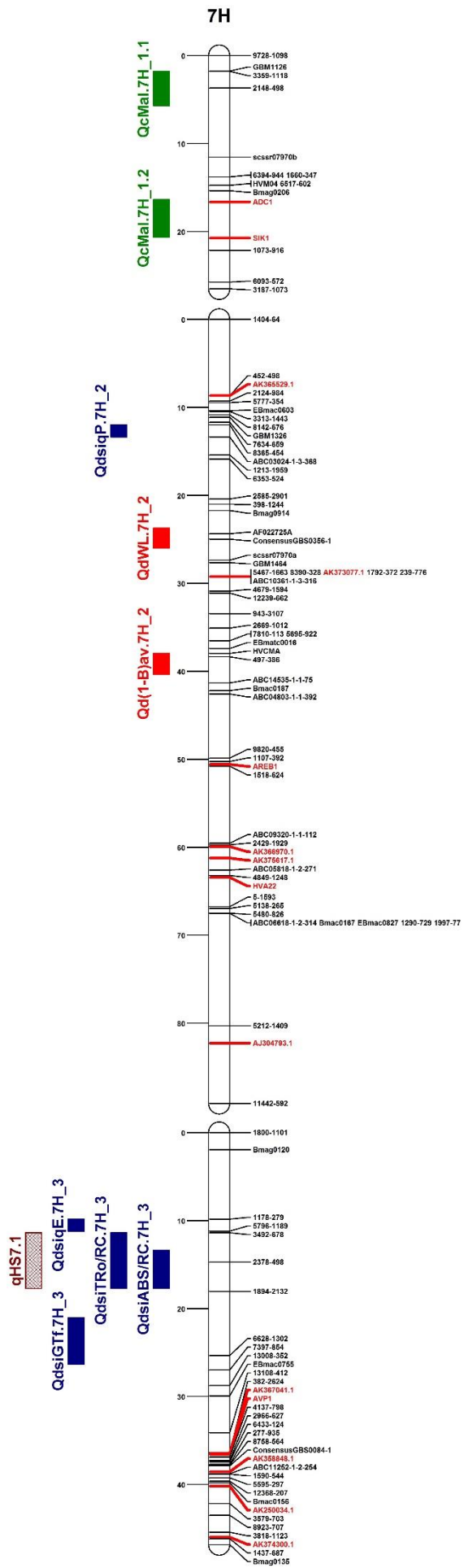
Rysunek 4.5. cd.



Rysunek 4.5. cd.



Rysunek 4.5. cd.



Rysunek 4.5. cd.

W warunkach optymalnego nawodnienia zidentyfikowano 33 QTL kontrolujące zmienność fenotypową 17 cech (Tabela 4.15 a). Najwięcej loci cech ilościowych (22) wyznaczono dla parametrów charakteryzujących proces fotosyntezy. Pozostałe kontrolowały bilans wodny (5), zawartość rafinozy (2), maltozy (2) i sacharozy (1) oraz aktywność katalazy (1). Stwierdzono, że około połowa zlokalizowanych w tym reżimie wodnym QTL tłumaczy w znacznym zakresie obserwowaną zmienność cech ($R^2 \geq 30\%$). Loci cech ilościowych o największym wpływie na wykształcenie fenotypu (wartość R^2 w zakresie 60,5-87,5%) determinowały względną zawartość wody (RWC), ilość energii zatrzymanej w PSII (TR_0) i rozproszonej z PSII (DI_0) w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia (CS) oraz zawartość maltozy. Ilość tego dwucukru w warunkach optymalnego nawodnienia kontrolowana była przez dwa QTL zmapowane w chromosomie 7H, charakteryzujące się najwyższymi wartościami LOD (>20) oraz R^2 ($>80\%$) spośród wszystkich loci cech ilościowych zidentyfikowanych w populacji MCam.

W warunkach stresu suszy zidentyfikowano 19 loci cech ilościowych kontrolujących zmienność 11 cech (Tabela 4.15 b). Najwięcej QTL zidentyfikowano dla parametrów charakteryzujących fotosyntezę (7) oraz zawartość osmoprotektantów (6). Pozostałe determinowały zawartość i utratę wody z liścia (4) oraz zawartość etylenu (1) i α -tokoferolu (1). Ponad połowa QTL zidentyfikowanych dla cech w warunkach deficytu wody zmapowana została w chromosomie 2H. Najwyższe współczynniki determinacji oraz wartości LOD charakteryzowały zawartość proliny oraz maltozy. Ilość proliny w tkankach osobników analizowanej populacji po zadziałaniu stresem niedoboru wody pozostawała pod kontrolą czterech QTL, zlokalizowanych w chromosomach 2H i 3H, z których trzy wyjaśniały od 73,6 do 77,5% obserwowanej zmienności tego aminokwasu. Dla zawartości maltozy zidentyfikowano dwa QTL w chromosomie 3H, scharakteryzowane przez współczynniki determinacji przekraczające 85% i wyznaczone przez maksima LOD równe 18,38 i 18,44.

Dla obliczonych wskaźników stresu (SI) zmapowano 14 QTL, kontrolujących 12 spośród analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych (Tabela 4.15 c). Najwięcej z nich, podobnie jak dla warunków stresu suszy, zidentyfikowano dla parametrów charakteryzujących wydajność procesu fotosyntezy oraz zawartość osmoprotektantów. Pozostałe determinowały zawartość wody w liściu (WC), fotochemicznie (qP) i energetycznie uwarunkowane (qT) wygaszanie fluorescencji oraz aktywność γ -tokoferolu i γ -tokotrienolu. Największy zakres wyjaśnionej zmienności

(60,8-82,1%) stwierdzono dla dwóch QTL kontrolujących zawartość sacharozy oraz jednego QTL dla aktywności γ -tokotrienolu, które zidentyfikowano w chromosomie 3H.

Tabela 4.15 a. Charakterystyka QTL zidentyfikowanych dla analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych w warunkach optymalnego nawodnienia

Cecha	Warunki optymalnego nawodnienia						
	Symbol QTL	Chr.	Najbliższy marker	LOD	Przedział ufności QTL [cM]	Efekt addytywny	R ² [%]
Bilans wodny							
RWC	QcRWC.2H	2H	252-556	7,44	126,13-127,13	-0,463	84,4
	QcRWC.3H_2.1	3H	4643-867	3,76	28,04-28,83	-3,632	1,3
	QcRWC.3H_2.2	3H	scssr25538	7,34	37,59-42,52	9,432	83,8
WC	QcWC.2H	2H	5184-1163	3,34	54,46-56,46	-0,338	13,1
	QcWC.3H_1	3H	5260-462	3,11	104,52-104,83	0,358	12,1
Fotosynteza							
ABS/RC	QcABS/RC.6H	6H	885-104	7,01	20,25-21,22	-0,182	34,8
TR ₀ /RC	QcTR ₀ /RC.5H_3	5H	HvABI5	3,46	0-0,32	0,051	10,5
	QcTR ₀ /RC.6H	6H	2188-425	8,53	20,25-21,22	-0,108	30,7
ET ₀ /RC	QcET ₀ /RC.5H_3	5H	X71362.1	3,75	41,96-44,59	-0,024	11,9
	QcET ₀ /RC.6H	6H	885-104	7,55	20,25-21,22	-0,048	30
DI ₀ /RC	QcDI ₀ /RC.2H	6H	885-104	5,62	20,25-21,22	-0,072	30
ABS/CS	QcABS/CS.2H	2H	2464-1228	3,35	118,27-118,27	787,930	10
	QcABS/CS.3H_2.1	3H	EBmac0708	6,51	16,02-18,08	1907,390	55,6
	QcABS/CS.3H_2.2	3H	ConsensusGBS0632-3	11,09	30,01-34,01	-1722,250	59,1
	QcABS/CS.5H_2	5H	Bmac0096	4,05	21,56-21,56	-192,893	11,6
TR ₀ /CS	QcTR ₀ /CS.2H	2H	2464-1228	4,28	118,27-118,32	637,155	10,7
	QcTR ₀ /CS.3H_2.1	3H	EBmac0708	7,59	16,02-18,08	1558,190	57,8
	QcTR ₀ /CS.3H_2.2	3H	ConsensusGBS0632-3	12,39	30,01-34,01	-1448,690	60,5
	QcTR ₀ /CS.5H_2	5H	Bmac0096	4,25	21,56-21,56	-152,128	6,7
DI ₀ /CS	QcDI ₀ /CS.3H_2.1	3H	EBmac0708	9,04	14,02-18,08	331,108	63,8
	QcDI ₀ /CS.3H_2.2	3H	265-1229	7,99	31,01-35,29	-359,451	64,3
	QcDI ₀ /CS.6H	6H	2188-425	3,03	18,74-20,25	-55,813	6,7
φ_{po}	Qc φ_{po} .3H_1.1	3H	6634-263	4,43	32,33-36,69	-0,006	17
	Qc φ_{po} .3H_1.2	3H	ABC19175-1-2-375	5,66	57,79-59,70	0,008	23,5
ψ_o	Qc ψ_o .2H	2H	GBM1462	3,15	129,13-138,17	0,009	17,2
(1-B)av	Qc(1-B)av.6H	6H	885-104	5,8	20,25-21,22	-0,470	30
Fv'/Fm'	QcFv'/Fm'.6H	6H	885-104	3,85	20,25-21,22	0,018	23,3
Zawartość osmoprotektantów i hormonów							
Sach	QcSach.5H_3	5H	GMS061	4,68	55,55-56,54	-6,558	21,1
Raf	QcRaf.1H_1	1H	5194-1118	3,84	33,95-34,34	-0,339	16,2
	QcRaf.2H	2H	Bmag0692	9,01	16,28-29,33	-0,458	34,8
Mal	QcMal.7H_1.1	7H	2148-498	20,76	1,79-5,69	-14,320	87,5
	QcMal.7H_1.2	7H	ADC1	20,75	16,36-20,66	14,387	85,4
Aktywność antyoksydantów							
Cat	QcCAT.2H	2H	1865-396	7,29	14,23-14,63	-0,003	30,3

Wytłuszczono funkcjonalne geny kandydackie zmapowane w przedziałach ufności zidentyfikowanych QTL, LOD \geq 10 oraz R² \geq 30; R² – współczynnik determinacji

Tabela 4.15 b. Charakterystyka QTL zidentyfikowanych dla analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych w warunkach stresu suszy

Cecha	Warunki stresu suszy						
	Symbol QTL	Chr.	Najbliższy marker	LOD	Przedział ufności QTL [cM]	Efekt addytywny	R ² [%]
Bilans wodny							
WL	QdWL.2H	2H	5880-2547	6,84	14,03-14,23	-0,202	21,9
	QdWL.5H_3	5H	3412-579	4,15	57,16-59,59	0,136	12,9
	QdWL.7H_2	7H	ConsensusGBS0356-1	3,15	23,72-25,99	-0,121	10,6
WC	QdWC.2H	2H	5880-2547	3,82	14,03-14,23	-0,323	17,2
Fotosynteza							
ABS/RC	QdABS/RC.2H.1	2H	9490-843	3,97	5,42-8,31	-0,085	17,3
	QdABS/RC.2H.2	2H	285-2932	4,09	119,60-120,57	-0,166	17,7
TR ₀ /RC	QdTR ₀ /RC.2H.1	2H	AK356764.1	3,55	10,92-14,03	-0,051	13,4
	QdTR ₀ /RC.2H.2	2H	2809-271	4,69	66,78-67,71	-0,047	16,9
ET ₀ /RC	QdET ₀ /RC.2H	2H	AK353596.1	3,85	132,17-145,34	0,041	20,5
DI ₀ /CS	QdDI ₀ /CS.5H_3	5H	5156-737	3,89	51,79-52,38	44,152	17,5
(1-B)av	Qd(1-B)av.7H_2	7H	497-386	3,33	37,97-40,35	-0,354	18,7
Zawartość osmoprotektantów i hormonów							
Pro	QdPro.2H.1	2H	Bmag0692	6,36	19,28-28,33	3,114	12,2
	QdPro.2H.2	2H	6328-736	10,62	118,44-118,63	-7,080	75,2
	QdPro.3H_2.1	3H	EBmac0708	10,53	15,02-19,08	-11,964	73,6
	QdPro.3H_2.2	3H	265-1229	11,58	33,01-35,29	20,832	77,5
Mal	QdMal.3H_2.1	3H	EBmac0708	18,38	17,02-18,08	1,370	85,8
	QdMal.3H_2.2	3H	GBM1420	18,44	36,75-42,52	-1,533	85,9
Ety	QdEty.2H	2H	Bmag0692	3,66	18,28-26,33	0,084	18,5
Aktywność antyoksydantów							
ATf	QdATf.6H	6H	ConsensusGBS0136-7	4,36	0-2,75	-0,019	20

Wytłuszczono funkcjonalne geny kandydackie zmapowane w przedziałach ufności zidentyfikowanych QTL, LOD \geq 10 oraz R² \geq 30; R² – współczynnik determinacji

Nie zidentyfikowano loci cech ilościowych kolokalizujących na mapie genetycznej pod względem określonej cechy w obu analizowanych reżimach wodnych, czyli takich, które wpływałyby na jej wykształcenie niezależnie od warunków prowadzonego doświadczenia. Zlokalizowano natomiast rejony, gdzie zmapowano co najmniej dwa QTL o pokrywających się całkowicie lub częściowo przedziałach ufności, kontrolujące różne parametry fizjologiczne i biochemiczne, często w odmiennych wariantach nawodnienia. Ogółem wyróżniono 11 hotspotów grupujących 61% wszystkich zmapowanych loci cech ilościowych (Tabela 4.16., Rysunek 4.5.). Najwięcej (4) rejonów tego typu zidentyfikowano w chromosomie 2H. Zawierały one od 2 to 5 QTL reprezentujących wszystkie analizowane kategorie fenotypowe w każdym wariantcie doświadczenia. Trzy hotspoty grupujące od 2 do 6 QTL zlokalizowano w dystalnym fragmencie długiego ramienia chromosomu 3H, natomiast 2 rejony zawierające po 2 QTL każdy, wyznaczono w chromosomie 5H.

Tabela 4.15 c. Charakterystyka QTL zidentyfikowanych dla indeksów stresu (SI) obliczonych dla analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych

Cecha	Wskaźnik stresu (SI)						
	Symbol QTL	Chr.	Najbliższy marker	LOD	Przedział ufności QTL [cM]	Efekt addytywny	R ² [%]
Bilans wodny							
WC	QdsiWC.5H_3	5H	X71362.1	4,98	41,96-44,59	6,097	23,6
Fotosynteza							
ABS/RC	QdsiABS/RC.7H_3	7H	2378-498	3,68	13,39-17,73	3,663	16,7
TR ₀ /RC	QdsiTR ₀ /RC.5H_3	5H	3477-1248	3,84	64,75-65,63	-2,242	14,4
	QdsiTR ₀ /RC.7H_3	7H	2378-498	4,19	11,39-17,73	2,399	16,5
ET ₀ /RC	QdsiET ₀ /RC.5H_3	5H	AK364080.1	3,57	49,85-50,94	3,310	16,2
DI ₀ /RC	QdsiDI ₀ /RC.5H_2	5H	4570-591	3,61	16,46-18,57	15,007	18,1
qP	QdsiqP.7H_2	7H	ABC03024-1-3-368	3,00	11,98-13,36	4,848	15,5
qE	QdsiqE.7H_3	7H	5796-1189	3,15	9,85-11,21	6,305	14,5
Zawartość osmoprotektantów i hormonów							
Glu	QdsiGlu.2H	2H	5880-2547	5,81	14,03-14,23	-107,193	25,7
Sach	QdsiSach.3H_2.1	3H	EBmac0708	4,88	16,02-18,08	405,162	60,8
	QdsiSach.3H_2.2	3H	265-1229	4,29	31,01-35,29	-400,512	54,6
Mal	QdsiMal.5H_3	5H	GBM5008	3,28	37,50-38,03	17,274	15,5
Aktywność antyoksydantów							
GTf	QdsiGTf.7H_3	7H	6628-1302	3,09	21,05-26,34	60,182	16
GTt	QdsiGTt.3H_2	3H	265-1229	14,1	32,01-35,29	-248,340	82,1

Wytłuszczono funkcjonalne geny kandydackie zmapowane w przedziałach ufności zidentyfikowanych QTL, LOD \geq 10 oraz R² \geq 30; R² – współczynnik determinacji

W chromosomie 6H zidentyfikowano hotspot zawierający siedem QTL dla parametrów szybkiej kinetyki fluorescencji chlorofilu *a* w warunkach optymalnego nawodnienia, co stanowi prawie 90% ogółu QTL zmapowanych w tej grupie sprzężeń. Do hotspotu zlokalizowanego w chromosomie 7H, zakwalifikowano 2 QTL dla wskaźników stresu (SI) parametrów ABS/RC i TR₀/RC.

Spośród analizowanych w tej pracy 67 funkcjonalnych genów kandydackich, zidentyfikowano 7 genów w rejonach przedziałów ufności dla 11 QTL (Tabela 4.17.). Cztery z nich to geny wytypowane na podstawie wyników różnicowej analizy transkryptomów liści i korzeni odmian ‘Maresi’ i Cam/B1/CI. Gen AK356764.1, kodujący transketolazę i zmapowany w chromosomie 2H, kolokalizował z rejonem obejmującym cztery loci cech ilościowych: dla zawartości (WC) i utraty (WL) wody z liścia, TR₀/RC w warunkach stresu suszy oraz dla SI zawartości glukozy. Gen X71362.1 z chromosomu 5H, kodujący białko z grupy dehydryn, zmapowany został w pozycji maksymalnej wartości krzywej LOD dla ET₀/RC w warunkach optymalnego nawodnienia oraz SI zawartości wody (WC) w liściu. Pozostałe geny kandydackie kolokalizowały z pojedynczymi QTL. Gen AK353596.1, dla białka o aktywności peroksydazy, zlokalizowano w chromosomie 2H w rejonie QTL

Tabela 4.16. Charakterystyka zidentyfikowanych regionów typu hotspot

Hotspot	Cecha	Wariant dośw.	Nazwa QTL	Chromosom	Rejon na mapie genetycznej [cM]
qHS2.1	TR ₀ /RC	S	QdTR ₀ /RC.2H.1	2H	10,92–14,63
	WC	S	QdWC.2H		
	WL	S	QdWL.2H		
	CAT	K	QcCAT.2H		
	glukoza	SI	QdsiGlu.2H		
qHS2.2	prolina	S	QdPro.2H.1	2H	16,28–29,33
	etylen	S	QdEty.2H		
	rafinoza	K	QcRaf.2H		
qHS2.3	prolina	S	QdPro.2H.2	2H	118,27–118,63
	TR ₀ /CS	K	QcTR ₀ /CS.2H		
	ABS/CS	K	QcABS/CS.2H		
qHS2.4	ET ₀ /RC	S	QdET ₀ /RC.2H	2H	129,13–145,34
	Φ _{po}	K	Qcpsi_po.2H		
qHS3.1	maltoza	S	QdMal.3H_2.1	3H	14,02–19,08
	prolina	S	QdPro.3H_2.1		
	DI ₀ /CS	K	QcDlo/CS.3H_2.1		
	TR ₀ /CS	K	QcTR ₀ /CS.3H_2.1		
	ABS/CS	K	QcABS/CS.3H_2.1		
	sacharoza	SI	QdsiSach.3H_2.1		
qHS3.2	prolina	S	QdPro.3H_2.2	3H	30,01–35,29
	DI ₀ /CS	K	QcDlo/CS.3H_2.2		
	TR ₀ /CS	K	QcTR ₀ /CS.3H_2.2		
	ABS/CS	K	QcABS/CS.3H_2.2		
	γ-tokotrienol	SI	QdsiGTte.3H_2		
	sacharoza	SI	QdsiSach.3H_2.2		
qHS3.3	maltoza	S	QdMal.3H_2.2	3H	36,75–42,52
	RWC	K	QcRT.3H_2.2		
qHS5.1	TR ₀ /CS	K	QcTR ₀ /CS.5H_2	5H	21,56
	ABS/CS	K	QcABS/CS.5H_2		
qHS5.2	WC	SI	QdsiWC.5H_3	5H	41,96–44,59
	ET ₀ /RC	K	QcET ₀ /RC.5H_3		
qHS6.1	Fv'/Fm'	K	QcFv/Fm.6H	6H	18,74–21,22
	(1-B)av	K	Qc1-Bv.6H		
	DI ₀ /CS	K	QcDlo/CS.6H		
	DI ₀ /RC	K	QcDlo/RC.2H		
	ET ₀ /RC	K	QcET ₀ /RC.6H		
	TR ₀ /RC	K	QcTR ₀ /RC.6H		
ABS/RC	K	QcABS/RC.6H			
qHS7.1	TR ₀ /RC	SI	QdsiTR ₀ /RC.7H_3	7H	11,39–17,73
	ABS/RC	SI	QdsiABS/RC.7H_3		

S – warunki stresu suszy; K – warunki optymalnego nawodnienia; SI – wskaźnik stresu

dla ET₀/RC w stresie suszy, a locus AK364080.1, kodujący proteazę cysteinową z chromosomu 5H, zmapowano w maksimum LOD dla SI tej samej cechy. Spośród genów kandydackich wybranych na podstawie danych literaturowych, trzy zmapowano w rejonach

QTL dla cech fizjologicznych i biochemicznych w warunkach optymalnego nawodnienia. Gen *HvABI5*, kodujący czynnik transkrypcyjny z rodziny AREB/ABF, zlokalizowano w pozycji maksymalnej wartości LOD w chromosomie 5H dla TR₀/RC, a gen *HvHsd4* odpowiedzialny za białko aktywujące GTP-azę z rodziny Rho, w chromosomie 3H dla DI₀/CS. Ostatni z genów, *ADC1* kodujący dekarboksylazę argininową, kolokalizował z QTL dla zawartości maltozy w chromosomie 7H.

Tabela 4.17. Charakterystyka funkcjonalnych genów kandydackich kolokalizujących ze zmapowanymi QTL

Gen kandydacki	MLOC	Produkt białkowy	Chr.	Symbol QTL	Hotspot	Cecha	War. dośw.	Pozycja [cM]
AK356764.1	MLOC_21709	transketolaza	2H	QdWL.2H	qHS2.1	WL	S	14,03
				QdWC.2H		WC	S	
				QdTR ₀ /RC.2H.1		TR ₀ /RC	S	
				QdsiGlu.2H		Glu	SI	
X71362.1	–	białko z grupy dehydryn	5H	QdsiWC.5H_3	qHS5.2	WC	SI	42,60
				QcET ₀ /RC.5H_3		ET ₀ /RC	K	
AK353596.1	MLOC_65477	Białko o aktywności peroksydazy	2H	QdET ₀ /RC.2H	–	ET ₀ /RC	S	143,34
AK364080.1	MLOC_18612	proteaza cysteinowa	5H	QdsiET ₀ /RC.5H_3	–	ET ₀ /RC	SI	50,94
<i>HvABI5</i>	MLOC_66546	czynnik transkrypcyjny z rodziny AREB/ABF	5H	QcTR ₀ /RC.5H_3	–	TR ₀ /RC	K	0,00
<i>HvHsd4</i>	MLOC_43556	białko aktywujące GTP-azę z rodziny Rho	3H	QcDI ₀ /CS.3H_2.1	–	DI ₀ /CS	K	14,02
<i>HvADC1</i>	MLOC_39205	dekarboksylaza argininowa	7H	QcMal.7H_1.2	–	Mal	K	16,66

S – warunki stresu suszy; K – warunki optymalnego nawodnienia; SI – wskaźnik stresu

4.5.3. Adnotacja funkcjonalna pozycyjnych genów kandydackich zidentyfikowanych w przedziałach ufności QTL dla cech związanych z reakcją na stres suszy

Integracja genetycznej i fizycznej mapy jęczmienia pozwoliła na identyfikację ogółem 3198 pozycyjnych genów kandydackich zlokalizowanych w obrębie przedziałów ufności dla 66 zmapowanych QTL, w tym 1101 genów specyficznych dla warunków stresu suszy oraz wskaźników stresu (SI) badanych cech fizjologicznych i biochemicznych (Tabela 4.18.; Rysunek 4.6.). Wyliczony stosunek między fizycznymi odległościami mierzonymi w parach zasad, a odległościami na mapie genetycznej wynosił średnio 2,11 Mpz/cM. Liczba genów zidentyfikowanych w regionach QTL dla poszczególnych cech wahała się od 1 do 550 i była skorelowana z wielkością przedziału ufności wyrażoną w cM ($r = 0,39$).

Tabela 4.18. Integracja genetycznej oraz fizycznej mapy genomu jęczmienia

Nr	Nazwa QTL	Wariant dośw.	Cecha	Chr.	Rejon na mapie fizycznej [bp]	Rejon na mapie genetycznej [cM]	Liczba genów
Bilans wodny							
1	QdWL.2H	S	WL	2H	2:22643528:26072559	14,03–14,23	21
2	QdWL.5H_3	S	WL	5H	5:506412662:507130283	57,16–59,59	23
3	QdWL.7H_2	S	WL	7H	7:52781716:61982602	23,72–25,99	59
4	QdWC.2H	S	WC	2H	2:22643528:26072559	14,03–14,23	21
5	QcRWC.2H	K	RWC	2H	2:608740116:610020328	126,13–127,13	59
6	QcRWC.3H_2.1	K	RWC	3H	3:550605291:550652504	28,04–28,83	5
7	QcRWC.3H_2.2	K	RWC	3H	3:558174662:558993852	37,59–42,52	26
8	QcWC.2H	K	WC	2H	2:388026062:439836589	54,46–56,46	434
9	QcWC.3H_1	K	WC	3H	3:507756627:509179555	104,52–104,83	42
10	QdsiWC.5H_3	SI	WC	5H	5:489228756:490243901	41,96–44,59	30
Fotosynteza							
11	QdABS/RC.2H.1	S	ABS/RC	2H	2:10072371:18350151	5,42–8,31	140
12	QdABS/RC.2H.2	S	ABS/RC	2H	2:590775680:593657396	119,60–120,57	38
13	QdTR ₀ /RC.2H.1	S	TR ₀ /RC	2H	2:18351780:22647378	10,92–14,03	54
14	QdTR ₀ /RC.2H.2	S	TR ₀ /RC	2H	2:545548207:547428085	66,78–67,71	65
15	QdET ₀ /RC.2H	S	ET ₀ /RC	2H	2:610024678:621267627	132,17–145,34	176
16	QdDl ₀ /CS.5H_3	S	DI ₀ /CS	5H	5:494046443:498813016	51,79–52,38	56
17	Qd1-Bv.7H_2	S	(1-B)av	7H	7:87544113:107893956	37,97–40,35	136
18	QcABS/RC.6H	K	ABS/RC	6H	6:15888915:24884319	20,25–21,22	106
19	QcTR ₀ /RC.5H_3	K	TR ₀ /RC	5H	5:421391154:421394996	0–0,32	1
20	QcTR ₀ /RC.6H	K	TR ₀ /RC	6H	6:15888915:24884319	20,25–21,22	106
21	QcET ₀ /RC.5H_3	K	ET ₀ /RC	5H	5:489228756:490243901	41,96–44,59	30
22	QcET ₀ /RC.6H	K	ET ₀ /RC	6H	6:15888915:24884319	20,25–21,22	106
23	QcDl ₀ /RC.2H	K	DI ₀ /RC	6H	6:15888915:24884319	20,25–21,22	106
24	QcABS/CS.2H	K	ABS/CS	2H	2:592594510:592597391	118,27–118,27	1
25	QcABS/CS.3H_2.1	K	ABS/CS	3H	3:541639145:550627716	14,02–18,08	124
26	QcABS/CS.3H_2.2	K	ABS/CS	3H	3:556921351:559196047	31,01–35,29	80
27	QcABS/CS.5H_2	K	ABS/CS	5H	5:302014386:305842804	21,56–21,56	46
28	QcTR ₀ /CS.2H	K	TR ₀ /CS	2H	2:591263825:592597391	118,27–118,32	17
29	QcTR ₀ /CS.3H_2.1	K	TR ₀ /CS	3H	3:541639145:550627716	16,02–18,08	124
30	QcTR ₀ /CS.3H_2.2	K	TR ₀ /CS	3H	3:556921351:559196047	30,01–34,01	80
31	QcTR ₀ /CS.5H_2	K	TR ₀ /CS	5H	5:302014386:305842804	21,56–21,56	46
32	QcDl ₀ /CS.3H_2.1	K	DI ₀ /CS	3H	3:541636846:550627716	16,02–18,08	125
33	QcDl ₀ /CS.3H_2.2	K	DI ₀ /CS	3H	3:556921592:558920662	30,01–34,01	68
34	QcDl ₀ /CS.6H	K	DI ₀ /CS	6H	6:15677659:15890631	18,74–20,25	14
35	Qc ϕ _{po} .3H_1.1	K	ϕ _{po}	3H	3:35858074:48090114	32,33–36,69	104
36	Qc ϕ _{po} .3H_1.2	K	ϕ _{po}	3H	3:427703074:432753152	57,79–59,70	112
37	Qc ψ _{po} .2H	K	ψ _{po}	2H	2:605431934:621266081	129,13–138,17	281
38	Qc1-Bv.6H	K	(1-B)av	6H	6:15888915:24884319	20,25–21,22	106
39	QcFv/Fm.6H	K	Fv'/Fm'	6H	6:15888915:24884319	20,25–21,22	106
40	QdsiABS/RC.7H_3	SI	ABS/RC	7H	7:549627972:570598564	13,39–17,73	179
41	QdsiTR ₀ /RC.5H_3	SI	TR ₀ /RC	5H	5:510654233:514427812	64,75–65,63	47
42	QdsiTR ₀ /RC.7H_3	SI	TR ₀ /RC	7H	7:549627201:570598564	11,39–17,73	180

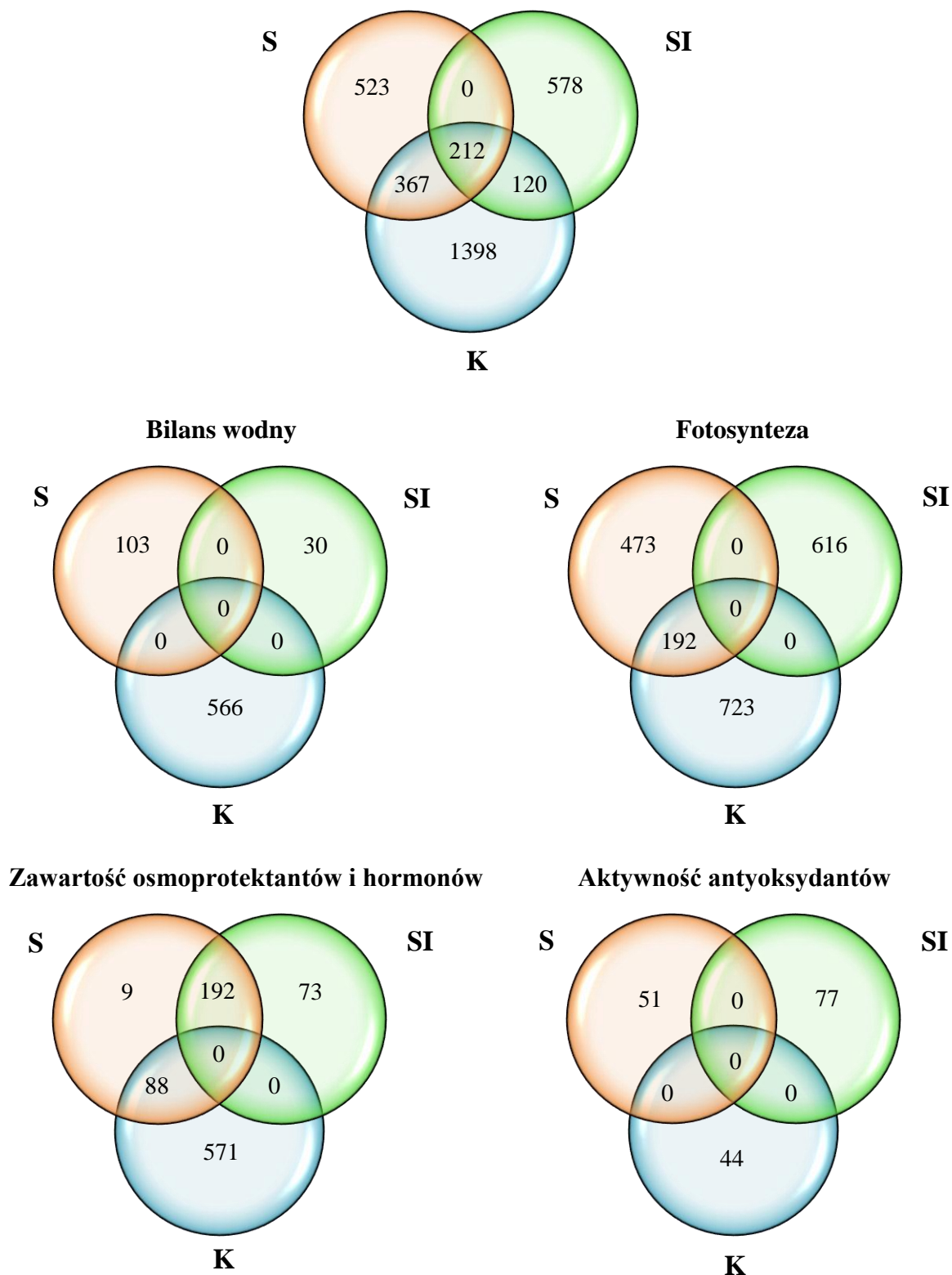
Tabela 4.18. cd.

Nr	Nazwa QTL	Wariant dośw.	Cecha	Chr.	Rejon na mapie fizycznej [bp]	Rejon na mapie genetycznej [cM]	Liczba genów
43	QdsiETo/RC.5H_3	SI	ET ₀ /RC	5H	5:498838285:499125794	49,85–50,94	16
44	QdsiDlo/RC.5H_2	SI	DI ₀ /RC	5H	5:52235365:83779551	16,46–18,57	275
45	QdsiqP.7H_2	SI	qP	7H	7:28143751:36984605	11,98–13,36	90
46	QdsiqE.7H_3	SI	qE	7H	7:547253062:567158278	9,85–11,21	150
Zawartość osmoprotektantów i hormonów							
47	QdPro.2H.1	S	prolina	2H	2:29185206:45887891	19,28–28,33	88
48	QdPro.2H.2	S	prolina	2H	2:592601560:592621267	118,44–118,63	5
49	QdPro.3H_2.1	S	prolina	3H	3:541639146:550627716	15,02–19,08	124
50	QdPro.3H_2.2	S	prolina	3H	3:556921592:558920662	33,01–35,29	68
51	QdEty.2H	S	etylen	2H	2:29185206:45887891	18,28–26,33	88
52	QdMal.3H_2.1	S	maltoza	3H	3:541639146:550627716	17,02–18,08	124
53	QdMal.3H_2.2	S	maltoza	3H	3:558758191:558993852	36,75–42,52	11
54	QcSach.5H_3	K	sacharoza	5H	5:504783183:505228489	55,55–56,54	5
55	QcRaf.1H_1	K	rafinoza	1H	1:14307374:18200214	33,95–34,34	15
56	QcRaf.2H	K	rafinoza	2H	2:29182003:45887891	16,28–29,33	89
57	QcMal.7H_1.1	K	maltoza	7H	7:5355159:61982602	1,79–5,69	550
58	QcMal.7H_1.2	K	maltoza	7H	7:11024780:19327908	16,36–20,66	71
59	QdsiGlu.2H	SI	glukoza	2H	2:22643528:26072559	14,03–14,23	21
60	QdsiSach.3H_2.1	SI	sacharoza	3H	3:541639146:550627716	16,02–18,08	124
61	QdsiSach.3H_2.2	SI	sacharoza	3H	3:556921592:558920662	31,01–35,29	68
62	QdsiMal.5H_3	SI	maltoza	5H	5:481377934:484720180	37,50–38,03	52
Aktywność antyoksydantów							
63	QdATf.6H	S	α-tokoferol	6H	6:4639195:7881976	0–2,75	51
64	QcCAT.2H	K	CAT	2H	2:22162411:26072559	14,23–14,63	44
65	QdsiGTf.7H_3	SI	γ-tokoferol	7H	7:570370503:570598564	21,05–26,34	9
66	QdsiGTte.3H_2	SI	γ-tokotrienol	3H	3:556921592:558920662	32,01–35,29	68

S – warunki stresu suszy; K – warunki optymalnego nawodnienia; SI – wskaźnik stresu

W rejonach QTL dla parametrów opisujących bilans wodny oraz aktywność antyoksydantów wyszczególniono ogółem, odpowiednio, 699 i 172 geny, specyficzne dla poszczególnych wariantów doświadczenia. W przedziałach ufności QTL dla fotosyntezy zidentyfikowano aż 2004 geny. Zaobserwowano, że ok. 30% genów potencjalnie kontrolujących ten proces w stresie suszy, znajduje się również w rejonach QTL warunkujących badane parametry w warunkach kontrolnych. Jeszcze większą redundancję stwierdzono wśród 933 genów dla zawartości osmoprotektantów i hormonów. Podobnie jak w przypadku fotosyntezy, ok 30% genów z regionów QTL zidentyfikowanych dla warunków deficytu wody może kontrolować tę cechę przy optymalnym nawodnieniu. Wśród pozostałych genów charakterystycznych dla tego reżimu wodnego, aż 96%

Pozycyjne geny kandydackie zidentyfikowane w przedziałach ufności 66 zmapowanych QTL



Rysunek 4.6. Pozycyjne geny kandydackie zidentyfikowane w przedziałach ufności zmapowanych QTL dla cech reprezentujących badane kategorie fenotypowe i analizowane warianty doświadczenia.

S – warunki stresu suszy; K – warunki optymalnego nawodnienia; SI – wskaźnik stresu

zidentyfikowano także dla wskaźników stresu (SI) zawartości analizowanych związków chemicznych.

W wyniku bioinformatycznej analizy wzbogacania terminów Ontologii Genów zidentyfikowano ogółem 187 różnych procesów biologicznych, statystycznie nadreprezentowanych wśród genów charakterystycznych dla analizowanych kategorii fenotypowych w stosunku do częstości ich występowania w genomie jęczmienia. Dla warunków optymalnego nawodnienia, zgodnie z oczekiwaniami, wyznaczono Ontologie Genów związane z procesami determinującymi kształtowanie się cech morfologicznych, anatomicznych oraz fizjologicznych, charakterystycznych dla prawidłowego wzrostu i funkcjonowania organizmów roślinnych. Zidentyfikowano m.in. procesy związane z rozwojem organów, sygnalingiem wewnątrzkomórkowym, transpiracją, syntezą związków chemicznych, transportem różnych substancji oraz odpowiedzią na zranienie lub infekcję. Terminy GO wspólne dla obu reżimów wodnych związane były głównie z fosforylacją białek, oddziaływaniem komórka-substrat, homeostazą redoks, metabolizmem pentoz oraz funkcjonowaniem włókien cytoszkieletu (Aneks 6.). Procesy biologiczne powiązane z genami zidentyfikowanymi w przedziałach ufności dla QTL zmapowanych w warunkach niedoboru wody oraz QTL dla wskaźników stresu (SI) analizowanych parametrów, skorelowane były wyraźnie z odebraniem przez rośliny sygnału o zaistnieniu czynnika stresowego (Rysunek 4.7.). Ogółem, w wyniku analizy wzbogacania terminów GO wyznaczono 143 geny zaangażowane w funkcjonowanie procesów biologicznych statystycznie nadreprezentowanych w genomie w związku z wystąpieniem stresu suszy (Aneks 7.). Szczegółowa analiza tych genów, polegająca głównie na porównaniu funkcji ich produktów białkowych z ortologami u *A. thaliana*, pozwoliła na wybór 46 najbardziej obiecujących pozycyjnych genów kandydackich, które z dużym prawdopodobieństwem zaangażowane są w wykształcenie badanych cech fizjologicznych i biochemicznych w warunkach stresu suszy (Tabela 4.19.). Stwierdzono, że 17% genów zlokalizowanych w przedziałach ufności QTL dla cech opisujących bilans wodny w warunkach stresu niedoboru wody związanych jest z procesami oksydoredukcyjnymi. Geny MLOC_5505 i MLOC_69302, kodujące odpowiednio enzymy z grupy dehydrogenaz oraz peroksydaz, zidentyfikowano w hotspocie qHS2.1 w przedziałach ufności QTL dla zawartości oraz utraty wody z liścia, a także wskaźnika stresu (SI) zawartości glukozy oraz aktywności katalazy w warunkach kontrolnych. Kolejne geny uczestniczące w procesach utleniania i redukcji wyznaczono

0,05		p-wartość				6,8E-05		Termin GO	Proces biologiczny
Bilans wodny		Aktywność antyoksydantów		Fotosynteza		Zawartość osmoprotektantów i hormonów			
S	SI	S	SI	S	SI	S	SI		
								GO:0009734	auxin mediated signaling pathway
								GO:0006457	protein folding
								GO:0090414	molybdate ion export from vacuole
								GO:0034486	vacuolar transmembrane transport
								GO:0000103	sulfate assimilation
								GO:0055114	oxidation-reduction process
								GO:0070291	N-acylethanolamine metabolic process
								GO:0006298	mismatch repair
								GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process
								GO:0016053	organic acid biosynthetic process
								GO:0009408	response to heat
								GO:0009644	response to high light intensity
								GO:0010023	proanthocyanidin biosynthetic process
								GO:0006593	ornithine catabolic process
								GO:0043462	regulation of ATPase activity
								GO:0032324	molybdopterin cofactor biosynthetic process
								GO:0006777	Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process
								GO:0042542	response to hydrogen peroxide
								GO:0009092	homoserine metabolic process
								GO:0071266	'de novo' L-methionine biosynthetic process
								GO:0046909	intermembrane transport
								GO:1900457	regulation of brassinosteroid mediated signaling pathway
								GO:1901038	cyanidin 3-O-glucoside metabolic process
								GO:1901804	beta-glucoside metabolic process
								GO:0019544	arginine catabolic process to glutamate
								GO:0010322	regulation of isopentenyl diphosphate biosynthetic process
								GO:0071071	regulation of phospholipid biosynthetic process
								GO:0009582	detection of abiotic stimulus
								GO:0035510	DNA dealkylation
								GO:0080111	DNA demethylation
								GO:0008272	sulfate transport
								GO:0043067	regulation of programmed cell death
								GO:0009094	L-phenylalanine biosynthetic process
								GO:1902223	phosphoenolpyruvate family amino acid biosynthetic process
								GO:0009652	thigmotropism
								GO:0042343	indole glucosinolate metabolic process
								GO:0043447	alkane biosynthetic process
								GO:0009581	detection of external stimulus
								GO:0006869	lipid transport
								GO:0042939	tripeptide transport
								GO:0072337	modified amino acid transport
								GO:0034635	glutathione transport
								GO:0007219	Notch signaling pathway
								GO:0006114	glycerol biosynthetic process
								GO:0006423	cysteinyl-tRNA aminoacylation
								GO:0006121	mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone
								GO:0006561	proline biosynthetic process
								GO:0009688	abscisic acid biosynthetic process
								GO:0045087	innate immune response
								GO:0006809	nitric oxide biosynthetic process
								GO:0046209	nitric oxide metabolic process
								GO:0015840	urea transport
								GO:0006952	defense response
								GO:0015937	coenzyme A biosynthetic process
								GO:0034030	ribonucleoside bisphosphate biosynthetic process
								GO:0034033	purine nucleoside bisphosphate biosynthetic process
								GO:0010050	vegetative phase change
								GO:0046164	alcohol catabolic process
								GO:0033866	nucleoside bisphosphate biosynthetic process
								GO:0010091	trichome branching
								GO:0030004	cellular monovalent inorganic cation homeostasis
								GO:0006261	DNA-dependent DNA replication
								GO:0019605	butyrate metabolic process
								GO:0051211	anisotropic cell growth
								GO:0007000	nucleolus organization
								GO:2000067	regulation of root morphogenesis
								GO:0051555	flavonol biosynthetic process
								GO:0051554	flavonol metabolic process
								GO:0051553	flavone biosynthetic process
								GO:0051552	flavone metabolic process
								GO:0019287	isopentenyl diphosphate biosynthetic process, mevalonate pathway
								GO:0006551	leucine metabolic process
								GO:0034051	negative regulation of plant-type hypersensitive response
								GO:0008380	RNA splicing
								GO:0006904	vesicle docking involved in exocytosis
								GO:0051052	regulation of DNA metabolic process
								GO:0048572	short-day photoperiodism
								GO:0045814	negative regulation of gene expression, epigenetic
								GO:0010017	red or far-red light signaling pathway
								GO:0010024	phytochromobilin biosynthetic process
								GO:0044205	'de novo' UMP biosynthetic process
								GO:0010258	NADH dehydrogenase complex (plastoquinone) assembly

Rysunek 4.7. Procesy biologiczne statystycznie nadreprezentowane w grupach genów dla analizowanych kategorii fenotypowych pod względem warunków stresu suszy (S) oraz wskaźników stresu (SI) w stosunku do częstości ich występowania w genomie jęczmienia.

w chromosomie 7H w rejonie QTL dla utraty wody z liścia. Były to MLOC_6299, którego produkt białkowy zaangażowany jest w biosyntezę długołańcuchowych kwasów tłuszczowych, MLOC_4579 dla syntazy flawonowej oraz MLOC_71498, kodujący komponent kanału translokacyjnego uczestniczącego w transporcie białek przez błony chloroplastów. Innymi statystycznie nadreprezentowanymi procesami biologicznymi w grupie genów dla bilansu wodnego były: transport przez błony komórkowe (MLOC_52403 kodujący białko zaangażowane w transport pęcherzykowy), metabolizm homoseryny i biosynteza L-metioniny (MLOC_71910 dla cystationiny gamma), metabolizm 3-O-glukozydu cyjanidyny i beta-glukozydu (MLOC_36976 kodujący UDP-glikozylotransferazę) oraz regulacja ścieżki sygnałowej brasinosteroidów (MLOC_72613, którego produktem białkowym jest III kinaza receptorowa zawierająca domenę lektynową). Wszystkie wybrane geny kandydackie dla wskaźników stresu (SI) bilansu wodnego zidentyfikowano w hotspocie qHS5.2 grupującym QTL dla zawartości wody w liściu oraz ET₀/RC w warunkach optymalnego nawodnienia. Stwierdzono, że 17% z nich powiązanych jest z procesami syntezy kwasów karboksylowych. Zidentyfikowano m.in. locus MLOC_18300, kodujący dioksygenazę 9-cis-epoksykaroteinową (NCED), będącą kluczowym enzymem w biosyntezie ABA oraz MLOC_53947 dla dehydrogenazy pirogronianowej, uczestniczącej w biosyntezie kwasów organicznych na terenie chloroplastów. Pozostałe terminy GO skorelowane z SI dla bilansu wodnego to biosynteza proliny i kwasu abscysynowego oraz katabolizm ornityny i argininy (MLOC_35821 dla aminotransferazy ornitynowej), a także regulacja aktywności ATP-azy i odpowiedź na ciepło (MLOC_37449 kodujący białko DnaJ).

Dla związków zaangażowanych w procesy antyoksydacyjne w stresie suszy zidentyfikowano pojedynczy QTL dla zawartości α -tokoferolu w chromosomie 6H. Procesami nadreprezentowanymi w grupie genów kandydackich dla tej cechy były biosynteza difosforanu izopentenyłu, regulacja biosyntezy fosfolipidów, metabolizm tlenu azotu i glukozyzolanów indolowych. Szczegółowa analiza pozwoliła na identyfikację locus MLOC_63263 kodującego białko związane z tlenkiem azotu (NO), zlokalizowane na terenie chloroplastów i mitochondriów, uczestniczące w usuwaniu ROS oraz MLOC_57100, którego produkt białkowy zaangażowany jest w syntezę flawonoli. Stwierdzono, że wyłonione geny dla wskaźników stresu (SI) zawartości antyoksydantów zlokalizowane są w silnym hotspocie qHS3.2, grupującym przedziały ufności QTL dla sześciu cech m.in. SI dla zawartości γ -tokotrienolu i sacharozy oraz zawartości proliny w warunkach stresu. Gen MLOC_73233, kodujący O-metylotransferazę powiązany

został z procesami biosyntezy oraz metabolizmu flawonów i flawonoli, natomiast MLOC_58872 kodujący akwaporynę, z transportem wody i mocznika przez błony komórkowe.

Na podstawie analizy wzbogacania terminów GO wśród pozycyjnych kandydatów zlokalizowanych w przedziałach ufności QTL charakteryzujących fotosyntezę w warunkach niedoboru wody, wyłoniono stosunkowo liczną grupę genów związanych z fałdowaniem białek, reakcją na ciepło, wysokie natężenie światła oraz nadtlenek wodoru. Były to głównie loci w chromosomach 2H i 7H kodujące białka szoku cieplnego (m.in. MLOC_568, MLOC_31567, MLOC_41281) oraz chaperony (MLOC_51927 i MLOC_54083), które zaangażowane są dodatkowo w fałdowanie białek kompleksu RuBisCO na terenie chloroplastów. Ciekawą grupę stanowią trzy loci: MLOC_15256, MLOC_19075, MLOC_38928, zlokalizowane w chromosomach 2H i 5H, kodujące chloroplastowe sulfuryazy uczestniczące w asymilacji związków siarki. W chromosomie 5H zidentyfikowano również geny powiązane z percepcją bodźców abiotycznych, mianowicie locus MLOC_824 dla białka fotoreceptorowego oraz MLOC_60235 kodujący białko histonowe zaangażowane w remodeling chromatyny po zadziałaniu czynnika stresowego. Wśród funkcjonalnych ontologii skorelowanych ze wskaźnikami stresu (SI) dla cech opisujących proces fotosyntezy wyróżniono trzy główne grupy. Pierwszą stanowiły procesy związane z modyfikacjami struktury DNA, z którymi powiązano dwa loci, MLOC_53029 i MLOC_11707, których produkty białkowe zaangażowane są w naprawę uszkodzonego DNA. Kolejną grupę stanowiły geny związane z transportem lipidów przez błony komórkowe, np. MLOC_51456 zlokalizowany w hotspotie qHS7.1, który grupował QTL dla wskaźników stresu TR₀/RC, ABS/RC i qE. Geny należące do ostatniej z wyróżnionych grup związane były z regulacją fotoperiodyzmu (MLOC_6879 i MLOC_19228) oraz ścieżką sygnałną indukowaną światłem czerwonym (MLOC_20045 i MLOC_53845).

Wśród pozycyjnych genów kandydackich dla zawartości osmoprotektantów i hormonów dominowały loci wspólne dla warunków stresu suszy oraz jego wskaźnika. Szczegółowa analiza pozwoliła na identyfikację czterech genów dla białek chloroplastowych, zlokalizowanych w obrębie hotspotu qHS3.1, wyróżnionego w rejonie nakładających się przedziałów ufności QTL dla SI zawartości sacharozy oraz zawartości proliny i maltozy w stresie suszy, a także trzech parametrów opisujących przebieg fotosyntezy w warunkach kontrolnych. Produkt białkowy genu MLOC_174 zaangażowany jest w komórkową odpowiedź na stresy poprzez uczestnictwo

w transporcie glutationu, natomiast fosfataza-3-glicerolu kodowana przez MLOC_40292, bierze udział w biosyntezie tego związku. Locus MLOC_70465 koduje enzym uczestniczący w biosyntezie fitochromów, a produktem białkowym genu MLOC_13836 jest podjednostka oksydoreduktazy NADH-chinon, zaangażowana w transport elektronów w fazie jasnej fotosyntezy. Wśród genów kandydackich dla zawartości osmoprotektantów i hormonów, charakterystycznych wyłącznie dla stresu suszy wyłoniono dwa geny zlokalizowane w hotspocie qHS2.3. Białko kodowane przez locus MLOC_65646 uczestniczy w biosyntezie molibdopteryny, a produkt genu MLOC_22343 zaangażowany jest w transport molibdenianów oraz siarczanów. Statystycznie nadreprezentowanymi procesami biologicznymi w grupie genów charakterystycznych dla wskaźników stresu (SI) były, podobnie jak dla bilansu wodnego w stresie suszy, metabolizm 3-O-glukozydu cyjanidyny i beta-glukozydu (MLOC_36976) oraz regulacja ścieżki sygnałowej brasinosteroidów (MLOC_72613). We fragmencie genomu pokrywającym się z regionem QTL dla wskaźnika stresu zawartości maltozy w chromosomie 5H wyróżniono również gen MLOC_58506, kodujący białko indukowane auksyną.

Tabela 4.19. Charakterystyka pozycyjnych genów kandydackich, wytypowanych na podstawie analizy wzbogacania terminów GO, które z dużym prawdopodobieństwem zaangażowane są w wykształcenie badanych parametrów fizjologicznych i biochemicznych w warunkach stresu suszy

MLOC	Hotspot	QTL	Termin GO	Proces biologiczny	Produkt białkowy	Ortolog u <i>A. thaliana</i>	Funkcja produktu białkowego u <i>A. thaliana</i>
Bilans wodny - susza							
MLOC_4579	–	QdWL.7H_2	GO:0055114	oxidation-reduction process	Oksygenaza zależna od 2-oksoglutaranu i Fe(II)/Syntaza flawonowa	AT5G20400	Uczestniczy w procesach utleniania i redukcji. Zaangażowany w transport azotu.
MLOC_5505	qHS2.1	QdWL.2H, QdWC.2H, QdsiGlu.2H, QcCAT.2H	GO:0055114	oxidation-reduction process	Dehydrogenaza mleczanowa	AT4G17260	Uczestniczy w procesach utleniania i redukcji. Zaangażowany w odpowiedź na stres solny i ABA.
MLOC_6299	–	QdWL.7H_2	GO:0055114	oxidation-reduction process	Acyl-CoA oksydaza 2	AT5G65110	Uczestniczy w biosyntezie długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.
MLOC_69302	qHS2.1	QdWL.2H, QdWC.2H, QdsiGlu.2H, QcCAT.2H	GO:0055114	oxidation-reduction process	Peroksydaza askorbinianowa I	AT1G07890	Uczestniczy w katabolizmie nadtlenu wodoru.
MLOC_71498	–	QdWL.7H_2	GO:0055114	oxidation-reduction process	Komponent kanału translokacyjnego zależny od protochlorofilidu	AT4G25650	Uczestniczy w procesach utleniania i redukcji oraz transporcie białek przez błony chloroplastów.
MLOC_52403	–	QdWL.7H_2	GO:0046909	intermembrane transport	Białko błonowe związane z transportem pęcherzykowym	AT5G11150	Uczestniczy w transporcie białek oraz procesie egzocytozy. Zaangażowany w odpowiedź na stres solny.
MLOC_72613	qHS2.1	QdWL.2H, QdWC.2H, QdsiGlu.2H, QcCAT.2H	GO:1900457	regulation of brassinosteroid mediated signaling pathway	III kinaza receptorowa zawierająca domenę lektynową	AT5G02800	Uczestniczy w fosforylacji białek.
MLOC_71910	–	QdWL.7H_2	GO:0009092	homoserine metabolic process	Cystationina gamma	AT3G57050	Enzym uczestniczący w biosyntezie metioniny. Zlokalizowany na terenie chloroplastów.
			GO:0071266	'de novo' L-methionine biosynthetic process			
MLOC_36976	qHS2.1	QdWL.2H, QdWC.2H, QdsiGlu.2H, QcCAT.2H	GO:1901038	cyanidin 3-O-glucoside metabolic process	UDP-glikozylotransferaza	AT1G64910	Uczestniczy w reakcji przenoszenia grupy glikozydowej.
			GO:1901804	beta-glucoside metabolic process			
Bilans wodny - SI							
MLOC_18300	qHS5.2	QdsiWC.5H_3, QcETo/RC.5H_3	GO:0016053	organic acid biosynthetic process	Dioksygenaza 9-cis-epoksykarotenoidowa (NCED)	AT1G78390	Kluczowy enzym w biosyntezie ABA. Zlokalizowany na terenie chloroplastów.
			GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process			
			GO:0009688	abscisic acid biosynthetic process			

Tabela 4.20. cd.

MLOC	Hotspot	QTL	Termin GO	Proces biologiczny	Produkt białkowy	Ortolog u <i>A. thaliana</i>	Funkcja produktu białkowego u <i>A. thaliana</i>
MLOC_56414	qHS5.2	QdsiWC.5H_3, QcETo/RC.5H_3	GO:0016053	organic acid biosynthetic process	Dehydrataza pefenatowa	AT5G22630	Uczestniczy w biosyntezie L-fenylalaniny. Zlokalizowany na terenie chloroplastów.
			GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process			
			GO:0009094	L-phenylalanine biosynthetic process			
			GO:1902223	erythrose 4-phosphate/phosphoenolpyruvate family amino acid biosynthetic process			
MLOC_35821	qHS5.2	QdsiWC.5H_3, QcETo/RC.5H_3	GO:0016053	organic acid biosynthetic process	Aminotransferaza ornitynowa	AT5G46180	Uczestniczy w katabolizmie argininy i ornityny oraz akumulacji proliny. Zaangażowany w odpowiedź na stres solny i ABA.
			GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process			
			GO:0006593	ornithine catabolic process			
			GO:0009413	response to flooding			
			GO:0019544	arginine catabolic process to glutamate			
			GO:0006561	proline biosynthetic process			
			GO:0045087	innate immune response			
GO:0009408	response to heat						
MLOC_53947	qHS5.2	QdsiWC.5H_3, QcETo/RC.5H_3	GO:0016053	organic acid biosynthetic process	Dehydrogenaza pirogronianowa	AT1G30120	Uczestniczy w biosyntezie kwasów organicznych. Zlokalizowany na terenie chloroplastów.
			GO:0046394	carboxylic acid biosynthetic process			
MLOC_37449	qHS5.2	QdsiWC.5H_3, QcETo/RC.5H_3	GO:0043462	regulation of ATPase activity	Białko DnaJ	AT3G44110	Uczestniczy w fałdowaniu białek. Wiąże się z białkami szoku cieplnego oraz ATP-azą. Reguluje czas kwitnienia.
			GO:0009408	response to heat			
Aktywność antyoksydantów - susza							
MLOC_57100	—	QdATf.6H	GO:0042343	indole glucosinolate metabolic process	O-metylotransferaza	AT5G54160	Uczestniczy w biosyntezie flawonoli.

Tabela 4.20. cd.

MLOC	Hotspot	QTL	Termin GO	Proces biologiczny	Produkt białkowy	Ortolog u <i>A. thaliana</i>	Funkcja produktu białkowego u <i>A. thaliana</i>
MLOC_63263	—	QdATf.6H	GO:0010322	regulation of isopentenyl diphosphate biosynthetic process, methylerythritol 4-phosphate pathway	Białko związane z NO	AT3G47450	Uczestniczy w usuwaniu ROS oraz metabolizmie tlenu azotu. Zlokalizowany na terenie chloroplastów oraz mitochondriów.
			GO:0071071	regulation of phospholipid biosynthetic process			
			GO:0006809	nitric oxide biosynthetic process			
			GO:0046209	nitric oxide metabolic process			
Aktywność antyoksydantów - SI							
MLOC_73233	qHS3.2	QdsiGTt.3H_2, QdPro.3H_2.2, QdsiSach.3H_2.2, QcABS/CS.3H_2.2, QcTRo/CS.3H_2.2, QcDlo/CS.3H_2.2	GO:0051554	flavonol metabolic process	O-metylotransferaza	AT5G54160	Uczestniczy w biosyntezie flawonoli.
			GO:0051555	flavonol biosynthetic process			
			GO:0051552	flavone metabolic process			
			GO:0051553	flavone biosynthetic process			
MLOC_58872	qHS3.2	QdsiGTt.3H_2, QdPro.3H_2.2, QdsiSach.3H_2.2, QcABS/CS.3H_2.2, QcTRo/CS.3H_2.2, QcDlo/CS.3H_2.2	GO:0015840	urea transport	Akwaporyna	AT4G01470	Uczestniczy w transporcie wody i mocznika przez błony komórkowe.
Fotosynteza - susza							
MLOC_568 MLOC_31567 MLOC_41281	—	Qd1-Bv.7H_2	GO:0006457	protein folding	białko szoku cieplnego z rodziny HSP20	AT5G51440	Białko szoku cieplnego.
			GO:0009408	response to heat			
			GO:0009644	response to high light intensity			
			GO:0042542	response to hydrogen peroxide			
MLOC_54083	—	Qd1-Bv.7H_2	GO:0006457	protein folding	Chaperon	AT4G04330	Białko szoku cieplnego. Zaangażowane w fałdowanie kompleksu RuBisCO na terenie chloroplastów.

Tabela 4.20. cd.

MLOC	Hotspot	QTL	Termin GO	Proces biologiczny	Produkt białkowy	Ortolog u <i>A. thaliana</i>	Funkcja produktu białkowego u <i>A. thaliana</i>
MLOC_5618	–	QdABS/RC.2H.1	GO:0006457	protein folding	Białko szoku cieplnego 90 kDa	AT5G52640	Białko szoku cieplnego.
			GO:0009408	response to heat			
			GO:0006952	defense response			
MLOC_51927	–	QdABS/RC.2H.1	GO:0006457	protein folding	60 kDa chaperonina	AT2G28000	Białko szoku cieplnego. Zaangażowane w fałdowanie kompleksu RuBisCO na terenie chloroplastów.
			GO:0009408	response to heat			
			GO:0009644	response to high light intensity			
			GO:0042542	response to hydrogen peroxide			
MLOC_15256	–	QdABS/RC.2H.1	GO:0000103	sulfate assimilation	ATP sulfurylaza, chloroplastowa	AT1G19920	Uczestniczy w szlaku asymilacji siarczanów.
MLOC_19075	–	QdDlo/CS.5H_3	GO:0000103	sulfate assimilation	ATP sulfurylaza, chloroplastowa	AT4G14680	Uczestniczy w szlaku asymilacji siarczanów.
MLOC_38928	–	QdABS/RC.2H.1	GO:0000103	sulfate assimilation	ATP sulfurylaza, chloroplastowa	AT3G22890	Uczestniczy w szlaku asymilacji siarczanów.
MLOC_51191	–	QdDlo/CS.5H_3	GO:0009408	response to heat	Czynnik transkrypcyjny aktywowany stresem	AT2G26150	Czynnik transkrypcyjny aktywowany stresem oksydacyjnym, ciepłym i wysokim natężeniem światła.
MLOC_75846	–	QdABS/RC.2H.2	GO:0010023	proanthocyanidin biosynthetic process	ATP-aza	AT3G42640	Biosynteza ATP. Aktywny transport kationów przez błony komórkowe.
			GO:0030004	cellular monovalent inorganic cation homeostasis			
MLOC_824	–	QdDlo/CS.5H_3	GO:0009582	detection of abiotic stimulus	Fitochrom A	AT1G09570	Fotoreceptor.
			GO:0009581	detection of external stimulus			
MLOC_36316	–	Qd1-Bv.7H_2	GO:0009408	response to heat	Aneksyna 2	AT5G65020	Uczestniczy w wiązaniu jonów wapnia. Zaangażowany w sekrecję polisacharydów z aparatu Golgiego.
MLOC_60235	–	QdDlo/CS.5H_3	GO:0009582	detection of abiotic stimulus	Histon H2A	AT3G54560	Zaangażowany w remodeling chromatyny po zadziałaniu czynnika stresowego.
			GO:0009581	detection of external stimulus			
			GO:0006952	defense response			
			GO:0051052	regulation of DNA metabolic process			

Tabela 4.20. cd.

MLOC	Hotspot	QTL	Termin GO	Proces biologiczny	Produkt białkowy	Ortolog u <i>A. thaliana</i>	Funkcja produktu białkowego u <i>A. thaliana</i>
Fotosynteza - SI							
MLOC_53029	–	QdsiP.7H_2	GO:0035510	DNA dealkylation	Białko naprawy DNA XRCC1	AT1G80420	Uczestniczy w naprawie DNA.
			GO:0080111	DNA demethylation			
MLOC_11707	–	QdsiDlo/RC.5H_2	GO:0035510	DNA dealkylation	Glikozylaza DNA	AT5G04560	Uczestniczy w naprawie DNA przez wycinanie zasad azotowych.
			GO:0080111	DNA demethylation			
			GO:0045814	negative regulation of gene expression, epigenetic			
MLOC_51456	qHS7.1	QdsiTRo/RC.7H_3, QdsiE.7H_3, QdsiABS/RC.7H_3	GO:0006869	lipid transport	Białko transportujące lipidy	AT3G53980	Uczestniczy w transporcie lipidów przez błony komórkowe.
MLOC_3724	–	QdsiTRo/RC.5H_3	GO:0006869	lipid transport	Białko transportujące glikolipidy	AT2G34690	Uczestniczy w transporcie glikolipidów przez błony komórkowe.
MLOC_6879	–	QdsiDlo/RC.5H_2	GO:0045814	negative regulation of gene expression, epigenetic	Białko niewrażliwe na wernalizację 3	AT3G24440	Uczestniczy w regulacji kwitnienia i metylacji histonów.
			GO:0048572	short-day photoperiodism			
MLOC_20045	–	QdsiDlo/RC.5H_2	GO:0010017	red or far-red light signaling pathway	Kinaza difosforanu nukleozydu	AT5G63310	Reguluje poziom dNTP w komórkach. Uczestniczy w sygnalingu auksyny i fototransdukcji. Zależny od stresu oksydacyjnego i UV.
MLOC_53845	–	QdsiDlo/RC.5H_2	GO:0010017	red or far-red light signaling pathway	Białko regulujące czas kwitnienia	AT1G25540	Uczestniczy w regulacji czasu kwitnienia.
MLOC_19228	–	QdsiTRo/RC.5H_3	GO:0048572	short-day photoperiodism	Cullin-4	AT5G46210	Uczestniczy w negatywnej regulacji fotomorfogenezy.
Zawartość osmoprotektantów i hormonów - susza							
MLOC_65646	qHS2.3	QdABS/RC.2H.2, QdPro.2H.2	GO:0019720	Mo-molybdopterin cofactor metabolic process	Białko biosyntezy molibdopteryny CNX1	AT5G20990	Uczestniczy w biosyntezie molibdopteryny. Zaangażowany w sygnaling auksyny.
			GO:0006777	Mo-molybdopterin cofactor biosynthetic process			
			GO:0032324	molybdopterin cofactor biosynthetic process			
			GO:0043545	molybdopterin cofactor metabolic process			
			GO:0051189	prosthetic group metabolic process			

Tabela 4.20. cd.

MLOC	Hotspot	QTL	Termin GO	Proces biologiczny	Produkt białkowy	Ortolog u <i>A. thaliana</i>	Funkcja produktu białkowego u <i>A. thaliana</i>
MLOC_22343	qHS2.3	QdABS/RC.2H.2, QdPro.2H.2	GO:0034486	vacuolar transmembrane transport	Transporter molibdenianów	AT1G80310	Uczestniczy w transporcie molibdenianów oraz siarczanów.
			GO:0090414	molybdate ion export from vacuole			
			GO:0008272	sulfate transport			
Zawartość osmoprotektantów i hormonów - SI							
MLOC_58506	—	QdsiMal.5H_3	GO:0009734	auxin mediated pathway	Białko indukowane auksyną	AT1G29420	Zaangażowany w sygnaling auksyny.
MLOC_36976	qHS2.1	QdsiGlu.2H, QdWL.2H, QdWC.2H, QcCAT.2H	GO:1901038	cyanidin 3-O-glucoside metabolic process	UDP-glikotransferaza	AT1G64910	Uczestniczy w reakcji przenoszenia grupy glikozydowej.
			GO:1901804	beta-glucoside metabolic process			
MLOC_72613	qHS2.1	QdsiGlu.2H, QdWL.2H, QdWC.2H, QcCAT.2H	GO:1900457	regulation of brassinosteroid mediated pathway	III kinaza receptorowa zawierająca domenę lektynową	AT5G02800	Uczestniczy w fosforylacji białek.
Zawartość osmoprotektantów i hormonów – susza/SI							
MLOC_174	qHS3.1	QdsiSach.3H_2.1, QdPro.3H_2.1, QdMal.3H_2.1, QcABS/CS.3H_2.1, QcTRo/CS.3H_2.1, QcDlo/CS.3H_2.1	GO:0042939	tripeptide transport	Crt homolog	AT5G12170	Uczestniczy w transporcie glutationu. Zaangażowany w odpowiedź na stresy. Zlokalizowany na terenie chloroplastów.
			GO:0072337	modified amino acid transport			
			GO:0034635	glutathione transport			
MLOC_40292	qHS3.1	QdsiSach.3H_2.1, QdPro.3H_2.1, QdMal.3H_2.1, QcABS/CS.3H_2.1, QcTRo/CS.3H_2.1, QcDlo/CS.3H_2.1	GO:0006114	glycerol biosynthetic process	Fosfataza-3-glicerolu	AT4G25840	Uczestniczy w biosyntezie glicerolu. Zlokalizowany na terenie chloroplastów.
MLOC_70465	qHS3.1	QdsiSach.3H_2.1, QdPro.3H_2.1, QdMal.3H_2.1, QcABS/CS.3H_2.1, QcTRo/CS.3H_2.1, QcDlo/CS.3H_2.1	GO:0010024	phytochromobilin biosynthetic process	Oksydoreduktaza ferredoksyny, chloroplastowa	AT3G09150	Uczestniczy w biosyntezie fitochromów. Zlokalizowany na terenie chloroplastów.
			GO:0051202	phytochromobilin metabolic process			

5. Dyskusja

5.1. Wysokorozdzielcza funkcjonalna mapa konsensusowa

W niniejszej pracy skonstruowano mapę genetyczną opartą o polimorfizm wewnątrzgenowy (73% zmapowanych markerów SSR i SNP), która umożliwiła integrację z fizyczną sekwencją genomu jęczmienia w celu przeszukiwania rejonów genomu odpowiadających zmapowanym QTL pod kątem identyfikacji pozycyjnych genów kandydackich. Prezentowana konsensusowa mapa genetyczna o długości 941,86 cM i zawierająca łącznie 875 loci ze średnią gęstością 1,1 cM stworzona została na podstawie analizy danych z trzech populacji mapujących RIL, wyprowadzonych z krzyżówek odmian europejskich oraz syryjskich jęczmienia jarego. Dodatkowo, na mapie zlokalizowano ogółem 64 funkcjonalne geny kandydackie kodujące jęczmienne ortologi białek funkcjonalnych oraz regulatorowych o aktywności związanej z reakcją na stres niedoboru wody u roślin modelowych oraz geny, które w eksperymencie mikromacierzowym wykazywały istotne różnice w ekspresji między genotypami 'Maresi' i Cam/B1/CI podczas stresu suszy zadanego w stadium siewki.

Wiele opublikowanych wysokorozdzielczych map jęczmienia opartych jest o polimorfizm w obrębie sekwencji anonimowych. Wenzl i zespół (2006) zintegrowali 2935 markerów DArT, RFLP, SSR oraz STS segregujących w dziewięciu populacjach mapujących otrzymując mapę konsensusową o długości 1161 cM, natomiast 3458 markerów RFLP, AFLP, SSR i RAPD zostało włączonych do mapy genetycznej o długości 1081 cM (Marcel i in., 2007). Markery w sekwencjach o nieznanym składzie nukleotydowym mogą jedynie wskazywać pozycję zmapowanych QTL w genomie, nie pozwalając na identyfikację genów kandydackich leżących u podstawy dziedziczenia cech ilościowych. Pierwsza mapa sprzężeń jęczmienia oparta o polimorfizm wewnątrz sekwencji genów, o długości 1211 cM i zawierająca pośród 1237 loci, 333 markery SNP, których źródłem były geny o zróżnicowanej ekspresji, pochodzące z analizy mikromacierzy, wygenerowana została przez Rostoks'a i współpracowników (2005). Innym przykładem jest mapa genetyczna stworzona przez zespół Stein'a (2007) o długości 1118,3 cM oraz gęstości 0,9 cM zawierająca 1055 markerów RFLP, SSR i SNP reprezentujących aktywne transkrypcyjnie geny w odpowiedzi na różne stropy abiotyczne. Sekwencje EST oraz zsekwencjonowane amplikony PCR wybranych genów o aktywności skorelowanej z występowaniem stresów abiotycznych posłużyły do skonstruowania platformy GoldenGate firmy Illumina, wykorzystanej w niniejszej pracy

doktorskiej do wysokoprzepustowego genotypowania markerów SNP. Metoda ta została zastosowana po raz pierwszy przez Close i in. (2009) do stworzenia konsensusowej mapy genetycznej o długości 1099 cM zawierającej 2943 loci SNP, integrującej dane markerowe z czterech populacji mapujących jęczmienia, a następnie przez Szűcs'a i współpracowników (2009) oraz Sato i Takede (2009). Mapy genetyczne oparte o polimorfizm wewnątrzgenowy stworzone zostały także dla innych gatunków roślin. Paina i zespół (2016) opracowali platformę GoldenGate dedykowaną dla genotypowania markerów SNP u zycicy trwałej (*Lolium perenne* L.) na podstawie analizy transkryptów genów aktywnych m.in. w odpowiedzi na stres niskiej temperatury. Mapa genetyczna markerów SSR i dCAPS, zidentyfikowanych w oparciu o sekwencjonowanie bibliotek EST metodą NGS, opracowana została dla kapusty warzywnej (*Brassica oleracea* L.) (Izzah i in., 2014), natomiast dla oliwki europejskiej (*Olea europea* L.) opracowano mapę genetyczną zawierającą 3384 wewnątrzgenowe markery SNP uzyskane metodą GBS (Ipek i in., 2017).

Długość skonstruowanej w tej pracy mapy genetycznej nie odbiega od innych map opublikowanych dla jęczmienia, a niewielkie średnie odległości między markerami, wynoszące od 0,8 do 1,6 cM w zależności od grupy sprzężeń, są wystarczające do mapowania loci cech ilościowych. Prezentowana mapa konsensusowa została z sukcesem wykorzystana w lokalizowaniu QTL dla cech związanych z plonowaniem, wczesnością, wysokością roślin oraz zawartością metabolitów wtórnych w odpowiedzi na stres suszy, analizowanych w ramach projektu POLAPGEN-BD (Mikołajczak i in., 2016; Mikołajczak i in., 2017; Ogrodowicz i in., 2017; Piasecka i in., 2017). Na podstawie analizy układu loci w poszczególnych grupach sprzężeń wykazano wysoką zgodność ułożenia markerów SSR i SNP w odniesieniu do map referencyjnych (Ramsay i in., 2000; Varshney i in., 2007; Close i in., 2009) za wyjątkiem nieco zmienionej kolejności loci w rejonach centromerów. Stosunkowo wysoki poziom polimorfizmu markerów SNP, reprezentujących na ogół konserwowane fragmenty genomu, wynoszący w przybliżeniu 37% oraz duża gęstość markerów świadczą o znacznym zróżnicowaniu genetycznym rodziców analizowanych populacji mapujących. Worch i współpracownicy (2011) wykazali podobny polimorfizm markerów SNP, na poziomie 30% między odmianami 'Steptoe' i 'Morex' oraz 33% między odmianą 'Brenda' i linią 584 *H. spontaneum*. Formami wyjściowymi populacji mapujących analizowanych w niniejszej pracy doktorskiej były elitarne odmiany jęczmienia przystosowane do uprawy i dobrze plonujące w klimacie europejskim oraz syryjskie linie i odmiany pochodzące z rejonów

charakteryzujących się znacznie bardziej suchym klimatem. Jako źródło pożądaných alleli w hodowli odmian lepiej przystosowanych do określonych warunków środowiska często stosowane są krzyżowania z lokalnymi formami jęczmienia, uprawianymi w niekorzystnym klimacie, lub z jego najbliższym dzikim krewnym *H. spontaneum* (Tuberosa i Salvi, 2006; Baum i in., 2007). Wykorzystanie form rodzicielskich pochodzących z oddalonych rejonów geograficznych zapewnia wysoki polimorfizm na poziomie molekularnym oraz istotne zróżnicowanie pod względem analizowanych cech fenotypowych. Von Korff wraz z zespołem (2008), do pozycjonowania QTL dla cech fenotypowanych w warunkach suchego klimatu rejonu basenu Morza Śródziemnego wykorzystali populację mapującą RIL pochodzącą z krzyżówki ‘Tadmor’ x ‘Er/Apm’. Odmiana ‘Tadmor’ jest lokalną formą jęczmienia pochodzącą z Syrii, charakteryzującą się przystosowaniem do wzrostu w warunkach ekstremalnej suszy. Z kolei odmiana ‘Er/Apm’ wyhodowana została w ośrodku ICARDA jako dobrze plonująca w warunkach umiarkowanego przesuszenia środowiska. Innym przykładem jest populacja RIL, wyprowadzona z krzyżowania syryjskiej lokalnej odmiany ‘Arta’ oraz australijskiej odmiany ‘Keel’ (Rollins i in., 2013). Krzyżowanie *H. spontaneum* z australijską, dobrze plonującą odmianą ‘Barque-73’, wykorzystano do wyprowadzenia populacji mapującej linii DH, w której prześledzono segregację markerów SSR i DArT (Hearnden i in., 2007).

Prezentowana w ramach niniejszej pracy mapa genetyczna składa się z 13 grup sprzężonych markerów. Chromosomy 2H, 4H i 6H zmapowano w całości, chromosomy 1H i 3H zostały rozbite na dwie grupy sprzężeń, a chromosomy 5H i 7H na trzy fragmenty. Taką samą liczbę grup sprzężeń otrzymał zespół Mansour’a (2014), analizując segregację polimorficznych markerów SNP pośród 232 linii RIL otrzymanych z krzyżowania hiszpańskich odmian jęczmienia ‘Orria’ i ‘Plaisant’. Mapę złożoną z dziesięciu grup sprzężonych markerów DArT, których segregację prześledzono w populacji 334 linii DH wyprowadzonych z krzyżowania amerykańskiej linii jęczmienia ND24260 oraz australijskiej odmiany ‘Flagship’, stworzyli Hickey i współpracownicy (2011). Innym przykładem dla jęczmienia jest mapa genetyczna integrująca markery DArT, SSR i STS w 11 grupach sprzężeń, stworzona dla populacji 446 linii RIL, których formami rodzicielskimi były syryjska odmiana ‘Arta’ oraz australijska ‘Keel’ (Rollins i in., 2013). Wszystkie wymienione mapy genetyczne z sukcesem wykorzystane zostały do mapowania QTL dla różnych cech fenotypowych. Otrzymana w tej pracy konsensusowa mapa genetyczna, mimo rozbicia niektórych chromosomów na części, charakteryzowała się dobrym pokryciem ze względu na występowanie stosunkowo

niewielkich fragmentów genomu niewysyconych markerami, zlokalizowanych między wyznaczonymi grupami sprzężeń. Szczegółowa analiza segregacji alleli w poszczególnych grupach sprzężeń wykazała, że występowanie luk między fragmentami chromosomów na mapach indywidualnych, które stanowiły podstawę tworzenia mapy konsensusowej, ma związek z obecnością grup markerów o zaburzonym wzorze segregacji na korzyść jednej z form rodzicielskich. Podobnej obserwacji dokonał także zespół Rollins'a (2013). Większość markerów, które przeanalizowano w populacjach M_{Cam} i G_H segregowała zgodnie z oczekiwanym wzorem segregacji dla populacji R_{IL}. Stwierdzono jednak, że 42,9% markerów SSR oraz SNP w populacji M_{Cam} i 36,6% loci w populacji G_H prezentowało odchylenia od przewidywanej segregacji alleli 1:1. Loci o zaburzonym wzorze segregacji zakwalifikowano do 10 różnych regionów SDR (ang. segregation distortion region), które grupowały średnio 90% markerów tego typu. Wyższy poziom odchylenia markerów od przyjętego wzoru 1:1 (61,7%) wykazano dla populacji L_{Cam} (Mikołajczak, 2015). Analiza czterech różnych populacji linii DH jęczmienia wykazała od 15 do 38% markerów RFLP, SSR i DArT o zaburzonym wzorze segregacji, co pozwoliło na identyfikację 14 różnych regionów SDR obejmujących sześć rejonów okołocentromerowych i grupujących 72% loci o nieprawidłowym wzorze segregacji (Li i in., 2010). W wyniku analizy sprzężeń otrzymano mapy genetyczne złożone z 8-10 fragmentów, w zależności od populacji. Z kolei zespół Bélanger'a (2016), na podstawie analizy segregacji markerów GBS w 12 populacjach linii DH jęczmienia, wykazał odsetek zaburzonych loci w przedziale od 3,7 do 58%, w 36 różnych regionach SDR.

Istotne statystycznie odchylenia od przewidywanej segregacji alleli są powszechnym zjawiskiem występującym w populacjach mapujących otrzymanych z krzyżowań zróżnicowanych genetycznie form rodzicielskich, zaobserwowanym u wielu gatunków roślin (Alheit i in., 2011; Izzah i in., 2014; Hashemi i in., 2015; Gardner i in., 2016). Tendencja do występowania segmentów zaburzonych markerów w chromosomach oraz identyfikacja pokrywających się rejonów SDR na różnych mapach świadczą o istnieniu genetycznych determinantów warunkujących częstość występowania alleli rodzicielskich w polimorficznych loci. Do najważniejszych czynników mających wpływ na występowanie tego zjawiska należą: typ wykorzystanej populacji mapującej, stopień pokrewieństwa form rodzicielskich, obecność genów, których aktywność skorelowana jest z preferowaną selekcją gamet lub zygot, epistaza oraz epigenetyczne modyfikacje chromatyny (Törjék i in., 2006; Li i in., 2010; Liu i in.,

2010; Habu i in., 2015). Badania wykazały, że istotne odchylenia od przewidywanej segregacji alleli obserwowane są częściej w populacjach linii RIL niż DH lub F₂, co związane jest z występowaniem większej liczby mejoz oraz presją selekcyjną faworyzującą allele pochodzące od odmiany lepiej przystosowanej do warunków panujących w trakcie ich wytwarzania (Xu i in., 1997; Sehgal i in., 2012). Kianian i Quiros (1992) zidentyfikowali 59% zaburzonych markerów w populacji F₂ powstałej w wyniku międzygatunkowego krzyżowania w obrębie rodzaju *Brassica* oraz tylko 7% markerów o zaburzonym wzorze segregacji w trzech populacjach F₂ wyprowadzonych z wewnątrzgatunkowych krzyżówek *B. oleracea*. Wykorzystanie w niniejszej pracy populacji RIL otrzymanych z krzyżówek odmian i linii jęczmienia charakteryzujących się znacznym oddaleniem geograficznym i genetycznym, mogło w bezpośredni sposób wpłynąć na otrzymanie indywidualnych map genetycznych o większej liczbie grup sprzężeń niż wynosi haploidalna liczba chromosomów jęczmienia, co jednak zniwelowano w znaczący sposób tworząc mapę konsensusową.

5.2. Fenotypowe skutki stresu suszy

Zastosowany w doświadczeniu szklarniowym stres suszy zadany w stadium siewki w istotny statystycznie sposób wpłynął na zmianę średnich wartości większości analizowanych parametrów fizjologicznych i biochemicznych w obrębie populacji RIL w analizowanych warunkach nawodnienia. Stwierdzone dla badanych parametrów efekty transgresji są częstym zjawiskiem obserwowanym w populacjach mapujących. Występowanie szerszego zakresu zmienności cech, w odniesieniu do pokolenia rodzicielskiego, jest najprawdopodobniej wynikiem dużego zróżnicowania genetycznego form rodzicielskich oraz wielogenowego dziedziczenia badanych cech fenotypowych (Xu i in., 2017). Zjawisko transgresji zaobserwowano m.in. dla parametrów fluorescencji chlorofilu *a* u słonecznika (*Helianthus annuus* L.; Kiani i in., 2008) oraz dla parametrów związanych z plonowaniem oraz terminem kwitnienia u jęczmienia (Tondelli i in., 2014).

Efektom stresu suszy w populacji M_{Cam} było obniżenie średnich wartości parametrów opisujących bilans wodny, przy czym największy spadek stwierdzono dla względnej zawartości wody (RWC) w liściach, która spadła do poziomu 40% w stosunku do warunków kontrolnych. Przyjmuje się, że poniżej krytycznej wartości RWC wynoszącej 70%, ograniczenie pobierania CO₂ zachodzi również niezależnie od funkcjonowania aparatów szparkowych. Uruchamiane są procesy związane z uszkodzeniem membran, zmniejszeniem zawartości barwników fotosyntetycznych oraz

utlenianiem lipidów chloroplastowych (Brestic i Zivcak, 2013). Wartość RWC, będąca wypadkową ilości wody pobranej przez system korzeniowy i wydalonej na drodze transpiracji, jest użytecznym wskaźnikiem odzwierciedlającym wpływ deficytu wody na ogólne uwodnienie tkanek i kondycję roślin (Teulat i in., 2003). Spadek RWC w liściach genotypów jęczmienia poddanych stresowi suszy stwierdzono także w innych pracach poświęconych badaniom mechanizmów tolerancji na ten stres (Diab i in., 2004; Chen i in., 2010; Szira i in., 2011).

Silne negatywne skutki stresu suszy wykazano również dla parametrów opisujących wydajność wymiany gazowej. W populacji RIL, średnia intensywność fotosyntezy netto (P_n) spadła do poziomu 17%, a intensywność transpiracji (E) do 30%. Wyniki te korespondują z badaniami Anjum'a i in. (2011b), którzy u kukurydzy (*Zea mays* L.) zaobserwowali w stresie suszy spadek wartości fotosyntezy netto do 33%, intensywności transpiracji do 38% oraz efektywności wykorzystania wody do 51%. Hura i zespół (2007) wykazali, w konsekwencji niskiego potencjału wody w liściach, zarówno spadek wartości fotosyntezy netto (36-68%), jak i intensywności transpiracji (42-76%) analizując wpływ suszy na różne rośliny typu C3 i C4 w fazie generatywnej. Wysokie dodatnie współczynniki korelacji wyliczone w ramach niniejszej pracy między RWC a wskaźnikiem wydajności fotosyntezy netto i intensywnością transpiracji wynikają z faktu, że obniżenie potencjału wodnego w liściach indukuje zamykanie aparatów szparkowych, prowadząc bezpośrednio do spadku poziomu CO_2 w komórkach mezofilu oraz prawdopodobnie uruchamia kaskadę mechanizmów pozaszparkowego ograniczenia stężenia CO_2 w liściach, co implikuje spadek wydajności procesu fotosyntezy.

Parametrem fizjologicznym, dla którego odnotowano prawie trzykrotny wzrost średnich wartości w analizowanej populacji RIL był wyciek elektrolitów (EL), co świadczy o dezintegracji i zwiększeniu przepuszczalności błon komórkowych dla jonów, w efekcie niedoboru wody. Dane literaturowe wskazują, że wyciek elektrolitów jest konsekwencją stresu oksydacyjnego będącego odpowiedzią tkanek roślinnych na suszę, atak patogenów, zasolenie, czy też zalewanie (Bajji i in., 2002; Maffei i in., 2007; Shabala, 2011; Demidchik i in., 2014). W niniejszej pracy stwierdzono liczne ujemne korelacje fenotypowe między wyciekiem elektrolitów i parametrami związanymi z wydajnością fotosyntezy. Najsilniejsze zależności wykazano dla parametrów szybkiej kinetyki fluorescencji chlorofilu *a*, współczynnika wydajności fotosyntezy netto (P_n) i intensywności transpiracji (E) oraz fotochemicznej wydajności kwantowej PSII (Φ_{PSII}). Zbliżone wyniki otrzymał zespół Wójcik-Jagły (2013), który analizując wpływ stresu

suszy na wydajność fotosyntezy w dwóch populacjach F₂ jęczmienia, podkreślił silną negatywną korelację między wyciekami elektrolitów i intensywnością fotosyntezy netto. Obserwacje uzyskane w niniejszej pracy wskazują, że obniżenie aktywności fotochemicznej PSII, związane z zaburzeniem transportu elektronów oraz nagromadzeniem energii wzbudzenia w antenach fotosyntetycznych, prowadzi do powstania reaktywnych form tlenu, których akumulacja jest przyczyną uszkodzeń w dwuwarstwie lipidowej i wycieku elektrolitów z błon komórkowych.

Istotnie statystycznie zmiany w wartości parametrów uzyskanych na podstawie analizy krzywej indukcji fluorescencji OJIP oraz zmiennych charakteryzujących fotochemiczną aktywność fotosystemu II między zastosowanymi reżimami wodnymi potwierdzają zasadność stosowania pomiaru fluorescencji chlorofilu *a* w ocenie fizjologicznej reakcji jęczmienia na stres suszy oraz zróżnicowania genotypowego wrażliwości na deficyt wody. Duży spadek średnich wartości w analizowanej populacji w warunkach stresu suszy odnotowano dla fotochemicznej wydajności kwantowej PSII (Φ_{PSII}), wskaźnika wydajności kwantowej PSII obliczonego na podstawie absorpcji energii (PI_{abs}) i dla parametrów charakteryzujących przepływy energii w przeliczeniu na wzbudzoną powierzchnię liścia. Spadek wartości PI_{abs} wskazuje na zaburzenia reoksydacji puli akceptorów elektronów (Q_A) w błonach tylakoidów chloroplastów podczas stresu suszy (Brestic i Zivcak, 2013). Doniesienia te znajdują potwierdzenie w silnych dodatnich korelacjach między PI_{abs} i liczbą aktywnych centrów reakcji (RC/CS) oraz parametrami wydajności kwantowej transportu elektronów (ϕ_{po} , ψ_o , ϕ_{eo}) obserwowanymi w niniejszej pracy. Ponadto, w warunkach deficytu wody wykazano wzrost ilości energii zaabsorbowanej przez cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na centrum reakcji (ABS/RC), przy jednoczesnym wzroście energii rozproszonej z fotosystemu II (DI_o/RC). Sugeruje to, że na skutek ograniczenia dostępności CO₂, pozostająca w trwale zredukowanym stanie pula Q_A nie może przyjąć elektronów wybitych z cząsteczek chlorofilu w centrach reakcji, co prowadzi do nagromadzenia energii wzbudzenia w antenach fotosyntetycznych, a w konsekwencji do fotoinhibicji. Obniżenie wartości PI_{abs} oraz RC/CS, przy jednoczesnym wzroście ABS/RC, wykazano również dla poddanych stresowi suszy odmian pszenicy (Parihar i Soni, 2016). Dla spadku wartości Φ_{PSII} stwierdzono wyraźną pozytywną korelację z fotochemicznym wygaszaniem fluorescencji (qP) oraz silny ujemny związek z komponentem jej niefotochemicznego tłumienia (qI). Analogiczne wyniki otrzymano na podstawie analizy wpływu stresu suszy na populację RIL słonecznika (Kiani i in.,

2008). Fotochemiczna wydajność kwantowa PSII określa stosunek kwantów wykorzystanych w przemianach fotochemicznych do całkowitej ilości zaabsorbowanego światła. Wygaszanie fotochemiczne związane jest natomiast z szybkością transportu elektronów i określa poziom efektywności przekształcania energii świetlnej na energię wiązań chemicznych (Maxwell i Johnson, 2000). Spadek wartości tych parametrów w stresie suszy sugeruje obniżenie intensywności reakcji karboksylacji w cyklu Calvina-Bensona na skutek redukcji produktywności jasnej fazy fotosyntezy. Nadmiar energii przechwytywanej przez systemy antenowe, która nie może być wykorzystana w fazie ciemnej fotosyntezy, prowadzi do generowania reaktywnych form tlenu. Wzrost niefotochemicznego wygaszania fluorescencji poprzez termiczne rozproszenie nadmiaru wzbudzonej energii świetlnej, będący procesem antagonistycznym do jej fotochemicznego tłumienia, wskazuje na uruchomienie mechanizmu zapobiegającego stresowi oksydacyjnemu powodującemu uszkodzenia komponentów fotosystemu II.

W analizowanej populacji RIL poddanej stresowi suszy stwierdzono zwiększenie liczby negatywnych korelacji fenotypowych między większością parametrów charakteryzujących bilans wodny i wydajność fotosyntezy, a aktywnością dysmutazy ponadtlenkowej (SOD), peroksydazy (POX), γ -tokoferolu oraz δ -tokoferolu, w stosunku do liczby tych korelacji w populacji rosnącej w warunkach kontrolnych. Z obserwacji tej wynika, że w warunkach niedoboru wody, średnie wartości parametrów charakteryzujących aktywność antyoksydantów rosną wraz ze spadkiem wartości parametrów fizjologicznych. Wynik ten świadczy o uruchomieniu podczas stresu suszy kaskady reakcji, mających na celu przeciwdziałanie negatywnym skutkom stresu oksydacyjnego, który jest następstwem powstawania ROS w PSII na skutek nagromadzenia energii wzbudzenia w antenach fotosyntetycznych. Mniejsza liczba negatywnych korelacji między parametrami fizjologicznymi a aktywnością katalazy (CAT), α -tokoferolu, α -tokotrienolu i γ -tokotrienolu, wskazuje na mniejszy udział wymienionych związków chemicznych w obronie komponentów fotosystemów przeciw skutkom szkodliwego działania reaktywnych form tlenu. Wśród wszystkich analizowanych przeciwutleniaczy najwyższy wzrost średnich wartości w stosunku do optymalnych warunków nawodnienia wykazano dla dysmutazy ponadtlenkowej (SOD). Obserwacja ta może sugerować, że O_2^- jest najbardziej toksyczną formą ROS dla jęczmienia w zadanych warunkach stresowych, w stosunku do cząsteczki H_2O_2 , która jest usuwana przez system peroksydaz i katalaz. Zbieżne wyniki uzyskał zespół Huang'a (2013), obserwując wzrost aktywności SOD, POX oraz zawartości proliny i dialdehydu

malonowego (MDA) w tkankach ramii indyjskiej (*Boehmeria nivea* L.) poddanej silnemu stresowi suszy, przy jednoczesnym obniżeniu wartości parametrów charakteryzujących wydajność fotosyntezy. W niniejszej pracy doktorskiej również wykazano wzrost zawartości proliny w liściach siewek populacji MCam w stosunku do warunków optymalnego nawodnienia, przy jednoczesnym zwiększeniu zawartości glukozy, fruktozy oraz sacharozy. Templer wraz z zespołem (2017) na podstawie analizy zawartości metabolitów w panelu kilkudziesięciu genotypów jęczmienia poddanych stresowi suszy w stadium liścia flagowego zaobserwował wzrost aktywności drobnocząsteczkowych antyoksydantów z grupy tokoferoli, wzrost zawartości proliny, cukrów prostych i sacharozy, przy jednoczesnej redukcji zawartości skrobi oraz ufosforylowanych związków węglowych, będących produktami pośrednimi cyklu Calvina-Bensona. Zgodnie z innymi doniesieniami literaturowymi, hydrolityczny rozkład skrobi rekompensuje obniżoną produkcję asymilatów, będącą wynikiem zredukowanej wydajności fotosyntezy podczas stresu suszy. Powstałe w wyniku tego procesu cukry funkcjonują jako osmoprotektanty, pozwalające utrzymać turgor komórek mezofilu, oraz mogą być gromadzone w komórkach szparkowych, regulując stopień ich otwarcia (Couée i in., 2006; Horrer i in., 2016; Thalmann i in., 2016; Zanella i in., 2016). Wśród analizowanych w prezentowanej pracy oligosacharydów odnotowano spadek zawartości rafinozy i maltozy. Obniżenie zawartości rafinozy w tkankach *L. perenne* pod wpływem deficytu wody wykazali również Amiard i in. (2003). Obserwacja ta sugeruje, że oba cukry w stresie suszy mogą ulegać enzymatycznej hydrolizie do cukrów prostych, które w warunkach stresowych prawdopodobnie stanowią bardziej pożądaną formę związków czynnych osmotycznie.

5.3. Lokalizowanie QTL dla cech związanych z reakcją na stres niedoboru wody

Przedmiotem analizy QTL w niniejszej pracy doktorskiej były 43 parametry fizjologiczne i biochemiczne charakteryzujące bilans wody, wydajność procesu fotosyntezy oraz zawartość związków chemicznych, zaangażowanych w odpowiedź na stres suszy w analizowanych genotypach jęczmienia. Z uwagi na złożoność mechanizmów leżących u podstawy odpowiedzi na niedobór wody, nie istnieje zestaw uniwersalnych parametrów pozwalających na ocenę tolerancji stresu suszy. Prezentowane badania obejmują analizę o wiele szerszego panelu wskaźników, niż zostało to udokumentowane w innych opublikowanych do tej pory pracach prowadzonych na jęczmieniu (Tabela 2.1.). Tak szeroki dobór analizowanych

parametrów pozwolił na lepsze powiązanie zdobytej wiedzy, dotyczącej kształtowania się cech fizjologicznych i biochemicznych u roślin rosnących w warunkach deficytu wody z genetyczną odpowiedzią na zaistnienie czynnika stresowego. Po raz pierwszy dla jęczmienia przeprowadzono mapowanie QTL dla aktywności enzymatycznych antyoksydantów i zawartości etylenu oraz niektórych sacharydów zaangażowanych w dostosowanie osmotyczne. Wykonano również o wiele bardziej kompleksową, niż do tej pory, analizę parametrów charakteryzujących wydajność procesu fotosyntezy w warunkach stresu suszy.

Przeprowadzone mapowanie QTL pozwoliło na wykrycie 66 chromosomowych rejonów kontrolujących zmienność 26 spośród analizowanych 43 cech, związanych z reakcją jęczmienia na niedobór wody. Podobne wyniki uzyskali Wójcik-Jagła i in. (2013), którzy spośród trzynastu badanych parametrów fizjologicznych zidentyfikowali 18 QTL dla dziewięciu cech w populacji jęczmienia browarnego oraz 15 QTL dla pięciu cech w populacji jęczmienia paszowego. Z kolei, w genomie soi, wyznaczono 26 QTL dla wszystkich dziesięciu analizowanych parametrów fluorescencji chlorofilu *a* (Yin i in., 2010). Istnieje kilka możliwych przyczyn tłumaczących dlaczego w niniejszej pracy nie zmapowano chromosomowych regionów kontrolujących wszystkie badane cechy. Pierwszym czynnikiem jest wysokość przyjętego krytycznego poziomu istotności statystycznej. W prezentowanych badaniach za wiarygodne uznawano wyłącznie loci cech ilościowych, które wyznaczone zostały dla wartości współczynnika LOD równej lub większej niż 3. Wszystkie QTL, które w mapowaniu interwałowym zidentyfikowane zostały dla niższych wartości testu statystycznego, nie były brane pod uwagę w dalszych analizach. Według doniesień literaturowych tylko te QTL, które wyznaczone zostały przy minimalnej wartości współczynnika LOD równej 3 i kontrolują co najmniej 10% zmienności fenotypowej, mogą być uznawane jako tzw. główne QTL (ang. major QTL) mające największy wpływ na kształtowanie się analizowanej cechy i mogące być przedmiotem MAS lub klonowania pozycyjnego. QTL o niewielkim efekcie fenotypowym, których wkład w wykształcenie badanej cechy jest znikomy, są mało użyteczne w programach hodowlanych mających na celu wyprowadzanie nowych, lepiej przystosowanych do trudnych warunków środowiska odmian (Tuberosa, 2012; Zhang i in., 2017). W prezentowanych badaniach wymagania dla głównego QTL spełnia 95% zidentyfikowanych loci cech ilościowych, przy czym wszystkie QTL wyznaczone dla cech analizowanych w warunkach stresu suszy oraz wskaźników stresu (SI). Do innych przyczyn rzutujących na precyzję mapowania QTL należą: niewystarczająco liczna

populacja mapująca, niewysyczone markerami fragmenty na mapie genetycznej, które nie pozwalają na zidentyfikowanie rzeczywistych QTL oraz zbyt niskie zróżnicowanie fenotypowe między genotypami rodzicielskimi populacji mapującej (Li i in., 2013; Fan i in., 2015).

Liczne publikacje dotyczące mapowania loci cech ilościowych wskazują, że QTL dla różnych cech związanych z odpowiedzią jęczmienia na stres suszy rozmieszczone są w całym genomie (Tabela 2.1.). W niniejszej pracy większość QTL zlokalizowano w chromosomach 2H, 3H i 5H. Żadnego QTL nie znaleziono w chromosomie 4H, natomiast w chromosomie 1H zidentyfikowano tylko jeden locus dla zawartości rafinozy w warunkach optymalnego nawodnienia. Najwięcej loci cech ilościowych kontrolujących ponad 30% zmienności fenotypowej analizowanych cech zmapowano w chromosomie 3H, natomiast w chromosomie 2H zidentyfikowano ponad połowę QTL dla parametrów fenotypowanych w warunkach stresu suszy. W innej pracy dotyczącej jęczmienia również najwięcej QTL zidentyfikowano w chromosomach 2H i 3H dla cech charakteryzujących potencjał plonotwórczy, względną zawartość wody oraz fluorescencję chlorofilu *a* w populacji 137 linii RCSL jęczmienia (ang. recombinant chromosome substitution lines; Mora i in., 2016). Z kolei Wójcik-Jagła i in. (2013), w populacji jęczmienia paszowego zidentyfikowali QTL dla cech charakteryzujących bilans wodny oraz fluorescencję chlorofilu *a* w chromosomach 2H, 4H, 5H i 6H, natomiast w populacji jęczmienia browarnego we wszystkich chromosomach za wyjątkiem 1H. Ponadto wykazali, że loci cech ilościowych wyjaśniających największą część obserwowanej zmienności znajdują się w chromosomach 4H i 5H. Zespół Szira (2011) zidentyfikował liczne QTL dla cech związanych z zawartością wody i potencjałem osmotycznym, morfologią liści i korzeni oraz strukturą plonu we wszystkich chromosomach oprócz 4H. Rozbieżności w proporcji kontrolowanej zmienności oraz w rozmieszczeniu zidentyfikowanych QTL na różnych mapach genetycznych stworzonych dla odmiennych form rodzicielskich wynikają głównie z rodzaju i stopnia ich zróżnicowania genetycznego oraz interakcji genotypowo-środowiskowych. Zhang wraz z zespołem (2017) przeprowadzili dla jęczmienia meta-analizę wszystkich QTL związanych z tolerancją na stesy abiotyczne, zidentyfikowanych przez różnych autorów w latach 1994-2015. Stosując takie samo restrykcyjne kryterium, jak w prezentowanej pracy doktorskiej ($LOD \geq 3$ i $R^2 \geq 10\%$), wyszczególniono 72 główne QTL dla cech warunkujących tolerancję jęczmienia na stres suszy. Najwięcej loci tego typu

zidentyfikowano w chromosomach 2H i 3H, a następnie w 5H i 7H, co jest wynikiem zbieżnym z uzyskanym w niniejszych badaniach.

Wiele doniesień naukowych wskazuje na istnienie regionów na mapach genetycznych, w których dla różnych cech związanych z odpowiedzią na stres suszy zidentyfikowano QTL o pokrywających się przedziałach ufności. Obserwacja ta sugeruje obecność genów warunkujących tolerancję na deficyt wody, niezależnie od tła genetycznego populacji i warunków środowiska (Li i in., 2013; Zhang i in., 2017). Na analizowanej mapie genetycznej również zidentyfikowano kolokalizujące całkowicie lub częściowo przedziały ufności dla QTL kontrolujących różne parametry fizjologiczne i biochemiczne, często w odmiennych wariantach nawodnienia. Ogółem zidentyfikowano 11 hotspotów zlokalizowanych w chromosomach 2H, 3H, 5H, 6H i 7H, grupujących 61% wszystkich zmapowanych loci cech ilościowych. Wynik ten sugeruje plejotropowy efekt genu lub genów zlokalizowanych w regionach tego typu oraz wskazuje na wspólne podłoże genetyczne cech zmapowanych w hotspotach (Kiani i in., 2008). Alternatywnym wytłumaczeniem powyższej obserwacji jest istnienie ścisłego sprzężenia kilku genów, z których każdy kontroluje inną cechę fenotypową (Diab i in., 2004; Szira i in., 2011). W niniejszej pracy nie zidentyfikowano natomiast loci cech ilościowych kontrolujących wykształcenie poszczególnych cech w obu reżimach wodnych, kolokalizujących na mapie genetycznej. Zbliżone wyniki otrzymał Wang i in. (2014), którzy analizowali cechy związane z potencjałem plonotwórczym populacji DH jęczmienia w sześciu różnych środowiskach oraz zespół Mora (2016), który zlokalizował specyficzne dla określonych warunków doświadczenia QTL dla 80% analizowanych cech. Z obserwacji tej wynika, że wszystkie QTL zidentyfikowane w niniejszych badaniach kontrolowane są przez geny, których ekspresja zależna jest od warunków nawodnienia. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki, loci cech ilościowych zidentyfikowane dla poszczególnych parametrów w warunkach kontrolnych wykorzystano jedynie w celu weryfikacji istnienia QTL wpływających na wykształcenie badanych cech, niezależnie od warunków prowadzonego doświadczenia i nie były one przedmiotem dalszych rozważań.

Przeprowadzona analiza kolokalizacji pozycji 64 zmapowanych funkcjonalnych genów kandydackich oraz loci cech ilościowych pozwoliła na identyfikację siedmiu genów w przedziałach ufności dla jedenastu QTL. Marcel i in. (2007), na podstawie mapowania 63 loci DGH (ang. defence gene homologues) wykazujących homologię ze znanymi genami biorącymi udział w odpowiedzi roślin na patogeny, zidentyfikowali 16

genów w przedziałach ufności QTL dla odporności jęczmienia na *Puccinia hordei* Otth. Z kolei, w rejonach chromosomów związanych z reakcją pszenicy na stres suszy zidentyfikowano 19 genów oraz sekwencji dEST z ogółu 43 analizowanych w tym doświadczeniu (Diab i in., 2008). W niniejszej pracy wykazano, że cztery geny o istotnych statystycznie różnicach w ekspresji między odmianami rodzicielskimi populacji M_{Cam}, kolokalizowały z QTL dla cech analizowanych w stresie suszy i dla wskaźników stresu. Były to: AK356764.1, kodujący transketolazę, X71362.1 dla białka z grupy dehydryn oraz AK353596.1 i AK364080.1, kodujące odpowiednio białko o aktywności peroksydazy i proteazę cysteinową. Pozostałe trzy geny, których źródłem były dane literaturowe, zidentyfikowano w przedziałach ufności dla TR₀/RC, DI₀/CS oraz zawartości maltozy w warunkach optymalnego nawodnienia. Można zatem wnioskować, że geny wyselekcjonowane na podstawie danych eksperymentalnych pochodzących z transkryptomu analizowanych odmian jęczmienia, są lepszym źródłem funkcjonalnych genów kandydackich niż te losowo wybrane z dostępnej literatury. Uzasadnieniem tej obserwacji jest fakt, że odpowiedź na stres suszy u często badanych dwuliściennych roślin modelowych może mieć zupełnie inne podłoże genetyczne niż w przypadku jęczmienia.

W ramach niniejszej pracy zidentyfikowano ogółem 33 loci cech ilościowych kontrolujące zmienność badanych parametrów fizjologicznych i biochemicznych w warunkach stresu suszy lub wskaźniki stresu (SI). Dla cech charakteryzujących przebieg procesu fotosyntezy w warunkach niedoboru wody zidentyfikowano ogółem 7 QTL, przy czym pięć w chromosomie 2H oraz po jednym locus w chromosomach 5H i 7H. Jednocześnie, dla wskaźników stresu (SI) parametrów opisujących fotosyntezę wyznaczono 7 QTL, z czego cztery w chromosomie 7H oraz trzy loci w chromosomie 5H. Zidentyfikowane QTL kontrolowały od 13,4 do 20,5% zmienności fenotypowej analizowanych cech. Stwierdzono, że QTL QdABS/RC.2H.2 dla ilości energii zaabsorbowanej przez cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na centrum reakcji (ABS/RC), zmapowany w pobliżu markera SNP 285-2932 oraz QTL QdET₀/RC.2H dla ilości energii wykorzystanej do transportu elektronów w PSII w odniesieniu do RC (ET₀/RC), zlokalizowany w sąsiedztwie genu kandydackiego MLOC_65477, wyznaczone zostały w tych samych regionach chromosomu 2H, co dwa hotspoty dla licznych cech związanych z fluorescencją chlorofilu *a*, zidentyfikowane w dystalnej części długiego ramienia tego chromosomu przez Guo i in. (2008). W korespondującym fragmencie chromosomu 2H wyznaczone zostały również dwa QTL dla wskaźników

stresu fotochemicznej wydajności kwantowej PSII (Φ_{PSII}) oraz współczynnika fotochemicznego wygaszania fluorescencji (qP; Wójcik-Jagła i in., 2013). W niniejszej pracy zaobserwowano, że locus QdETo/RC.2H wyjaśnia największą część obserwowanej zmienności (20,5%) wśród cech charakteryzujących wydajność fotosyntezy w stresie suszy. Kolokalizujący z QTL QdETo/RC.2H na mapie genetycznej MLOC_65477 koduje enzym z grupy peroksydaz, katalizujący reakcję utleniania H_2O_2 . Sens biologiczny jego podwyższonej ekspresji związany jest z mechanizmem usuwania ROS, powstałych w łańcuchu transportu elektronów w celu zapewnienia ciągłości funkcjonowania procesu fotosyntezy.

Innym rejonem na mapie genetycznej, kolokalizującym z QTL dla fluorescencji początkowej (F_0) w chromosomie 7H wyznaczonym przez Guo i in. (2008), jest QTL Qd(1-B)av.7H_2 zmapowany w pobliżu SNP 497-386. Z kolei rejon dla QTL QdsiDLo/RC.5H_2, zlokalizowany w chromosomie 5H niedaleko SNP 4570-591 pokrywał się z przedziałem ufności czterech QTL dla wskaźników stresu wycieku elektrolitów oraz zawartości wody w liściach, zidentyfikowanych przez Wójcik-Jagłę i in. (2013). W prezentowanej pracy, na podstawie analizy kolokalizacji pozycji zmapowanych funkcjonalnych genów kandydackich z przedziałami ufności QTL dla cech związanych z wydajnością fotosyntezy, zidentyfikowano locus MLOC_21703 w rejonie dla QTL QdTRo/RC.2H.1 oraz MLOC_18612 w przedziale mapowym QTL QdsiETo/RC.5H_3. Pozycja MLOC_21703 została wyznaczona w hotspocie qHS2.1 zawierającym także QTL dla zawartości i utraty wody z liścia oraz wskaźnika stresu dla zawartości glukozy. MLOC_21703 jest ortologiem genu AT3G60750 kodującego u *A.thaliana* chloroplastową transketolazę, która jest jednym z enzymów szlaku Calvina-Bensona. Z locus tym powiązано również terminy GO związane z tolerancją na stres zasolenia, z glukoneogenezą oraz transportem wody, co może wskazywać na plejotropowy efekt tego genu. Produktem drugiego z genów (MLOC18612) jest endopeptydaza cysteinowa biorąca udział w degradacji białek. Jego ortolog u *A. thaliana*, AT5G45890 (*senescence-associated gene 12*), koduje białko zaangażowane w proces starzenia się liści, którego aktywność skorelowana jest ze zmianą poziomu auksyny, cytokinin, etylenu oraz cukrów.

Bilans wodny w stresie suszy znalazł się pod kontrolą pięciu QTL w chromosomach 2H, 5H i 7H, tłumaczących od 10,6 do 23,6% zmienności fenotypowej analizowanych cech. Wykazano, że QTL QdsiWC.5H_3 dla SI zawartości wody, zlokalizowany w pobliżu genu kandydackiego X71362.1 oraz QTL QdWL.5H_3 dla

utrąty wody liścia w stresie suszy, zawierający w przedziale ufności marker SNP 3412-579, znajdują się w rejonie mapy genetycznej korespondującym z QTL dla RWC, wyznaczonym przez Teulat'a i in. (2001, 2003), w pobliżu którego autorzy pracy zmapowali dwa geny dla dehydryn *dhn1* i *dhn9*. Obserwacja ta jest zbieżna z wynikiem uzyskanym w ramach prezentowanych badań, ponieważ produktem genu X71362.1, który mapuje się w maksimum krzywej LOD dla wskaźnika stresu zawartości wody w liściach i kontroluje największą część obserwowanej zmienności (23,6%), jest również białko z grupy dehydryn. Dehydryny należą do rodziny białek LEA i gromadzone są w tkankach roślin poddanych różnym stresom abiotycznym. Ich biologiczna rola nie została, jak dotąd, dokładnie poznana, aczkolwiek doniesienia literaturowe wskazują na ich prawdopodobne zaangażowanie w ochronę enzymów, DNA oraz lipidów błon komórkowych przed uszkodzeniami wywołanymi m.in. akumulacją ROS (Graether i Boddington, 2014; Abedini i in., 2017).

Dla cech charakteryzujących zawartość osmoprotektantów i hormonów w stresie suszy, zidentyfikowano ogółem 11 QTL kontrolujących od 12,3 do 85,9% zmienności fenotypowej, w chromosomach 2H, 3H i 5H. Po raz pierwszy dla jęczmienia zlokalizowano loci cech ilościowych dla zawartości maltozy, glukozy, sacharozy i etylenu, których akumulacja w tkankach została indukowana stresem niedoboru wody. Stwierdzono, że QTL QdsiGlu.2H, dla SI zawartości glukozy, zmapowany w pobliżu markera SNP 5880-2547 oraz wyznaczony w hotspotie qHS2.1 wraz z innymi QTL dla WC, WL, TR₀/RC i genem MLOC_21703, kolokalizuje z rejonem chromosomu dla locus zawartości rozpuszczalnych cukrów w stresie suszy wyznaczonym w pełnym turgorze (WSC₁₀₀) przez Diab'a i współpracowników (2004). Najciekawszy wynik otrzymano dla mapowania genetycznych determinantów zawartości proliny, maltozy i sacharozy. Stwierdzono, że sześć QTL wyznaczonych dla zawartości tych cukrów w stresie suszy, zlokalizowanych jest w trzech hotspotach wyznaczonych w dystalnej części długiego ramienia chromosomu 3H. Ponadto, zidentyfikowane QTL kontrolują największą część zmienności fenotypowej wśród wszystkich zmapowanych w niniejszej pracy loci cech ilościowych (54,6-85,9%). Wyznaczony rejon pokrywa się z QTL dla zawartości proliny w warunkach niedoboru wody zidentyfikowanym przez Sayed'a i in. (2012) oraz z locus dla zawartości tego aminokwasu w tkankach jęczmienia poddanych stresowi zasolenia (Fan i in., 2015). Wynik ten wskazuje, że w dystalnym odcinku chromosomu 3H znajduje się gen lub geny kontrolujące zawartość proliny w warunkach różnych stresów abiotycznych, prawdopodobnie wykazujące efekt plejotropowy lub bliskie sprzężenie

z innymi genami dla zawartości sacharydów podczas niedoboru wody. W niniejszej pracy, dla zawartości etylenu podczas niedoboru wody, zidentyfikowano QTL QdEty.2H w pobliżu markera SSR Bmag0692, kolokalizujący na mapie genetycznej z locus dla zawartości proliny w hotspocie qHS2.2. Rola etylenu w stresie suszy nie została dotąd poznana, aczkolwiek badania wskazują na istnienie zależności między obniżeniem wrażliwości aparatów szparkowych na ABA, a podwyższoną zawartością etylenu podczas stresu wywołanego wysokim stężeniem ozonu (Wilkinson i Davies, 2010). Ozon może indukować u roślin stres oksydacyjny, zatem rola etylenu w stresie suszy może wiązać się z regulacją poziomu ROS.

Wykazano, że aktywność antyoksydantów znajduje się pod kontrolą trzech loci cech ilościowych w chromosomach 3H, 6H i 7H, tłumaczących od 16 do 82,1% zmienności fenotypowej. Dla zawartości α - tokoferolu w stresie suszy wyznaczono QTL QdATf.6H w chromosomie 6H. QTL QdsiGTt.3H_2 dla SI zawartości γ -tokotrienolu, zawierający w przedziale ufności marker SNP 265-1229 i kontrolujący aż 82,1% zmienności fenotypowej zawartości tego związku, zmapowany został w hotspocie qHS3.2 wraz z loci cech ilościowych dla zawartości proliny i sacharozy. Obserwacja ta może świadczyć o wspólnej regulacji genetycznej szlaków metabolicznych wymienionych związków. Dla zawartości γ -tokoferolu wyznaczono QTL QdsiGTf.7H_3 zlokalizowany w pobliżu markera SNP 6628-1302. Wykazano, że zidentyfikowany rejon pokrywa się z QTL dla zawartości γ -tokoferolu w warunkach niedoboru wody zmapowanym przez Templer'a i in. (2017), dla którego na podstawie analizy mapy fizycznej jęczmienia wytypowano gen kandydacki MLOC_37476. Locus ten koduje chloroplastowy enzym HPT1 zaangażowany w biosyntezę tokoferolu.

5.4. Identyfikacja pozycyjnych genów kandydackich kontrolujących zmienność analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych w stresie suszy

Jednym z podstawowych wyzwań genetyki roślin jest identyfikacja i izolacja genetycznych determinantów zaangażowanych w wykształcenie istotnych gospodarczo cech dziedziczonych wielogenowo. Większość opublikowanych do tej pory prac bazuje na kolokalizacji przedziałów ufności wyznaczonych QTL z pozycją zmapowanych w tych rejonach markerów genetycznych opartych na polimorfizmie wewnątrzgenowym (Li i in., 2013; de Miguel i in., 2014; Mikołajczak i in., 2016). Wadą podejścia tego typu jest fakt, że wyznaczone geny kandydackie reprezentowane są na mapie genetycznej przez całkowicie losowe markery prezentujące polimorfizm między rodzicami konkretnej

populacji mapującej, które wybrane zostały jedynie na podstawie ich położenia względem QTL, bez analizy funkcjonalnego zaangażowania w wykształcenie analizowanej cechy. Alternatywna strategia, polegająca na weryfikacji kolokalizacji regionów dla QTL i zmapowanych funkcjonalnych genów kandydackich o eksperymentalnie potwierdzonej roli w wykształceniu badanej cechy, ograniczona jest do aktualnie dostępnej wiedzy dotyczącej genetycznych podstaw jej dziedziczenia u roślin modelowych (Bargsten i in., 2014). Niewiele jest doniesień literaturowych, gdzie wykorzystano potencjał płynący z dostępności fizycznej mapy genomu analizowanego gatunku, która pozwala na pozyskanie informacji o wszystkich genach zlokalizowanych w przedziałach ufności wyznaczonych QTL (Fan i in., 2015; Piasecka i in., 2017; Zhang i in., 2017). Czynnikiem najbardziej limitującym ten sposób identyfikacji genów kandydackich jest ogromna liczba loci zlokalizowanych we fragmentach genomu dla zmapowanych QTL, co uniemożliwia ich manualną analizę funkcjonalną. Konieczne jest zatem znalezienie kryterium umożliwiającego sklasyfikowanie wytypowanych genów według największego prawdopodobieństwa ich potencjalnego zaangażowania w wykształcenie analizowanej cechy.

W niniejszej pracy wykorzystano narzędzie wzbogacania terminów Ontologii Genów (ang. GO enrichment) w celu redukcji puli wytypowanych pozycyjnych genów kandydackich. Identyfikowano procesy biologiczne statystycznie nadreprezentowane wśród grup genów dla czterech analizowanych kategorii fenotypowych związanych z tolerancją na stres suszy, w stosunku do częstości ich występowania w genomie jęczmienia. Na podstawie aktualnych doniesień literaturowych wykazano, że znaczenie biologiczne wszystkich terminów GO wytypowanych w oparciu o przeprowadzoną analizę, jest ściśle skorelowane z kształtowaniem się analizowanych cech w kontekście stresu suszy. Można zatem przypuszczać, że geny powiązane z nadreprezentowanymi procesami są z dużym prawdopodobieństwem zaangażowane w wykształcenie analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych w warunkach niedoboru wody. Ogółem, wytypowano 143 loci, co pozwoliło na ośmiokrotną redukcję liczby pozycyjnych kandydatów zidentyfikowanych pierwotnie w przedziałach ufności QTL dla cech skorelowanych ze stresem suszy. Podobny wynik uzyskał zespół Bargsten'a (2014), który dziesięciokrotnie ograniczył liczbę genów kandydackich z przedziałów ufności QTL wytypowanych z bazy danych Gramene u ryżu, dla 153 różnych cech fenotypowych. Analiza wzbogacania terminów Ontologii Genów została z sukcesem zastosowana również w priorytetyzacji pozycyjnych genów kandydackich

zidentyfikowanych w przedziałach ufności QTL dla cech charakteryzujących produktywność, morfologię organów nadziemnych oraz efektywność wykorzystania wody w populacji mieszańców topoli (*Populus spp.*) oraz dla cech związanych z architekturą kwiatostanów u winorośli (*Vitis vinifera* L.; Monclus i in., 2012; Correa i in., 2014).

W niniejszej pracy wykazano, że najwięcej genów zidentyfikowanych w przedziałach ufności QTL dla cech charakteryzujących bilans wodny podczas stresu suszy związanych jest z procesami oksydoredukcyjnymi. Ma to swoje biologiczne uzasadnienie, ponieważ akumulacja reaktywnych form tlenu jest jedną z pierwszych reakcji organizmów roślinnych na odebranie informacji o obniżeniu się potencjału wodnego w komórkach. ROS funkcjonują jako wtórne przekaźniki sygnału o zaistnieniu czynnika stresowego, uruchamiając kaskadę jego transdukcji, która zakończona jest ekspresją genów indukowanych niedoborem wody, m.in. dla enzymów zaangażowanych w biosyntezę hormonów roślinnych oraz regulujących metabolizm osmoprotektantów (Xiong i in., 2002). Jednym z genów kandydackich zidentyfikowanych w tej grupie procesów biologicznych jest MLOC_69302, który koduje peroksydazę askorbinianową. Enzym ten katalizuje reakcję utleniania cząsteczki H_2O_2 , która jest najbardziej stabilną postacią ROS, mogącą z łatwością dyfundować między różnymi kompartmentami komórki (Cruz de Carvalho, 2008). Wykazano, że rośliny *A. thaliana* z mutacją typu *knock-out* w genie *APX1* charakteryzowały się zwiększoną akumulacją nadtlenu wodoru w tkankach oraz większą wrażliwością na stesy abiotyczne, w porównaniu z typem dzikim (Koussevitzky i in., 2008). Innym zidentyfikowanym pozycyjnym kandydatem jest MLOC_4579, będący ortologiem genu AT5G20400 u *A. thaliana*, kodującym białko o aktywności syntazy flawonowej. Flawony są grupą metabolitów wtórnych akumulowanych w tkankach roślin poddanych różnym stresom abiotycznym, o aktywności skorelowanej z usuwaniem negatywnych skutków stresu oksydacyjnego (Nakabayashi i in., 2013). Wykazano zwiększony poziom transkryptu genu AT5G20400 w liniach *A. thaliana* z nadekspresją genu *ARR2* (*RESPONSE REGULATOR 2*) kodującego czynnik transkrypcyjny zaangażowany w ścieżkę sygnalingu etylenu, co wskazuje na udział tego hormonu w regulacji ekspresji genów zaangażowanych w usuwanie ROS (Hass i in., 2004).

Drugim statystycznie nadreprezentowanym procesem biologicznym wśród genów zidentyfikowanych w regionach QTL dla cech opisujących bilans wodny w stresie suszy jest biosynteza kwasów karboksylowych. Wynikiem szczegółowej analizy genów

opisanych przez ten termin GO było wytypowanie locus MLOC_18300 kodującego dioksygenazę 9-cis-epoksykarotenoidową (NCED). U *A. thaliana*, NCED jest kluczowym enzymem zaangażowanym w syntezę kwasu abscysynowego (ABA), uczestniczącym w powstawaniu jego prekursora w ostatnim etapie szlaku zachodzącym w plastydach (Seo i Koshiba, 2002). Kwas abscysynowy reguluje bilans wodny komórek poprzez stymulację pobierania wody przez system korzeniowy, przy jednoczesnym ograniczeniu jej utraty przez liście, wpływając bezpośrednio na zamykanie aparatów szparkowych w odpowiedzi na niedobór wody (Sah i in., 2016).

Innym wytypowanym genem jest MLOC_35821 kodujący aminotransferazę ornitynową. Jego ortolog u *A. thaliana* AT5G46180 zaangażowany jest w katabolizm argininy i ornityny, które są komórkowym źródłem azotu oraz prekursorami dla poliamin i kwasu glutaminowego, będącego substratem reakcji syntezy proliny (Funck i in., 2008). Wykazano, że locus *OsOAT* dla aminotransferazy ornitynowej u ryżu jest genem docelowym dla czynnika transkrypcyjnego SNAC2, a linie z jego nadekspresją charakteryzowały się zwiększoną zawartością proliny oraz aktywnością antyoksydantów w porównaniu z typem dzikim (You i in. 2012). Z kolei, ortolog genu MLOC_53947 u *A. thaliana* koduje chloroplastową podjednostkę dehydrogenazy pirogronianowej uczestniczącej w metabolizmie acetylo-CoA, który jest związkiem wyjściowym do licznych syntez m.in. kwasów tłuszczowych (Johnston i in., 1997; Mentzen i in., 2008). Konsekwencją długotrwałej suszy jest degradacja dwuwarstwy lipidowej oraz zwiększenie jej przepuszczalności dla jonów i związków chemicznych (Farooq i in., 2009). Wzmoczona synteza kwasów tłuszczowych podczas stresu suszy może być jedną z dróg zachowania ciągłości błon komórkowych, w celu zapewnienia równowagi osmotycznej, utrzymania turgoru komórek oraz kontrolowanego transportu substancji.

W wyniku analizy wzbogacania terminów Ontologii Genów, wśród pozycyjnych kandydatów dla aktywności związków zaangażowanych w procesy antyoksydacyjne, zidentyfikowano dwa geny kandydackie MLOC_57100 oraz MLOC_73233, których ortolog AT5G54160 (*AtOMT1*) u *A. thaliana* koduje enzym O-metylotransferazę. Enzymy należące do tej grupy katalizują u roślin metylację atomu tlenu w cząsteczkach wielu metabolitów wtórnych, m.in. flawonoidów oraz alkaloidów i są zaangażowane w syntezę ligniny oraz tolerancję na stresy abiotyczne i biotyczne (Bureau i in., 2007). Akumulację białka OMT wykazano m.in. w korzeniach kukurydzy oraz soi poddanych stresowi suszy, natomiast u winorośli stwierdzono pozytywną korelację między zwiększeniem ilości transkryptu enzymu z grupy O-metylotransferaz i koncentracją

metylowanych antocyjanów (Yamaguchi i in., 2010; Liu i in., 2013; Giordano i in., 2016). Wyniki te sugerują, że aktywność O-metylotransferaz podczas stresu niedoboru wody związana jest z akumulacją metylowanych, zatem bardziej stabilnych, form antyoksydantów. Zaobserwowano, że jeden z wytypowanych genów (MLOC_73233) zmapowany został w hotspocie qHS3.2 dla aktywności γ -tokotrienolu oraz zawartości proliny i sacharozy, co wskazuje na uruchomienie ścieżki metylacji związków chemicznych, będących prawdopodobnie pośrednimi produktami metabolizmu wymienionych antyoksydantów i osmoprotektantów.

Genem kandydackim dla aktywności α - tokoferolu jest MLOC_63263, będący ortologiem locus AT3G47450, który u *A. thaliana* koduje syntazę tlenu azotu (*AtNOS1*). Tlenek azotu jest niskocząsteczkowym, bardzo reaktywnym związkiem chemicznym, który przenikając z łatwością przez błony komórkowe funkcjonuje obok reaktywnych form tlenu jako główny mediator wielu szlaków sygnałowych u roślin (Siddiqui i in., 2011). Zwiększoną akumulację tlenu azotu podczas stresu suszy stwierdzono w liściach i korzeniach tytoniu, grochu, pszenicy oraz pietruszki (*Petroselinum crispum* Mill.; Gould i in., 2003; Kolbert i in., 2005). Rośliny *A. thaliana* niosące mutację w genie *AtNOS1* charakteryzowały się obniżoną zawartością tlenu azotu w tkankach, redukcją stopnia zamknięcia aparatów szparkowych zależną od ABA oraz zahamowanym wzrostem korzeni oraz organów nadziemnych, w porównaniu z typem dzikim (Guo i in., 2003; Bright i in., 2006). Wykazano, że tlenek azotu jest zaangażowany w odpowiedź na stres suszy poprzez regulację ekspresji genów biorących udział m.in. w transdukcji sygnału, transporcie związków chemicznych oraz enzymatycznym unieszkodliwianiu ROS. Wzrost stężenia reaktywnych form tlenu stymuluje syntezę tlenu azotu, który poprzez S-nitrozylację modyfikuje strukturę czynników transkrypcyjnych wiążących się z elementami *cis* sekwencji promotorowych genów dla enzymatycznych antyoksydantów, aktywując proces ich transkrypcji (Palmieri i in., 2008). Można zatem wnioskować, że ekspresja genu lub genów zaangażowanych w szlak syntezy α - tokoferolu u jęczmienia regulowana jest na drodze zależnej od stężenia tlenu azotu.

Najbardziej nadreprezentowaną grupą genów wśród pozycyjnych kandydatów dla cech związanych z funkcjonowaniem procesu fotosyntezy w stresie suszy były białka szoku cieplnego (HSP), których rola polega na stabilizacji struktury innych białek, zapobiegając ich denaturacji oraz agregacji, a także na translokacji i degradacji peptydów uszkodzonych w wyniku oddziaływania czynnika stresowego (Santhanagopalan i in., 2015). Ma to swoje biologiczne uzasadnienie, ponieważ konsekwencją fotoinhibicji oraz

nagromadzenia energii wzbudzenia w antenach fotosyntetycznych wywołanego stresem suszy, jest produkcja w łańcuchu transportu elektronów reaktywnych form tlenu, które wpływają bezpośrednio na uszkodzenia białkowych struktur fotosystemu II. Szczególnie wrażliwymi na degradację komponentami PSII są: enzymatyczny kompleks rozkładający wodę, enzym RuBisCO zaangażowany w asymilację cząsteczek CO₂ w ciemnej fazie fotosyntezy oraz syntaza ATP (Allakhverdiev i in., 2008). Szczegółowa analiza pozwoliła na identyfikację trzech genów MLOC_568, MLOC_31567 oraz MLOC_41281, których ortologiem u *A.thaliana* jest AT5G51440 kodujący białko HSP o masie 20 kDa. Wykazano, że białka z rodziny HSP20 są najliczniej reprezentowaną grupą niezależnych od ATP niskocząsteczkowych chaperonów u roślin. W genomie *A. thaliana* zlokalizowano 19 loci dla HSP20, natomiast odpowiednio 36 i 23 geny zaangażowane są w syntezę tej grupy białek u topoli i ryżu (Lopes-Caitar i in., 2013). Innym zidentyfikowanym locus dla procesów biologicznych związanych z fałdowaniem białek jest MLOC_51927, którego produktem jest zlokalizowana w stromie chloroplastów podjednostka α chaperoniny o masie 60 kDa. Wykazano, że białko to zaangażowane jest w stabilizację kompleksu RuBisCO oraz biogenezę i podział plastydów (Salvucci, 2007; Suzuki i in., 2009). Mutanty *A. thaliana* w genie AT2G28000 (*CPN60A*) charakteryzowały się albinotycznym fenotypem, zahamowanym wzrostem oraz zredukowaną liczbą większych, w stosunku do typu dzikiego, chloroplastów w komórkach.

Interesującym procesem biologicznym nadreprezentowanym w grupie genów kandydackich dla cech charakteryzujących wydajność fotosyntezy w stresie suszy jest asymilacja siarki. Zidentyfikowano trzy geny MLOC_15256, MLOC_19075 i MLOC_38928, których ortologi u *A. thaliana* kodują chloroplastowe ATP sulfurylasy. Liczne doniesienia literaturowe sugerują, że siarka jest ważnym pierwiastkiem wchodzącym w skład wielu związków chemicznych, których synteza skorelowana jest z wystąpieniem stresów abiotycznych (Anjum i in., 2015). ATP sulfurylasy katalizują pierwszy etap reakcji asymilacji siarczanów, polegający na aktywacji SO₄²⁻ z utworzeniem adenozyno-5'-fosfosiarczanu (APS), który w dalszych etapach cyklu redukowany jest do postaci siarczków S²⁻, włączanych do cząsteczki cysteiny. Cysteina jest natomiast jednym z substratów syntezy glutationu, który ze względu na obecność bardzo reaktywnej grupy tiolowej (-SH) uczestniczy w zachowaniu wewnątrzkomórkowej homeostazy redoks oraz w reakcji utleniania reaktywnych form tlenu (Prioretti i in., 2014).

Wynikiem wzbogacania terminów GO wśród genów kandydackich dla cech charakteryzujących proces fotosyntezy, była również identyfikacja kilku loci związanych z percepcją bodźców abiotycznych, regulacją fotoperiodyzmu oraz ścieżką sygnałną indukowaną światłem czerwonym. Zidentyfikowano MLOC_824, który jest ortologiem genu AT1G09570 (*PHYA*), u *A. thaliana* kodującego fitochrom A. Powszechnie wiadomo, że światło jest kluczowym czynnikiem regulującym u roślin procesy fizjologiczne związane m.in. z asymilacją CO₂, kiełkowaniem nasion, wydłużaniem pędu, rozwojem liści, czy też indukcją kwitnienia. Wykazano, że związane z percepcją światła czerwonego barwniki z grupy fitochromów, uczestniczą również w ścieżce odpowiedzi na różne bodźce abiotyczne, aczkolwiek molekularne mechanizmy leżące u podstawy tego procesu pozostają niewyjaśnione (Carvalho i in., 2011). Wykazano, że podwójny mutant *A. thaliana* w genach *phyA* i *phyB* charakteryzuje się zwiększoną wrażliwością na promieniowanie UV-B, czego skutkiem jest obniżenie fotochemicznej aktywności fotosystemu II. Wynik ten sugeruje udział kompleksu fitochromów w mechanizmie zapobiegającym szkodliwym skutkom stresów abiotycznych na wydajność fotosyntezy (Khudyakova i in., 2017). Doniesienia literaturowe wskazują również na udział fitochromów w kontroli zależnego od ABA mechanizmu zamykania aparatów szparkowych oraz regulacji ekspresji genów zaangażowanych w biosyntezę ABA i giberelin, co wskazuje na bezpośredni udział tych fotoreceptorów w odpowiedzi na stres niedoboru wody (Sawada i in., 2008; Boggs i in., 2010). Innymi wyznaczonymi genami związanymi z percepcją światła czerwonego są MLOC_53845 i MLOC_6879, zaangażowane w regulację czasu kwitnienia. Długotrwały okres stresu suszy występujący w generatywnej fazie wzrostu wpływa na zahamowanie rozwoju kwiatów, co w konsekwencji prowadzi do sterylności. Obniżony potencjał wody w fazie wzrostu wegetatywnego jest dla roślin sygnałem o możliwości wystąpienia warunków stresowych w późniejszej fazie cyklu życiowego. Uruchomiona zostaje kaskada reakcji mająca na celu przyspieszenie terminu kwitnienia w celu ucieczki przed suszą i wydania płodnych nasion (Cattivelli i in., 2008). Do czynników wpływających na stymulację ekspresji genów zaangażowanych w przyspieszenie kwitnienia u *A. thaliana* należą m.in. wernalizacja, fotoperiod oraz zawartość giberelin i cukrów, będących produktem fotosyntezy (Kazan i Lyons, 2016). Najważniejszym genem indukującym wejście w fazę generatywną jest *FLOWERING LOCUS T (FT)*, którego produkt białkowy stymuluje ekspresję genów zaangażowanych w podział komórek merystematycznych w celu zapoczątkowania kwitnienia (Turck i in., 2008). Ekspresja genu *FT* jest aktywowana

przez czynnik transkrypcyjny CONSTANS (CO) oraz hamowana przez produkt genu *FLOWERING LOCUS C* (FC). Zidentyfikowany gen MLOC_6879 jest ortologiem genu AT3G24440, kodującego u *A. thaliana* białko niewrażliwe na wernalizację (VIN3), które zaangażowane jest w epigenetyczną represję transkrypcji genu *FC*, przyspieszając tym samym wejście w fazę kwitnienia. Produkt białkowy drugiego z genów (MLOC_53845) jest ortologiem PHYTOCHROME AND FLOWERING TIME 1 (PFT1), który aktywuje ekspresję genu *FT* na drodze zależnej i niezależnej od *CO* (Inigo i in., 2012). Wyniki te sugerują, że obniżenie wydajności fotosyntezy na skutek stresu niedoboru wody zadanego w stadium siewki może być dla roślin istotnym sygnałem dla aktywacji ekspresji genów związanych z indukcją kwitnienia, a zatem skróceniem długości cyklu życiowego i ucieczką przed suszą.

Wśród genów kontrolujących komórkową zawartość osmoprotektantów i hormonów zidentyfikowano wiele nowych loci uczestniczących w biosyntezie różnych związków chemicznych oraz zaangażowanych w regulację sygnalingu hormonów roślinnych. Większość wyznaczonych genów zlokalizowanych jest w hotspotach qHS2.1, qHS2.3 i qHS3.1, co wskazuje na udział ich produktów białkowych w kilku szlakach metabolicznych. Przykładem są: MLOC_174, którego produkt białkowy uczestniczy w transporcie glutationu oraz MLOC_40292 kodujący fosfatazę-3-glicerolu, które są genami kandydackimi dla zawartości proliny oraz maltozy i sacharozy. Zawartość maltozy w stresie suszy została powiązana również z locus MLOC_58506, którego ortolog AT1G29420 u *A. thaliana* koduje małe RNA indukowane auksyną (SMALL AUXIN UPREGULATED RNA 61; SAUR61). Auksyny są grupą hormonów roślinnych zaangażowanych m.in. w procesy wzrostu elongacyjnego i różnicowania się komórek, dominację wierzchołkową, inicjację tworzenia korzeni bocznych oraz ruchy roślin w odpowiedzi na bodźce zewnętrzne. Doniesienia literaturowe wskazują również na udział auksyny w odpowiedzi na różne stresy biotyczne i abiotyczne (Du i in., 2013). Wykazano, że poddane stresowi niedoboru wody linie *A. thaliana* z nadekspresją genu zaangażowanego w syntezę auksyny, charakteryzowały się zwiększoną aktywnością antyoksydantów i zmienną zawartością aminokwasów, cukrów, poliamin oraz alkoholi cukrowych, w porównaniu z typem dzikim. Dodatkowo, zarówno endo- jak i egzogenna auksyna wpływała na zwiększenie ekspresji genów, których aktywność skorelowana jest ze stresem suszy tj. *DREB2A*, *RD22*, czy *RD29A* (Shi i in., 2014). Małe RNA (ang. small RNA) należące do rodziny SAUR kodowane są przez geny wczesnej odpowiedzi na auksynę, aczkolwiek nieznane są ich loci docelowe oraz rola jaką pełnią w sygnalingu

tego hormonu w odpowiedzi na stresy abiotyczne (Wu i in., 2012; Ren i Gray, 2015). Obserwowany spadek zawartości maltozy w analizowanej populacji RIL podczas stresu suszy, może być zatem kontrolowany na drodze wyciszenia ekspresji genów zaangażowanych w syntezę tego cukru przez małe RNA, których obecność w komórce indukowana jest zmianą poziomu auksyny.

Interesującym wynikiem jest identyfikacja dwóch genów: MLOC_65646 i MLOC_22343, których produkty białkowe uczestniczą w metabolizmie związków zawierających atom molibdenu. Locus MLOC_65646 jest ortologiem genu AT5G20990, który u *A. thaliana* koduje białko związane z biosyntezą molibdopteryny, natomiast produktem białkowym genu MLOC_22343, wykazującym dużą homologię sekwencji z AT1G80310, jest transporter tlenków molibdenu. Molibdopteryna oraz molibdeniany są substratami biosyntezy kofaktora molibdenowego, którego biologiczną funkcją jest nadawanie wielu enzymom aktywności oksydoredukcyjnej. Najważniejszymi enzymami docelowymi dla kofaktora molibdenowego są oksydaza aldehydowa, reduktaza azotanowa, dehydrogenaza ksantynowa oraz oksydaza siarczynowa (Mendel, 2013). Oksydaza aldehydowa jest kluczowym enzymem w szlaku biosyntezy ABA, katalizującym jego ostatni etap, polegający na utlenieniu aldehydu abscysynowego. W celu uzyskania pełnej aktywności katalitycznej oksydazy aldehydowej, niezbędna jest modyfikacja kofaktora molibdenowego przez dodanie do jego cząsteczki atomu siarki, co u roślin przeprowadzane jest przez enzym sulfurylazę, kodowany przez gen *LOS5/ABA3* (Bakhsh i Hussain, 2015). Badania wykazały, że linie kukurydzy i soi z nadekspresją genu *LOS5/ABA3* charakteryzowały się redukcją transpiracji, ograniczonym błonowym wyciekami elektrolitów oraz większą aktywnością antyoksydantów i zawartością proliny (Li i in., 2013; Lu i in., 2013). Geny MLOC_65646 i MLOC_22343 zidentyfikowane zostały w przedziałach ufności QTL QdABS/RC.2H.2 dla ilości energii zaabsorbowanej przez cząsteczki chlorofilu anten PSII w przeliczeniu na centrum reakcji oraz QTL QdPro.2H.2 dla zawartości proliny, co pozwala przypuszczać, że spadek wydajności fotosyntezy w stresie suszy indukuje ekspresję genów zaangażowanych w syntezę substratów kofaktora molibdenowego i implikuje zależną od stężenia ABA akumulację proliny.

6. Wnioski

- 1) Zidentyfikowane w pracy 33 loci cech ilościowych (QTL) kontrolujące zmienność 18 parametrów fizjologicznych i biochemicznych w stresie suszy lub wskaźników stresu (ang. SI – stress index), zakwalifikowano jako główne QTL, które mogą być wykorzystane w programach hodowlanych, w celu tworzenia odmian o zwiększonej tolerancji na deficyt wody.
- 2) Po raz pierwszy dla jęczmienia zmapowano QTL dla następujących cech związanych z odpowiedzią na suszę: zawartość etylenu, glukozy, sacharozy, maltozy, rafinozy, α -tokoferolu, γ -tokotrienolu, aktywność katalazy oraz dla niektórych parametrów charakteryzujących wydajność fotosyntezy.
- 3) Zidentyfikowano 11 hotspotów, grupujących 61% wyznaczonych QTL, co sugeruje wspólne podłoże genetyczne analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych zmapowanych w rejonach tego typu lub bliskie sprzężenie kontrolujących je genów.
- 4) W wyniku integracji mapy genetycznej i fizycznej sekwencji genomu jęczmienia wyznaczono 1101 pozycyjnych genów kandydackich, leżących w przedziałach ufności zmapowanych QTL dla warunków stresu suszy lub wskaźników stresu (SI).
- 5) Zastosowana strategia wzbogacania terminów Ontologii Genów (ang. GO enrichment), umożliwiła 8-krotną redukcję puli pozycyjnych kandydatów do grupy 143 genów, o największym prawdopodobieństwie ich potencjalnego zaangażowania w wykształcenie analizowanych cech w warunkach deficytu wody.
- 6) Wśród pozycyjnych genów kandydackich znajduje się 46 ortologów *Arabidopsis thaliana* kodujących m.in. antyoksydanty, enzymy szlaku biosyntezy kwasów organicznych, białka szoku cieplnego, małe RNA indukowane auksyną, syntazę tlenu azotu, ATP sulfurylasy, białka zaangażowane w metabolizm substratów syntezy kofaktora molibdenowego oraz uczestniczące w regulacji czasu kwitnienia.

- 7) Istotny statystycznie spadek średnich wartości większości parametrów fizjologicznych z jednoczesnym wzrostem zawartości cukrów prostych i etylenu oraz aktywności antyoksydantów w liściach siewek badanych genotypów w stresie suszy, w porównaniu do warunków optymalnego nawodnienia, wskazuje na zmianę metabolizmu komórek, nakierowaną na uruchomienie mechanizmów zwiększających adaptację do niekorzystnych warunków wywołanych niedoborem wody.
- 8) Skonstruowana konsensusowa, funkcjonalna mapa genetyczna charakteryzuje się dobrym pokryciem markerami oraz układem loci zgodnym z mapą fizyczną oraz innymi mapami genetycznymi jęczmienia. Ze względu na wysoką rozdzielczość, wynoszącą 1,1 cM, stanowi solidną podstawę do identyfikacji loci cech ilościowych dla różnych cech w warunkach stresu suszy.
- 9) Występowanie markerów o istotnym statystycznie odchyleniu od przewidywanej segregacji alleli 1:1 oraz grup sprzężeń przekraczających haploidalną liczbę chromosomów jęczmienia są prawdopodobnie konsekwencją niskiego stopnia pokrewieństwa form rodzicielskich, pochodzących z odległych rejonów geograficznych oraz presji selekcyjnej faworyzującej allele odmiany europejskiej w trakcie wytwarzania populacji RIL.

7. Literatura

- Abebe, T., A.C. Guenzi, B. Martin and J.C. Cushman. 2003. Tolerance of mannitol-accumulating transgenic wheat to water stress and salinity. *Plant Physiol.* 131: 1748–1755
- Abedini, R., F. GhaneGolmohammadi, R. PishkamRad, E. Pourabed, A. Jafarnezhad, Z.-S. Shobbar and M. Shahbazi. 2017. Plant dehydrins: shedding light on structure and expression patterns of dehydrin gene family in barley. *J. Plant Res.* 130: 747–763
- Agarwal, M., N. Shrivastava and H. Padh. 2008. Advances in molecular marker techniques and their applications in plant sciences. *Plant Cell Rep.* 27: 617–631
- Alexandersson, E., J.A.H. Danielson, J. Rade, V.K. Moparthi, M. Fontes, P. Kjellbom and U. Johanson. 2010. Transcriptional regulation of aquaporins in accessions of *Arabidopsis* in response to drought stress. *Plant J.* 61: 650–660
- Alheit, K.V., J.C. Reif, H.P. Maurer, V. Hahn, E.A. Weissmann, T. Miedaner and T. Würschum. 2011. Detection of segregation distortion loci in triticale (\times *Triticosecale* Wittmack) based on a high-density DArT marker consensus genetic linkage map. *BMC Genomics* 12: 380
- Allakhverdiev, S.I., V.D. Kreslavski, V.V. Klimov, D.A. Los, R. Carpentier and P. Mohanty. 2008. Heat stress: an overview of molecular responses in photosynthesis. *Photosynth. Res.* 98: 541–550
- Amiard, V., A. Morvan-Bertrand, J.P. Billard, C. Huault, F. Keller and M.P. Prud'homme. 2003. Fructans, but not the sucrosyl-galactosides, raffinose and loliose, are affected by drought stress in perennial ryegrass. *Plant Physiol.* 132: 2218–2229
- Anderson, J.A., G.A. Churchill, J.E. Autrique, S.D. Tanksley and M.E. Sorrells. 1993. Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36: 181–186
- Anjum, N.A., R. Gill, M. Kaushik, M. Hasanuzzaman, E. Pereira, I. Ahmad, N. Tuteja and S.S. Gill. 2015. ATP-sulfurylase, sulfur-compounds, and plant stress tolerance. *Front. Plant Sci.* 6: 210
- Anjum, S.A., X. Xie, L. Wang, M.F. Saleem, C. Man and W. Lei. 2011a. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *Afr. J. Agr. Res.* 6: 2026–2032
- Anjum, S.A., L.C. Wang, M. Farooq, M. Hussain, L.L. Xue and C.M. Zou. 2011b. Brassinolide application improves the drought tolerance in maize through

- modulation of enzymatic antioxidants and leaf gas exchange. *J. Agron. Crop Sci.* 197: 177–185
- Babu, R.C., Z. Jingxian, A. Blum, T.H.D. Ho, R. Wue and H.T. Nguyen. 2004. *HVA1*, a LEA gene from barley confers dehydration tolerance in transgenic rice (*Oryza sativa* L.) via cell membrane protection. *Plant Sci.* 166: 855–862
- Bajji, M., J.M. Kinet and S. Lutts. 2002. The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regul.* 36: 61–70
- Baker, N.R. 2008. Chlorophyll fluorescence: a probe of photosynthesis *in vivo*. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 89–113
- Bakhsh, A. and T. Hussain. 2015. Engineering crop plants against abiotic stress: current achievements and prospects. *Emir. J. Food Agric.* 27: 24–39
- Bakshi, M. and R. Oelmüller. 2014. WKRY transcription factors: jack of many trades in plants. *Plant Signal. Behav.* 9: e27700
- Bargsten, J.W., J.P. Nap, G.F. Sanchez-Perez and A.D. van Dijk. 2014. Prioritization of candidate genes in QTL regions based on associations between traits and biological processes. *BMC Plant Biol.* 14: 330
- Bartels, D. and R. Sunkar. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 24: 23–58
- Baum, M., M. von Korff, P. Guo, B. Lakew, S.M. Udupa, H. Sayed, W. Choumane, S. Grando and S. Ceccarelli. 2007. Molecular approaches and breeding strategies for drought tolerance in barley. In: *Genomics-Assisted Crop Improvement*. Varshney, R.K. and R. Tuberosa (Eds.) Springer, Dordrecht. pp. 51–79
- Bélanger, S., I. Clermont, P. Esteves and F. Belzile. 2016. Extent and overlap of segregation distortion regions in 12 barley crosses determined via a Pool-GBS approach. *Theor. Appl. Genet.* 129: 1393–1404
- Biesaga-Kościelniak, J., M. Filek, M. Dziurka, A. Ostrowska, A. Maksymowicz and A. Sierpawska. 2014. Analysis of antioxidant system under abiotic stress. In: *Methodology of system approach to study drought tolerance in barley*. Surma, M. and P. Krajewski (Eds.) Institute of Plant Genetics PAS, Dissertations and Monographs. Institute of Plant Genetics PAS, Poznań
- Boggs, J.Z., K. Loewy, K. Bibee and M.S. Heschel. 2010. Phytochromes influence stomatal conductance plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regul.* 60: 77–81

- Brestic, M. and M. Zivcak. 2013. PSII fluorescence techniques for measurement of drought and high temperature stress signal in crop plants: protocols and applications. In: Molecular stress physiology of plants. Rout, G.R. and A.B. Das (Eds.) Springer, Dordrecht. pp. 87–131
- Bright, J., R. Desikan, J.T. Hancock, I.S. Weir and S.J. Neill. 2006. ABA-induced NO generation and stomatal closure in Arabidopsis are dependent on H₂O₂ synthesis. *Plant J.* 45: 113–122
- Bureau, T., K.C. Lam, R.K. Ibrahim, B. Behdad and S. Dayanandan. 2007. Structure, function, and evolution of plant O-methyltransferases. *Genome* 50: 1001–1013
- Capell, T., L. Bassie and P. Christou. 2004. Modulation of the polyamine biosynthetic pathway in transgenic rice confers tolerance to drought stress. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 101: 9909–9914
- Carrier, G., Y.F. Huang, L. Le Cunff, A. Fournier-Level, S. Vialet, J.-M. Souquet, V. Cheynier, N. Terrier and P. This. 2013. Selection of candidate genes for grape proanthocyanidin pathway by an integrative approach. *Plant Physiol. Biochem.* 72: 87–95
- Carvalho, R.F., M.L. Campos and R.A. Azevedo. 2011. The role of phytochrome in stress tolerance. *J. Integr. Plant Biol.* 53: 920–929
- Cattivelli, L., F. Rizza, F.W. Badeck, E. Mazzucotelli, A.M. Mastrangelo, E. Francia, C. Mare, A. Tondelli and A.M. Stanca. 2008. Drought tolerance improvement in crop plants: an integrated view from breeding to genomics. *Field Crop. Res.* 105: 1–14
- Checker, V.G., A.K. Chhibbar and P. Khurana. 2012. Stress-inducible expression of barley *Hva1* gene in transgenic mulberry displays enhanced tolerance against drought, salinity and cold stress. *Trans. Res.* 21: 939–957
- Cheema, J. and J. Dicks. 2009. Computational approaches and software tools for genetic linkage map estimation in plants. *Brief. Bioinform.* 10: 595–608
- Chen, G., T. Krugman, T. Fahima, K. Chen, Y. Hu, M. Roder, E. Nevo and A. Korol. 2010. Chromosomal regions controlling seedling drought resistance in Israeli wild barley, *Hordeum spontaneum* C. Koch. *Genet. Resour. Crop Evol.* 57: 85–99
- Choudhury, S., P. Panda, L. Sahoo and S.K. Panda. 2013. Reactive oxygen species signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signal. Behav.* 8: e23681
- Close, T.J., P.R. Bhat, S. Lonardi, Y. Wu, N. Rostoks, L. Ramsay, A. Druka, N. Stein, J.T. Svensson, S. Wanamaker, S. Bozdog, M.L. Roose, M.J. Moscou, S. Chao,

- R.K. Varshney, P. Szűcs, K. Sato, P.M. Hayes, D.E. Matthews, A. Kleinhofs, G.J. Muehlbauer, J. DeYoung, D.F. Marshall, K. Madishetty, R.D. Fenton, P. Condamine, A. Graner and R. Waugh. 2009. Development and implementation of high-throughput SNP genotyping in barley. *BMC Genomics* 10: 582
- Collard, B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer and E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196
- Comas, L.H., S.R. Becker, V.M.V. Cruz, P.F. Byrne and D.A. Dierig. 2013. Root traits contributing to plant productivity under drought. *Front. Plant Sci.* 4: 442
- Correa, J., M. Mamani, C. Muñoz-Espinoza, D. Laborie, C. Muñoz, M. Pinto and P. Hinrichsen. 2014. Heritability and identification of QTLs and underlying candidate genes associated with the architecture of the grapevine cluster (*Vitis vinifera* L.). *Theor. Appl. Genet.* 127: 1143–1162
- Couée, I., C. Sulmon, G. Gouesbet and A. El Amrani. 2006. Involvement of soluble sugars in reactive oxygen species balance and responses to oxidative stress in plants. *J. Exp. Bot.* 57: 449–459
- Cruz de Carvalho, M.H. 2008. Drought stress and reactive oxygen species. *Plant Signal. Behav.* 3: 156–165
- Davey, J.W., P.A. Hohenlohe, P.D. Etter, J.Q. Boone, J.M. Catchen and M.L. Blaxter. 2011. Genome-wide genetic marker discovery and genotyping using next-generation sequencing. *Nat. Rev. Genet.* 12: 499–510
- Delorge, I., M. Janiak, S. Carpentier and P.V. Dijck. 2014. Fine tuning of trehalose biosynthesis and hydrolysis as novel tools for the generation of abiotic stress tolerant plants. *Front. Plant Sci.* 5: 147
- de Miguel, M., J.A. Cabezas, N. de María, D. Sánchez-Gómez, M.A. Guevara, M.D. Vélez, E. Sáez-Laguna, L.M. Díaz, J.A. Mancha, M.C. Barbero, C. Collada, C. Díaz-Sala, I. Aranda and M.T. Cervera. 2014. Genetic control of functional traits related to photosynthesis and water use efficiency in *Pinus pinaster* Ait. drought response: integration of genome annotation, allele association and QTL detection for candidate gene identification. *BMC Genomics* 15: 464
- Demidchik, V., D. Straltsova, S.S. Medvedev, G.A. Pozhvanov, A. Sokolik and V. Yurin. 2014. Stress-induced electrolyte leakage: the role of K⁺-permeable channels and involvement in programmed cell death and metabolic adjustment. *J. Exp. Bot.* 65: 1259–1270

- De Ronde, J.A., W.A. Cress, G.H.J. Krüger, R.J. Strasser and J. Van Staden. 2004. Photosynthetic response of transgenic soybean plants, containing an Arabidopsis *P5CR* gene, during heat and drought stress. *J. Plant. Physiol.* 161: 1211–1224
- Diab, A.A., B. Teulat-Merah, D. This, N.Z. Ozturk, D. Benscher and M.E. Sorrells. 2004. Identification of drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags in barley. *Theor. Appl. Genet.* 109: 1417–1425
- Diab, A.A., R.V. Kantety, N.Z. Ozturk, D. Benscher, M.M. Nachit and M.E. Sorrells. 2008. Drought-inducible genes and differentially expressed sequence tags associated with components of drought tolerance in durum wheat. *Sci. Res. Essay* 3: 9–26
- Doyle, J.J. and J.L. Doyle. 1987. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11–15
- Druka, A., E. Potokina, Z. Luo, N. Jiang, X. Chen, M. Kearsey and R. Waugh. 2010. Expression quantitative trait loci analysis in plants. *Plant Biotech. J.* 8: 10–27
- Du, H., N. Wang, F. Cui, X. Li, J. Xiao and L. Xiong. 2010. Characterization of the β -carotene hydroxylase gene *DSM2* conferring drought and oxidative stress resistance by increasing xanthophylls and abscisic acid. *Plant Physiol.* 154: 1304–1318
- Du, H., H. Liu and L. Xiong. 2013. Endogenous auxin and jasmonic acid levels are differentially modulated by abiotic stresses in rice. *Front. Plant Sci.* 4: 397
- Duangpan, S., W. Zhang, Y. Wu, S.H. Jansky and J. Jiang. 2013. Insertional mutagenesis using *Tnt1* retrotransposon in potato. *Plant Physiol.* 163: 21–29
- Fan, Y., S. Shabala, Y. Ma, R. Xu and M. Zhou. 2015. Using QTL mapping to investigate the relationships between abiotic stress tolerance (drought and salinity) and agronomic and physiological traits. *BMC Genomics* 16: 43
- Fang, Y. and L. Xiong. 2015. General mechanisms of drought response and their application in drought resistance improvement in plants. *Cell. Mol. Life Sci.* 72: 673–689
- Farooq, M., A. Wahid, N. Kobayashi, D. Fujita and S.M.A. Basra. 2009. Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agron. Sustain. Dev.* 29: 185–212
- Ferreira, A., M.F. da Silva, L. da Costa e Silva and C.D. Cruz. 2006. Estimating the effects of population size and type on the accuracy of genetic maps. *Genet. Mol. Biol.* 29: 187–192

- Filek, M., J. Biesaga-Kościelniak and M. Dziurka. 2014. Determination of proline, carbohydrates and ethylene content and their role in drought stress in plant. In: Methodology of system approach to study drought tolerance in barley. Surma, M. and P. Krajewski (Eds.) Institute of Plant Genetics PAS, Dissertations and Monographs. Institute of Plant Genetics PAS, Poznań
- Filek, M., M. Łabanowska, J. Kościelniak, J. Biesaga-Kościelniak, M. Kurdziel, I. Szarejko and H. Hartikainen. 2015. Characterization of barley leaf tolerance to drought stress by chlorophyll fluorescence and electron paramagnetic resonance studies. *J. Agron. Crop Sci* 201: 228–240
- Forster, B., W. Thomas and O. Chloupek. 2005. Genetic controls of barley root systems and their associations with plant performance. *Aspects Appl. Biol.* 73: 199–204
- Fujita, Y., M. Fujita, R. Satoh, K. Maruyama, M.M. Parvez, M. Seki, K. Hiratsu, M. Ohme-Takagi, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2005. *AREB1* is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA signaling that enhances drought stress tolerance in Arabidopsis. *Plant Cell* 17: 3470–3488
- Funck, D., B. Stadelhofer and W. Koch. 2008. Ornithine- δ -aminotransferase is essential for arginine catabolism but not for proline biosynthesis. *BMC Plant Biol.* 8: 40
- Gao, Z., X. He, B. Zhao, C. Zhou, Y. Liang, R. Ge, Y. Shen and Z. Huang. 2010. Overexpressing a putative aquaporin gene from wheat, *TaNIP*, enhances salt tolerance in transgenic Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* 51: 767–775
- Gardner, K.A., L. M. Wittern and I. J. Mackay. 2016. A highly recombined, high-density, eight-founder wheat MAGIC map reveals extensive segregation distortion and genomic locations of introgression segments. *Plant Biotechnol. J.* 14: 1406–1417
- Gaxiola, R., J. Li, S. Undurraga, L.M. Dang, G.J. Allen, S.L. Alper and G.R. Fink. 2001. Drought- and salt-tolerant plants result from overexpression of the AVP1 H⁺ pump. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 98: 11444–11449
- Ge, L.F., D.Y. Chao, M. Shi, M.Z. Zhu, J.P. Gao and H.X. Lin. 2008. Overexpression of the trehalose-6-phosphate phosphatase gene *OsTPPI* confers stress tolerance in rice and results in the activation of stress responsive genes. *Planta* 228: 191–201
- Giordano, D., S. Provenzano, A. Ferrandino, M. Vitali, C. Pagliarani, F. Roman, F. Cardinale, S.D. Castellarin and A. Schubert. 2016. Characterization of a multifunctional caffeoyl-CoA O-methyltransferase activated in grape berries upon drought stress. *Plant Physiol. Biochem.* 101: 23–32

- Golldack, D., I. Lüking and O. Yang. 2011. Plant tolerance to drought and salinity: stress regulating transcription factors and their functional significance in the cellular transcriptional network. *Plant Cell Rep.* 30: 1383–1391
- Gould, K.S., O. Lamotte, A. Klinguer, A. Pugin and D. Wendehenne. 2003. Nitric oxide production in tobacco leaf cells: a generalized stress response? *Plant Cell Environ.* 26: 1851–1862
- Górny, A.G. and D. Ratajczak. 2008. Efficiency of nitrogen and phosphorus utilization in progenies of factorial crosses between European and exotic cultivars of spring barley. *J. Appl. Genet.* 49: 349–355
- Graether, S.P. and K.F. Boddington. 2014. Disorder and function: a review of the dehydrin protein family. *Front. Plant Sci.* 5: 576
- Guo, F.Q., M. Okamoto and N.M. Crawford. 2003. Identification of a plant nitric oxide synthase gene involved in hormonal signaling. *Science* 302: 100–103
- Guo, L., Z.Y. Wang, H. Lin, W.E. Cui, J. Chen, M. Liu, Z.L. Chen, L.J. Qu and H. Gu. 2006. Expression and functional analysis of the rice plasma-membrane intrinsic protein gene family. *Cell Res.* 16: 277–286
- Guo, P., M. Baum, R.K. Varshney, A. Graner, S. Grandó and S. Ceccarvelli. 2008. QTLs for chlorophyll and chlorophyll fluorescence parameters in barley under post-flowering drought. *Euphytica* 163: 203–214
- Habu, Y., T. Ando, S. Ito, K. Nagaki, N. Kishimoto, F. Taguchi-Shiobara, H. Numa, K. Yamaguchi, S. Shigenobu, M. Murata, T. Meshi and M. Yano. 2015. Epigenomic modification in rice controls meiotic recombination and segregation distortion. *Mol. Breed.* 35: 103
- Hadiarto, T. and L.S.P. Tran. 2011. Progress studies of drought-responsive genes in rice. *Plant Cell Rep.* 30: 297–310
- Hallingbäck, H.R., J. Fogelqvist, S.J. Powers, J. Turrion-Gomez, R. Rossiter, J. Amey, T. Martin, M. Weih, N. Gyllenstrand, A. Karp, U. Lagercrantz, S.J. Hanley, S. Berlin and A.-C. Rönnerberg-Wästljung. 2016. Association mapping in *Salix viminalis* L. (*Salicaceae*) – identification of candidate genes associated with growth and phenology. *Glob. Change Biol. Bioenergy* 8: 670–685
- Hand, S.C., M.A. Menze, M. Toner, L. Boswell and D. Moore. 2011. LEA proteins during water stress: not just for plants anymore. *Ann. Rev. Physiol.* 73: 115–134
- Hashemi, F.S.G., M.Y. Rafii, M.R. Ismail, M.T.M. Mohamed, H.A. Rahim, M.A. Latif and F. Aslani. 2015. Comparative mapping and discovery of segregation

- distortion and linkage disequilibrium across the known fragrance chromosomal regions in a rice F₂ population. *Euphytica* 204: 557–569
- Hass, C., J. Lohrmann, V.N. Albrecht, U. Sweere, F. Hummel, S.D. Yoo, I. Hwang, T. Zhu, E. Schäfer, J. Kudla and K. Harter. 2004. The response regulator 2 mediates ethylene signalling and hormone signal integration in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 23: 3290–3302
- Hearnden, P.R., P.J. Eckermann, G.L. McMichael, M.J. Hayden, J.K. Eglinton and K.J. Chalmers. 2007. A genetic map of 1,000 SSR and DArT markers in a wide barley cross. *Theor. Appl. Genet.* 115: 383–391
- Hickey, L.T., W. Lawson, G.J. Platz, M. Dieters, V.N. Arief, S. Germán, S. Fletcher, R.F. Park, D. Singh, S. Pereyra and J. Franckowiak. 2011. Mapping *Rph20*: a gene conferring adult plant resistance to *Puccinia hordei* in barley. *Theor. Appl. Genet.* 123: 55–68
- Honsdorf, N., T.J. March, A. Hecht, J. Eglinton and K. Pillen. 2014. Evaluation of juvenile drought stress tolerance and genotyping by sequencing with wild barley introgression lines. *Mol. Breed.* 34: 1475–1495
- Horrer, D., S. Flütsch, D. Pazmino, J.S. Matthews, M. Thalmann, A. Nigro, N. Leonhardt, T. Lawson and D. Santelia. 2016. Blue light induces a distinct starch degradation pathway in guard cells for stomatal opening. *Curr. Biol.* 26: 362–370
- Hu, H., M. Dai, J. Yao, B. Xiao, X. Li, Q. Zhang and L. Xiong. 2006. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 103: 12987–12992
- Hu, H. and L. Xiong. 2014. Genetic engineering and breeding of drought-resistant crops. *Ann. Rev. Plant Biol.* 65: 715–741
- Huang, C., S. Zhao, L. Wang, S.A. Anjum, M. Chen, H. Zhou and C. Zou. 2013. Alteration in chlorophyll fluorescence, lipid peroxidation and antioxidant enzymes activities in hybrid ramie (*Boehmeria nivea* L.) under drought stress. *AJCS* 7: 594–599
- Hura, T., K. Hura, M. Grzesiak and A. Rzepka. 2007. Effect of long-term drought stress on leaf gas exchange and fluorescence parameters in C₃ and C₄ plants. *Acta Physiol. Plant.* 29: 103–113
- Hura, K., B. Jurczyk, A. Ostrowska, M. Rapacz, K. Śniegowska-Świerk, M. Wójcik-Jagła, K. Żmuda, J. Biesaga-Kościelniak and J. Kościelniak. Physiological indicators of drought tolerance in barley. 2014. In: *Methodology of system*

- approach to study drought tolerance in barley. Surma, M. and P. Krajewski (Eds.)
Institute of Plant Genetics PAS, Dissertations and Monographs. Institute of Plant
Genetics PAS, Poznań
- Hutz, J.E., A.T. Kraja, H.L. McLeod and M.A. Province. 2008. CANDID: a flexible
method for prioritizing candidate genes for complex human traits. *Genet.
Epidemiol.* 32: 779–790
- Inigo, S., M.J. Alvarez, B. Strasser, A. Califano and P.D. Cerdán. 2012. PFT1, the
MED25 subunit of the plant mediator complex, promotes flowering through
CONSTANS dependent and independent mechanisms in *Arabidopsis*. *Plant J.* 69:
601–612
- Ipek, A., M. Ipek, S. Ercisli and N.A. Tangu. 2017. Transcriptome-based SNP discovery
by GBS and the construction of a genetic map for olive. *Funct. Integr. Genomics*.
doi:10.1007/s10142-017-0552-1
- Izzah, N.K., J. Lee, M. Jayakodi, S. Perumal, M. Jin, B.S. Park, K. Ahn and T.J. Yang.
2014. Transcriptome sequencing of two parental lines of cabbage (*Brassica
Oleracea* L. var. *capitata* L.) and construction of an EST-based genetic map. *BMC
Genomics* 15: 149
- Jin, X.F., A.S. Xiong, R.H. Peng, J.G. Liu, F. Gao, J.M. Chen and Q.H. Yao. 2009.
OsAREB1, an ABRE-binding protein responding to ABA and glucose, has
multiple functions in *Arabidopsis*. *BMB Rep.* 43: 34–39
- Jaccoud, D., K. Peng, D. Feinstein and A. Kilian. 2001. Diversity arrays: a solid state
technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res.*
29: e25
- Johnston, M.L., M.H. Luethy, J.A. Miernyk and D.D. Randall. 1997. Cloning and
molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* plastid pyruvate dehydrogenase
subunits. *Biochim. Biophys. Acta* 1321: 200–206
- Joung, J., S. Konermann, J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, R.J. Platt, M.D. Brigham,
N.E. Sanjana and F. Zhang. 2017. Genome-scale CRISPR-Cas9 knockout and
transcriptional activation screening. *Nat. Protoc.* 12: 828–863
- Kalaji, H.M., K. Bosa, J. Kościelniak and Z. Hossain. 2011a. Chlorophyll *a* fluorescence
– a useful tool for the early detection of temperature stress in spring barley
(*Hordeum vulgare* L.). *Omics J. Integr. Biol.* 15: 925–934

- Kalaji, H.M., Govindjee, K. Bosa, J. Kościelniak and K. Żuk-Gołaszewska. 2011b. Effects of salt stress on photosystem II efficiency and CO₂ assimilation of two Syrian barley landraces. *Environ. Exp. Bot.* 73: 64–72
- Kang, J., H. Choi, Min-young Im and S.Y. Kim. 2002. Arabidopsis basic leucine zipper proteins that mediate stress-responsive abscisic acid signaling. *Plant Cell* 14: 343–357
- Kano-Nakata, M., R.R. Suralta, J.M. Niones and A. Yamauchi. 2012. Root sampling by using a root box-pinboard method. In: Methodologies for root drought studies in rice. Shashidhar, H.E., A. Henry and B. Hardy (Eds.) International Rice Research Institute. Los Baños, Philippines. pp 3–8
- Kazan, K. and R. Lyons. 2016. The link between flowering time and stress tolerance. *J. Exp. Bot.* 67: 47–60
- Khazaei, H., D.M. O'Sullivan, M.J. Sillanpaa and F.L. Stoddart. 2014. Use of synteny to identify candidate genes underlying QTL controlling stomatal traits in faba bean (*Vicia Faba* L.). *Theor. Appl. Genet.* 127: 2371–2385
- Khudyakova, A.Y., V.D. Kreslavski, G.N. Shirshikova, S.K. Zharmukhamedov, A.A. Kosobryukhov and S.I. Allakhverdiev. 2017. Resistance of *Arabidopsis thaliana* L. photosynthetic apparatus to UV-B is reduced by deficit of phytochromes B and A. *J. Photochem. Photobiol. B.* 169: 41–46
- Kiani, S.P., P. Maury, A. Sarrafi and P. Grieu. 2008. QTL analysis of chlorophyll fluorescence parameters in sunflower (*Helianthus annuus* L.) under well-watered and water-stressed conditions. *Plant Science*: 175: 565–573
- Kianian, S.F. and C.F. Quiros. 1992. Genetic analysis of major multigene families in *Brassica oleracea* and related species. *Genome* 35: 516–527
- Kola, V.S.R.K, P. Renuka, M.S. Madhav and S.K. Mangrauthia. 2015. Key enzymes and proteins of crop insects as candidate for RNAi based gene silencing. *Front. Physiol.* 6: 119
- Kolbert, Z., B. Bartha and L. Erdei. 2005. Generation of nitric oxide in roots of *Pisum sativum*, *Triticum aestivum* and *Petroselinum crispum* plants under osmotic and drought stress. *Acta Biol. Szegediensis* 49: 13–16
- Kooyers, N.J. 2015. The evolution of drought escape and avoidance in natural herbaceous populations. *Plant Sci.* 234: 155–162
- Kotchoni, S.O., C. Kuhns, A. Ditzler, H.H. Kirch and D. Bartels. 2006. Over-expression of different aldehyde dehydrogenase genes in *Arabidopsis thaliana* confers

- tolerance to abiotic stress and protects plants against lipid peroxidation and oxidative stress. *Plant Cell Environ.* 29: 1033–1048
- Koussevitzky, S., N. Suzuki, S. Huntington, L. Armijo, W. Sha, D. Cortes, V. Shulaev and R. Mittler. 2008. Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *J. Biol. Chem.* 283: 34197–34203
- Krzemińska, A. and A.G. Górny. 2003. Genotype dependent variation in the transpiration efficiency of plants and photosynthetic activity of flag leaves in spring barley under varied nutrition. *J. Appl. Genet.* 44: 481–490
- Kumar, J., D.S. Gupta, S. Gupta, S. Dubey, P. Gupta and S. Kumar. 2017. Quantitative trait loci from identification to exploitation for crop improvement. *Plant Cell Rep.* doi: 10.1007/s00299-017-2127-y
- Kurowska, M., A. Daszkowska-Golec, D. Gruszka, M. Marzec, M. Szurman, I. Szarejko and M. Maluszynski. 2011. TILLING – a shortcut in functional genomics. *J. Appl. Genet.* 52: 371–390
- Lander, E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daly, S.E. Lincoln and L. Newburg. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genetics* 1: 174–181
- Lee, I., B. Ambaru, P. Thakkar, E.M. Marcotte and S.Y. Rhee. 2010. Rational association of genes with traits using a genome-scale gene network for *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Biotech.* 28: 149–156
- Li, H., A. Kilian, M. Zhou, P. Wenzl, E. Huttner, N. Mendham, L. McIntyre and R.E. Vaillancourt. 2010. Construction of a high-density composite map and comparative mapping of segregation distortion regions in barley. *Mol. Genet. Genomics* 284: 319–331
- Li, H.W., B.S. Zang, X.W. Deng and X.P. Wang. 2011. Overexpression of the trehalose-6-phosphate synthase gene *OsTPS1* enhances abiotic stress tolerance in rice. *Planta* 234: 1007–1018
- Li, R.Y., Y. Ago, W.J. Liu, N. Mitani, J. Feldmann, S.P. McGrath, J.F. Ma and F.J. Zhao. 2009. The rice aquaporin *Lsi1* mediates uptake of methylated arsenic species. *Plant Physiol.* 150: 2071–2080
- Li, W.T., C. Liu, Y.X. Liu, Z.E. Pu, S.F. Dai, J.R. Wang, X.J. Lan, Y.L. Zheng and Y.M. Wei. 2013. Meta-analysis of QTL associated with tolerance to abiotic stresses in barley. *Euphytica* 189: 31–49

- Liu, D., C. Ma, W. Hong, L. Huang, M. Liu, H. Liu, H. Zeng, D. Deng, H. Xin, J. Song, C. Hu, X. Sun, X. Hou, X. Wang and H. Zheng. 2014. Construction and analysis of high-density linkage map using high-throughput sequencing data. *PLoS ONE* 9: e98855
- Liu, D., R. Hu, K.J. Palla, G.A. Tuskan and X. Yang. 2016. Advances and perspectives on the use of CRISPR/Cas9 systems in plant genomics research. *Curr. Opin. Plant Biol.* 30: 70–77
- Liu, L., G. Sun, X. Ren, C. Li and D. Sun. 2015. Identification of QTL underlying physiological and morphological traits of flag leaf in barley. *BMC Genetics* 16: 29
- Liu, N., G.-Q. Chen, G.-A. Ning, H.-B. Shi, C.-L. Zhang, J.-P. Lu, L.-J. Mao, X.-X. Feng, X.-H. Liu, Z.-Z. Su and F.-C. Lin. 2016. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: an efficient tool for insertional mutagenesis and targeted gene disruption in *Harpophora oryzae*. *Microbiol. Res.* 182: 40–48
- Liu, T., L. Zhang, Z. Yuan, X. Hu, M. Lu, W. Wang and Y. Wang. 2013. Identification of proteins regulated by ABA in response to combined drought and heat stress in maize roots. *Acta Physiol. Plant* 35: 501–513
- Liu, W.Y., M.M. Wang, J. Huang, H.J. Tang, H.X. Lan and H.S. Zhang. 2009. The *OsDHODH1* gene is involved in salt and drought tolerance in rice. *J. Integr. Plant Biol.* 51: 825–833
- Liu, X., L. Guo, J. You, X. Liu, Y. He, J. Yuan, G. Liu, and Z. Feng. 2010. Progress of segregation distortion in genetic mapping of plants. *Res. J. Agron.* 4: 78–83
- Lloyd, J. and D. Meinke. 2012. A comprehensive dataset of genes with a loss-of-function mutant phenotype in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 158: 1115–1129
- Lopes-Caitar, V.S., M.C. de Carvalho, L.M. Darben, M.K. Kuwahara, A.L. Nepomuceno, W.P. Dias, R.V. Abdelnoor and F.C. Marcelino-Guimarães. 2013. Genome-wide analysis of the *Hsp20* gene family in soybean: comprehensive sequence, genomic organization and expression profile analysis under abiotic and biotic stresses. *BMC Genomics* 14: 577
- Lu, Y., Y. Li, J. Zhang, Y. Xiao, Y. Yue, L. Duan, M. Zhang and Z. Li. 2013. Overexpression of *Arabidopsis* molybdenum cofactor sulfurase gene confers drought tolerance in maize (*Zea mays* L.). *PLoS ONE* 8: e52126
- Maffei, M.E., A. Mithöfer and W. Boland. 2007. Before gene expression: early events in plant-insect interaction. *Trends Plant Sci.* 12: 310–316

- Mahdieh, M., A. Mostajeran, T. Horie and M. Katsuhara. 2008. Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant Cell Physiol.* 49: 801–813
- Mammadov, J., R. Aggarwal, R. Buyyarapu and S. Kumpatla. 2012. SNP markers and their impact on plant breeding. *Int. J. Plant Genomics* doi: 10.1155/2012/728398
- Mansour, E., A.M. Casas, M.P. Gracia, J.L. Molina-Cano, M. Moralejo, L. Cattivelli, W.T.B. Thomas and E. Igartua. 2014. Quantitative trait loci for agronomic traits in an elite barley population for Mediterranean conditions. *Mol. Breed.* 33: 249–265
- Marcel, T.C., R.K. Varshney, M. Barbieri, H. Jafary, M.J.D. de Kock, A. Graner and R.E. Niks. 2007. A high-density consensus map of barley to compare the distribution of QTLs for partial resistance to *Puccinia Hordei* and of defence gene homologues. *Theor. Appl. Genet.* 114: 487–500
- Masoudi-Nejad, A., A. Meshkin, B. Haji-Eghrari and G. Bidkhori. 2012. Candidate gene prioritization. *Mol. Genet. Genom.* 287: 679–698
- Maxwell, K. and G.N. Johnson. 2000. Chlorophyll fluorescence – a practical guide. *J. Exp. Bot.* 51: 659–668
- Mendel, R.R. 2013. The molybdenum cofactor. *J. Biol. Chem.* 288: 13165–13172
- Mentzen, W.I., J. Peng, N. Ransom, B.J. Nikolau and E.S. Wurtele. 2008. Articulation of three core metabolic processes in Arabidopsis: fatty acid biosynthesis, leucine catabolism and starch metabolism. *BMC Plant Biol.* 8: 76
- Miao, Y., D. Lv, P. Wang, X.C. Wang, J. Chen, C. Miao and C.P. Song. 2006. An Arabidopsis glutathione peroxidase functions as both a redox transducer and a scavenger in abscisic acid and drought stress responses. *Plant Cell* 18: 2749–2766
- Mikołajczak, K. 2015. Mapowanie loci cech ilościowych związanych z plonowaniem w warunkach niedoboru wody linii rekombinacyjnych jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) segregujących w locus *denso*. Praca doktorska. IGR PAN, Poznań
- Mikołajczak, K., P. Ogrodowicz, K. Gudyś, K. Krystkowiak, A. Sawikowska, W. Frohberg, A. Górny, A. Kedziora, J. Jankowiak, D. Józefczyk, G. Karg, J. Andrusiak, P. Krajewski, I. Szarejko, M. Surma, T. Adamski, J. Guzy-Wróbelska and A. Kuczyńska. 2016. Quantitative trait loci for yield and yield-

- related traits in spring barley populations derived from crosses between European and Syrian cultivars. PLoS ONE 11: e0155938
- Mikołajczak, K., A. Kuczyńska, P. Krajewski, A. Sawikowska, M. Surma, P. Ogrodowicz, T. Adamski, K. Krystkowiak, A.G. Górny, M. Kempa, I. Szarejko, J. Guzy-Wróbelska and K. Gudyś. 2017. Quantitative trait loci for plant height in ‘Maresi’ × CamB barley population and their associations with yield-related traits under different water regimes. J. Appl. Genet. 58: 23–35
- Mir, R.R., M. Zaman-Allah, N. Sreenivasulu, R. Trethowan and R.K. Varshney. 2012. Integrated genomics, physiology and breeding approaches for improving drought tolerance in crops. Theor. Appl. Genet. 125: 625–645
- Møller, I.M., P.E. Jensen and A. Hansson. 2007. Oxidative modifications to cellular components in plants. Ann. Rev. Plant Biol. 58: 459–481
- Monclus, R., E. Dreyer, M. Villar, F.M. Delmotte, D. Delay, J.M. Petit, C. Barbaroux, D.L. Thiec, C. Bréchet and F. Brignolas. 2006. Impact of drought on productivity and water use efficiency in 29 genotypes of *Populus deltoids* x *Populus nigra*. New Phytol. 169: 765–777
- Monclus, R., J.C. Leplé, C. Bastien, P.F. Bert, M. Villar, N. Marron, F. Brignolas and V. Jorge. 2012. Integrating genome annotation and QTL position to identify candidate genes for productivity, architecture and water-use efficiency in *Populus spp.* BMC Plant Biol. 12: 173
- Mora, F., Y.A. Quitral, I. Matus, J. Russell, R. Waugh and A. del Pozo. 2016. SNP-based QTL mapping of 15 complex traits in barley under rain-fed and well-watered conditions by a mixed modeling approach. Front. Plant Sci. 7: 909
- Moreau, Y. and L.-C. Tranchevent. 2012. Computational tools for prioritizing candidate genes: boosting disease gene discovery. Nat. Rev. Genet. 13: 523–536
- Murovec, J. and B. Bohanec. 2012. Haploids and doubled haploids in plant breeding. In: Plant breeding. Abdurakhmonov, I. (Ed.) InTech Europe, Croatia. pp. 87–106
- Nakabayashi, R., K. Yonekura-Sakakibara, K. Urano, M. Suzuki, Y. Yamada, T. Nishizawa, F. Matsuda, M. Kojima, H. Sakakibara, K. Shinozaki, A.J. Michael, T. Tohge, M. Yamazaki and K. Saito. 2013. Enhancement of oxidative and drought tolerance in Arabidopsis by overaccumulation of antioxidant flavonoids 77: 367–379
- Nakashima, K., L-S.P. Tran, D.V. Nguyen, M. Fujita, K. Maruyama, D. Todaka, Y. Ito, N. Hayashi, K. Shinozaki and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Functional

- analysis of a NAC-type transcription factor *OsNAC6* involved in abiotic and biotic stress-responsive gene expression in rice. *Plant J.* 51: 617–630
- Nakashima, K., K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 2014. The transcriptional regulatory network in the drought response and its crosstalk in abiotic stress responses including drought, cold, and heat. *Front. Plant Sci.* 5: 170
- Nayyar, H. and D. Gupta. 2006. Differential sensitivity of C3 and C4 plants to water deficit stress: association with oxidative stress and antioxidants. *Environ. Exp. Bot.* 58: 106–113
- Naz, A.A., M. Arifuzzaman, S. Muzammil, K. Pilen and J. Leon. 2014. Wild barley introgression lines revealed novel QTL alleles for root and related shoot traits in the cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genetics* 15: 107
- Ning, J., X. Li, L. M. Hicks and L. Xiong. 2010. A raf-like MAPKKK gene *DSM1* mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiol.* 152: 876–890
- Noctor, G., A. Mhamdi and C.H. Foyer. 2014. The roles of reactive oxygen metabolism in drought: not so cut and dried. *Plant Physiol.* 164: 1636–1648
- Obsa, B.T., J. Eglinton, S. Coventry, T. March, P. Langridge and D. Fleury. 2016. Genetic analysis of developmental and adaptive traits in three doubled haploid populations of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 129: 1–13
- Ogrodowicz, P., T. Adamski, K. Mikołajczak, A. Kuczyńska, M. Surma, P. Krajewski, A. Sawikowska, A.G. Górny, K. Gudyś, I. Szarejko, J. Guzy-Wróbelska and K. Krystkowiak. 2017. QTLs for earliness and yield-forming traits in the ‘Lubuski’ × CamB barley RIL population under various water regimes. *J. Appl. Genet.* 58: 49–65
- Ouyang, S.Q., Y.F. Liu, P. Liu, G. Lei, S.J. He, B. Ma, W.K. Zhang, J.S. Zhang and S.Y. Chen. 2010. Receptor-like kinase *OsSIK1* improves drought and salt stress tolerance in rice (*Oryza sativa*) plants. *Plant J.* 62: 316–329
- Paina, C., S.L. Byrne, B. Studer, O.A. Rognli, and T. Asp. 2016. Using a candidate gene-based genetic linkage map to identify QTL for winter survival in perennial ryegrass. *PLoS ONE* 11: e0152004
- Palmieri, M.C., S. Sell, X. Huang, M. Scherf, T. Werner, J. Durner and C. Lindermayr. 2008. Nitric oxide-responsive genes and promoters in *Arabidopsis thaliana*: a bioinformatics approach. *J. Exp. Bot.* 59: 177–186
- Parihar, S. and V. Soni. 2016. Biophysical characterization of drought tolerance in wheat

- (*Triticum aestivum* L.) through polyphasic chlorophyll fluorescence OJIP analysis. *Biotech. Res. J.* 2: 48–52
- Pardo-Diaz, C., C. Salazar and C.D. Jiggins. 2015. Towards the identification of the loci of adaptive evolution. *Methods Ecol. Evol.* 6: 445–464
- Park, H.Y., H.Y. Seok, B.K. Park, S.H. Kim, C.H. Goh, B. Lee, C.H. Lee and Y.H. Moon. 2008. Overexpression of *Arabidopsis ZEP* enhances tolerance to osmotic stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 375: 80–85
- Peremarti, A., L. Bassie, C. Zhu, P. Christou and T. Capell. 2010. Molecular characterization of the arginine decarboxylase gene family in rice. *Trans. Res.* 19: 785–797
- Pflieger, S., V. Lefebvre and M. Causse. 2001. The candidate gene approach in plant genetics: a review. *Mol. Breed.* 7: 275–291
- Piasecka, A., A. Sawikowska, A. Kuczynska, P. Ogrodowicz, K. Mikolajczak, K. Krystkowiak, K. Gudys, J. Guzy-Wrobelska, P. Krajewski and P. Kachlicki. 2017. Drought-related secondary metabolites of barley (*Hordeum vulgare* L.) leaves and their metabolomic quantitative trait loci. *Plant J.* 89: 898–913
- Poczai, P., I. Varga, M. Laos, A. Cseh, N. Bell, J.P. Valkonen and J. Hyvonen. 2013. Advances in plant gene-targeted and functional markers: a review. *Plant Meth.* 9: 6
- Potokina, E., A. Druka, Z. Luo, R. Wise, R. Waugh and M. Kearsley. 2008. Gene expression quantitative trait locus analysis of 16000 barley genes reveals a complex pattern of genome-wide transcriptional regulation. *Plant J.* 53: 90–101
- Prioretti, L., B. Gontero, R. Hell and M. Giordano. 2014. Diversity and regulation of ATP sulfurylase in photosynthetic organisms. *Front. Plant Sci.* 5: 597
- Qayyum, A., A. Razzaq, M. Ahmad and M.A. Jenks. 2011. Water stress causes differential effects on germination indices, total soluble sugar and proline content in wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes. *Afr. J. Biotech.* 10: 14038–14045
- Ramamoorthy, R., S.Y. Jiang, N. Kumar, P.N. Venkatesh and S. Ramachandran. 2008. A comprehensive transcriptional profiling of the WRKY gene family in rice under various abiotic and phytohormone treatments. *Plant Cell Physiol.* 49: 865–879
- Ramsay, L., M. Macaulay, S. degli Ivanissevich, K. MacLean, L. Cardle, J. Fuller, K.J. Edwards, S. Tuveesson, M. Morgante, A. Massari, E. Maestri, N. Marmiroli, T. Sjakste, M. Ganal, W. Powell and R. Waugh. 2000. A simple sequence repeat-based linkage map of barley. *Genetics* 156: 1997–2005

- Rawat, N., S.P. Kiran, D. Du, F.G. Gmitter Jr. and Z. Deng. 2015. Comprehensive meta-analysis, co-expression, and miRNA nested network analysis identifies gene candidates in citrus against Huanglongbing disease. *BMC Plant Biol.* 15: 184
- Rehman, S. and T. Mahmood. 2015. Functional role of DREB and ERF transcription factors: regulating stress-responsive network in plants. *Acta Physiol. Plant.* 37: 178
- Ren, H. and W.M. Gray. 2015. SAUR proteins as effectors of hormonal and environmental signals in plant growth. *Mol. Plant* 8: 1153–1164
- Ren, X., D. Sun, G. Sun, C. Li and W. Dong. 2013. Molecular detection of QTL for agronomic and quality traits in a doubled haploid barley population. *AJCS* 7: 878–886
- Rodríguez, E.M., J.T. Svensson, M. Malatrasi, D.W. Choi and T.J. Close. 2005. Barley *Dhn13* encodes a KS-type dehydrin with constitutive and stress responsive expression. *Theor. Appl. Genet.* 110: 852–858
- Rollins, J.A., B. Drosse, M.A. Mulki, S. Grando, M. Baum, M. Singh, S. Ceccarelli and M. von Korff. 2013. Variation at the vernalisation genes *Vrn-H1* and *Vrn-H2* determines growth and yield stability in barley (*Hordeum vulgare*) grown under dryland conditions in Syria. *Theor. Appl. Genet.* 126: 2803–2824
- Ronin, Y., D. Mester, D. Minkov and A. Korol. 2010. Building reliable genetic maps: different mapping strategies may result in different maps. *Natural Sci.* 2: 576–589
- Rostoks, N., S. Mudie, L. Cardle, J. Russell, L. Ramsay, A. Booth, J.T. Svensson, S.I. Wanamaker, H. Walia, E.M. Rodriguez, P.E. Hedley, H. Liu, J. Morris, T.J. Close, D.F. Marshall and R. Waugh. 2005. Genome-wide SNP discovery and linkage analysis in barley based on genes responsive to abiotic stress. *Mol. Gen. Genomics* 274: 515–527
- Sah, S.K., K.R. Reddy and J. Li. 2016. Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Front. Plant Sci.* 7: 571
- Saijo, Y., S. Hata, J. Kyozuka, K. Shimamoto and K. Izui. 2000. Over-expression of a single Ca²⁺-dependent protein kinase confers both cold and salt/drought tolerance on rice plants. *Plant J.* 23: 319–327
- Salgotra, R.K., B.B. Gupta and C.N. Stewart. 2014. From genomics to functional markers in the era of next-generation sequencing. *Biotechnol. Lett.* 36: 417–426
- Salvi, S. and R. Tuberosa. 2005. To clone or not to clone plant QTLs: present and future challenges. *Trends Plant Sci.* 10: 297–304

- Salvucci, M.E. 2007. Association of Rubisco activase with chaperonin-60: a possible mechanism for protecting photosynthesis during heat stress. *J. Exp. Bot.* 59: 1923–1933
- Sanders, G.J. and S.K. Arndt. 2012. Osmotic adjustment under drought conditions. In: *Plant responses to drought stress*. Aroca, R. (Ed.) Springer, Berlin Heidelberg. pp. 199–229
- Santhanagopalan, I., E. Basha, K.N. Ballard, N.E. Bopp and E. Vierling. 2015. Model chaperones: small heat shock proteins from plants. In: *The big book on small heat shock proteins*. Tanguay, R.M. and L.E. Hightower (Eds.) Springer, Berlin Heidelberg. pp. 119–153
- Sato, Y. and S. Yokoya. 2008. Enhanced tolerance to drought stress in transgenic rice plants overexpressing a small heat-shock protein, sHSP17.7. *Plant Cell Rep.* 27: 329–334
- Sato, K. and K. Takeda. 2009. An application of high-throughput SNP genotyping for barley genome mapping and characterization of recombinant chromosome substitution lines. *Theor. Appl. Genet.* 119: 613–619
- Sawada, Y., M. Aoki, K. Nakaminami, W. Mitsuhashi, K. Tatematsu, T. Kushiro, T. Koshihara, Y. Kamiya, Y. Inoue, E. Nambara and T. Toyomasu. 2008. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol.* 146: 1386–1396
- Sayed, M.A., H. Schumann, K. Pillen, A.A. Naz and J. Leon. 2012. AB-QTL analysis reveals new alleles associated to proline accumulation and leaf wilting under drought stress conditions in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Genetics* 13: 61
- Schmalenbach, I., L. Zhang, M. Reymond and J.M. Jimenez-Gomez. 2014. The relationship between flowering time and growth responses to drought in the *Arabidopsis Landsberg erecta* x Antwerp-1 population. *Front. Plant Sci.* 5: 609
- Schneider, K. 2005. Mapping populations and principles of genetic mapping. In: *The Handbook of Plant Genome Mapping*. Meksem, K. and G. Khal (Eds.) WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. pp. 3–21
- Sehgal, D., V. Rajaram, I.P. Armstead, V. Vadez, Y.P. Yadav, C.T. Hash and R.S. Yadav. 2012. Integration of gene-based markers in a *Pearl millet* genetic map for identification of candidate genes underlying drought tolerance quantitative trait loci. *BMC Plant Biol.* 12: 9

- Semagn, K., Å. Bjørnstad and M.N. Ndjioudjop. 2006. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *Afr. J. Biotech.* 5: 2569–2587
- Seo, M. and T. Koshiba. 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends Plant Sci.* 7: 41–48
- Shabala, S. 2011. Physiological and cellular aspects of phytotoxicity tolerance in plants: the role of membrane transporters and implications for crop breeding for waterlogging tolerance. *New Phytol.* 190: 289–298
- Shaik, R. and W. Ramakrishna. 2014. Machine learning approaches distinguish multiple stress conditions using stress-responsive genes and identify candidate genes for broad resistance in rice. *Plant Physiol.* 164: 481–495
- Sharma, S., J.G. Villamor and P.E. Verslues. 2011. Essential role of tissue-specific proline synthesis and catabolism in growth and redox balance at low water potential. *Plant Physiol.* 157: 292–304
- Shen, Q., S.J. Uknes and T.H. Ho. 1993. Hormone response complex in a novel abscisic acid and cycloheximide-inducible barley gene. *J. Biol. Chem.* 268: 23652–23660
- Shi, H., L. Chen, T. Ye, X. Liu, K. Ding and Z. Chan. 2014. Modulation of auxin content in *Arabidopsis* confers improved drought stress resistance. *Plant Physiol. Biochem.* 82: 209–217
- Shinozaki, K. and K. Yamaguchi-Shinozaki. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221–227
- Siddiqui, M.H., M.H. Al-Whaibi and M.O. Basalah. 2011. Role of nitric oxide in tolerance of plants to abiotic stress. *Protoplasma* 248: 447–455
- Sivamani, E., A. Bahieldin, J.M. Wraith, T. Al-Niemi, W.E. Dyer, T.H.D. Ho and R. Qu. 2000. Improved biomass productivity and water use efficiency under water deficit conditions in transgenic wheat constitutively expressing the barley *HVA1* gene. *Plant Sci.* 155: 1–9
- Smirnoff, N. 2007. Ascorbate, tocopherol and carotenoids: metabolism, pathway engineering and functions. In: *Antioxidants and reactive oxygen species in plants*. Smirnoff, N. (Ed.) Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. pp. 53–86
- Smulders, M.J.M., G. Bredemeijer, W. Rus-Kortekaas, P. Arens and B. Vosman. 1997. Use of short microsatellites from database sequences to generate polymorphisms among *Lycopersicon esculentum* cultivars and accessions of other *Lycopersicon* species. *Theor. Appl. Genet.* 94: 264–272
- Stein, N., M. Prasad, U. Scholz, T. Thiel, H. Zhang, M. Wolf, R. Kota, R.K. Varshney,

- D. Perovic, I. Grosse and A. Graner. 2007. A 1,000-loci transcript map of the barley genome: new anchoring points for integrative grass genomics. *Theor. Appl. Genet.* 114: 823–839
- Sunkar, R., A. Kapoor and J.K. Zhu. 2006. Posttranscriptional induction of two Cu/Zn superoxide dismutase genes in *Arabidopsis* is mediated by downregulation of miR398 and important for oxidative stress tolerance. *Plant Cell* 18: 2051–2065
- Suzuki, K., H. Nakanishi, J. Bower, D.W. Yoder, K.W. Osteryoung and S.Y. Miyagishima. 2009. Plastid chaperonin proteins Cpn60 α and Cpn60 β are required for plastid division in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 9: 38
- Szabados, L. and A. Savouré. 2010. Proline: a multifunctional amino acid. *Trends Plant Sci.* 15: 89–97
- Szira, F., A. Borner, K. Neumann, K.Z. Nezhad, G. Galiba and A.F. Balint. 2011. Could EST-based markers be used for the marker-assisted selection of drought tolerant barley (*Hordeum vulgare*) lines? *Euphytica* 178: 373–391
- Szűcs, P., V.C. Blake, P.R. Bhat, S. Chao, T.J. Close, A. Cuesta-Marcos, G.J. Muehlbauer, L. Ramsay, R. Waugh, and P.M. Hayes. 2009. An integrated resource for barley linkage map and malting quality QTL alignment. *Plant Genome* 2: 134–140
- Śróbka, J. 2012. Analiza polimorfizmów markerów SNP oraz zmienności w rozwoju systemu korzeniowego genotypów *Hordeum vulgare* różniących się reakcją na stres niedoboru wody. Praca magisterska. Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski, Katowice
- Taheri, S., T.L. Abdullah, S.M. Jain, M. Sahebi and P. Azizi. 2017. TILLING, high-resolution melting (HRM), and next-generation sequencing (NGS) techniques in plant mutation breeding. *Mol. Breed.* 37: 1–23
- Templer, S.E., A. Ammon, D. Pscheidt, O. Ciobotea, C. Schuy, C. McCollum, U. Sonnewald, A. Hanemann, J. Förster, F. Ordon, M. von Korff and L.M. Voll. 2017. Metabolite profiling of barley flag leaves under drought and combined heat and drought stress reveals metabolic QTLs for metabolites associated with antioxidant defense. *J. Exp. Bot.* 68: 1697–1713
- Tester, M. and P. Langridge. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327: 818–822

- Teulat, B., P. Monneveux, J. Wery, C. Borries, I. Souyris, A. Charrier and D. This. 1997. Relationships between relative water content and growth parameters under water stress in barley: a QTL study. *New Phytol.* 137: 99–107
- Teulat, B., D. This, M. Khairallah, C. Borries, C. Ragot, P. Sourdille, P. Leroy, P. Monneveux and A. Charrier. 1998. Several QTLs involved in osmotic-adjustment trait variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 96: 688–698
- Teulat, B., C. Borries and D. This. 2001. New QTLs identified for plant water-status, water soluble carbohydrate and osmotic adjustment in a barley population grown in a growth-chamber under two water regimes. *Theor. Appl. Genet.* 103: 161–170
- Teulat, B., O. Merah, X. Sirault, C. Borries, R. Waugh and D. This. 2002. QTLs for grain carbon-isotope discrimination in field-grown barley. *Theor. Appl. Genet.* 106: 118–126
- Teulat, B., N. Zoumarou-Wallis, B. Rotter, M.B. Salem, H. Bahri and D. This. 2003. QTL for relative water content in field-grown barley and their stability across Mediterranean environments. *Theor. Appl. Genet.* 108: 181–188
- Thalmann, M., D. Pazmino, D. Seung, D. Horrer, A. Nigro, T. Meier, K. Kölling, H.W. Pfeifhofer, S.C. Zeeman and D. Santelia. 2016. Regulation of leaf starch degradation by abscisic acid is important for osmotic stress tolerance in plants. *Plant Cell* 28: 1860–1878
- The International Barley Genome Sequencing Consortium. 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature* 491: 711–716
- Thudi, M., H.D. Upadhyaya, A. Rathore, P.M. Gaur, L. Krishnamurthy, M. Roorkiwal, S.N. Nayak, S.K. Chaturvedi, P.S. Basu, N.V.P.R. Gangarao, A. Fikre, P. Kimurto, P.C. Sharma, M.S. Sheshashayee, S. Tobita, J. Kashiwagi, O. Ito, A. Killian and R.K. Varshney. 2014. Genetic dissection of drought and heat tolerance in chickpea through genome-wide and candidate gene-based association mapping approaches. *PLoS ONE* 9: e96758
- Tondelli, A., E. Francia, D. Barabaschi, A. Aprile, J.S. Skinner E.J. Stockinger, A.M. Stanca and N. Pecchioni. 2006. Mapping regulatory genes as candidates for cold and drought stress tolerance in barley. *Theor. Appl. Genet.* 112: 445–454
- Tondelli, A., E. Francia, A. Visionsi, J. Comadran, A.M. Mastrangelo, T. Akar, A. Al-Yasin, S. Ceccarelli, S. Grando, A. Benbelkacem, F.A. van Eeuwijk, W.T.B. Thomas, A.M. Stanca, I. Romagosa and N. Pecchioni. 2014. QTLs for barley yield

- adaptation to Mediterranean environments in the ‘Nure’ × ‘Tremois’ biparental population. *Euphytica* 197: 73–86
- Törjék, O., H. Witucka-Wall, R.C. Meyer, M. von Korff, B. Kusterer, C. Rautengarten and T. Altmann. 2006. Segregation distortion in *Arabidopsis* C24/Col-0 and Col-0/C24 recombinant inbred line populations is due to reduced fertility caused by epistatic interaction of two loci. *Theor. Appl. Genet.* 113: 1551–1561
- Trijatmiko, K.R., Supriyanta, J. Prasetyono, M.J. Thomson, C.M. Vera Cruz, S. Moeljopawiro and A. Pereira. 2014. Meta-analysis of quantitative trait loci for grain yield and component traits under reproductive-stage drought stress in an upland rice population. *Mol. Breed.* 34: 283–295
- Tuberosa, R. and S. Salvi. 2006. Genomics-based approaches to improve drought tolerance of crops. *Trends Plant Sci.* 11: 405–412
- Tuberosa, R. 2012. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front. Physiol.* 3: 347
- Turck, F., F. Fornara and G. Coupland. 2008. Regulation and identity of florigen: *FLOWERING LOCUS T* moves center stage. *Annu. Rev. Plant Biol.* 59: 573–594
- Van Dijk, E.L., H. Auger, Y. Jaszczyszyn and C. Thermes. 2014. Ten years of next-generation sequencing technology. *Trends Genet.* 30: 418–426
- Van Ooijen, J.W. and R.E. Voorrips. 2001. JoinMap® 3.0, software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands
- Van Ooijen, J.W. 2004. MapQTL® 5, Software for the mapping of quantitative trait loci in experimental populations. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands
- Varshney, R.K., T.C. Marcel, L. Ramsay, J. Russell, M.S. Röder, N. Stein, R. Waugh, P. Langridge, R.E. Niks and A. Graner. 2007. A high density barley microsatellite consensus map with 775 SSR loci. *Theor. Appl. Genet.* 114: 1091–1103
- Von Korff, M., S. Grandó, A. Del Greco, D. This, M. Baum and S. Ceccarelli. 2008. Quantitative trait loci associated with adaptation to Mediterranean dryland conditions in barley. *Theor. Appl. Genet.* 117: 653–669
- Voorrips, R.E. 2002. MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J. Hered.* 93: 77–78

- Urban, W. 2014. Genotypowanie w populacjach mapujących jęczmienia (*Hordeum vulgare*) loci wykazujących zróżnicowaną ekspresję w warunkach niedoboru wody. Praca magisterska. Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski, Katowice
- Wang, F.Z., Q.B. Wang, S.Y. Kwon, S.S. Kwak and W.A. Su. 2005. Enhanced drought tolerance of transgenic rice plants expressing a pea manganese superoxide dismutase. *J. Plant Physiol.* 162: 465–472
- Wang, J., J. Yang, Q. Jia, J. Zhu, Y. Shang, W. Hua, M. Zhou and C. Li. 2014. A new QTL for plant height in barley (*Hordeum vulgare* L.) showing no negative effects on grain yield. *PLoS ONE* 9: 90144
- Weir, B.S. 1990. Genetic data analysis. Methods for discrete population genetic data. Sinauer Associates, Sunderland, MA
- Wenzl, P., H. Li, J. Carling, M. Zhou, H. Raman, E. Paul, P. Hearnden, C. Maier, L. Xia, V. Caig, J. Ovesná, M. Cakir, D. Poulsen, J. Wang, R. Raman, K.P. Smith, G.J. Muehlbauer, K.J. Chalmers, A. Kleinhofs, E. Huttnerand and A. Kilian. 2006. A high-density consensus map of barley linking DArT markers to SSR, RFLP and STS loci and agricultural traits. *BMC Genomics* 7: 206
- Wilkinson, S. and J. Davies. 2010. Drought, ozone, ABA and ethylene: new insights from cell to plant to community. *Plant. Cell Environ.* 33: 510–525
- Worch, S., K. Rajesh, V.T. Harshavardhan, C. Pietsch, V. Korzun, L. Kuntze, A. Börner, U. Wobus, M.S. Röder and N. Sreenivasulu. 2011. Haplotyping, linkage mapping and expression analysis of barley genes regulated by terminal drought stress influencing seed quality. *BMC Plant Biol.* 11: 1
- Wójcik-Jagła, M., M. Rapacz, M. Tyrka, J. Kościelniak, K. Crissy and K. Żmuda. 2013. Comparative QTL analysis of early short time drought tolerance in Polish fodder and malting spring barleys. *Theor. Appl. Genet.* 126: 3021–3034
- Wu, Y., P.R. Bhat, T.J. Close and S. Lonardi. 2008. Efficient and accurate construction of genetic linkage maps from the minimum spanning tree of a graph. *PLoS Genet.* 4: e1000212
- Wu, J., S. Liu, Y. He, X. Guan, X. Zhu, L. Cheng, J. Wang and G. Lu. 2012. Genome-wide analysis of SAUR gene family in *Solanaceae* species. *Gene* 509: 38–50
- Xiang, Y., Y. Huang and L. Xiong. 2007. Characterization of stress-responsive *CIPK* genes in rice for stress tolerance improvement. *Plant Physiol.* 144: 1416–1428
- Xiang, Y., N. Tang, H. Du, H. Ye and L. Xiong. 2008. Characterization of *OsbZIP23* as a key player of the basic leucine zipper transcription factor family for conferring

- abscisic acid sensitivity and salinity and drought tolerance in rice. *Plant Physiol.* 148: 1938–1952
- Xiao, B., Y. Huang, N. Tang and L. Xiong. 2007. Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions. *Theor. Appl. Genet.* 115: 35–46
- Xiao, B.Z., X. Chen, C.B. Xiang, N. Tang, Q.F. Zhang and L.Z. Xiong. 2009. Evaluation of seven function-known candidate genes for their effects on improving drought resistance of transgenic rice under field conditions. *Mol. Plant* 2: 73–83
- Xing, H.-L., L. Dong, Z.-P. Wang, H.-Y. Zhang, C.-Y. Han, B. Liu, X.-C. Wang and Q.-J. Chen. 2014. A CRISPR/Cas9 toolkit for multiplex genome editing in plants. *BMC Plant Biol.* 14: 327
- Xing, Y. and Q. Zhang. 2010. Genetic and molecular bases of rice yield. *Annu. Rev. Plant Biol.* 61: 421–442
- Xiong, L., B.H. Lee, M. Ishitani, H. Lee, C. Zhang and J.K. Zhu. 2001a. *FIERY1* encoding an inositol polyphosphate 1-phosphatase is a negative regulator of abscisic acid and stress signalling in Arabidopsis. *Genes Dev.* 15: 1971–1984
- Xiong, L., Z. Gong, C.D. Rock, S. Subramanian, Y. Guo, W. Xu, D. Galbraith and J.K. Zhu. 2001b. Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Dev. Cell* 1: 771–778
- Xiong, L., K.S. Schumaker and J.K. Zhu. 2002. Cell signaling during cold, drought, and salt stress. *Plant Cell* 14: 165–183
- Xiong, L. and Y. Yang. 2003. Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 15: 745–759
- Xu, W., F. Zhang, Y. Luo, L. Ma, X. Kou and K. Huang. 2009a. Antioxidant activity of a water-soluble polysaccharide purified from *Pteridium aquilinum*. *Carbohydr. Res.* 344: 217–222
- Xu, Y., L. Zhu, J. Xiao, N. Huang and S.R. McCouch. 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F₂, backcross, doubled haploid, and recombinant inbred populations in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 253: 535–545
- Xu, Y.F., S.S. Li, L.H. Li, F.F. Ma, X.Y. Fu, Z.L. Shi, H.X. Xu, P.T. Ma and D.G. An. 2017. QTL mapping for yield and photosynthetic related traits under different water regimes in wheat. *Mol. Breed.* 37: 34

- Xu, Z.S., Z.Y. Ni, Z.Y. Li, L.C. Li, M. Chen, D.Y. Gao, X.D. Yu, P. Liu and Y.Z. Ma. 2009b. Isolation and functional characterization of *HvDREB1* – a gene encoding a dehydration-responsive element binding protein in *Hordeum vulgare*. *J. Plant Res.* 122: 121–130
- Xue, G.P. and C.W. Loveridge. 2004. *HvDRF1* is involved in abscisic acid-mediated gene regulation in barley and produces two forms of AP2 transcriptional activators, interacting preferably with a CT-rich element. *Plant J.* 37: 326–339
- Yamaguchi, M., B. Valliyodan, J. Zhang, M.E. Lenoble, O. Yu, E.E. Rogers, H.T. Nguyen and R.E. Sharp. 2010. Regulation of growth response to water stress in the soybean primary root. I. Proteomic analysis reveals region-specific regulation of phenylpropanoid metabolism and control of free iron in the elongation zone. *Plant Cell Environ.* 33: 223–243
- Yin, Z., F. Meng, H. Song, X. He, X. Xu and D. Yu. 2010. Mapping quantitative trait loci associated with chlorophyll *a*. *Planta* 231: 875–885
- You, J., H. Hu and L. Xiong. 2012. An ornithine δ -aminotransferase gene *OsOAT* confers drought and oxidative stress tolerance in rice. *Plant Sci.* 197: 59–69
- You, J., W. Zong, H. Du, H. Hu and L. Xiong. 2014. A special member of the rice SRO family, *OsSRO1c*, mediates responses to multiple abiotic stresses through interaction with various transcription factors. *Plant Mol. Biol.* 84: 693–705
- Yoshida, Y., T. Nanjo, S. Miura, K. Yamaguchi-Shinozaki and K. Shinozaki. 1999. Stress-responsive and developmental regulation of *Delta(1)-pyrroline-5-carboxylate synthetase 1 (P5CS1)* gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 261: 766–772
- Yu, S., C. Ligang, Z. Liping and Y. Diqui. 2010. Overexpression of *OsWRKY72* gene interferes in the abscisic acid signal and auxin transport pathway of *Arabidopsis*. *J. Biosci.* 35: 459–471
- Yu, Y., D. Yang, S. Zhou, J. Gu, F. Wang, J. Dong and R. Huang. 2017. The ethylene response factor OsERF109 negatively affects ethylene biosynthesis and drought tolerance in rice. *Protoplasma* 254: 401–408
- Zanella, M., G.L. Borghi, C. Pirone, M. Thalmann, D. Pazmino, A. Costa, D. Santelia, P. Trost and F. Sparla. 2016. β -amylase 1 (BAM1) degrades transitory starch to sustain proline biosynthesis during drought stress. *J. Exp. Bot.* 67: 1819–1826

- Zhang, C.Y., N.N. Wang, Y.H. Zhang and Q.Z. Feng. 2013. DNA methylation involved in proline accumulation in response to osmotic stress in rice (*Oryza sativa*). Genet. Mol. Res. 12: 1269–1277
- Zhang, X., S. Shabala, A. Koutoulis, L. Shabala and M. Zhou. 2017. Meta-analysis of major QTL for abiotic stress tolerance in barley and implications for barley breeding. Planta 245: 283–295
- Zhu, B.C., J. Su, M.C. Chan, D.P.S. Verma, Y.L. Fan and R. Wu. 1998. Over-expression of a *Δ-pyrroline-5-carboxylate synthetase* gene and analysis of tolerance to water-stress and salt-stress in transgenic rice. Plant Sci. 139: 41–48
- Zhu, M. and S. Zhao. 2007. Candidate gene identification approach: progress and challenges. Int. J. Biol. Sci. 3: 420–427

8. Streszczenie

Susza jest jednym z najgroźniejszych stresów środowiskowych ograniczających prawidłowy wzrost i rozwój roślin oraz głównym czynnikiem powodującym straty w rolnictwie. Wśród zbóż, czwartą pozycję na świecie pod względem wielkości produkcji rolnej zajmuje jęczmień zwyczajny (*Hordeum vulgare* L.), który ze względu na duże zdolności adaptacyjne jest chętnie uprawiany w niesprzyjających warunkach klimatycznych. Rośliny na drodze ewolucji wykształciły wiele różnych strategii pozwalających na ich przystosowanie do okresowego niedoboru wody w glebie. Identyfikacja molekularnych mechanizmów kontrolujących zmienność cech w warunkach stresu suszy jest trudna ze względu na złożony, ilościowy charakter dziedziczenia tolerancji na deficyt wody, będący wynikiem łącznej ekspresji wielu genów o niewielkich efektach fenotypowych.

Prezentowane badania przedstawiają kompleksowe podejście do poznania molekularnych podstaw tolerancji jęczmienia na stres suszy, obejmujące skonstruowanie wysokorozdzielczej mapy genetycznej markerów SNP i SSR, na której zlokalizowano funkcjonalne geny kandydackie oraz rejony QTL dla parametrów fizjologicznych i biochemicznych, związanych z odpowiedzią na deficyt wody. Otrzymaną mapę genetyczną zintegrowano z fizyczną sekwencją genomu w celu identyfikacji nowych, nie badanych dotąd u jęczmienia, genów w przedziałach ufności wyznaczonych loci cech ilościowych.

W pierwszym etapie badań stworzono konsensusową mapę genetyczną dla trzech populacji mapujących RIL, otrzymanych w wyniku krzyżowania odmian europejskich z syryjskimi liniami hodowlanymi i zlokalizowano na niej 64 jęczmienne ortologi genów białek regulatorowych oraz funkcjonalnych, związanych z odpowiedzią na stres suszy u gatunków modelowych, oraz geny wyróżnione na podstawie analizy transkryptomów genotypów wykorzystanych w pracy. Skonstruowana mapa o długości 941,86 cM, zawierała ogółem 875 loci z rozdzielczością 1,1 cM i składała się z 13 grup sprzężeń, co związane było z wystąpieniem regionów genomu grupujących markery wykazujące odchylenia od oczekiwanego wzoru segregacji alleli 1:1, wyraźnie oddzielonych od sąsiadujących segmentów chromosomów. Zidentyfikowano 66 loci cech ilościowych kontrolujących zmienność 26 parametrów fizjologicznych i biochemicznych, charakteryzujących bilans wodny, wydajność procesu fotosyntezy, zawartość osmoprotektantów i hormonów oraz aktywność antyoksydantów u badanych genotypów.

Po raz pierwszy dla jęczmienia zmapowano QTL dla takich cech jak: zawartość etylenu, glukozy, sacharozy, maltozy, rafinozy, α -tokoferolu, γ -tokotrienolu, aktywność katalazy oraz dla niektórych parametrów charakteryzujących przebieg procesu fotosyntezy. Wśród zidentyfikowanych loci cech ilościowych, opisano 33 QTL dla 18 cech fizjologicznych i biochemicznych w stresie suszy lub wskaźników stresu (ang. SI - stress index), przy czym wszystkie loci zakwalifikowano jako tzw. główne QTL, wyjaśniające co najmniej 10% obserwowanej zmienności cech. Zmapowane loci cech ilościowych charakteryzowały się tendencją do grupowania w określonych regionach genomu. Wyznaczono 11 hotspotów, zawierających 61% wszystkich zidentyfikowanych QTL, o całkowicie bądź częściowo pokrywających się przedziałach ufności, z czego aż cztery w chromosomie 2H. Występowanie hotspotów sugeruje wspólne podłoże genetyczne analizowanych cech fizjologicznych i biochemicznych, zmapowanych w rejonach tego typu lub bliskie sprzężenie kontrolujących je genów. Integrację mapy genetycznej i fizycznej przeprowadzono na podstawie pozycji w genomie jęczmienia markerów definiujących początek i koniec przedziałów ufności wyznaczonych QTL. Zidentyfikowano 1101 pozycyjnych genów kandydackich we fragmentach genomu, odpowiadających rejonom QTL kontrolującym wykształcenie badanych cech w stresie suszy. W wyniku analizy wzbogacania terminów Ontologii Genów (ang. GO enrichment), pulę tę zredukowano do 143 genów powiązanych z procesami biologicznymi istotnie nadreprezentowanymi w grupach genów dla cech charakteryzujących bilans wodny, wydajność procesu fotosyntezy, zawartość osmoprotektantów i hormonów oraz aktywność antyoksydantów, w stosunku do częstości ich występowania w genomie jęczmienia. Wyróżniono geny kodujące m.in. antyoksydanty, enzymy szlaku biosyntezy kwasów organicznych, białka szoku cieplnego, małe RNA indukowane auksyną, syntazę tlenu azotu, ATP sulfurylasy, białka zaangażowane w metabolizm substratów syntezy kofaktora molibdenowego oraz uczestniczące w regulacji czasu kwitnienia.

9. Summary

Drought is one of the most adverse abiotic stresses limiting plant growth and development, as well as the major factor influencing yield loss. Among cereals, barley (*Hordeum vulgare* L.) is ranked fourth in terms of harvested acreage and as a staple food is attracting renewed attention, because of its wide adaptation to the harsh environments. Plants have evolved various mechanisms to cope with water deficit at different biological levels. However, there is an enormous challenge to decipher molecular mechanisms influencing particular complex phenotypic traits under water-limiting conditions due to polygenic inheritance controlled by several genes of small effects.

The presented research shows a comprehensive approach for elucidation of molecular basis of drought tolerance in barley. The study includes construction of high-density SNP and SSR-based genetic map with positioned functional candidate genes (CGs), mapping of QTLs for physiological and biochemical traits associated with drought tolerance, projection of QTL confidence intervals on physical barley genome map, and the retrieval of positional CGs, followed by Gene Ontology (GO) enrichment analysis.

The genetic consensus map was constructed using three RIL populations, developed from the crosses between European cultivars and Syrian breeding lines, and was enriched with 64 genes, encoding barley orthologues of functional and regulatory drought tolerance-related genes described in model species, as well as the genes derived from the transcriptome analysis of parental genotypes of the study, performed under water deficit conditions. The genetic map spans 941.86 cM with resolution of 1.1 cM and contains 875 loci clustered into 13 linkage groups, as a result of presence of the genomic regions with markers exhibited significant segregation distortion, clearly separated from neighboring chromosome segments. A total of sixty-six QTLs for 26 physiological and biochemical traits that describe water relations, photosynthetic efficiency, content of osmoprotectants and hormones, and activity of antioxidants, were identified. For the first time, QTLs for ethylene, glucose, sucrose, maltose, raphinose, α -tocopherol, γ -tocotrienol content, catalase activity, and various photosynthetic parameters have been mapped in barley. All of the 33 detected QTLs for 18 physiological and biochemical parameters under drought conditions and stress indices (SI) were a major QTLs with the value of phenotypic variance exceeding 10%. The mapped QTLs tended to be clustered in particular chromosome regions. Based on overlapping confidence intervals of QTLs, 11 hotspots were identified that enclosed 61% of mapped QTLs. Four of them were

localized in chromosome 2H. The existence of hotspots suggests a common genetic background of analyzed physiological and biochemical traits mapped in these regions or presence of closely linked genes that control them. The genetic and physical map integration was based on the position of markers defining boundaries of QTL confidence intervals in barley genome and allowed the identification of 1101 positional CGs within the chromosomal regions of drought-specific QTLs. The GO enrichment resulted in the designation of 143 CGs potentially involved in Biological Processes (BP) significantly over-represented in the gen sets associated with water relations, photosynthetic efficiency, content of osmoprotectants and hormones, and activity of antioxidants, compared with the genome-wide background frequency. Among them were genes encoding antioxidants, carboxylic acid biosynthesis enzymes, heat shock proteins, small auxin upregulated RNAs, nitric-oxide synthase, ATP sulfurylases, and proteins involved in the metabolism of molybdenum cofactor synthesis substrates as well as regulation of flowering time.

10. Aneksy

Aneks 1. Składy zastosowanych odczynników

Tabela 10.1. Skład buforu ekstrakcyjnego C-TAB (100 ml)

Składniki	Ilość
C-TAB	2 g
Tris HCl 1 M pH=8	10 ml
EDTA 0,5 M	4 ml
NaCl 5M	28 ml
Dodać tuż przed użyciem: β-mercaptoethanol	1 ml

Tabela 10.2. Skład buforu TE (100 ml)

Składniki	Ilość
Tris HCl 1M pH=8	1 ml
EDTA 0,5 M	200 µl

Tabela 10.3. Skład mieszaniny żelowej dla 6% denaturujących żeli poliakrylamidowych (20 ml)

Składniki	Ilość
Mocznik	8,4 g
10 x TBE	2,0 ml
30% AA (akrylamid/bisakrylamid)	4,0 ml
ddH ₂ O	do 20,0 ml
Dodać tuż przed wylaniem: TEMED	15,0 µl
10% APS (nadsiaczyn amonu)	150,0 µl

Tabela 10.4. Skład buforu 10 x TBE (1 l)

Składniki	Ilość
Tris	162 g
Kwas borowy	27,5 g
EDTA	9,3 g
ddH ₂ O	do 1 l

Tabela 10.5. Skład buforu do ładowania z formamidem, tzw. „stop bufor” (10 ml)

Składniki	Ilość
Formamid (Sigma)	8,8 ml
Bromophenol Blue/Xylene Cyanol (Sigma)	1 ml
EDTA 0,5 M pH=8	200 µl

Tabela 10.6. Skład buforu do ładowania z sacharozą (5 ml)

Składniki	Ilość
Bromophenol Blue/Xylene Cyanol (Sigma)	0,2 ml
Sacharoza (Sigma)	2 g
ddH ₂ O	4,8 ml

Aneks 2. Sekwencje starterów, chromosomowa lokalizacja oraz jakość markerów SSR

Tabela 10.7.

Chromosom	Nazwa markera	Program PCR	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Jakość	Uwagi
1H	GMS021	scssr-51	CTATCACACGACGCAACATG	CCTGAGAAAGAAAGCGCAAC	słaba	skomplikowany wzór prążkowy
1H	Bmac0399	ssr-51	CGATGCTTTACTATGAGAGGT	GGGTCTGAAGCCTGAAC	bardzo dobra	
1H	Bmac0213	SSR-F	ATGGATGCAAGACCAAAC	CTATGAGAGGTAGAGCAGCC	bardzo dobra	
1H	Bmag0872	SSR-I	ATGTACCATTACGCATCCA	GAAATGTAGAGATGGCACTTG	bardzo dobra	
1H	Bmag0347	SSR-E	CTGGGATTGGATCACTCTAA	AAAACAAGTACTGAAAATAGGAGA	bardzo dobra	
1H	EBmac0656	SSR-F	TAGACCTCATGCTCATGG	GTATGTGTAGGTGTAGGAATGC	bardzo dobra	
1H	Bmag0345	SSR-F	ATGAGGAATAACTCAACCAAA	AATATATTTTCGATGTCGAGC	bardzo dobra	
1H	GBM1412	GBM-MOD	TCGACACAGATAGACAGGCG	GACGGAGCCAACCAATAAAA	bardzo dobra	
1H	Bmag0211	SSR-F	ATTCATCGATCTTGTATTAGTCC	ACATCATGTGCGATCAAAGC	bardzo dobra	
1H	Bmag0770	SSR-I	AAGCTCTTTCTTGTATTCGTG	GTCCATACTCTTTAACATCCG	bardzo dobra	
1H	GBM1234	GBM-MOD	TTCTTCTGACGGCGCTTATT	TATGGGTACCCGCACTTAGC	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
1H	GBM1336	GBM-MOD	ACTTCTATGGCGCGTAATGC	TACACGCCCAAACAAGTCCT	bardzo dobra	
1H	GBM1216	GBM-MOD	ATGGACGGATGCTACTCCAC	TTGATTGGCTTACCTGAGCA	bardzo dobra	
1H	EBmac0501	SSR-F	ACTTAAAGTGCCATGCAAAG	AGGGACAAAAATGGCTAAG	bardzo dobra	
1H	EBmac0695	SSR-E	AGTTGGTGACAGCCAAATA	ATCCTAAGACACATTTGCACT	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
1H	HVM20	SSR-A	CTCCACGAATCTCTGCACAA	CACCGCCTCCTCTTTCAC	bardzo dobra	
1H	GBM1334	GBM-59	CCTCTTCCGAATCCATCAAA	GAGTTGGGGACTTTGCTGAC	bardzo dobra	
1H	Bmac0063	SSR-E	AAACATGCACGTCACCTAC	ACAACCACTGCATGAACAT	bardzo dobra	
1H	Bmac0032	SSR-D	CCATCAAAGTCCGGCTAG	GTCGGGCCTCATACTGAC	bardzo dobra	
1H	GBM1411	GBM-MOD	TGCTCTACAAACCGCTGATG	CGGAGTTCAGTTCAGACCGT	bardzo dobra	
1H	Bmac0154	ssr-51	CTGGGTGATGAATAGAGTTTC	TATTCCTCAAAGATGTTCTGC	bardzo dobra	
1H	GBM1143	GBM-MOD	TCCAACGGCACTAGCAATTT	GAAAATATGAAGGCGGACCA	bardzo dobra	
1H	GBM5162	GBM-MOD	GCCGTCTCCGACTACTTGC	CCGTAACCTGAACCAGAGGA	bardzo dobra	
1H	GBM1272	GBM-MOD	CCGTCCAAAGGGTTTGTATT	CTCTGTAAAGGGAGGCAACG	bardzo dobra	
1H	Bmag0382	SSR-F	TGAAACCCATAGAGAGTGAGA	TCAAAGTTTCGTCCAAATA	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
1H	HVHVA1	SSR-E	CATGGGAGGGGACAACAC	CGACCAAACACGACTAAAGGA	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy

Tabela 10.7. cd.

Chromosom	Nazwa markera	Program PCR	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Jakość	Uwagi
1H	GBM1278	GBM-MOD	CACATCAGTCCGACAACACC	AACCCTGAACGGCTACCAG	bardzo dobra	
1H	GMS149	SSR-I	ACCCTAACTCATGTTCT	AAGGAACATAGCCAACCTC	słaba	obecność allelu null
1H	WMC1E8	SSR-E	TCATTCGTTGCAGATACACCAC	TCAATGCCCTTGTTTCTGACCT	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
1H	Bmag0579	SSR-E	CCTAGATAAGGAACATAGCCA	CAAAGACCCTAACTCATGTTC	bardzo dobra	
1H	GBM1461	GBM-MOD	AAACCATGCATTCTTCAGAGA	TTTAGACCGACCCGATGAAG	bardzo dobra	obecność allelu null
1H	GBM1434	GBM-MOD	CACGAGGCTACAACCCAATC	GTCATCTTCTTGCTGCCTCC	słaba	
1H	EBmac0783	SSR-E	TAGTACGGGGCAGTAGATAGT	TGCATATGTGTGTACTGCTG	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
2H	Bmac0134	SSR-E	CCAACCTGAGTCGATCTCG	CTTCGTTGCTTCTCTACCTT	bardzo dobra	
2H	GBM1121	GBM-MOD	ACCACCCCATCCATCAG	GACTGCACCTTGATGCCGAT	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
2H	HVM36	SSR-A	TCCAGCCGACAATTTCTTG	AGTACTCCGACACCACGTCC	bardzo dobra	
2H	GBM5018	ssr-56	GTCGGTCGTAGATCGGACTC	CATCATGGAACACTTCCACC	bardzo dobra	
2H	GBM1214	GBM-MOD	ATGCTACAGCAAGCATGCAC	TGGTGAGGATGTCCGAGAAC	bardzo dobra	
2H	Bmag0692	SSR-E	GCAAGGTATCTCTGTATTTTG	TGGCATCTACAATCTAAAACA	bardzo dobra	obecność allelu null
2H	GBM1523	scssr-60	GCATGATTCAGTAGGCAACG	GTTGTGATGGCCTTGATGTG	bardzo dobra	
2H	Bmac0218a, b	SSR-F	ATTGCATTGATTAACCTCTACA	GGGGGAATCTTTGTGTAAG	bardzo dobra	wiele loci
2H	GBM1446	GBM-MOD	GAGCACCGAGCTACCTCTCA	CCTGCCTGAAGAAGTCGAAC	bardzo dobra	
2H	HvXan	SSR-F	CAGCCACCTCCATAGTACTT	CTGCTCTAGGCTCGTGTT	bardzo dobra	
2H	GBM1459	GBM-MOD	AACACATCCATACTTCCCCG	AGCTGAATAAATGCCCATGC	bardzo dobra	
2H	Bmac0093	SSR-E	CGTTTGGGACGTATCAAT	GGGAGTCTTGAGCCTACTG	bardzo dobra	
2H	EBmac0557	SSR-D	ATGCATGTGTAGATGTAGATGTG	AACAAGGATAAACTAACATGGG	bardzo dobra	
2H	GBM1366	GBM-MOD	TCCTCTACATCAGCACGTCG	AAAGGCAGCACCCAGTCAGAT	bardzo dobra	
2H	EBmac0684b	SSR-E	TTCCGTTGAGCTTTCATACAC	ATTGAATCCCAACAGACACAA	bardzo dobra	
2H	EBmac0854	SSR-K	GTCGATATAACGCACTTTCA	ATTCCTCTAACACACCAAC	bardzo dobra	
2H	Bmag0518	SSR-F	AATGCCATGATGTTATTGG	AAGAAGATTACATCGAATAGATCA	bardzo dobra	
2H	Bmag0720	SSR-I	AAACCGTTTGTATAGCACG	ATAAGTGAATGCTTCTGAGGA	bardzo dobra	
2H	Bmag0829a, b	SSR-I	TAAAAGCCAACTCGATAATC	TTGTTGATGAGAAGTTTTGTG	bardzo dobra	wiele loci
2H	Bmag0378	SSR-F	CTTTTGTTCGGTAGCATCTA	ATCCAACCTATAGTAGCAAAGCC	bardzo dobra	

Tabela 10.7. cd.

Chromosom	Nazwa markera	Program PCR	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Jakość	Uwagi
2H	Bmag0140	SSR-F	GCGATCCCATATACTTGTG	TCGGATTAAAGTATCTCTGGA	bardzo dobra	
2H	Bmag0711	SSR-I	GGAGAGTCACATATCAAGGAC	CCACTCCTTCTCATACTTTA	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
2H	GBM1468	GBM-59	GTTCTTCTTTGCTCCTCC	TCCATGGTCTCTCCTTCAC	bardzo dobra	
2H	Bmac0216	SSR-E	GTACTATTCTTTGCTTGGGC	ATACACATGTGCAAAACCATA	bardzo dobra	
2H	Bmag0125	SSR-E	AATTAGCGAGAACAAAATCAC	AGATAACGATGCACCACC	bardzo dobra	
2H	EBmatc0039	SSR-F	TAGTCTCTTCATTTATACCATCACC	CATGCTGATCCCCCTTCT	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
2H	EBmag0793	SSR-E	ATATATCAGCTCGGTCTCTCA	AACATAGTAGAGGCGTAGGTG	bardzo dobra	
2H	GBM1440	GBM-MOD	CTACCGAGCTCCTCCTCCTC	GGCCTCCTTCTGTCTGTA	bardzo dobra	
2H	GBM1309	GBM-MOD	ATAACTCTTCGTGCCGAACC	ACGTAGACCTCCACCACCTG	bardzo dobra	
2H	GBM1469	GBM-59	GGGTACGAGGCTTATGGACA	ATGAGGCGATCAAAATCAGG	bardzo dobra	
2H	EBmac0415	SSR-E	GAAACCCATCATAGCAGC	AAACAGCAGCAAGAGGAG	bardzo dobra	
2H	HVM54	scssr-51	AACCCAGTAACACCTGTCTCTG	AGTTCCTGACCCGATGTC	bardzo dobra	
2H	GBM1498	GBM-MOD	TGCTCCAACCCAAAAGCTAC	GAAGACGACGAGCGGTA	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
2H	GBM1462	GBM-MOD	CTGTGGCTAAAGAAGGCACC	AAGATTGCTGCAGGATAGGC	bardzo dobra	
2H	Bmag0749	SSR-I	CGGATTCTTGAGTAGTCTCTG	GATCTGTTTTTGTAGAATGTC	słaba	
2H/6H/7H	Bmag0571a, b, c, d	SSR-E	AAGAACACCATATGATCCAAC	ATTGGAGACGTATCATGTACC	bardzo dobra	obecność allelu null
3H	GBM1280	GBM-MOD	CTTCTTCTTCTTGTGGGCG	AAGGGATCAGTTTGGTTCC	bardzo dobra	
3H	GBM1450	GBM-MOD	AAGGTGGCGGAGTTCTACCT	ATCGACCAGTGGAGCACATA	bardzo dobra	
3H	GBM1078	GBM-MOD	GGGCCTCCTTCTCTCTCTC	CCTTCTGCCCTCCTCAAT	bardzo dobra	
3H	GBM1382	GBM-MOD	TCTCAACTCACATGGCTTGG	GATTGATGGATTGATTGCC	bardzo dobra	
3H	EBmac0705	SSR-K	GTGGAAAAGTGAAGTGAAGTCA	TTGAGGAGAAGTAATGACGAT	bardzo dobra	
3H	GBM1284	GBM-51	GTAGGGGTGCGGCTCTTG	TCAATCATGGAGTCCCTCAC	bardzo dobra	
3H	Bmag0023	SSR-E	AACACAGACCTACGGGTC	CATGAGATAGATCCAAGCAC	bardzo dobra	
3H	GBM1300	GBM-MOD	TGGATGCTCCTCCCAATTTA	ATGCATGTTGTGCCCAAGTA	bardzo dobra	
3H	Bmac0067	SSR-E	AACGTACGAGCTCTTTTCTA	ATGCCAACTGCTTGTTAG	bardzo dobra	obecność allelu null
3H	Bmag0006	SSR-F	TTAAACCCCCCTCTAG	TGCAGTACTATCGCTGATTTAGC	bardzo dobra	
3H	Bmac0043	ssr-51	ACGTTACCCATATGACAAG	TGGGTAATCCTGGTTAAACTA	bardzo dobra	

Tabela 10.7. cd.

Chromosom	Nazwa markera	Program PCR	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Jakość	Uwagi
3H	HVM27	SSR-A	GGTCGGTCCCGGTAGTG	TCCTGATCCAGAGCCACC	bardzo dobra	
3H	Bmag0131	SSR-E	TTTCAGAAACGGAGTTTTG	CCTCCACACAAAAAATCC	bardzo dobra	
3H	GBM1444	GBM-MOD	AGGGATGCTCTTGAGTCGTG	ACCACAGGTAACCTCGCAAC	bardzo dobra	
3H	GBM1213	GBM-MOD	AAAGCTACGACCGACAAGGA	GTCATCTCAGTCCTACCGC	bardzo dobra	
3H	Bmac0209	SSR-F	CTAGCAACTTCCCAACCGAC	ATGCCTGTGTGTGGACCAT	bardzo dobra	
3H	Bmag0828	SSR-I	CATCTCCTAAGGTTTATCTTTGA	AGATCGTGACCTCTCAAGAC	bardzo dobra	
3H	Bmag0138a	SSR-F	ACCAGGAGGAATGAGAGAG	AATAAACCTTGAGACGATGG	bardzo dobra	
3H	Bmag0603	SSR-E	ATACCATGATACATCACATCG	GGGGGTATGTACGACTAACTA	bardzo dobra	
3H	EBmac0871	SSR-E	TGCCCTCTGTTGTGTTATTGT	CCCCAAGTGAACATTGAC	bardzo dobra	
3H	GBM1495	ssr-58	ATTGCATCCGCTACCAGAGT	AAGGACAGGCCCTTGTTGT	bardzo dobra	
3H	HVM33	SSR-A	ATATTA AAAAAGGTGGAAAGCC	CACGCCCTCTCCCTAGAT	bardzo dobra	
3H	GBM1090	GBM-MOD	CTGCCCTAGAAATGGCGTAG	TGTGCAACTCAATAACCCCA	bardzo dobra	
3H	HVM60	SSR-A	CAATGATGCGGTGAACCTTG	CCTCGGATCTATGGGTCCTT	bardzo dobra	
3H	Bmag0225	SSR-F	AACACACAAAAATATTACATCA	CGAGTAGTTCCTCATGTGAC	bardzo dobra	
3H	GBM1405	GBM-MOD	TACACGCACTGAAAAGACGG	CTCGCTGCTGAGTTTGTCTG	bardzo dobra	
3H	GBM1233	GBM-MOD	TTAACCCCAATGTCAGGAA	AATGTGTTCACTGTGGCTGC	bardzo dobra	
3H	Bmag0010b, c	SSR-G	AGTAGTTCACCCTTGGGGCT	AGCACGTGATACATCAAGAACG	bardzo dobra	wiele loci, obecność allelu null
3H	Bmag0606	SSR-E	CTATTTGTAATGTATGTATGTCCC	TCATTGGTCCAGATAATACAA	bardzo dobra	
3H	Bmag0013	SSR-F	AAGGGGAATCAAAATGGGAG	TCGAATAGGTCTCCGAAGAAA	bardzo dobra	
3H	GBM1118	GBM-60	GACCGGAGCAGATCTTTGAG	CTCCTCCTCCTCGGACTCTT	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
3H	Bmag0877	SSR-I	AAAGCTCATGGTAGATCAAGA	TAGTTTTCCCAAAAGCTTCTA	bardzo dobra	obecność allelu null
3H	GBM1288	GBM-MOD	AGCTTGTCCTCCATCTTCTT	CGCTGTACACCTCCCTGAG	bardzo dobra	
3H	EBmac0541	SSR-F	ACGATCTACTTTAGCTAGCA	AAACAACCCACACAATC	bardzo dobra	
3H	EBmac0708	SSR-E	AATTTTTGTTTCCCATGC	AGCCCTATTGTCACAGTTTT	bardzo dobra	
3H	EBmag0705	SSR-E	TCCTGTAGTCTCTTTGTTTC	TATATTACACATGGAGAGAGAGG	bardzo dobra	
3H	GBM1420	GBM-MOD	GGATCTCCCCATTCCTCAC	TTTCTGGTCTTTGATTCGG	bardzo dobra	
3H	scssr25538	scssr-60	CCTCCACTATCTTCTCTCC	GAGTGTTACTGCCGATTTGC	bardzo dobra	

Tabela 10.7. cd.

Chromosom	Nazwa markera	Program PCR	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Jakość	Uwagi
4H	GBM1501	GBM-MOD	TGTGGACAGTCAAACACGCT	AAGGAGCACCTGAAAAGCAA	bardzo dobra	
4H	GBM1221	GBM-MOD	ACCAGCAATCCAAGTTACGG	TGCCTTGGTCTTGGTGTGTA	bardzo dobra	
4H	GBM1465	GBM-MOD	ATTGCATCAACCACTACGGC	CAGGACAGCAGAGACCACAA	bardzo dobra	
4H	HVM40	SSR-A	CGATCCCCCTTTCCAC	ATTCTCCGCCGTCCACTC	bardzo dobra	
4H	GBM1252	GBM-51	GCACGAGGGGTATAAGTCCA	GACGTTGAGAGCCGAGGA	bardzo dobra	
4H	GBM1323	GBM-MOD	GCTCTCCAGGGTTCGTTTC	CACCGTCTTGCAGTTGAGAC	bardzo dobra	
4H	GBM1482	GBM-MOD	GAGAGCTAGCCACCATTTGC	GACAGGTCGAGGCTGAGAAG	bardzo dobra	
4H	scsr20569	scsr-51	ATCGAGCACCTACGAACC	TTGCATAGCGGAAGTAATCC	bardzo dobra	
4H	HvOLE	SSR-H	GATGGATGTCAGTCGGTC	ATGAGCAGTAGTACAACCTAAGC	bardzo dobra	
4H	Bmag0740	SSR-I	ATTGTCATGGAGGTGAGTG	AAGAACACCATATGACTCGAC	bardzo dobra	
4H	Bmag0808	SSR-I	TCATAGACTACGACGAAGATG	TCTTTGGATGTGTGTTACTG	bardzo dobra	
4H	GBM1452	GBM-MOD	GGAACCCATCTTACACCTGG	CCAAAGCAAAAAGTTCCGAG	bardzo dobra	
4H	EBmac0906	SSR-D	CAAATCAATCAAGAGGCC	TTGAAGTGAGACATTTCCA	bardzo dobra	
4H	GBM1236	GBM-MOD	GGTCACCTCCTCCTGAGTTG	GAGGATTCGCTCAAAGTTGC	bardzo dobra	
4H	Bmag0384	SSR-F	TGTGAGTAGTTCACCATAGACC	TGCCATTATCATTGTATTGAA	bardzo dobra	
4H	HVM03	SSR-E	ACACCTCCCAGGACAATCCATTG	AGCACGCAGAGCACCGAAAAAGTC	bardzo dobra	
4H	Bmac0181	SSR-E	ATAGATACCAAGTGAACCAC	GGTTATCACTGAGGCAAATAC	bardzo dobra	
4H	Bmac0030a, b	ssr-51	CCCAATCGGAGTTACAGATG	GCCTCTGAGAATGGATC	bardzo dobra	wiele loci
4H	Bmag0490	SSR-E	TGATACATCAAGATCGTGACA	GGGACTGAGTGTATGAATGAG	bardzo dobra	
4H	GBM1509	GBM-MOD	CAATCGTTGTCCAGAACCCT	GGCCGACAAATATGCTTCAT	bardzo dobra	
4H	EBmac0775	SSR-E	GCTTCCTTCATAGACCCAT	ATATCATGCCAATGGTGTC	bardzo dobra	obecność allelu null
4H	Bmag0353	SSR-F	ACTAGTACCCACTATGCACGA	ACGTTCAATAAAATCACAACCTG	bardzo dobra	
4H	GBM1299	GBM-MOD	GATCCCCCTAAAAGCAGACC	CTGCCTAGTCCCTGCATCTC	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
4H	EBmac0658	ssr-58	GTATGCAAGTGTAGGTGTGTG	CATGGGTTTACCCACATAC	bardzo dobra	
4H	scsr14079	ssr-51	AAAATAAGGTTTCTTGTTCTTGG	GAAACCCTGTTGAAGTACGG	bardzo dobra	
4H	EBmac0679	SSR-E	ATTGGAGCGGATTAGGAT	CCCTATGTCATGTAGGAGATG	bardzo dobra	
4H	EBmac0701	SSR-E	ATGATGAGAACTCTTCACCC	TGGCACTAAAGCAAAAGAC	bardzo dobra	

Tabela 10.7. cd.

Chromosom	Nazwa markera	Program PCR	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Jakość	Uwagi
4H	GBM1220	GBM-MOD	GCTACCAGAACCCAGGAACA	TGAGCAACCTGAAACTGTCG	bardzo dobra	
4H	HVMLOH1A	SSR-E	CCTCCCCTCTGATATGATAA	GTACAGACGGTTTAATTGTCC	bardzo dobra	
4H	WMS6	ssr-51	CGTATCACCTCCTAGCTAAACTAG	AGCCTTATCATGACCCCTACCTT	bardzo dobra	
4H	HVM67	SSR-A	GTCGGGCTCCATTGCTCT	CCGGTACCCAGTGACGAC	bardzo dobra	
4H	GBM1324	GBM-60	GTCGACTCTCGCTCCAGG	CCTTGGGGTACAGGATGTTG	bardzo dobra	
4H	GBM1453	GBM-MOD	ATGCCCACTTGATGATGGAT	TGCATCTACGTACAGTGTGGTG	bardzo dobra	
4H/5H/7H	Bmac0303a, b, c	SSR-F	CCTCCAAGATTAGATCTCTCTC	CCGTATATTTAAGAAATGGTGA	bardzo dobra	wiele loci
5H	scssr02306	scssr-60	TGCCTTGTTTATGTAATATCTTGTG	GGCGTAAATAAGAGTGTCTTCAG	bardzo dobra	
5H	GBM1176	GBM-MOD	TATACATCAGCGGGCCTTTT	CTCCAACCTCGCAAAGAGTC	bardzo dobra	
5H	scssr07106	scssr-60	GCGCTGTCTCTTCTATGTGC	AGGTGCTCCTAATCTGATGG	bardzo dobra	
5H	GBM5028	GBM-MOD	TTCTCTCCGCCATACATA	TTGCAGAAGTTGCAGTGGAC	bardzo dobra	
5H	Bmac0163	SSR-E	TTTCCAACAGAGGGTATTTACG	GCAAAGCCCATGATACATACA	bardzo dobra	
5H	EBmac0970	SSR-E	ACATGTGATACCAAGGCAC	TGCATAGATGATGTGCTTG	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
5H	HVM30a	scssr-51	AGTGGGGAATGAGAGAATGG	TGCTTGTTGGGTCATCACAC	bardzo dobra	
5H	GBM1229	GBM-MOD	GGGACCCAGCCAAATTTTA	GGTTGCTGCTGGGTATGTTT	bardzo dobra	
5H	Bmag0751	SSR-I	CACTGCAAATATTTAAAATGGA	GATCTACTGGTCCATAGTTGC	bardzo dobra	
5H	Bmag0337	SSR-E	ACAAAGAGGGAGTAGTACGC	GACCCATGATATATGAAGATCA	bardzo dobra	
5H	Bmag0323	SSR-E	TTTGTGACATCTCAAGAACAC	TGACAAACAAATAATCACAGG	bardzo dobra	
5H	Bmac0311	GBM-51	ATTGATGGAGCATTGTCC	AAGTGTGGAAGGATAGTAGCA	bardzo dobra	
5H	EBmatc0054	SSR-D	TGACCACCATTGTGAGACAG	AGTGGTAGTGGGAGGAGGAG	bardzo dobra	
5H	Bmac0096	SSR-F	GCTATGGCGTACTATGTATGGTTG	TCACGATGAGGTATGATCAAAGA	bardzo dobra	
5H	Bmac0113	SSR-F	TCAAAAAGCCGGTCTAATGCT	GTGCAAAGAAAATGCACAGATAG	bardzo dobra	
5H	Bmac0306a, b	SSR-F	CCTTGTGTGAGTGTGTGTG	ACATGCACATGAACTAATCAA	bardzo dobra	wiele loci
5H	Bmag0357	ssr-51	CTTCTACATCATCCTTGTGTC	ATGATCATTGTATTGAAGAGCA	bardzo dobra	
5H	Bmag0760	SSR-I	GTGATACATCAAGATCGTGC	TCCCCAACACCAGTATCTA	bardzo dobra	obecność allelu null
5H	GBM1426	GBM-MOD	AGCACCACCTCAAGCAAAAG	CGAAGAGCATGGTCAGGG	bardzo dobra	
5H	GBM1506	GBM-MOD	GCCGTAAGTAAGAACCCTG	TCAAATCCGACTTTATCTTAAATCTC	bardzo dobra	

Tabela 10.7. cd.

Chromosom	Nazwa markera	Program PCR	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Jakość	Uwagi
5H	scssr15334	scssr-51	GGGAGCCGTAAGTAAGAACC	CGACCTCTGAATCTCAAATCC	bardzo dobra	
5H	GBM1483	GBM-MOD	CAGTGATATGGACTACGGCG	CTTGTTCTCCACCTCGAAGC	bardzo dobra	
5H	Bmag0223	SSR-F	TTAGTCACCCCTCAACGGT	CCCCTAACTGCTGTGATG	bardzo dobra	
5H	Bmag0812	SSR-I	ATAGTTCTTTCAGGACCAATG	GTCATATGGATCTCCAAAGAG	bardzo dobra	
5H	GBM1227	GBM-MOD	GGTCATCATAACATACGCTGCTG	GGGTGGTGTAGGAGGAGGAT	bardzo dobra	
5H	GBM1231	GBM-MOD	CTGCAGACCCCTGAAATTGGT	GGATCCCTTTTGACGTGCTA	bardzo dobra	
5H	GBM1438	GBM-MOD	TGAAGGAGATCAAGAACGGC	ATCAGTCCGAAAGACATGC	bardzo dobra	
5H	GBM1141	GBM-MOD	ACGTCGTGGATCAACGTGTA	ACAATCCTTCCATCCATTCG	bardzo dobra	
5H	HvLox	SSR-F	CAGCATATCCATCTGATCTG	CACCCTTATTTATTGCCTTAA	bardzo dobra	
5H	GBM5008	GBM-MOD	CAGCATCCATCAGCAATGAA	ATGTTTGGCTTCTTCGTCCA	bardzo dobra	
5H	GMS061	SSR-J	CACCTGTTCCGTCCCGTC	AACCTCTTTTTATCCCTCGC	bardzo dobra	
5H	AF043094A	SSR-E	CACGGTATAAATATCCACCC	ATGGACTCTTCTCCCTGAA	bardzo dobra	
5H	EBmac0824	SSR-K	GCAAGCTTCCTAAATCCTTA	TGCAGACAGTTTTTCATATACA	bardzo dobra	
5H	EBmatc0003	SSR-F	AATTTTGCAAAGCTGGAGG	CATTATGGTGGGGTTCATGT	bardzo dobra	
5H	GMS027	SSR-J	CTTTTTCTTTGACGATGCACC	TGAGTTTGTGAGAAGTGGATGG	bardzo dobra	
5H	Bmag0222	SSR-F	ATGCTACTCTGGAGTGGAGTA	GACCTCAACTTTGCCTTATA	bardzo dobra	
5H	GBM1490	GBM-MOD	TTTTGCCTATGGGTAATGGG	TTGCTCTGAATGTTTGCAGG	bardzo dobra	
5H	GBM1164	GBM-MOD	TGAGTTTATTCGGTCTCGCC	ACGAACACCTTCATCCATCC	bardzo dobra	
5H	GMS001	SSR-J	CTGACCCTTGTCTTAACATGC	TCAGCGTGACAAACAATAAAGG	bardzo dobra	
5H	scssr03907	scssr-60	CTCCATCACACCATCTGTC	GACATGGTCCCTTCTTCTTC	bardzo dobra	
6H	AF166121A	scssr-51	TTATGCTTACACGGTGTAC	GGCACAAAAGACTGAAATAG	bardzo dobra	
6H	Bmac0316	SSR-E	ATGGTAGAGGTCCCAACTG	ATCACTGCTGTGCCTAGC	bardzo dobra	
6H	scssr09398	GBM-MOD	AGAGCGCAAGTTACCAAGC	GTGCACCTCAGCGAAAGG	bardzo dobra	
6H	Bmag0500	SSR-F	GGGAACCTTGCTAATGAAGAG	AATGTAAGGGAGTGTCCATAG	bardzo dobra	
6H	GBM1270	GBM-MOD	TGCGTCTTACAACTTCGTGG	AGGCTGCTGTTAGTGGTGGT	bardzo dobra	
6H	GBM1215	GBM-MOD	ATGACCAGAAAACGCCTGTC	GGATTCTGCACACACGAGAA	bardzo dobra	
6H	GBM1355	GBM-MOD	ATCCGTCGTATTCGCATCTC	GCTGGTACTGGGAGAAATGG	bardzo dobra	

Tabela 10.7. cd.

Chromosom	Nazwa markera	Program PCR	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Jakość	Uwagi
6H	Bmag0807	SSR-I	GGATATAAGGGTCCATAGCA	AATTACATCAAATAGGCTCCA	bardzo dobra	
6H	Bmag0173	SSR-F	CATTTTTGTTGGTGACGG	ATAATGGCGGGAGAGACA	bardzo dobra	
6H	HVM31	SSR-A	CGGTTTCTGGTTGCTTGG	CGAAGCTCTCAGGCTTCATG	bardzo dobra	
6H	GBM5012	GBM-MOD	CTGCTATCCTAACGCGGTTTC	CAATGGACACGACTGCAAAG	bardzo dobra	
6H	EBmac0874	SSR-F	AACCATTCCTCACCCAGG	GTGAATGATGTTGAGGACATTG	słaba	
6H	Bmag0009	SSR-F	AAGTGAAGCAAGCAAACAAACA	ATCCTTCCATATTTTGATTAGGCA	bardzo dobra	
6H	Bmag0496	SSR-E	AGTATAACCAACAGCCGTCTA	CTATAGCACGCCTTTGAGA	bardzo dobra	
6H	scssr02093	GBM-MOD	CGTCACGCACACATCGAC	GATCTCTCCTCGGGCATC	słaba	
6H	GBM1400	GBM-MOD	AGCGCTCTCTCACACACAGA	ATTCTCGCCTGTTTTTCGTG	bardzo dobra	
6H	Bmag0613	SSR-E	AAGAACACCATATGATCCAAC	CTCCATGACTATGAGGAGAAG	bardzo dobra	
6H	EBmac0602	SSR-F	GATTGGAGCTTCGGATCAC	CCGTCTAGGGAGAGGTTCTC	bardzo dobra	
6H	EBmac0806	SSR-E	ACTAAGTCCTTTCACGAGGA	GTGTGTAGTAGGTGGGTACTTG	bardzo dobra	
6H	GBM1256	GBM-MOD	GCCTCGATCTGTGGAAAGAA	GTCTCGGAGAAGGTGACGAT	słaba	
6H	HVM11	ssr-51	CCGGTCGGTGCAGAAGAG	AAATGAAAGCTAAATGGCGATAT	bardzo dobra	
6H	scssr05599	scssr-51	TTCCATCATAACAGCAATGG	TTCGTCGAAGGCTATGTAGG	bardzo dobra	
6H	GBM1356	GBM-MOD	CCACCTGGTTTTGCGTTTAT	AAAGTGCCCAGATTCACCAC	bardzo dobra	
6H	scssr00103	scssr-51	GGTAAGGAGTGGGTCTCAGG	CAAGCAGATGCAACTACACC	bardzo dobra	
6H	GBM1274	GBM-MOD	CGTCCACTCTTTTCTGAGGG	TGGGCTCAATTTTCTGTTC	bardzo dobra	
6H	GBM1275	GBM-MOD	TCTTCTGCTGTGGGTCTGTC	CACATCCAGTCGCACAACCT	bardzo dobra	
6H	GBM1087	scssr-60	TAAGATGCACACGTCCAACC	TGATACACCTCACAGCTCGG	bardzo dobra	
6H	GBM1404	GBM-MOD	CAAGCCAGCAAACAAACAAA	GGGAGTACGTGTTGCTCCAT	bardzo dobra	
7H	HvPLASC1B	SSR-E	GTGCATGCATCATATTGATTA	ACGTACGTACTTATCACGAAGA	bardzo dobra	
7H	GBM1126	GBM-MOD	AGCAGATGATTCCCCAGATG	GCCCACGGTGTAGATGTCTT	bardzo dobra	
7H	Bmag0206	SSR-F	TTTTCCCTATTATAGTGACG	TAGAACTGGGTATTTCTTGA	bardzo dobra	
7H	Bmag0007	SSR-F	TGAAGGAAGAATAAACCAACCAACA	TCCCTATTATAGTGACGGTGTG	bardzo dobra	
7H	HVM04	SSR-E	AGAGCAACTACCAGTCCAATGGCA	GTCGAAGGAGAAGCGGCCCTGGTA	bardzo dobra	
7H	HVCABG	SSR-E	ACACCTTCCCAGGACAATCC	CAGAGCACCGAAAAAGTCTGTA	bardzo dobra	

Tabela 10.7. cd.

Chromosom	Nazwa markera	Program PCR	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Jakość	Uwagi
7H	GBM1326	GBM-MOD	AGAGCACAACCCTTGGAGG	GTAGAGGCAGCCCTTCTCCT	bardzo dobra	skomplikowany wzór prążkowy
7H	EBmac0603	SSR-F	ACCGAAACTAAATGAACTACTTCG	TGCAAACACTGTGCTATTAAGGG	bardzo dobra	
7H	AF022725A	SSR-E	AGTATGGGGAATTTATTTGG	GCTGCAAAGTATGACAATATG	bardzo dobra	
7H	Bmag0914	SSR-I	GGGCAATATACAGTTCAACTC	ATGAACTGGAGGCAGTAAATA	bardzo dobra	
7H	GBM1116	scssr-51	CACGAGGCCAAAACCTAAAA	CTTCTCGAGGTTCTTGACGG	słaba	
7H	GBM1464	GBM-MOD	ATAGCCGTGCTCTTGCTCAT	CAAGACCACCATTTGCATTG	bardzo dobra	
7H	scssr07970a, b	scssr-60	TGCATTGGGAGTGCTAGG	TGCAAGAAGCCAAGAATACC	bardzo dobra	wiele loci
7H	EBmatc0016	SSR-D	CCAACCAAGATAATGTGCTTG	ATCCTTATGCTCCTCGCTG	bardzo dobra	
7H	HVCMA	SSR-D	GCCTCGGTTTGGACATATAAAG	GTAAAGCAAATGTTGAGCAACG	bardzo dobra	
7H	Bmac0187	SSR-F	GCTCTCTCTCAGAAAAATGAA	GAATTATCTAGGGCTGTGAA	bardzo dobra	
7H	Bmag0900	SSR-I	AGCCTGTGATACATCAAGATC	AGGATGAGGGTATGTAGACG	bardzo dobra	
7H	Bmag0321	SSR-F	ATTATCTCCTGCAACAACCTA	CTCCGGAACCTACGACAAG	bardzo dobra	
7H	EBmac0827	SSR-E	CATGGTATTCAAACATACACG	AAGGTCTTAAGGGGTGATG	bardzo dobra	
7H	GBM1516	GBM-MOD	CCCTCTCCTTTCCCTATCGT	GTGGGGTTGATGTTCCCTGTT	bardzo dobra	
7H	Bmac0167	SSR-E	CATTTCCACTTCAAAAATATCC	CCAAAGTTTGAGTGCAGAC	bardzo dobra	
7H	Bmag0507	SSR-F	CAACTAGCATACCCAAGCTATA	ACCCCTATTTCAATAATGGA	bardzo dobra	
7H	GBM1359	GBM-MOD	ATAGCAAACACGCGGAAAAA	CGCCTACGAGCAAGGTTC	bardzo dobra	
7H	GBM1303	ssr-58	TCTTTTTGGAGGGGTTTCCT	ATCATCTTCACGCTTCCTCC	bardzo dobra	
7H	Bmag0385	SSR-F	CTCCACAGAGTCAGAGTTAGA	CTGACATTAGCTGACTCTCTATC	bardzo dobra	
7H	GBM1396	GBM-MOD	ACCATTACTTACCGGTTGCG	ATGCTGGCTTCTGCAATCTT	bardzo dobra	
7H	EBmac0764	SSR-K	AGAATCAAGATCGACCAAAC	AAAAACATGAACCGATGAA	słaba	obecność allelu null
7H	Bmag0120	SSR-F	ATTTTCATCCCAAAGGAGAC	GTCACATAGACAGTTGTCTTCC	bardzo dobra	
7H	GBM5225	GBM-MOD	GCTCACATGCTTCTCCTCC	GCAACTCTCCCTACCTCCCT	bardzo dobra	
7H	EBmac0755	SSR-E	AGCCTTGTGTATCAGGACA	CTGCTGGTGTCTCTAAAAGT	bardzo dobra	obecność allelu null
7H	Bmac0156	SSR-E	AACCGAATGTATTCCCTGTGA	GCCAAACAACATATCGTGTAC	bardzo dobra	
7H	EBmag0757	SSR-E	GTGTCTTTTTCACTTCCTTTG	TCTTCACTGTTGAGATGATGA	bardzo dobra	
7H	Bmag0135	SSR-F	ACGAAAGAGTTACAACGGATA	GTTTACCACAGATCTACAGGTG	bardzo dobra	obecność allelu null

Aneks 3. Programy PCR dla amplifikacji markerów SSR

- **SSR-A**

94°C 5 min; 94°C 1 min, 64°C 30 sek, 72°C 1 min x 18 cykli; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min x 30 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-B**

94°C 5 min, 94°C 1 min, 69°C 30 sek, 72°C 1 min x 2 cykle; 94°C 1 min, 68°C 30 sek, 72°C 1 min x 2 cykle; 94°C 1 min, 67°C 30 sek, 72°C 1 min x 2 cykle; 94°C 1 min, 66°C 30 sek, 72°C 1 min x 2 cykle; 94°C 1 min, 65°C 30 sek, 72°C 1 min x 2 cykle; 94°C 1 min, 64°C 30 sek, 72°C 1 min x 2 cykle; 94°C 1 min, 63°C 30 sek, 72°C 1 min x 2 cykle; 94°C 1 min, 62°C 30 sek, 72°C 1 min x 2 cykle; 94°C 1 min, 61°C 30 sek, 72°C 1 min x 2 cykle; 94°C 1 min, 60°C 30 sek, 72°C 1 min x 19 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-D**

94°C 3 min; 94°C 2 min, 66°C 1 min, 72°C 1 min; 94°C 30 sek 65°C 30 sek ($\Delta T = -0.5^\circ\text{C}$), 72°C 30 sek x 5 cykli; 94°C 30 sek., 60°C 30 sek, 72°C 30 sek x 23 cykle; 72°C 5 min

- **SSR-E**

94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 1 min x 30 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-F**

94°C 5 min; 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min x 3 cykle; 94°C 30 sek, 58°C 30 sek, 72°C 30 sek x 30 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-G**

94°C 5 min; 94°C 3 min, 69°C 1 min, 72°C 1 min, 94°C 30 sek, 68°C 30 sek ($\Delta T = -1^\circ\text{C}$), 72°C 30 sek x 5 cykli; 94°C 30 sek, 63°C 30 sek, 72°C 30 sek x 25 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-H**

94°C 5 min; 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 1 min x 30 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-I**

94°C 5 min; 94°C 1 min, 55°C 1 min, 72°C 2 min x 35 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-J**

94°C 5 min; 94°C 1 min, 53°C 1 min, 72°C 1 min x 30 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-K**

94°C 5 min; 94°C 1 min, 60°C 1 min, 72°C 2 min x 35 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-51**

94°C 5 min, 94°C 1 min, 51°C 1 min, 72°C 1 min x 36 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-56**

94°C 5 min; 94°C 1 min, 56°C 1 min, 72°C 1 min x 36 cykli; 72°C 5 min

- **SSR-58**

94°C 5 min; 94°C 1 min, 58°C 1 min, 72°C 1 min x 36 cykli; 72°C 5 min

- **scssr-51**

94°C 5 min; 94°C 30 sek, 51°C 45 sek, 72°C 1 min x 25 cykli; 72°C 5 min

- **scssr-60**

94°C 5 min; 94°C 30 sek, 60°C 45 sek, 72°C 1 min x 25 cykli; 72°C 5 min

- **GBM-MOD**

94°C 3 min; 94°C 30 sek, 60°C 30 sek ($\Delta T = -0.5^\circ\text{C}$), 72°C 30 sek x 10 cykli; 94°C 30 sek, 55°C 30 sek, 72°C 30 sek x 25 cykli; 72°C 5 min

- **GBM-51**

94°C 5 min; 94°C 45 sek, 51°C 45 sek, 72°C 45 sek x 30 cykli; 72°C 5 min

- **GBM-59**

94°C 5 min, 94°C 30 sek, 64°C 30 sek ($\Delta T = -0.5^\circ\text{C}$), 72°C 30 sek x 10 cykli; 94°C 30 sek, 59°C 30 sek, 72°C 30 sek x 20 cykli; 72°C 5 min

- **GBM-60**

94°C 5 min; 94°C 45 sek, 60°C 45 sek, 72°C 45 sek x 30 cykli; 72°C 5 min

Aneks 4. Analiza polimorfizmów w sekwencjach funkcjonalnych genów kandydackich

Tabela 10.8. Sekwencje starterów oraz warunki amplifikacji metodą PCR analizowanych fragmentów CG

Gen	Nr fragmentu	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Długość fragmentu [pz]	Program PCR*	
					°C	l. cykli
Geny wytypowane z danych literaturowych						
<i>FRY1</i>	1	TTGACTCGCTTCTGGCTAACT	TGCAGGCAAAGGTCTCTTTT	827	55	32
	2	CACCTTTCCTTTCTATCTGGAGCT	AGAACCCAATGTCGTCCAGA	832	62	33
	3	CATGCATGCTCGAACAAAT	GGCATTCACTGGATTGTCG	780	55	30
	4	GCAGCCATGTCATGAAAGAA	TGTTTCATACCATTCTCGTTTCTG	1194	56	35
<i>AREB1</i>	1	TTGATAGCACTGACCGATGG	ACCTCATCCTTTTGCTTCTGT	801	55	32
<i>NAC6</i>	1	ATGTACGGCGAGAAGGAGTG	CAATCATCCAACCTGCACCAA	802	55	32
<i>MPK5</i>	1	CATAGAGCGGATGCTCACCT	CTCTAGGTACGGGTGCTCCA	805	61	35
	2	CGGTTTCTTGCCAGGTTTGT	ATCCTCTGAAGCGGGTTGAA	1208	55	32
<i>SAD1</i>	1	CCC GTTAGCACGGA ACTATC	AACTCCAGCGAGCCTATGAC	803	62	32
	2	TCAGCAAAGATGTTGAGATGG	CACGTCACAATTAGCATTTCC	862	62	35
	3	CCAGATTAGCAAGACCTCTCGG	GCAACTTCAGCATCGCCTAA	713	55	30
	4	TTCTCTCCTTTTGT TTTTCTGG	ATTGGGAGGCCTTTTGCTT	758	55	30
	5	AACATAACATCTTGCTTGGTTTG	CCAGAAAAACAAAAAGGAGAGAA	755	55	35
	6	CACTGCCACCACCAAGTTC	GGTCCATACATCCAATGGGTA	1155	55	32
	7	CACCCGAAATGCTAATTGT	TTAGCGGCCTTCTTTGTCAC	1193	56	30
	8	TACCCAAGTTGCCATTGGAC	AGGTACAGTGGTTTGAATC	1083	55	35
<i>SIK1</i>	1	AACTCCTTCGCCGTCTCT	CATGTCTACAGCAAAAAGGTAGGA	814	55	32
<i>bZIP23</i>	1	CACCGATGCCCTATGTTTTT	AGGGCTTATATTCACCGGAAG	1127	55	35
<i>P5CS1</i>	1	TGAAAAGAACAGAGGTGAGTGC	CCACAGAGTTGAATCTCAAACAAC	806	55	32
<i>CSD1</i>	1	TGACCTCGGAAATGTGACAG	TCCGTGCCAAAATAAGTGTC	821	60	32
	2	AGAGAAAAGAAAAGGAAACAAGAGG	AAACTAGTACATACAGGCCTTGCT	800	60	36
<i>DHODH1</i>	1	TCGAGTACTTAGCGGTCACA	AAATATGGGCGAAATTAGCAA	823	55	32
<i>HVA22</i>	1	CCTCTGCTCATCTCTCCTG	AGTATGTGCACCTTGTGATCG	824	60	32
	2	ACGAATCTTTTAACGCGCGG	TCACCAGAACGACGATGTGC	861	55	32
<i>ADC1</i>	1	TCTACCCCGTCAAGTGCAAC	ATGGGGATGATGGGGAAC	1132	57	35
<i>AVP1</i>	1	TCATCACTGTTTCGTGCAAAG	GACTTACAGCTGGGTTCTCT	1054	55	35
<i>ALDH3</i>	1	CGATTTGTGTGGGAGAGGCT	GCAGCTTCGCGAACAAATGAA	808	62	33
<i>PIPIA</i>	1	CACATCAACCCAGCAGTGAC	CCACCATGTTTCGCATCATATC	850	60	32
	2	TGCTAGTACTGCTCACCCTG	GTAGAAGATGGCCCTGGTCA	812	62	33

Tabela 10.8. cd.

Gen	Nr fragmentu	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Długość fragmentu [pz]	Program PCR*	
					°C	l. cykli
<i>PIP1A</i>	3	TTCCAGAGCCACCTTCCTC	TCTGTGGCAAGAAAAGAGCAG	777	50	30
	4	GCAAATTGCTCCTCTAAATAATCA	CCAGGGATGGAGAATCGAC	768	55	30
	5	CCCCACTCTCACCTACTTGC	CTCTCATGTGAAAAGAGCTGGT	1161	55	32
	6	TTTCGTTCCGGGTTCACTTTG	GGGTGCGTTGTGAGCTATG	824	55	35
<i>TPP1</i>	1	TTCCTGAAGAAGATCCTGCCTA	CGTGAGTATCGCGCACATAA	800	55	30
	2	TGGCTTGACACTTGATCCAT	ACCATCCATGCACTGTAGGC	792	55	30
	3	TTTTCTCGCCCTTTTCCAGC	ACTTCCATGACGTGACAAC	1157	55	32
	4	CAATGCTGAAAAGGTGAGCA	TAACAGGGGACACAGCAACA	1184	55	32
	5	CTTGGTGAGGTGGAAGAAGC	GAGCGTGTACGGATTTCTC	1097	55	32
<i>sHSP17.7</i>	1	AGTGTTACGGGAAGACGAG	GCCGGACTCTGATTTCAATT	802	55	32
	2	CAGTGGTCGTGATGATAA	CAAGATTTCTGAACCAGTTTTT	1184	57	35
	3	AAGTTTGGTAACCCCAAC	ATAGAGGGCTGGGGAAGATT	1161	55	32
Geny wytypowane na podstawie wyników eksperymentu mikromacierzowego						
AK364695.1	1	AAGACAAGCTAGCCAGTGATACAA	CTGTGATCACGAACGAAAGC	801	55	30
AF307145.1	1	ATGACACACAATACCTACCCTCAG	CAGCTTCTCATGCTTGCTACC	729	54	35
AK248508.1	1	CTCATGGGGTACTTGAGTT	CTGGATTTGCCACTCAGCTT	1153	57	35
AK250959.1	1	GAGTGGCCTGAGCTGGTC	CTCCCGAAAGGAAAGAAAC	920	55	32
AK366970.1	1	AAAATTCGTTTGATGGATTAACCTC	GAGTGAATTTACAGAAACAATGGTG	1062	55	32
AK375617.1	1	GATGAAGTATCATGCATACCAACTG	TTCAAAGGACTGCGGTTATTG	1055	55	32
AK373077.1	1	CTGGTACCATGGCTTTCTC	ATGACCATGCATCAACCAAC	1081	55	32
AK248413.1	1	TGAATAATGCTGCCACCTAGC	TGCTGCAATTGAAAGACTCG	1068	55	35
AK373549.1	1	CAGGTCGTGGAGAAGGAGAG	CCTGGTCTGGCTTGTACGTT	804	55	32
AK376769.1	1	GCATAGCTGCAAGTGTGGA	TCGGCAAGAAGAGTCGAGTT	1176	57	35
	2	GCGAGGAACCTCGGAGATTG	CTATCCCACACGATCCAAGTG	1013	55	32
AK355834.1	1	CAGTATGACGGCGAACTGAA	AGGTCCTTCCGGAATCCA	1162	55	32
	2	TAGCCTCGTGGACGCTCTAT	GAACCTTGGGGAATCTGACA	1183	55	32
	3	CGAGTGTCTCGAGTTCTACC	TGTATCCGGTCTGCTTTCC	1137	55	35
AK354606.1	1	CTGTCTCATCGCCAGAAAC	GGTGGCCGTGTAGTCCAG	1073	55	32
	2	TCCAGCATCATCAACACCAC	TGTTGTAAGGAAGCGCACAG	907	55	35
BM816765.1	1	CAGGCAGTTTGCCGTTTACT	GATGGTTGCCCTTACCTTGA	802	60	35
DQ201158.1	1	TTGTCACCACCAGCTAAACAA	CCATCACTAACGATTTCCAGA	814	55	30
AK376707.1	1	TCGAGCTAGGCTGATGAAGG	CGTGCAGTGCATCCTTAAGAC	1069	55	35

Tabela 10.8. cd.

Gen	Nr fragmentu	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')	Długość fragmentu [pz]	Program PCR*	
					°C	l. cykli
AK252018.1	1	GCACTTGCCTTGTGGATCC	CCAAGGATGAACTGGTGGTC	1058	55	35
	2	TCATCCAGACCAACATCGAC	TCATCACATCCTGGACTTGG	1051	55	35
AK369200.1	1	GGCAAGCAAAGACAACGAC	CGTGATTTTCATCCTCACACG	804	55	30
	2	CGCTCTAGCTCTGGCGTACT	TGTTGACCTTCACGAACAGG	772	55	30
	3	TGAGCCATGAGACCAAACCTT	CCTCTAGGGCGCAAACATATC	1114	55	32
	4	CGAGGGTTAATCCTGTATTGC	CAATTTATGGTGGGGTACAG	1156	59	35
AK250034.1	1	CCTCCAGACCGACCTCATA	GAAGCCGTTGAAGAATGACC	1079	55	32
AK365529.1	1	GATGACAGAACCCGCTCCT	ACTTCCCAAAGCGAACATTG	779	55	32
AK367041.1	1	CGATGAAACCGTGCTAATTG	ACACGTGCCTCCATAACAATC	1071	55	32
AK358114.1	1	TTTCAGCAGCACAGATGGTC	TCAGCAGCAAAGAATGGTTG	1198	55	32
AK364080.1	1	CGGTACGTACGATCAACACG	GTGCACCACTGACCGAATC	1084	55	35
AK374300.1	1	GGCGAGTACTCCCTCAAC	GCGAATTTCTGGTTACCG	1065	55	35
AK249171.1	1	GAACTTGATGCGTGCTTGTG	TGGCGCTATCCTTGAGAAAC	1091	55	35
AK251637.1	1	ATGGACCGGAGGAAGGAG	ACGTAGGTTCCGGACATCAG	1113	55	35
AK355062.1	1	TCGGGATCTGGGAATTTTATG	AACGACGTTTCATGCTGATTG	1108	55	35
AY188394.1	1	CCACCATCATGTCCGAGTATG	AAAAGAGCAGGCCAGAAAG	1038	55	35
AK365725.1	1	TCGTCCTCCACCAATAATCC	GCACTCCTTCCATGCACTC	1074	55	35
M60733.1	1	CTTGGAGAACCAGGATGGAG	TGCCATAAAGCAATAAACAGATG	1077	55	35
	2	GGATAGCCAAACTGCCCTTC	CCACCACGAACATTCAAGC	1192	55	32
AK369380.1	1	TCCCGCCTAATACAAACCAG	AGTGTGTGGCAAATGGTCAA	846	55	32
AK248326.1	1	TGAGCGAGCAAGCAACTAAC	TTGCCCCCTTGATAACGTAG	1123	55	35
AK250811.1	1	ACGCTAGCATTGTTCTTTC	GAAGGCCGTGTTGATGTTG	1060	55	35
	2	CAAACCTGTATGCCACGAAGG	GATAGTCGTCGGCTCTTTGG	801	55	32
AK366003.1	1	CATGCTTGCTGCGTGTAAG	AATCGATCCCAAACCTTTGATG	895	55	32
	2	CATCCATTAGGAATCAGCAG	TGGTTGGTGATTTGGATGTG	683	55	32
AK356650.1	1	CGCTATTGGCAGCCCTATAA	AGTAGAGCCGCTCGATGAAG	1085	55	35
	2	CCGTGAGTTGGGAATACATTG	TGAATCGATTGATGCAAAGG	1111	55	35
AK365167.1	1	ACCAGAAGCTCAGGGACATC	CTTGCTCAAATAAAGACTTGCTG	1070	55	35
	2	CAAAGCAAGTGGTGGTTTCG	CCTTTATTCGCTGGAAATTCTG	1172	60	35
AK376206.1	1	CAGACATGGCAATTTGATGGTG	CGCAGAACAGAACAGACGAT	752	55	30
AK250206.1	1	CCAAGAGGAGCAACTTCTCG	TGGAGAAATCAAGGGAAACG	806	55	30
AK372760.1	1	TGGGAAATTCATCGCATACTG	TGCTCCTTGGTTGCTCCTC	1150	55	32
AK358848.1	1	GCCACCATGTTCACTCAC	GTATTGGCAAGCACCCACTT	840	55	32

*Program PCR (temperatura przyłączenia starterów oraz liczba cykli podane w tabeli): 94°C 5 min; 94°C 30 sek; ...°C 45 sek; 72°C 1 min x ... cykli; 72°C 5 min

Tabela 10.9. Zidentyfikowane polimorfizmy w sekwencjach CG

Gen	Nr fragm.	Nr zmiany	Pozycja we fragm. [pz]	Typ polimorf.	Polimorf.	Allel w odmianie				Liczba haplotypów
						M	C	G	H	
Geny wytypowane z danych literaturowych										
<i>FRYI</i>	5	1	1030-1042	INDEL	insercja	-	12 pz	-	-	2
<i>AREB1</i>	1	1	92	SNP	A/G	A	G	G	G	2
		2	527	SNP	C/T	C	T	T	T	
<i>NAC6</i>	1	1	395	SNP	T/C	T	C	T	T	2
		2	431	SNP	G/A	G	A	G	G	
		3	668	SNP	T/C	T	C	T	T	
<i>MPK5</i>	2	1	630	SNP	T/G	T	G	T	T	2
<i>SIK1</i>	1	1	159	SNP	A/G	G	G	A	G	2
		2	219	SNP	C/T	T	T	C	T	
		3	242	SNP	G/A	A	A	G	A	
		4	519	SNP	C/T	T	T	C	T	
<i>bZIP23</i>	1	1	200	SNP	A/G	G	G	A	G	3
		2	216	SNP	T/C	C	C	T	C	
		3	296	SNP	C/T	C	C	C	T	
		4	305	SNP	C/G	G	G	C	G	
		5	344	INDEL	insercja	-	-	-	1 pz	
		6	394	SNP	C/T	T	T	C	T	
		7	457	SNP	G/A	T	T	T	C	
		8	458	SNP	T/C	G	G	G	A	
		9	497	SNP	C/T	T	T	T	C	
		10	509	SNP	A/G	C	C	C	T	
		11	514	SNP	G/A	A	A	A	G	
		12	545	SNP	T/C	G	G	G	A	
		13	561	SNP	C/G	T	T	T	C	
		14	585	SNP	G/A	C	C	C	G	
		15	587	SNP	G/A	G	G	G	A	
		16	588	SNP	C/G	G	G	G	A	
		17	592	SNP	C/G	C	C	C	G	
		18	637	SNP	C/T	C	C	C	T	
		19	652	SNP	G/A	G	G	G	A	
		20	690-709	INDEL	delecja	-	-	-	19 pz	
		21	726	SNP	T/C	C	C	T	C	
		22	799	SNP	G/T	G	G	G	T	
		23	879	SNP	A/G	A	A	A	G	
		24	932	SNP	A/C	A	A	A	C	
		25	969	SNP	C/G	C	C	C	G	
		26	1040	SNP	T/G	T	T	T	G	
		27	1055	SNP	C/A	C	C	C	A	
<i>P5CS1</i>	1	1	118	SNP	C/T	T	T	T	C	2
		2	606	SNP	A/C	C	C	C	A	
<i>CSD1</i>	3	1	386	SNP	A/G	A	G	G	G	2
		2	656	SNP	G/T	G	T	T	T	
		3	665-670	INDEL	insercja	5 pz	-	-	-	
<i>DHODH1</i>	1	1	74	SNP	T/A	T	T	T	A	2
		2	175	SNP	G/C	G	G	G	C	
		3	185	SNP	G/A	G	G	G	A	
<i>HVA22</i>	3	1	143	SNP	G/A	G	G	G	A	2
		2	312	SNP	T/C	T	T	T	C	
		3	506	SNP	A/T	A	A	A	T	
<i>ADC1</i>	3	1	50	SNP	T/C	C	C	T	C	2
		2	305	SNP	T/C	C	C	T	C	
		3	545	SNP	A/C	C	C	A	C	
		4	933	SNP	C/T	T	T	C	T	
<i>AVP1</i>	2	1	146-174	INDEL	insercja	-	-	-	28 pz	2
<i>ALDH3</i>	2	1	338	SNP	A/G	A	G	A	A	2
		2	384	SNP	G/A	G	A	G	G	

M – 'Maresi'; C – Cam/B1/Cl; G – 'Georgie'; H – 'Harmal'

Tabela 10.9. cd.

Gen	Nr fragm.	Nr zmiany	Pozycja we fragm. [pz]	Typ polimorf.	Polimorf.	Allel w odmianie				Liczba haplotypów
						M	C	G	H	
		3	423	SNP	T/C	T	C	T	T	
		4	473	SNP	G/T	G	T	G	T	
		5	481-484	INDEL	delecja	-	3 pz	-	-	
Geny wytypowane na podstawie wyników eksperymentu mikromacierzowego										
AK364695.1	1	1	248	SNP	C/T	C	T	C	T	2
		2	256	SNP	G/A	G	A	G	A	
		3	257	SNP	T/A	T	A	T	A	
AF307145.1	1	1	815	SNP	G/C	G	C	C	C	3
		2	912	SNP	G/A	G	A	A	A	
		3	931	SNP	G/C	G	C	G	C	
AK248508.1	1	1	75	SNP	C/T	T	T	C	T	3
		2	247	SNP	T/C	C	C	T	C	
		3	282	SNP	G/T	T	T	G	T	
		4	285	SNP	A/C	C	C	A	C	
		5	402	SNP	A/G	G	G	A	G	
		6	405	SNP	A/G	C	C	G	C	
		7	516	SNP	G/C	G	A	G	G	
		8	840	SNP	G/A	G	G	C	G	
		9	888	SNP	C/G	A	A	C	A	
		10	896	SNP	C/A	T	C	C	T	
AK250959.1	1	1	90	SNP	G/A	G	A	G	A	3
		2	121	SNP	A/G	A	G	A	A	
		3	156	SNP	A/G	A	G	A	A	
		4	197	SNP	T/C	T	C	T	T	
		5	267	SNP	G/A	G	A	G	G	
		6	269-270	INDEL	delecja	-	1 pz	-	-	
		7	385	SNP	C/G	C	C	C	G	
AK366970.1	1	1	285	SNP	T/C	T	T	T	C	2
		2	834	SNP	G/A	G	G	G	A	
AK375617.1	1	1	915	SNP	C/T	C	C	C	T	2
		2	925-926	INDEL	insercja	-	-	-	1 pz	
AK373077.1	1	1	156	SNP	C/T	C	C	C	T	3
		2	190-198	INDEL	delecja	-	-	-	8 pz	
		3	216	SNP	C/A	C	C	C	A	
		4	333	SNP	C/T	T	C	C	T	
		5	509	SNP	G/T	C	G	G	G	
		6	601	SNP	G/T	C	T	T	C	
		7	823	SNP	A/T	G	T	T	T	
		8	878-881	INDEL	insercja	3 pz	-	-	-	
AK248413.1	1	1	38	SNP	G/C	G	G	G	C	3
		2	57	SNP	C/A	C	C	C	A	
		3	779	SNP	G/A	G	A	G	G	
		4	786	SNP	G/A	G	A	G	G	
		5	809	SNP	T/C	T	T	T	C	
		6	851	SNP	C/G	C	C	C	G	
		7	933	SNP	G/A	G	A	G	G	
AK373549.1	1	1	253	SNP	T/G	T	G	G	T	3
		2	310	SNP	T/C	C	C	T	C	
		3	687	SNP	A/G	A	G	G	A	
BM816765.1	1	1	307	SNP	G/T	G	G	G	T	2
		2	346	SNP	C/T	C	C	C	T	
		3	407	SNP	T/C	T	T	T	C	
		4	448	SNP	C/T	C	C	C	T	
		5	470	SNP	A/G	A	A	A	G	
DQ201158.1	1	1	359	SNP	A/G	A	G	A	A	2
		2	596	SNP	A/G	A	G	A	A	
		3	667	SNP	T/C	T	C	T	T	
AK376707.1	2	1	64	SNP	C/A	C	A	A	A	2
		2	141	SNP	T/C	T	C	C	C	
		3	373	SNP	A/G	A	G	G	G	

M – 'Maresi'; C – Cam/B1/CI; G – 'Georgie'; H – 'Harmal'

Tabela 10.9. cd.

Gen	Nr fragm.	Nr zmiany	Pozycja we fragm. [pz]	Typ polimorf.	Polimorf.	Allel w odmianie				Liczba haplotypów
						M	C	G	H	
		4	376	SNP	A/G	A	G	G	G	
		5	628	SNP	C/T	C	T	T	T	
		6	824	SNP	T/C	T	C	C	C	
		7	891	SNP	G/A	G	A	A	A	
AK252018.1	2	1	316	SNP	T/G	T	T	T	G	2
		2	404	SNP	A/C	A	A	A	C	
		3	418	SNP	G/A	G	G	G	A	
		4	434	SNP	C/T	C	C	C	T	
		5	830	SNP	C/T	C	C	C	T	
		6	954-962	INDEL	delecja	-	-	-	9 pz	
AK369200.1	5	1	526	SNP	G/A	G	G	G	A	2
AK250034.1	1	1	52	SNP	C/T	C	C	C	T	2
		2	70	SNP	C/T	C	C	C	T	
		3	133	SNP	C/A	C	C	C	A	
		4	286	SNP	C/T	C	C	C	T	
		5	310	SNP	G/C	G	G	G	C	
		6	322	SNP	C/G	C	C	C	G	
		7	325	SNP	T/C	T	T	T	C	
		8	454	SNP	T/C	T	T	T	C	
		9	493	SNP	G/A	G	G	G	A	
		10	503	SNP	T/G	T	T	T	G	
		11	522	SNP	T/C	T	T	T	C	
		12	569	SNP	G/A	G	G	G	A	
		13	632	SNP	C/T	C	C	C	T	
		14	667	SNP	C/T	C	C	C	T	
		15	687	SNP	C/T	C	C	C	T	
		16	704	SNP	C/G	C	C	C	G	
		17	836	SNP	A/G	A	A	A	G	
		18	840	SNP	A/C	A	A	A	C	
		19	849	SNP	T/C	T	T	T	C	
		20	853-856	INDEL	delecja	-	-	-	3 pz	
		21	861	SNP	G/A	G	G	G	A	
		22	873	SNP	T/G	T	T	T	G	
		23	890	SNP	C/T	C	C	C	T	
		24	950	SNP	T/C	T	T	T	C	
		25	988	SNP	T/C	T	T	T	C	
		26	1004	SNP	A/T	A	A	A	T	
		27	1021	SNP	G/A	G	G	G	A	
		28	1032	INDEL	delecja	-	-	-	3 pz	
AK365529.1	1	1	326	SNP	G/A	A	A	G	A	2
		2	340	SNP	T/A	A	A	T	A	
		3	354-389	INDEL	delecja	-	-	36 pz	-	
		4	408	SNP	A/C	C	C	A	C	
		5	507	SNP	A/G	G	G	A	G	
		6	510	SNP	G/A	A	A	G	A	
		7	527	SNP	A/T	T	T	A	T	
		8	563	SNP	G/C	C	C	G	C	
		9	569	SNP	C/G	G	G	C	G	
		10	572	SNP	T/C	C	C	T	C	
AK367041.1	1	1	69	SNP	G/A	G	G	G	A	2
		2	71	SNP	G/A	G	G	G	A	
		3	76	SNP	G/A	G	G	G	A	
		4	95	SNP	C/T	C	C	C	T	
		5	122	SNP	C/G	C	C	C	G	
		6	133	SNP	T/G	T	T	T	G	
		7	136	SNP	G/C	G	G	G	C	
		8	191	SNP	A/G	A	A	A	G	
		9	197	SNP	T/C	T	T	T	C	
		10	199	SNP	G/A	G	G	G	A	

M – 'Maresi'; C – Cam/B1/CI; G – 'Georgie'; H – 'Harmal'

Tabela 10.9. cd.

Gen	Nr fragm.	Nr zmiany	Pozycja we fragm. [pz]	Typ polimorf.	Polimorf.	Allel w odmianie				Liczba haplotypów
						M	C	G	H	
		11	299	SNP	A/G	A	A	A	G	
		12	301	SNP	A/T	A	A	A	T	
		13	304	SNP	A/G	A	A	A	G	
		14	357	SNP	A/C	A	A	A	C	
		15	422	SNP	C/T	C	C	C	T	
		16	431	SNP	C/A	C	C	C	A	
		17	440	SNP	C/T	C	C	C	T	
		18	166	SNP	A/T	A	A	A	T	
		19	467	SNP	T/G	T	T	T	G	
		20	468	SNP	C/G	C	C	C	G	
		21	912	SNP	T/C	T	T	T	C	
		22	917	SNP	G/A	G	G	G	A	
AK358114.1	1	1	231	SNP	A/G	A	G	A	A	3
		2	237	SNP	C/G	C	G	C	C	
		3	348	SNP	T/C	T	C	T	C	
		4	364	SNP	T/C	T	C	T	C	
		5	365	SNP	A/G	A	G	A	G	
		6	370	SNP	T/C	T	C	T	C	
		7	371	SNP	T/C	T	C	T	C	
		8	378	SNP	C/T	C	T	C	T	
		9	386	SNP	G/T	G	T	G	T	
		10	388	SNP	A/T	A	T	A	T	
		11	395	SNP	C/T	C	T	C	T	
		12	402	SNP	C/T	C	T	C	T	
		13	406-408	INDEL	insercja	-	3 pz	-	3 pz	
		14	417	SNP	A/C	A	A	A	C	
		15	429	SNP	A/G	A	A	A	G	
		16	432	SNP	A/G	A	A	A	G	
		17	468	SNP	T/C	T	T	T	C	
		18	489	SNP	C/T	C	C	C	T	
		19	520	SNP	A/G	A	G	A	G	
		20	534	SNP	A/T	A	T	A	T	
		21	541	SNP	A/T	A	T	A	T	
		22	555	SNP	G/A	G	A	G	A	
		23	737	SNP	A/G	A	A	A	G	
		24	796	SNP	T/A	T	T	T	A	
		25	804	SNP	C/T	C	T	C	C	
		26	860	SNP	T/C	T	T	T	C	
		27	932	SNP	C/T	C	T	C	C	
AK364080.1	1	1	355	SNP	T/C	T	C	T	T	3
		2	399	SNP	T/C	C	C	T	C	
		3	455	SNP	G/C	G	C	G	G	
		4	531	SNP	C/T	C	T	C	C	
AK374300.1	1	1	49	SNP	G/A	G	G	G	A	4
		2	68	SNP	C/T	C	T	T	T	
		3	74	SNP	T/C	T	T	T	C	
		4	135	SNP	G/C	G	C	C	G	
		5	159-180	INDEL	delecja	-	-	-	22 pz	
		6	237	SNP	T/G	T	G	G	G	
		7	496	SNP	T/G	T	T	T	G	
		8	568	SNP	T/C	T	T	T	C	
		9	751	SNP	C/A	C	A	C	C	
		10	763	SNP	T/C	T	C	T	T	
		11	929	SNP	G/C	G	C	G	G	
		12	941	SNP	C/G	C	G	C	C	
AK249171.1	1	1	169	SNP	T/C	-	-	T	C	2
		2	172	SNP	C/A	-	-	C	A	
		3	202	SNP	A/G	-	-	A	G	
		4	204-205	INDEL	delecja	-	-	-	1 pz	

M – 'Maresi'; C – Cam/B1/Ci; G – 'Georgie'; H – 'Harmal'

Tabela 10.9. cd.

Gen	Nr fragm.	Nr zmiany	Pozycja we fragm. [pz]	Typ polimorf.	Polimorf.	Allel w odmianie				Liczba haplotypów			
						M	C	G	H				
		5	208	SNP	C/G	-	-	C	G				
		6	223	SNP	G/A	-	-	G	A				
		7	228	SNP	T/A	-	-	T	A				
		8	236	SNP	C/G	-	-	C	G				
		9	254	SNP	T/C	-	-	T	C				
		10	260	SNP	C/A	-	-	C	A				
		11	268	SNP	G/A	-	-	G	A				
		12	298	SNP	C/G	-	-	C	G				
		13	352	SNP	C/A	-	-	C	A				
		14	421-428	INDEL	insercja	-	-	-	7 pz				
		15	468	SNP	G/A	-	-	G	A				
		16	737	SNP	C/T	-	-	C	T				
		17	1019	SNP	C/G	-	-	C	G				
		AK251637.1	1	1	54	SNP	T/C	T	C		C	T	3
				2	57	SNP	C/T	C	T		C	C	
				3	188	SNP	G/T	G	T		G	G	
				4	214	SNP	G/A	G	A		G	G	
5	365			SNP	T/C	T	C	T	T				
6	528			SNP	C/T	C	T	C	C				
7	663			SNP	G/C	G	C	G	G				
8	883			SNP	G/T	G	T	G	G				
9	1035			SNP	C/T	C	T	C	C				
AK355062.1	2	1	326	SNP	A/C	A	A	A	C	2			
		2	609	SNP	G/A	G	G	G	A				
AY188394.1	1	1	47	SNP	T/A	T	A	T	A	3			
		2	98	SNP	T/C	T	C	T	C				
		3	101	SNP	T/C	T	C	T	C				
		4	104	SNP	C/G	C	G	C	G				
		5	179	SNP	T/C	T	T	T	C				
		6	194	SNP	C/T	C	T	C	C				
		7	230	SNP	G/A	G	G	G	A				
		8	233	SNP	C/T	C	C	C	T				
		9	408	SNP	A/C	A	A	A	C				
		10	410	SNP	G/A	G	G	G	A				
		11	428	SNP	T/C	T	T	T	C				
		12	527	SNP	G/A	G	A	G	G				
		13	548	SNP	C/T	C	T	C	C				
		14	566	SNP	A/G	A	G	A	A				
		15	614	SNP	G/T	G	T	G	T				
		16	836	SNP	A/C	A	C	A	C				
		17	923	SNP	G/T	G	G	G	T				
		18	932	SNP	T/C	T	C	T	C				
		19	938	SNP	G/A	G	A	G	A				
		20	995	SNP	C/G	C	G	C	G				
AK365725.1	1	1	520	SNP	G/A	G	A	-	-	2			
		2	581	SNP	G/C	G	C	-	-				
		3	849	SNP	G/C	G	C	-	-				
		4	926	SNP	C/T	C	T	-	-				
M60733.1	2	1	621	SNP	C/T	C	T	C	C	2			
AK369380.1	1	1	69	SNP	C/A	C	A	A	A	2			
		2	249	SNP	C/T	C	T	T	T				
		3	277	SNP	C/T	C	T	T	T				
		4	381	SNP	C/T	C	T	T	T				
		5	414	SNP	T/C	T	C	C	C				
		6	669	SNP	G/A	G	A	A	A				
		7	745	SNP	A/G	A	G	G	G				
AK248326.1	1	1	111	SNP	C/A	C	A	C	A	4			
		2	381	SNP	T/G	G	G	T	G				
		3	520	SNP	C/G	C	G	C	G				
		4	539	SNP	C/G	G	G	C	G				

M – 'Maresi'; C – Cam/B1/CI; G – 'Georgie'; H – 'Harmal'

Tabela 10.9. cd.

Gen	Nr fragm.	Nr zmiany	Pozycja we fragm. [pz]	Typ polimorf.	Polimorf.	Allel w odmianie				Liczba haplotypów
						M	C	G	H	
		5	709	SNP	T/C	T	C	C	C	
		6	882	SNP	T/C	T	C	T	C	
		7	896	SNP	A/G	G	G	A	G	
		8	909	SNP	A/G	A	G	A	A	
		9	1029	SNP	A/C	C	C	A	C	
AK376206.1	1	1	310	SNP	T/C	T	C	T	T	2
2	394	SNP	A/C	A	C	A	A	A		
AK250206.1	1	1	37	SNP	A/C	A	A	A	C	2
		2	323	SNP	A/G	A	A	A	G	
		3	381	SNP	T/C	T	T	T	C	
		4	524	SNP	C/G	C	C	C	G	
		5	577	SNP	A/C	A	A	A	C	
		6	761	SNP	T/C	T	T	T	C	
AK372760.1	1	1	228	SNP	G/T	G	T	G	G	2
AK358848.1	1	1	562	SNP	A/G	A	A	A	G	2
		2	615	SNP	T/A	T	T	T	A	
		3	719	SNP	T/C	T	T	T	C	
		4	751	SNP	G/C	G	G	G	C	
		5	756	SNP	T/A	T	T	T	A	

M – 'Maresi'; C – Cam/B1/CI; G – 'Georgie'; H – 'Harmal'

Aneks 5. Protokoły genotypowania polimorficznych CG w populacjach mapujących

Tabela 10.10. Sekwencje starterów do amplifikacji markerów STS

Gen	Nazwa startera	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')
<i>CSD1</i>	INDEL (1)	GAGGAGGAGGAAGGCGAGT	TATTTAAGCTAGCCGGCCCT
<i>bZIP23</i>	INDEL (2)	GGAGACTGAGGTGGCAAAAC	TGAGGTGATCAACCAGAAGC
<i>FRY1</i>	INDEL (3)	TTCATCATCCAGGATACACAATAAG	TGTTCATACCATTCTCGTTTCTG
<i>AVP1</i>	INDEL (4)	TCATCACTGTTTCGTGCAAAG	ACAGCAATCTGTCAGCAAGG
<i>AK365529.2</i>	INDEL (5)	ATTCCGTCCCATCATCACAG	TCCATAAGCAGTTGGGCTTC
<i>AK374300.2</i>	INDEL (6)	GGCGAGCTACTCCCTCAAC	CAAATCCGGCAAGAAACC

Tabela 10.11. Sekwencje starterów do amplifikacji markerów dCAPS

Gen	Nazwa startera	Sekwencja startera <i>forward</i> (5'- 3')	Sekwencja startera <i>reverse</i> (5'- 3')
<i>SIK1</i>	dCAPS (1)	TCATAAGATTTTGTGCCTGAA GCT	CATGTCTACAGCAAAAAGGTAGGA
<i>NAC6</i>	dCAPS (2)	ATGATCTGCCAATTACGACGG CTC	CAATCATCCAACCTGCACCAA
<i>HVA22</i>	dCAPS (3)	CCACGCGGAGCACTACTGCC CAGC	TCACCAGAACGACGATGTGC
<i>MPK5</i>	dCAPS (4)	CCATACTCTGAATGAAGAGCA AATA	GCAGATCTTGAGGTGCGAGTT
DQ201158.1	dCAPS (5)	TGCTCATGCTTACTTTTATA CTCG	CCATCACTAACGATTCCCAGA
AK369200.1	dCAPS (6)	TTTGCATGCCATTTAATGACCT CG	TATTTGGGGGCGGAGAAGGA
AK366970.1	dCAPS (7)	AACTCGTCTCGCCAATGATGCC AC	GAGTGAATTTACAGAAACAATGGTG
AK372760.1	dCAPS (8)	GGTTTGTACGCGGGATTAAT GG	GACCGCAAACACTACAGCAG
AK375617.1	dCAPS (9)	ACCTAGTTATAGCTTCTACCC GCT	CGTGTTTTCGTTGTGTGAGC
AK250206.1	dCAPS (10)	GGCAAGGAGGCCATCCAGTGG CTT	TGGAGAAATCAAGGGAAACG
BM816765.1	dCAPS (11)	ATTTTAAATCAACATGTCAGGAT C	GATGGTTGCCCTTACCTTGA
M60733.1	dCAPS (12)	TTGTGGTGGGGATCCAAGTCCG CT	CCTCCTGCCATTGTCTTCAT
AK373549.1	dCAPS (13)	GGCAGGGCGGGCAAGGTGAC CGA	ATGCTTCTGACTTGGGGATGC

Kolorem czerwonym oznaczono niedopasowane nukleotydy (ang. mismatch)

Tabela 10.12. Szczegółowe protokoły genotypowania polimorficznych CG w populacjach mapujących

Gen	Typ polimorf.	Polimorf.	Pozycja w genie [pz]	Populacja mapująca	Metoda genotyp.	Program PCR*	Enzym**	Rozpoznawana sekwencja	Mix.***	Warunki restrykcji (inkubacja/ inaktywacja)	Wielkość produktu [pz]	
											Odmiana eur. M lub G	Odmiana syr. C lub H
Geny wytypowane z danych literaturowych												
<i>P5CS1</i>	SNP	C/T	100 down	GH	CAPS	55°C 32 cykle	XhoI	C'TCGAG	3	37°C noc/ 65°C 20 min	116+690	806
<i>CSD1</i>	INDEL	ins. 5 pz	102-106	MCam	STS	63°C 32 cykle, startery INDEL (1)	-	-	-	-	110	115
<i>ALDH3</i>	SNP	G/A	10	MCam	CAPS	62°C 33 cykle	BcoDI	GTCTC'	1	37°C noc	389+419	808
<i>SIK1</i>	SNP	C/T	666	GH	dCAPS	55°C 32 cykle, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (1)	HindIII	A'AGCTT	3	37°C 75 min./ 80°C 20 min	320	20+300
<i>NAC6</i>	SNP	G/A	852	MCam	dCAPS	55°C 32 cykle, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (2)	DdeI	C'TNAG	1	37°C noc/ 65°C 20 min	396	22+374
<i>DHODH1</i>	SNP	G/C	2549	GH	CAPS	55°C 32 cykle	MnlI	CCTC(N)7'	4	37°C noc/ 65°C 20 min	177+646	823
<i>HVA22</i>	SNP	A/T	44 up	GH	dCAPS	55°C 32 cykle, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (3)	PvuII	CAG'CTG	2	37°C noc	380	23+357
<i>bZIP23</i>	INDEL	del. 19 pz	2051-2069	GH	STS	55°C 35 cykli, startery INDEL (2)	-	-	-	-	174	193
<i>AREB1</i>	SNP	A/G	1075	MCam	CAPS	55°C 32 cykle	AvaII	G'GWCC	2	37°C noc/ 80°C 20 min	801	91+710
<i>MPK5</i>	SNP	T/G	1122	MCam	dCAPS	55°C 32 cykle, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (4)	SspI	AAT'ATT	4	37°C noc/ 65°C 20 min	208	23+185
<i>ADC1</i>	SNP	A/C	763	GH	CAPS	57°C 35 cykli	MlyI	GAGTC(N)5'	1	37°C noc/ 65°C 20 min	547+585	1132
<i>FRY1</i>	INDEL	ins. 12 pz	919-930 down	MCam	STS	55°C 35 cykli, startery INDEL (3)	-	-	-	-	225	237

M – 'Maresi'; G – 'Georgie'; C – Cam/B1/CI; H – 'Harmal'

Tabela 10.12. cd.

Gen	Typ polimorf.	Polimorf.	Pozycja w genie [pz]	Populacja mapująca	Metoda genotyp.	Program PCR*	Enzym**	Rozpoznawana sekwencja	Mix.***	Warunki restrykcji (inkubacja/inaktywacja)	Wielkość produktu [pz]	
											Odmiana eur. M lub G	Odmiana syr. C lub H
<i>AVPI</i>	INDEL	ins. 28 pz	574-601	GH	STS	55°C 35 cykli, startery INDEL (4)	-	-	-	-	287	315
Geny wytypowane z eksperymentu mikromacierzowego												
DQ201158.1	SNP	A/G	1761	MCam	dCAPS	PCR, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (5)	XhoI	C'TCGAG	3	37°C 4h/ 65°C 20 min	21 + 459	480
AK364695.1	SNP	C/T	949	GH	CAPS	55°C 32 cykle	StuI	AGG'CCT	1	37°C 5h	246+555	801
AK376206.1	SNP	A/C	348	MCam	CAPS	55°C 32 cykle	PstI	CTGCA'G	2	37°C 5h/ 80°C 20 min	394+358	752
AK248508.1	SNP	A/G	903	GH	CAPS	57°C 35 cykli	NsiI	ATGCA'T	1	37°C noc/ 65°C 20 min	409+744	1153
AF307145.1	SNP	G/C	2290	MCam	CAPS	54°C 35 cykli	MspAII	CMG'CKG	5	37°C noc/ 65°C 20 min	813+327	1140
AK369200.1	SNP	G/A	252 down	GH	dCAPS	59°C 35 cykli, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (6)	XhoI	C'TCGAG	3	37°C noc/ 65°C 20 min	322	21+301
AK358848.1	SNP	A/G	2795	GH	CAPS	55°C 32 cykle	BanI	G'GYRCC	3	37°C 1h/ 65°C 20 min	840	279+561
AK365529.1	INDEL	del. 36 pz	941-976	GH	STS	55°C 35 cykli, startery INDEL (5)	-	-	-	-	220	256
AK366970.1	SNP	G/A	774	GH	dCAPS	55°C 35 cykli, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (7)	PvuII	CAG'CTG	2	37°C noc	253	26+227
AK250959.1	SNP	G/A	129	GH	CAPS	55°C 35 cykli	NciI	CC'SGG	3	37°C noc	5+88+827	5+915
AK372760.1	SNP	G/T	2678	MCam	dCAPS	55°C 35 cykli, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (8)	HaeIII	GG'CC	2	37°C noc/ 80°C 20 min	25+252	277

M – 'Maresi'; G – 'Georgie'; C – Cam/B1/CI; H – 'Harmal'

Tabela 10.12. cd.

Gen	Typ polimorf.	Polimorf.	Pozycja w genie [pz]	Populacja mapująca	Metoda genotyp.	Program PCR*	Enzym**	Rozpoznawana sekwencja	Mix.***	Warunki restrykcji (inkubacja/ inaktywacja)	Wielkość produktu [pz]	
											Odmiana eur. M lub G	Odmiana syr. C lub H
AK375617.1	SNP	C/T	593	GH	dCAPS	55°C 40 cykli, , rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (9)	BsrBI	CCG'CTC	1	37°C noc/ 80°C 20 min	22+312	334
AK373077.1	SNP	C/A	585	GH	CAPS	55°C 35 cykli	BamHI	G'GATCC	2	37°C 8h/ 80°C 20 min	211+870	1081
AK358114.1	SNP	A/G	4036	MCam	CAPS	55°C 35 cykli	BstEII	G'GTNACC	2	60°C 1/5h	1198	519+679
AK250034.1	SNP	C/A	4245	GH	CAPS	55°C 35 cykli	BanII	GRGCY'C	2	37°C 1h/ 80°C 20 min	132+947	1079
AK367041.1	SNP	C/G	138	GH	CAPS	55°C 35 cykli	BstEII	G'GTNACC	2	60°C 1/5h	117+954	1071
AK250206.1	SNP	A/G	1235	GH	dCAPS	55°C 32 cykle, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (10)	AflIII	C'TTAAG	3	37°C noc/ 65°C 20 min	22+486	508
BM816765.1	SNP	T/C	1932	GH	dCAPS	60°C 35 cykli, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (11)	BamHI	G'GATCC	2	37°C 8h/ 80°C 20 min	420	20+400
AK376707.1	SNP	G/A	3755	MCam	CAPS	55°C 35 cykli	DraI	TTT'AAA	3	37°C noc/ 65°C 20 min	1069	179+890
AK252018.1	SNP	A/C	1478	GH	CAPS	55°C 35 cykli	BsiEI	CGRY'CG	1	60°C 1/15h/ 80°C 20 min	1051	403+648
AK248413.1	SNP	C/G	695	GH	CAPS	55°C 35 cykli	BtgI	C'CRYGG	1	37°C noc/ 80°C 20 min	1068	219+849
AK364080.1	SNP	T/C	497	MCam	CAPS	55°C 35 cykli	HpaI	GTT'AAC	4	37°C 1/15h	353+731	1084
AK374300.1	INDEL	del. 22 pz	359-380	GH	STS	55°C 35 cykli, startery INDEL (6)	-	-	-	-	205	183

M – 'Maresi'; G – 'Georgie'; C – Cam/B1/CI; H – 'Harmal'

Tabela 10.12. cd.

Gen	Typ polimorf.	Polimorf.	Pozycja w genie [pz]	Populacja mapująca	Metoda genotyp.	Program PCR*	Enzym**	Rozpoznawana sekwencja	Mix.***	Warunki restrykcji (inkubacja/ inaktywacja)	Wielkość produktu [pz]	
											Odmiana eur. M lub G	Odmiana syr. C lub H
AK249171.1	SNP	C/A	204	GH	CAPS	55°C 35 cykli	AseI	AT ⁺ TAAT	2	37°C noc/ 65°C 20 min	1091	257+834
AK248326.1	SNP	T/G	346	GH	CAPS	55°C 35 cykli	HphI	GGTGA(N)8'	4	37°C 1/15h/ 65°C 20 min	387+736	1123
AK251637.1	SNP	C/T	564	MCam	CAPS	55°C 35 cykli	EarI	CTCTTC(N)1'	6	37°C noc/ 65°C 20 min	111+473+529	473+640
AY188394.1	SNP	C/T	300	GH	CAPS	55°C 35 cykli	PvuII	CAG ⁺ CTG	2	37°C noc	1038	231+807
AK355062.1	SNP	A/C	230	GH	CAPS	55°C 35 cykli	NciI	CC ⁺ SGG	6	37°C noc	264+60+784	264+844
AK365725.1	SNP	G/C	1300	MCam	CAPS	55°C 35 cykli	XhoI	C ⁺ TCGAG	2	37°C noc/ 65°C 20 min	1074	227+847
M60733.1	SNP	C/T	1688	MCam	dCAPS	55°C 32 cykle, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (12)	BsrBI	CCG ⁺ CTC	1	37°C noc/ 80°C 20 min	22+366	388
AK373549.1	SNP	T/C	687	GH	dCAPS	55°C 32 cykle, rozc. 50x, nested PCR, startery dCAPS (13)	EcoRV	GAT ⁺ ATC	3	37°C noc/ 80°C 20 min	25+281	306
AK369380.1	SNP	C/T	548	MCam	CAPS	55°C 35 cykli	AvaII	G ⁺ GWCC	1	37°C noc/ 80°C 20 min	273+573	846

M – 'Maresi'; G – 'Georgie'; C – Cam/B1/CI; H – 'Harmal'

*Program PCR (temperatura przyłączenia starterów i liczba cykli podane w tabeli): 94°C 5 min.; 94°C 30 sek.; ...°C 45 sek.; 72°C 1 min. x ...cykli; 72°C 5 min.

Program PCR do wewnętrznego PCR (nested PCR): 94°C 5 min.; 94°C 30 sek.; 55°C 45 sek'; 72°C 1 min. x 30 cykli; 72°C 5 min.

** W badaniach wykorzystano enzymy firmy New England Biolabs

*** Skład mixu restrykcyjnego (objętość wody – objętość buforu dla enzymu – objętość enzymu – objętość DNA [μl])

1. 5,7 - 1 - 0,8 - 2,5; 2. 5,5 - 1 - 1 - 2,5; 3. 6 - 1 - 0,5 - 2,5; 4. 4,9 - 1 - 1,6 - 2,5; 5. 6,2 - 1 - 0,8 - 2; 6. 6,1 - 1 - 0,4 - 2,5

Aneks 6. Procesy biologiczne zidentyfikowane w oparciu o analizę wzbogacania terminów GO w grupach genów dla warunków optymalnego nawodnienia oraz wspólne dla warunków optymalnego nawodnienia i stresu suszy

Tabela 10.13.

Kategoria fenotypowa	Termin GO	p-wartość	Proces biologiczny
Warunki optymalnego nawodnienia			
Bilans wodny	GO:0048569	7,96E-05	post-embryonic organ development
	GO:0048544	2,10E-04	recognition of pollen
	GO:0010227	3,68E-04	floral organ abscission
	GO:0006415	7,10E-04	translational termination
	GO:0006887	0,0014	exocytosis
	GO:0044765	0,0014	single-organism transport
	GO:0006298	0,0024	mismatch repair
	GO:0009756	0,0036	carbohydrate mediated signaling
	GO:0010182	0,0036	sugar mediated signaling pathway
	GO:0015800	0,0048	acidic amino acid transport
	GO:0015804	0,01	neutral amino acid transport
	GO:0065002	0,01	intracellular protein transmembrane transport
	GO:0071806	0,01	protein transmembrane transport
	GO:0006605	0,01	protein targeting
	GO:0072594	0,01	establishment of protein localization to organelle
	GO:0009611	0,01	response to wounding
	GO:0030001	0,01	metal ion transport
	GO:0006812	0,01	cation transport
	GO:0090342	0,02	regulation of cell aging
	GO:0006612	0,02	protein targeting to membrane
	GO:0010229	0,02	inflorescence development
	GO:0048527	0,02	lateral root development
	GO:0015748	0,02	organophosphate ester transport
	GO:0006720	0,02	isoprenoid metabolic process
	GO:0046246	0,03	terpene biosynthetic process
	GO:0051274	0,04	beta-glucan biosynthetic process
	GO:0048438	0,04	floral whorl development
	GO:0009737	0,04	response to abscisic acid
	GO:0009057	0,04	macromolecule catabolic process
	GO:0006396	0,04	RNA processing
	GO:0006464	0,04	cellular protein modification process
	GO:0036211	0,04	protein modification process
	GO:0006970	0,05	response to osmotic stress
Aktywność antyoksydantów	GO:1901701	0,0024	cellular response to oxygen-containing compound
	GO:1900457	0,01	regulation of brassinosteroid mediated signaling pathway
	GO:1900459	0,01	positive regulation of brassinosteroid mediated signaling
	GO:1901038	0,01	cyanidin 3-O-glucoside metabolic process
	GO:1901804	0,01	beta-glucoside metabolic process
	GO:0046686	0,01	response to cadmium ion
	GO:0034051	0,02	negative regulation of plant-type hypersensitive response
	GO:0006809	0,02	nitric oxide biosynthetic process
	GO:0046209	0,02	nitric oxide metabolic process
	GO:0042744	0,04	hydrogen peroxide catabolic process

Tabela 10.13. cd.

Kategoria fonotypowa	Termin GO	p-wartość	Proces biologiczny
Fotosynteza	GO:0048530	0,01	fruit morphogenesis
	GO:0006302	0,01	double-strand break repair
	GO:1901617	0,01	organic hydroxy compound biosynthetic process
	GO:0006720	0,01	isoprenoid metabolic process
	GO:0006468	0,01	protein phosphorylation
	GO:0006796	0,01	phosphate-containing compound metabolic process
	GO:0019856	0,02	pyrimidine nucleobase biosynthetic process
	GO:0016106	0,02	sesquiterpenoid biosynthetic process
	GO:0048573	0,02	photoperiodism, flowering
	GO:0048544	0,02	recognition of pollen
	GO:0010817	0,02	regulation of hormone levels
	GO:0046165	0,03	alcohol biosynthetic process
	GO:0009966	0,03	regulation of signal transduction
	GO:0042742	0,03	defense response to bacterium
	GO:0046700	0,03	heterocycle catabolic process
	GO:0044270	0,03	cellular nitrogen compound catabolic process
	GO:0098542	0,03	defense response to other organism
GO:0007166	0,05	cell surface receptor signaling pathway	
Zawartość osmoprotektantów i hormonów	GO:0006952	4,54E-04	defense response
	GO:0010118	0,01	stomatal movement
	GO:0055114	0,01	oxidation-reduction process
	GO:0010037	0,02	response to carbon dioxide
	GO:0000398	0,02	mRNA splicing, via spliceosome
GO:0071265	0,03	L-methionine biosynthetic process	
Stres suszy/warunki optymalnego nawodnienia			
Fotosynteza	GO:0009845	0,01	seed germination
	GO:0006468	0,01	protein phosphorylation
	GO:0016310	0,01	phosphorylation
	GO:0048041	0,02	focal adhesion assembly
	GO:0007044	0,02	cell-substrate junction assembly
	GO:0007045	0,02	cell-substrate adherens junction assembly
	GO:1900425	0,02	negative regulation of defense response to bacterium
	GO:0034333	0,02	adherens junction assembly
	GO:0034332	0,02	adherens junction organization
	GO:0033611	0,03	oxalate catabolic process
	GO:0019307	0,03	mannose biosynthetic process
	GO:0033609	0,03	oxalate metabolic process
	GO:0015961	0,03	diadenosine polyphosphate catabolic process
	GO:0015959	0,03	diadenosine polyphosphate metabolic process
	GO:0015967	0,03	diadenosine tetraphosphate catabolic process
	GO:0015965	0,03	diadenosine tetraphosphate metabolic process
	GO:0008610	0,03	lipid biosynthetic process
	GO:0002239	0,04	response to oomycetes
	GO:0002229	0,04	defense response to oomycetes
	GO:0010038	0,04	response to metal ion
GO:0006099	0,05	tricarboxylic acid cycle	
GO:0009725	0,05	response to hormone	

Tabela 10.13. cd.

Kategoria fenotypowa	Termin GO	p-wartość	Proces biologiczny
Zawartość osmoprotektantów i hormonów	GO:0006979	5,18E-04	response to oxidative stress
	GO:0080021	0,01	response to benzoic acid
	GO:0030833	0,01	regulation of actin filament polymerization
	GO:0019321	0,01	pentose metabolic process
	GO:2000762	0,02	regulation of phenylpropanoid metabolic process
	GO:0010070	0,02	zygote asymmetric cell division
	GO:0055114	0,02	oxidation-reduction process
	GO:0009833	0,03	primary cell wall biogenesis
	GO:0042732	0,03	D-xylose metabolic process
	GO:0042357	0,03	thiamine diphosphate metabolic process
	GO:0009229	0,03	thiamine diphosphate biosynthetic process
	GO:0042545	0,04	cell wall modification
	GO:0048468	0,04	cell development
	GO:0030835	0,05	negative regulation of actin filament depolymerization
	GO:0030837	0,05	negative regulation of actin filament polymerization
	GO:0051693	0,05	actin filament capping
	GO:0043242	0,05	negative regulation of protein complex disassembly
	GO:1901880	0,05	negative regulation of protein depolymerization

Aneks 7. Lista 143 pozycyjnych genów kandydackich zidentyfikowanych w wyniku analizy wzbogacania terminów GO związanych z odpowiedzią na stres suszy

MLOC_63263, MLOC_19378, MLOC_78707, MLOC_57100, MLOC_58872, MLOC_51227, MLOC_73233, MLOC_115, MLOC_16632, MLOC_4579, MLOC_5505, MLOC_6299, MLOC_7484, MLOC_14114, MLOC_37278, MLOC_44861, MLOC_52360, MLOC_54499, MLOC_65920, MLOC_67164, MLOC_71498, MLOC_75032, MLOC_21133, MLOC_52403, MLOC_39658, MLOC_4953, MLOC_71910, MLOC_6300, MLOC_35821, MLOC_56414, MLOC_18300, MLOC_53947, MLOC_4744, MLOC_51763, MLOC_37449, MLOC_70676, MLOC_26683, MLOC_568, MLOC_2695, MLOC_4149, MLOC_4341, MLOC_5618, MLOC_6969, MLOC_15907, MLOC_31567, MLOC_41281, MLOC_51927, MLOC_57734, MLOC_59220, MLOC_61944, MLOC_54083, MLOC_15256, MLOC_19075, MLOC_38928, MLOC_44719, MLOC_61983, MLOC_3946, MLOC_14746, MLOC_38120, MLOC_76334, MLOC_36316, MLOC_51191, MLOC_52260, MLOC_75846, MLOC_4541, MLOC_6633, MLOC_12985, MLOC_38340, MLOC_56811, MLOC_63626, MLOC_64358, MLOC_65574, MLOC_1377, MLOC_10019, MLOC_68105, MLOC_14136, MLOC_12299, MLOC_60577, MLOC_9041, MLOC_19160, MLOC_56676, MLOC_40523, MLOC_20738, MLOC_57002, MLOC_67333, MLOC_2310, MLOC_60235, MLOC_12135, MLOC_824, MLOC_11990, MLOC_77446, MLOC_61145, MLOC_9931, MLOC_63336, MLOC_41589, MLOC_27721, MLOC_54983, MLOC_59997, MLOC_72777, MLOC_5461, MLOC_56820, MLOC_53029, MLOC_11707, MLOC_38476, MLOC_40798, MLOC_42618, MLOC_45409, MLOC_51456, MLOC_3724, MLOC_38263, MLOC_64461, MLOC_74018, MLOC_69804, MLOC_6879, MLOC_34262, MLOC_20045, MLOC_53845, MLOC_45302, MLOC_57278, MLOC_19228, MLOC_22343, MLOC_65646, MLOC_58506, MLOC_58508, MLOC_58507, MLOC_65368, MLOC_65978, MLOC_36976, MLOC_69302, MLOC_60529, MLOC_67137, MLOC_74704, MLOC_17904, MLOC_72613, MLOC_35028, MLOC_174, MLOC_40292, MLOC_20354, MLOC_81908, MLOC_70465, MLOC_13836, MLOC_59533, MLOC_6793