

**ANNA HAWLICZEK**<sup>1</sup>  
**BRADLEY TILL**<sup>2,3</sup>  
**JOANNA JANKOWICZ-CIEŚLAK**<sup>2</sup>  
**EWA BORŻĘCKA**<sup>1</sup>  
**KATARZYNA TOFIL**<sup>1</sup>  
**ADAM KRAL**<sup>1</sup>  
**HANNA BOLIBOK-BRĄGOSZEWSKA**<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, SGGW

<sup>2</sup> International Atomic Energy Agency, Vienna International Centre, Vienna, Austria

<sup>3</sup> present address: Agriaquaculture Nutritional Genomic Center (CGNA) Temuco, Chile  
e-mail: anna\_hawliczek\_strulak@sggw.pl

## Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie w ocenie zróżnicowania genów oraz w identyfikacji ich funkcjonalnych wariantów \*

Mając na uwadze ciągły wzrost liczby ludności na świecie oraz zmiany klimatu, wprowadzenie bardziej wydajnych odmian roślin uprawnych wydaje się niezbędne. Bardzo często pożądaną zmienność genetyczną i genotypy o interesujących kombinacjach allelicznych można znaleźć w odmianach lokalnych oraz w dzikich formach gatunków uprawnych. Szczegółowa wiedza na temat zróżnicowania genetycznego zgromadzonego w kolekcjach gatunków roślin uprawnych jest kluczowym elementem umożliwiającym ich efektywne wykorzystanie w programach hodowlanych.

Podjęto próbę opracowania ekonomicznej procedury umożliwiającej ocenę zróżnicowania wybranych genów w heterogennych formach żyta. Wykorzystano 95 form o różnym stopniu udoskonalenia i pochodzeniu geograficznym. Do analiz użyto pul zbiorczych DNA, uzyskanych z 96 roślin reprezentujących poszczególne formy. Dla każdej z badanych form zamplifikowano, a następnie zsekwencjonowano 6 genów (*AACT1*, *Pbf*, *Fba*, *SecB*, *Gsp-1*, *Tlp*), o długości od 456 do 4638 pz (łącznie 9,141 pz). W efekcie analizy bioinformatycznej odczytów Illumina MiSeq zidentyfikowano 1000 miejsc polimorficznych oraz 1132 różne warianty alleliczne, w tym warianty wpływające na funkcje genu. Frekwencje poszczególnych alleli wynosiły od 0,001 do 1, a największą grupę stanowiły zmiany pojedynczych nukleotydów (SNP). Spośród zidentyfikowanych

---

\* Badania sfinansowane ze środków NCN — projekt DEC-2014/14/E/NZ9/00285

wariantów 27% było unikatowych i pojawiło się tylko w jednej z analizowanych form. Ilość miejsc polimorficznych w obrębie jednej akcesji zawierała się pomiędzy 594 a 867.

W celu potwierdzenia wiarygodności zastosowanej metody, dla wybranych materiałów przeprowadzono walidację uzyskanych wyników. Analizy wykonano na 10-20 pojedynkach, co okazało się wystarczające do potwierdzenia występowania SNP, których częstotliwość *in silico* określono na min 0,04. W przypadku genu *Pbf*, dla jednej z analizowanych form potwierdzono przy użyciu sekwencjonowania Sangera występowanie mutacji, która według analiz bioinformatycznych zmienia funkcje badanego genu (mutacja typu nonsens).

Uzyskane wyniki wskazują, że zastosowana metodyka jest stosunkowo niedrogą i wiarygodną metodą badania zróżnicowania genów w heterozygotycznym i heterogennym gatunku *Secale cereale* oraz umożliwia szybka i skuteczną identyfikację potencjalnych wariantów funkcjonalnych w badanych kolekcjach.