

KATARZYNA STELMACH
ALICJA MACKO-PODGÓRNI
RAFAŁ BARAŃSKI
DARIUSZ GRZEBELUS

Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Zastosowanie technik genotypowania TaqMan[®] oraz tetra-primer ARMS-PCR do identyfikacji polimorfizmów punktowych zasocjowanych z genetycznymi determinantami kształtu korzenia marchwi

**The use of TaqMan[®] and tetra-primer ARMS-PCR genotyping techniques
for identification of single nucleotide polymorphisms associated with genetic
determinants of root shape of carrot**

W ostatnich dwóch dekadach zaobserwowano znaczący wzrost tempa rozwoju zróżnicowanych systemów markerów molekularnych oraz odpowiadających im zaawansowanych platform detekcyjnych. Markery oparte na polimorfizmach pojedynczego nukleotydu (SNP), ze względu na częstość ich występowania w genomach bardzo szybko zyskały uznanie w badaniach z zakresu hodowli molekularnej roślin. Wśród najczęściej wykorzystywanych technik genotypowania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu znajdują się sondy TaqMan[®], mikromacierze DNA, oraz technologia genotypowania przez sekwencjonowanie (GBS). W celu obniżenia kosztów genotypowania opracowano również techniki oparte na standardowej reakcji łańcuchowej polimerazy z zastosowaniem zmodyfikowanych starterów, między innymi technikę tetra-primer ARMS-PCR. W niniejszej pracy zidentyfikowano pięć markerów SNP zasocjowanych z genetycznymi determinantami kształtu korzenia spichrzowego marchwi oraz dokonano ich przekształcenia do markerów wykrywalnych przy zastosowaniu technologii TaqMan[®] oraz tetra-primer ARMS-PCR. Przydatność wymienionych technik zweryfikowano poprzez genotypowanie 40 wybranych odmian populacyjnych marchwi typu zachodniego. Przeanalizowano zbieżność wyników identyfikacji genotypów otrzymanych przy zastosowaniu wyżej wymienionych technik oraz metody referencyjnej GBS. Techniki te oceniono pod kątem możliwości wykorzystania ich do opracowania wiarygodnych markerów specyficznych zasocjowanych z genetycznymi determinantami kształtu korzenia marchwi.

Słowa kluczowe: ARMS-PCR, GWAS, marchew, MLM, polimorfizm pojedynczego nukleotydu, sondy TaqMan®

Over the last two decades a significant increase has been observed in the pace of development of diverse systems of molecular markers and the corresponding advanced detection platforms. Owing to their ubiquity in genomes, markers based on single nucleotide polymorphism (SNP) promptly gained recognition within research on molecular breeding of plants. Amongst the most widely used genotyping techniques of a single nucleotide polymorphisms are the TaqMan® probes, DNA micro-arrays and the genotyping-by-sequencing (GBS) technology. Techniques based on standard polymerase chain reaction with the use of modified primers, including the tetra-primer ARMS-PCR technique, have also been devised with in order to decrease the costs of genotyping. The current work identifies five SNP markers associated with genetic determinants of the shape of carrot taproot and converts them into markers detectable by the TaqMan® and tetra-primer ARMS-PCR technologies. The usefulness of the above techniques has been verified by genotyping 40 selected cultivars of Western-type carrot. The present authors have also analysed the convergence of the results obtained through the mentioned techniques and a GBS reference method. The techniques have been evaluated in terms of their usefulness for designing reliable specific markers associated with genetic determinants of the shape of the carrot root.

Key words: ARMS-PCR, GWAS, carrot, MLN

WSTĘP

Marchew uprawna (*Daucus carota* subsp. *sativus*) należy do najważniejszych gatunków warzyw korzeniowych uprawianych na świecie. W Polsce zajmuje trzecie pod względem powierzchni uprawy miejsce wśród warzyw, po kapuście i cebuli. Powierzchnia uprawy w 2015 roku wynosiła 22,1 tys. ha, stanowiąc 12,6% ogólnej uprawy warzyw gruntowych (Rocznik Statystyczny Rolnictwa, 2016). Szacuje się, że proces udomowienia marchwi rozpoczął się ponad 2 tysiące lat temu (Stolarczyk i Janick, 2011), a centrum udomowienia stanowi Azja Centralna (Iorizzo i in., 2013). W wyniku tego procesu powstały dwie główne grupy: marchew typu wschodniego/azjatyckiego charakteryzująca się fioletowym lub żółtym korzeniem, oraz marchew typu zachodniego obejmująca odmiany wytwarzające korzeń koloru pomarańczowego, ale również czerwonego lub białego (Banga, 1963). Cechy ważne z punktu widzenia udomowienia marchwi obejmowały między innymi zdolność tworzenia mięsistego korzenia spichrzowego, brak tendencji do jego rozwidlania oraz dwuletni okres wegetacyjny. W dalszej kolejności prowadzono selekcję pod kątem cech związanych z jakością korzenia, między innymi jego kolorem i kształtem. Marchew typu zachodniego jest lepiej przystosowana do przetwórstwa oraz produkcji na skalę komercyjną, głównie z powodu wytwarzania korzenia spichrzowego o pożądanym cylindrycznym kształcie. Dodatkowo, typ zachodni charakteryzuje się mniejszą tendencją do pośpiechowatości czyli tendencji do wytwarzania pędów generatywnych w pierwszym roku uprawy, oraz wyższą zawartością karotenoidów (Rubatzky i in., 1999).

Poznanie genetycznych podłoż zmienności fenotypowej od lat stanowiło główną siłę napędową badań z zakresu selekcji wspomaganą markerami (MAS, ang. Marker-Assisted Selection) oraz hodowli molekularnej roślin uprawnych. Rozwój technologii wysokoprzepustowego sekwencjonowania pozwolił na identyfikację polimorfizmów

pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. Single Nucleotide Polymorphism) na niespotykaną wcześniej skalę. Opracowano strategie wykorzystania informacji łączące wyniki fenotypowej oceny osobników i wysokowydajnego genotypowania pozwalające na wskazanie czynników genetycznych odpowiedzialnych za warunkowanie cech jakościowych i ilościowych (QTL, ang. Quantitative Trait Loci) (Brachi i in., 2011). Kluczowym założeniem jest powiązanie wyników fenotypowania przeprowadzonego na dużą skalę z wynikami genotypowania wykorzystującymi dużą liczbę polimorfizmów równomiernie pokrywających cały genom. Podejście takie określa się jako genomowe badania asocjacji (GWAS, ang. Genome Wide Association Study). Obecnie GWAS jest powszechnie wykorzystywaną techniką mapowania asocjacyjnego u wielu organizmów modelowych (Korte i Farlow, 2013) pozwalającą na identyfikację tzw. SNP diagnostycznych skorelowanych ze zmiennością analizowanych cech ilościowych. Wytypowane polimorfizmy diagnostyczne mogą zostać w dalszych etapach potwierdzone i dostosowane do rutynowo stosowanych markerów molekularnych opartych na technice łańcuchowej reakcji polimerazy (PCR, ang. Polymerase Chain Reaction) (Mammadov i in., 2012).

Dostępne wysokowydajne techniki genotypowania SNP opierają się w większości na sekwencjonowaniu DNA bądź wykorzystaniu PCR. Wśród najczęściej wykorzystywanych znajdują się: pyrosekwencjonowanie, genotypowanie przez sekwencjonowanie (GBS, ang. Genotyping-By-Sequencing), mikromacierze DNA oraz sondy TaqMan[®]. Technologia TaqMan była jedną z pierwszych stosowanych do analizy zmienności sekwencji DNA z użyciem reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (ang. Real-time PCR) (Holland i in., 1991). Obecnie, ze względu na: (1) zwiększenie specyficzności reakcji z wykorzystaniem sond TaqMan[®] poprzez zastosowanie technologii MGB (ang. Minor Groove Binder) pozwalającej na podwyższenie temperatury hybrydyzacji, co skutkuje lepszą stabilizacją kompleksu sonda-matryca DNA oraz (2) znaczne ułatwienie i skrócenie czasu przygotowania próbek do analizy, technologia ta cieszy się dużą popularnością, między innymi w badaniach dotyczących genotypowania polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (Campsall i in., 2004; Giancola i in., 2006; Lindh i in., 2005).

W celu obniżenia kosztów genotypowania opracowano techniki oparte na standardowej reakcji łańcuchowej polimerazy (PCR) z zastosowaniem zmodyfikowanych starterów, między innymi technikę Bi-PASA (ang. Bidirectional PCR Amplification of Specific Alleles; Liu i in., 1997), HRM (ang. High Resolution Melting; Wittwer i in., 2003) czy ARMS-PCR (ang. Amplification Refractory Mutation System Polymerase Chain Reaction; Newton i in., 1989). Opracowano również techniki identyfikacji SNP oparte na wprowadzaniu na drodze PCR sztucznych allelo-specyficznych miejsc rozpoznania dla endonukleaz restrykcyjnych (Dry, 1991). Zaproponowana przez Ye i in. (2001) metodyka tetra-primer ARMS-PCR zakłada wykorzystanie dwóch par starterów do selektywnej amplifikacji alleli w danym *locus*. Została z powodzeniem zastosowana w wielu projektach, głównie z zakresu medycyny (Baris i in., 2010; Huang i in., 2013; Vannucchi i in., 2006). Opublikowane przez Chiapparino i in. (2004) oraz Rubio i in. (2008) prace były pierwszymi wykazującymi przydatność tej techniki w genotypowaniu SNP i opracowaniu funkcjonalnych markerów dla genomów roślinnych.

W ramach niniejszej pracy dokonano identyfikacji rejonów genomu potencjalnie związanych z procesem rozwoju korzenia spichrzowego u marchwi typu zachodniego oraz

wytypowano polimorfizmy pojedynczego nukleotydu zasocjowane z współczynnikiem kształtu i zbieżności korzenia. Przeprowadzono genotypowanie roślin reprezentujących 40 wybranych odmian populacyjnych marchwi uprawnej typu zachodniego w obrębie pięciu wytypowanych *loci* diagnostycznych, przy zastosowaniu technik TaqMan® oraz tetra-primer ARMS-PCR. Przeanalizowano zbieżność wyników identyfikacji genotypów otrzymanych przy zastosowaniu wyżej wymienionych technik oraz metody referencyjnej GBS. Techniki te oceniono pod kątem możliwości wykorzystania ich do opracowania wiarygodnych markerów specyficznych zasocjowanych z genetycznymi determinantami kształtu korzenia marchwi.

MATERIAŁ I METODY

Identyfikacja polimorfizmów diagnostycznych

Do identyfikacji rejonów genomu potencjalnie zaangażowanych w proces rozwoju korzenia spichrzowego u marchwi wykorzystano 95 odmian populacyjnych typu zachodniego o różnym kształcie korzenia. Były one oceniane w doświadczeniach polowych w latach 2014 i 2015 w trzech lokalizacjach (Raciborowice, woj. małopolskie; Gołębiew, woj. łódzkie; Nochowo, woj. wielkopolskie). Przeprowadzono fenotypowanie 10 korzeni spichrzowych danej odmiany w każdej lokalizacji. Ocenie poddano trzy cechy mierzalne: (1) długość korzenia, (2) średnicę ramienia oraz (3) średnicę nasady korzenia. Do analiz bioinformatycznych wykorzystano wartości średnie obliczone dla każdej cechy, odmiany, roku oraz lokalizacji. Genotypowaniu polimorfizmów punktowych (SNP, ang. *Single Nucleotide Polymorphism*) przy wykorzystaniu technologii GBS poddano po dwie rośliny z każdej odmiany (łącznie 180 genotypów). Zidentyfikowano łącznie 6726 SNP charakteryzujących się frekwencją w przedziale 5–95%. Identyfikację polimorfizmów wykazujących wiarygodny związek z analizowanymi cechami morfologicznymi korzenia przeprowadzono przy wykorzystaniu strategii genomowego mapowania asocjacyjnego. Analizie GWAS poddano współczynniki kształtu (stosunek długości korzenia do średnicy w ramionach) i zbieżności korzenia (stosunek średnicy korzenia w ramionach do średnicy przy nasadzie) obliczone na podstawie uśrednionych wyników fenotypowania. Analizę asocjacji przeprowadzono zgodnie z modelem MLM (ang. *Mixed Linear Model*), uwzględniającym wpływ struktury zmienności genetycznej populacji, wykorzystując program TASSEL 5 (Zhang i in., 2010). Do analizy MLM z reestymacją wariancji po każdym markerze wykorzystano otrzymane informacje o wartościach cechy, polimorfizmach, strukturze populacji oraz obliczonej macierzy pokrewieństwa (*K*, ang. *Kinship matrix*) (Yo i in., 2006). Dopasowanie modelu do danych sprawdzono przez porównanie wykresu wartości $-\text{Log}_{10}(p)$ spodziewanych i otrzymanych. Poziom istotności, powyżej którego marker został uznany za związany z cechą, obliczono z uwzględnieniem korekty Bonferroniego (Armstrong, 2014).

Material roślinny

Do weryfikacji przydatności techniki tetra-primer ARMS-PCR oraz sond TaqMan® w genotypowaniu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) wykorzystano rośliny reprezentujące 40 odmian populacyjnych marchwi uprawnej typu zachodniego reprezentujących 13 typów kształtu korzenia spichrzowego (tab. 1).

Lista i charakterystyka odmian marchwi wykorzystanych w doświadczeniu
List and characteristics of carrot cultivars used in the experiment

Numer polowy No.	Numer WGRU No.	Odmiana Cultivar	Typ Type	Pochodzenie Origin
RS01	7123	Foram	Carrot-Amsterdam	NLD
RS02	3950	Cylindra Amsterdamer	Carrot-Amsterdam	NLD
RS04	3981	Amsterdam 5564	Carrot-Amsterdam	GBR
RS06	5477	Amsterdam Forcing	Carrot-Amsterdam	GBR
RS11	6511	Karotan	Carrot-Autumn King	GBR
RS14	6513	Autumn King Vita Longa	Carrot-Autumn King	GBR
RS17	6021	Rothild	Carrot-Autumn King	DEU
RS22	6484	Feonia	Carrot-Berlic/Imper	DNK
RS25	3851	Perfecta	Carrot-Berlicum	GBR
RS26	12403	Lange Rote St O Herz 2/Zino	Carrot-Berlicum	DEU
RS29	6045	Camberley	Carrot-Berlicum	GBR
RS33	8860	Chantenay Royal	Carrot-Chantenay	FRA
RS35	3882	Royal Chantenay	Carrot-Chantenay	USA
RS36	4004	Shin Kuroda Gosun	Carrot-Chantenay	JPN
RS39	5090	Chantenay Long Type	Carrot-Chantenay	USA
RS42	7255	Criolla	Carrot-Chantenay	ARG
RS45	5128	Danvers Red Cored	Carrot-Danvers	USA
RS46	6118	Danvers Half Long E W K's Scarlet Intermediate	Carrot-Danvers	GBR
RS47	3969	Early Spartan	Carrot-Danvers	GBR
RS51	8109	Danvers Half Long	Carrot-Danvers	USA
RS52	10110	Danvers Half Long Danvers 126	Carrot-Danvers	GBR
RS54	10414	Early Scarlet Wonder	Carrot-Early Sh Horn	JPN
RS59	6489	French Forcing Horn	Carrot-Early Sh Horn	GBR
RS61	9311	Early Scarlet Horn	Carrot-Early Sh Horn	-
RS64	7258	Rood Hild	Carrot-Flakkee	NLD
RS67	3983	Flattie (Oxheart)	Carrot-Guerande	-
RS70	5814	Gold Pak 28	Carrot-Imperator	USA
RS72	3907	Imperator 408	Carrot-Imperator	USA
RS75	3917	Long Imperator 58	Carrot-Imperator	USA
RS80	7121	Kardinal Marche De Paris	Carrot-M De Paris	DDR
RS83	8895	Tip Top	Carrot-Nantes	NLD
RS86	5994	Juwarot	Carrot-Nantes	DEU
RS88	7253	Hilmar	Carrot-Nantes	DDR
RS91	3982	Red Elephant	Carrot-St Valery	GBR
RS93	10322	Kiel Red	Carrot-St Valery	GBR
RS94	6788	St Valery	Carrot-St Valery	POL
RS95	6004	Kieler Rote (Bauers)	Carrot-St Valery	DEU
RS96	6163	New Red Intermediate	Carrot-St Valery	GBR
RS98	6330	Egmont Gold	Fodder Carrot	NZL
RS100	11290	Flavius	Fodder Carrot	-

Każda odmiana była reprezentowana przez dwie rośliny. DNA każdej z roślin wyizolowano przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) zgodnie z metodyką producenta.

Projektowanie sond TaqMan® i starterów tetra-primer ARMS-PCR

Na podstawie sekwencji nukleotydowych otaczających polimorfizmy zasocjowane ze współczynnikiem kształtu i zbieżności korzenia marchwi opracowano markery SNP wykrywalne przy zastosowaniu sond TaqMan® oraz techniki tetra-primer ARMS-PCR.

Tabela 2

Charakterystyka starterów oraz sond TaqMan® wykorzystanych do genotypowania pięciu polimorfizmów pojedynczego nukleotydu o znaczeniu diagnostycznym
Characteristics of primers and TaqMan® probes used for genotyping five single nucleotide polymorphisms with diagnostic significance

Locus	Starter Primer	Sekwencje starterów (5' → 3') Primer sequences (5' → 3')	Sonda Probe	Sekwencje sond (5' → 3') Probe sequence (5' → 3')	Identyfikowany allel Identified allele	Zakres wartości ΔR_{n1} i ΔR_{n2} otrzymanych dla badanej kolekcji roślin Range of ΔR_{n1} and ΔR_{n2} values obtained for the tested plant collection	Zakres wartości granicznych R_{a1} : R_{a2} dla homozygot obu typów i heterozygot Range of threshold values R_{a1} : R_{a2} for homozygotes of both types and heterozygotes
chr2_393 27561	forward	CGCCACAGATTTAAAC CCTTCAG	chr2_393275 61_V	ACTTGTCATA ATTGGC	A	0,03 – 3,24	A/A: > 5,0 C/C: < 0,5
	reverse	CGATCCGGACAGGAA AAGATTACT	chr2_393275 61_M	CTTGTCATCAT TTGGC	C	0,05 – 1,19	A/C: ≤ 5,0; ≥ 0,5
chr3_355 83370	forward	AGCTCTAACGTTTTAT GACTGCAACT	chr3_355833 70_V	CCATTGATA TATTTTC	A	0,11 – 1,73	A/A: > 3,0 C/C: < 0,3
	reverse	GCTTTGAGTTTAGTAG TATGTGACTTTGTG	chr3_355833 70_M	CCATTGATCT ATTTTC	C	0,15 – 3,44	A/C: ≤ 3,0; ≥ 0,3
chr4_180 83099	forward	GCTATACCGCTATCAG GAAACCAAT	chr4_180830 99_V	CACCCTTCAC ATTTT	C	0,24 – 2,48	C/C: > 5,0 G/G: < 0,5
	reverse	CATTCTCATTGTGT TCTCCAGTTT	chr4_180830 99_M	ACCCTTGACA TTTT	G	0,07 – 3,44	C/G: ≤ 5,0; ≥ 0,5
chr5_418 06771	forward	GCTGTTTCCGATTGCG AATAGAAG	chr5_418067 71_V	ACAACCCAAA TCAACC	T	0,08 – 2,93	T/T: > 3,0 C/C: < 0,3
	reverse	CTGCTACGTTTGACGC CATTTC	chr5_418067 71_M	CAACCCAGAT CAACC	C	0,39 – 4,34	T/C: ≤ 3,0; ≥ 0,3
chr8_393 27561	forward	CGGCCTTGTCATAAGC TAAAGCT	chr8_393275 61_V	CATTGGAAC GGCTGAAG	C	0,05 – 3,21	C/C: > 5,0 T/T: < 0,5
	reverse	GCAGAAATACGAGAT TCCACAAGGA	chr8_393275 61_M	CATTGGAAC AGCTGAAG	T	0,11 – 1,88	C/T: ≤ 5,0; ≥ 0,5

W technice genotypowania z użyciem sond TaqMan® zastosowano dwa startery (forward i reverse) oraz dwie sondy wyznakowane na końcu 5' barwnikiem VIC lub FAM z przyłączonym wygaszaczem na końcu 3'. Sondy TaqMan® zostały zaprojektowane w ramach zlecenia przez firmę Applied Biosystems na podstawie dostarczonych

sekwencji obejmujących region 1000 nt otaczających analizowany Polimorfizm punktowy. Startery wykorzystane w technice tetra-primer ARMS-PCR zaprojektowano przy użyciu oprogramowania PRIMER1 (<http://primer1.soton.ac.uk/primer1.html>).

Tabela 3

Charakterystyka starterów tetra-primer ARMS-PCR wykorzystanych w doświadczeniu. Kolorem czerwonym oznaczono pozycje nukleotydów zdegenerowanych (oznaczenie wg systemu IUPAC), pogrubieniem oznaczono niedopasowania nukleotydów względem matrycy
Characteristics of tetra-primer ARMS-PCR primers used in the experiment. The colour red marks the positions of degenerated nucleotides (marking acc. to IUPAC system), the bold script marks the mismatch of nucleotides relative to the matrix

Locus	Starter Primer	Sekwencja (5' → 3') Sequence (5' → 3')	Wielkość amplikonu (pz) Amplicon size (bp)	T _m (°C)	Struktura drugorzędowa ^a Secondary structure ^a	Dimer ^b
1	2	3	4	5	6	7
chr2_3932 7561	wewnętrzny forward (allel C) internal forward (allele C)	CAGATTTAAACCCCTCAGG TACTTGTCGTC	allel C/allele C: 187	60,3	brak	brak
	wewnętrzny reverse (allel A) internal reverse (allele A)	CGGACAGGAAAAGATTACT GGCCAAGTT	allel A/allele C: 116	59,9	brak	brak
	zewnętrzny forward external forward	TTCTCAGATGAAGAATCTT CCAGCAACA		57,0	brak	brak
	zewnętrzny reverse external reverse	ATATGGGGTTGGTGAATT TTTATGGAC	startery zewnętrzne /external primers: 245	57,0	brak	brak
chr3_3558 3370	wewnętrzny forward (allel A) internal forward (allele A)	CGATTGTCA K CTAGTTCCC ATTGGTA	allel A/allele A: 174	56,4 - 58,0	brak	brak
	wewnętrzny reverse (allel C) internal reverse (allele C)	GTATGTGACTTTGTGGGAT GGAAAACAG	allel C/ allele C: 124	58,5	brak	brak
	zewnętrzny forward external forward	ACGAAACGTTATAATCAAC TGGGACAGG		58,5	silna	homo- dimer
	zewnętrzny reverse external reverse	ACATTGGATGGTTTGTACC AGAATTCA	startery zewnętrzne /external primers: 244	55,5	brak	brak
chr4_1808 3099	wewnętrzny forward (allel C) internal forward (allele C)	TATCAGGAAACCAATAGCC ACCCATC	allel C/allele C: 127	58,0	brak	brak
	wewnętrzny reverse (allel G) internal reverse (allele G)	CTTCATTGTGTGC W GCAC AAAATCTC	allel G/allele G: 152	56,7 - 58,2	brak	brak
	zewnętrzny forward external forward	GAAGAAATGACAACCTGGT TTGTATTGCT		57,3	brak	brak
	zewnętrzny reverse external reverse	CATGAAATAAGATAAGACC TCCCATGGC	startery zewnętrzne /external primers: 226	58,5	brak	brak
chr5_4180 6771	wewnętrzny forward (allel T) internal forward (allele T)	GATTGCGAATAGAAGCAGG GTTGCTT	allel T/allele T: 243	61,6	brak	brak
	wewnętrzny reverse (allel C) internal reverse (allele C)	CTACGTTTGACGCCATTAC AACCAAG	allel C/allele C: 141	61,5	brak	brak
	zewnętrzny forward external forward	CAGTCCCTTGCCGTTGAA ATACACGAACG		63,0	brak	hetero- dimer
	zewnętrzny reverse external reverse	AAGGGCGAGATTGGAGTTG AGGAGATGGAG	startery zewnętrzne /external primers: 285	64,4	brak	brak

1	2	3	4	5	6	7
chr8 3932 7561	wewnętrzny forward (allel C)	TTGTCATAAGCTAAAGCTG	allel C/allele C: 137	58,9 - 60,3	brak	brak
	internal forward (allele C)	CYTCTTCATCC				
	wewnętrzny reverse (allel T)	TKGGGTCTGGCTTGGGACA	allel T/allele T: 103	62,9 - 64,3	brak	brak
	internal reverse (allele T)	TTTGGACCA				
	zewnętrzny forward	AGGGAAGTTAAGGTGTGCT	62,9	brak	hetero- dimer	
	external forward	TTAGGACCCC				
zewnętrzny reverse	CGAGACATTATAGGGGTGT	startery zewnętrzne /external primers: 182	62,9	brak	brak	
external reverse	GAGAAGGCG					

^a brak/lack; silna/strong

^b brak/lack

Zaprojektowane startery wewnętrzne charakteryzowały się niedopasowaniem pierwszego nukleotydu na końcu 3', zwiększającym selektywność amplifikacji. W celu dodatkowego wzmocnienia specyficzności amplifikacji wykorzystano dodatkowe niedopasowanie nukleotydów w pozycji -2 końca 3' startera wewnętrznego (Ye i in., 2001). Zakres długości produktów obejmował 100–500 pz, a stosunek długości produktu dłuższego do krótszego co najmniej 1,2. W przypadku występowania dodatkowego polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w obrębie miejsca przyłączenia startera stosowano tzw. nukleotydy zdegenerowane w sekwencji starterów — połowa syntezowanych cząsteczek startera zawiera w swojej sekwencji nukleotyd odpowiadający pierwszemu allelowi, połowa zawiera nukleotyd odpowiadający drugiemu allelowi obecnemu w analizowanym *locus* SNP. Każdy z zaprojektowanych starterów został przeanalizowany z użyciem oprogramowania OligoAnalyzer 3.1 (<https://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) pod kątem tworzenia struktur drugorzędowych oraz homo- i heterodimerów mogących zmniejszyć wydajność PCR. Charakterystykę sond i starterów zaprojektowanych na potrzeby doświadczenia przedstawiono w tabeli 2 i 3.

Reakcje PCR i pomiar intensywności fluorescencji

Reakcje amplifikacji z użyciem sond TaqMan[®] przeprowadzono w mieszaninie o objętości 25 µl zawierającej 11,25 µl matrycy DNA o stężeniu 0,44 ng/µl lub wody (kontrola negatywna), 12,5 µl 2X TaqMan[®] Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) oraz 1,25 µl 20X mieszaniny indywidualnie zaprojektowanych starterów i sond TaqMan[®] (Applied Biosystems). Reakcja PCR obejmowała etap aktywacji polimerazy AmpliTaq Gold[®] w 95°C przez 10 min oraz 40 cykli składających się z etapu denaturacji w 95°C przez 15 s i przyłączenia starterów/wydłużania nici DNA w 60°C przez 1 min. Przed rozpoczęciem oraz po zakończeniu PCR przeprowadzono pomiar intensywności emisji fluorescencji pochodzący od barwników związanych z sondami. Reakcje PCR oraz pomiary fluorescencji były przeprowadzane w termocyklerze StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Wyniki pomiarów uzyskano w formie (1) pliku zawierającego wartości ΔR_n otrzymane dla każdego z alleli obecnych w analizowanym *locus* oraz (2) wykresu punktowego dyskryminacji allelicznej. Współczynnik R_n oznacza stosunek sygnału fluorescencji emitowanego przez barwnik związany z sondą (VIC lub FAM) do sygnału emitowanego przez barwnik pasywny (ROX). ΔR_n stanowi różnicę tego stosunku obserwowaną przed i po zakończeniu reakcji PCR.

Na podstawie uzyskanego stosunku: $\frac{\Delta R_{n1}}{\Delta R_{n2}} = R_{allele1:allele2}$ dokonano manualnej identyfikacji analizowanych genotypów.

Tabela 4

Zestawienie warunków reakcji tetra-primer ARMS-PCR oraz składu mieszaniny reakcyjnej zoptymalizowanych dla czterech polimorfizmów diagnostycznych
Collation of tetra-primer ARMS-PCR conditions and the composition of the reaction mixture optimised for four diagnostic polymorphisms

Chromosom Chromosome	Pozycja SNP SNP position	Warunki reakcji PCR PCR conditions				Skład mieszaniny reakcyjnej Composition of reaction mixture	
		etap stage	temp. (°C)	czas time (s)	liczba cykli number of cycles	odczynnik reagent	stężenie concentration
1	2	3	4	5	6	7	8
2	39327561	denaturacja wstępna/pre-denaturation	95	300	–	bufor/buffer	1x
		denaturacja/denaturation	95	60		dNTP	0,2 mM
		annealing	69	30	30	Wewnętrzny/internal forward (allel/allele C)	0,8 µM
		elongacja/elongation	72	30		wewnętrzny /internal reverse (allel/allele A)	0,9 µM
		elongacja końcowa/final elongation	72	120	–	Zewnętrzny/external forward	0,1 µM
							zewnętrzny /external reverse
					polimeraza/polymerase DreamTaq	0,05 U/µl	
3	35583370	denaturacja wstępna/pre-denaturation	95	300	–	bufor/buffer	1x
		denaturacja/denaturation	95	60		dNTP	0,2 mM
		annealing	62,5	30	30	wewnętrzny /internal forward (allel/allele A)	1 µM
		elongacja/elongation	72	30		wewnętrzny/internal reverse (allel/allele C)	1,2 µM
		elongacja końcowa final elongation	72	120	–	zewnętrzny /external forward	0,2 µM
							zewnętrzny/external reverse
					polimeraza/polymerase DreamTaq	0,05 U/µl	
4	18083099	denaturacja wstępna pre-denaturation	95	300	–	bufor/buffer	1x
		denaturacja/denaturation	95	60		dNTP	0,15 mM
		annealing	62,4	45	30	wewnętrzny /internal forward (allel/allele C)	0,5 µM
		elongacja/elongation	72	30		wewnętrzny /internal reverse (allel/allele G)	0,9 µM
		elongacja końcowa/final elongation	72	120	–	zewnętrzny/external forward	0,1 µM
							zewnętrzny/external reverse
					polimeraza/polymerase DreamTaq	0,05 U/µl	

1	2	3	4	5	6	7	8
						bufor/buffer	1x
		denaturacja wstępna pre-denaturation	95	120	–	dNTP	0,25 mM
		denaturacja/denaturation	95	60		wewnętrzny /internal forward (allel/allele T)	1 μM
5	41806771	annealing	66	30	30	wewnętrzny /internal reverse (allel/allele C)	1 μM
		elongacja/elongation	72	30		zewnętrzny/external forward	0,5 μM
		elongacja końcowa final elongation	72	300	–	zewnętrzny/external reverse	0,5 μM
						polimeraza/polymerase DreamTaq	0,05 U/μl

Warunki reakcji tetra-primer ARMS-PCR zostały dobrane indywidualnie dla każdego z analizowanych polimorfizmów. Optymalizacja PCR opierała się na doborze odpowiednich stężeń odczynników i matrycy oraz warunków termicznych reakcji. Wszystkie reakcje PCR były przeprowadzane w termocyklerze *Mastercycler egradient* lub *Mastercycler pro vapo.protect* (Eppendorf). Na pierwszym etapie dobierano odpowiednie warunki reakcji z użyciem wyłącznie starterów zewnętrznych, ponieważ powstały produkt służy jako matryca do amplifikacji fragmentów specyficznych dla alleli. W drugim etapie, do już zoptymalizowanej reakcji dodawano startery wewnętrzne i analizowano otrzymany wzór prążkowy. W przypadku otrzymania dodatkowych produktów niespecyficznych dokonywano dalszej optymalizacji reakcji PCR. Zoptymalizowane warunki reakcji PCR oraz skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli 4.

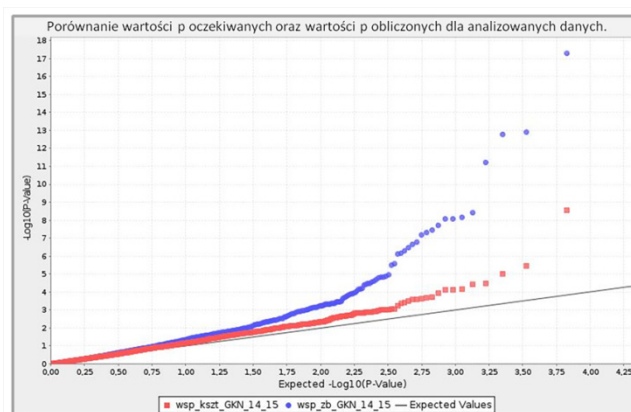
W celu określenia przydatności techniki TaqMan® oraz tetra-primer ARMS-PCR do przekształcenia polimorfizmów SNP do markerów specyficznych otrzymane wyniki genotypowania porównano z wynikami uzyskanymi dla pięciu losowo wybranych polimorfizmów diagnostycznych zasocjowanych ze współczynnikiem kształtu i zbieżności korzenia, zidentyfikowanych w toku analizy wyników GBS.

WYNIKI I DYSKUSJA

Identyfikacja rejonów genomu związanych z genetycznymi determinantami kształtu korzenia

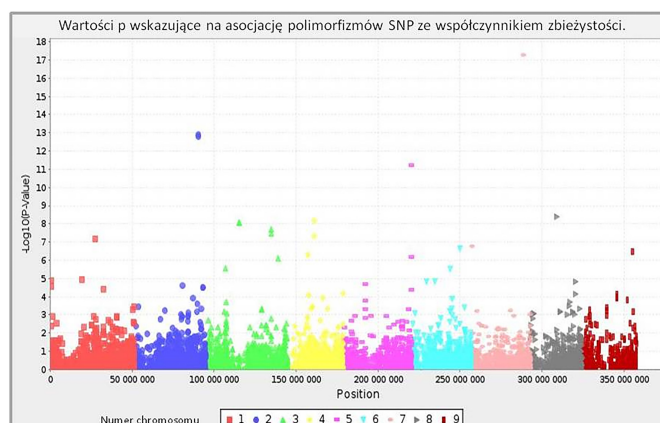
W pierwszym etapie identyfikacji rejonów genomu związanych z współczynnikiem kształtu i zbieżności korzenia marchwi obliczono wartości $-\text{Log}_{10}(p)$. Jest to wartość mówiąca o poziomie asocjacji pomiędzy każdym z polimorfizmów a badaną cechą. Ze względu na możliwość wzrostu błędu α wynikającą z dużej liczby testowanych polimorfizmów, co przekłada się na jednoczesne testowanie wielu hipotez, mogące prowadzić do odrzucenia prawdziwej hipotezy zerowej konieczne jest przeprowadzanie korekty dla poziomu istotności. W tym celu wykorzystano korektę Bonfferoniego, zgodnie ze wzorem $\alpha' = 1 - (1 - \alpha) 1/k$, gdzie α' = wartość po korekcie Bonfferoniego α = przyjęta wartość p (0,05), k = liczba testów odpowiadająca liczbie polimorfizmów. Poziom istotności

powyżej którego zidentyfikowany polimorfizm pojedynczego nukleotydu został uznany za zasocjowany z analizowanym współczynnikiem kształtu lub zbieżności korzenia dla $p \leq 0,05$ wyniósł po korekcie $-\text{Log}_{10}(p) = 5,13$.



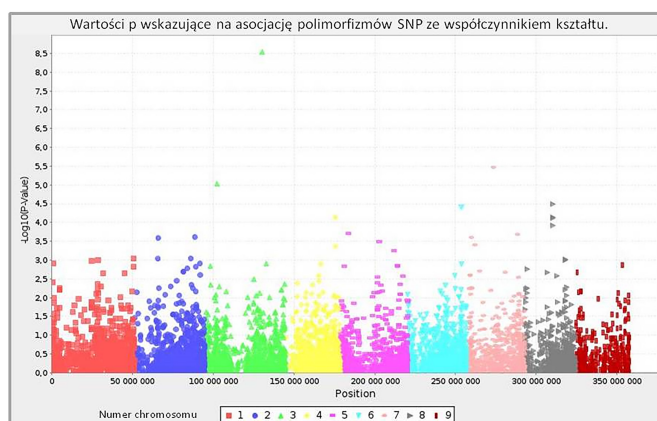
Rys. 1. Wynik porównania wartości $-\text{Log}_{10}(p)$ oczekiwanych oraz wartości $-\text{Log}_{10}(p)$ otrzymanych metodą MLM z reestymacją danych. Kolorem niebieskim oznaczono wartości $-\text{Log}_{10}(p)$ obliczone dla współczynnika zbieżności, kolorem czerwonym – dla współczynnika kształtu, linią ciągłą – wartości oczekiwane

Fig. 1. Comparison result of the expected $-\text{Log}_{10}(p)$ values and the $-\text{Log}_{10}(p)$ values obtained via the MLM method with data re-estimation. The colour blue is used for the $-\text{Log}_{10}(p)$ values calculated for the tapering coefficient, the colour red is used for shape coefficient, continuous line marks the expected value



Rys. 2. Wykres punktowy przedstawiający wartości $-\text{log}_{10}(p)$ otrzymane w wyniku analizy asocjacji z wykorzystaniem modelu MLM pomiędzy polimorfizmami SNP ze współczynnikiem zbieżności korzenia. Poziom istotności powyżej którego przyjęto, że polimorfizm jest związany z cechą wynosił $-\text{log}_{10} > 5,13$

Fig. 2. Manhattan plot of MLM analysis showing negative log_{10} values of association between SNP and root tapering coefficient. The significance threshold corresponds to negative log_{10} (NegLog10) > 5.13



Rys. 3. Wykres punktowy przedstawiający wartości $-\log_{10}(p)$ otrzymane w wyniku analizy asocjacji z wykorzystaniem modelu MLM pomiędzy polimorfizmami SNP ze współczynnikiem kształtu korzenia. Poziom istotności powyżej którego przyjęto, że polimorfizm jest związany z cechą wynosił $-\log_{10} > 5,13$

Fig. 3. Manhattan plot of MLM analysis showing negative \log_{10} values of association between SNP and root shape coefficient. The significance threshold corresponds to negative \log_{10} (NegLog10) > 5.13

Tabela 5

**Markery wykazujące istotny związek ze współczynnikiem zbieżności
Markers displaying a significant relationship with the tapering coefficient**

Lp No.	Chromosom Chromosome	Pozycja SNP SNP position	Region (pz) Region (bp)	$-\log_{10}(p)$	Obserwowana substytucja (genotyp występujący w przewodzie) Observed substitution (genotype present in excess)	Obecność polimorfizmu w rejonie sekwencji kodującej Presence of the polymorphism in the coding region ^a
1	7	31814592	66309	17,28	A/T (A)	tak
2		39327561			A/C (A)	nie
3	2	39327611	289103	12,9	G/T (G)	nie
4		41806771			T/C (T)	nie
5	5	41951269	197667	11,21	T/C (T)	tak
6	8	16133460	35	8,41	C/T (C)	tak
7		18083099			C/G (C)	tak
8	4	18083111	7548	8,16	A/T (T)	tak
9		20494477			G/T (T)	nie
10	3	20494481	1145038	8,09	A/G (A)	nie
11		40077989			A/G (G)	tak
12	3	40078041	91408	7,71	A/G (G)	tak
13	1	27477851	51	7,18	C/T (C)	tak
14	7	556948	5691	6,78	T/A (T)	tak
15	6	29526147	584	6,66	C/T (C)	nie
16	9	30762163	61561	6,48	T/G (T)	tak
17	4	14260714	186293	6,3	C/A (C)	tak
18	3	44244819	4259	6,13	A/G (A)	tak
19	3	12183461	94584	5,56	A/G (A)	tak
20	6	23719828	32863	5,51	A/G (G)	tak

Porównanie wartości $-\log_{10}(p)$ spodziewanych i otrzymanych dla obu współczynników wskazywało na odpowiednie dopasowanie modelu do testowanych

danych (rys. 1). Dla współczynnika zbieżności zidentyfikowano 20 polimorfizmów o charakterze biallelicznym, które zgrupowano w 15 regionach (rys. 2, tab. 4). Cztery polimorfizmy diagnostyczne związane ze współczynnikiem zbieżności oraz jeden związany ze współczynnikiem kształtu zostały wytypowane do opracowania metody genotypowania TaqMan[®] oraz tetra-primer ARMS-PCR.

Tabela 6

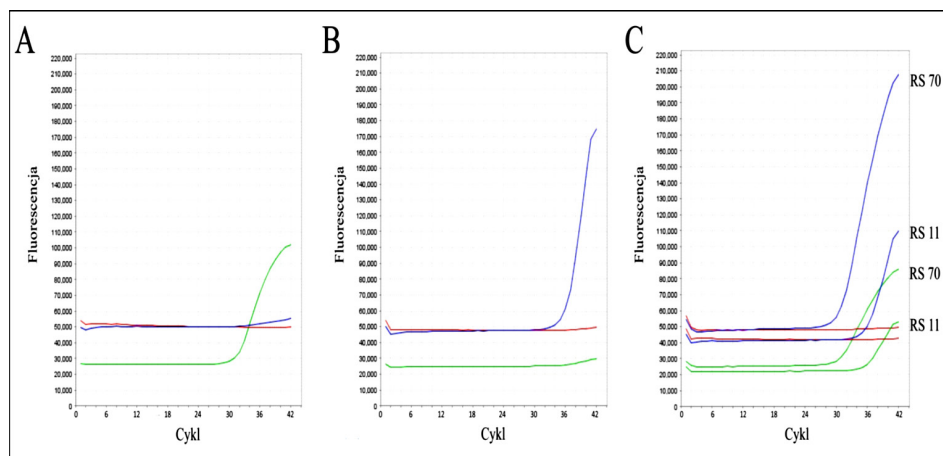
Markery wykazujące istotny związek ze współczynnikiem kształtu
Markers displaying a significant relationship with the shape coefficient

Chromosom Chromosome	Pozycja SNP SNP position	Region (pz) Region (bp)	-Log10(p)	Obserwowana substytucja (genotyp występujący w przewadze) Observed substitution (genotype present in excess	Obecność polimorfizmu w rejonie sekwencji kodującej Presence of the polymorphism in the coding region ^a
3	35583370	198988	8,54	A/C (A)	nie
7	16766588	242591	5,47	C/T (C)	tak

^atak/yes; nie/no

Genotypowanie TaqMan[®]

Otrzymane wartości ΔR_n dla *locus* chr3_35583370 mieściły się w zakresie 0,11–1,73 dla sondy chr3_35583370_V (VIC) oraz 0,15–3,44 dla sondy chr3_35583370_M (FAM) (tab. 2). Widma emisji fluorescencji pochodzące od sondy chr3_35583370_M przyjmowały wartości nawet dwukrotnie niższe niż dla sondy chr3_35583370_V (rys. 4).



Rys. 4. Locus chr3_35583370 – przykładowe wykresy zależności intensywności emisji fluorescencji od cyklu reakcji PCR dla czterech obiektów reprezentujących trzy genotypy. A – RS 22 (homozygota A/A), B – RS 54 (homozygota C/C), C – RS 11 i RS 70 (heterozygota A/C). Linie: zielona – barwnik VIC, niebieska – barwnik FAM, czerwona – barwnik ROX

Fig. 4. Locus chr3_35583370 – sample graphs of the interdependence of the fluorescence emission intensity and the PCR cycle for four objects representing three genotypes. A – RS 22 (homozygote A/A), B – RS 54 (homozygote C/C), C – RS 11 and RS 70 (heterozygote A/C). Lines: green –VIC dye, blue –FAM dye, red –ROX dye

Tabela 7

Wyniki genotypowania roślin reprezentujących 40 odmian marchwi uprawnej w oparciu o pięć polimorfizmów diagnostycznych. Porównano wyniki identyfikacji genotypów otrzymane przy zastosowaniu techniki tetra-primer ARMS-PCR, TaqMan® oraz GBS. Podkreśleniem oznaczono zaobserwowaną rozbieżność identyfikowanych genotypów względem GBS. ^a – procent zgodności uzyskanych wyników względem metody GBS; ^b – brak amplifikacji

The results of genotyping plants representing 40 accessions of western-type carrot based on five diagnostic polymorphisms. The results of genotype identification obtained through the use of tetra-primer ARMS-PCR, TaqMan® and GBS techniques were compared. Underlining marks the observed divergence of the identified genotypes relative to GBS. ^a – the percentage of convergence of the obtained results relative to GBS; ^b – lack of amplification

Odmiana Cultivar	CHR2 39327561						CHR3 35583370					
	Roślina 1/ Plant 1			Roślina 2/ Plant 2			Roślina 1/Plant 1			Roślina 2/Plant 2		
	ARMS-PCR	TaqMan	GBS	ARMS-PCR	TaqMan	GBS	ARMS-PCR	TaqMan	GBS	ARMS-PCR	TaqMan	GBS
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
RS 1	A	A	A	A	A	A	C	C	C	A/C	A/C	A/C
RS 2	A	A	A	A	A	A	A/C	A/C	A/C	A	A	A
RS 4	A	A	A	A	A	A	<u>A</u>	<u>A</u>	A/C	A/C	A/C	A/C
RS 6	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 11	C	C	C	<u>A/C</u>	<u>A/C</u>	C	A/C	A/C	A/C	A	A	A
RS 14	<u>A/C</u>	<u>A/C</u>	C	- ^b	A	A	A	A	A	-	A	A
RS 17	<u>A/C</u>	<u>A/C</u>	A	-	A	A	A	A	A	-	A	A
RS 22	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 25	A/C	A/C	A/C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 26	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A	A	A	A	A	A
RS 29	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 33	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 35	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 36	A	A	A	A/C	A/C	A/C	A	A	A	A	A	A
RS 39	A/C	A/C	A/C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 42	-	A	A	-	A	A	A	A	A	A/C	A/C	A/C
RS 45	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 46	A	A	A	A	A	A	A	A	A	<u>A/C</u>	<u>A/C</u>	C
RS 47	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 51	<u>A/C</u>	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 52	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 54	C	C	C	C	C	C	A	A	A	A	A	A
RS 59	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 61	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A/C	A/C	A/C
RS 64	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 67	<u>A/C</u>	A	A	A	A	A	A	A	A	A/C	A/C	A/C
RS 70	A	A	A	A	A	A	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C
RS 72	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 75	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 80	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 83	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 86	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 88	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 91	A	A	A	-	A/C	A/C	A	A	A	A	A	A
RS 93	A	A	A	-	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 94	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A/C	A	A	A	A	A	A
RS 95	<u>A/C</u>	<u>A/C</u>	C	C	C	C	A	A	A	A	A	A
RS 96	-	A/C	A/C	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 98	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RS 100	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
% ^a	87,5	92,5	—	97,5	97,5	—	97,5	97,5	—	97,5	97,5	—

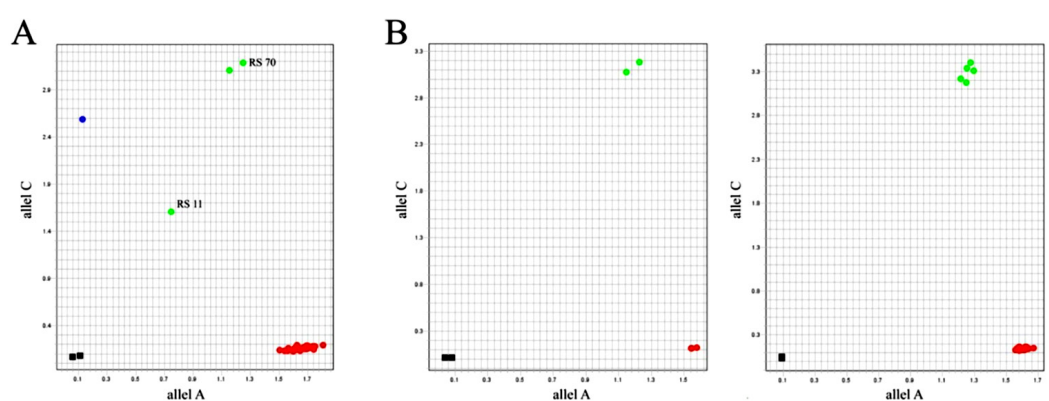
Odmiana Cultivar	CHR4 18083099									
	Roślina 1/ Plant 1			Roślina 2/ Plant 2						
	ARMS-PCR	TaqMan	GBS	ARMS-PCR	TaqMan	GBS				
RS 1	C	C	C	G	G	C/G				
RS 2	C	C	C/G	G	G	C/G				
RS 4	C	C	C/G	G	G	C/G				
RS 6	C/G	G	C	C	C	C				
RS 11	C/G	C	C	C	C	C				
RS 14	C	C	C	-	C	C				
RS 17	C	C	C	-	C	C/G				
RS 22	C	C	C	C	C	C				
RS 25	C	C	C	C	C	C				
RS 26	C	C	C	C	C	C/G				
RS 29	C	C	C/G	C	C	C				
RS 33	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C				
RS 35	C	C	C	C/G	C/G	C/G				
RS 36	C	C	C	C	C	C				
RS 39	C/G	G	C/G	C/G	C/G	C				
RS 42	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G				
RS 45	C/G	C/G	C	C	C	C/G				
RS 46	C	C	C	C	C	C/G				
RS 47	C	C	C	C/G	C/G	C				
RS 51	C	C	C	C	C	C				
RS 52	C/G	C/G	C	C	C	C				
RS 54	G	G	G	G	G	G				
RS 59	C	C	C	C	C	C				
RS 61	C	C	C	C/G	C/G	C				
RS 64	C	C	C	C	C	C/G				
RS 67	C	C	C	C	C	C				
RS 70	C/G	C/G	C	C/G	C/G	C				
RS 72	C	C/G	C/G	C/G	C/G	C				
RS 75	C	C	C/G	C	C	C/G				
RS 80	C	C	C	C	C	C				
RS 83	C	C	C	C	C	C				
RS 86	G	G	C	G	G	C/G				
RS 88	C	C	C	C	C	C				
RS 91	C/G	C/G	C	C	C	C/G				
RS 93	C/G	G	C/G	C/G	G	C				
RS 94	C	C	C	C/G	C/G	C				
RS 95	C	C	C	C	C	C/G				
RS 96	C/G	C/G	C/G	C/G	C/G	C				
RS 98	C/G	C/G	C	C/G	C/G	C/G				
RS 100	C	C	C	C	C	C/G				
% ^a	67,5	67,5	—	45,0	45,0	—				
Odmiana Cultivar	CHR 5 41806771						CHR8 16133451			
	Roślina 1/Plant 1			Roślina 2/ Plant 2			Roślina 1/Plant 1		Roślina 2/Plant 2	
	ARMS-PCR	TaqMan	GBS	ARMS-PCR	TaqMan	GBS	TaqMan	GBS	TaqMan	GBS
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
RS 1	T/C	T/C	T	T	T	T	C/T	C/T	C/T	C/T
RS 2	T/C	T/C	T/C	T	T	T	C	C	C	C
RS 4	T	T	T	T	T	T	C/T	C/T	C	C
RS 6	T	T	T	T	T	T	C	C	C/T	C/T
RS 11	T/C	T/C	T	T	T	T	C/T	C	C/T	C/T
RS 14	T	T	T	-	T	T	C	C	C	C

c. d. Tabela 7

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
RS 17	T	T	T	-	T	T	C/T	C/T	C/T	C/T
RS 22	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	C	C	C	C
RS 25	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 26	T/C	T/C	T/C	T	T	T	C	C	C	C
RS 29	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 33	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	T/C	C	C	C	C
RS 35	T	T	T	T/C	T/C	T/C	C	C	C	C
RS 36	T	T	T	T	T	T	C	C/T	C	C/T
RS 39	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 42	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 45	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 46	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 47	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 51	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 52	T	T	T	T/C	T/C	T/C	C	C	C	C
RS 54	C	C	C	C	C	C	T	T	T	T
RS 59	T	T	T	T	T	T	C/T	C/T	C/T	C/T
RS 61	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 64	T/C	T/C	T/C	T	T	T	C	C	C/T	C/T
RS 67	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 70	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 72	T/C	T/C	T/C	T	T	T	C	C	C	C
RS 75	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 80	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 83	T	T	T	T/C	T/C	T	C	C	C	C
RS 86	T/C	T/C	T/C	T	T	T	C	C	C	C
RS 88	T	T	T	T/C	T/C	T/C	C	C	C	C
RS 91	C	C	C	T	T	T	C	C	C	C
RS 93	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 94	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 95	C	C	C	C	C	C	C/T	C/T	C	C
RS 96	T	T	T	T/C	T/C	T/C	C/T	C/T	C/T	C/T
RS 98	T	T	T	T	T	T	C	C	C	C
RS 100	T	T	T	T	T	T	C	C	C/T	C/T
%	95,0	95,0	—	97,5	97,5	—	95,0	—	97,5	—

Ze względu na znaczące ale stałe różnice emisji fluorescencji pochodzącej od przyłączonych sond, do identyfikacji genotypów wykorzystano współczynnik $R_{A:C}$ ($R_{\text{allele1:allele2}}$). Na podstawie analizy widm fluorescencji otrzymanych dla analizowanego *locus* wyznaczono zakresy graniczne wartości współczynnika $R_{A:C}$ dla: (1) homozygot A/A – $R_{A:C} > 3,0$; (2) heterozygot – $3,0 \geq R_{A:C} \geq 0,3$; (3) homozygot C/C – $R_{A:C} < 0,3$ (tab. 2). Obliczone wartości współczynnika $R_{A:C}$ mieściły się zakresie 0,04–10,33. Przyjęte kryteria umożliwiły jednoznaczną identyfikację w badanej kolekcji 69 homozygot A/A, 1 homozygoty C/C oraz 10 heterozygot A/C (rys. 5).

Dla analizowanego *locus* zaobserwowano 97,5% zgodność wyników genotypowania techniką TaqMan® i GBS (tab. 7). Analogicznie, na podstawie wartości ΔR_n otrzymanych dla poszczególnych wariantów allelicznych w obrębie pozostałych czterech *loci* wyznaczono odpowiadające im wartości graniczne współczynnika $R_{\text{allele1:allele2}}$ dla homozygot obu typów oraz heterozygot (tab. 2) oraz dokonano manualnej identyfikacji genotypów (tab. 7) w obrębie badanej kolekcji roślin.

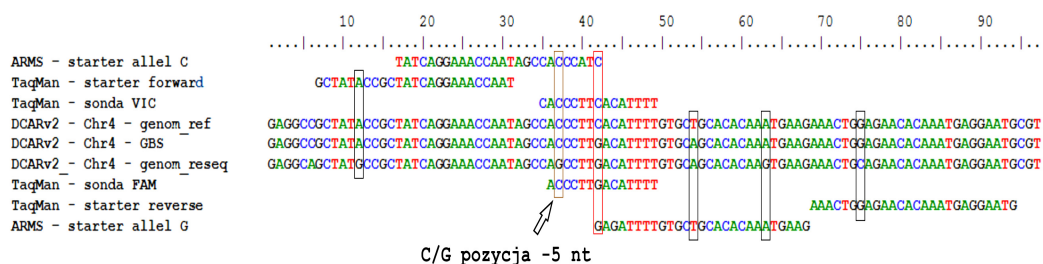


Rys. 5. Wykres punktowy dyskryminacji allelicznej 40 odmian marchwi uprawnej w *locus* chr3_35583370. Oś x – wartości ΔRn dla sondy chr3_35583370_V (allel A); oś y – wartości ΔRn dla sondy chr3_35583370_M (allel C); oznaczenie punktów: niebieskie – homozygota C/C, zielone – heterozygota A/C, czerwone – homozygota A/A, czarne – kontrola negatywna. A – roślina 1; B – roślina 2

Fig. 5. Point graph of allele discrimination of 40 accessions of cultivated carrot in *locus* chr3_35583370. The x axis – ΔRn values for chr3_35583370_V (allele A) probe; the y axis – ΔRn values for chr3_35583370_M (allele C) probe; point marking: blue – C/C homozygote, green A/C heterozygote, red – A/A homozygote, black – negative control. A – plant 1; B – plant 2

Podstawę weryfikacji przydatności wykorzystanej technologii stanowiło porównanie zbieżności wyników genotypowania z zastosowaniem sond TaqMan[®] oraz techniki GBS uzyskanych dla badanej kolekcji 40 odmian marchwi uprawnej. Sondy TaqMan[®] oraz startery dla każdego z pięciu *loci* zostały zaprojektowane prawidłowo, a ogólna wydajność amplifikacji nie odbiegała od oczekiwanej. Zaobserwowana w przypadku *locus* chr4_18083099 duża (45%) rozbieżność wyników genotypowania TaqMan[®] i GBS wynika prawdopodobnie z obecności dodatkowego polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w obrębie sekwencji przyłączania sond. Wyniki resekwencjonowania rejonu chromosomu 4 zawierającego analizowany locus potwierdziły obecność dodatkowego biallelicznego polimorfizmu G/C w pozycji -5 nt w stosunku do locus chr4_18083099 w genomie odmiany uprawnej marchwi Chantenay Red Cored (rys. 6). Obecność dodatkowego polimorfizmu punktowego bądź indelu w sąsiedztwie analizowanego SNP jest podawana przez producenta sond jako jedna z najczęstszych przyczyn otrzymania nieprawidłowych wyników (TaqMan[®] Genotyping Assays — Protocol, 2010). W celu eliminacji wpływu obserwacji odstających na wynik genotypowania, za kryterium identyfikacji genotypu przyjęto wartość współczynnika $R_{\text{allel1:allel2}}$. Dla każdego *locus*, po uprzedniej wizualnej analizie intensywności widm fluorescencji, ustalono graniczne wartości współczynnika $R_{\text{allel1:allel2}}$, w obrębie których identyfikowano określone genotypy. Dzięki wykorzystaniu tego współczynnika próbkom o intensywności fluorescencji proporcjonalnej, ale odbiegającej pozostałych mógł zostać jednoznacznie przypisany genotyp. Bardzo wysoki współczynnik zbieżności wyników genotypowania czterech *loci* (chr2_39327561, chr3_35583370, chr5_41806771 oraz chr8_39327561) otrzymanych z wykorzystaniem techniki TaqMan[®] oraz GBS, sięgający nawet 97,5%

wskazuje na wysoki potencjał zastosowania sond TaqMan® w badaniach z zakresu identyfikacji oraz analizy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w genomie marchwi. Niewątpliwą zaletą technologii TaqMan® w porównaniu do genotypowania przez sekwencjonowanie jest większa dokładność identyfikacji genotypu. Ponad 70% rozbieżności wyników dotyczyło niepełnej identyfikacji wariantu allelicznego przy zastosowaniu techniki GBS — badana roślina została zidentyfikowana jako homozygota, podczas gdy wyniki genotypowania z zastosowaniem sond TaqMan® jednoznacznie wskazywały na jej heterozygotyczność w analizowanym *locus*.



Rys. 6. Fragment sekwencji chromosomu 4 marchwi zawierający analizowany SNP chr4_18083099 (zaznaczony czerwonym prostokątem) wraz z sekwencjami starterów wewnętrznych ARMS-PCR (*starter allele C i allele G*) oraz starterami i sondami TaqMan® (*starter forward i reverse* oraz *sonda VIC i FAM*) wykorzystanych do genotypowania 40 odmian marchwi uprawnej. Sekwencję genomu referencyjnego (*DCARv2_Chr4-genom_ref*) porównano z wynikiem genotypowania techniką GBS (*DCARv2_Chr4-GBS*) oraz sekwencją pochodzącą z resekwencjonowanego genomu marchwi uprawnej odmiany Chanenay Red Cored (*DCARv2_Chr4-genom_reseq*). Brązowym prostokątem oraz strzałką oznaczono pozycję -5 nt, w której zidentyfikowano dodatkowy SNP chr4_18083094 obecny w miejscu przyłączania sond TaqMan®. Dodatkowe polimorfizmy zaobserwowane w odległości do 40 nt od *locus* chr4_18083099 zaznaczono czarnymi prostokątami

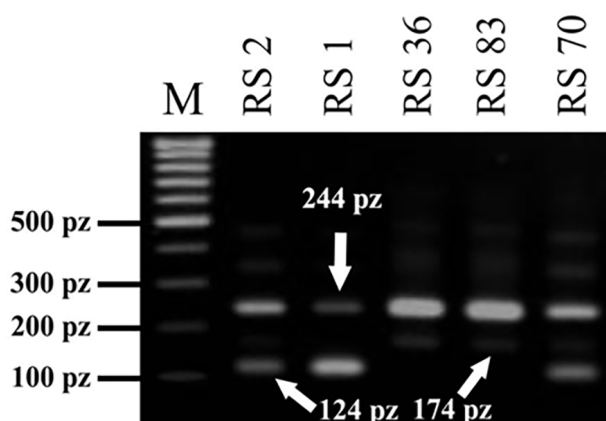
Fig. 6. A fragment of the carrot chromosome 4 sequence, including the analysed SNP chr4_18083099 (marked with the red rectangle) together with the internal ARMS-PCR primer sequences (*starter allele C and allele G*), as well as TaqMan® primers and probes (*starter forward and starter reverse* and *sonda VIC and sonda FAM*), used to genotype 40 cultivars of the carrot. The reference genome sequence (*DCARv2_Chr4-genom_ref*) was compared with the result of genotyping through the GBS technique (*DCARv2_Chr4-GBS*) and the sequence derived from the re-sequenced genome of the Chanenay Red Cored cultivar (*DCARv2_Chr4-genom_reseq*). The brown rectangle and the arrow mark the -5 nt position, where an additional SNP chr4_18083094, present at the TaqMan® probes' hybridization regions, was identified. Additional polymorphisms detected within the distance of 40 nt of the chr4_18083099 locus were marked with black rectangles

Często przyczyną tych różnic jest zbyt niskie pokrycie sekwencjonowanego genomu w technologii GBS, uniemożliwiające identyfikację heterozygot. Wśród głównych zalet technologii TaqMan® należy wymienić: łatwość przygotowania próbek i szybkość wykonania analizy, precyzyjność analizy przy prawidłowym zaprojektowaniu sond i starterów, prosty model identyfikacji genotypu poprzez wykorzystanie współczynnika $R_{allele1:allele2}$ oraz stosunkowo niewielkie wymagania dotyczące wyposażenia laboratorium. Znacznym ograniczeniem tej metody jest możliwość analizowania jednego polimorfizmu w obrębie doświadczenia, dlatego też technika ta jest wykorzystywana głównie do

genotypowania *loci* o znaczeniu diagnostycznym. Koszty analizy z wykorzystaniem sond TaqMan®, w przeliczeniu na próbkę, są stosunkowo wysokie, dlatego w przypadkach genotypowania na dużą skalę oraz dysponowania ograniczonym zapleczem laboratoryjnym można rozważyć zastosowanie technik opartych na wykorzystaniu tańszej i prostszej techniki PCR, takich jak tetra-primer ARMS-PCR.

Genotypowanie tetra-primer ARMS-PCR

Dla czterech spośród pięciu analizowanych polimorfizmów diagnostycznych uzyskano oczekiwane produkty reakcji tetra-primer ARMS-PCR, odpowiadające amplifikacji allelo-specyficznej oraz amplifikacji starterów zewnętrznych. Reakcje przeprowadzone dla *locus* chr3_35583370 charakteryzowały się obecnością trzech produktów: (1) o długości 124 pz będącego wynikiem amplifikacji startera specyficznego dla allelu C oraz odpowiedniego startera zewnętrznego, (2) o długości 174 pz będącego wynikiem amplifikacji startera specyficznego dla allelu A oraz odpowiedniego startera zewnętrznego oraz (3) o długości 244 pz będącego wynikiem amplifikacji obu starterów zewnętrznych (rys. 7). Na podstawie analizy otrzymanego profilu elektroforetycznego dokonano manualnej identyfikacji genotypów, a otrzymane wyniki porównano z wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu techniki GBS oraz TaqMan® (tab. 7).



Rys. 7. Przykładowy wynik rozdzielania elektroforetycznego produktów reakcji ARMS-PCR dla *locus* chr3_35583370. Białymi strzałkami zaznaczono produkty amplifikacji starterów specyficznym dla obu alleli oraz starterów zewnętrznych (tab. 3). M — marker długości GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific). Zidentyfikowane genotypy: RS 2 i RS 70 – heterozygoty A/C, RS 1 – homozygota A/A, RS 36 i RS 83 – homozygoty C/C

Fig. 7. Sample result of electrophoretic separation of ARMS-PCR products for *locus* chr3_35583370.

White arrows mark the amplification products for primers specific to two alleles and the external primers (Tab. 3). M — GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus (Thermo Scientific) size marker. Identified genotypes: RS 2 and RS 70 – heterozygotes A/C, RS 1 – homozygote A/A, RS 36 and RS 83 – homozygotes C/C

Analogicznie, na podstawie profili otrzymanych dla pozostałych trzech *loci* dokonano manualnej identyfikacji genotypów oraz ich porównania z wynikami otrzymanymi pozostałymi metodami (tab. 7).

Najważniejszym czynnikiem odpowiedzialnym za uzyskanie specyficznej amplifikacji w technice tetra-primer ARMS-PCR jest odpowiednie zaprojektowanie starterów. W celu uzyskania wydajnej i specyficznej amplifikacji, muszą być spełnione cztery warunki: (1) odpowiednia długość starterów, pomiędzy 26 a 32 nukleotydami, znacząco zwiększa specyficzność przyłączania starterów; (2) niedopasowanie nukleotydu w pozycji -2 końca 3'; (3) brak tendencji starterów do tworzenia struktur drugorzędowych oraz dimerów, (4) długość produktów uzyskanych w efekcie amplifikacji zaprojektowanych starterów powinna być na tyle duża i zróżnicowana, aby możliwa była ich łatwa identyfikacja. Wszystkie z zaprojektowanych par starterów spełniały założenia dotyczące ich długości oraz niedopasowania nukleotydu na końcu 3'. W przypadku trzech *loci*: chr3_35583370, chr4_18083099 i chr8_16133451 jeden ze starterów wewnętrznych posiadał dodatkowe niedopasowanie jednego nukleotydu wynikające z obecności dodatkowego polimorfizmu pojedynczego nukleotydu w obrębie miejsca przyłączania do matrycy. Obecność dodatkowego niedopasowania nukleotydu nie uniemożliwiła selektywnej amplifikacji, a wręcz wydaje się, że łatwiej było ją osiągnąć - reakcje amplifikacji dla SNP, które były identyfikowane przy użyciu starterów zawierających dodatkowe niedopasowanie były z reguły łatwiejsze w optymalizacji ze względu na szerszy zakres optymalnej temperatury ich przyłączania. Możliwość uzyskania poprawnego wzoru prążkowego pomimo obecności dodatkowego polimorfizmu w bezpośrednim sąsiedztwie analizowanego SNP znacząco zwiększa przydatność techniki ARMS-PCR w identyfikacji i analizie polimorfizmów obecnych w rejonie charakteryzującym się dużym wysyceniem SNP. Jest to duża zaleta w porównaniu do techniki genotypowania TaqMan[®], której głównym ograniczeniem jest wrażliwość na obecność dodatkowych SNP w rejonie przyłączenia sond. Jak zauważono w pracy Chiapparino i in. (2004), najważniejszym czynnikiem w procesie optymalizacji reakcji ARMS-PCR był dobór odpowiedniej temperatury przyłączania starterów (T_a). Generalnie, zestawy starterów charakteryzujące się tworzeniem silnej struktury drugorzędowej, ale mające zbliżoną temperaturę topnienia (T_m) pozwalały na otrzymanie lepszych wyników genotypowania niż te o zróżnicowanej T_m , ale nie tworzące struktur drugorzędowych. Problem tworzenia struktur drugorzędowych oraz dimerów przez cztery z zaprojektowanych starterów ograniczono poprzez podniesienie temperatury annealingu o około 2°C w stosunku do przewidzianej na podstawie ich składu nukleotydowego. Otrzymane zakresy długości produktów dla poszczególnych *loci* były wystarczające do ich identyfikacji metodą rozdziału w żelu agarozowym o zwiększonym do 1,5% stężeniu, co przekłada się w bezpośrednio na łatwość i szybkość wykonania analizy.

Badana kolekcja roślin marchwi została zgenotypowana w pięciu wybranych *loci* diagnostycznych. Niska specyficzność reakcji tetra-primer ARMS-PCR dla *locus* chr8_16133451, wynikająca prawdopodobnie ze zbyt dużej różnicy T_m starterów wewnętrznych, nie pozwoliła na uzyskanie wiarygodnych wyników genotypowania analizowanej kolekcji. Również wyniki genotypowania w *locus* chr4_18083099

odbiegały od wyników uzyskanych z zastosowaniem techniki GBS, prawdopodobnie na skutek obecności dodatkowych SNPów w obrębie miejsca przyłączenia starterów allelo-specyficznych (rys. 6). Dla pozostałych trzech *loci* diagnostycznych zaobserwowano bardzo wysoką zbieżność wyników genotypowania techniką tetra-primer ARMS-PCR oraz GBS, wahającą się w zakresie od 87,5% do 97,5%. Wyniki genotypowania techniką tetra-primer ARMS-PCR oraz TaqMan[®] charakteryzowały się jeszcze większą zbieżnością, sięgającą od 94,6% do 100%. Otrzymane wartości wskazują na dużą wiarygodność wyników genotypowania marchwi uzyskanych przy zastosowaniu tetra-primer ARMS-PCR.

Do głównych wad techniki tetra-primer ARMS-PCR należy zaliczyć konieczność bardzo precyzyjnego projektowania starterów, z uwzględnieniem wielu czynników krytycznych dla powodzenia analizy oraz często długi i żmudny proces optymalizacji reakcji PCR, zwłaszcza w przypadku zastosowania zestawu starterów o zróżnicowanej temperaturze przyłączenia starterów. Obserwuje się również większy w stosunku do techniki TaqMan[®] procent niewydajnej amplifikacji uniemożliwiającej identyfikację genotypu. W rejonach bogatych w zasady GC bardzo często niemożliwe jest zaprojektowanie starterów wydajnie amplifikujących analizowany SNP (Medrano i de Oliveira, 2014), co ogranicza możliwość wykorzystania tej metody do rejonów ubogich w sekwencje powtórzone. Do niewątpliwych zalet techniki tetra-primer ARMS-PCR należy niski koszt analizy, ograniczający się do kosztów otrzymania starterów oraz podstawowych odczynników do przeprowadzenia PCR i rozdziłu elektroforetycznego oraz wysoka wydajność genotypowania po opracowaniu zoptymalizowanej metodyki. Dodatkowo, opisana już mniejsza wrażliwość na obecność dodatkowych SNP w sąsiedztwie analizowanego locus oraz dokładniejsza w stosunku do GBS identyfikacja heterozygot sprawia, że technika tetra-primer ARMS-PCR może być uznana za przydatną do przekształcenia polimorfizmów diagnostycznych do kodominacyjnych markerów specyficznych.

PODSUMOWANIE

Zastosowana w powyższych badaniach strategia genomowego mapowania asocjacyjnego z wykorzystaniem modelu MLM umożliwiła identyfikację dwudziestu dwóch polimorfizmów pojedynczego nukleotydu zgrupowanych w siedemnastu rejonach genomu, wykazujących wiarygodny związek z analizowanymi cechami morfologicznymi korzenia spichrzowego marchwi. Pięć spośród zidentyfikowanych polimorfizmów wytypowano do ich eksperymentalnej walidacji i opracowania markerów specyficznych związanych z genetycznymi determinantami kształtu korzenia z zastosowaniem technik opartych na łańcuchowej reakcji polimerazy. Przekształcenie zidentyfikowanych polimorfizmów diagnostycznych do markerów opartych na technologii TaqMan[®] oraz tetra-primer ARMS-PCR charakteryzowała się wysokim współczynnikiem sukcesu, wskazując na duży potencjał wykorzystania tych technik do opracowywania markerów SNP zasocjowanych z istotnymi cechami agronomicznymi.

LITERATURA

- Armstrong R. A. 2014. When to use the Bonferroni correction. *Ophthalmic Physiol. Opt.* 34: 502 — 508. DOI:10.1111/opo.12131.
- Banga O. 1963. Origin and distribution of the western cultivated carrot. *Genet. Agrar. Period. di Genet. Appl. all' Agric.* 17: 357 — 370.
- Baris I., Etlik O., Koksall V., Arican-Baris S. T. 2010. Rapid diagnosis of spinal muscular atrophy using tetra-primer ARMS PCR assay: Simultaneous detection of SMN1 and SMN2 deletion. DOI:10.1016/j.mcp.2009.12.001. *Mol. Cell. Probes* 24: 138 — 141.
- Brachi, B., Morris, G. P., Borevitz, J. O. 2011. Genome-wide association studies in plants: the missing heritability is in the field. DOI:10.1186/gb-2011-12-10-232. *Genome Biol.* 12: 232.
- Campsall P. A., Au, N. H. C., Prendiville J. S., Speert, D. P., Tan R., Thomas E. E. 2004. Detection and genotyping of varicella-zoster virus by TaqMan allelic discrimination real-time PCR. *J. Clin. Microbiol.* 42: 1409 — 13. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15070981> [Accessed November 1, 2016].
- Chiapparino E., Lee, D., Donini P. 2004. Genotyping single nucleotide polymorphisms in barley by tetra-primer ARMS-PCR. *Genome* 47: 414 — 420. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/g03-130#.VzL8g-Qvtng> [Accessed May 11, 2016].
- Dry P. 1991. Rapid detection of alpha-1-antitrypsin deficiency by analysis of a PCR-induced TaqI restriction site. DOI:10.1007/BF00201739. *Hum. Genet.* 87: 742–744.
- Giancola S., McKhann H. I., Bérard A., Camilleri C., Durand S., Libeau P., et al. 2006. Utilization of the three high-throughput SNP genotyping methods, the GOOD assay, Amplifluor and TaqMan, in diploid and polyploid plants. DOI:10.1007/s00122-006-0213-6. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1115 — 1124.
- Holland P. M., Abramson R. D., Watson R., Gelfand D. H. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'→3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. DOI:10.1073/PNAS.88.16.7276. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88: 7276 — 7280.
- Huang T., Zhuge J., Zhang W. W. 2013. Sensitive detection of BRAF V600E mutation by Amplification Refractory Mutation System (ARMS)-PCR. DOI:10.1186/2050-7771-1-3. *Biomark. Res.* 1: 3.
- Iorizzo M., Senalik D. A., Ellison S. L., Grzebelus D., Cavagnaro P. F., Allender C., Brunet J., Spooner D., van Dezyne A., Simon P. W. 2013. Genetic structure and domestication of carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) (Apiaceae). DOI:10.3732/ajb.1300055. *Am. J. Bot.* 100: 930 — 938.
- Korte A., Farlow A. 2013. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. DOI:10.1186/1746-4811-9-29. *Plant Methods* 9: 29.
- Lindh M., Hannoun C. 2005. Genotyping of hepatitis C virus by Taqman real-time PCR. DOI:10.1016/j.jcv.2005.02.002. *J. Clin. Virol.* 34: 108 — 114.
- Liu Q., Thorland E. C., Heit J. A., Sommer S. S. 1997. Overlapping PCR for bidirectional PCR amplification of specific alleles: a rapid one-tube method for simultaneously differentiating homozygotes and heterozygotes. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9110178> [Accessed October 30, 2016]. *Genome Res.* 7: 389 — 398.
- Mammadov J., Aggarwal R., Buyyarapu R., Kumpatla S. 2012. SNP markers and their impact on plant breeding. DOI:10.1155/2012/728398. *Int. J. Plant Genomics* 72: 83 — 98.
- Medrano R. F. V., de Oliveira C. A. 2014. Guidelines for the tetra-primer ARMS-PCR technique development. DOI:10.1007/s12033-014-9734-4. *Mol. Biotechnol.* 56: 599 — 608.
- Newton C. R., Graham A., Heptinstall L. E., Powell S. J., Summers C., Kalsheker N., Smith J., Markham A. 1989. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). DOI:10.1093/nar/17.7.2503. *Nucleic Acids Res.* 17: 2503 — 2516.
- Rubatzky V. E., Quiros C. F., Simon P. W. 1999. Carrots and related vegetable Umbelliferae. CAB International, Wallingford.
- Rubio M., Caranta C., Palloix A. 2008. Functional markers for selection of potyvirus resistance alleles at the pvr2-eIF4E locus in pepper using tetra-primer ARMS-PCR. DOI:10.1139/G08-056. *Genome* 51: 767 — 771.

- Stolarczyk J., Janick J. 2011. Carrot: History and Iconography. Available at: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/pdfs/ch5102-carrot.pdf>. Chron. Horticult. 51: 12 — 18.
- Vannucchi A. M., Pancrazzi A., Bogani C., Antonioli E., Guglielmelli P. 2006. A quantitative assay for JAK2V617F mutation in myeloproliferative disorders by ARMS-PCR and capillary electrophoresis. DOI:10.1038/sj.leu.2404209. Leukemia 20: 1055 — 1060.
- Wittwer C. T., Reed G. H., Gundry C. N., Vandersteen J. G., Pryor R. J. 2003. High-resolution genotyping by amplicon melting analysis using LCGreen. DOI:10.1373/49.6.853. Clin. Chem. 49: 853 — 860.
- Ye S., Dhillon S., Ke X., Collins A. R., Day I. N. M. 2001. An efficient procedure for genotyping single nucleotide polymorphisms. DOI:10.1093/nar/29.17.e88. Nucleic Acids Res. 29: 88e — 88.
- Yu J., Pressoir G., Briggs W. H., Vroh Bi I., Yamasaki M., Doebley J. F. et al. 2006. A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. DOI:10.1038/ng1702. Nat. Genet. 38: 203 — 208.
- Zhang Z., Ersoz E., Lai C.-Q., Todhunter R. J., Tiwari H. K., Gore M. A., Bradbury P. J., Yu J., Arnett D. K., Ordovas J. M., Buckler E. S. 2010. Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. DOI:10.1038/ng.546. Nat. Genet. 42: 355 — 360.

PODZIĘKOWANIA

Dziękujemy pracownikom spółek hodowlanych: POLAN Kraków, PlantiCo Zielonki i Spójnia Nochowo za przeprowadzenie i ocenę doświadczeń polowych. Praca została sfinansowana ze środków Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi na badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej.