Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: **21**

Tytuł zadania: **Poszukiwanie markerów molekularnych genów przywracania płodności pyłku u żyta (*Secale cereale* L.) z CMS-Pampa.**

Kierownik zadania: **prof. dr hab. Piotr T. Bednarek**

*Cel zadania:* Celem zadania jest opracowanie markerów DNA silnie sprzężonych z możliwie jak najszerszym spektrum genów przywracania płodności pyłku u żyta z CMS-Pampa występujących w obrębie badanych populacji RIL oraz określenie wkładu tych genów do zmienności fenotypowej.

**Zadanie było realizowane w ramach 2 tematów badawczych:**

***Temat badawczy1***: Markerowanie genetyczne linii rekombinacyjnych (DArT).

*Cele tematu badawczego 1*: Uzyskanie markerów DNA umożliwiających opracowanie mapy genetycznej dla populacji mapującej RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05).

*Materiały i metody:* Wykonano izolacje genomowego DNA 145 roślin linii RIL populacji mapującej RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05). Genotypowanie DArTseq zostało wykonane w Diversity Arrays Technology w Australii.

*Wyniki i dyskusja:* W wyniku profilowania DNA uzyskano 36000 markerów DArTseq (marker SNP, ang. Single Nucleotide Polymorphism) oraz 128000 silicoDArT (marker dominujący). Zaletą metody DArT jest znana lokalizacja chromosomowa części z tych markerów.

*Wnioski:* Metoda DArT umożliwiła identyfikację dużej liczby powtarzalnych markerów DArTseq i silicoDArT w obrębie analizowanej populacji RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05).

***Temat badawczy 2:*** Identyfikacja markerów cechy (mapowanie genetyczne/mapowanie asocjacyjne).

*Cel tematu badawczego 2:* Opracowanie zagęszczonej mapy genetycznej oraz mapowanie genów przywracania płodności pyłku.

*Materiały i metody:*

1. Do opracowania mapy genetycznej (MultiPoint UltraDense) wykorzystano markery DArTseq oraz silicoDArT uzyskane dla populacji RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05).

2. Identyfikacja QTLi (ang. Quantitative Trait Loci) cechy przywracanie płodności pyłku została wykonana w programie Windows QTL Cartographer 2.5.

3. Mapowanie asocjacyjne dla populacji RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05) wykonano w programie TASSEL z zastosowaniem ogólnego modelu liniowego (GLM ang. General Linear Model).

*Wyniki i dyskusja:*

Na podstawie wyników segregacji markerów DArTseq i silicoDArT dla populacji RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05) opracowano mapę genetyczną składającą się z 7 grup sprzężeń odpowiadających poszczególnym chromosomom żyta (1R-7R). Na mapie umieszczono 643 markery szkieletowe, 2418 redundantne (3061 łącznie dla wszystkich chromosomów) oraz 1245 markerów dodanych (interpolowanych na mapę). Opracowana mapa genetyczna pokrywa 1070.5 cM. Największa grupa rozciągała się na obszarze 182.8 cM a najmniejsza na 123.0 cM. Średnio na pojedynczy chromosom przypadało 92 markery szkieletowe, 345 markerów redundantnych i 1779 markerów dodanych. Średnie zagęszczenie markerów szkieletowych na mapie wynosiło 1.66 markera na 1 cM. Obecność licznych markerów redundantnych stwarza możliwość wyboru wielu alternatywnych sekwencji przy ich konwertowaniu do markerów użytecznych do identyfikacji form z genami przywracania płodności pyłku. Potencjalnie, takie możliwości stwarzają również markery dodane, których precyzyjna lokalizacja na mapie nie jest określona, natomiast wiadomo jest pomiędzy którymi markerami szkieletowymi powinny się znajdować.

Mapowanie QTL z wykorzystaniem metody regresji liniowej (SMA, ang. Single Marker Analysis), złożonego (CIM, ang. Composite Interval Mapping) i wielokrotnego (MIM, ang. Multiple Interval Mapping) mapowania interwałowego wykazało, że QTL przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa lokalizuje się w części dystalnej długiego ramienia chromosomu 4R. Wykres funkcji LOD dla wymienionych metod pokazuje, że osiąga ona wartość maksymalną na poziomie około 30.0 przy wyznaczonej krytycznej wartości ustalonej na podstawie testu permutacji (p=1000) równej 3.3. Identyfikowany QTL charakteryzuje się addytywnym sposobem działania oraz odziedziczalnością na poziomie ponad 50%. W obszarze QTL lokalizują się cztery markery silicoDArT oddalone od 0.01 do 3.5 cM od maksymalnej wartości funkcji LOD. Metody CIM oraz MIM wykazały, że w obrębie badanej populacji może występować słabszy QTL zlokalizowany na chromosomie 5R w pozycji 49.7 cM mapy sprzężeniowej. QTL na chromosomie 5R charakteryzuje się efektem addytywnym oraz niską odziedziczalnością.

Mapowanie asocjacyjne umożliwiło identyfikację 176 markerów DArTseq i silicoDArT asocjowanych z genami przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa. Dodatkowo dla 37 z nich identyfikowano łącznie 650 markerów redundantnych. Stopień asocjacji określany za pomocą współczynnika determinacji (R2) wynosił od 0.163 do 0.583 co świadczyło o silnych asocjacjach tych markerów z cechą. Markery o najwyższych wartościach asocjacji lokalizowały się na chromosomie 4R.

Dotychczasowe badania prowadzone w ramach niniejszego projektu wykazały, że   
w materiałach roślinnych dostępnych w Polsce dominują geny przywracania płodności pyłku z CMS-Pampa lokalizujące się na chromosomach 1R i 4R. Pewną rolę odgrywają również geny na 3R oraz 5R. W badaniach tych udowodniono wysoką zbieżność wyników mapowania kompozytowego i asocjacyjnego. Wynik mapowania genetycznego i asocjacyjnego uzyskany dla populacji RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05) jest zgodny z wynikami uzyskanymi dla innych populacji RIL oraz z danymi literaturowymi i potwierdza, że w badanych materiałach cecha jest kontrolowana głównie przez gen zlokalizowany na chromosomie 4R oraz w niewielkim stopniu przez gen zlokalizowany na chromosomie 5R.

***Wnioski:***

1. Opracowano mapę genetyczną żyta dla populacji mapującej: RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05).
2. Zidentyfikowano jeden silny QTL przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa występujący w obrębie chromosomu 4R oraz słaby QTL na chromosomie 5R.
3. Pomiędzy markerami identyfikowanymi za pomocą CIM znajdują się 202 markery dodane, które mogą okazać się użyteczne w selekcji wspartej markerami molekularnymi.
4. Zidentyfikowano szereg markerów asocjowanych z genami przywracanie płodności pyłku u żyta z CMS Pampa.
5. Markery asocjowane z cechą ze względu na wysoki poziom współczynnika determinacji mogą stanowić dodatkowe źródło markerów w selekcji materiałów niosących gen przywracania płodności pyłku u żyta.