

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 15.

Tytuł zadania: **Poszukiwanie markerów molekularnych genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms- Tt.**

Kierownik zadania: **dr hab. P. Bednarek prof. IHAR-PIB**

Cel tematu badawczego 1

Zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii rekombinacyjnych metodą pojedynczych ziarniaków na poziomie pokoleń (F_4 - F_8).

Materiały i metody:

Materiał badawczy stanowiło 5 populacji mapujących RIL5 składających się z około 250 linii wsobnych każda prowadzona w chowie wsobnym metodą pojedynczych ziarniaków. Częstość rekombinacji badano w przypadku jednej z pięciu ww linii RIL (RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo).

Wyniki i dyskusja:

Uzyskane wyniki dla populacji mapującej RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo pokazują, że zróżnicowanie genomu linii badanej populacji mapującej uległo zwiększeniu o czym świadczy występowanie "poszatkowania" oraz krótkich fragmentów DNA pochodzących od różnych form rodzicielskich. Należy oczekiwać, że również w przypadku pozostałych populacji mapujących RIL częstość rekombinacji uległa zwiększeniu a dalsze prowadzenie materiałów roślinnych metodą SSD doprowadzi do pogłębienia się obserwowanych zmian.

Wnioski:

Metoda SSD umożliwia zwiększanie częstości rekombinacji w obrębie linii wsobnych. Wskazaniem jest wyprowadzanie kolejnych pokoleń linii populacji mapujących metodą SSD celem kumulowania aktów rekombinacji w obrębie poszczególnych genotypów.

Cel tematu badawczego 2:

Określenie występowania genów utrzymania sterylności pyłku w obrębie linii RIL populacji mapujących poprzez fenotypowanie roślin BC_1F_4 : MS 114(5)-2-1 cms Tt x [RIL4: MS 114(5)-2-1dop. x Borwo] oraz wstęp do oceny występowania genów utrzymania sterylności pyłku w obrębie linii RIL5 na bazie populacji wstecznych BC_1F_5 : DB1 cmsTt x [RIL5: DB1xRB1] x oraz BC_1F_5 : MS HT 352 cms Tt x [RIL5: MS HT 352 dop. x Borwo].

Materiały i metody:

Materiał do badań stanowiły rośliny BC_1F_4 : MS 114(15)-2-1 cms x [RIL4: MS 114(15)-2-1dop. X Borwo], u których badano stopień zawiązywania ziarniaków. Linie populacji RIL5: DB1 x RB1 oraz RIL5: MS 112(15)-2-1 dop. x Borwo krzyżowano wstecznie z formami matecznymi tych populacji na cms Tt. Krzyżowanie przeprowadzono pod izolatorami. Zebrano ziarniaki, które następnie wysiano oraz zaizolowano linie RIL5: MS HT 352 dop. x Borwo do krzyżowań wstecznych w roku 2015.

Wyniki i dyskusja:

Stwierdzono zróżnicowanie w zawiązywaniu ziaren u poszczególnych form populacji BC_1F_4 : MS 114(5)-2-1 cms Tt x [RIL4: MS 114(5)-2-1dop. x Borwo]. Identyfikowano zarówno formy, które praktycznie nie zawiązywały ziarniaków jak i takie, które dawały ich nawet 83 w kłosie. Analiza rozkładu cechy wykazała, że ma ona rozkład nieznacznie odbiegający od normalnego. W wyniku krzyżowania wstecznego RIL5: DB1 x RB1 z formą mateczną uzyskano ziarniaki BC_1F_5 : DB1 cms Tt x [RIL5: DB1 x RB1] reprezentujące 216 linii populacji RIL5: DB1 x RB1. Tylko w nielicznych przypadkach stwierdzono brak zawiązywania lub występowanie niewielkiej liczby ziarniaków w izolowanym kłosie. W przypadku krzyżówki BC_1F_5 : MS HT 112(15)-2-1 cms Tt x [RIL5: MS HT 112(15)-2-1 dop. x Borwo], ziarniaki zawiązało 40 z 300 krzyżowanych z formą mateczną linii RIL5. Ziarniaki obu populacji BC_1F_5 wysiano w polu celem oceny zawiązywania ziarniaków w roku 2015.

Wnioski:

Na podstawie danych dotyczących zawiązywania ziaren w BC_1F_4 : MS 114(5)-2-1 cms Tt x [RIL4: MS 114(5)-2-1dop. x Borwo], stwierdzono w obrębie populacji RIL4: MS 114(5)-2-1dop. x Borwo występowanie genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt. Warunki pogodowe

uniemożliwiły uzyskanie odpowiedniej reprezentacji ziarniaków BC₁F₅: MS 112(15)-2-1 cms Tt x [MS 112(15)-2-1dop. x Borwo] i koniecznym jest wykonanie większej ilości krzyżowań. W przypadku pozostałych krzyżowań wstecznych realizowanych dla BC₁F₅: DB1 cms Tt x [DB1xRB1], zawiązywanie ziarniaków przebiegło pomyślnie.

Cel tematu badawczego 3:

Genotypowanie linii rekombinacyjnych (konkretnie RIL4: MS 114(5)-2-1 x Borwo oraz RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo) populacji mapujących za pomocą markerów DArTseq.

Materiały i metody:

Materiałem badawczym były preparaty DNA około 200 linii RIL dwóch populacji mapujących RIL4: MS 114(5)-2-1 x Borwo oraz RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo prowadzonych na normalnej cytoplazmie. Analiza molekularna została wykonana w firmie Diversity Arrays Technology P/L w Australii.

Wyniki i dyskusja:

W wyniku genotypowania populacji RIL4: MS 114(5)-2-1 x Borwo oraz RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo uzyskano odpowiednio 52000 i 56000 markerów (DArTseq i silico DArT) w postaci macierzy z segregacjami. Przy czym markerów DArTseq otrzymano około 10 000 i 12 000 dla populacji RIL4 i RIL5. Metoda DArTseq umożliwiła uzyskanie dużej liczby markerów, która wielokrotnie przekraczała możliwości stosowanych wcześniej markerów DArT czy SSR. W porównaniu do markerów GBS markery DArTseq charakteryzowały się zdecydowanie niższym stopniem brakujących danych.

Wnioski:

Profilowanie populacji RIL4: MS 114(5)-2-1 x Borwo umożliwiło uzyskanie ok 10000 markerów DArTseq o pożądanej segregacji i dopuszczalnej liczbie brakujących danych użytecznych do mapowania genetycznego. Profilowanie populacji RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo umożliwiło uzyskanie 12000 markerów DArTseq użytecznych do mapowania genetycznego.

Cel zadania:

Identyfikowanie QTLi warunkujących utrzymanie sterylności pyłku z wykorzystaniem mapowania kompozytowego w oparciu o mapowanie genetyczne i badaną cechę oraz mapowanie asocjacyjne.

Materiały i metody:

Mapy genetyczne opracowano z wykorzystaniem markerów DArTseq dla populacji RIL5: MS 112(15)-2-1dop. x Borwo oraz DArTseq i GBS dla populacji RIL4: MS 114(5)-2-1dop. x Borwo z wykorzystaniem programu MultiPointUltraDense (demo). Dla każdej z grup niezrównoważenie sprzężeń obliczono w programie GGT2. Mapowanie kompozytowe oraz asocjacyjne wykonano dla populacji RIL4: MS 114(5)-2-1dop. x Borwo. Mapowanie kompozytowe zrealizowano w programie WinQTL Cartographer. Mapowanie asocjacyjne przeprowadzono w programie TASSEL.

Wyniki i dyskusja:

Mapę genetyczną populacji RIL4: MS 114(5)-2-1 dop. x Borwo opracowaną w 2013r w oparciu o markery GBS zagęszczono 1402 DArTseq, 10 markerów Xgwm, 11 Xrems, 6 Xscm. Opracowano 31 grup sprzężeń opartych o 714 markerów szkieletowych oraz 1007 markerów redundantnych. Na podstawie mapowania porównawczego w oparciu o znaną lokalizację markerów DArTseq u pszenicy 6 grup sprzężeń (LG5, LG6, LG8, LG14, LG17, LG29) populacji mapującej przypisano do genomu A oraz 8 (LG2, LG3, LG4, LG9, LG10, LG16, LG 21, LG26) do B. Brak danych o lokalizowaniu się markerów DArTseq na mapach genetycznych żyta uniemożliwił określenie, które grupy odpowiadają którym chromosomom genomu żytniego. Mapę genetyczną populacji RIL5: MS 112(15)-2-1 dop. X Borwo opracowano w oparciu o 11 340 markerów DArTseq. Opracowano 37 grup sprzężeń z 1895 markerami szkieletowymi oraz 2266 markerami redundantnymi. Na podstawie mapowania porównawczego, w oparciu o znaną lokalizację markerów DArTseq u pszenicy, 14 grup sprzężeń populacji mapującej przypisano do genomu A (1A: LG21; 2A: LG6, LG12; 3A: LG9, LG11; 4A: LG10, LG27; 5A: LG28, LG37; 6A: LG34, LG13; 7A: LG2, LG7, LG31) 17 do B (1B: LG3, LG25, LG29, LG30; 2B: LG5; 3B: LG16, LG19, LG24, LG32; 5B: LG1, LG4, LG15; 6B: LG18, LG23; 7B: LG14, LG20, LG33). Brak danych o lokalizowaniu się markerów DArTseq na mapach genetycznych żyta uniemożliwił określenie, które grupy odpowiadają którym chromosomom żyta.

Analiza niezrównoważenia sprzężeń ujawniła, że największy dystans pomiędzy markerami na mapie genetycznej powinien wynosić 4 cM dla populacji RIL5: MS 112(15)-2-1 dop. x Borwo oraz 4.9 cM dla populacji RIL4: MS 114(5)-2-1 dop. x Borwo. Interwałowe mapowanie kompozytowe dla populacji RIL4: MS 114(5)-2-1 x Borwo pozwoliło na identyfikację QTLa determinującego cechę męskiej sterility pyłku u pszenżyta z cms Tt. Stwierdzono, że cecha była warunkowana genem lokalizującym się w grupie sprzężeń LG4, którą najprawdopodobniej można przypisać do chromosomu 5B. Mapowanie asocjacyjne z wykorzystaniem ogólnego modelu liniowego (GLM) umożliwiło identyfikację dwudziestu trzech markerów asocjowanych z cechą męskiej sterility pyłku u pszenżyta. Dziewięć z nich lokalizowało się w grupie sprzężeń LG4 (5B), kolejne trzy w grupie LG12 (brak lokalizacji), jeden w grupie LG23 (7D), a dziesięć nie znalazło się na mapie konsensusowej. Analiza MLM potwierdziła asocjacje markerów lokalizujących się w grupie sprzężeń LG6 (prawdopodobna lokalizacja chromosomowa 5B) oraz LG4 i LG1 (3A) z cechą męskiej sterility pyłku u pszenżyta. Niektóre markery identyfikowane metodą GLM i MLM w grupie LG4 pokrywały się z markerami lokalizującymi się w maksimum QTLa identyfikowanego za pomocą mapowania kompozytowego.

Wnioski:

Opracowano dwie mapy genetyczne RIL4: MS 114(5)-2-1 x Borwo i RIL5: MS 112(15)-2-1 dop. X Borwo. Mimo wysycenia mapy genetycznej markerami SNP obserwowano duże luki - obszary pozbawione markerów. Takie luki są wynikiem rzadkich aktów rekombinacji w niektórych obszarach genomu. Można dążyć do ich zagęszczenia poprzez zwiększenie liczebności profilowanych populacji, dalsze prowadzenie linii RIL metodą SSD oraz zastosowanie markerów zdolnych do identyfikowania polimorfizmu pojedynczych nukleotydów. Mapowanie porównawcze wykonane dla RIL4: MS 114(5)-2-1 x Borwo umożliwiło przypisanie części grup sprzężeń do chromosomów pszenicy. Brak analogicznych danych dla żyta nie daje możliwości wykonania podobnych badań na obecnym etapie rozwoju metody DArTseq. Mapowanie kompozytowe wykazało, że w obrębie populacji RIL4: MS 114(5)-2-1 x Borwo za utrzymanie sterility pyłku odpowiada co najmniej jeden gen lokalizujący się na chromosomie 5B oraz prawdopodobnie minimum dwa dodatkowe geny o słabszych efektach. Mapowanie asocjacyjne jest rozsądnym uzupełnieniem mapowania kompozytowego i sugeruje, że w utrzymaniu sterility pyłku u pszenżyta z cms Tt mogą uczestniczyć geny lokalizujące się na chromosomach 3A, oraz na jednym z chromosomów 7 grupy homologicznej. Zarówno mapowanie kompozytowe jak i mapowanie asocjacyjne, przynajmniej w przypadku populacji RIL4: MS 114(5)-2-1 x Borwo, sugerują, że utrzymanie sterility pyłku u pszenżyta z cms Tt jest warunkowane interakcją wielu genów o relatywnie słabych efektach. Taka cecha może się okazać trudna do selekcji. Uzyskane wyniki stanowią potwierdzenie wcześniejszych danych o złożoności badanej cechy, warunkowanej interakcją wielu genów lokalizujących się na różnych chromosomach (genom A i B) gatunku i pokazują odrębność systemu cmsTt w porównaniu z cms P u żyta.