

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. Piotr T. Bednarek prof. nadz. IHAR PIB

Cel zadania: Celem zadania jest opracowanie markerów DNA silnie sprzężonych/asocjowanych z możliwie jak najszerszym spektrum genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt występujących w obrębie badanych populacji RIL oraz określenie wkładu tych genów do zmienności fenotypowej.

Zadanie było realizowane w ramach 3 tematów badawczych:

Temat badawczy 1: Zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii rekombinacyjnych metodą pojedynczych ziarniaków (SSD) na poziomie pokoleń (F5-F8).

Cel tematu badawczego 1: Zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii wsobnych poszczególnych populacji RIL poprzez uzyskanie ziarniaków F8 linii rekombinacyjnych dla populacji mapujących pszenżyta z genami utrzymania jałowości pyłku w systemie cytoplazmatyczno jądrowej męskiej sterylności (cms) typu Tt.

Materiały i metody: Materiał badawczy stanowiło 5 populacji mapujących RIL7 prowadzonych w chowie wsobnym metodą SSD. Częstość rekombinacji zobrażowano za pomocą programu GGT2 dla jednej z wybranych linii RIL (RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo).

Wyniki i dyskusja: Wyprowadzono kolejne pokolenie (RIL7) 5 populacji mapujących, uzyskując w przypadku populacji DB1 x RB1 oraz DB2 x RB2 150 linii wsobnych, a w przypadku populacji MS 114(5)-2-1 dop. x Borwo, MS 112(15)-2-1 dop. x Borwo oraz MS HT 352 dop. x Borwo po 250 linii. Każda linia reprezentowana była przez 10 roślin. Uzyskane wyniki pokazują, że poszczególne linie RIL populacji mapującej RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo charakteryzują się przetasowaniem genomów, co uwidacznia się w postaci występowania w obrębie tych linii fragmentów DNA o zróżnicowanej długości pochodzących od obu 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 (prowadząc do wzrostu homozygotyczności linii), a wyprowadzenie kolejnych pokoleń przyczyni się do zwiększenia rozdzielczości map genetycznych poprzez kumulację aktów rekombinacji w obrębie poszczególnych genotypów.

Temat badawczy 2: Markerowanie genetyczne (DArTseq) linii rekombinacyjnych.

Cele tematu badawczego 2: Genotypowanie linii RIL6: MS HT 352 x Borwo populacji mapującej za pomocą markerów DArTseq.

Materiały i metody: Materiałem badawczym były preparaty DNA 192 linii RIL populacji mapującej RIL6: MS HT 352 x Borwo prowadzonej na normalnej cytoplazmie wraz z kontrolami i formami rodzicielskimi. Genotypowanie DArTseq dla linii rekombinacyjnych pszenżyta została przeprowadzona w firmie Diversity Arrays Technology P/L w Australii.

Wyniki i dyskusja: W wyniku genotypowania populacji RIL6: MS HT 352 x Borwo uzyskano 29672 markerów DArTseq w postaci macierzy z segregacjami. Po usunięciu markerów monomorficznych

oraz wykazujących ponad 70% braki uzyskano 12922 markerów użytecznych w kolejnych etapach projektu. Zaletą metody DArTseq jest znana lokalizacja chromosomowa części z tych markerów (głównie na bazie map genetycznych pszenicy), co może być użyte do przypisania poszczególnych grup sprzężeń do odpowiednich chromosomów gatunku (na podstawie kolinearności genomów).

Wnioski: Profilowanie populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo pozwoliło na uzyskanie 12922 markerów DArTseq o pożądanej segregacji i dopuszczalnej liczbie brakujących danych użytecznych do mapowania genetycznego.

Temat badawczy 3: Identyfikacja markerów genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt (mapowanie genetyczne/mapowanie asocjacyjne).

Cel tematu badawczego 3: Poszukiwanie markerów związanych z cms Tt z wykorzystaniem populacji BC1F6: MS HT 352 cms Tt x [MS HT 352 dop. x Borwo]. Cel został osiągnięty.

Materiały i metody:

1. Do opracowania map genetycznych (MultiPoint UltraDense) wykorzystano markery DArTseq uzyskane dla populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo.
2. Do oceny zawiązywania ziarniaków: materiał do badań stanowiły rośliny BC1F6: MS HT 352 cms Tt x [RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo], u których badano stopień zawiązywania ziarniaków. Ocenie poddano 250 genotypów uzyskanych w wyniku krzyżowań wstecznych (uzyskano ziarniaki dla 154 form, które zostały użyte do dalszych analiz). Zgodność rozkładu cechy z rozkładem normalnym weryfikowano w programie XLStat (test Kolmogorov'a-Smirnova).
3. Mapowanie kompozytowe i asocjacyjne QTL genów utrzymania sterylności pyłku w systemie z cms Tt u pszenżyta dla populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo w oparciu o markery DArTseq oraz dane fenotypowe. Mapowanie kompozytowe wykonano w programie WinQTL Cartographer. Mapowanie asocjacyjne przeprowadzono w programie TASSEL.

Wyniki i dyskusja:

- Mapowanie genetyczne, wykonane dla populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo umożliwiło identyfikację 46 grup sprzężeń (każdej grupie odpowiada jej komplementarna grupa, ale w odwrotnej fazie segregacji markerów). Na mapie znalazło się łącznie 6446 markerów (563 markerów szkieletowych). Łącznie, wszystkie grupy sprzężeń pokrywały 1023 cM (średnio 1 marker na 1,55 cM). Na podstawie markerów DArTseq o znanej lokalizacji chromosomowej u pszenicy 5 grup sprzężeń przypisano do genomu A oraz 6 do genomu B. Brak danych o lokalizowaniu się markerów DArTseq na mapach genetycznych żyta uniemożliwił określenie, które grupy sprzężeń odpowiadają którym chromosomom genomu żytniego. Mapę genetyczną opracowaną dla RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo charakteryzuje relatywnie wysokie zagęszczenie markerami molekularnymi. Niemniej, opracowane mapy genetyczne zawierają obszary, których zagęszczenie markerami nie powiodło się w dostatecznym stopniu. Biorąc pod uwagę, że sposób prowadzenia materiałów roślinnych sprzyja zwiększeniu częstości rekombinacji, można się spodziewać, że na kolejnym poziomie wsobności większość z luk zostanie zagęszczona.
- W wyniku krzyżowania linii matecznej MS HT 352 cms Tt z liniami populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo uzyskano 250 form, które poddano ocenie fenotypowej (zawiązywanie ziarniaków). Uzyskane genotypy były zróżnicowane pod względem zawiązywania ziarniaków. Część materiałów uległa porażeniu fuzariozą, co doprowadziło do niskiego zawiązywania ziarna (od 0 do kilku ziarniaków). Ponieważ wyniki uzyskane na bazie porażonych fuzariozą kłosów mogły zniekształcać dalsze analizy zostały one pominięte z dalszych analiz. W rezultacie, do analizy wykorzystano dane fenotypowe odnoszące się do 154 form. Analiza zgodności rozkładu badanej cechy fenotypowanej (zawiązywanie ziaren/liczba ziarniaków w kłosie) dla formy BC1F6: MS HT 352 cms Tt x [RIL6: MS

HT 352 dop. x Borwo] z rozkładem normalnym wykazała, że badana cecha nie ma rozkładu normalnego

- Mapowanie kompozytowe umożliwiło identyfikację czterech QTL determinujących cechę męskiej sterility pyłku u pszenżyta z cms Tt w obrębie badanej populacji mapującej. Test permutacji (1000 permutacji) wykazał istotność tych QTL, przy czym punktem odcięcia wszystkich QTL była wartość 1,7 LOD. QTL identyfikowano w obrębie grup sprzężeń LG5 (7A), LG6 (1B), LG13 (??) i LG21 (??)
- W wyniku mapowania asocjacyjnego identyfikowano 20 markerów asocjowanych z cechą utrzymania sterility pyłku dla populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo wykazujących wartość asocjacji w przedziale od 0,09 do 0,13. Markery te były przypisane do chromosomu 1B i 2B oraz do grupy LG 21. Identyfikowane markery nie przekroczyły punktu odcięcia testu Bonferroni'ego i testu permutacji przy poziomie istotności $p < 0,05$.
- Większość markerów identyfikowanych w wyniku mapowania kompozytowego identyfikowano również w wyniku mapowania asocjacyjnego. W przypadku chromosomu 1B i LG21 markery asocjowane wystąpiły albo bezpośrednio w obszarze QTL lub w jego sąsiedztwie. Nie stwierdzono obecności markerów asocjowanych w obszarze pozostałych QTLi (chromosom 7A i LG 13).

Wnioski:

- Analiza statystyczna rozkładu cechy dla form BC1F6: MS HT 352 cms Tt x [RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo] wykazała, że badana cecha nie ma rozkładu normalnego.
- Opracowano mapę genetyczną dla populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo o średnim pokryciu genomu wynoszącym jeden marker na 1,55 cM. Część grup sprzężeń przypisano do chromosomów pszenicznych genomu pszenżyta (pozostałe do chromosomów żytnich w chwili opracowania odpowiednich map genetycznych).
- Interwałowe mapowanie kompozytowe (CIM) wykazało, że w obrębie populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo za utrzymanie sterility pyłku może odpowiadać co najmniej cztery QTL. Dwa z nich lokalizują się na chromosomach 7A i 1B pozostałe w obrębie grup sprzężeń LG13 i LG21. W przypadku QTL na 1B i LG21 markery asocjowane występują w obszarze QTL lub w jego bezpośrednim sąsiedztwie. Są to QTL odpowiedzialne za najwyższy procent wytłumaczonej wariancji badanej cechy.
- Mapowanie asocjacyjne umożliwiło wytypowanie markerów, które są asocjowane z cechą utrzymania sterility pyłku u pszenżyta z cms Tt. Asocjowane markery zostały przypisane do chromosomu 1B (możliwe również 2B) oraz do LG21 populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo.
- Nie stwierdzono markerów asocjowanych w obrębie pozostałych 2 QTL (7A i LG13). Takie rozbieżności mogą wynikać z faktu, że badana cecha jest relatywnie 'słaba' (markery nie przeszły testu Bonferroni'ego) i tylko najsłabsze asocjacje znalazły odzwierciedlenie w obszarach najistotniejszych QTL.
- Fakt, że markery asocjowane nie przeszły testu Bonferroni'ego oraz ich lokalizowanie się w obrębie 2 z 4 QTL cechy sugeruje, że to właśnie QTL 1B i LG21 mogą być najistotniejsze w przypadku badanej populacji mapującej.
- Bez wątpienia, przynajmniej w przypadku badanej populacji, utrzymanie sterility pyłku u pszenżyta z cms Tt jest cechą wielogenową o złożonych interakcjach pomiędzy nimi.