

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 szerokim spektrum genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt występujących w obrębie badanych populacji RIL oraz określenie wkładu tych genów do zmienności fenotypowej.

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

Cel tematu badawczego 1: Zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii wsobnych poszczególnych populacji RIL poprzez uzyskanie ziarniaków F7 linii rekombinacyjnych dla populacji mapujących pszenżyta z genami utrzymania jałowości pyłku w systemie cytoplazmatyczno jądrowej męskiej sterylności typu Tt.

Materiały i metody: Materiał badawczy stanowiło 5 populacji mapujących RIL6 prowadzonych w chowie wsobnym metodą pojedynczych ziarniaków. Częstość rekombinacji zobrazowano za pomocą programu GGT2 dla jednej z wybranych linii RIL (RIL5: DB1 x RB1).

Wyniki i dyskusja: Uzyskane wyniki dla populacji mapującej RIL5: DB1 x RB1 pokazują zróżnicowanie genomu linii badanej populacji mapującej o czym świadczy naprzemienne występowanie 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 zwiększania częstości rekombinacji w obrębie linii wsobnych oraz wskazanym jest wyprowadzanie kolejnych pokoleń linii populacji mapujących metodą SSD celem kumulowania aktów rekombinacji w obrębie poszczególnych genotypów.

Temat badawczy 2: Ocena występowania genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt na podstawie fenotypu roślin uzyskanych w wyniku krzyżowań wstecznych z formą męskosterylną.

Cele tematu badawczego 2:

- Określenie występowania genów utrzymania sterylności pyłku w obrębie linii RIL populacji mapujących poprzez fenotypowanie roślin BC1F5: DB1 x [RIL5: DB1 x RB1], BC1F5: DB2 x [RIL5: DB2 x RB2] oraz BC1F5: MS 112(15)-2-1 cms Tt x [RIL5: MS 112(15)-2-1-dop. x Borwo].
- Przygotowanie do oceny występowania genów utrzymania sterylności pyłku w obrębie linii populacji mapujących RIL5: MS 112(15)-2-1dop. x Borwo oraz RIL6: MS HT 352 dop.

x Borwo poprzez wykonanie krzyżowań BC1F5: MS 112(15)-2-1 cms Tt x [RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo] oraz BC1F6: MS HT 352 cms Tt x [MS HT 352 dop x Borwo] i uzyskanie odpowiednich ziarniaków.

Materiały i metody: Materiał do badań stanowiły rośliny BC1F5: DB1 x [RIL5: DB1 x RB1], BC1F5: DB2 x [RIL5: DB2 x RB2] oraz BC1F5: MS 112(15)-2-1 cms Tt x [RIL5: MS 112(15)-2-1-dop. x Borwo], u których badano stopień zawiązywania ziarniaków.

Linie populacji RIL6: MS HT 352 dop x Borwo oraz RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo krzyżowano wstecznie z formami matecznymi tych populacji na cms Tt. Dla każdej populacji wykonano ponad 250 krzyżowań wstecznych.

Wyniki i dyskusja: Określenie czy linie rekombinacyjne prowadzone na cytoplazmie normalnej (niesterylizującej) zawierają geny utrzymania sterylności pyłku w systemie z cytoplazmatyczną męską sterylnością jest możliwe poprzez wykonanie krzyżowania formy matecznej prowadzonej na cytoplazmie sterylizującej i linii rekombinacyjnych poszczególnych populacji. Potomstwo powstałe w wyniku takich krzyżowań będzie albo sterylne (jeżeli geny utrzymania sterylności są obecne) albo płodne. W przypadku populacji BC1F5: DB1 x [RIL5: DB1 x RB1], BC1F5: DB2 x [RIL5: DB2 x RB2] oraz BC1F5: MS 112(15)-2-1 cms Tt x [RIL5: MS 112(15)-2-1-dop. x Borwo] stwierdzono zróżnicowanie w zawiązywaniu ziaren u poszczególnych form populacji. Identyfikowano zarówno formy, które praktycznie nie zawiązywały ziarniaków jak i takie, które dawały ich ponad 70 w kłosie. Analiza rozkładu cechy wykonana dla populacji BC1F5: DB1 x [RIL5: DB1 x RB1] oraz BC1F5: DB2 x [RIL5: DB2 x RB2] wykazała, że ma ona rozkład normalny. Uzyskane dane demonstrują, że omawiane populacje zawierają geny utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt i mogą być wykorzystane do mapowania cechy.

Zawiązywanie ziarniaków w przypadku krzyżowań wstecznych realizowanych dla BC1F5: MS 112(15)-2-1 cms Tt x [RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo] oraz BC1F6: MS HT 352 cms Tt x [RIL6: MS HT 352 dop x Borwo] przebiegło pomyślnie i umożliwiło uzyskanie ziarniaków BC1F5 oraz BC1F6 odpowiadających 235 i 265 liniom RIL populacji RIL5: MS 112(15)-2-1 dop x Borwo i RIL6: MS HT 352 dop x Borwo. Linie te zostaną ocenione pod kątem zawiązywania ziarniaków w przyszłym roku, a następnie wykorzystane do mapowania cechy.

Wnioski: Na podstawie danych dotyczących zawiązywania ziaren w BC1F5: DB1 x [RIL5: DB1 x RB1], BC1F5: DB2 x [RIL5: DB2 x RB2] oraz BC1F5: MS 112(15)-2-1 cms Tt x [RIL5: MS 112(15)-2-1-dop. x Borwo], stwierdzono w obrębie odpowiednich populacji RIL5: DB1 x RB1, RIL5: DB2 x RB2 oraz RIL5: MS 112(15)-2-1-dop. x Borwo występowanie genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt. W przypadku krzyżowań wstecznych realizowanych dla BC1F5: MS 112(15)-2-1 cms Tt x [MS 112(15)-2-1dop. x Borwo] i BC1F6: MS HT 352 cms Tt x [RIL6: MS HT 352 dop x Borwo] zawiązywanie ziarniaków przebiegło pomyślnie.

Temat badawczy 3: Markerowanie genetyczne (DArTseq) linii rekombinacyjnych.

Cel tematu badawczego 3: Genotypowanie linii RIL5: DB1 x RB1 populacji mapującej za pomocą markerów DArTseq.

Materiały i metody: Materiałem badawczym były preparaty DNA 192 linii RIL populacji mapującej RIL5: DB1 x RB1 wraz z kontrolami. Analiza molekularna została wykonana w firmie Diversity Arrays Technology P/L w Australii.

Wyniki i dyskusja: Metoda DArTseq umożliwiła uzyskanie dużej liczby markerów genetycznych, która wielokrotnie przekracza możliwości metody SSR czy DArT. Dodatkową zaletą metody DArTseq jest znana lokalizacja chromosomowa części z tych markerów. W wyniku genotypowania populacji RIL5: DB1 x RB1 uzyskano 16110 markerów DArTseq w postaci macierzy z segregacjami. Po usunięciu markerów monomorficznych oraz wykazujących ponad 95% braki ostatecznie dysponowano 11600 markerami, które mogły być wykorzystane w kolejnych etapach Projektu.

Wnioski: Profilowanie populacji RIL5: DB1 x RB1 umożliwiło uzyskanie 11600 markerów DArTseq o pożądanej segregacji i dopuszczalnej liczbie brakujących danych użytecznych do mapowania genetycznego.

Temat badawczy 4: Identyfikacja markerów genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt (mapowanie genetyczne/mapowanie asocjacyjne).

Cel tematu badawczego 4: Identyfikowanie QTLi warunkujących utrzymanie sterylności pyłku z wykorzystaniem mapowania kompozytowego w oparciu o mapowanie genetyczne i badaną cechę oraz mapowania asocjacyjnego.

Materiały i metody: Do opracowania map genetycznych wykorzystano markery DArTseq uzyskane dla populacji RIL5: DB1 x RB1. Mapy genetyczne konstruowano z wykorzystaniem programu MultiPoint. Mapowanie kompozytowe dla populacji RIL5: DB1 x RB1 oraz RIL5: MS 112(15)-2-1dop. x Borwo wykonano w programie WinQTL Cartographer. Istotność QTLi określano na podstawie testu permutacji (1000). Mapowanie asocjacyjne przeprowadzono w programie TASSEL. Markery asocjowane z cechą identyfikowano stosując ogólny model liniowy (General Linear Model - GML).

Wyniki i dyskusja: Mapowanie genetyczne wykonane dla populacji RIL5: DB1 x RB1 umożliwiło identyfikację dwudziestu dwóch grup sprzężeń. Na mapie szkieletowej znalazło się 637 markerów, 2705 markerów redundantnych oraz 3053 markerów aproksymowanych. Łącznie, wszystkie grupy sprzężeń pokrywały 1432 cM, przy czym średnio markery występowały co 2,17 cM. Mapowanie porównawcze umożliwiło przypisanie części grup sprzężeń do chromosomów gatunku. Interwałowe mapowanie kompozytowe dla populacji RIL5: DB1 x RB1 wykazało obecności QTLa determinującego cechę męskiej sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt w grupie sprzężeń przypisanej do chromosomu 4A. Najbliższe maksimum QTLa, w odległości 0,2 cM, znalazł się marker DS3610112TC11. Dla tego markera zidentyfikowano 3 markery redundantne: DS3604977AG23, DS4348966GC15 i DS3610112TC11. Wartość wytłumaczonej wariancji cechy w zidentyfikowanym locus wynosiła 32%. W wyniku mapowania asocjacyjnego identyfikowano szereg markerów

asocjowanych z QTL utrzymania sterylności pyłku dla populacji RIL5: DB1 x RB1. Markery te były przypisane do chromosomu 4A, 1B i 3B. Zbyt mała liczba danych fenotypowych uniemożliwiła identyfikację markerów cms Tt dla populacji RIL5: MS 112(15)-2-1dop. x Borwo poprzez zastosowanie mapowania kompozytowego. Mapowanie asocjacyjne sugeruje jednak, że QTL odpowiedzialny za utrzymanie sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt lokalizuje się na chromosomach 1A i 2B. Przebadane do tej pory populacje mapujące wykazują zróżnicowanie co do QTLi genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt. Uzyskane dane są zgodne z wynikami innych autorów, którzy pokazują złożoność cechy utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt, która jest warunkowana wieloma genami. Takie zróżnicowanie może się okazać korzystne do określenia roli poszczególnych genów w ekspresji badanej cechy oraz wskazaniu wzajemnej relacji pomiędzy QTLami. W efekcie pomoże w lepszym zrozumieniu zjawiska męskiej sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt.

Wnioski:

- Opracowano mapę genetyczną dla populacji RIL5: DB1 x RB1 składającą się z 22 grup sprzężeń o średnim pokryciu genomu wynoszącym jeden marker na 2,2 cM. Na podstawie znanej lokalizacji chromosomowej markerów DArTseq poszczególne grupy sprzężeń przypisano do chromosomów pszenicznych. Brak analogicznych danych dla żyta nie dał możliwości przypisania grup sprzężeń do chromosomów żytnich.
- Interwałowe mapowanie kompozytowe (CIM) wykazało, że w obrębie populacji RIL5: DB1 x RB1 za utrzymanie sterylności pyłku może odpowiadać co najmniej jeden gen lokalizujący się na chromosomie 4A. Mapowanie asocjacyjne umożliwiło wytypowanie szeregu markerów asocjowanych z QTL utrzymania sterylności pyłku dla populacji RIL5: DB1 x RB1. Markery te były przypisane do chromosomu 4A, 1B i 3B.
- Zbyt mała liczba danych fenotypowych uniemożliwiła identyfikację markerów cms Tt dla populacji RIL5: MS 112(15)-2-1dop. x Borwo poprzez zastosowanie mapowania kompozytowego. Mapowanie asocjacyjne sugeruje jednak, że QTL odpowiedzialny za utrzymanie sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt lokalizuje się na chromosomach 1A i 2B.