

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 4 tematów badawczych:

Temat badawczy 1: Zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii rekombinacyjnych metodą pojedynczych ziarniaków (SSD) na poziomie pokoleń (F4-F8).

Cel tematu badawczego 1: Zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii wsobnych poszczególnych populacji RIL poprzez uzyskanie ziarniaków F9 linii rekombinacyjnych dla populacji mapujących pszenżyta z genami utrzymania sterylności pyłku w systemie cytoplazmatyczno jądrowej męskiej sterylności typu Tt.

Materiały i metody: Materiał badawczy stanowiło 5 populacji mapujących RIL8 prowadzonych w chowie wsobnym metodą SSD.

Wyniki i dyskusja: Wyprowadzono kolejne pokolenie (RIL8) 5 populacji mapujących, uzyskując dla populacji DB1 x RB1 oraz DB2 x RB2 po 150 linii wsobnych, a w przypadku populacji MS 114(5)-2-1 dop. x Borwo, MS 112(15)-2-1 dop. x Borwo, MS HT 352 dop. x Borwo po 250 linii.

Wnioski: Metoda SSD umożliwia zwiększanie częstości rekombinacji w obrębie linii wsobnych (prowadząc do wzrostu homozygotyczności linii), a wyprowadzenie kolejnych pokoleń przyczynia się do zwiększenia rozdzielczości map genetycznych poprzez kumulację aktów rekombinacji.

Temat badawczy 2: Ocena występowania genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt na podstawie fenotypu (zawijania ziaren) roślin uzyskanych w wyniku krzyżowań z formą mateczną.

Cel tematu badawczego 2: Wstępna analiza występowania genów utrzymania sterylności pyłku w obrębie linii RIL populacji mapującej MS HT 112(15)-2-1 dop. x Borwo poprzez ocenę zawijania ziaren 186 form BC1F6.

Wyniki: Badana cecha była zróżnicowana. Obserwowano zarówno rośliny sterylne jak i płodne. Liczba ziarniaków w kłosie – jako dane surowe, nie wykazywała rozkładu normalnego. Wykorzystanie transformacji cechy (kwadrat znormalizowanej liczby ziarniaków w kłosie) wykazało, że w 2 testach dane fenotypowe po transformacji pierwiastek kwadratowy mają rozkład zbliżony do normalnego co daje podstawy do wykorzystania tych danych do dalszych analiz.

Wnioski: Wstępna analiza zawijania ziarniaków dla 186 genotypów sugeruje, że w obrębie populacji RIL6: MS HT 112(15)-2-1-dop. x Borwo występują geny utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt.

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

Cele tematu badawczego 3: Genotypowanie linii RIL6: MS HT 112(15)-2-1 x Borwo populacji mapującej za pomocą markerów DArT.

Materiały i metody: Wykonano izolacje genomowego DNA 192 roślin linii RIL populacji mapującej MS HT 112(15)-2-1 x Borwo. Genotypowanie DArTseq zostało wykonane w Diversity Arrays Technology w Australii.

Wyniki i dyskusja: W wyniku genotypowania DArT populacji RIL6: MS HT 112(15)-2-1 x Borwo uzyskano 19967 markerów DArTseq oraz 69231 markerów silicoDArT. Do dalszych analiz użyto 25066 markerów (usunięto markery monomorficzne i markery zawierające dużą liczbę brakujących danych). Zaletą metody DArTseq jest znana lokalizacja chromosomowa części z tych markerów.

Wnioski: Profilowanie populacji RIL6: MS HT 112(15)-2-1 x Borwo pozwoliło na uzyskanie łącznie 25066 markerów DArTseq i silicoDArT 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: Mapowanie genetyczne populacji RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo i MS HT 112(15)-2-1 dop. x Borwo w oparciu o markery DArTseq i silicoDArT oraz poszukiwanie markerów związanych z cms Tt z wykorzystaniem populacji BC1F6: MS HT 112(15)-2-1 cms Tt x [RIL6: MS HT 112(15)-2-1 x Borwo].

Materiały i metody:

1. Do opracowania map genetycznych (MultiPoint UltraDense) wykorzystano markery DArTseq i silicoDArT uzyskane dla dwóch populacji MS HT 352 dop. x Borwo oraz MS HT 112(15)-2-1 dop. x Borwo).
2. Wykonano mapowanie kompozytowe i wielokrotne mapowanie interwałowe (WinQTLCart) oraz asocjacyjne (skrypt GAPIT-R CRAN) dla 182 linii populacji BC1F6: MS HT 112(15)-2-1 cms Tt x [RIL6: MS HT 112(15)-2-1 x Borwo].

Wyniki i dyskusja:

- Mapowanie genetyczne
 - wykonane dla populacji MS HT352 dop. x Borwo pozwoliło na identyfikację 21 grup sprzężeń (LG). Na mapie znalazło się łącznie 5802 markerów DArTseq i silicoDArT (1718 markerów szkieletowych). Najmniej liczna pod względem liczby markerów szkieletowych LG21 składała się z 19, za to najliczniejsza LG4 z 117. Najdłuższa grupa LG37 pokrywała 183,49 cM, zaś najkrótsza LG8 65,71 cM. Łącznie, wszystkie LG pokrywały 2520 cM. Poszczególne LG przypisano do odpowiadających im chromosomom na podstawie znanej lokalizacji markerów DArT i kolinearności zbóż.
 - wykonane dla populacji MS 112(15)-2-1 dop. x Borwo umożliwiło identyfikację 26 LG. Na mapie znalazło się łącznie 3499 markerów DArTseq i silicoDArT (1093 markerów szkieletowych). Najmniej liczna pod względem liczby markerów szkieletowych LG22 składała się z 7, zaś najliczniejsza LG2 z 90. Najdłuższa grupa (LG26) pokrywała 153,49 cM, natomiast najkrótsza (LG22) 16,45 cM. Łącznie, wszystkie LG pokrywały 1093 cM. Poszczególne LG przypisano do odpowiadających im chromosomom na podstawie znanej lokalizacji markerów DArT i kolinearności genomów zbóż.
 - mapy genetyczne opracowane dla populacji RIL6: MS HT 352 x Borwo oraz RIL6: MS 112(15)-2-1 dop. x Borwo charakteryzuje relatywnie wysokie zagęszczenie markerami molekularnymi.
- Interwałowe mapowanie kompozytowe CIM
 - przeprowadzone dla populacji RIL6: MS HT 112(15)-2-1 x Borwo umożliwiło identyfikację 3 QTL determinujących cechę męskiej sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt w obrębie badanej populacji mapującej. QTL identyfikowano w obrębie grup sprzężeń LG16 (3R), LG19 (6B) oraz LG25 (4R).
- Wielokrotne mapowanie interwałowe MIM
 - Analiza ta potwierdziła obecność 3 QTLi w obrębie LG16, LG19 i LG25, co jest zgodne z mapowaniem kompozytowym.

- Mapowanie asocjacyjne

- analiza struktury genetycznej populacji mapującej RIL6: MS HT 112(15)-2-1 x Borwo, demonstruje brak wyraźnych oznak strukturyzacji danych. Biorąc pod uwagę, że do tego mapowania wykorzystano populację mapującą wyprowadzoną na bazie krzyżowania dwóch homozygotycznych linii rodzicielskich brak struktury danych był jak najbardziej oczekiwany.
- analiza pokrewieństwa linii wchodzących w skład populacji mapującej RIL6: MS HT 112(15)-2-1 x Borwo pokazuje, że tylko część linii wykazuje pewien stopień pokrewieństwa.
- na podstawie analizy PCA oraz analizy pokrewieństwa wybrano do dalszej analizy model statystyczny mapowania asocjacyjnego, który nie uwzględnia struktury genetycznej i bierze pod uwagę pokrewieństwo badanych materiałów.
- mapowanie asocjacyjne wykazało, że 14 istotnych markerów DArTseq/silicoDArT jest silnie asocjowanych (od 8 do 22 %) z genami utrzymania sterylności. Markery te charakteryzują się niską wartością FDR (za wyjątkiem trzech ostatnich markerów gdzie odpowiednie wartości wynoszą 9, 12.5 oraz 16.2%). FDR mówi jakie jest prawdopodobieństwo, że wykorzystanie danego markera do ewentualnej selekcji wspartej markerami molekularnymi doprowadzi do błędnego typowania.

Wnioski:

1. Opracowano mapę genetyczną dla populacji RIL6: MS HT 352 x Borwo o średnim pokryciu genomu wynoszącym jeden marker na 1,62 cM.
2. Opracowano mapę genetyczną dla populacji RIL6: MS HT 112(15)-2-1 x Borwo o średnim pokryciu genomu wynoszącym jeden marker na 2,00 cM.
3. Mimo wysycenia mapy genetycznej markerami SNP obserwowano obszary pozbawione markerów. Takie luki są wynikiem rzadkich aktów rekombinacji w niektórych obszarach genomu.
4. Na podstawie znanej lokalizacji chromosomowej markerów DArTseq i silicoDArT poszczególne grupy sprzężeń populacji MS HT 112(15)-2-1 dop. x Borwo przypisano do chromosomów pszenicznych genomu pszenżyta. Natomiast na podstawie kolinearności genomów zbóż przypisano grupy sprzężeń do chromosomów żyta.
5. Analiza CIM wykazała, że w obrębie populacji MS HT 112(15)-2-1 dop. x Borwo za utrzymanie sterylności pyłku mogą odpowiadać 3 QTL, które lokalizują się na chromosomach 3R, 4R oraz 6B.
6. Wielokrotne mapowanie interwałowe potwierdziło wyniki CIM, wskazując na QTL na 4R jako najistotniejszy dla ekspresji cechy w obrębie populacji MS HT 112(15)-2-1 dop. x Borwo.
7. Mapowanie asocjacyjne wykazało obecność jednego QTL na chromosomie 4R. Lokalizacja tych markerów jest identyczna z lokalizacją QTL określoną na podstawie mapowania kompozytowego i wielokrotnego mapowania interwałowego. Mapowanie asocjacyjne nie wykryło QTL cechy na innych chromosomach gatunku w obrębie badanej populacji mapującej MS HT 112(15)-2-1 dop. x Borwo.
8. Uzyskane wyniki potwierdzają wielogenowy charakter cechy. Niemniej poraż pierwszy udało się zidentyfikować silny QTL oraz markery charakteryzujące się silną asocjacją/sprzężeniem z cechą.