

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

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

Zadanie zostało zrealizowane w pięciu tematach badawczych.

Temat badawczy 1: Wyprowadzenie kolejnych pokoleń linii rekombinacyjnych (F8-F9).

Cel tematu badawczego 1: Zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii wsobnych poszczególnych populacji RIL poprzez uzyskanie ziarniaków F8-F9 linii rekombinacyjnych dla populacji mapujących żyta z genami przywracania płodności pyłku w systemie cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterility typu pampa.

Materiały i metody: Materiał do wyprowadzenia kolejnych pokoleń RIL stanowiły 3 populacje mapujące: RIL8 (S 60/08): S305N/00 x SO 2R/05; DANKO Sp. z o.o.-116 linii; RIL8 (S 64/04/01): S305N/00 x SO37R/05; DANKO Sp. z o.o.-186 linii; RIL7 (RIL-A): NS 08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2; PHR Sp. z o.o.; 110 linii. Populacje mapujące na normalnej cytoplazmie prowadzono w DANKO Hodowla Roślin oraz w Poznańskiej Hodowli Roślin. Linie RIL prowadzono w chowie wsobnym metodą pojedynczych ziarniaków (SSD).

Wyniki: W wyniku realizowanych prac wyprowadzono kolejne pokolenia linii rekombinacyjnych uzyskując ziarniaki reprezentujące 116 linii populacji RIL9 (S60/08); 186 linii populacji RIL9 (S64/04/01); 110 linii populacji RIL8 (RIL-A). Realizacja kolejnego cyklu generatywnego populacji RIL umożliwiła kumulację dodatkowych aktów rekombinacji, co uwidacznia się poprzez występowanie częstego „poszatkowania” genomów linii rekombinacyjnych. Prowadzenie populacji RIL metodą SSD doprowadziło do wyrównania genetycznego poszczególnych linii rekombinacyjnych o czym świadczy brak występowania obszarów genomu reprezentowanych przez markery heterozygotyczne.

Wnioski (Podsumowanie): Uzyskano kolejne pokolenia ziarniaków F8 i F9 odpowiadających 116, 186 i 110 liniom RIL9 (S60/08): S305N/00 x SO 2R/05, RIL9 (S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05 oraz RIL8 (RIL-A): NS08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2. Uzyskanie kolejnych pokoleń generatywnych wymienionych wyżej populacji mapujących, ze względu na występowanie zjawiska rekombinacji, doprowadziło do zwiększenia częstości rekombinacji oraz przyczyniło się do wyrównania genetycznego w obrębie każdej z linii danej populacji RIL.

Temat badawczy 2: Ocena występowania genów przywracania płodności pyłku u żyta z cms pampa na podstawie fenotypu roślin uzyskanych w wyniku krzyżowań wstecznych z formą mateczną.

Cel tematu badawczego 2: Ocena obecności jądrowych genów przywracania płodności pyłku linii RIL populacji mapujących żyta.

Materiały i metody: Uzyskane i wysiane w 2015r formy BC1F7: S305P/00 x [RIL7 (S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05] (186 form) oraz BC1F6: NS135P x [RIL6 (RIL-A): NS 08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2] (110 form) zostały poddane ocenie bonitacyjnej pod względem zdolności do przywracania płodności pyłku opracowanej przez profesora H. H. Geigera. Dla obu form (BC1F7 oraz BC1F6) przeprowadzono analizę zgodności rozkładu badanej cechy fenotypowanej z rozkładem normalnym w programie XLSTAT.

Wyniki: Uzyskano dane dotyczące przywracania płodności pyłku dla populacji BC1F7: S305P/00 x [RIL7(S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05], w której stwierdzono występowanie zarówno płodnych jak i sterylnych form w obrębie generatywnego potomstwa, gdzie 55,94% stanowiły formy sterylne (ocena fen. 1-3); 2,10% formy pośrednie (4-6) oraz 41,96% formy płodne (7-9). Natomiast w przypadku generatywnego potomstwa BC1F6: NS135P x [RIL6 (RIL-A): NS 08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2] obserwowano wyłącznie formy płodne

dla których ocena fenotypowa mieściła się w zakresie 7-9. Analiza statystyczna dla obu fenotypowanych populacji wykazała, że badana cecha nie ma rozkładu normalnego.

Dyskusja i wnioski: Uzyskano dane fenotypowe dotyczące pylenia roślin wybranych linii RIL7 (S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05 na bazie bonitacji wizualnej potomstwa generatywnego form BC1F7: S305P/00 x [RIL7(S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05] oraz linii RIL-A: NS08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2 na podstawie form BC1F6: NS135P x [RIL6 (RIL-A): NS08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2]. Na podstawie uzyskanych danych dotyczących przywracania płodności pyłku obu form (BC1F6 oraz BC1F7) należy stwierdzić, że odpowiadające im populacje RIL6 (RIL-A): NS08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2 i RIL7: (S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05 zawierają geny przywracania płodności pyłku. Analiza statystyczna rozkładu cechy dla obu form (BC1F7 oraz BC1F6): wykazała, że badana cecha nie ma rozkładu normalnego. Występowaniu form o skrajnych fenotypach w przypadku form BC1F7: S305P/00 x [RIL7(S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05] sprawia, że populacja RIL7: RIL7(S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05 może być wykorzystana do mapowania kontrastowego. Natomiast zróżnicowanie form BC1F6: NS135P x [RIL6 (RIL-A): NS08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2], wyłącznie w obrębie form płodnych może sprawiać problem przy mapowaniu genów przywracania płodności w latach kolejnych. W przypadku wystąpienia ww. problemów populacja ta, po przeprowadzeniu mapowania genetycznego, może być wykorzystana do weryfikacji użyteczności markerów cechy oraz do konstruowania mapy konsensusowej żyta z cms pampa.

Temat badawczy 3: *Genotypowanie linii populacji mapującej.*

Cel tematu badawczego 3: Uzyskanie markerów DNA umożliwiających opracowanie map genetycznych populacji mapujących.

Materiały i metody: Materiał do analiz molekularnych stanowiło DNA wyizolowane z liści reprezentujących każdą z linii populacji RIL7(S 64/04/01): S305N/00 x SO37R/05. Analiza DArTseq została przeprowadzona w firmie Diversity Arrays Technology Pty Ltd, Canberra, Australia. Genotypowaniu zostało poddanych 192 preparatów DNA celem uzyskania profili markerowych poszczególnych linii ww. populacji RIL.

Wyniki: W wyniku profilowania DNA populacji RIL7: (S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05 uzyskano 35 991 markerów DArTseq (marker SNP) oraz 128016 silicoDArT (marker dominujący). Liczba markerów DArTseq i silicoDArT (ponad 160 000) jest wystarczająca by uzyskać zagęszczoną mapę genetyczną użyteczną do lokalizowania obszarów genomu odpowiedzialnych za kodowanie genów przywracania płodności pyłku u żyta z cms pampa.

Wnioski: Metoda DArTseq umożliwiła identyfikację dużej liczby markerów SNP i silicoDArT w obrębie analizowanej populacji RIL7: (S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05.

Temat badawczy 4: *Identyfikacja markerów cechy (mapowanie genetyczne/mapowanie asocjacyjne dla przeanalizowanej populacji mapującej).*

Cel tematu badawczego 4: Opracowanie zagęszczonej mapy genetycznej oraz mapowanie genów przywracania płodności pyłku.

Materiał i Metody:

Do mapowania genetycznego została wykorzystana populacja: RIL7 (S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05. Mapowanie genetyczne wykonano w programie Multi Point Ultra Dense z wykorzystaniem markerów DArTseq oraz silicoDArT. Kolinearność genomów pszenicy i żyta określano na podstawie znanej lokalizacji markerów DArTseq oraz silicoDArT na siedmiu mapach genetycznych pszenicy (udostępnione przez dr A. Kiliana).

Mapowanie cech ilościowych (przywracanie płodności pyłku) zostało wykonane z wykorzystaniem wyników analizy fenotypowej form BC1F7: S305P/00 x [RIL7(S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05] (temat badawczy 2) w programie Windows QTL Cartographer.

Mapowanie asocjacyjne zrealizowano w programie TASSEL z wykorzystaniem wszystkich dostępnych markerów DArTseq i silicoDArT oraz danych fenotypowych form BC1F7: S305P/00 x [RIL7(S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05]. Markery asocjowane z cechą identyfikowano stosując ogólny model liniowy (General Linear Model – GLM).

Analizę bioinformatyczną sekwencji nukleotydowych markerów silicoDArT i DArTseq wykonano w programie CLC Main Workbench.

Wyniki i dyskusja:

Mapowanie genetyczne umożliwiło identyfikację 16 grup sprzężeń (LG), przy czym każdej grupie odpowiada jej komplementarna grupa, ale w przeciwnej fazie segregacji markerów. Poszczególne pary grup sprzężeń nieznacznie różniły się między sobą długością i liczbą markerów. Na mapie genetycznej umieszczono 2733 markerów szkieletowych i 14509 redundantnych. Głównie były to markery typu silicoDArT. Opracowana mapa genetyczna pokrywa 1430cM (bez uwzględnienia komplementarności grup LG). Największa grupa rozciągała się na obszarze 256.74 cM a najmniejsza na 65.23 cM. Średnio na 1cM przypada jeden marker. Największa lukę między markerami wynosiła 12.5 cM. Mapowanie genetyczne linii wsobnych RIL7 (S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05 z wykorzystaniem markerów DArTseq i silicoDArT umożliwiło opracowanie zagęszczonej mapy genetycznej o wysokiej rozdzielczości bez większych obszarów pozbawionych markerów DNA.

Mapowanie cech ilościowych (mapowanie kompozytowe) pozwoliło na identyfikację 3 stabilnych QTL występujących w obrębie LG3 (2 QTL) i LG15 (1 QTL), które przechodziły wartość krytyczną testu permutacji (LG3 - 1.7; LG15 - 1.8 LOD). W przypadku grupy sprzężeń LG3 identyfikowano dwa QTL cechy. Pierwszy w pozycji 94.2 cM mapy genetycznej a drugi w pozycji 117cM. Natomiast w grupie sprzężeń LG15 identyfikowano 1 QTL lokalizujący się w pozycji 11 7.2cM.

Na podstawie analizy kolinearności genomów (syntenii) pszenicy i żyta oraz informacji o lokalizowaniu się markerów silicoDArT oraz DArTseq na siedmiu mapach genetycznych pszenicy grupę LG3 przypisano do chromosomu 4R, a LG15 najprawdopodobniej do 5R. Uzyskane wyniki potwierdzają wcześniejsze rezultaty, że w obrębie populacji RIL7 (S64/04/01): S305N/00 x SO37R/05 występuje silny QTL przywracania płodności odpowiedzialny za około 66% wariancji cechy oraz dwa mniej istotne loci na 4R i 5R.

Na uwagę zasługuje obszar LG3-2, który to jest bogaty w geny odpowiedzialne między innymi za energetykę komórki, helikazy uczestniczące w dojrzewaniu pre mRNA czy geny odpowiedzialne za degradację białek (poprzez wprowadzanie/usuwanie ubiquityny). Obszar QTL LG3-2 jest otoczony sekwencjami kodującymi białka z rodziny PPR. Uważa się, że geny przywracania płodności pyłku w zdecydowanej większości należą do tej właśnie grupy. Rozmieszczenie genów kodujących białka PPR jest charakterystyczne dla obszarów występowania genów przywracania płodności pyłku u innych gatunków roślin. W przypadku LG15 również występują geny odpowiedzialne za energetykę komórki oraz processing RNA czy degradację białek. Uzyskane dane sugerują, że przywracanie płodności pyłku u żyta z cms pampa może być wynikiem współdziałania genów odpowiedzialnych za energetykę komórki, dojrzewanie mRNA oraz degradację lub utrzymanie integralności białek. Ostatnie dwie grupy genów nie są powszechnie uważane za kandydatów genów przywracania płodności jednak wydają się wpisywać w pewien schemat sugerujący równowagę pomiędzy mRNA i białkami niezbędnymi dla prawidłowego funkcjonowania komórki oraz zapotrzebowaniem energetycznym. Zaburzenie pomiędzy tymi procesami (np. poprzez obecność cytoplazmy sterylizującej) może być kompensowane poprzez interakcje wymienionych grup białek.

Mapowanie asocjacyjne umożliwiło identyfikację 90 markerów DArTseq i 813 silicoDArT, które przeszły test Bonferroni'ego. Markery te wykazywały wartość asocjacji (R^2) wahającą się od 0,14 do 0,63 przy $p=0.01$. Porównanie wyników mapowania genetycznego i asocjacyjnego pokazało, że markery asocjowane (występujące na szkieletowej mapie genetycznej) lokalizowały się na chromosomie 4R w obszarze QTL LG3-2.

Wnioski (podsumowanie):

- Opracowano wysokorozdzielczą mapę genetyczną żyta dla populacji mapującej: RIL7 (S 64/04/01): S305N/00 x SO37R/05.
- Zidentyfikowano trzy QTL genów przywracania płodności pyłku u żyta z cms pampa, przy czym zastosowanie populacji RIL umożliwiło znaczne zawężenie obszarów QTL. Na podstawie kolinearności genomów zbóż przypisano grupy sprzężeń w obrębie których identyfikowano QTL cechy do chromosomów żyta. Stwierdzono, że badana populacja mapująca posiada silny QTL przywracania płodności lokalizujący się na chromosomie 4R oraz że w obszarach QTL występują liczne markery DNA.
- Mapowanie asocjacyjne potwierdziło wyniki mapowania kompozytowego przy czym wszystkie markery asocjowane będące markerami szkieletowymi, redundantnymi czy dodanymi znajdują się na chromosomie 4R w obszarze QTL L3-2. Wykres wartości współczynników asocjacji marker-cecha dla markerów w obrębie QTL LG3-2 ma charakterystyczny kształt w znacznej mierze pokrywający się z krzywą LOD tego QTL.
- Analiza bioinformatyczna sekwencji markerowych obszarów QTL sugeruje, że przywracanie płodności pyłku u żyta może być warunkowane wzajemną interakcją genów odpowiedzialnych za energetykę komórki, dojrzewanie mRNA oraz degradację białek. Równowaga pomiędzy tymi procesami może być kluczowa do wykształcenia się funkcjonalnego pyłku a defekty genomu mitochondrialnego mogą być kompensowane poprzez grupy jądrowych genów uczestniczących w wymienionych procesach komórkowych.

Temat badawczy 5: Uzyskanie genotypów o pożądanym kombinacjach genów przywracania płodności pyłku z wykorzystaniem dostępnych materiałów roślinnych w oparciu o markery molekularne.

Cel tematu badawczego 5: Uzyskanie kolejnych pokoleń linii restorerowych zawierających różne kombinacje genów przywracania płodności pyłku u żyta z cms pampa.

Materiał i Metody: Materiał roślinny stanowiły uzyskane w ubiegłych latach linie wsobne BC5F1: S59/08/1/3/99 x SR 13; S59/08/1/3/99 x SO 23R/09; S59/08/1/3/99 x WM 19R; S59/08/1/3/99 x WM 30R; S59/08/1/3/99 x WM 34R pochodzące od pięciu różnych genotypów form restorerowych prowadzonych w chowie wsobnym celem wyrównania materiału roślinnego. Analizy molekularne przeprowadzono na DNA wyizolowanym z liści 10 roślin odpowiadającym pięciu liniom wsobnym BC5F1 w celu weryfikacji obecności markerów genów przywracania płodności na chromosomach 4R i 1R za pomocą 4 typów markerów molekularnych (markery specyficzne, reakcja PCR).

Wyniki i dyskusja: Selekcja wspomagana markerami molekularnymi jest wykorzystywana między innymi w przypadku żyta, a w ramach niniejszego projektu ma za zadanie wyprowadzenie linii wsobnych o różnym składzie QTLi odpowiedzialnych za przywracanie płodności pyłku u żyta z cmsP. Analiza 50 roślin odpowiadających pięciu liniom restorerowym BC5F1 za pomocą czterech markerów molekularnych wykazała, że dla chromosomu 1R marker 508859 wystąpił u 11 osobników BC5F1, zaś marker 399799 u 15 roślin. Dla chromosomu 4R markery 401955 i 507026 wystąpiły odpowiednio u 45 oraz 36 osobników. Na podstawie obecności markerów genów na chromosomach 4R oraz 1R wytypowano po jednej linii spośród 5 genotypów wyjściowych BC5F1: Badania realizowane nad wyprowadzeniem linii wsobnych o ściśle zdefiniowanym składzie genów przywracania płodności pokazały, że uzyskano kolejne pokolenie linii w których genotyp formy matecznej (donora QTL na 4R) został wyparty bez utraty QTL 4R oraz jego kombinacji z innymi QTL cechy.

Wnioski: Specyficzne markery DNA ukierunkowane na geny lokalizujące się 1R i 4R umożliwiają kontrolowanie obecności (lub braku) tych genów w obrębie badanych linii. Wyprowadzono kolejne pokolenie linii wstecznych zawierających różne geny przywracania płodności pyłku.