

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 21

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

Kierownik zadania: **dr hab. Piotr T. Bednarek prof. nadz. IHAR-PIB**

Cel zadania: Celem zadania jest opracowanie markerów DNA silnie sprzężonych z możliwie jak najszerszym spektrum genów przywracania płodności pyłku u żyta z CMS-Pampa 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: Wyprowadzenie kolejnego pokolenia linii rekombinacyjnych (F9).

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

Materiały i metody: Materiał badawczy stanowiła populacja mapująca RIL8 (RIL-A): NS 08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2, składająca się ze 110 linii prowadzona w chowie wsobnym metodą SSD.

Wyniki: W wyniku realizowanych prac uzyskano ziarniaki reprezentujące 110 linii populacji RIL9 (RIL-A): NS 08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR.)/2.

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.

Temat badawczy 2: Ocena występowania genów przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa na podstawie fenotypu potomstwa roślin uzyskanych w wyniku krzyżowań wstecznych formy matecznej (S305P/00) i odpowiednich linii rekombinacyjnych (RIL8 (S60/08): S 305N/00 x SO 2R/05).

Cel tematu badawczego 2: Ocena obecności jądrowych genów przywracania płodności pyłku linii RIL8 (S60/08): S 305N/00 x SO 2R/05 stanowiących populację mapującą żyta.

Wyniki: Stwierdzono występowanie zarówno płodnych jak i sterylnych form w obrębie potomstwa BC1F1 (56,36 % form sterylnych, ocena fen. 1-3; 7,28 % form pośrednich (4-6) oraz 36,36 % form płodnych (7-9)). Analiza statystyczna wykazała, że badana cecha (zarówno dane surowe jak i transformowane) nie ma rozkładu normalnego.

Wnioski: Brak rozkładu normalnego w przypadku form **BC1F1**: S305P/00 x [RIL8 (S60/08): S 305N/00 x SO 2R/05] przy jednoczesnym występowaniu form o skrajnych fenotypach sprawia, że populacja RIL8 (S60/08): S 305N/00 x SO 2R/05 może być wykorzystana do mapowania kontrastowego. Fakt, że wartość przywracania płodności pyłku dla **BC1F1** oceniano na wartościach średnich (dane surowe) dla materiałów odpowiadających danej linii rekombinacyjnej sprawia, że a priori cecha ma rozkład normalny więc może być wykorzystana do mapowania cech ilościowych.

Temat badawczy 3: Genotypowanie linii populacji mapującej

Cele tematu badawczego 3: Uzyskanie markerów DNA umożliwiających opracowanie mapy genetycznej dla populacji mapującej RIL8 (S60/08): S 305N/00 x SO 2R/05.

Materiały i metody: Wykonano izolacje genomowego DNA 148 roślin linii RIL populacji mapującej RIL8 (S60/08): S 305N/00 x SO 2R/05. Genotypowanie DArTseq zostało wykonane w Diversity Arrays Technology w Australii.

Wyniki i dyskusja: W wyniku genotypowania DArT uzyskano 47957 markerów DArTseq oraz 165163 markerów silicoDArT. Zaletą metody DArT jest znana lokalizacja chromosomowa części z tych markerów.

Wnioski: Metoda DArT umożliwiła identyfikację dużej liczby powtarzalnych markerów DArTseq i silicoDArT w obrębie analizowanej populacji RIL8 (S60/08): S 305N/00x SO 2R/05].

Temat badawczy 4: Identyfikacja markerów cechy (mapowanie genetyczne/ mapowanie asocjacyjne).

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

Materiały i metody:

1. Do opracowania mapy genetycznej (MultiPoint UltraDense) wykorzystano markery DArTseq uzyskane dla populacji RIL8 (S60/08):S 305N/00 x SO 2R/05 .
2. Wykonano mapowanie kompozytowe (WinQTLCart) i asocjacyjne (skrypt GAPIT-R CRAN) dla populacji **BC1F1**: S305P/00 x [RIL8 (S60/08):S 305N/00 x SO 2R/05].

Wyniki i dyskusja:

- Mapowanie genetyczne wykonane dla populacji RIL8 pozwoliło na identyfikację 7 grup sprzężeń (LG). Na mapie znalazło się 256 markerów DArTseq (136 markerów szkieletowych). Opracowana mapa genetyczna pokrywa 620 cM. Największa grupa rozciągała się na obszarze 106.30 cM a najmniejsza na 68.80 cM. Średnio na jedną LG przypada 19 markerów szkieletowych, 17 markerów redundantnych, 527 markerów dodanych.

- Interwałowe mapowanie kompozytowe CIM

W wyniku mapowania kompozytowego na populacji mapującej RIL8 (S60/08): S305N/00 x SO 2R/05 identyfikowano obecność silnego QTL w obrębie LG6. Identyfikowany QTL rozciąga się na obszarze około 8cM, a w jego obrębie występują 3 markery szkieletowe.

- Wielokrotne mapowanie interwałowe MIM

Analiza ta ujawniła obecność QTL w obrębie LG6. Maksimum funkcji LOD o wartości 4.4 występuje w okolicy 40.4 cM mapy szkieletowej, a w jego obrębie występują silnie sprzężone markery oddalone o około 0.06 i 0.03 cM. Na podstawie wykonanej analizy stwierdzono, że przywracanie płodności wykazuje odziedziczalność (w wąskim znaczeniu) na poziomie 25.6 %.

- Mapowanie asocjacyjne (dotyczy populacji RIL8 (S60/08): S 305N/00 x SO 2R/05)

- analiza struktury genetycznej populacji demonstuje brak wyraźnych oznak strukturyzacji danych. Biorąc pod uwagę, że do tego mapowania wykorzystano populację mapującą wyprowadzoną na bazie krzyżowania dwóch form rodzicielskich brak struktury danych był jak najbardziej oczekiwany.

- analiza pokrewieństwa linii wchodzących w skład populacji pokazuje, że przynajmniej część linii wykazuje większe niż należałoby oczekiwać pokrewieństwo. Taki stan rzeczy nie ma jednak większego znaczenia dla dalszych analiz, o ile pokrewieństwa zostaną włączone do modelu statystycznego.

- 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 co najmniej 4 markery DArTseq (szkieletowe) są asocjowane z genami przywracania płodności pyłku u żyta. Mimo relatywnie silnej asocjacji tych markerów z badaną cechą charakteryzują się one relatywnie dużą wartością FDR (False Discovery Rate).

- Analiza bioinformatyczna

Analiza bioinformatyczna (**UPGMA**) sekwencji markerów DNA występujących w obrębie QTL przywracania płodności pyłku wykazała, że nie są to sekwencje redundantne. Poszukiwanie w bazach danych sekwencji DNA wykazało, że przynajmniej część z sekwencji markerowych jest homologiczna do sekwencji genów. Funkcja tych genów oraz ich ewentualne powiązanie ze zjawiskiem CMS wymaga dalszych analiz.

Wnioski:

1. Opracowano mapę genetyczną żyta dla populacji mapującej: RIL8 (S60/08): S 305N/00 x SO 2R/05].
2. Mapowanie kompozytowe, interwałowe oraz asocjacyjne jednoznacznie sugerują, że obszar genomu odpowiedzialny za kodowanie przywracania płodności pyłku u żyta znajduje się w obrębie LG6.
3. Identyfikowany QTL charakteryzuje się relatywnie wysokim stopniem odziedziczalności (około 26 %), natomiast asocjowane markery DArTseq zapewniłyby odziedziczalność na poziomie około 12%.
4. Metoda mapowania kompozytowego (CIM) oraz asocjacyjnego (MA) identyfikują identyczne markery szkieletowe (oraz redundantne) wykazujące silne sprzężenie/asocjacje z badaną cechą.
5. Pomiędzy markerami identyfikowanymi CIM i MA znajduje się 20 markerów dodanych, które również mogą okazać się użyteczne w selekcji wspartej markerami molekularnymi.
6. Należy również podkreślić, że wytypowane markery (asocjowane) powinny zapewnić sukces selekcji na poziomie 80%.