

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. P. Bednarek prof. IHAR-PIB**

Temat badawczy 1: Zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii rekombinacyjnych metodą pojedynczych ziarniaków na poziomie pokoleń F<sub>5</sub>-F<sub>7</sub>.

#### Cel

Zwiększenie częstości rekombinacji w obrębie linii wsobnych poszczególnych populacji RIL poprzez uzyskanie ziarniaków F<sub>5</sub>-F<sub>7</sub> 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 następujące populacje mapujące:

1. S 60/08 (S 305N/00\*SO 2R/05): pokolenie F<sub>6</sub>/F<sub>7</sub>; DANKO Sp. z o.o.
2. S 64/04/01 (S 305N/00\*SO 37R/05): pokolenie F<sub>6</sub>/F<sub>7</sub>; DANKO Sp. z o.o.
3. RIL-A; pokolenie F<sub>5</sub>/F<sub>6</sub>; PHR Sp. z o.o.
4. RIL-B; pokolenie F<sub>5</sub>/F<sub>6</sub>; PHR Sp. z o.o.

Populacje mapujące na normalnej cytoplazmie prowadzono w chowie wsobnym metodą pojedynczych ziarniaków. Zebrane ziarniaki wysiano w celu uzyskania kolejnych pokoleń RIL (warunki polowe). Częstość rekombinacji badano w przypadku poszczególnych linii populacji RIL-A. W tym celu z liści roślin odpowiadających liniom populacji RIL wyizolowano DNA. Preparaty DNA poddano profilowaniu metodą DArTseq. Wykonano mapowanie genetyczne w programie MultiPoint UltraDense (demo). Częstość rekombinacji w przypadku populacji RIL-A badano przy pomocy programu Graphical GenoTypes Software (GGT2).

#### Wyniki

Analiza grup sprzężeń dla populacji RIL-A ukazuje wysoki poziom zróżnicowania poszczególnych linii. Stwierdzono występowanie pochodzących od dwóch form rodzicielskich fragmentów DNA o różnej długości. Występowanie krótkich obszarów DNA pochodzących od jednej z form rodzicielskich świadczy o kumulacji aktów rekombinacji na krótkich fragmentach genomu dla analizowanych linii z populacji RIL-A. Nie we wszystkich grupach sprzężeń obserwuje się jednak dostatecznie wysoki stopień przetasowania genomów rodzicielskich.

#### Dyskusja

Metoda pojedynczych ziarniaków pozwala na uzyskanie kolejnych pokoleń RIL. W rezultacie następuje zwiększenie poziomu homozygotyczności. Zwiększeniu ulega również częstość rekombinacji, która ma istotny wpływ na rozdzielczość map genetycznych oraz próby określenia obszaru genomu związanego z daną cechą. Przetasowanie genomów nie jest jednak dostatecznie silne. Zwiększona częstość rekombinacji pozwala na identyfikację lokalizacji cechy z większą dokładnością, gdyż obszar lokalizacji cechy jest zawężany do mniejszego fragmentu genomu. Obserwowany wzrost częstości rekombinacji nie jest jednak dostateczny i należy dążyć do jego zwiększenia poprzez dalsze prowadzenie materiałów roślinnych metodą SSD.

#### Wnioski

1. Metoda SSD zwiększa częstość rekombinacji w obrębie linii wsobnych.
2. W obrębie niektórych grup sprzężeń występują obszary genomu, które tylko w niewielkim stopniu uległy rekombinacji. Obszary te mogą być słabo wysyczone markerami molekularnymi, co może powodować problemy z identyfikacją markerów silnie sprzężonych z genami cechy.
3. Wskazaniem jest wyprowadzanie kolejnych pokoleń linii populacji mapujących metodą SSD celem kumulowania aktów rekombinacji w obrębie poszczególnych genotypów.

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 maticzną

#### Cel

1. Ocena obecności jądrowych genów przywracania płodności pyłku linii RIL populacji mapujących żyta (BCR-A i BCR-B).

2. Wstęp do oceny obecności jądrowych genów przywracania płodności pyłku linii RIL populacji D(N)\*R(P) S60/08 (BC1F6).

#### Materiały i metody

Materiał do badań stanowiły rośliny BC<sub>1</sub>F<sub>4</sub> (BCR-A i BCR-B), u których badano płodność poszczególnych linii. Ocena płodności roślin została opracowana na podstawie bonitacyjnej skali pylenia Geigera. Rozkład cechy oceniono w programie XLStat (Addinsoft).

Ze względu na wyniki fenotypowania populacji BC<sub>1</sub>F<sub>4</sub> (S305P/00 x S 60/08) uzyskane w ubiegłych latach powtórzono doświadczenie polowe polegające na wyprowadzeniu populacji wstecznych opartych o linie RIL S 60/08. Wyprowadzono populacje BC<sub>1</sub>F<sub>6</sub> uzyskane w wyniku krzyżowania 3 form matecznych (linia męskosterylna z cms pampa – S305P/00, oraz dwa pojedyncze mieszańce sterylne SIN 2 i CSIN 168) z liniami populacji mapującej S 60/08 (na cytoplazmie normalnej). Ziarniaki BC<sub>1</sub>F<sub>6</sub> wysiano w pole celem fenotypowania w roku 2015.

#### Wyniki

W obrębie populacji BCR-A stwierdzono, że formy sterylne stanowiły 51,1% tej populacji, natomiast formy płodne – 41,1%. Formy pośrednie stanowiły 7,7% populacji. Cecha nie ma rozkładu zgodnego z normalnym. W populacji BCR-B dominowały formy płodne i sterylne, nie stwierdzono występowania form pośrednich.

#### Dyskusja

Określenie czy linie rekombinacyjne prowadzone na cytoplazmie normalnej (niesterylizującej) zawierają geny przywracania płodności pyłku w systemie z cytoplazmatyczną męską sterylnością jest możliwe poprzez wykonanie krzyżowania odpowiedniej linii matecznej na cms P z liniami rekombinacyjnymi populacji mapującej. Potomstwo powstałe w wyniku takich krzyżowań powinno wykazywać zróżnicowanie cechy. Bonitacyjna skala płodności pyłku pokazała, że oceniane pod względem płodności pyłku populacje są w znacznej mierze pozbawione form częściowo płodnych, a dominują linie sterylne i płodne. Zarówno populacja RIL-A jak i RIL-B nie mają rozkładu normalnego. Występowanie skrajnych form może jednak być wykorzystane do mapowania kontrastowego i podwyższyć rozdzielczość mapowania.

#### Wnioski

1. W obrębie badanych populacji występują geny przywracania płodności pyłku.
2. Brak rozkładu normalnego dla populacji BCR-A jak też BCR-B, brak fenotypów częściowo płodnych i przewaga sterylnych oraz płodnych sprawia, że dostępne dane mogą być wykorzystane do mapowania kontrastowego, które zwiększa rozdzielczość mapowania kompozytowego w obszarze lub obszarach kodujących cechę.

Temat badawczy 3: Markerowanie genetyczne (DARtseq) linii rekombinacyjnych RIL-A i RIL-B (pokolenie F4)

#### Cel

Uzyskanie markerów DNA umożliwiających opracowanie wstępnych map genetycznych dwóch populacji mapujących, określenie, czy w populacjach występują klony oraz czy nie występuje strukturyzacja form.

#### Materiały i metody

Materiał roślinny do analiz molekularnych został dostarczony w postaci liści reprezentujących 149 linii populacji RIL (RIL-A – 110 form, RIL-B – 39 form). Izolację genomowego DNA wykonano zgodnie z procedurą rekomendowaną przez dostawcę zestawów do izolacji (Plant DNeasy MiniKit). DNA charakteryzowano spektrometrycznie. Czystość i integralność poszczególnych preparatów weryfikowano na żelach agarozowych. Analiza DARtseq dla linii populacji rekombinacyjnych żyta została przeprowadzona w firmie Diversity Arrays Technology Pty Ltd, Canberra, Australia. Analizę skupień wykonano metodą Ward'a w programie PAST.

#### Wyniki

W wyniku analiz dla obu populacji RIL uzyskano 14 222 markery DARtseq oraz 57 209 markerów SilicoDARt. Nie stwierdzono występowania klonów i strukturyzacji form w badanych populacjach RIL.

#### Dyskusja

Zastosowanie metody DARtseq przyczyniło się do opracowania dużej liczby markerów. Metoda ta wyróżnia dwa typy markerów: DARtseq i SilicoDARt. Pierwsze to wynik zmienności pojedynczych nukleotydów identyfikowanych dla określonych sekwencji genomowych (SNP). Markery SilicoDARt

są wynikiem zmienności w obrębie miejsca restrykcji rozpoznawanego przez restryktazę wykorzystywaną do redukcji złożoności genomu. Ich wykorzystanie może być ograniczone do zagęszczania map szkieletowych opartych o markery DArTseq. Markery DArTseq stanowią około 20-25% wszystkich markerów identyfikowanych tą metodą. Niemniej ich liczebność jest relatywnie wysoka w porównaniu z liczebnością markerów DArT wykorzystywanych w latach ubiegłych. Do oceny zróżnicowania form populacji RIL-A i RIL-B wykorzystano markery DArTseq, które na podstawie analizy skupień wykazały, że obie populacje nie mają cech strukturyzacji.

#### Wnioski

1. Metoda DArTseq umożliwiła identyfikację dużej liczby markerów SNP identyfikowanych w obrębie dwóch populacji mapujących.
2. Liczba markerów DArTseq była kilkakrotnie mniejsza niż liczba markerów SilicoDArT, co pokazuje, że zmienność w obrębie miejsc restrykcji rozpoznawanych przez endonukleazę metody jest większa niż zmienność wykrywana poprzez sekwencjonowanie nowej generacji.
3. Liczba markerów użytecznych do tworzenia map szkieletowych bazujących na markerach DArTseq jest wyższa niż liczba markerów DArT.
4. Populacje mapujące RIL-A i RIL-B nie wykazują cech strukturyzacji danych.

Temat badawczy 4: Identyfikacja markerów cechy (mapowanie genetyczne/mapowanie kompozytowe/mapowanie asocjacyjne dla przeanalizowanych populacji mapujących)

#### Cel

Opracowanie wstępnych map genetycznych populacji mapujących RIL-A i RIL-B oraz mapowanie asocjacyjne i kompozytowe genów przywracania płodności pyłku.

#### Material i Metody

Mapowanie genetyczne dla populacji RIL-A oraz RIL-B wykonano w programie MultiPointUltraDenese (demo) z wykorzystaniem markerów DArTseq oraz wybranych markerów SilicoDArT. Mapowanie kompozytowe zostało wykonane w programie Windows QTL Cartographer na podstawie wyników fenotypowania poszczególnych form badanych populacji z wykorzystaniem markerów DArTseq i na bazie uzyskanej mapy genetycznej. Mapowanie asocjacyjne zrealizowano w programie TASSEL na markerach DArTseq oraz SilicoDArT. Markery asocjowane z cechą identyfikowano stosując ogólny model liniowy (General Linear Model - GLM) oraz wielokrotny model liniowy (Multiple Linear Model - MLM). Niezrównoważenie sprzężeń LD (ang. linkage disequilibrium - nierównowaga sprzężeń) obliczono w programie GGT2.

#### Wyniki

Dla obydwu populacji (RIL-A i RIL-B) na podstawie dostępnych po analizach DArTseq markerów molekularnych uzyskano mapy genetyczne. Mapa genetyczna populacji RIL-A zawierała 8 grup sprzężeń. Mapa genetyczna populacji RIL-B zawierała 13 grup sprzężeń. Brak danych o lokalizacji markerów DArTseq na mapach genetycznych żyta uniemożliwił określenie, które grupy sprzężeń odpowiadają którym chromosomom genomu żytniego. Analiza niezrównoważenia sprzężeń wykazała, że maksymalny dystans pomiędzy markerami dla populacji RIL-A oraz RIL-B nie powinien wynosić więcej niż odpowiednio 10 i 8 cM. Interwałowe mapowanie kompozytowe dla populacji RIL-A pozwoliło na identyfikację QTLi sprzężonych z cechą przywracania męskiej płodności pyłku u żyta z cms pampa. Stwierdzono, że cecha była warunkowana kilkoma genami, lokalizującymi się w grupach sprzężeń LG1, LG5 i LG7. Analogicznie dla populacji RIL-B zidentyfikowano QTL w grupie sprzężeń LG2. Mapowanie asocjacyjne potwierdziło wyniki mapowania kompozytowego.

#### Dyskusja

Mapy genetyczne populacji RIL-A i RIL-B charakteryzuje relatywnie wysokie zagęszczenie markerami molekularnymi. Analiza niezrównoważenia sprzężeń wykazała, że występowanie markerów genetycznych co 8-10 cM powinno wystarczyć do precyzyjnego identyfikacji obszarów genomu odpowiedzialnych za ekspresję cechy. Mimo zagęszczenia mapy genetycznej dużą liczbą markerów DArTseq wciąż występują obszary rozciągające się nawet na 21 cM wolne od markerów. Biorąc pod uwagę wyniki mapowania genetycznego oraz analizę niezrównoważenia sprzężeń widać, że należy dążyć do zwiększenia częstości rekombinacji badanych populacji metodą SSD.

Identyfikacja QTL cechy przeprowadzona za pomocą mapowania kompozytowego wykazała, że jest ona warunkowana kilkoma jądrowymi genami przywracania płodności, które lokalizują się na różnych chromosomach żyta. Na uwagę zasługuje fakt, że najsilniejszy QTL dla jednej jak i drugiej populacji identyfikowano w grupach sprzężeń, do których zostało przyporządkowanych kilka tych samych

markerów. Można więc oczekiwać, że grupa LG1 populacji RIL-A oraz grupa LG2 populacji RIL-B odpowiadają temu samemu chromosomowi, oraz że opisany QTL odpowiada genowi na chromosomie 1R. Biorąc pod uwagę specyfikę obu populacji RIL (na bazie materiałów orientalnych) jeden z QTL może odpowiadać genowi na 4R. Jednak przypisanie grup sprzężeń na danym etapie badań nie było możliwe i koniecznym jest kontynuowanie badań w tym zakresie.

#### Wnioski

1. Mapy genetyczne opracowane dla dwóch badanych populacji mapujących zostały wysyczone markerami typu DArTseq.
2. Wartości niezrównoważenia sprzężeń oraz występowanie luk sugerują konieczność dalszego prowadzenia populacji RIL metodą SSD.
3. Mapowanie kompozytowe wykazało, że za przywracanie płodności pyłku w populacji RIL-A oraz RIL-B odpowiada co najmniej kilka genów lokujących się na różnych grupach sprzężeń.
4. Mapowanie asocjacyjne potwierdziło wyniki mapowania kompozytowego, wskazując na występowanie genów przywracania płodności pyłku w podobnych obszarach genomu żyta.
5. W przypadku niektórych QTL wykryto markery silnie sprzężone z genami restoracji. Markery te, po konwersji ich do markerów LNA (lub innych) mogą okazać się użyteczne w dalszych badaniach.
6. Koniecznym jest przypisanie grup sprzężeń do poszczególnych chromosomów żyta.

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

#### Cel:

Uzyskanie kolejnych pokoleń linii restorerowych zawierających geny przywracania płodności pyłku. Prowadzono krzyżowania wypierające linii restorerowych o zróżnicowanych genotypach, do których wprowadzono gen przywracania płodności pyłku na chromosomie 4R. Wypierano genom formy donorowej. Obecność pożądanego genu kontrolowano za pomocą markerów specyficznych.

#### Materiał i metody

Materiał roślinny stanowiły rośliny BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> (218 osobników) oraz linie restorerowe (154 osobniki). Linie BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> wykastrowano i przekrzyżowano z odpowiednimi liniami restorerowymi. Analizy molekularne wykonano na DNA roślin BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> przed krzyżowaniami wstecznymi celem weryfikacji obecności pożądanego genu. Obecność pożądanego genu kontrolowano za pomocą markerów molekularnych opartych o reakcję PCR, opracowanych na bazie sekwencji DArT. Obecność markerów weryfikowano elektroforetycznie na żelach agarozowych. Wykorzystano trzy markery dla chromosomu 4R oraz dwa dla 1R.

#### Wyniki

Analiza 218 roślin BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> za pomocą pięciu markerów molekularnych wykazała, że dla chromosomu 1R marker 508859 wystąpił u 79 osobników, zaś marker 399799 u 91 roślin. Dla chromosomu 4R markery 401955, 506357 oraz 507026 wystąpiły odpowiednio u 175, 203 oraz 110 osobników. Uzyskane dane świadczą o znacznym, choć niepełnym wyrównaniu tworzonych linii restorerowych i występującej segregacji w obrębie wytwarzanych linii. Analogiczna analiza linii restorerowych (wypierających) wykazała brak tych markerów. Rośliny BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> zawierające marker na 4R i/lub 1R zostały przekrzyżowane wstecznie z odpowiednimi liniami restorerowymi nie zawierającymi tych markerów celem wytworzenia kolejnych pokoleń linii restorerowych wyrównanych pod względem genetycznych w obrębie pożądanego obszaru genomu.

#### Dyskusja

Markery molekularne są wykorzystywane w selekcji genotypów z pożądanymi genami. W ramach projektu markery DNA sprzężone z genami przywracania płodności pyłku umożliwiły wprowadzanie do form restorerowych silnego genu z chromosomu 4R oraz kontrolę obecności genu lokalizującego się na chromosomie 1R i tym samym uzyskanie linii o zróżnicowanym składzie genów przywracania płodności. Mimo uzyskania linii BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> i znacznego wzbogacenia prowadzonych materiałów o pożądaną geny wciąż obserwowano występowanie segregacji, o czym świadczy występowanie linii BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> bez markera poszczególnych genów. Oznacza to konieczność dalszego prowadzenia materiałów roślinnych celem zwiększenia ich homozygotyczności. Biorąc pod uwagę fakt, że linie restorerowe zawierały również inne geny przywracania płodności pyłku należy sądzić, że uzyskano kolekcję linii restorerowych o wzbogaconym składzie genów Rf oraz o zróżnicowanych genotypach.

### Wnioski

1. Specyficzne markery DNA ukierunkowane na geny lokalizujące się 1R i 4R umożliwiają kontrolowanie przenoszenia tych genów do wybranych genotypów linii restorerowych lub stwierdzenie tam ich obecności.
2. Uzyskanie kolejnych pokoleń linii restorerowych wzbogaconych o geny przywracania płodności, głównie na 4R, pozwalają uzyskać zróżnicowane materiały roślinne z różnym składem tych genów. Takie materiały mogą być użyteczne w badaniach cechy.
3. Mimo wyprowadzenia BC<sub>3</sub>F<sub>1</sub> dla 7 genotypów restorerowych stopień homozygotyczności uzyskiwanych materiałów wciąż nie jest dostateczny i należy przedsięwziąć działania, które doprowadzą do ustabilizowania się prowadzonych form.