

Beata Myśków, Stefan Stojalowski, Paweł Milczarski, Piotr Masojć

Wykorzystanie mapy sprzężeń markerów RAPD do identyfikacji genów odporności na porastanie u żyta (*Secale cereale* L.)

Application of RAPD linkage map for identification of sprouting resistance genes in rye
(*Secale cereale* L.)

ABSTRACT. The aim of this paper was the construction of RAPD linkage map based on the intercross S120 × S76 and localization of QTLs underlying sprouting resistance. 876 10-mer primers were used for detection of inter-line polymorphism. 48 markers were found which segregated in F₂ progeny according to a single gene model. The map constructed using these markers consists of ten linkage groups spanning the distance of 248.8 cM and covering about 20% of rye genome. Among the mapped markers three were common with those found earlier on the map constructed using DS2 × RXL10 intercross. A low number of common markers for the two maps precluded chromosomal identification of the newly obtained linkage groups. Two QTLs controlling sprouting resistance were identified within two different linkage groups on the S120 × S76 map.

KEY WORDS: *Secale cereale* L., RAPD, quantitative trait loci, QTL, pre-harvest sprouting

Mapy genomów roślin uprawnych, zbudowane na bazie markerów molekularnych, stały się w ostatnim dziesięcioleciu jednym z głównych narzędzi w badaniu dziedzicznego podłoża cech ilościowych. Pierwsza mapa genetyczna wszystkich siedmiu chromosomów żyta została skonstruowana na początku lat dziewięćdziesiątych minionego wieku w oparciu o mieszańca F₂ między liniami DS2 i RXL10 [Devos i in. 1993]. Jest ona od tego czasu regularnie rozbudowywana [Masojć i in. 2001; Bednarek i in. 2003] i wykorzystywana do lokalizowania loci o charakterze ilościowym [Masojć, Milczarski 1999; Milczarski, Masojć 2002, 2003].

Poza mapą skonstruowaną na bazie populacji DS2 × RXL10 utworzone zostały również inne mapy genetyczne żyta, dostarczające cennych informacji na temat lokalizacji i działania genów związanych m. in. z dziedziczeniem cech morfologicznych roślin, wczesności, przywracania płodności pyłku w cytoplazmach sterylizujących itp. [Korzun i in. 2001; Miedaner i in. 2000; Stojalowski, Łapiński 2002]. Prace te, poza wiedzą o lokalizacji genów kontrolujących określone cechy o znaczeniu agronomicznym, pozwalają jednocześnie na wstępne typowanie markerów molekularnych, potencjalnie przydatnych w pracach hodowlanych.

Celem niniejszej pracy była konstrukcja mapy genetycznej dla mieszańca między liniami S120 i S76 przy użyciu markerów RAPD oraz znalezienie markerów sprzężonych z odpornością roślin żyta na porastanie przedzmiwne.

METODY

Materiał do badań stanowiła licząca 110 osobników populacja F₂ wyprowadzona po skrzyżowaniu podatnej na porastanie linii S120 z linią S76, którą charakteryzuje wydłużony okres spoczynku. Linie rodzicielskie mieszańca zostały udostępnione przez firmę DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. Mieszaniec F₂, będący podstawą do skonstruowania mapy genetycznej, został wysiany w warunkach polowych w sezonie wegetacyjnym 1998/99 na terenie Hali Wegetacyjnej Akademii Rolniczej w Szczecinie. Po osiągnięciu dojrzałości pełnej z każdej rośliny F₂ pobierano od 3 do 6 kłosów, które zraszano wodą i umieszczano w komorze o wysokiej wilgotności. Po pięciu dniach prowokacji porastania kłosy ręcznie młócono i oceniano procentowy udział ziarniaków porośniętych w stopniu widocznym (z pękniętym pericarpium).

DNA poszczególnych osobników badanej populacji roślin izolowano z liści pobranych w fazie krzewienia i zamrożonych w -70°C, wykorzystując uproszczoną metodę Thomson i Henry`ego [1995] z modyfikacjami [Myśków i in. 2001]. Reakcje RAPD-PCR prowadzono w 20 µl mieszaniny reakcyjnej w buforze 10 × PCR z dodatkiem (NH₄)₂SO₄ (MBI Fermentas), zawierającej: 1,2 U Taq polimerazy rekombinowanej, 2 mmol MgCl₂, 2,0 µg BSA, 80 µmol każdego dNTP, 32 ng startera 10-merowego oraz 2–4 ng DNA w 1 µl buforu ekstrakcyjnego TPS. Amplifikację fragmentów RAPD prowadzono w termocyklerze PTC-200 DNA Engine firmy MJ Research zgodnie z profilem temperaturowym opisanym w pracy Masojcia i in [2001]. Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym w buforze TBE i uwidacziano w świetle UV, wykorzystując bromek etydyliny.

Zgodność segregacji markerów RAPD z modelem jednogenowym oceniano przy użyciu standardowego testu chi-kwadrat. Konstruowanie grup sprzężeń wykonano w programie Mapmaker EXP v. 3.0, stosując funkcję Kosambi i wyznaczając odległości mapowe w centymorganach (cM). Identyfikację loci kontrolujących skłonność do porostania w badanym materiale przeprowadzono przy użyciu programu Mapmaker QTL v. 1.1 przy wartości krytycznej $LOD=2,0$. W celu przybliżenia rozkładu cechy do rozkładu normalnego przy mapowaniu QTL wykorzystano wyniki oceny porostania po transformacji logarytmicznej.

WYNIKI

Spośród użytych w pracy 876 starterów 10-nukleotydowych o losowych sekwencjach, 111 nie generowało żadnych produktów amplifikacji, a kolejnych 524 nie ujawniało polimorfizmu między liniami rodzicielskimi badanego mieszańca. Wśród pozostałych 173 starterów ujawniających produkty RAPD różniące linie S120 i S76, jedynie 43 generowały markery segregujące w populacji mapującej w sposób zgodny z modelem dziedziczenia jednogenowego (3:1). Większość z tych starterów była źródłem pojedynczych prążków markerowych, tylko w przypadku pięciu z nich uzyskano po dwa prawidłowo segregujące produkty amplifikacji. Jeden ze starterów (pr728) był źródłem dwóch produktów amplifikacji wykazujących kodominację. W sumie otrzymano 47 prawidłowo segregujących markerów oraz jeden wyrazisty fragment RAPD, który uwzględniono przy konstruowaniu grup sprzężeń ze względu na fakt, że odchylenie od wartości oczekiwanych przy dziedziczeniu jednogenowym tylko nieznacznie przekraczało próg statystycznej istotności (tab. 1). Najczęściej stosowanym miernikiem efektywności mapowania z użyciem techniki RAPD jest stosunek liczby wykrytych markerów do liczby użytych starterów. W badaniach prowadzonych nad żytem mieści się on przeważnie w granicach 4–10% [Senft, Wricke 1996; Loarce i in. 1996; Masojć i in. 2001; Stojałowski, Łapiński 2002]. W niniejszej pracy wskaźnik ten wynosi 5,48%, co jest wartością jedną z niższych wśród dotychczas odnotowanych w literaturze. Przepuszczalnie wynika to z faktu, że dystans genetyczny pomiędzy liniami rodzicielskimi użytymi do wprowadzenia populacji mapującej oceniany jest na przeciętnym poziomie [Myśków i in. 2001].

Stosunkowo niewielka liczba markerów uzyskanych w trakcie analiz pozwoliła na skonstruowanie dziesięciu, w większości bardzo małych, grup sprzężeń (ryc. 1). Wśród nich tylko jedna grupa liczy więcej niż 10 markerów. W grupie tej znajduje się marker pr641, który jest produktem amplifikacji o zbliżonej wielkości do APR6.7 (generowanego przez starter o tej samej sekwencji), zło-

Tabela 1. Markery RAPD wykorzystane do konstruowania grup sprzężeń u mieszańca S120 × S76

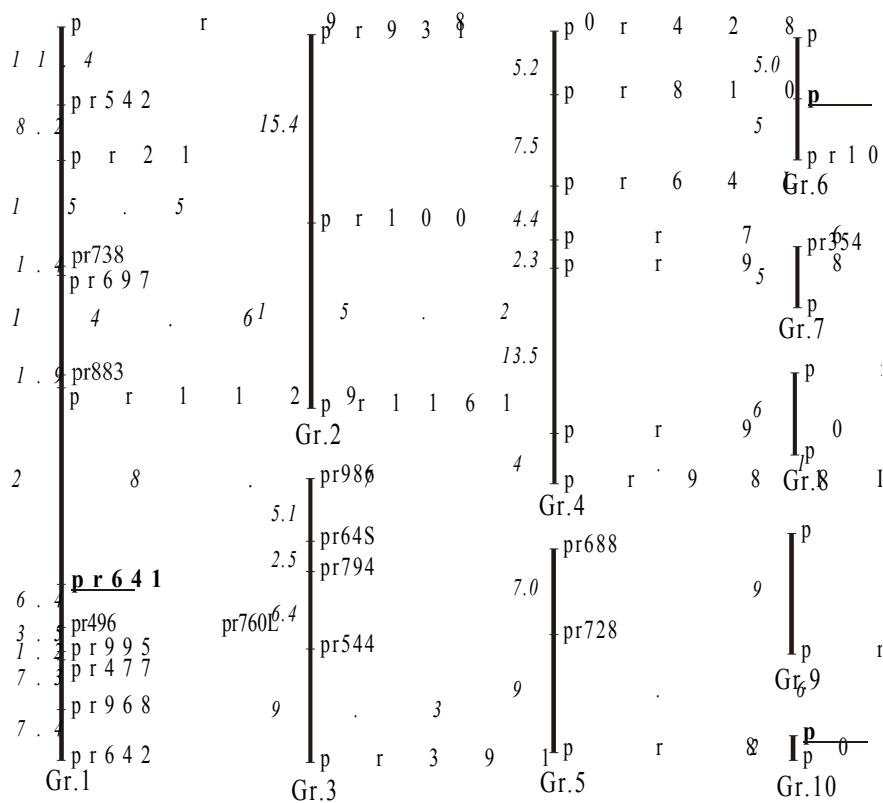
Table 1. RAPD markers used for constructing linkage groups within S120 × S76 cross

Marker Marker	Długość amplifi- kowanego produktu (pz) Length of amplified product (bp)	Stosunek rozszcze- pień Segregation ratio	χ^2 odchylenie od stosunku 3:1 deviation from 3:1 ratio	Marker Marker	Długość amplifi- kowanego produktu (pz) Length of amplified product (bp)	Stosunek rozszcze- pień Segregation ratio	χ^2 odchylenie od stosunku 3:1 deviation from 3:1 ratio
pr3	970	75:21	0,50	pr728	750+660	23:51:32	1,68
pr21	1030	75:26	0,03	pr738	650	74:32	1,52
pr64L	650	70:21	0,17	pr760L	1100	81:26	1,01
pr64S	400	75:15	3,33	pr760S	550	84:22	0,03
pr100	500	70:28	0,67	pr794	750	90:18	4,00*
pr312	1100	77:28	0,16	pr803	450	82:23	0,53
pr354	650	81:27	0,00	pr810	600	81:23	0,47
pr366	550	86:20	2,12	pr877	600	71:22	0,71
pr372	200	80:24	0,20	pr878	470	66:22	0,00
pr391	2000	80:27	0,00	pr883	600	66:22	0,00
pr428	270	85:23	0,80	pr900L	1700	72:17	1,65
pr477	500	78:27	0,03	pr900S	750	66:25	0,29
pr496	730	83:21	1,28	pr926	670	85:23	0,79
pr542	480	82:26	0,05	pr931	250	83:23	0,61
pr543	450	78:22	0,48	pr968	410	80:28	0,05
pr544	880	88:20	2,41	pr980	650	83:25	0,20
pr641	520	83:24	0,37	pr981L	780	79:27	0,01
pr642	690	78:30	0,44	pr981S	270	81:25	0,11
pr665L	1050	85:23	0,80	pr986	720	84:24	0,44
pr665S	420	84:24	0,44	pr995	920	83:21	1,28
pr688	380	74:34	2,12	pr1032	1230	78:25	0,03
pr697	430	86:21	1,65	pr1101	400	81:26	0,03
pr706	300	80:28	0,05	pr1129	550	81:25	0,11
pr710	850	77:28	0,16	pr1161	1030	77:28	0,16

*odchylenie istotne przy P=0,05

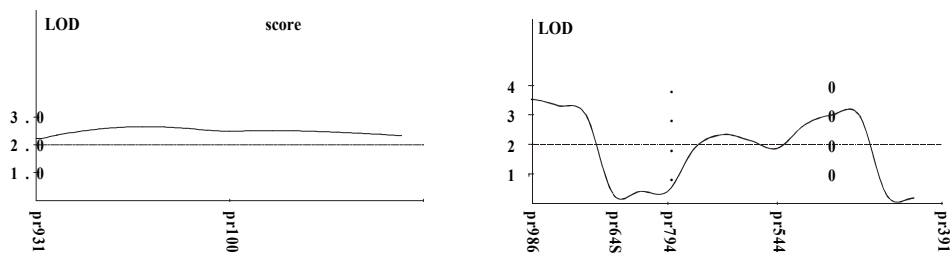
*significant deviation at P=0.05

kalizowanego na mapie mieszańca DS2 x RXL10 na chromosomie 6RL [Masojć i in. 2001]. Wśród pozostałych grup sprzężeń największe liczą odpowiednio 7 i 5 markerów, kolejne trzy grupy składają się z trzech markerów każda, a pozostałe cztery to pary sprzężonych ze sobą produktów RAPD. W grupie sprzężeń oznaczonej numerem 6 występuje fragment pr878, odpowiadający markerowi APR1.8 z chromosomu 1RS [Bednarek i in. 2003], a w grupie 10 znajduje się odpowiednik APR3.6 zlokalizowanego na chromosomie 3RS [Masojć i in. 2001]. Obecność pojedynczych produktów RAPD o zbliżonej ruchliwości



Rycina 1. Grupy sprzężeń żyta utworzone na bazie markerów RAPD dla populacji S120xS76. Liczby po lewej stronie oznaczają odległości mapowe w cM. Podkreślone markery – loci RAPD zmapowane w populacji DS2×RXL10

Figure 1. Rye linkage groups of RAPD markers constructed using S120×S76 F₂ population. Numbers on the left are map distances in cM. Underlined – markers common with genetic map of DS2×RXL10 population



Rycina 2. Krzywa wartości LOD dla cechy odporności na porastanie w przedziałach mapowych w grupach sprzężeń 2 i 3

Figure 2. LOD curve for sprouting resistance observed in map intervals with linkage groups 2 and 3

w żelu agarozowym nie pozwala na jednoznaczne wskazanie lokalizacji chromosomowej poszczególnych grup sprzężeń. Wymienione trzy markery wspólne dla mieszańców S120 × S76 i DS2 × RXL10 nie dają jeszcze przekonującej podstawy do identyfikacji chromosomów żyta wśród utworzonych grup sprzężeń.

Całość utworzonej mapy sprzężeń zawiera 43 markery (pięć markerów pozostało niesprzężonych) i liczy w sumie 248,8 cM, czyli pokrywa niespełna 20% genomu żyta [Bednarek i in. 2003]. Odległości pomiędzy markerami na mapie, poza jednym wyjątkiem, nie przekraczają 20 cM, co potwierdza wcześniejsze obserwacje, że markery RAPD są dość równomiernie rozłożone w genomie żyta [Masojć i in. 2001] i nie tworzą skupień obserwowanych przy mapowaniu z wykorzystaniem markerów AFLP [Saal, Wricke 2002; Bednarek i in. 2003].

Tabela 2. Charakterystyka loci (QTL) kontrolujących odporność na porastanie u mieszańca S120 × S76
Table 2. Characterization of QTLs controlling resistance to pre-harvest sprouting in S120 × S76 cross

QTL	Grupa sprzężeń Linkage group	Przedział mapowy Map interval	Pozycja ¹⁾ Position ¹⁾	LOD	V _E (%) ²⁾
Spr99a	Gr2	pr931-pr100	10,0 cM	2,65	53,2
Spr99b	Gr3	pr544-pr391	4,0 cM	3,00	63,9
Ogółem ³⁾ Total ³⁾				2,93	61,0

¹⁾ Pozycja QTL określona jako odległość od lewego markera przedziału mapowego

¹⁾ Position of QTL given as a distance in cM from the left marker of interval

²⁾ Wielkość wariancji fenotypowej tłumaczona działaniem wykrytego locus

²⁾ Part of phenotypic variance explained by a single QTL

³⁾ Wartości uzyskane przy równoległej ocenie obu wykrytych loci

³⁾ Estimates obtained after simultaneous analyzing of all detected QTL

Analiza mapowania w przedziałach z wykorzystaniem danych uzyskanych po prowokacji porastania w kłosach pozwoliła na wskazanie dwóch grup sprzężeń (Gr 2 i Gr 3), zawierających markery silnie sprzężone z genami kontrolującymi okres spoczynku ziarna. W obrębie obu tych grup sprzężeń krzywa LOD wyraźnie przekraczała wartość 2,0, przyjętą jako poziom statystycznej istotności (ryc. 2). Uzyskane rozkłady krzywych LOD nie pozwalają na formułowanie jednoznacznych wniosków co do lokalizacji genów warunkujących odporność na porastanie. W obrębie grupy 2 krzywa przebiega na wyrównanym, lecz istotnym poziomie. W grupie 3, pomiędzy markerami pr544 i pr391, widoczne jest jedno wyraźne wzniesienie krzywej i tam przypuszczalnie zlokalizowany jest jeden z genów odporności na porastanie (tab. 2). W obrębie grupy 3, w są-

siedztwie markera pr986, krzywa ponownie wznosi się powyżej poziomu istotności i prawdopodobnie osiąga maksimum poza utworzoną grupą sprzężeń. Taki przebieg rozkładu LOD w obu wymienionych grupach sprzężeń wskazuje na to, że dodatkowe loci kontrolujące spoczynek ziarna mogą się znajdować w przylegających, lecz niepowiązanych dotąd regionach. Stąd pełna analiza QTL będzie możliwa dopiero po rozbudowie mapy przy zastosowaniu różnorodnych technik markerowych.

Maksymalny poziom LOD dla obu wykrytych QTL przekracza wyraźnie granicę statystycznej istotności, lecz ze względu na niekompletność mapy trudno jest przesądzać o efektach wykrytych QTL dla wykształcenia odporności na porastanie. Wysokie dla obu loci wartości V_E , sugerują, że ich znaczenie w kontroli cechy porastania może być znaczące. Wartości V_E są jednak prawdopodobnie nieco przeszacowane z uwagi na dominujący charakter markerów RAPD użytych do konstruowania mapy sprzężeń. Stąd też wartości parametrów QTL nie uległy praktycznie zmianie przy jednoczesnej ocenie działania obu wykrytych loci (tab. 2).

WNIOSKI

1. Poziom polimorfizmu zastosowanych w pracy markerów RAPD nie pozwolił na skonstruowanie pełnej mapy chromosomów żyta. Utworzone grupy sprzężeń pokrywają około 20% całego genomu żyta.

2. Wyniki przeprowadzonych analiz pozwalają na wytypowanie markerów sprzężonych z loci kontrolującymi okres spoczynku ziarna żyta, które mogą znaleźć zastosowanie przy selekcjonowaniu genotypów o podwyższonej odporności na porastanie.

PIŚMIENNICTWO

- Bednarek P.T., Masojć P., Lewandowska R., Myśków B. 2003. Saturating rye genetic map with amplified fragment length polymorphism (AFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Appl. Genet.* 44, 21–33.
- Devos K. M., Atkinson M.D., Chinoy C.N., Francis H. A., Harcourt R. L., Koeber R. M., Liu C. J., Masojć P., Xie D.X., Gale M.D. 1993. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 85, 673–680.
- Korzun V., Malyshev S., Voylovkov A. V., Börner A. 2001. A genetic map of rye (*Secale cereale* L.) combining RFLP, Isozyme, protein, microsatellite and gene loci. *Theor. Appl. Genet.* 102, 709–717.

- Loarce Y., Hueros G., Ferrer E. 1996. A molecular linkage map of rye. *Theor. Appl. Genet.* 93, 1112–1118.
- Masojć P., Milczarski P. 1999. Wykorzystanie mapy molekularnej genomu żyta i analizy QTL do identyfikacji genów warunkujących wczesność kłoszenia. *Biul. IHAR* 211, 205–210.
- Masojć P., Myśków B., Milczarski P. 2001. Extending a RFLP-based genetic map of rye using random amplified polymorphic DNA (RAPD) and isozyme markers. *Theor. Appl. Genet.* 102, 1273–1279.
- Miedaner T., Glass C., Dreyer F., Wilde P., Wortmann H., Geiger H. H. 2000. Mapping of genes for male-fertility restoration in 'Pampa' CMS winter rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101, 1226–1233.
- Milczarski P., Masojć P. 2002. The mapping of QTLs for chlorophyll content and responsiveness to gibberelic (GA₃) and abscisic (ABA) acids in rye. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 7, 2A, 449–455.
- Milczarski P., Masojć P. 2003. Interval mapping of genes controlling growth of rye plants. *Plant Breed. Seed. Sci.* 48, 135–142.
- Myśków B., Masojć P., Banek-Tabor A., Szolkowski A. 2001. Genetic diversity of inbred rye lines evaluated by RAPD analysis. *J. Appl. Genet.* 42, 1–14.
- Saal B., Wricke G. 2002. Clustering of amplified fragment length polymorphism markers in a linkage map of rye. *Plant Breed.* 121, 117–123.
- Senft P., Wricke G. 1996. An extended genetic map of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breed.* 115, 508–510.
- Stojałowski S., Łapiński M. 2002. Wykorzystanie techniki RAPD do konstruowania mapy sprzężeń u międzyliniowego mieszańca żyta. *Zesz. Probl. Post. Nauk Rol.* 488, 153–159.
- Thomson D., Henry R. 1995. Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19, 394–400.