

Iwona SZYP-BOROWSKA\*

## MAPOWANIE LOCI CECH ILOŚCIOWYCH JAKO NOWE NARZĘDZIE W HODOWLI SELEKCYJNEJ DRZEW LEŚNYCH

MAPPING QUANTITATIVE TRAIT LOCI  
AS A NEW TOOL IN FOREST TREE BREEDING

***Abstract.** Genetic mapping represents a new tool to help traditional tree breeding methods through the identification of QTL and their integration into marker assisted selection programs. Understanding of the genetic basis of quantitative traits requires a combination of modern molecular genetic techniques and powerful statistical methods. In this review, it has been considered how developments in mapping across several forest trees have made it possible to go from QTL location to candidate genes. Information on the genetic control of adaptive and economically important traits will provide abilities for foresters to enhance wood production and to preserve adaptive capacity stands.*

***Key words:** QTL, MAS, forest tree.*

---

\*Instytut Badawczy Leśnictwa w Warszawie, Zakład Genetyki i Fizjologii Drzew Leśnych, Sękocin Las, 05-090 Raszyn, e-mail: I.Szyp@ibles.waw.pl

## 1. WSTĘP

Obecnie dokonuje się ogromny postęp w poznawaniu sekwencji genomu wielu organizmów, od bakterii po człowieka. W przypadku roślin dysponujemy już kompletnymi mapami genowymi rzodkiewnika (*Arabidopsis thaliana*) i ryżu (*Oryza sativa*) oraz pierwszym zsekwencjonowanym genomem drzewa leśnego – topoli (*Populus trichocarpa*)\*. Sekwencjonowanie genomu drzew leśnych stwarza nowe pole dla odkryć naukowych, ważnych także dla leśnictwa. Naukowcy z całego świata będą bowiem mieli możliwość analizowania fundamentalnych mechanizmów, które kontrolują procesy wzrostu i rozwoju roślin długowiecznych.

Mapy genetyczne to istotne narzędzie poznania struktury i ewolucji genomów oraz wykrywania loci\*\*, które kontrolują zmienność cech ilościowych o znaczeniu ekonomicznym (takich jak: produkcja masy drzewnej, produkcja nasion, skład chemiczny drewna, gęstość drewna, wielkość pierśnicy) i ekologicznym, związanych z adaptacją do zmiennych warunków środowiska oraz odpowiedzią na stres wywołany czynnikami biotycznymi lub abiotycznymi. Analiza tych informacji stwarza możliwość zrozumienia procesów regulacji genów oraz funkcji genowych produktów. Wiedza ta ma szczególne znaczenie dla zapewnienia długoterminowej stabilności zasobów leśnych i ich wydajności.

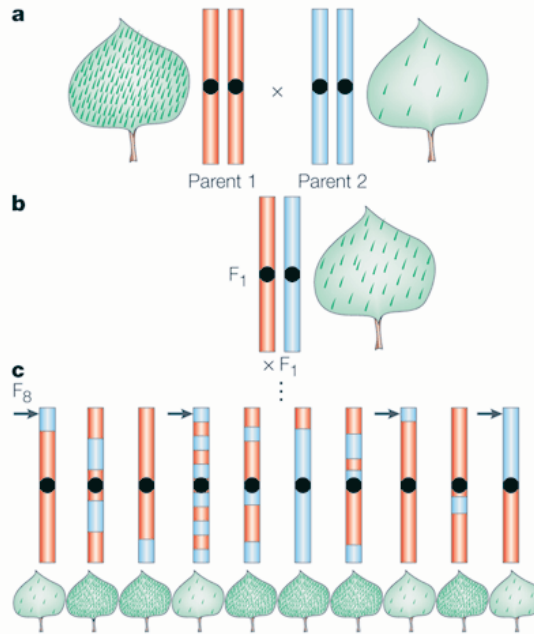
## 2. MAPOWANIE LOCI CECH ILOŚCIOWYCH

Ważnym nurtem współczesnych badań genetycznych jest poszukiwanie związku między markerem a cechą użytkową. Większość cech fenotypowych o znaczeniu ekonomicznym jest uwarunkowana wieloma genami z różnych loci (poligeny), których efekty sumują się, powodując w ten sposób nasilenie cechy. Stąd, w przeciwieństwie do cech jakościowych, mechanizm ich dziedziczenia jest złożony. Każdy z genów, kontrolujący taką cechę, segreguje według prawa Mendla i w różnym stopniu podlega presji środowiska. Cecha tego typu nazywana jest cechą ilościową a loci kontrolujące tę cechę – QTL (Quantitative Trait Loci). Większość cech fenotypowych ważnych dla ekonomicznej działalności leśnictwa, takich jak: produkcja biomasy, jakość drewna, odpowiedź na stres biotyczny i abiotyczny, jest złożonymi cechami ilościowymi (Plomion i in. 2003). Zrozumienie genetycznych podstaw dziedziczenia tych cech wymaga zastosowania nowoczesnych technik genetyki molekularnej i odpowiednich metod statystycznych. Charakterystyka podłoża genetycznego cechy mierzalnej uzyskiwana klasycznymi

---

\* Informacje dotyczące prac związanych z sekwencjonowaniem genomu topoli można znaleźć pod adresem internetowym: <http://www.ornl.gov/ipgc/>.

\*\*l. poj. locus – pozycja na chromosomie, gdzie zlokalizowany jest gen.



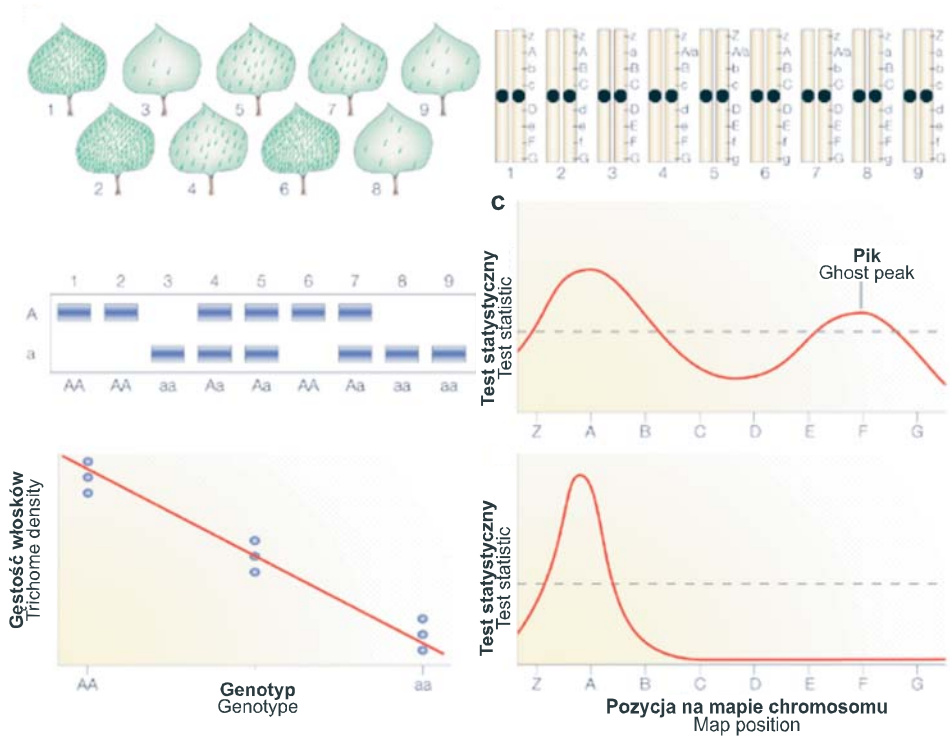
Ryc. 1. Zasady mapowania QTL na przykładzie gęstości włosków pokrywających liść: a – osobniki rodzicielskie pochodzące z linii wsobnych skrzyżowano i otrzymano pokolenie  $F_1$  z pośrednią ilością włosków; b – osobniki z populacji  $F_1$  rozmnażane wsobnie; c – każdy osobnik z populacji  $F_2$  rozmnażany wsobnie dał 6 kolejnych pokoleń, formując kilka linii wsobnych rekombinantów.

Strzałka pokazuje fragment chromosomu, który pochodzi od rodzica z małą gęstością włosków. Liście wszystkich osobników, które odziedziczyły ten fragment chromosomu też mają małą gęstość włosków (wg Mauricio 2001)

Fig. 1. Principles of mapping QTL for trichome density on leaf: a – density of hairs on a plant leaf. Inbred parents that differ in the density of trichomes are crossed to form  $F_1$  population with intermediate trichome density; b – an  $F_1$  individuals is selfed to form a population  $F_2$ ; c – each  $F_2$  is selfed for six additional generations, forming several recombinant inbred lines.

The arrow marks a section of chromosome that derives from the parent with low trichome density. The leaves of all individuals that have that section have also low trichome density (accor. to Mauricio 2001)

metodami genetyki ilościowej ogranicza się z reguły do szacowania efektów addytywnych, dominowania i epistazy oraz odziedziczalności cechy (Malepszy 2003). Podłożem zależności stwierdzonej w prowadzonych dziś badaniach jest silne sprzężenie markera z genem głównym danej cechy, umożliwiające przeprowadzenie selekcji na podstawie analizy polimorfizmu DNA. Odbyna się to za pomocą markerów molekularnych, których rozdział elektroforetyczny wskazuje na polimorfizm genetyczny. Wynikiem tych działań są mapy genetyczne z loci wyróżnionymi przez markery molekularne. Mapy te umożliwiają identyfikację istotnych genów, w tym szczególnie ważnej i trudnej do analizy grupy loci cech ilościowych.



**Ryc. 2. Metody wyróżnienia locus cechy ilościowej sprzężonej z markerem molekularnym (wg Mauricio 2001): a – technika regresji, b – mapowanie interwałowe, c – złożone mapowanie interwałowe**

Fig. 2. Quantitative trait loci mapping methods (accor. to Mauricio 2001): a – the regression technique, b – interval mapping, c – composite interval mapping

Markery molekularne, związane z QTL są identyfikowane przez analizę DNA. Determinowany jest tym samym molekularny genotyp każdego z członków populacji. Następnie ocenia się, czy istnieje związek pomiędzy danymi markerami a cechą ilościową. Ponieważ segmenty leżące dostatecznie blisko siebie dziedziczą się łącznie, jest to więc pośrednia droga „wytropienia” QTL. Mapowanie QTL polega na znalezieniu związku między markerem genetycznym a fenotypem. W praktyce populację mapującą otrzymujemy najczęściej przez krzyżowanie osobników ze skrajnymi wartościami badanej cechy ilościowej, a następnie z pokolenia  $F_1$  wyprowadza się wsobne linie rekombinantów. Na rycinie 1 przedstawiono zasady mapowania QTL na przykładzie cechy ilościowej, jaką jest gęstość włosków pokrywających liść (Mauricio 2001). Wszystkie osobniki populacji mapującej były badane pod względem fenotypu cechy mierzalnej i genotypu molekularnego. Jeżeli wszystkie spośród analizowanych roślin mających małą gęstość włosków miały szczególny allel genetycznego markera, istnieje duże prawdopodobieństwo, że QTL dla cechy gęstości włosków jest w badanej populacji związany z tym markerem.

Z analizy wielu cech ilościowych wynika, że na ogół istnieje jeden lub kilka loci silnie determinujących cechę fenotypową oraz geny o niewielkim znaczeniu rozrzucone na różnych chromosomach, których efekt końcowy podlega sumowaniu.

Istnieje kilka metod mapowania QTL w populacji (Mauricio 2001). Najprostsza z nich jest technika regresji (ryc. 2a), w której fenotyp korelowany jest z każdym markerem genotypowym (środkowy panel ilustruje różną migrację DNA w żelu). W tym przypadku analizowany był pojedynczy marker „A”. Osobniki homozygoty „AA” mają dużą gęstość włosków, a „aa” – małą gęstość, natomiast heterozygoty „Aa” dają wartości pośrednie badanej cechy. Liniowa regresja gęstości włosków dla kilku alleli „A” pokazuje znaczące powiązanie pomiędzy markerem a fenotypem, co wskazuje, że QTL dla gęstości włosków jest związane z tym markerem. Metoda ta używana jest do lokalizacji segmentu chromosomu, w którym zawiera się QTL.

Kolejną metodą jest mapowanie interwałowe (ryc. 2b). Polega ona na ustaleniu sprzężenia między QTL a markerami ograniczającymi wyznaczony przedział na mapie chromosomu, przez ocenę maksymalnej wiarygodności. Testowanie obecności QTL w danym przedziale mapowym odbywa się przez wyliczenie wartości LOD (logarytmu ilorazu wiarygodności). Locus QT jest identyfikowany w regionie wyznaczonym przez pik krzywej LOD, o ile przewyższa on wartość krytyczną. Krzywa wartości LOD wyznacza przedział największego prawdopodobieństwa wystąpienia locus cechy mierzalnej. Stosuje się parę lub dwie pary markerów, które ograniczają interwał chromosomu, wewnątrz którego lokalizowane jest QTL.

Trzecia metoda – złożone mapowanie interwałowe – łączy dwie poprzednie (ryc. 2c). Metoda ta ocenia prawdopodobieństwo, że interwał pomiędzy dwoma markerami jest związany z QTL, który wpływa na badaną cechę oraz redukuje efekt oddziaływania poligenów pozostałych, znajdujących się w innych częściach chromosomu. Uzyskane informacje pozbawione są w ten sposób błędów, które mogą pojawić się jako wynik sumowania efektów działania wielu loci warunkujących nasilenie badanej cechy fenotypowej, zlokalizowanych na tym samym chromosomie lub na innych. Rezultaty nanoszone są, podobnie jak w metodzie interwałowej, na mapę chromosomu w postaci krzywej LOD. Test statystyczny jest niezależny od QTL w innych regionach chromosomu.

Analiza QTL była stosowana z sukcesem w badaniach drzew leśnych w celu poznania genetycznych podstaw wielu ważnych cech. Sewel i Neale (2000) dokonali przeglądu osiągnięć w mapowaniu QTL dla drzew leśnych. I tak, jak już wcześniej opisano dla innych organizmów, nasilenie cechy ilościowej w danej populacji warunkowane jest wieloma genami, ale tylko kilka z nich wpływa na zakres zmienności fenotypowej. Identyfikacja genów o dużym efekcie fenotypowym stwarza możliwość zwiększenia efektywności hodowli przez bezpośrednią selekcję materiału hodowlanego na podstawie markerów blisko sprzężonych ze zidentyfikowanym QTL, co nosi nazwę selekcji zależnej od markerów MAS (Marker-Assisted Selection). Podczas gdy eksperymenty z mapowaniem QTL koncentrują się najczęściej na pojedynczej populacji, uwiarygodnienie znalezionej loci wymaga skonstruowania mapy genetycznej dla gatunku.

Dysponujemy już prawie kompletną mapą dla sosny zwyczajnej (*Pinus sylvestris*) skonstruowaną z wykorzystaniem 737 markerów molekularnych. Wielkość genomu oszacowana jest na 1600–2100 centymorganów (cM), a markery pokrywają 98% mapy w odstępach 20 cM (Yin i in. 2003). Porównanie map *P. sylvestris* i *P. taeda* wykazało znaczną zbieżność. Badania wykazały, że możliwe jest przeniesienie około 40% markerów z jednego gatunku na drugi (Komulainen i in. 2003). Niemal identyczna kolejność ułożenia odpowiadających sobie genów na chromosomach nosi nazwę syntenii, czyli konserwatywności liczby i porządku ustawienia genów, jakie zachowało się w toku ewolucji. Ponieważ podobne zjawisko obserwuje się wykonując mapowanie porównawcze niektórych gatunków roślin uprawnych, wydaje się ono w świecie roślin powszechne (Malepszy 2003). Oznacza to, że gen kodujący określoną cechę fenotypową powinien mieć podobną lokalizację na mapie sprzężeń u spokrewnionych gatunków. Mapy porównawcze pozwalają więc na przeniesienie mapowania i informacji o QTL pomiędzy gatunkami. Jest to szczególnie ważne w przypadku gatunków leśnych drzew iglastych, grupy, dla której badania QTL są dopiero w stadium początkowym. Porównanie map genetycznych pomiędzy gatunkami *Pinus taeda* i *P. pinaster* posłużyło potwierdzeniu występowania QTL dla gęstości drewna oraz loci kontrolującego skład chemiczny komponentów ściany komórkowej obu gatunków (Chagné i in. 2003). Zbieżność tych pozycji na mapach potwierdza hipotezę, że loci leżące u podstawy naturalnej zmienności cech ilościowych są konserwowane podczas ewolucji.

Hanley i inni (2003) przedstawili program badań służący identyfikacji markerów związanych z kluczowymi cechami agronomicznymi dla wierzby (*Salix viminalis*), które mogłyby być wykorzystane w selekcji typu MAS. Dla zwiększenia możliwości lokalizacji QTL, badali oni dwie populacje pochodzące z kontrolowanych krzyżówek, składające się z 950 osobników, i zidentyfikowali genetyczne regiony prawdopodobnie związane z wysokością pnia i jego średnicą, suchą i świeżą masą oraz odpornością na rdzę. Genetyczne czynniki wpływające na zdolności adaptacyjne jodły były badane przez Jermstad i in. (2003). Zidentyfikowano 34 QTL odpowiadające na czynniki środowiskowe, takie jak: zimowe przymrozki, wiosenna temperatura, wilgotność, fotoperiod oraz cechy związane z fenologią: czas pędzenia wiosennego i strzelania pąków. Była to pierwsza praca poświęcona interakcji QTL ze specyficznymi czynnikami środowiskowymi dla drzew leśnych, która w przyszłości może pomóc w identyfikacji genów kontrolujących ważne cechy adaptacyjne.

Zainicjowanie programu hodowlanego opartego na markerach molekularnych odbywa się trzystopniowo (Pot 2002). Pierwszy krok, to wykorzystanie klasycznych metod genetyki ilościowej w celu dostarczenia szacunkowych wartości dotyczących zmienności i odziedziczalności cech ważnych pod względem ekonomicznym lub ekologicznym. Drugi etap, to analiza uzyskanych wcześniej informacji w powiązaniu z markerami molekularnymi w celu zidentyfikowania QTL, czyli regionów genomu związanych ze zmiennością interesujących cech. W

trzecim etapie, porównawcze mapowanie pomiędzy dwoma spokrewnionymi gatunkami pozwala na weryfikację zlokalizowanych QTL.

Droga od wyznaczenia QTL do określenia genu nie jest łatwa. QTL to segment chromosomu potencjalnie obejmujący wiele set pojedynczych loci, które składają się na dany fenotyp. W przypadku sosny zwyczajnej, której wielkość genomu szacowana jest na około 2000 cM, na 1 cM przypada około miliona par nukleotydów, a rozdział między markerami – nawet bardzo dobry – to około 10 cM, co daje 10 milionów par zasad, wśród których kryje się poszukiwany gen. Wyłowienie więc interesującego genu jest bardzo skomplikowane i czasochłonne.

W przypadku *P. taeda* udało się zidentyfikować 39 QTL wpływających na jakość drewna, związanych z biosyntezą ligniny i strukturą ściany komórkowej oraz scharakteryzować 18 genów kontrolujących te cechy (Brown i in. 2003).

### 3. PODSUMOWANIE

Większość badań genetyki klasycznej opiera się na materiale trudno dostępnym dla genetyków leśnych, takim jak linie wsobne czy kolekcjonowanie charakterystycznych mutantów. Dzieje się tak dlatego, że gatunki drzew leśnych charakteryzuje długi okres wzrostu i duży genom. Ulepszanie drzew jest więc limitowane przez czas potrzebny do osiągnięcia dojrzałości płciowej i opóźnienia potrzebnego do oceny wzrostu. Dodatkowo, selekcja pozostaje nieprecyzyjna z powodu efektu czynnika środowiskowego, który w przypadku ważnych ekonomicznie cech jest wysoki. Odziedziczalność tych cech jest niska, np. odziedziczalność wysokości, grubości, miąższości czy ugałęzienia mieści się w granicach 0,1–0,3. W tym kontekście, każde dodatkowe narzędzie kierujące procesem selekcji, które poprawi ocenę genetycznej wartości i zredukuje czas, ma znaczącą wartość.

Mapowanie QTL za pomocą markerów molekularnych i ulepszanie cech ilościowych jest ważnym celem w programach hodowli roślin. Analizowanie informacji marker–QTL wydaje się być obiecujące dla efektywności selekcji. Badanie markerów molekularnych umiejscawia program hodowli drzew na poziomie molekularnym, na którym selekcja i hodowla wartościowych genotypów dotyczy już bezpośrednio DNA. Przydatność tej metody obrazuje przykład dziedziczenia gęstości drewna u *Pinus taeda* (Groover i in. 1994). Możliwość identyfikacji loci odpowiedzialnych za tę cechę pozwala na określenie predyspozycji osobnika do produkcji drewna o specyficznej gęstości. Fenotypowo cechę tę można badać jedynie u osobników dorosłych przeznaczonych do wyrębu, tymczasem z zastosowaniem markerów genetycznych selekcja może być dokonywana na etapie siewki, czyli przed ostatecznym ujawnieniem się tej cechy.

## MAPPING QUANTITATIVE TRAIT LOCI AS A NEW TOOL IN SELECTIVE FOREST TREE BREEDING

### Summary

Each week, progress is made in sequencing of the genomes of species ranging from bacteria to humans. The genetic sequences of plant species such as *Arabidopsis*, rice and the first tree genome of *Populus trichocarpa* have already been completed. Sequencing the genome of forest tree will undoubtedly usher in an exciting period of scientific discovery for the forest community. Scientists worldwide will have an opportunity to examine fundamental mechanisms that determine growth and developmental processes in long-lived organisms.

Most characters important to forestry, such as biomass, wood quality, biotic and abiotic stress response are complex quantitative traits, resulting from a number of different genes interacting with each other and with the environment. These genes act together to provide a quantitative difference, and are referred to as quantitative trait loci or QTLs. The availability of genetic maps in many forest tree species made possible to dissect quantitative traits into their Mendelian inherited components and improve our basic understanding regarding the genetic architecture of economically and ecologically important traits. It offers new opportunities to assist traditional tree-breeding programs through the identification of QTL and their integration in to marker-assisted selection programs. QTL mapping involves just few basic steps. The primary requirements are for two parental individuals that have differences between them in the alleles that affect variation in a trait. The parents are crossed to form an  $F_1$  population. An  $F_1$  individuals is selfed to form a population  $F_2$  in which the phenotype and the multilocus genotype of each individual are measured. The results of the analysis are plotted as a likelihood-ratio test statistics against the chromosomal map position. In this review, it has been presented how developments in mapping across several forest trees have made it possible to go from QTL location to candidate genes. Information on the genetic control of adaptive and economically important traits will provide abilities for foresters to enhance wood production and to preserve adaptive capacity of stands.

### LITERATURA

- Brown G. R., Bassoni D. L., Gill G. P., Fontana J. R., Wheeler N. C., Megraw R. A., Davis M., Sewell M. M., Tuskan G. A., Neale D. B. 2003: Identification of quantitative trait loci influencing wood property traits in *Pinus taeda*. III. QTL verification and candidate gene mapping. *Genetics* 164: 1537-1567.
- Chagné D., Brown G., Lalanne C. 2003: Comparative genome and QTL mapping between maritime and loblolly pines. *Mol. Breed* (in press).
- Groover A., Devey M., Fiddler T., Lee J., Megraw R., Mitcheloldos T., Sherman B., Vujcic S., Williams C., Neale D. 1994: Identification QTL influencing wood specific gravity in an outbred pedigree of loblolly pine. *Genetics*, 138: 876-885.
- Hanley S., Barker J., Van Ooijen J., Aldam C., Harris S., Lhman I., Larsson S., Karp A. 2002: A genetic linkage map of willow (*Salix viminalis*) based on AFLP and microsatellite markers. *Theor. Appl. Genet.*, 105: 1087 – 1096.
- Jermstad K. D., Bassoni D. L., Jech K. S., Ritchie G. A., Wheeler N. C., Neale D.B. 2003: Mapping of quantitative trait loci controlling adaptive traits in coastal Douglas-fir. III. QTL by environment interactions. *Genetics*, 165: 1489-1506.



- Komulainen P., Brown G. R., Mikkonen M., Karhu A., Garcia-Gil M. R., O'Malley D., Lee B., Neale D. B., Savolainen O. 2003: Comparing EST-based genetic maps between *Pinus sylvestris* and *Pinus taeda*. *Theor. Appl. Genet.* 107: 667-678.
- Malepszy S. 2003: Biotechnologia roślin. Mapowanie porównawcze genomów roślinnych. PWN, Warszawa: 506-507.
- Mauricio R. 2001: Mapping quantitative trait loci in plants: uses and caveats for evolutionary biology. *Nature*, 2: 370-380.
- Plomion C., Cooke J., Richardson T., Mackay J., Tuskan G. 2003: Raport on the forest trees workshop at plant and animal genome conference. *Comp. Funct. Genom.*, 4: 229-238.
- Pot D., Chantre G., Rozenberg P., Rodrigues J. C., Lloyd J. G., Pereira H., Hannrup B., Cahalan C., Plomion C. 2002: Genetic determinism of pulp and timber properties in maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.). *Ann. For. Sci.* 59 : 563-575.
- Sewell M.M., Neale D.B. 2000: Mapping quantitative traits in forest trees. [W:] *Molecular Biology of Woody Plants* (eds. S. M. Jain, S. C. Minocha), Vol 1. Kluwer Academic: Dordrecht; 407-424.
- Yin M. T., Wang X. R., Anderson B., Larceteau-Köhler E. 2003: Nearly complete genetic maps of *Pinus sylvestris* constructed by AFLP marker analysis in a full-sib family. *Theor. Appl. Genet.*, 106: 1075-1083.