

WYKORZYSTANIE TECHNIKI RAPD DO KONSTRUOWANIA MAPY SPRZEŻEŃ U MIĘDZYLINIOWEGO MIESZAŃCA ŻYTA

Stefan Stojatowski, Mirosław Łapiński

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza w Szczecinie

Wstęp

Konstruowanie map genetycznych genomów roślin może w znaczący sposób przyczynić się do postępu prac hodowlanych. Dzięki metodzie mapowania interwałowego (IM) mapy genetyczne pozwalają na pełniejsze niż dotąd poznanie charakterystyki loci warunkujących cechy ilościowe (QTL), a w dalszej perspektywie otwierają możliwości identyfikowania markerów molekularnych silnie sprzężonych z genami kontrolującymi cechy użytkowe. Większość skonstruowanych na przestrzeni ostatnich dziesięciu lat map genetycznych żyta oparta była o markery RFLP [DEVOS i in. 1993; SENFT, WRICKE 1996; LOARCE i in. 1996; KORZUN i in. 1998] i rozbudowywana przy użyciu innych technik markerowych [KORZUN i in. 2001; MASOJC i in. 2001; SAAL, WRICKE 2002]. Silnie rozbudowane mapy genetyczne żyta są podstawą do mapowania loci warunkujących cechy ilościowe, takie jak wczesność, wysokość roślin, długość kłosa, masa 1000 ziarn i szereg innych [MASOJC, MILCZARSKI 1999; KORZUN i in. 2001; MILCZARSKI, MASOJC 2001].

Celem pracy była próba wykorzystania markerów RAPD do stworzenia nowej mapy sprzężeń u międzyliniowego mieszańca żyta.

Materiał i metody

Materiał stanowiły 94 pojedynki pokolenia F_2 międzyliniowego mieszańca żyta 544 x Ot0-20. Linie rodzicielskie mieszańca miały pochodzenie całkowicie odrębne. Na wysianych punktowo w 1999 roku roślinach pokolenia F_2 przeprowadzono obserwacje terminu kłoszenia. Do celów obliczeniowych datę, gdy połowa kłosów danego pojedynka była całkowicie wysunięta z pochew liściowych, wyrażano jako liczbę dni po 15 maja.

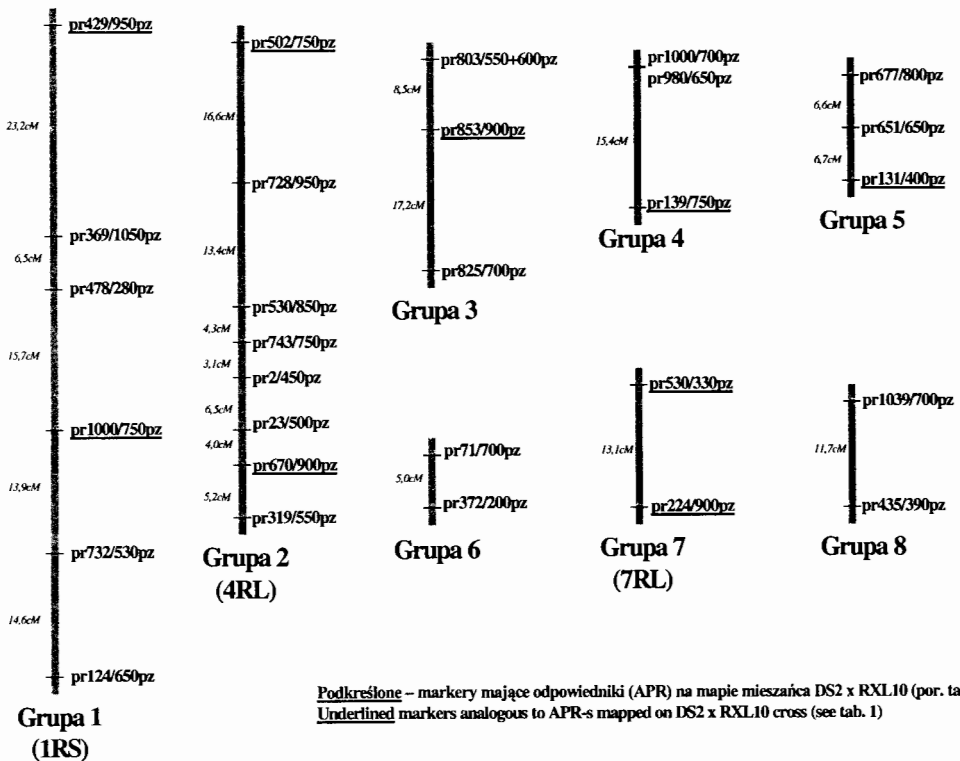
DNA ekstrahowano metodą THOMPSON i HENRY`EGO [1995] z liści pobranych z krzewiących się roślin i przechowywanych w temp. -70°C . Reakcje PCR prowadzono w termocyklerze PTC-200 firmy MJ Research, zgodnie z metodyką opisaną szczegółowo w pracy MASOJCIA i in. [2001]. W badaniach wykorzystano 1050 starterów 10-nukleotydowych o losowych sekwencjach. Produkty amplifikacji rozdzielano w 1,5% żelu agarozowym i wizualizowano w obecności bromku etydyny w świetle UV.

Zgodność segregacji poszczególnych markerów RAPD z modelem jedno-

genowym testowano przy użyciu testu Chi-kwadrat. Analizę segregacji markerów RAPD i danych dotyczących wczesności przeprowadzono przy użyciu pakietu programów MAPMAKER EXP/QTL [LANDER i in. 1987] używając funkcji Kosambi i przyjmując wartość graniczną LOD = 3,0. Z uwagi na dominujący charakter markerów RAPD oraz brak pełnego pokrycia genomu przez utworzone grupy sprzężeń, wyniki mapowania interwałowego genów warunkujących termin kłoszenia mają charakter jedynie orientacyjny.

Wyniki i dyskusja

Po zastosowaniu 1050 starterów uzyskano 704 markery różnicujące linie rodzicielskie. Powszechnie znane problemy ze stabilnością techniki RAPD spowodowały jednak, że tylko 42 markery były w zadowalającym stopniu powtarzalne i w pokoleniu F₂ segregowały w sposób mendlowski. Wśród nich 22 markery były amplifikowane na genomie linii matecznej, 19 na genomie linii ojcowskiej, a jeden został zidentyfikowany jako marker kodominujący (para produktów RAPD o długości ok. 550 i 600pz, pochodząca od startera pr803). Wielkość stabilnych produktów RAPD mieściła się w granicach od 200 do 1100pz.



Rys. 1. Grupy sprzężeń markerów RAPD utworzone na pokoleniu F₂ mieszańca 544 × Ot0-20

Fig. 1. Linkage groups of RAPD markers constructed on F₂ population of 544 × Ot0-20 cross

Analiza segregacji markerów pozwoliła na utworzenie ośmiu grup sprzężeń (rys. 1). Dwie największe z nich, oznaczone numerami 1 i 2 miały długość przekraczającą 50cM i zawierały, odpowiednio 6 i 8 markerów. Kolejne trzy grupy (3, 4 i 5) składały się z trzech markerów każda. Pozostałe trzy grupy (6, 7 i 8) to pary sprzężonych ze sobą markerów. Łączna długość wszystkich grup sprzężeń wyniosła 211cM. Uwzględniając fakt, że ostatnio opublikowane, silnie rozbudowane mapy genetyczne żyta [KORZUN i in. 2001; MASOJC i in. 2001; SAAL, WRICKE 2002] mają po około 1100cM, można przyjąć, że utworzone grupy sprzężeń pokrywają w przybliżeniu 20% genomu. Trzydzieści z 42 analizowanych markerów pozostało jak dotąd poza grupami sprzężeń.

Uzyskana efektywność mapowania mierzona proporcją uzyskanych prawidłowo segregujących markerów (42) do liczby użytych starterów (1050) wynosi zaledwie 4%. Inni autorzy stosujący tę samą technikę do mapowania genomu żyta uzyskiwali wyższą efektywność – w granicach 6–10% [SENF, WRICKE 1996; LOARCE i in. 1996; MASOJC i in. 2001]. Tak niska efektywność mapowania wynika z faktu, że pomimo całkowicie odrębnego pochodzenia, dystans genetyczny między liniami rodzicielskimi 544 i Ot0-20 osiąga zaledwie przeciętne wartości [MYŚKÓW i in. 2001].

Wrażliwość techniki RAPD na warunki reakcji PCR poważnie ogranicza przydatność tej metody dla badań genetycznych i powoduje, że powtarzalność można czasami uzyskać tylko w obrębie jednego laboratorium. W prezentowanej pracy warunki PCR były prowadzone dokładnie w tych samych warunkach, co analizy które zaowocowały rozszerzeniem mapy genetycznej żyta skonstruowanej na mieszańcu DS2 × RXL10 [MASOJC i in. 2001]. Dzięki temu wśród 42 markerów udało się wskazać dziesięć, dla których analogiczne produkty RAPD (ta sama sekwencja startera i wielkość produktu) zostały uprzednio umieszczone na mapie mieszańca DS2 × RXL10 (tab. 1). W obrębie grup sprzężeń nr 1, 2 i 7 (rys. 1) znalazły się po dwa takie wspólne markery. Ich analogi zostały zmapowane na populacji DS2 × RXL10 na chromosomach, odpowiednio 1RS, 4RL i 7RL. Występowanie sprzężeń między parami tych samych markerów na dwóch odrębnych mieszańcach międzyliniowych pozwoliło na wstępne przypisanie wymienionych trzech grup sprzężeń do odpowiednich ramion chromosomowych. Co prawda, odległości między sprzężonymi analogicznymi markerami są u mieszańca 544 × Ot0-20 wyraźnie mniejsze niż na mapie DS2 × RXL10, ale jest to prawdopodobnie rezultat słabego wysycenia nowo konstruowanej mapy markerami oraz matematycznego zaniżania dystansu między markerami dominującymi występującymi w układzie cis (faza przyciągania). Dodatkowe trzy wspólne dla obu mieszańców markery, obecne są również w grupach 3, 4 i 5 (tab. 1). GONZALES i in. [2002] analizując na liniach addycyjnych pszenicy występowanie fragmentów RAPD charakterystycznych dla genomu *Secale cereale* stwierdzili, że w większości przypadków są one amplifikowane na pojedynczych, dodanych chromosomach żyta, tak jak można było tego oczekiwać. Wśród analizowanych markerów pojawiały się jednak sporadycznie fragmenty amplifikowane na dwóch, trzech lub nawet pięciu dodanych chromosomach żytnich. Z tego też powodu obecność pojedynczego, kosegregującego markera RAPD w populacjach DS2 × RXL10 i 544 × Ot0-20 uznano za zbyt niską podstawę do wskazywania lokalizacji chromosomowych dla poszczególnych grup sprzężeń na nowo konstruowanej mapie genetycznej żyta.

Tabela 1; Table 1

Lista markerów RAPD segregujących u mieszańca 544 × Ot0-20
I mających swe odpowiedniki na mapie genetycznej żyta skonstruowanej
na populacji DS2 × RXL10

List of RAPD markers segregating in 544 × Ot0-20 cross
and co-migrating markers mapped in DS2 × RXL10 population

Mieszańiec 544 × Ot0-20 544 × Ot0-20 cross		Mieszańiec DS2 × RXL10 DS2 × RXL10 cross	
oznaczenie markera marker designation	grupa sprzężeń linkage group	symbol markera na mapie genetycznej żyta code of marker on genetic map of rye	lokalizacja localization
pr131/400pz	5	APR2.4*	2RL
pr139/750pz	4	APR6.1*	6RL
pr224/900pz	7	APR7.3*	7RL
pr429/950pz	1	APR1.5*	1RS
pr502/750pz	2	APR4.5*	4RL
pr530/330pz	7	APR7.6*	7RL
pr670/900pz	2	APR4.12*	4RL
pr853/900pz	3	APR5.10**	5RS
pr877/950pz	niesprzężony; unlinked	APR5.11**	5RL
pr1000/750pz	1	APR1.10**	1RS

* – lokalizacja chromosomowa markerów APR wg MASOJĆ i in. [2001]; chromosomal localization of APR markers according to MASOJĆ et al. [2001]

** – MASOJĆ i MYŚKÓW – niepublikowane; MASOJĆ and MYŚKÓW – not published

Przeprowadzona analiza QTL dla danych dotyczących terminu kłoszenia, jakkolwiek tylko orientacyjna, pozwoliła na wskazanie dwóch grup sprzężeń, podczas skanowania których przekroczona została krytyczna wartość LOD. Najwyższe wartości krzywa LOD osiągnęła w przedziałach mapowych wskazanych w tabeli 2.

Tabela 2; Table 2

Charakterystyka loci QTL warunkujących wczesność kłoszenia u mieszańca 544 × Ot0-20
Characteristics of QTL-s controlling heading time in 544 × Ot0-20 cross

Grupa sprzężeń Linkage group	Przedział mapowy Mapping interval	LOD	V _E (%)
4	pr980/650pz – pr139/750pz	6,85	61,4
7 (7RL)	pr530/330 – pr224/900pz	8,37	65,7
Ogółem; Total		11,04	87,0

Ze względu jednak na niewielką długość wskazanych grup sprzężeń wartość LOD na całej ich długości utrzymuje się powyżej poziomu istotności. Tym samym kształt krzywej nie pozwala na stwierdzenie, czy geny decydujące o wczesności kłoszenia znajdują się w obrębie wskazanych przedziałów mapowych, czy raczej w ich sąsiedztwie. Oba wykryte QTL-e tłumaczą do 87% obserwowanej zmienności fenotypowej, ale wartości te należy uznać za zawyżone z powodu braku na mapie sprzężeń markerów kodominujących, które pozwoliłyby na zidentyfikowanie genotypów heterozygotycznych i prawidłowe oszacowanie efektywności poszczegól-

gólnych loci. Pomimo bardzo orientacyjnego charakteru uzyskanych danych, interesujące jest, że względnie wysokie wartości parametrów QTL odnotowano w obrębie grupy 7, która prawdopodobnie stanowi fragment długiego ramienia chromosomu 7R. W regionie okołocentromerowym tego chromosomu obserwowano już efekty QTL dla wczesności kłoszenia [MASOJC, MILCZARSKI 1999] i terminu kwitnienia [KORZUN i in. 2001] w innych genetycznie populacjach używanych do mapowania genomu żyta.

Wnioski

1. Niedostatecznie wysoki polimorfizm markerów RAPD między liniami rodzicielskimi wpłynął na niską efektywność mapowania. Skonstruowana mapa sprzężeń obejmuje około 20% genomu żyta.
2. Rygorystyczne przestrzeganie warunków reakcji PCR pozwala na uzyskanie stabilnych fragmentów RAPD amplifikowanych w tych samych regionach genomu niezależnie od pochodzenia materiału roślinnego. Potwierdza to przydatność techniki RAPD przy mapowaniu genomu żyta.
3. Wyniki analizy QTL dla wczesności kłoszenia potwierdzają wcześniejsze doniesienia o obecności jednego z genów warunkujących tę cechę na chromosomie 7R.

Literatura

- DEVOS K.M., ATKINSON M.D., CHINYOY C.N., FRANCIS H.A., HARCOURT R.L., KOEBNER R.M., LIU C.J., MASOJC 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.
- GONZALES C., CAMACHO M.V., BENITO C. 2002. *Chromosomal location of 46 new RAPD markers in rye (Secale cereale L.)*. Genetica 118: 205–211.
- KORZUN V., MALYSHEV S., KARTEL N., WESTERMANN T., WEBER W. E., V., BÖRNER A. 1998. *A genetic linkage map of rye (Secale cereale L.)*. Theor. Appl. Genet. 96: 203–208.
- KORZUN V., MALYSHEV S., VOYLOKOV 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.
- LANDER E. S., GREEN P., ABRAMSON J., BARLOW A., DALY M. J., LINCOLN S. E., NEWBURG L. 1987. *Mapmaker: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations*. Genomics 1: 174–181.
- LOARCE Y., HUEROS G., FERRER E. 1996. *A molecular linkage map of rye*. Theor. Appl. Genet. 93: 1112–1118.
- MASOJC P., MILCZARSKI P. 1999. *Wykorzystanie mapy molekularnej genomu żyta i analizy QTL do identyfikacji genów warunkujących wczesność kłoszenia*. Biul. IHAR 211: 205–210.
- MASOJC 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.

MILCZARSKI P., MASOJĆ P. 2001. *Interval mapping of genes controlling growth of rye plants*. Proceed. of the EUCARPIA Rye Meeting, July 4–7, 2001, Radzików, Poland: 327–332.

MYŚKÓW B., MASOJĆ P., BANEK-TABOR A., SZOŁKOWSKI A. 2001. *Genetic diversity of inbred rye lines by RAPD analysis*. J. Appl. Genet. 42(1): 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.

SENF T., WRICKE G. 1996. *An extended genetic map of rye (Secale cereale L.)*. Plant Breed. 115: 508–510.

THOMSON D., HENRY R. 1995. *Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR*. BioTechniques 19: 394–400.

Słowa kluczowe: żyto, mapa sprzężeń, RAPD, loci cech ilościowych (QTL), wczesność

Streszczenie

Celem pracy było wykorzystanie markerów RAPD do skonstruowania nowej mapy sprzężeń dla populacji F_2 mieszańca między liniami wsobnymi żyta. W badaniach wykorzystano 1050 starterów 10-nukleotydowych o losowych sekwencjach. Spośród 704 wykrytych markerów różnicujących linie rodzicielskie, tylko 42 były powtarzalne i segregowały w pokoleniu F_2 zgodnie z modelem jednogenowym. Analiza segregacji została zakończona utworzeniem 8 grup sprzężeń zawierających od 2 do 8 markerów. Łączna długość wszystkich grup sprzężeń wyniosła 211cM, co stanowi ok. 20% genomu żyta. Występowanie w utworzonych grupach sprzężeń markerów analogicznych (ta sama sekwencja startera i długość amplifikowanego produktu) do zmapowanych wcześniej na mieszańcu DS2 x RXL10, była podstawą do przypisania trzem grupom sprzężeń lokalizacji na chromosomach 1RS, 4RL i 7RL. Pozostałe grupy sprzężeń nie zostały na razie zlokalizowane na konkretnych chromosomach. Niska skuteczność mapowania techniką RAPD w dużym stopniu była rezultatem niedostatecznego zróżnicowania genetycznego pomiędzy liniami rodzicielskimi. Pomimo niewielkiego zaawansowania w konstruowaniu mapy genetycznej, dzięki analizie QTL, możliwe było wskazanie potencjalnych loci warunkujących wczesność kłoszenia. Zlokalizowano je na dwóch grupach sprzężeń: jednej przypisanej do chromosomu 7RL i drugiej, o niezidentyfikowanej dotąd lokalizacji.

APPLICATION OF RAPD TECHNIQUE TO CONSTRUCTING THE LINKAGE MAP IN INTERLINE CROSS OF RYE

Stefan Stojalowski, Mirosław Łapiński

Department of Genetics and Plant Breeding, Agricultural University, Szczecin

Key words: rye, linkage map, RAPD, quantitative trait loci (QTL), earliness

Summary

The study was aimed at constructing a new linkage map of RAPD markers on F₂ population of interline rye cross. A set of 1050 random 10-mer primers were applied in the study. From among of 704 markers differentiating parental lines only 42 were reproducible and showed in F₂ mendelian segregations. Mapping analysis yielded in construction of 8 linkage groups containing from 2 to 8 markers. Total length of all linkage groups reached 211cM, that is approx. 20% of rye genome. The presence of co-migrating markers (the same primer and analogous length of amplified fragment) in constructed linkage groups with those mapped formerly on DS2 × RXL10 population, let to assign three groups to 1RS, 4RL and 7RL chromosomes. The remaining linkage groups are still not assigned to specific chromosomes. Low effectiveness of RAPD technique in mapping analysis issued mainly from insufficient genetic diversity between parental lines. In spite of low advances in constructing genetic map, QTL analysis showed probable localizations of genes controlling heading earliness. They were localized on two linkage groups: first – assigned to 7RL chromosome and the second – not identified on specific chromosome.

Dr inż. Stefan Stojalowski
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Akademia Rolnicza
ul. Słowackiego 17
71-434 SZCZECIN
e-mail: stefs@agro.ar.szczecin.pl