

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2020 roku

INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania - Identyfikacja regionów genomu oraz markerów DNA związanych z heterozją w heksaploidalnym pszenżycie ozimym
Numer zadania (w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170)) - 82
Planowany okres realizacji zadania: 2020
Planowane nakłady w zł: 144 900

INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

Kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Michał Nowak	dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Piotr Tomasz Bednarek	prof. dr hab.	Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
Justyna Leśniowska-Nowak	dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Magdalena Sozoniuk (Zapalska)	dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Adam Kuzdrałiński	dr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Karolina Różaniecka	mgr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
Magdalena Kawęcka	mgr inż.	Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel (zgodnie ze szczegółowym opisem na dany rok)	Czy cel został zrealizowany (tak/nie ¹ /częściowo ¹)
1	Uzyskanie profilu markerów DArT dla genotypów pszenżyta wchodzących w skład populacji mapującej RIL.	TAK
2	Ocena efektu heterozji mieszańców pokolenia F ₁ uzyskanych w poprzednim sezonie wegetacyjnym.	TAK

¹ Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

2. Opis tematów badawczych *(należy sporządzić opis dla tematów badawczych wymienionych w tabeli powyżej; kolejność zgodnie z tabelą powyżej)*

2.1. Temat badawczy 1: Genotypowanie populacji mapujących RIL.

Cel tematu badawczego 1

Celem tematu badawczego w roku 2020 było uzyskanie preparatów DNA z przeznaczeniem do analiz techniką DArT dla jednej populacji mapującej RIL składających się ze 170 osobników, a następnie ich wysyłka do firmy Diversity Array Technology Ltd. i analiza otrzymanych wyników.

Materiały i metody

Materiał roślinny w zadaniu stanowiła uzyskana wcześniej i będąca w dyspozycji zespołu realizującego projekt populacja mapująca rekombinowanych linii wsobnych (RIL) pszenżyta pokolenia S₆. DNA z przeznaczeniem do analiz techniką DArT izolowano ze świeżych liści badanych roślin. Ziarniaki analizowanych genotypów wykładano na wilgotną bibułę na szalkach Petriego, a następnie po 7 dniach pobrano świeże liście. Po pobraniu materiał roślinny zamrażano w ciekłym azocie i wykonywano procedurę izolacji DNA.

Do izolacji DNA wykorzystano komercyjny zestaw odczynników oparty na oczyszczaniu kwasu nukleinowego na złożu w kolumnkach. Wyizolowane preparaty DNA poddane zostały ocenie jakościowej i ilościowej za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000, jak również analizie integralności przy użyciu elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym. W kolejnym etapie wszystkie preparaty DNA doprowadzono do jednakowego stężenia 100 ng/μl i przesłano do firmy Diversity Array Technology Ltd. w celu wykonania genotypowania techniką DArT.

Wyniki

W pierwszym etapie realizacji zadania dokonano przekształcenia i usystematyzowania zestawu danych otrzymanych z Diversity Arrays Technology do formatu pliku wsadowego, umożliwiającego wykonanie procedury mapowania z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania.

W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano 23 228 markerów silicoDArT specyficznych dla poszczególnych genotypów populacji S₆ pszenżyta. W obrębie tych markerów zidentyfikowano 6 844 markery SNP.

Średnia wartość PIC dla wszystkich analizowanych prób wynosiła 0,392, natomiast wartość współczynnika heterozygotyczności wyniosła 0,133. Statystyczne podsumowanie najważniejszych charakterystyk dla analizowanej populacji RIL zaprezentowano w tabeli 1.

Tabela. 1. Dane statystyczne dla mapowania genetycznego populacji RIL pokolenia F₆.

TM – całkowita liczba markerów; SM – markery szkieletowe; LL – długość grupy sprzężeń; TM/cM – liczba markerów na cM.

	Sum	Av/Chr	Max	Min
TM	18111	862.4	1435	120
SM	1785	85	108	21
LL	2288	109	178.2	58.8
TM/cM	0.13	0.13	0.42	0.08

Dyskusja

Polimorfizm markerów DArT wynika z występowania polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (SNP) oraz insercji/delecji (INDEL) zarówno w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne, jak i w obrębie fragmentów restrykcyjnych (White i in. 2008).

Wartość średnia współczynnika PIC (Polymorphic Information Content) uzyskana dla wszystkich badanych prób wynosiła 0,392. Wartość ta była analogiczna do uzyskanych dla uprzednio analizowanych w projekcie (w latach 2017-2018) 2 innych populacji RIL, wynoszących odpowiednio 0,375 i 0,402. Uzyskana wartość nie odbiega również od wartości tego współczynnika podawanej dla pszenżyta ozimego w źródłach literaturowych (m.in. Badea i in. 2011, Alheit i in. 2013, Niedziela i in. 2016). Uzyskana wartość współczynnika PIC potwierdza, że analiza różnicowania genetycznego

analizowanych form w oparciu o uzyskane markery DArT charakteryzuje się wysokim stopniem wiarygodności.

Dla analizowanej populacji RIL stwierdzono niski współczynnik heterozygotyczności wynoszący 0,133, którego wartość była nieznacznie wyższa od współczynników uzyskanych dla dwóch uprzednio scharakteryzowanych populacji (odpowiednio 0,120 i 0,112). Niska wartość współczynnika jest wartością oczekiwaną, co związane jest z faktem, iż analizowana populacja była populacją linii wsobnych uzyskiwanych przez wielokrotne samozapylenie mające na celu wyrównanie materiału i zwiększenie poziomu homozygotyczności badanych genotypów.

Wnioski

1. Poziom polimorfizmu uzyskany w badaniach własnych w oparciu o markery DArT jest wystarczający dla pewnej i wiarygodnej oceny zróżnicowania genetycznego analizowanych genotypów pszenżyta ozimego.
2. Współczynnik heterozygotyczności uzyskany w wyniku genotypowania techniką DArT dla badanej populacji RIL cechuje się relatywnie niską wartością, co potwierdza wysoki stopień wyrównania genetycznego form składających się na badaną populację i jej przydatność do wykorzystania w projekcie.

Mierniki dla tematu badawczego 1 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik ²	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba genotypów z populacji RIL ze zdefiniowanym profilem markerów DArT	170	170

2.2. Temat badawczy 2: Krzyżowanie wybranych w zad. 6 genotypów, ocena mieszańców F₁ i oszacowanie efektu heterozji.

Cel tematu badawczego 2

Celem tematu badawczego w roku 2020 była ocena plonowania mieszańców F₁ uzyskanych na drodze krzyżowania ze sobą genotypów charakteryzujących się największym zróżnicowaniem genetycznym, oszacowanym na podstawie analizy markerów DNA zlokalizowanych na poszczególnych chromosomach pszenżyta oraz oszacowanie efektu heterozji.

Materiały i metody

Metodyka zadania badawczego była analogiczna do metodyki wykorzystanej dla pierwszego zestawu mieszańców, które analizowano w roku 2018. Badane mieszańce oraz odpowiednie formy rodzicielskie wysiano na poletka doświadczalne o powierzchni 1 m² przy gęstości wysiewu 350 ziarniaków/m². Doświadczenie polowe założono w gospodarstwie doświadczalnym Felin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie.

Efekt heterozji został oszacowany na podstawie oceny plonu z jednostki powierzchni, która została wykonana w warunkach doświadczenia polowego. Plon mieszańców F₁ oceniano zarówno w porównaniu ze średnią wartością dla obu form rodzicielskich (mid-parent, MPH), jak również względem formy rodzicielskiej o lepszych parametrach (best-parent, BPH). Wartości współczynników MPH oraz BPH wyrażono w formie procentowej wykorzystując następujące formuły:

² Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

$$MPH = \frac{F1 - MP}{MP} \times 100\%$$

$$BPH = \frac{F1 - BP}{BP} \times 100\%$$

gdzie;

MPH – efekt heterozji mid-parent;

MP – średni plon obu form rodzicielskich;

BPH – efekt heterozji best-parent;

BP – plon formy rodzicielskich o wyższym plonowaniu.

Uzyskane wyniki, po opracowaniu, zestawione zostały z wynikami doświadczenia dla pierwszego zestawu mieszańców celem analizy porównawczej.

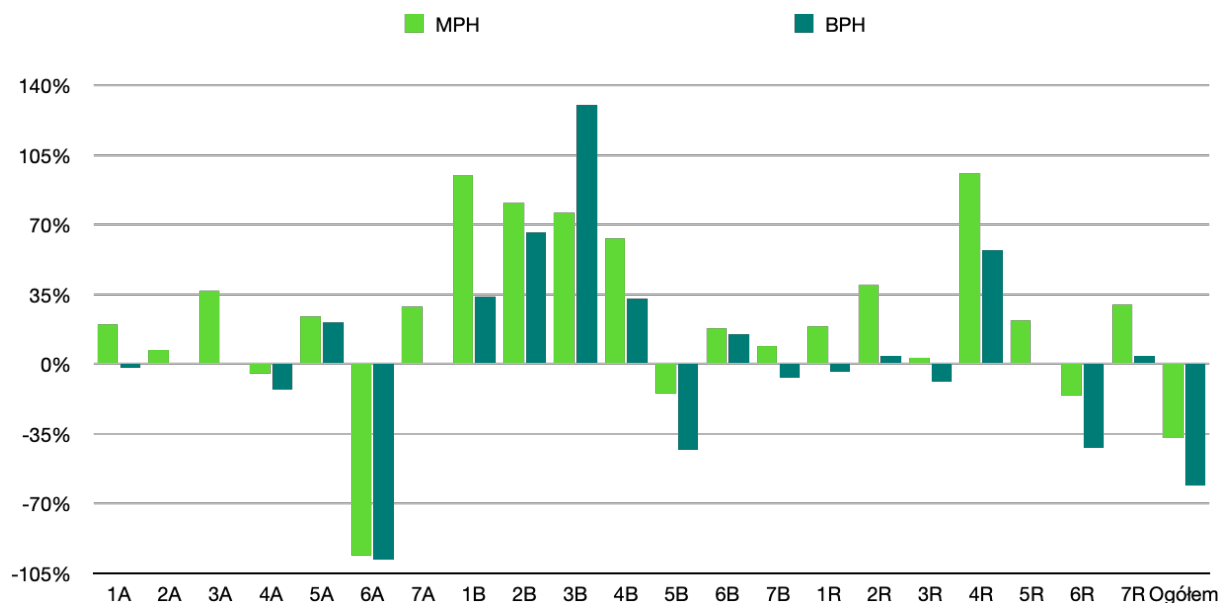
Wyniki

Analiza efektu heterozji uzyskanego z wykorzystaniem markerów ulokowanych na różnych chromosomach pszenżyta potwierdziła dotychczasowe wnioskowanie, że lokalizacja chromosomowa markerów na podstawie których określano dystans genetyczny pomiędzy formami rodzicielskimi wykorzystanymi do krzyżowań ma istotny wpływ na uzyskany efekt heterozji. Wartości współczynnika MPH dla badanych form wahały się w zakresie od -96% przy zastosowaniu markerów zlokalizowanych na chromosomie 6A do +96% przy zastosowaniu do projektowania formuły krzyżowania markerów zlokalizowanych na chromosomie 4R. Dla efektu BPH wartości te wyniosły -98% dla chromosomu 6A i +130% dla chromosomu 3B. Dodatkowo uzyskane wyniki porównano z wynikiem uzyskanym przy wykorzystaniu do szacowania dystansu genetycznego ogólnej puli markerowej, niezależnie od lokalizacji chromosomowej i wykazano, że wybór form w oparciu o ogólną pulę markerów nie pozwolił na uzyskanie efektu heterozji, a plon formy mieszańcowej był niższy o 37% od średniego plonu form rodzicielskich i o 61% od plonu formy o lepszych parametrach (Tab. 2, Rys. 1).

Tabela 2. Wartości efektu heterozji mid-parent (MPH) i best-parent (BPH) dla badanych form mieszańcowych uzyskanych w wyniku krzyżowania form najbardziej oddalonych genetycznie, wytypowanych na podstawie markerów DArTseq zlokalizowanych na poszczególnych chromosomach pszenżyta.

Chromosom	Kombinacja krzyżówkowa	MPH	BPH
1A	DC 07064-16 x BOH_2207-3	20%	-2%
2A	L-203 x DL 643/09	7%	0%
3A	B-262 x L-205	37%	0%
4A	MAHD 35081-7 x DL_402/11	-5%	-13%
5A	DL 26/13 x BOH_2039-2	24%	21%
6A	BOH_1684-2 x LAD 21/11	-96%	-98%
7A	BOH_2039-2 x CT 08221/08	29%	0%
1B	DL 678/12 x DANKO_12	95%	34%
2B	B-210 x DANKO_11	81%	66%
3B	MAH 34985-5 x DS 4043/13	76%	130%
4B	BOH_1439-8 x MAHD 35188-16	63%	33%
5B	DC_007063/03 x DS_4211/11	-15%	-43%
6B	DC_08220-4 x DANKO_8	18%	15%
7B	B-47 x DL_593/11	9%	-7%

1R	cD 175/08 x DS_4211/11	19%	-4%
2R	DL 593/07 x DD_333/09	40%	4%
3R	DT_270/11 x BOH_1439-5	3%	-9%
4R	MAH 34964-2 x CT 08006/12	96%	57%
5R	CT 08006/12 x L-207	22%	0%
6R	B-263 x CT 10104-74	-16%	-42%
7R	DD_293/11 x DC 07004-4	30%	4%
Ogółem	cD 197/08 x BOH_1684-2	-37%	-61%



Rys. 1. Wykres efektu MPH oraz BPH uzyskanego dla badanych form mieszańcowych wybranych z uwzględnieniem lokalizacji chromosomowej markerów DArTseq.

Porównanie uzyskanych wyników z wynikami z roku 2018 wykazało, że w przypadku predykcji wystąpienia efektu heterozji w oparciu o markery zlokalizowane na 5 chromosomach: 5A, 1B, 2B, 3B i 4R uzyskany efekt był analogiczny i potwierdził wystąpienie tego efektu. W przypadku markerów zlokalizowanych na chromosomie 6R oraz markerów reprezentujących ogólną pulę markerową, również uzyskano wyniki analogiczne do wyników z roku 2018, z tym, że w tych przypadkach plon mieszańców był znacznie niższy niż uzyskany dla form rodzicielskich. Dla markerów zlokalizowanych na pozostałych chromosomach uzyskano w większości przypadków wyniki rozbieżne pomiędzy dwoma latami realizowanych badań. Zestawienie wyników uzyskanych w obu latach doświadczeń zaprezentowano w tabeli 3.

Tabela 3. Zestawienie wartości efektu heterozji mid-parent (MPH) i best-parent (BPH) dla badanych form mieszańcowych uzyskanych w wyniku krzyżowania form najbardziej oddalonych genetycznie, wytypowanych na podstawie markerów DArTseq zlokalizowanych na poszczególnych chromosomach pszenżyta w dwóch latach doświadczeń.

Rok badań	2018		2020	
	MPH	BPH	MPH	BPH
1A	6%	-3%	20%	-2%
2A	20%	7%	7%	0%
3A	-23%	-36%	37%	0%
4A	57%	47%	-5%	-13%

5A	129%	111%	24%	21%
6A	110%	62%	-96%	-98%
7A	7%	-4%	29%	0%
1B	52%	14%	95%	34%
2B	105%	75%	81%	66%
3B	89%	71%	76%	130%
4B	-8%	-18%	63%	33%
5B	20%	20%	-15%	-43%
6B	24%	21%	18%	15%
7B	-12%	-18%	9%	-7%
1R	32%	8%	19%	-4%
2R	13%	-16%	40%	4%
3R	48%	44%	3%	-9%
4R	75%	67%	96%	57%
5R	18%	-13%	22%	0%
6R	-28%	-38%	-16%	-42%
7R	24%	20%	30%	4%
Ogółem	-11%	-11%	-37%	-61%

Dyskusja

Wyniki dotychczasowych badań nad zjawiskiem heterozji u pszenżyta wskazują, że efekt ten może wahać się w szerokich granicach. Pomimo podejmowanych prób, nie udało się dotychczas opracować skutecznego sposobu wyboru form rodzicielskich, który umożliwiłby pewną i skuteczną predykcję wystąpienia tego zjawiska (Martin i in. 1995, Bohn i in. 1999). Według dotychczasowych badań średnie wartości współczynnika MPH dla plonu mieszańców F₁ pszenżyta kształtowały się w granicach od ok. -12% do prawie +40%, natomiast dla współczynnika BPH wynosiły od ok. -21% do prawie +25% (m.in. Yildirim i in. 2014, Mühleisen i in. 2015, Ferrari i in. 2018). W ramach badań wykonanych w projekcie uzyskane wyniki znacznie przekraczały podane wartości, co najprawdopodobniej wynika z faktu, że są to wyniki uzyskane w skali laboratoryjnej na poletkach o niewielkiej powierzchni. W celu walidacji uzyskanych wyników niezbędne jest przeskalowanie doświadczenia na większe poletka, gdzie rośliny rosną będą w zróżnicowanych warunkach środowiska.

Dotychczasowe badania nad predykcją heterozji opierają się zazwyczaj na założeniu, że prawdopodobieństwo uzyskania efektu heterozji rośnie wraz ze wzrostem zróżnicowania genetycznego form rodzicielskich (Bertan i in. 2009). Niemniej jednak, dotychczasowe prace badawcze prowadzone dla pszenżyta wykonywane były na ogólnej puli markerowej i nie dały odpowiedzi na pytanie o zależność pomiędzy poziomem heterozji, a zróżnicowaniem genetycznym form rodzicielskich (Góral i in. 2005, Orlovskaya i in. 2013).

Zaproponowane w projekcie podejście pozwoliło na potwierdzenie założonej hipotezy roboczej, że analiza oparta na markerach lokalizujących się na konkretnych chromosomach pozwala na dużo bardziej precyzyjną predykcję wystąpienia zjawiska heterozji w pokoleniu F₁. Porównanie wyników uzyskanych w dwóch latach doświadczeń dowodzi jednakże, że wybór regionów genomu do tego rodzaju prac musi być poprzedzony badaniami pozwalającymi na selekcję lokalizacji dających stabilne wyniki. W ramach projektu wytypowano 5 lokalizacji chromosomowych markerów, na podstawie których uzyskano stabilną predykcję efektów MPH i BPH. W przypadku pozostałych chromosomów, porównanie wyników pomiędzy latami doświadczeń wykazało, że były one niestabilne lub nawet skrajnie różniące się (np. dla chromosomów 4A, 6A czy 5B). Wynik ten może sugerować istnienie w genomie pszenżyta regionów, których zróżnicowanie genetyczne pomiędzy formami rodzicielskimi determinuje predyspozycję do wystąpienia zjawiska heterozji.

Wnioski

1. Lokalizacja chromosomowa markerów na podstawie których określano dystans genetyczny pomiędzy formami rodzicielskimi wykorzystanymi do krzyżowań miała istotny wpływ na uzyskany w mieszańcach efekt heterozji.
2. Analiza zróżnicowania genetycznego badanych form pszenżyta w oparciu o markery zlokalizowane na chromosomach 5A, 1B, 2B, 3B i 4R pozwoliła na predykcję wystąpienia efektu heterozji w obu latach badań.
3. Analiza zróżnicowania genetycznego badanych form pszenżyta w oparciu o ogólną pulę markerową nie pozwoliła na predykcję wystąpienia efektu heterozji w obu latach badań, a plon mieszańców był niższy niż form rodzicielskich.
4. Uzyskane wyniki sugerują istnienie w genomie pszenżyta regionów, których zróżnicowanie genetyczne pomiędzy formami rodzicielskimi determinuje predyspozycję do wystąpienia zjawiska heterozji.
5. Zaprezentowane podejście polegające na wyborze komponentów rodzicielskich na podstawie analizy zróżnicowania genetycznego w oparciu o markery zlokalizowane na 5 w/w chromosomach pszenżyta powinno być zwalidowane w doświadczeniach polowych prowadzonych na większej powierzchni i w zróżnicowanych warunkach środowiska.

Mierniki dla tematu badawczego 2 (podać w tabeli)

Lp.	Miernik ³	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba genotypów mieszańcowych ocenionych pod kątem MPH i BPH	21	21

3. Planowana prezentacja wyników badań (podać w tabeli - należy wymienić konferencje, na których zaprezentowano wyniki i/lub wymienić publikacje, przygotowane i przyjęte do druku w trakcie realizacji zadania w danym roku).

Prezentacja wyników na konferencjach				
Lp.	Konferencja	Prezentacja ⁴	Liczba prezentacji podana w opisie zadania	Liczba prezentacji zrealizowana
1	Breeding: the key to innovative solutions EUCARPIA 21 st General Congress (Niderlandy)	poster	2	0
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
Lp.	Monografia/Czasopismo	Publikacja ⁵	Liczba publikacji podana w opisie zadania	Liczba publikacji zrealizowana
1	Agronomy (ISSN 2073-4395)	publikacja oryginalna	1	0

Jeśli któryś z mierników nie został zrealizowany należy podać przyczyny.

Wyjaśnienie:

Planowana prezentacja wyników na międzynarodowej konferencji naukowej nie doszła do skutku, ze względu na sytuację związaną z epidemią COVID-19, która uniemożliwiła organizację konferencji.

Planowana publikacja naukowa jest obecnie w końcowej fazie przygotowywania, jednakże ze względu na fakt, że do jej ukończenia niezbędny jest komplet wyników z roku bieżącego nie została dotychczas złożona w czasopiśmie.

Planowany czas złożenia publikacji w czasopiśmie to I kwartał 2021 r.

³ Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

⁴ Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

⁵ Podać, czy chodzi o publikację oryginalną, czy np. polemika, list do edytora, rozdział w monografii etc.

4. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:

<https://www.up.lublin.pl/badania-gen/>

5. Miernik zadania – stopień realizacji

Lp.	Miernik	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana	Stopień realizacji zadania	
1	2	3	4	5	
Temat badawczy 1					
1.1	Liczba genotypów z populacji RIL ze zdefiniowanym profilem markerów DArT	170	170	1,00	
Temat badawczy 2					
2.1	Liczba genotypów mieszańcowych ocenionych pod kątem MPH i BPH	21	21	1,00	
				ŚREDNIA	1,00
				% REALIZACJI ZADANIA	100,0%

*Sporządzono:
Lublin, 15.12.2020 r.*