

AGNIESZKA NIEDZIELA**WERONIKA JARSKA****PIOTR T. BEDNAREK**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Wybrane elementy nowoczesnych rozwiązań wpływające na skuteczność programów hodowlanych

Up-to-date solutions in modern plant breeding programs

Postęp hodowli roślin uzależniony jest od technologii pozwalających na identyfikację markerów cech ilościowych takich jak profilowanie DNA, czy też ich fenotypowanie. Coraz większe znaczenie zaczynają odgrywać metody statystyczne wykorzystywane w mapowaniu asocjacyjnym i selekcji genomowej. W ostatnich latach obserwuje się zmianę podejścia do selekcji. Zamiast wykorzystywać pojedyncze markery cech poszukuje się wielu markerów tych cech lub też stosuje całą dostępną pulę markerów opisujących daną populację dla potrzeb selekcji. Większość ze stosowanych metod selekcji związanych jest z wykorzystaniem wydajnych technologii markerowych, natomiast problemem pozostaje ograniczona dostępność i wysokie koszty fenotypowania roślin. W pracy przedstawiono wybrane elementy nowoczesnych rozwiązań mogących wpływać na skuteczność oraz czas realizacji programów hodowlanych.

Słowa kluczowe: genotypowanie; fenotypowanie; mapowanie; cechy ilościowe; selekcja

Advances in plant breeding depend on technologies that allow the identification of markers linked to agronomical traits that could be achieved via genotyping and phenotyping. There is a growing interest in the application of statistical methods developed for association mapping and genomic selection. In the last few years, a change in attitude towards plant selection is being observed. Instead of the tendency of identifying single markers for some traits the attention is focused on the evaluation of numerous markers from the QTL regions or the whole available pool of markers is utilized in a selection process. Most of the modern approaches are based on the efficient marker technologies whereas phenotyping on a large scale, is still a problem. This paper is devoted to the aspects affecting efficiency of numerous stages of selection used in plant breeding and involving advances in molecular biology.

Key words: genotyping; phenotyping, mapping, QTL, selection

WPROWADZENIE

Wśród obecnie stosowanych metod molekularnych wspierających proces hodowlany należy wymienić selekcję wspartą markerami molekularnymi. Metoda ta, w wielu przypadkach zakłada identyfikację markerów cechy, ich lokalizowanie na mapach genetycznych, a następnie walidację na szerszej puli genowej. Do realizacji takich badań wykorzystuje się odpowiednie modele genetyczne. Model mendlowski bazuje na populacjach o ściśle zdefiniowanych formach rodzicielskich wykazujących zróżnicowanie pod względem badanej cechy. Umożliwia to jej mapowanie, a następnie typowanie markerów do selekcji. Inną strategią jest podejście populacyjne. W tym przypadku model genetyczny nie jest tak ściśle zdefiniowany, a jego analiza wiąże się z zastosowaniem narzędzi genetyki populacji. Odrębną możliwością stwarza selekcja genomowa. Każda z wymienionych metod bazuje na określonych założeniach dotyczących populacji wykorzystywanej do analizy cech ilościowych, sposobie ich fenotypowania, metod genotypowania oraz identyfikacji markerów do selekcji czy wręcz podejścia w jaki selekcja będzie realizowana. W pracy zostaną omówione możliwości nowoczesnych strategii hodowlanych mających wpływ na efektywność selekcji materiałów roślinnych oraz racjonalizację procesu decyzyjnego na poszczególnych etapach hodowli.

POPULACJE MAPUJĄCE PODSTAWĄ DO IDENTYFIKACJI MARKERÓW CECH

Przygotowanie odpowiedniej populacji mapującej stanowi kluczowy element, od którego zależy powodzenie każdego projektu mającego na celu mapowanie *loci* cech użytkowych oraz identyfikację markerów przydatnych w selekcji. Przy wyborze populacji mapującej należy zwracać uwagę przede wszystkim na: 1) zróżnicowanie form rodzicielskich 2) sposób jej wyprowadzenia (żywołność, czas konieczny na jej otrzymanie) oraz 3) liczebność.

Zróżnicowanie form rodzicielskich

Do tworzenia populacji mapujących zwykle wybiera się osobniki możliwie najbardziej homozygotyczne lecz oddalone pod względem genetycznym lub pod względem badanych cech użytkowych. Dobór form rodzicielskich jest jednak zależny od konkretnych potrzeb eksperymentalnych. W niektórych przypadkach, gdy celem jest opracowanie mapy ograniczonego obszaru genomu uzasadnionym jest wybór rodziców silnie spokrewnionych czy wręcz linii izogenicznych, lecz różniących się pod względem badanej cechy (Niedziela i in., 2014), gdy celem jest uzyskanie silnie zagęszczonej mapy genetycznej dla cech złożonych preferowane są formy rodzicielskie oddalone genetycznie (Semagn i in., 2010).

Sposób wyprowadzenia i charakterystyka populacji mapujących

Populacje mapujące, zależnie od potrzeb mogą być wyprowadzone w taki sposób, by można było realizować analizy w oparciu o model mendlowski lub model populacyjny. Wybór modelu, warunkowany jest między innymi złożonością badanej cechy, dostępnym materiałem roślinnym oraz podejściem eksperymentalnym. W przypadku modelu mendlowskiego formy rodzicielskie są zdefiniowane, natomiast model bazujący na metodach genetyki populacyjnej nie wymaga znajomości pochodzenia badanych form.

Zakłada jednak, że powinny być one zróżnicowane, a w zależności od przyjętej strategii mniej lub bardziej wyrównane genetycznie. W modelu mendlowskim wykorzystuje się populacje dwurodzicielskie, takie jak: pokolenie F_2 , linie podwojonych haploidów (DH, ang. Double Haploid), linie bliskoizogeniczne (NIL, ang. Near Isogenic Lines) i rekombinacyjne linie wsobne (RIL, ang. Recombinant Inbred Lines) oraz populacje wielorodzicielskie takie jak zagnieżdżone populacje asocjacyjne (NAM, ang. Nested Association Mapping), oraz wielorodzicielskie zaawansowane pokolenia mieszańców (MAGIC, ang. Multi-parent Advanced Generation Inter-Cross populations). Inny podział związany jest z żywotnością populacji mapujących. Możemy wyróżnić populacje "śmiertelne" i "nieśmiertelne". Do pierwszej grupy należą np. populacje pokolenia F_2 uzyskiwane poprzez samozapylenie roślin F_1 będących potomstwem roślin rodzicielskich. Populacje takie zwykle mają ograniczone zastosowanie i raczej służą do weryfikowania segregacji badanych cech, czy też wstępnej ich lokalizacji na mapach genetycznych. Zdecydowanie bardziej racjonalnym, choć czaso- lub/i pracochłonnym jest wykorzystanie populacji "nieśmiertelnych" do których zalicza się linie DH, RIL, NIL, NAM i MAGIC. Ich zaletą jest niezmienność (wyrównanie w obrębie poszczególnych linii) w kolejnych pokoleniach, a tym samym możliwość realizacji doświadczeń polowych w różnych latach i środowiskach bez obawy, że obserwowana zmienność fenotypowa będzie wynikiem rozszczepiania się cech. Linie DH charakteryzuje wysoka (~100%) homozygotyczność. Są one istotne dla hodowców ponieważ nie „gubią” ustabilizowanych cech, a ich zastosowanie może istotnie skrócić proces hodowlany (Semagn i in., 2010). Populacje DH mogą być jednak obciążone błędem wynikającym z włączenia do analizy tak zwanych klonów. Ponadto, proces rekombinacji zostaje "zamrożony" już na poziomie wyprowadzania podwojonych haploidów. Kolejnym problemem jest zjawisko zmienności somaklonalnej (Bednarek i in., 2007). Zwykle regeneranty wymagają kilku cykli chowu wsobnego by wyeliminować mutacje indukowane w kulturach *in vitro*. W tym kontekście populacje RIL są zdecydowanie korzystniejszym rozwiązaniem, które wymaga niewiele więcej czasu na ich wyprowadzenie. Wielokrotne procesy rekombinacji mające miejsce podczas wyprowadzania populacji RIL wpływają pozytywnie na późniejsze uzyskanie silnie zagęszczonych map genetycznych. Populacje te są przydatne do mapowania rzadkich alleli (Rafalski, 2010). Poważnym ograniczeniem dwurodzicielskich populacji mapujących jest kwestia zawartej w nich zmienności cechy, która ogranicza się do genotypów roślin rodzicielskich. W związku z tym wytypowane markery selekcyjne będą miały zastosowanie jedynie w obrębie danej populacji. Alternatywą staje się wówczas zastosowanie modelu populacyjnego i populacji asocjacyjnych (AMP, ang. Association Mapping Population) stanowiących zbiór różnych linii, odmian, czy też form dzikich, a więc reprezentują szeroką (historyczną) pulę alleli danego gatunku (Zhu i in., 2008). W tym przypadku zakłada się, że pomiędzy osobnikami przez wiele pokoleń zachodziły spontaniczne akty rekombinacji. W obszarach genomu ściśle powiązanych z cechą takie akty są rzadsze co stwarza możliwość powiązania markera z cechą. Stopień powiązania markera i cechy jest określany za pomocą zjawiska niezrównoważenia genetycznego (LD, ang. linkage disequilibrium) (Hall i in., 2010). Ponieważ AMP bazuje na zróżnicowanej puli genetycznej wykazującej zmienność fenotypową badanej cechy jest ona warunkowana

ekspresją różnych *loci* oraz form allelicznych genów. Identyfikowane markery powinny więc odzwierciedlać tę zmienność. AMP mogą być pełniej wykorzystane, gdy do badań włącza się dane pochodzące z map genetycznych lub wręcz map konsensusowych. Dzięki temu można również wnioskować o lokalizacji cech na poszczególnych chromosomach. Populacje te mają jednak swoje ograniczenia. Do badań należy wykorzystywać od 200 do 1000 osobników (zależnie od gatunku, badanej cechy), które powinny być wielokrotnie fenotypowane (w latach i środowiskach) (Zhu i in., 2008; Hall i in., 2010). Koszty zarówno markerowania jak i prac polowych są więc relatywnie wysokie. Ponadto nie dla każdego gatunku możemy dysponować tak rozległą pulą zróżnicowanych pod względem badanej cechy roślin. Cechą AMP jest również możliwość wystąpienia silnej struktury, która wpływa na wartość LD zwiększając prawdopodobieństwo identyfikacji błędnych asocjacji (Hall i in., 2010).

W ostatnich latach wzrasta znaczenie populacji wielorodzicielskich takich jak NAM i MAGIC opartych o krzyżowania w obrębie niewielkiej puli roślin rodzicielskich (Kover i in., 2009; Rafalski, 2010). Populacje te łączą zalety mapowania ilościowego i asocjacyjnego z wykorzystaniem map genetycznych i informacją o lokalizacji markerów na poszczególnych chromosomach (Yu i in., 2008). Charakteryzuje je wystarczająca do uzyskania map o wysokiej rozdzielczości liczba rekombinacji, większe niż u RIL zróżnicowanie zmienności allelicznej i fenotypowej oraz brak silnej struktury (Rafalski, 2010). Do utworzenia NAM wykorzystuje się zróżnicowane genetycznie linie danego gatunku, które krzyżuje się z jedną wybraną linią referencyjną (Yu i in., 2008). Powstałe w ten sposób potomstwo prowadzi się aż do uzyskaniu pokoleń o wysokim poziomie homozygotyczności, podobnie jak ma to miejsce w przypadku linii RIL. W populacjach MAGIC wyjściową pulę zwykle ośmiu wyrównanych linii rodzicielskich o zróżnicowanych genotypach krzyżuje się ze sobą w taki sposób by uzyskać potomstwo pokolenia F₁ będące kombinacją wszystkich form rodzicielskich (Bandillo i in., 2013). W kolejnym cyklu generatywnym wyprowadza się wszelkie możliwe kombinacje czteroliniowe. Ostatecznie krzyżuje się ze sobą czteroliniowe potomstwo łącząc tym samym osiem wyjściowych genotypów i wyprowadza populacje RIL. Znane są również populacje MAGIC, do których uzyskania wykorzystano mniejszą (Huang i in., 2012), bądź większą pulę linii rodzicielskich (Kover i in., 2009). Otrzymane populacje NAM i MAGIC poddaje się fenotypowaniu oraz genotypowaniu, poszukuje asocjacji cecha - marker z wykorzystaniem mapowania asocjacyjnego, konstruuje mapy i nanosi na nie QTL-e.

Liczebność populacji mapujących

Liczebność populacji mapujących jest niezwykle istotnym czynnikiem decydującym o uzyskaniu wysokiej rozdzielczości map genetycznych, a tym samym możliwości oraz poprawności lokalizacji poszukiwanych *loci* i właściwej ocenie ich efektów fenotypowych (Xu, 2003). Przy ustalaniu wielkości populacji należy kierować się zasadą, że im mniejszy efekt QTL-a, tym większa ilość osobników potrzebna do jego identyfikacji. Teoretycznie, jeśli wiemy jakiego efektu QTL-a możemy się spodziewać istnieje możliwość oszacowania wielkości populacji. Przykładowo dla F₂ oraz BC₁ można zastosować następujący wzór (Francis i Merk, 2012): $N_{F_2(BC_1)} = [1 - r^2_{F_2(BC_1)} / r^2_{F_2(BC_1)}] \times \{ [Z_{(1 - (\alpha/2))} / (1 - r^2_{F_2(BC_1)})^{1/2}] + Z_{(1 - \beta)} \}^2 \times [1 + (k^2 / 2)]$, gdzie: r^2 — frakcja wariancji fenotypowej wytłumaczonej przez

QTL, k — współczynnik dominacji, α — błąd I stopnia, β — błąd II stopnia, $z_{(1-(\alpha/2))} = 1,96$, a $z_{(1-\beta)} = 1,28$ (według tabeli rozkładu normalnego).

Należy jednak pamiętać, że większość cech fenotypowych jest wynikiem sumowania się genów o niewielkim efekcie jednostkowym. W takich przypadkach ważna jest identyfikacja możliwie jak największej liczby QTL-i determinujących badaną cechę. W latach 90. William D. Bavis przeprowadził eksperyment w celu oceny wydajności mapowania interwałowego do detekcji i szacowania efektów poligenów (Bavis i in., 1998). Wykazał on, że średnia ocena wariancji fenotypowej asocjowanej z prawidłowo zidentyfikowanym QTL-em będzie znacznie przeszacowana jeśli materiał roślinny ograniczymy do 100 osobników, w niewielkim stopniu przeszacowana jeśli będzie to 500 osobników i bardzo bliska prawidłowej wartości jeśli osobników będzie 1000 (Bavis i in., 1998; Xu, 2003). Jednym słowem jeśli populacja będzie zbyt mała, zidentyfikujemy tylko kilka QTL-i o wysokich, często zawyżonych efektach fenotypowych. Musimy liczyć się również z możliwością przesunięcia QTL-i względem rzeczywistej pozycji, co może wpłynąć na błędną ocenę siły sprzężenia wytypowanych markerów z badaną cechę. W praktyce, ze względów ekonomicznych (koszty genotypowania i fenotypowania) oraz fakt, że do celów selekcji brane są pod uwagę przede wszystkim QTL-e o dużych efektach fenotypowych, wielkość dwurodzicielskich populacji mapujących ograniczana jest zazwyczaj do 100–200 osobników (Semagn i in., 2010). Podobne liczebności osiągają populacje asocjacyjne, jakkolwiek w niektórych badaniach są one rozszerzane do ponad 500 osobników (Zhu i in., 2008; Hall i in., 2010). Jeszcze liczniejsze są populacje NAM i MAGIC liczące często ponad 1000 roślin (Yu i in., 2008; Bandillo, 2013). Eksperymenty angażujące duże populacje AMP, NAM i MAGIC mają na celu identyfikację możliwie szerokiego spektrum alleli powiązanych z badaną cechę (mapowanie asocjacyjne) lub ustalenie sumarycznej wartości poszczególnych roślin stanowiących badaną populację odzwierciedlających badaną cechę (selekcja genomowa).

WYSOKOPRZEPUSTOWE METODY FENOTYPOWANIA

Zastosowanie nowoczesnych narzędzi (mapowanie asocjacyjne, selekcja genomowa) do selekcji materiałów roślinnych daje nadzieję na osiągnięcie znacznego postępu hodowlanego w niedalekiej przyszłości. Należy jednak podkreślić, że techniki te angażują niezwykle rozbudowane (kilkaset do kilku tysięcy osobników) populacje mapujące prowadzone w wielu odległych lokalizacjach środowiskowych co znacznie utrudnia bądź wręcz uniemożliwia ich fenotypowanie. Przykładowo doświadczenie z wykorzystaniem populacji NAM składającej się z 5000 linii (Yu i in., 2008) wymaga założenia 20000 poletek (w systemie: stres, kontra dwa powtórzenia). Przyjmując, że poletka będą miały wymiar 4m x 1m to eksperyment zajmie powierzchnię 8 ha (bez wliczania ścieżek i pasów granicznych). Nawet wizualny monitoring takiego obszaru zająłby jednej osobie ponad dobę, a synchronizacja oceny poszczególnych cech w czasie byłaby niemożliwa (White i in., 2012). Również gromadzenie danych byłoby procesem długotrwałym. Rozwiązaniem może być wdrożenie rozwijalnych obecnie nowoczesnych wysokoprzepustowych systemów fenotypowania (HTPPs, ang. high-throughput phenotyping platforms). Ich

zaletą jest możliwość oceny zdolności i efektywności wykorzystania promieniowania słonecznego, wody i składników odżywczych w czasie (przez cały cykl hodowlany) i przestrzeni (na poziomie łąnu) (Araus i Cairns, 2014). HTPPs działają z wykorzystaniem zjawiska teledetekcji, które jest rodzajem badania wykonywanego z pewnej odległości przy wykorzystaniu specjalistycznych sensorów (czujników). Pozyskiwanie informacji w sposób zdalny oznacza, iż badany obiekt i badający go sensor nie wchodzi ze sobą w bezpośredni kontakt dzięki czemu metoda ta jest bezinwazyjna dla roślin. Informacja o kondycji roślin uzyskiwana jest poprzez analizę przemian — odbicia, przechodzenia i pochłaniania promieniowania elektromagnetycznego. Techniki teledetekcyjne możemy podzielić na pasywne i aktywne biorąc pod uwagę źródło promieniowania rejestrowanego przez sensory. Techniki pasywne są uzależnione od zewnętrznego źródła promieniowania (np. promieniowanie emitowane przez obiekty), natomiast aktywne wykorzystują własne źródła promieniowania generowane przez specjalistyczne urządzenia (radary i lidary). W teledetekcji wykorzystywanej do celów fenotypowania roślin korzysta się z wielu rodzajów obrazowania począwszy od kamer rejestrujących obraz w paśmie widzialnym, poprzez obrazowanie w podczerwieni, fluorescencyjne, spektroskopowe, 3D i tomograficzne (Li i in., 2014).

Obrazowanie w paśmie widzialnym

Do obrazowania w paśmie widzialnym wykorzystuje się tradycyjne kamery cyfrowe lub kamery RGB/CIR. W warunkach kontrolowanych (szklarnie, komory wzrostowe) zastosowanie tego typu kamer daje możliwość oceny koloru i powierzchni liści, dynamiki wzrostu, wigoru i morfologii nasion, architektury korzeni, zakresu uszkodzeń liści przez choroby, liczby i rozmieszczenia owoców (Li i in., 2014). Obrazowanie w paśmie widzialnym ma ograniczone zastosowanie w warunkach polowych pozwalając jedynie na ocenę powierzchni i zabarwienia łąnu (Li i in., 2014). Jakkolwiek połączenie danych z kilku kamer daje możliwość przeanalizowania struktury łąnu (tj. liczby roślin po wschodach, krzewienia, liczby pędów kłosośnych i płonnych na jednostce powierzchni) (Huang i in., 2013).

Obrazowanie termiczne

Obrazowanie termiczne wykorzystuje pasmo średniej podczerwieni (3-14 μ m) pozwalając na wizualizację promieniowania cieplnego emitowanego przez obiekt w przedziale temperatur spotykanych w warunkach codziennych. Stosowane jest do pomiaru temperatury powierzchni liści pozwalając na ocenę relacji wodnych w roślinie, co jest bezpośrednio związane z określeniem stopnia przewodności aparatów szparkowych (Araus i Cairns, 2014). Przewodność szparkowa jest istotnym wskaźnikiem stanu wodnego rośliny i dostarcza ważnych informacji na temat wzrostu roślin i ich adaptacji do zmiennych warunków środowiskowych. Obrazowanie termiczne jest z powodzeniem stosowane w licznych programach hodowlanych, szczególnie tych dotyczących poprawy tolerancyjności roślin na suszę (Jones i in., 2009; Monneveux i in., 2012). Należy jednak pamiętać, że w warunkach polowych pomiary mogą być zaburzone przez szybkie zmiany temperatury otoczenia, intensywność światła, prędkość wiatru, wilgotność oraz problemy z odseparowaniem temperatury gleby od temperatury roślin (Araus i Cairns, 2014).

Obrazowanie fluorescencyjne

Obrazowanie fluorescencyjne bazuje na właściwościach chlorofilu do rozpraszania nadmiaru pochłoniętej energii (Li i in., 2014). Zjawisko takie zachodzi między innymi podczas różnego rodzaju stresów, kiedy zostaje naruszona równowaga pomiędzy podażą siły asymilacyjnej (ATP i NADPH) wytwarzanej w reakcjach fotochemicznych, a zmniejszonym popytem na te produkty w enzymatycznych reakcjach cyklu Calvina-Bensona (Kalaji i Łoboda, 2010). Pomiar intensywności fluorescencji w zależności od długości fali lub pomiar stosunku zmian intensywności fluorescencji dla różnych długości fal wzbudzenia pozwala na ocenę funkcjonowania aparatu fotosyntetycznego roślin w warunkach stresowych. Obrazowanie fluorescencyjne może być stosowane zarówno w warunkach kontrolowanych, jak i polowych, jednakże na poziomie łąnu pomiar jest znacznie utrudniony poprzez możliwość zakłóceń słabego sygnału (Li i in., 2014).

Obrazowanie spektroskopowe

Obrazowanie spektroskopowe jest obecnie najbardziej obiecującą i intensywnie rozwijaną metodą umożliwiającą fenotypownie roślin zarówno w warunkach polowych jak i szklarniowych. Technika ta wykorzystuje zdolności zielonych części roślin do odbijania różnych zakresów promieniowania w różnych proporcjach (Gausman, 1985; Li i in., 2014). Wielkość odbicia będzie zależna przede wszystkim od zawartości poszczególnych barwników (głównie chlorofili), ale również od mikrostruktury komórkowej, uwodnienia oraz zawartości składników odżywczych. Do analiz roślinności najczęściej wykorzystuje się pasmo widzialne oraz bliską i średnią podczerwień (400 do 2500 nm). W zakresie światła widzialnego (400–700 nm) wartości odbicia będą niskie ze względu na wysokie zdolności barwników, głównie chlorofilu a i b, do pochłaniania promieniowania (Knipling, 1970). Bardzo wyraźny wzrost odbicia nastąpi w zakresie bliskiej podczerwieni (750–900 nm). Widmo spektralne w tym przedziale związane jest ze strukturą komórkową liści i zależy od zawartości oraz sposobu ułożenia komórek mezofilu (Gausman, 1985). Modyfikacja odpowiedzi spektralnych roślin będzie uwidaczniała zmiany ich kondycji w warunkach stresowych. Destrukcja chloroplastów spowoduje wzrost odbicia od aparatu asymilacyjnego w zakresie widzialnym, natomiast destrukcja mezofilu i dehydratacja tkanek — silne zmiany odbicia w podczerwieni. Wyższe zakresy promieniowania (1300–2500 nm) służą do badania zawartość wody oraz innych elementów struktury roślin takich jak celuloza, karotenoidy, czy ligniny (Knipling, 1970). Do charakterystyki roślin na podstawie danych spektralnych wykorzystuje się teledetekcyjne wskaźniki roślinności. Ze względu na sposób wyliczenia można je podzielić na dwie grupy. Pierwszą stanowią wskaźniki oparte na stosunku wybranych kanałów (ang. Ratio Based Indices) takie jak RVI (ang. Ratio Vegetation Index) (Pearson i Miller, 1972) i NDVI (ang. Normalized Difference Vegetation Index) (Rouse i in., 1973). Do drugiej zaliczane są wskaźniki wykorzystujące istnienie tzw. linii gleby, takie jak PVI (ang. Perpendicular Vegetation Index) (Richardson i Wiegand, 1977) czy SAVI (ang. Soil Adjusted Vegetation Index) (Huete, 1988). W hodowli roślin (m.in. selekcji genomowej) najczęściej stosuje się NDVI obliczany jako wagowanie odpowiedzi spektralnych bliskiej podczerwieni (NIR) i czerwieni (R) według wzoru: $NDVI = (NIR - R) / (NIR + R)$. Wskaźnik ten oraz jemu podobne mogą charakteryzować fotosyntetycznie aktywną biomasę, efektywność zużycia

azotu, zawartość barwników i status wodny (Ramoelo, 2015). Innym wskaźnikiem jest tzw. indeks liściowy LAI (ang. Leaf Area Index) należący do grupy podstawowych miar opisujących strukturę roślinności. LAI jest wielkością bezwymiarową opisaną wzorem: $LAI = s/G(m^2/m^2)$, gdzie: s — funkcjonalna powierzchnia liści; G — jednostka powierzchni terenu. Pozwala on na określenie przebiegu i efektywności procesów takich jak ewapotranspiracja, transpiracja, fotosynteza oraz warunkuje produkcję pierwotną, wielkość plonów i równowagę energetyczną (Darvishzadeh i in., 2006). Wymienione wskaźniki wyliczane są w oparciu o zdjęcia wielospektralne składające się z wielu kanałów będących uogólnieniem kanałów barw podstawowych (RGB) na dowolne zakresy spektralne. Obecnie do charakterystyki roślin uprawnych zaczyna się również konstruować wskaźniki korzystające z wąskich zakresów spektralnych generowanych przez sensory hiperspektralne (Darvishzadeh i in., 2006.). Poszczególne kanały są tu znacznie gęściej rozmieszczone i obejmują niewielkie fragmenty spektrum elektromagnetycznego (10–20 nm) dzięki czemu mamy więcej możliwości wykrycia różnic w charakterze odbicia spektralnego badanych obiektów.

Obrazowanie 3D

Spśród dostępnych technologii obrazowania 3D do celów mapowania roślin używane są obecnie: LIDAR (ang. Light Detection And Ranging), PMD (ang. Photon Mixer Devices), Microsoft Kinect i systemy stereowizyjne (Li i in., 2014). Ze względu na wysoką precyzję i rozdzielczość obrazu najczęściej użytkowanym systemem zdalnego pozyskiwania informacji jest LIDAR. Wykorzystuje on skoncentrowaną wiązkę promieni świetlnych (laserowych), która wysyłana w kierunku obiektu ulega od niego odbiciu (i rozproszeniu), a wiązka zwrotna jest rejestrowana i następnie analizowana. Lasery skanerowe używane są do szybkiego szacowania LAI (Gebbers i in., 2011) oraz określenia profilu gęstości roślin na danej powierzchni (Hosoi i in., 2009). Mogą również z dużą dokładnością dostarczać danych dotyczących wysokości, pokrycia i struktury łąnu (Hosoi i in., 2009).

Obrazowanie z zastosowaniem tomografii komputerowej

Do charakterystyki roślin wykorzystywane są również techniki tomografii komputerowej (CT, ang. X-ray Computed Tomography), rezonansu magnetycznego (MRT, ang. Magnetic Resonance Imagers) oraz pozytonowej tomografii emisyjnej (PET, ang. Positron Emission Detectors). Metody te mają jednak wiele ograniczeń (niska przepustowość, duża segmentacja obrazu) i mogą być stosowane głównie w warunkach kontrolowanych (Li i in., 2014). Służą do określenia zawartości wody, oceny transportu, krzewienia i jakości ziarna (Li i in., 2014). Niemniej jednak próby zastosowania CT do pomiaru wilgotności podłoża i masy korzeni w polu dały obiecujące wyniki w przypadku sorga i kukurydzy (Srayeddin i Doussan, 2009).

Platformy służące fenotypowaniu roślin

Opisane powyżej metody obrazowania można zestawiać w dowolny sposób w zależności od potrzeb konstruując platformy służące jak najdokładniejszej charakterystyce roślin (Araus i Cairns, 2014). Niewątpliwie platformy takie będą się znacznie różniły w zależności od tego, czy mają służyć fenotypowaniu roślin w polu, czy w szklarni. W warunkach kontrolowanych istnieją większe możliwości pełnego

zrobotyzowania całego procesu hodowli poprzez automatyzację dozowania nawozów i wody, montowanie specjalnych taśmociągów, które przesuują i obracają rośliny w celu ich równomiernego oświetlenia oraz transportują je do pomieszczeń, w których przeprowadza się analizę poprzez fotografowanie w wybranych zakresach światła. Platformy takie są obecnie projektowane i sprzedawane komercyjnie do celów naukowych, chociaż oferta jest ograniczona głównie do roślin o małych rozetach takich jak rzodkiewnik (Arvidsson i in., 2011) oraz zbóż (Hartmann i in., 2011; Golzarian i in., 2011). Platformy konstruowane dla celów fenotypowania w warunkach polowych wymagają zastosowania pojazdów kołowych (np. specjalnie przystosowanych traktorów) i/lub powietrznych (helikoptery, drony, balony) wyposażonych w sensory oraz kamery umożliwiające pomiar wartości cechy w określonym czasie i na dużej przestrzeni (White i in., 2012; Li i in., 2014). Monitoring możliwy jest również poprzez obrazowanie z pokładów wysokorozdzielczych satelitów teledetekcyjnych (Ramoelo i in., 2015).

Pełna charakterystyka fenotypu roślin to nie tylko ocena polowa, ale także jakościowa i ilościowa ocena laboratoryjna. Od wielu lat do tego celu z powodzeniem wykorzystywana jest spektroskopia w zakresie bliskiej podczerwieni (NIRS). Umożliwia ona szybką analizę zawartości białek, tłuszczu, cukrów, azotu, popiołu, fenoli, a także wagi, tekstury i wielu innych cech ziarna (Rhodes i in., 2014; Ferreira i in., 2015). NIRS stosowana jest również do analizy dyskryminacji izotopu węgla (C^{13}) w badaniach dotyczących wydajności wykorzystania wody w warunkach suszy (Li i in., 2014). Obiecującym rozwiązaniem stają się próby montowania sensorów bliskiej podczerwieni do maszyn żniwnych, co daje możliwość fizycznej i chemicznej oceny próbek, bez względu na to, czy są to tkanki wegetatywne, czy nasiona (Araus i Cairns, 2014). Prace laboratoryjne wspomagają odpowiednio zaprojektowane roboty dające możliwość mielenia, ważenia i analizy tkanek roślinnych (White i in., 2012).

Wysokoprzepustowe systemy fenotypowania roślin generują ogromne ilości danych, których nie sposób przetworzyć bez odpowiedniego zaplecza komputerowego i programów statystycznych. Zarządzanie danymi oraz umiejętność poradzenia sobie z ich przetworzeniem wymaga zatrudnienia w tego typu doświadczeniach biegłych bioinformatyków. Wydaje się, że wkrótce wąskim gardłem stanie się pozyskanie, opis i przechowanie prób zanim będą one poddane analizie.

GENOTYPOWANIE NOWEJ GENERACJI

Kolejnym czynnikiem mającym znaczenie przy identyfikacji markerów cech jest wybór systemu markerowego. Jest on w pewnym stopniu niezależny od modelu eksperymentalnego (mendelowski, populacyjny). Ponieważ obecnie znanych jest szereg obszernych opracowań poświęconych systemom markerowym (Semagn i in., 2006), a pewną lukę stanowią wysoce wydajne technologie generujące markery hybrydacyjne oraz markery bazujące na sekwencjonowaniu nowej generacji poniżej zostaną przedstawione ich wady i zalety.

Markery hybrydazyjne DArT

Technologia DArT (Jaccoud i in., 2001) pod wieloma względami jest podobna do AFLP (Vos 1995). Genomowy DNA jest traktowany enzymami restrykcyjnymi rozpoznającymi unikalne sekwencje DNA. Zwykle do tego celu wykorzystuje się enzym PstI wrażliwy na metylację DNA. Tym samym trawione są wyłącznie takie miejsca restrykcji, które nie są metylowane. Ponieważ uważa się, że miejsca niemetylowane są powiązane z sekwencjami kodującymi, uzyskana frakcja fragmentów DNA jest wzbogacana o te, które mogą być powiązane z cechami użytkowymi. Po dołączeniu syntetycznych adaptorów, będących dupleksami DNA, uzyskane fragmenty restrykcyjne ulegają powieleniu. W metodzie DArT wykorzystuje się również enzym rozpoznający czteronukleotydowe sekwencje DNA i niewrażliwy na metylację DNA. Taki enzym restrykcyjny dobiera się empirycznie odpowiednio do gatunku (Wenzl i in., 2004). Zastosowanie drugiego enzymu prowadzi do redukcji złożoności genomu. W ten sposób przygotowuje się zarówno biblioteki genomowe dla danego gatunku bazujące na szerokiej puli zróżnicowanego materiału roślinnego, jak i próby DNA populacji przeznaczonych do analiz. Frakcja powielonych a następnie pociętych drugim enzymem restrykcyjnym fragmentów DNA przeznaczonych do utworzenia biblioteki jest klonowana do odpowiedniego wektora, który następnie wprowadza się do komórek bakteryjnych. Wybrane klony są nanoszone na płytki, obszary markerów są powielane w wyniku reakcji PCR, a uzyskane produkty są nanoszone w ściśle zdefiniowanych pozycjach na szkiełkach tworząc macierze do genotypowania. Takie macierze są hybrydizowane z fragmentami reprezentującymi DNA badanych pojedynków. Wektorowe fragmenty DNA oraz te reprezentujące pojedynki barwione są fluorescencyjnie na dwa różne kolory, co umożliwia ich rozpoznanie przez analizę wyników doświadczeń hybrydazyjnych. W zależności od zróżnicowania badanych materiałów uzyskuje się od kilku do kilkunastu tysięcy dominujących markerów DNA.

Markery polimorfizmu pojedynczych nukleotydów GBS (ang. Genotyping-By-Sequencing) i DArTseq (ang. Diversity Arrays Technology sequencing)

Technologia GBS (Elshire i in., 2011), podobnie jak DArTseq (Carling i in., 2015) bazuje na sekwencjonowaniu nowej generacji (NGS). Jak w przypadku markerów DArT genomowy DNA jest trawiony rzadko tnącym enzymem restrykcyjnym PstI (Poland i in., 2012) w połączeniu z innym, często tnącym enzymem. Dla GBS w systemie jednoenzymowym stosowano początkowo ApeKI (Elshire i in., 2011). Otrzymane fragmenty DNA poddaje się ligacji z dwoma rodzajami adaptorów komplementarnych do lepkich końców powstałych po trawieniu enzymami rzadko tnącymi. Adaptory różnią się obecnością lub brakiem kilkunukleotydowych (4–8pz) sekwencji identyfikatorowych zwanych w języku angielskim "barcode". Po inaktywacji ligazy DNA T4 preparaty pochodzące od pojedynczych osobników łączy się ze sobą i powiela z wykorzystaniem odpowiednich starterów komplementarnych do sekwencji adaptorów. Po weryfikacji wielkości uzyskanych fragmentów DNA uzyskanej biblioteki następuje etap sekwencjonowania. Dzięki "barcode'om" polimorfizm pojedynczych nukleotydów identyfikowany w obrębie poszczególnych sekwencji DNA występujących w badanej puli obiektów jest przypisany do określonych roślin. Opisane technologie generują od kilkunastu do kilkuset tysięcy głównie kodominujących markerów DNA.

Technologia hybrydacyjna i sekwencyjna różnią się więc zarówno pod względem metodycznym, wydajnością jak i typem uzyskiwanych markerów. Ponadto, polimorfizm markerów DArT wynika ze zmian identyfikowanych w obszarach miejsc restrykcyjnych natomiast w przypadku markerów DArTseq czy GBS istotniejszą rolę odgrywają zmiany sekwencyjne. Nie należy jednak wykluczać sytuacji kiedy zmienność jest wynikiem zróżnicowania w obrębie miejsc restrykcyjnych poszczególnych osobników. To właśnie takie zmiany mogą prowadzić do powstawania markerów dominujących (silicoDArT) widocznych w technologii DArTseq. Zaletą markerów sekwencyjnych jest obecność informacji o konkretnej sekwencji w genomie. Ułatwia to ich konwersję do markerów specyficznych ukierunkowanych bezpośrednio na miejsce polimorfizmu. W przypadku markerów DArT koniecznym jest projektowanie starterów do sekwencji markerowych. Ponieważ zmienność jest wynikiem różnic w obrębie miejsc restrykcji markery specyficzne nie muszą być polimorficzne.

PODSUMOWANIE

Konwencjonalna hodowla roślin uprawnych opiera się na wizualnym doborze odpowiednich osobników rodzicielskich do krzyżowań. W ich wyniku otrzymuje się segregujące pod względem danej cechy, liczne pokolenie generatywne, które podlegają dalszej selekcji. Takie podejście jest kosztowne, pracochłonne, wymaga posiadania dużej powierzchni do obsiewu i daje możliwość uzyskania nowej odmiany dopiero po 8–10 latach. Ponadto liczba cech przejawiających się w wyglądzie zewnętrznym (tzn. markerów morfologicznych, fenotypowych) jest ograniczona, a poziom ich ekspresji będzie uzależniony od genotypu (organizmu) i warunków środowiska. Zintegrowanie genetyki molekularnej z tradycyjnymi metodami selekcji roślin gwarantuje obiektywną ocenę fenotypu z uwzględnieniem czynników środowiskowych i daje możliwość eliminacji niepożądanych genotypów już na etapie siewki skracając tym samym czas hodowli. Rozwój biologii molekularnej, a w szczególności metod kultur *in vitro*, technologii markerowych (np. sekwencjonowanie nowej generacji), opracowanie map genetycznych gatunków uprawnych, czy też wykorzystanie mapowania genetycznego, mapowania cech ilościowych, a ostatnio również mapowania asocjacyjnego w połączeniu z odpowiednio dobranymi populacjami mapującymi oraz zautomatyzowanymi metodami fenotypowania roślin otwierają przed hodowlą nowe możliwości.

LITERATURA

- Araus J. L., Cairns J. E. 2014. Field high-throughput phenotyping: the new crop breeding frontier. *Trends in Plant Science* 19, 1: 52 — 61.
- Arvidsson S., Pérez-Rodríguez P., Mueller-Roeber B. 2011. A growth phenotyping pipeline for *Arabidopsis thaliana* integrating image analysis and rosette area modeling for robust quantification of genotype effects. *New Phytol.* 191: 895 — 907.
- Bandillo N., Raghavan C., Muyco P. A., Lynn Sevilla M. A., Lobina I. T., Dilla-Ermita C. J., Tung C.-W., McCouch S., Thomson M., Mauleon R., Singh R. K., Gregorio G., Redoña E., Leung H. 2013. Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. *Rice* 6: 11.

- Beavis W. D. 1998. Molecular dissection of complex traits. QTL analyses: power, precision, and accuracy. Eds A. H. Paterson. CRC Press, New York, pp. 145 — 162.
- Bednarek P. T., Orłowska R., Koebner R. M. D., Zimny J. 2007. Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology* 7: 10.
- Carling J., Heller-Uszyńska K., Jaccoud D., Machado A., Hopper C., Xia L., Vipin C., Caig V., Uszyński G., Kilian A. 2015. DArTTM and DArTseqTM genome profiling for breeding, pre-breeding and population genetics applications. Contribution P0052, XXIII Plant and Animal Genome, San Diego, CA pp. 10 — 14.
- Darvishzadeh R., Atzberger C., Skidmore A. K. 2006. Hyperspectral vegetation indices for estimation of leaf area index. ISPRS Commission VII Mid-term Symposium "Remote Sensing: From Pixels to Processes", Enschede, the Netherlands, 8–11 May.
- Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E. 2011. A robust, simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE* 6, 5: e19379.
- Ferreira D. S., Pallone J. A. L., Poppi R. J. 2015. Direct analysis of the main chemical constituents in Chenopodium quinoa grain using Fourier transform near-infrared spectroscopy. *Food Control* 48: 91 — 95.
- Francis D. M., Merk H. L. 2012. Equation to estimate sample size required for QTL detection. *Plant Breeding and Genomics*. http://www.extension.org/pages/32355/equation-to-estimate-sample-size-required-for-qtl-detection#.VP7P9fmG_E.
- Gausman H. W. 1985. Plant leaf optical properties in visible and near-infrared light. Texas Tech Press; Lubbock, Texas, Graduate Studies No. 29.
- Gebbers R., Ehlert D., Adamek R. 2011. Rapid mapping of the leaf area index in agricultural crops. *Agron. J.* 103: 1532 — 1541.
- Golzarian M. R., Frick R. A., Rajendran K., Berger B., Roy S., Tester M., Lun D. S. 2011. Accurate inference of shoot biomass from high-throughput images of cereal plants. *Plant Methods* 7: 1 — 11.
- Hall D., Tegström C., Ingvarsson P. K. 2010. Using association mapping to dissect the genetic basis of complex traits in plants. *Brief. Funct. Genomics* 9, 2: 157 — 165.
- Hartmann A., Czaderna T., Hoffmann R., Stein N., Schreiber F. 2011. HTPPheno: An image analysis pipeline for high-throughput plant phenotyping. *BMC Bioinf.* 12: 148.
- Hosoi F., Omasa K. 2009. Estimating vertical plant area density profile and growth parameters of a wheat canopy at different growth stages using three-dimensional portable lidar imaging. *ISPRS J. Photogramm. Remote Sens.* 64: 151 — 158.
- Huang B. E., George A. W., Forrest K. L., Kilian A., Hayden M. J., Morell M. K., Cavanagh C. R. 2012. A multiparent advanced generation inter-cross population for genetic analysis in wheat. *Plant Bio. J.* 10: 826 — 839.
- Huang C., Yang W., Duan L., Jiang N., Chen G., Xiong L., Liu Q. 2013. Rice panicle length measuring system based on dual-camera imaging. *Comput. Electr. Agric.* 98: 158 — 165.
- Huete A. R. 1988. A Soil-Adjusted Vegetation Index (SAVI). *Remote Sensing Of Environment* 25: 295 — 309.
- Jaccoud D., Peng K., Feinsein D., Kilian A., 2001. Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* 29, 4: 25.
- Jones H. G., Serraj R., Brian R. L., Xiong L., Wheaton A., Price A.H. 2009. Thermal infrared imaging of crop canopies for the remote diagnosis and quantification of plant responses to water stress in the field. *Funct. Plant Biol.* 36: 978 — 989.
- Kalaji M. H., Łoboda T. 2009. Fluorescencja chlorofilu w badaniach stanu fizjologicznego roślin. Wydawnictwo SGGW, Warszawa.
- Knipling, E. B. 1970. Physical and physiological basis for the reflectance of visible and near-infrared radiation from vegetation. *Remote Sens. Environ.* 1: 155 — 159.
- Kover P. X., Valdar W., Trakalo J., Scarcelli N., Ehrenreich I. M., Purugganan M. D., Durrant C., Mott R. 2009. A multiparent advanced generation inter-cross to fine-map quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 5, 7: e1000551.
- Li L., Zhang Q., Huang D. 2014. A review of imaging techniques for plant phenotyping. *Sensors* 14: 20078 — 20111.

- Monneveux P., Jing R., Misra S. C. 2012. Phenotyping for drought adaptation in wheat using physiological traits. *Frontiers in Physiology* 3, 429: 1 — 12.
- Niedziela A., Bednarek P. T., Labudda M., Mańkowski D. R., Anioł A. 2014. Genetic mapping of a 7R Al tolerance QTL in triticale (x *Triticosecale* Wittmack). *J. App. Genetics* 55, 1: 1 — 14.
- Pearson R. L., Miller L. D. 1972. Remote mapping of standing crop biomass for estimation of the productivity of the short-grass. *Prairie, Pawnee National Grassland, Colorado: 8th international symposium on remote sensing of environment*. pp. 1357 — 1381.
- Poland J. A., Brown P. J., Sorrells M. E., Jannink J.-L. 2012. Development of high-density genetic maps for barley and wheat using a novel two-enzyme genotyping-by-sequencing approach. *PLoS ONE* 7, 2: e32253.
- Rafalski J. A. 2010. Association genetics in crop improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 13: 174 — 180.
- Ramoelo A., Dzikiti S., van Deventer H., Maherry A., Cho M. A., Gush M. 2015. Potential to monitor plant stress using remote sensing tools. *J. Arid Env.* 113: 134 — 144.
- Rhodes D. H., Hoffmann L. Jr, Rooney W. L., Ramu P., Morris G. P., Kresovich S. 2014. Genome-wide association study of grain polyphenol concentrations in global sorghum (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) germplasm. *J. Agric Food Chem.* 62, 45: 10916 — 27.
- Richardson A. J., Wiegand C. L. 1977. Distinguishing vegetation from soil background information. *Photogramm. Eng. Remote Sens.* 43: 1541 — 1552.
- Semagn K., Bjørnstad Å., Ndjiondjop M. N. 2006. An overview of molecular marker methods for plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5, 25: 2540 — 2568.
- Semagn K., Bjørnstad Å., Xu Y. 2010. The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electron J Biotechnol.* 13: 5, <http://dx.doi.org/10.2225/vol13-issue5-fulltext-14>.
- Srayeddin I., Doussan C. 2009. Estimation of the spatial variability of root water uptake of maize and sorghum at the field scale by electrical resistivity tomography. *Plant Soil* 319: 185 — 207.
- Vos P., Hogers R., Bleeker M., Rijans M., Van de Lee T., Hormes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M., Zabeau M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23: 4407 — 4414.
- Wenzl P., Carling J., Kudrna D., Jaccoud D., Huttner E., Kleinhofs A., Kilian A. 2004. Diversity arrays technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 9915 — 9920.
- White J. W., Andrade-Sanchez P., M. A. Gore, Bronson K. F., Coffelt T. A., Conley M. M., Feldmann K. A., French A. N., Heun J. T., Hunsaker D. J., Jenks M. A., Kimball B. A., Roth R. L., Strand R. J., Thorp K. R., Wall G. W., Wang G. 2012. Field-based phenomics for plant genetics research. *Field Crops Research* 133: 101 — 112.
- Xu S. 2003. Theoretical basis of the Beavis effect. *Genetics* 165: 2259 — 2268.
- Yu J., Holland J. B., McMullen M. D., Buckler E. S. 2008. Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. *Genetics* 178: 539 — 551.
- Zhu C., Gore M., Buckler E. S., Yu J., 2008. Status and prospects of association mapping in plants. *Plant Gen.* 1: 5 — 20.