

**PAWEŁ MILCZARSKI**

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Akademia Rolnicza w Szczecinie

## Identyfikacja QTL warunkujących długość liścia flagowego w dwóch populacjach mapujących żyta (*Secale cereale* L.)

### Identification of QTLs affecting the flag leaf length in two mapping populations of rye (*Secale cereale* L.)

Celem niniejszych badań była identyfikacja regionów genomowych kontrolujących długość liścia flagowego (FLL) w dwóch populacjach mapujących żyta Ds2 × RXL10 i 541 × Ot1-3. Wykryto łącznie 5 QTL (dwa dla Ds2 × RXL10 i trzy dla 541 × Ot1-3), które zmapowano na chromosomach 2R, 4R i 7R. Tylko QTL zidentyfikowane na chromosomie 2R lokalizowały się w tym samym regionie u obu populacji mapujących. Najważniejsze QTL zlokalizowano na chromosomie 7R, lecz na różnych ramionach map obu mieszańców. Współczynnik determinacji ( $R^2$ ) obliczony dla wykrytych QTL mieścił się w szerokim zakresie od 4,5 do 30,9%. Identyfikacja QTL może pomóc w wyjaśnieniu mechanizmów genetycznych rozwoju liścia flagowego u żyta.

**Słowa kluczowe:** długość liścia flagowego, QTL (*loci* cechy ilościowej), żyto

The objective of this study was identification of genomic regions controlling the flag leaf length (FLL) in Ds2 × RXL10 and 541 × Ot1-3 mapping populations of rye. Five QTLs (two on Ds2 × RXL10 map and three on 541 × Ot1-3 map) were detected on chromosomes 2R, 4R and 7R. Only the QTL on chromosome 2R was identified in the same region on both maps. The most important QTLs are located on chromosome 7R, but on different arms in each map. The coefficient of determination ( $R^2$ ) for QTLs ranged from 4.5 to 30.9%. The identification of QTLs can be helpful in explaining the genetic mechanisms of flag leaf development in rye.

**Key words:** flag leaf length, QTL (quantitative trait *loci*), rye

#### WSTĘP

Liście właściwe u żyta, w tym liść flagowy, wykazują u linii wsobnych wysoki poziom polimorfizmu. Różnice dotyczą zarówno powierzchni, kształtu, długości czy szerokości liści, co przekłada się na zwiększenie bądź zmniejszenie powierzchni asymilacyjnej, a w konsekwencji wpływa na produkcję biomasy. Badania nad dziedzicznym podłożem kształtu liścia flagowego prowadzone były między innymi przez Ruebenbauera i wsp. (1980), Kubicką i Dec (2001). Ruebenbauer i wsp. (1980) przebadali charakterystyczny

dla form karłowatych trójkątny kształt liścia i stwierdzili, że cecha ta jest kontrolowana 4 recesywnymi genami a allele dominujące odpowiadają za normalny ich kształt. Kubicka i Dec (2001) badali sposób dziedziczenia długości liścia flagowego i podflagowego stwierdzając, że cecha ta jest uwarunkowana 3 genami o działaniu addytywnym. Badania te nie pozwoliły jednak na precyzyjne podanie lokalizacji chromosomowej, oraz ocenę wpływu poszczególnych *loci* na determinację cechy.

Pełna identyfikacja i charakterystyka *loci* warunkujących cechy ilościowe (QTL) jest możliwa w oparciu o mapy genetyczne na bazie, których można określić liczbę *loci*, ich lokalizacje chromosomową, wpływ wykrytych *loci* na determinację cechy a także wnioskować o sposobie dziedziczenia czy interakcjach pomiędzy QTL. Poznanie dziedzicznego podłoża warunkującego tę cechę może pomóc w zrozumieniu złożonego mechanizmu kształtowania się ważnych cech użytkowych.

Celem niniejszej pracy było wstępne rozpoznanie dziedzicznego podłoża długości liścia flagowego z wykorzystaniem dwóch populacji mapujących oraz wskazanie liczby i lokalizacji chromosomowej QTL kontrolujących tę cechę wraz z charakterystyką *loci*.

#### MATERIAŁ I METODY

Materiałem badawczym były potomstwa F<sub>4</sub> (100 i 94 osobniki) dwóch populacji mapujących otrzymanych z mieszańców międzyliniowych: Ds2 × RXL10 oraz 541 × Ot1-3. Formy rodzicielskie wykazywały różnicowanie pod względem długości liścia flagowego, a w potomstwie obserwowano segregację. Zmierzono długość liścia flagowego na pędzie głównym u form rodzicielskich i obu populacjach potomnych (min. 20 pomiarów każdego genotypu) i otrzymano szeroki zakres zmienności cechy zbliżony do rozkładu normalnego (tab. 1).

Tabela 1

**Charakterystyka długości liścia flagowego w dwóch populacjach mapujących żyta**  
**Characteristics of flag leaf length in two mapping population of rye**

Cecha Trait	Symbol QTL QTL code	Populacja mapująca Mapping population	Wartość średnia cechy u rodziców Mean trait value in parents		Wartość średnia cechy w populacji (odchylenie standardowe) Mean trait value in population (standard deviation)	Zakres zmienności cechy w populacji Variation range of trait in population	Współczynnik odziedziczalności (H) Coefficient of heritability
Długość liścia flagowego Flag leaf length (cm)	Fll	Ds2 × RXL10	DS2 11,1	RXL10 7,5	10,5 (1,69)	7,1–16,2	0,57
		541 × Ot1-3	541 11,7	Ot1-3 9,2	10,7 (1,80)	6,8–18,4	0,71

Dane z pomiarów wprowadzono do programu komputerowego WinQTL Cartographer 2.5 (Wang i in., 2006) w celu wykrycia QTL warunkujących cechę i naniesienia ich na mapy genetyczne utworzone wcześniej (Bednarek i in., 2003; Milczarski i in., 2007), na których została (dla przejrzystości) ograniczona liczba markerów molekularnych. Do identyfikacji

QTL zastosowano model CIM (Composite Interval Mapping), a do wykrywania interakcji i sposobu działania QTL zastosowano moduł MIM (Multiplay Interval Mapping).

Parametrami opisującymi wykryte QTL są: LOD — test logarytmiczny określający pewność lokalizacji QTL w danym miejscu na chromosomie, "a" — efekt addytywny allele rodzicielskiego (tu pochodzącego od linii rodzicielskiej DS2 lub 541) wyrażany jest w jednostkach pomiaru i określa (w zależności od znaku) o jaką wartość allele ten obniża lub podwyższa wartość cechy,  $R^2$  — współczynnik determinacji. Przyjęto min. poziom krytyczny testu LOD = 2,5. Za istotne QTL uznaje się te, których poziom LOD przekracza wartość krytyczną a  $R^2 \geq 10\%$ .

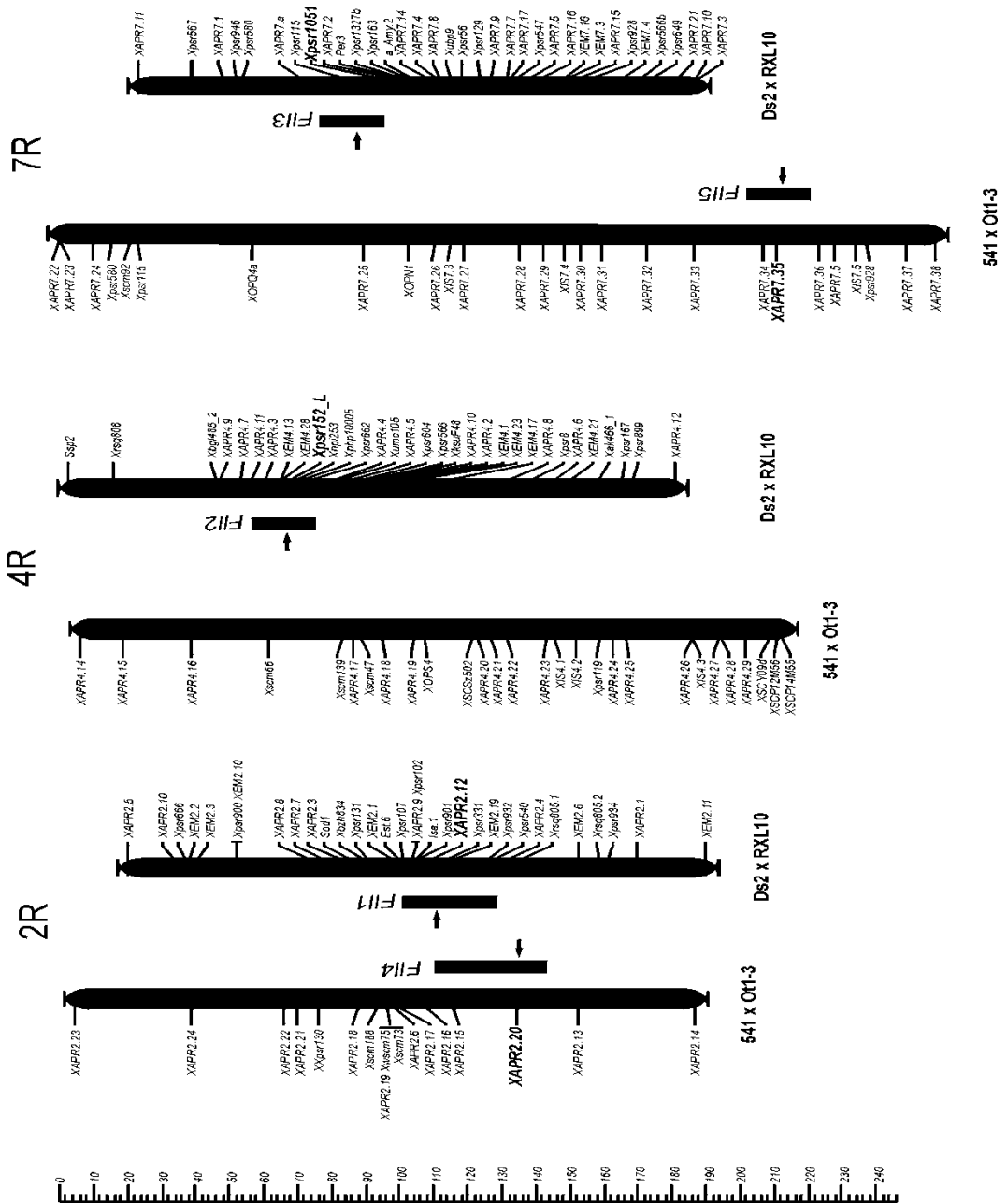
#### WYNIKI I DYSKUSJA

Formy rodzicielskie użyte do wytworzenia populacji mapujących znacznie różniły się długością liścia flagowego. Linie DS2 i 541 posiadają długi liść, RXL10 (forma karłowa) liść krótki a Ot1-3 liść średniej długości (tab. 1). Stwierdzone różnice wynosiły 26% w przypadku pary linii 541 i Ot1-3 i 48% w przypadku DS2 i RXL10. W populacjach potomnych obserwowano genotypy o dużym rozrzucie cechy i wartościach przekraczających rodziców, co może świadczyć o występowaniu transgresji. Obliczony współczynnik odziedziczalności o szerokim zakresie był różny u obu populacji i wynosił 0,57 dla mieszańca Ds2  $\times$  RXL10 i 0,7 dla 541  $\times$  Ot1-3 (tab. 1).

Identyfikacja i mapowanie *loci* warunkujących cechy ilościowe dokonywana jest poprzez wykrywanie zależności pomiędzy obserwowaną zmiennością cechy (tu długości liścia flagowego) z segregacją markerów molekularnych mapy genetycznej, na której oznaczono genotypy odpowiednimi, zależnymi od stosowanego programu komputerowego, kodami. Wykryte QTL lokalizowane są na mapie genetycznej w przedziale mapowym ograniczonym markerami molekularnymi, a ich odległość do najbliższego markera jest estymowana.

W niniejszej pracy podjęto próbę określenia prawdopodobnej liczby QTL kontrolującej długość liścia flagowego wykorzystując do tego celu dwie populacje mapujące, na bazie których skonstruowano uprzednio mapy genetyczne (Bednarek i in., 2003; Milczarski i in., 2007).

Zidentyfikowano i opisano 5 prawdopodobnych QTL warunkujących długość liścia flagowego: 2 w populacji 541  $\times$  Ot1-3 oraz 3 w populacji Ds2  $\times$  RXL10, którym przypisano skrócony symbol (*Fll*) i umiejscowiono na chromosomach 2R, 4R i 7R (rys. 1, tab. 2). Wykryte QTL na chromosomach 2R i 7R obserwowano u obu populacji, lecz tylko na chromosomie drugim ich pozycje są zbliżone co pozwala sądzić, że *Fll1* i *Fll4* stanowią prawdopodobnie ten sam *locus*. Lokalizowane na chromosomie 7R QTL *Fll3* i *Fll5* zostały zmapowane na odpowiednio krótkim i długim ramieniu tego chromosomu, co wskazuje na możliwość umiejscowienia na 7R dwóch genów odpowiedzialnych za kształtowanie się długości liścia, lecz różnych gdyż ich lokalizacja nie pokrywa się u testowanych populacji.



Rys. 1. Lokalizacja QTL warunkujących długość liścia flagowego na chromosomach żyta na dwóch populacjach mapujących. **Boldem** zaznaczono markery najbliższe sprzężone z QTL  
 Fig. 1. Localization of QTLs related to flag leaf length on chromosomes of two mapping populations of rye. **Markers** linked to QTL are in bold

Oba wymienione wyżej *loci* wykazują największy wpływ ( $R^2$ ) na ekspresję tej cechy, a efekty addytywne alleli pochodzących od rodzicielskich linii DS2 i 541 posiadają jednakowe znaki dodatnie oznaczające, że allele wykrywane u tych rodziców wydłużają liść flagowy (tab. 2). Odmienna sytuacja stwierdzona została dla QTL *FIII1* i *FIII4* lokujących się w zbliżonych regionach chromosomu 2RL. Efekty addytywne alleli rodzicielskich dla tych *loci* mają różne znaki a dodatkowo *locus FIII1* charakteryzuje się najniższym efektem addytywnym spośród wszystkich wykrytych QTL. Pojedynczy QTL wykrywany na chromosomie 4R w mieszańcu DS2 × RXL10 nie znajduje potwierdzenia w drugiej populacji mapującej, a jego wpływ na kształtowanie się cechy jest nieznaczny (nie przekracza 10%).

Tabela 2

**Identyfikacja i charakterystyka QTL warunkujących długość liścia flagowego na dwóch populacjach mapujących żyta**

**Identification and characteristics of QTLs related to flag leaf length on two mapping populations of rye**

Populacja mapująca Mapping population	Symbol QTL QTL code	Lokalizacja chromosomowa Chromosomal localisation	Najbliższy marker (dystans w cM) Nearest marker (distance in cM)	LOD	Efekt addytywny Additive effect (cm)	$R^2$ (%)	Działanie QTL The QTL action
Ds2 × RXL10	<i>FIII1</i>	2R	<i>APR3.12</i> (0,0)	3,26	-0,54	4,5	addytywne — additive
	<i>FIII2</i>	4R	<i>psr152_L</i> (0,2)	2,60	-0,64	6,8	addytywne — additive
	<i>FIII3</i>	7R	<i>psr 1051</i> (5,0)	3,24	2,46	16,9	addytywne — additive
541 × Otl-3	<i>FIII4</i>	2R	<i>APR2.20</i> (0,0)	3,3	2,37	24,6	addytywne — additive
	<i>FIII5</i>	7R	<i>APR7.35</i> (3,0)	3,05	1,51	30,6	addytywne — additive

Wszystkie wykrywane QTL testowano przy użyciu moduły MIM w celu określenia typu działania pojedynczego QTL i interakcji pomiędzy nimi. Stwierdzono addytywny sposób działania wszystkich *loci*, nie stwierdzając interakcji pomiędzy QTL.

Parametry liści (długość, szerokość, powierzchnia) dziedziczą się ilościowo i wykazują dużą reakcję na warunki środowiskowe co utrudnia rozpoznanie ich podłoża (Kobayashi i in., 2003). Jak dotąd brak jest opublikowanych prac na wykrywaniem QTL warunkujących długość liścia flagowego u żyta, pomimo faktu że opublikowano już kilka prac identyfikujących QTL kontrolujących inne cechy morfologiczne (Börner i in., 1999 i 2000; Milczarski i Masojć, 2003). Cecha ta była badana u innych gatunków, przede wszystkim u ryżu, u którego ograniczenie powierzchni liści obniża drastycznie plon nasion. Wykrywano tam różną liczbę QTL zależną od składu alleli u form rodzicielskich w zakresie od 2 (Mei i in., 2003) do 8 (Kobayashi i in., 2003). Kobayashi i wsp. 2003 przeprowadzili doświadczenie i pomiary długości liścia flagowego w wielu lokalizacjach i kilku sezonach wegetacyjnych i stwierdzili istotny efekt środowiska wpływający na wykrywanie QTL. W niniejszych badaniach liczba QTL stwierdzanych w populacjach mapujących wynosiła 2 i 3 lecz nie przeprowadzono testu w różnych środowiskach. Otrzymane wyniki potwierdzają

analizy klasycznego oszacowania liczby genów warunkujących długość liścia flagowego na 3 zaproponowanego przez Kubicką i Dec 2001. W pracach Kobayashi i wsp. (2003) oraz Mei i wsp. (2003) efekty wariacji wyjaśniające zmienność pozostającą pod kontrolą QTL (jest to ekwiwalent współczynnika determinacji) były niewielkie i mieściły się w zakresie od 5,1 do 17,3%. Podobny zakres determinacji cechy obserwowano dla QTL wykrywanych w populacji Ds2 × RXL10, a zdecydowanie wyższy (24,6 i 30,6%) dla dwóch QTL w populacji 541 × Ot1-3. W tej drugiej populacji również efekty addytywne allele pochodzącego z linii 541 były wysokie i w obu *loci* wpływały na wydłużenie liścia. Bardziej skomplikowany obraz wyłania się z charakterystyki QTL w mieszańcu Ds2 × RXL10, gdyż efekty addytywne allele pochodzącego z linii Ds2 w dwóch z trzech QTL obniżają (łącznie o ok. 1 cm) długość liścia przy zdecydowanie niskich, poniżej przyjętych za istotne, wartościach współczynnika determinacji. Efekt fenotypowy długiego liścia u linii Ds2 wynika prawdopodobnie z działania *locus Fll3* równoważącego niekorzystny wpływ dwóch pozostałych *loci*.

Zaprezentowany wstępny obraz dziedziczenia się długości liścia flagowego u żyta jest przyczynkiem do prowadzenia szerszych badań nad identyfikacją genów warunkujących kształtowanie się liścia.

#### WNIOSKI

1. Otrzymane wyniki wskazują, że przynajmniej 4 *loci* kontrolują długość liścia flagowego u żyta wpływając na fenotypowy obraz cechy w różnym stopniu.
2. QTL zlokalizowane na chromosomie 7R w największym stopniu determinują cechę u obu populacji mapujących.
3. Tylko QTL (*Fll1* i *Fll4*) na chromosomie 2R wykrywane u obu populacji zajmują zbliżony obszar na mapie genetycznej.
4. W celu zidentyfikowania wszystkich genów warunkujących długość liścia flagowego u żyta należy rozszerzyć badania o populacje posiadające inne źródła alleli, a następnie weryfikować je w różnych środowiskach.

#### LITERATURA

- Bednarek P. T., Masojć P., Lewandowska R., Myśków B. 2003. Saturating rye genetic map with amplified fragment length polymorphism (AFLP) and random amplified polymorphic DNA (RAPD) markers. *J. Appl. Genet.* 44 (1): 21 — 33.
- Börner A., Korzun V., Voylokov A.V., Weber W. E. 1999. Detection of quantitative trait loci on chromosome 5R of rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 1087 — 1090.
- Börner A., Korzun V., Voylokov A. V., Worland A. J., Weber W. E. 2000. Genetic mapping of quantitative trait loci in rye (*Secale cereale* L.) *Euphytica* 116: 203 — 209.
- Kobayashi S., Fukuta Y., Morita S., Sato T., Osaki M., Khush G.S. 2003. Quantitative trait loci affecting flag leaf development in rice (*Oryza sativa* L.). *Breeding Science* 53: 255 — 262.
- Kubicka H., Dec D. 2001. Analiza genetyczna długości i szerokości liścia flagowego i podflagowego u żyta ozimego (*Secale cereale* L.) *Biul. IHAR* 218/219: 351 — 360.
- Mei H. W., Luo L. J., Ying C. S., Wang Y. P., Yu X. Q., Guo L. B., Paterson A. H., Li Z. K. 2003. Gene actions of QTLs affecting several agronomic traits resolved in a recombinant inbred rice population and two tester populations. *Theor. Appl. Genet.* 107: 89 — 101.

- Milczarski P., Masojć P. 2003. Interval mapping of genes controlling growth of rye plants. *Plant Breed. Seed Sci.* 48: 135 — 142.
- Milczarski P., Banek-Tabor A., Lebiecka K., Stojalowski S., Myśków B., Masojć P. 2007. New genetic map of rye composed of PCR-based molecular markers and its alignment with the reference map of the DS2 × RXL10 intercross. *J. Appl. Genet.* 48 (1): 11 — 24.
- Ruebenbauer T., Kubara-Szpunar Ł., Łoś T. 1980. Genes controlling quantitative traits in rye (*Secale cereale* L.). *Genetica Polonica* 22 (4): 397 — 410.
- Wang S. C., Basten C. J., Zeng Z. B, 2006. Windows QTL Cartographer 2.5, Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>).