

POSZUKIWANIE POLIMORFICZNYCH MARKERÓW ZDEFINIOWANYCH SEKWENCYJNIE W POPULACJI GROCHU CARNEVAL X MP1401

MICHAŁ KNOPKIEWICZ, MAGDALENA GAWŁOWSKA, WOJCIECH ŚWIĘCICKI

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

mkno@igr.poznan.pl

Synopsis. W latach 2011–2012 przeprowadzono badania, których celem było znalezienie polimorficznych markerów zdefiniowanych sekwencyjnie w populacji grochu Carneval x MP1401. Analizie poddano 131 markerów STS. Badania doprowadziły do znalezienia 13 markerów polimorficznych. Analiza programem BLAST potwierdziła homologię uzyskanych w reakcji PCR produktów w stosunku do sekwencji, wobec których projektowano startery. Analiza porównawcza wykazała homologię 10 analizowanych markerów z genomem *Medicago truncatula*, 3 z genomem *Lotus japonicus* oraz 1 z genomem *Lupinus angustifolius*.

Słowa kluczowe – *key words*: mapa genetyczna – *genetic map*, marker molekularny – *molecular marker*, populacja mapująca – *mapping population*, *Pisum sativum* L.

WSTĘP

Mapa genetyczna odzwierciedla odległości między loci genów. W jej konstruowaniu wykorzystuje się analizę sprzężeń. Dystans dzielący poszczególne loci na mapie nie stanowi jednak rzeczywistej, fizycznej odległości między nimi. Mierzy się go w centymorganach; jednostka ta informuje o częstości zachodzenia procesu crossing-over między danymi loci w genie [Andersen i Lubberstedt 2003, Kumar 1999].

Pierwszymi wykorzystywanymi markerami były cechy morfologiczne. Powszechnie stosowano cechy takie jak: karłowatość, niedobory chlorofilu i zmieniona morfologia liści. Chociaż tego typu markery dobrze służą, zarówno w badaniach podstawowych, jak i aplikacyjnych, ich użyteczność jest ograniczona. Do rozpoznania większości markerów morfologicznych konieczna jest obserwacja całej rośliny. Ponadto występują one w genie stosunkowo rzadko. Do wad markerów morfologicznych zalicza się też dominująco-recesywny sposób dziedziczenia i silny efekt epistatyczny [Tanksley 1983].

W celu uzupełnienia puli markerów zastosowano markery izoenzymatyczne. Izoenzymy to enzymy przeprowadzające tę samą reakcję, ale kodowane przez inne regiony DNA i różniące się strukturą. Często działają w różnych przedziałach komórkowych lub na różnych etapach rozwoju organizmu. Dzięki różnicom struktury izoenzymy migrują z różną prędkością podczas elektroforezy w żelu skrobiowym. Do mapowania genetycznego wykorzystuje się allozymy – izoenzymy tego samego locus. Niestety ilość markerów izoenzymatycznych w genie również jest ograniczona. Badanie każdego markera wymaga specjalnego protokołu, a procedura jest stosunkowo pracochłonna [Farooq i Azam 2002, Zeidler 2000].

Przełom w mapowaniu genetycznym nastąpił po zastosowaniu markerów opartych o technikę PCR. Sekwencja genomowa stanowi olbrzymie źródło markerów polimorficznych m.in. RAPD, SCAR, SNP, SSR, ISSR, CAPS. Ich nazwy pochodzą od rodzaju sekwencji i/lub metody badawczej. Tematem przedstawionej pracy są markery STS. Markery STS, powstają w reakcji PCR ze starterami zaprojektowanymi tak, żeby amplifikacji uległ specyficzny fragment DNA o znanej sekwencji [Brauner i in. 2002, Farooq i Azam 2002].

„Wysycione” mapy genetyczne są potrzebne w badaniach podstawowych z zakresu genomiki porównawczej i mapowania QTL oraz aplikacyjnych – dla selekcji wykorzystującej sprzężone markery. Prezentowane wyniki pochodzą z pierwszego etapu projektu mającego doprowadzić do zagęszczenia „kanadyjskiej” mapy *Pisum* markerami odniesienia, w tym markerami zdefiniowanymi sekwencyjnie. Przeprowadzono również analizę porównawczą znalezionych markerów polimorficznych grochu z innymi roślinami strączkowymi w celu znalezienia homologii.

Celem badań było znalezienie polimorficznych markerów zdefiniowanych sekwencyjnie w populacji grochu Carneval X MP1401.

MATERIAŁ I METODY

W pracy przedstawiono wyniki badań przeprowadzonych w Instytucie Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu w latach 2011–2012. Populacja mapująca Carneval x MP1401 składa się z 88 linii wsobnych rekombinantów w pokoleniu F₁₀. Linie rodzicielskie to rośliny wąsolistne, o krótkich międzywęzłach i białych kwiatach. Carneval jest odmianą częściowo odporną na *Mycosphaerella pinodes* i mniej podatną na wyleganie [Tar’ana i in. 2003]. Nasiona populacji mapującej zostały udostępnione przez prof. B. Tar’ana i prof. T. Warkentina z Uniwersytetu Saskatchewan w Kanadzie.

Startery opracowano w ramach 6 Programu Ramowego Unii Europejskiej GLIP (Grain Legumes Integrated Project). Informacje na ich temat znajdują się na stronie: <http://bioweb.abc.hu/cgi-mt/pisprim/pisprim.pl>. Wykorzystano również startery pochodzące z publikacji Gilpin i in. [1997.]

Skład reakcji PCR dla markerów z programu GLIP: Bufor GoTaq flexi (1X); MgCl₂ (2,5 mM); dNTP (0,25 mM); starter F (10 μM); starter R (10 μM); BSA; Taq polimeraza (1,25 U); matryca (20ng). Profil temperaturowy: 95°C (3min); 2x [94°C (30s), 60°C (1min), 72°C (1min)]; 2x [94°C (30s), 58°C (1min), 72°C (1min)]; 2x [94°C (30s), 56°C (1min), 72°C (1min)]; 2x [94°C (30s), 54°C (1min), 72°C (1min)]; 2x [94°C (30s), 52°C (1min), 72°C (1min)]; 2x [94°C (30s), 50°C (1min), 72°C (1min)]; 2x [94°C (30s), 48°C (1min), 72°C (1min)]; 2x [94°C (30s), 46°C (1min), 72°C (1min)]; 19x [94°C (30s), 45°C (1min), 72°C (1min)]; 72°C (4min); 10°C ∞.

Skład reakcji PCR dla markerów Q363 i P482: Bufor GoTaq flexi (1x); MgCl₂ (2,5 mM); dNTP (2 mM); starter F (10 μM); starter R (10 μM), Taq polimeraza (0,625 U), matryca (20 ng). Profil temperaturowy: 40x [95°C (1min), Ta (54°C dla P482, 58°C dla Q363) (1min), 72°C (5min)], 10°C ∞.

Produkty reakcji PCR były trawione odpowiednio dobranymi enzymami restrykcyjnymi. Skład reakcji: mieszanina po PCR (5μl); bufor (1x), enzym (0,3 U).

Do analizy izoenzymatycznej wykorzystano elektroforezę w 11% żelu skrobiowym. Badano aktywność enzymatyczną w ekstrakcie z młodej tkanki liściowej. Ekstrakt pozyskano przez zmieszenie 0,5 g tkanki liściowej w 0,5 ml buforu ekstrakcyjnego. Dla każdego enzymu zastosowano odpowiedni system buforowy w celu zapewnienia odpowiedniego rozdziału i aktywności enzymu [Wolko i Weeden 1989].

WYNIKI I DYSKUSJA

Linie rodzicielskie populacji mapującej Carneval x MP1401 nie wykazywały żadnych różnic morfologicznych. Charakteryzowały się również niskim poziomem polimorfizmu izoenzymatycznego. Z 21 testowanych markerów tylko dwa były polimorficzne (*Lap2* oraz *6Pgd-p*).

Przeanalizowano 131 markerów STS w liniach rodzicielskich Carneval i MP1401. Dla trzech wykryto polimorfizm bez etapu sekwencjonowania (Q363, P482 i Unk7). W przypadku 27 markerów po reakcji PCR otrzymano czysty produkt, który poddano sekwencjonowaniu. Przy pomocy programu BLAST potwierdzono homologię uzyskanych produktów w stosunku do sekwencji, wobec których projektowano startery (tab. 1). Następnie przy pomocy progra-

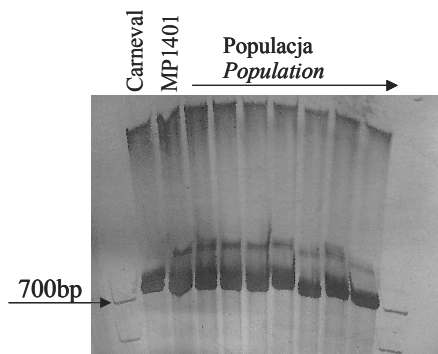
Tabela 1. Analiza sekwencji polimorficznych programem BLAST

Table 1. BLAST analysis for polymorphic sequences

Nazwa markera <i>Marker name</i>	Podobieństwo z sekwencją genomową (BLAST) <i>Similarity with genomic sequence (BLAST)</i>	Sekwencja genomowa <i>Genomic sequence</i>
mtmt_EST_03378_02_1	79%	AC169076
Pis_GEN_17_2_1	98%	AY093427
Pis_GEN_18_2_1	99%	AY557341
Pis_GEN_1_2_1	98%	X63060
Pis_GEN_7_1-2_1	98%	X69215
Pis_GEN_25_2-3_1	99%	AB075695
Pis_GEN_57_1-2_1	99%	AB116263
Psat_EST_00189_01_1	100%	EU270948
QOR	96%	NM_001254672.1
mtmt_GEN_01093_06_1	89%	AC131026

mu Sequencher poszukiwano miejsc polimorficznych. W 10 parach sekwencji wykryto SNP. Łącznie w całej populacji przeanalizowano 7 markerów (P482, UNK7, Pis_GEN_18_2_1, Pis_GEN_1_2_1, Pis_GEN_7_1-2_1, Pis_GEN_25_2-3 i Q363). Marker Q363 wykazał polimorfizm długości produktu podczas elektroforezy w żelu poliakryloamidowym (rys. 1). Polimorfizm pozostałych 6 markerów uwidocznił się przez trawienie odpowiednio dobranym enzymem restrykcyjnym (tab. 2, rys. 2). Wyniki poddano analizie statystycznej testem chi-kwadrat w celu sprawdzenia poprawności segregacji.

Tar'an i inni [2003] stworzyli mapę genetyczną dla populacji RIL Carneval x MP1401. Mapa ta obejmuje 139 markerów AFLP, 13 RAPD i 1 STS. Markery są przypisane do 10 grup sprzężeń, które obejmują 1274 cM genomu. Średnia odległość pomiędzy markerami wynosi 6,2 cM. Niestety markery odniesienia do opublikowanej wcześniej mapy *Pisum* są nieliczne



Rys.1. Marker Q363 na żelu poliakryloamidowym
 Fig. 1. Q363 marker on the polyacrylamide gel

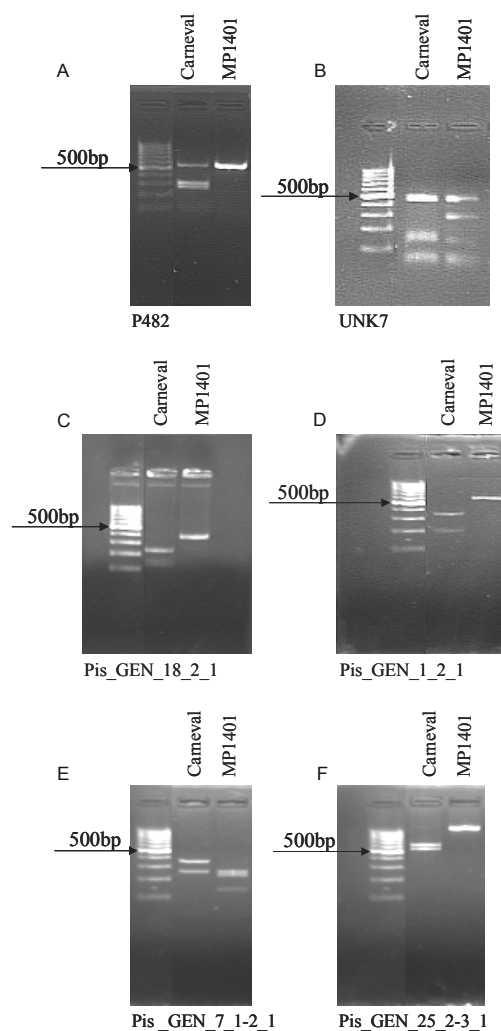
[Weeden i in. 1998]. Aby w pełni korzystać z różnych map genetycznych konieczne jest ich porównanie [Tar'an i in. 2003].

Markery przetestowane w całej populacji można nanieść na mapę opublikowaną przez Tar'an i in. [2003]. Jeden z nich (Q363) jest już zmapowany. W celu odniesienia mapy Carneval x MP1401 do innych map konieczne jest umieszczenie jak największej liczby markerów odniesienia. Jest to również niezbędne do mapowania loci cech ilościowych (QTL). Tego typu analiza polega na poszukiwaniu zależności pomiędzy wartością cechy ilościowej, wykształconej przez każdego osobnika populacji mapującej, a obserwacjami genotypowymi.

Tabela 2. Enzymy restrykcyjne wykorzystane do uwidocznienia polimorfizmu markerów oraz wyniki testu chi-kwadrat

Table 2. Restriction enzymes used to visualise polymorphism of the markers and chi-square test results

Nazwa markera – <i>Marker name</i>	Enzym – <i>Enzyme</i>	chi-kwadrat – <i>chi-square</i>
P482	RsaI	2,0
UNK7	AluI	3,7
Pis_GEN_18_2_1	VspI	2,2
Pis_GEN_1_2_1	MnII	24,1
Pis_GEN_7_1-2_1	Cfr13I	26,2
Pis_GEN_25_2-3_1	KspAI	1,4
Q363	–	2,9



Rys. 2. Polimorfizm markerów uwidoczniiony przez trawienie restrykcyjne
Fig. 2. Polymorphic markers after digestion with restriction enzymes

Wszystkie zidentyfikowane markery polimorficzne wykorzystano do analizy porównawczej z genomami *M. truncatula* (<http://www.medicago-hapmap.org/?genome>) i *L. japonicus* (<http://www.kazusa.or.jp/lotus/>). Są to rośliny modelowe dla rodziny strączkowych. Znaczna część ich genomu została już zsekwencjonowana [Cannon 2009]. *Medicago truncatula* posiada mały diploidalny genom (ok. 470Mpz), jest samopylna, wytwarza dużo nasion oraz charakteryzuje się szybkim cyklem rozwojowym. Istnieje wiele ekotypów *Medicago*, zróżnicowanych fenotypowo pod względem cech takich, jak: sposób wzrostu, czas kwitnienia, specyficzność symbiotyczna i odporność na choroby. Ta różnorodność stanowi cenne źródło informacji w badaniach doty-

czących genetyki roślin strączkowych [Cook 1999]. *Lotus japonicus* również ma diploidalny genom. Posiada podobne zalety do *Medicago*. Ponadto charakteryzuje się morfologią strąków podobną do innych uprawnych roślin strączkowych (soja, groch, wspania), co umożliwia badania porównawcze z zakresu rozwoju nasion [Marquez i in. 2005]. Porównanie znalezionych w populacji grochu sekwencji polimorficznych z genomami roślin modelowych zaowocowało znalezieniem 9 sekwencji homologicznych do genomu *Medicago truncatula* (tab. 3). Trzy markery wykazały homologię z genomem *Lotus japonicus*. Znaleziono 1 sekwencję homologiczną do genomu *Lupinus angustifolius* [Nelson i in. 2010] (tab. 4). Sekwencjonowanie genomów roślin modelowych jest kosztowne i pracochłonne. Przedsięwzięcie to jest jednak opłacalne ze względu na możliwość wykorzystania uzyskanej wiedzy w badaniu spokrewnionych gatunków uprawnych o bardziej skomplikowanym genomie [Cannon 2009]. Genetyka porównawcza

Tabela 3. Porównanie lokalizacji markerów grochu z mapą *M. truncatula*
Table 3. Comparison of the pea marker localisation with the *M. truncatula* map

Marker <i>Marker name</i>	<i>Medicago truncatula</i>		
	Adnotacja Bac <i>BAC annotation</i>	Pseudochromosom <i>Pseudochromosome</i>	Najbliższy marker <i>Closest marker</i>
mtmt_EST_03378_02_1	mth2-151b17 AC169076	MtChr7	-
Pis_GEN_17_2_1	mth2-34j5 AC137829	MtChr2	002E10 54.700 cM
Pis_GEN_18_2_1	mth2-52p12 CR956392	MtChr3	h2_52p12a 72.900 cM
Pis_GEN_1_2_1	-	-	-
Pis_GEN_7_1-2_1	mth2-32e10 AC126013	MtChr2	002E10 54.700 cM h2_32e10d 54.700 cM
Pis_GEN_25_2-3_1	mth2-15o24 AC139748	MtChr1	005G01 43.900 cM
Pis_GEN_57_1-2_1	mth2-69a16 CU468574	MtChr3	-
Psat_EST_00189_01_1	mth2-8f9 AC136138	MtChr2	h2_8f9d 54.700 cM
QOR	mth2-74p6 AC187543	MtChr2	-
mtmt_GEN_01093_06_1	mth2-6e18 AC131026	MtChr3	001E04 73.200 cM CysPr1 79.400 cM

Tabela 4. Porównanie lokalizacji markerów grochu z genomem *L. japonicus* i mapą *L. angustifolius*
 Table 4. Comparison of the pea marker localisation with the *L. japonicus* genome and the *L. angustifolius* map

Marker Marker name	<i>Lotus japonicus</i>			<i>Lupinus angustifolius</i>
	Kontig Contig	Klon Clone	Chromosom Chromosome	Grupa sprzężeń Linkage group
mtmt_EST_03378_02_1	-	-	-	LG10
Pis_GEN_17_2_1	-	LjSGA_027684	-	-
Pis_GEN_18_2_1	-	LjB19M02	-	-
Pis_GEN_1_2_1	-	-	-	-
Pis_GEN_7_1-2_1	CM0590	LjT43F24	3	-
Pis_GEN_25_2-3_1	CM0024	LjT17D01	5	-
Pis_GEN_57_1-2_1	-	LjSGA_030827	-	-
Psat_EST_00189_01_1	-	LjSGA_040572	-	-
QOR	-	LjSGA_100436	-	-
mtmt_GEN_01093_06_1	CM0113	LjT09O08	1	-

może dostarczyć wielu ciekawych informacji na temat stopnia pokrewieństwa roślin, przebiegu ewolucji genomów oraz funkcji genów.

WNIOSKI

1. Analiza programem BLAST wykazała homologię sekwencji projektowanych dla *Medicago* i zamplifikowanych w grochu.
2. Poziom polimorfizmu w populacji Carneval x MP1401 wyniósł około 10%, ale był wyższy niż polimorfizm wykazany przez markery morfologiczne (0%) i izoenzymatyczne (9,5%).
3. W przypadku markerów Pis_GEN_1_2_1 i Pis_GEN_7_1-2_1 wyniki analizy statystycznej znacznie odbiegają od poprawnej segregacji. Wzór trawienia dla tych markerów jest bardzo czytelny, dlatego odchylenie od normy jest najprawdopodobniej spowodowane zbyt małą liczbą osobników w populacji mapującej.

PIŚMIENNICTWO

- Andersen J.R., Lubberstedt T. 2003. Functional markers in plants. Trends Plant Sci. 8(11): 554–560.
 Brauner S., Murphy R.L., Walling J.G., Przyborowski J., Weeden N.F. 2002. STS Markers for Comparative Mapping in Legumes. J. Am. Soc. Hort. Sci. 127: 616–622.
 Cannon S.B., May G.D., Jackson S.A. 2009. Three sequenced legume genomes and many crop species: Rich opportunities for translational genomics. Plant Physiol. 151: 970–977.

- Cook D.R. 1999. *Medicago truncatula* – a model in the making! *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 301–304.
- Farooq S., Azam F. 2002. Molecular markers in plant breeding-I: Concepts and characterization. *Pak. J. Biol. Sci.* 5: 1135–1140.
- Gilpin B.J., McCallum J.A., Frew T.J., Timmerman-Vaughan G.M. 1997. A linkage map of the pea (*Pisum sativum* L.) genome containing cloned sequences of known function and expressed sequence tags (ESTs). *Theor. Appl. Genet.* 95: 1289–1299.
- Kumar L.S. 1999. DNA markers in plant improvement: An overview. *Biotechnol. Advances* 17: 143–182.
- Marquez A.J., Stougaard A.J., Udvardi J., Parniske M., Spink M., Saalbach H., Webb G., Chiurazzi J. 2005. *Lotus japonicus* Handbook.
- Nelson M.N., Moolhuijzen P.M., Boersma J.G., Chudy M., Lesniewska K., Bellgard M., Oliver R.P., Świącicki W., Wolko B., Cowling W.A., Ellwood S.R. 2010. Aligning a new reference genetic map of *Lupinus angustifolius* with the genome sequence of the model legume, *Lotus japonicus*. *DNA Res.* 17: 73–83.
- Tanksley S.D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 3–8.
- Tar'an B., Warkentin T., Somers D.J., Miranda D., Vandenberg A., Blade S., Woods S., Bing D., Xue A., DeKoeyer D., Penner G. 2003. Quantitative trait loci for lodging resistance, plant height and partial resistance to mycosphaerella blight in field pea (*Pisum sativum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 107: 1482–1491.
- Weeden N.F., Ellis T.H., Timmerman-Vaughan G. M., Świącicki W., Rozov S.M., Berdnikov V.A. 1998. A consensus linkage map for *Pisum sativum*. *Pisum Genetics* 30: 1–4.
- Wolko B., N.F. Weeden 1989. Estimation of *Lupinus* genome polyploidy on the basis of isozymic loci number. *Genet. Pol.* 30: 165–171.
- Zeidler M. 2000. Electrophoretic analysis of plant isozymes. *Acta Univ. Palacki. Olomuc., Fac. Rer. Nat., Biologica* 38: 7–16.

M. KNOPKIEWICZ, M. GAWŁOWSKA, W. ŚWIĄCICKI

SEARCHING FOR POLYMORPHIC SEQUENCE-DEFINED MARKERS IN THE PEA POPULATION CARNEVAL X MP1401

Summary

The linkage map of the pea population Carneval x MP1401 was published by Tar'an et al. [2003]. It consists of 193 AFLP markers, 13 RAPD markers and 1 STS marker, which are assigned to ten linkage groups. Dense genetic maps are necessary for the comparative genomics, QTL mapping and marker assisted selection. In order to fully benefit from the existing genetic maps, there is a need of common markers that will allow the comparison of the different pea maps. The main aim of this study was to find polymorphic sequence-defined markers in the RIL mapping population Carneval x MP1401. The research was conducted in the years 2011–2012. Totally 131 STS markers were analyzed. Thirteen of them were polymorphic. The rate of polymorphism was 10% in comparison to 0% of morphological polymorphism and 9.5% of isozymic polymorphism. Seven polymorphic markers (P482, UNK7, Pis_GEN_18_2_1, Pis_GEN_1_2_1, Pis_GEN_7_1-2_1, Pis_GEN_25_2-3, Q363) were tested in the whole population, and can be added to the previously published map. Furthermore comparative analysis revealed homology of 9 markers (mtmt_EST_03378_02_1, Pis_GEN_17_2_1, Pis_GEN_18_2_1, Pis_GEN_7_1-2_1, Pis_GEN_25_2-3_1, Pis_GEN_57_1-2_1, Psat_EST_00189_01_1, QOR, mtmt_GEN_01093_06_1) with *Medicago truncatula* genome, 3 markers (Pis_GEN_7_1-2_1, Pis_GEN_25_2-3_1, mtmt_GEN_01093_06_1) with *Lotus japonicus* genome and 1 marker (mtmt_EST_03378_02_1) with *Lupinus angustifolius* genome.