

Molekulární přístupy ve šlechtění
roślin
Olomouc
14. února, 2017

Charakterizace hybridních trav pomocí cytogenetických a molekulárních metod

Jan Bartoš
Ústav experimentální botaniky
Olomouc, Czech Republic

Komplex *Festuca* - *Lolium*

- *Lolium multiflorum* Lam. ($2n=2x=14$; $2n=4x=28$)
- *Lolium perenne* L. ($2x=2x=14$; $2n=4x=28$)
- *Festuca pratensis* Huds. ($2n=2x=14$; $2n=4x=28$)
- *Festuca arundinacea* Schreb. ($2n=6x=42$)

Agronomické vlastnosti	Lm	Lp	Fp	Fa
Rychlý vývoj ze semene	+++	+++	-	-
Výnos	+++	++	-	-
Stravitelnost	++	+++	++	-
Odolnost k sešlapu	-	++	-	-
Vytrvalost	-	+	+	+++
Mrazuvzdornost	-	+	+++	++
Suchovzdornost	-	-	+	++



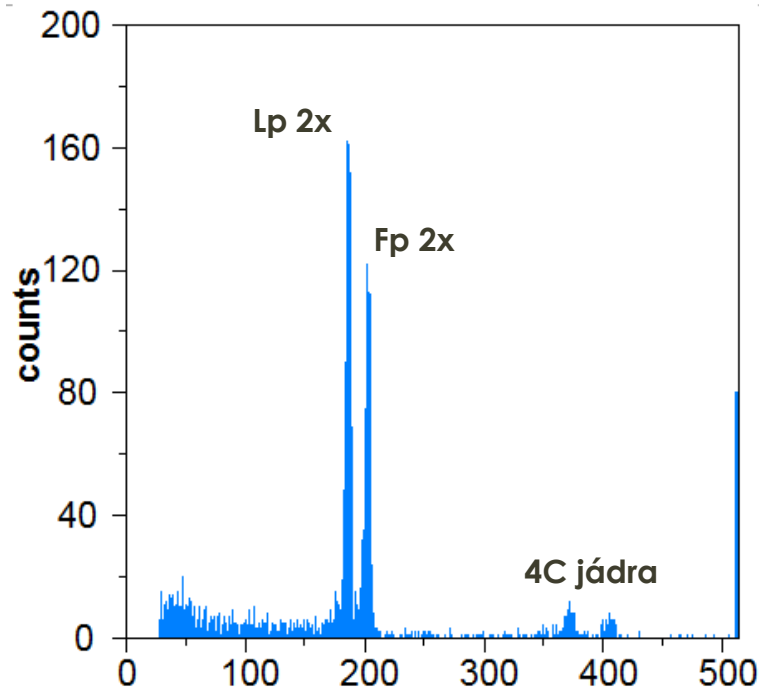
Trávy s kombinovanými vlastnostmi

- mezidruhové a mezirodové křížení
- *Lolium x Festuca* = *xFestulolium*
- 1967 – dr. Antonín Fojtík
- 1988 – registrována Felina
- 2015 – přes 50 odrůd registrovaných ve světě



Průtoková cytometrie – detekce hybridů

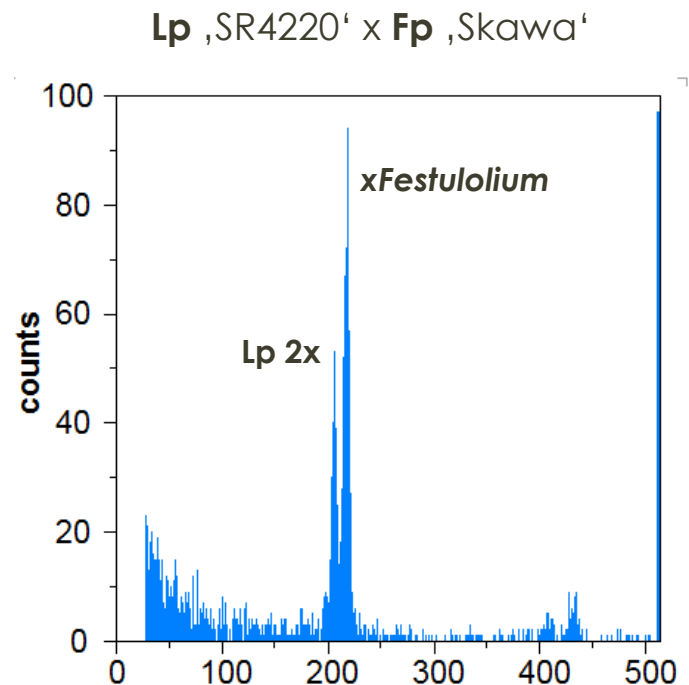
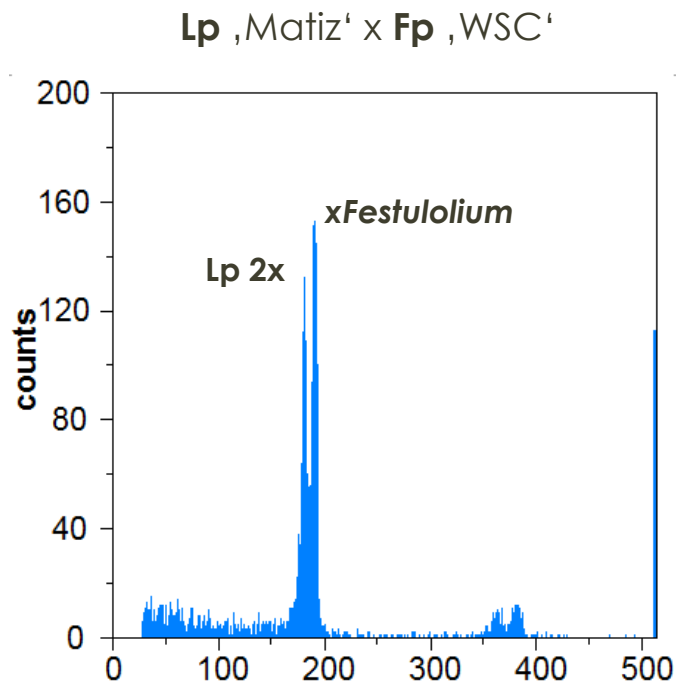
- detekce hybridů jílku vytrvalého a kostřavy luční
- stanovení obsahu DNA
 - izolace jader
 - analýza průtokovou cytometrií



- rozdíl v obsahu DNA u rodičovských druhů $\approx 8\%$

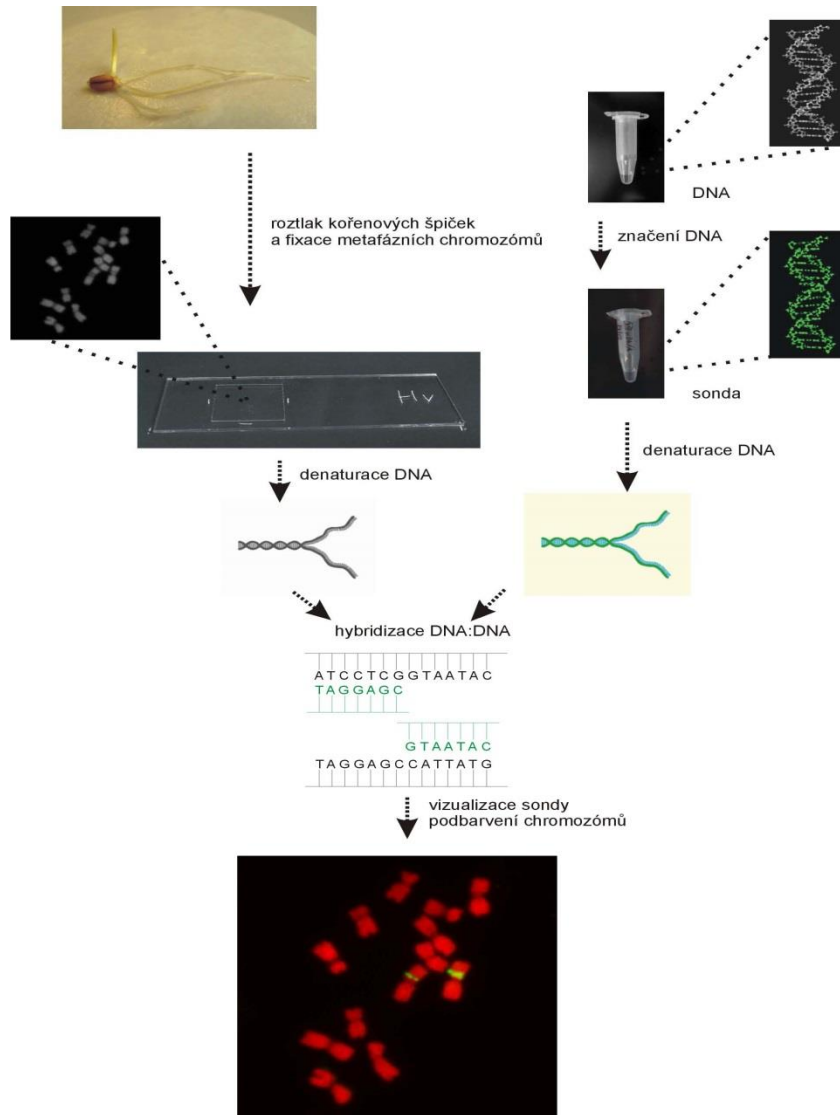
Průtoková cytometrie – detekce hybridů

- současná analýza jader jednoho z rodičů a hybridního potomka
- jako rodiče je vhodné použít mateřskou rostlinu



- hybridní rostliny úspěšně detekovány u všech křížení

Fluorescenční *in situ* hybridizace

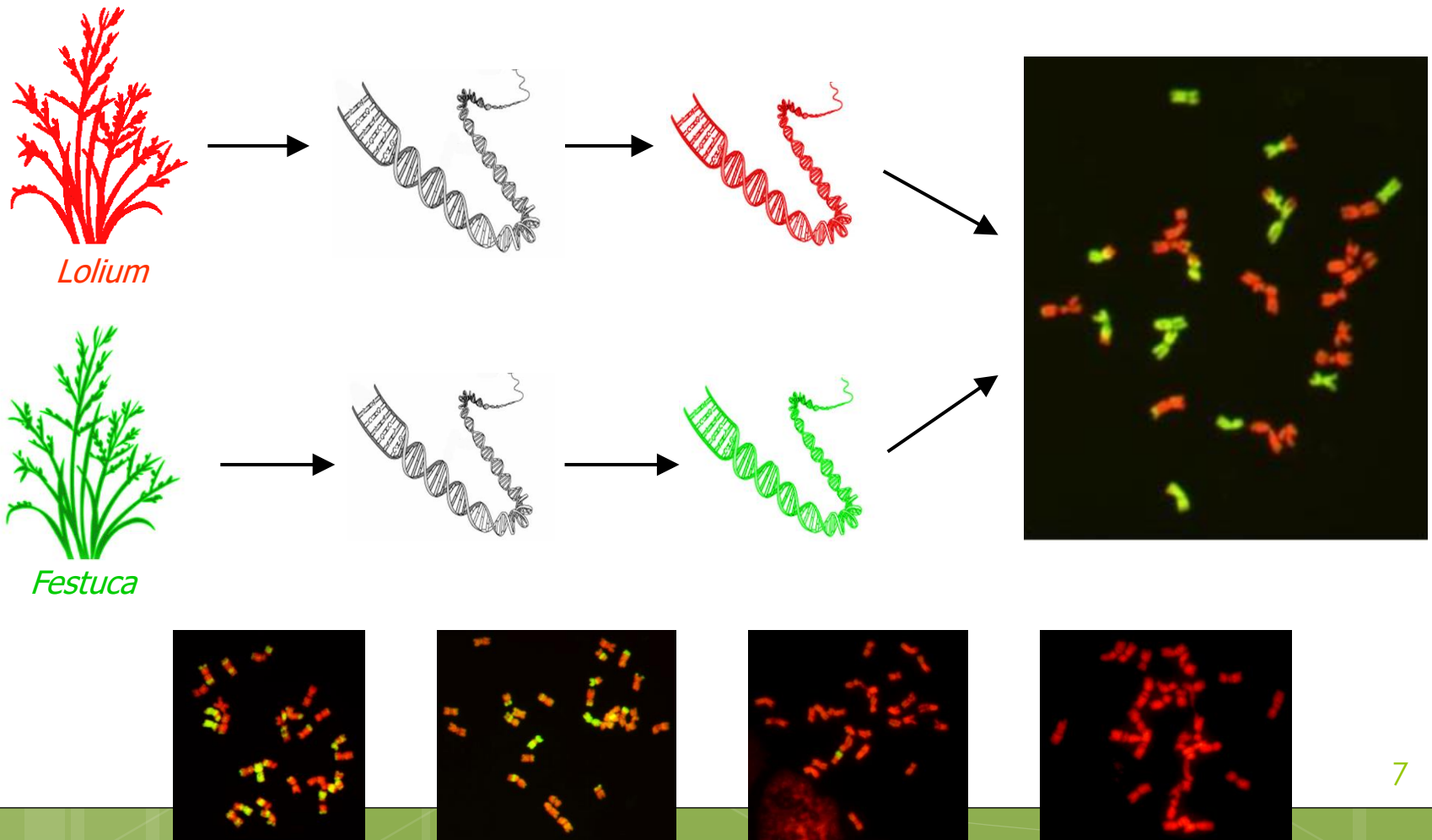


- vizualizace DNA sekvencí na chromozomech nebo jádrech

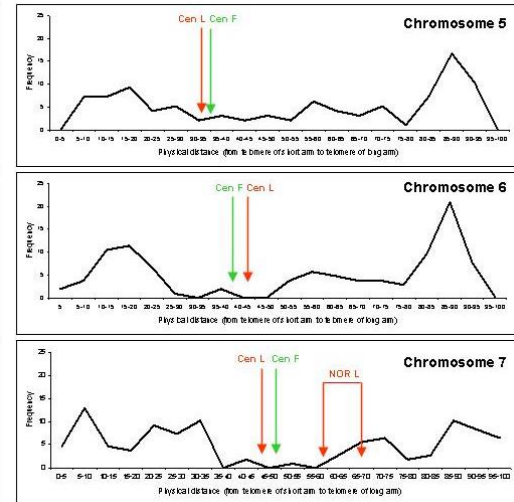
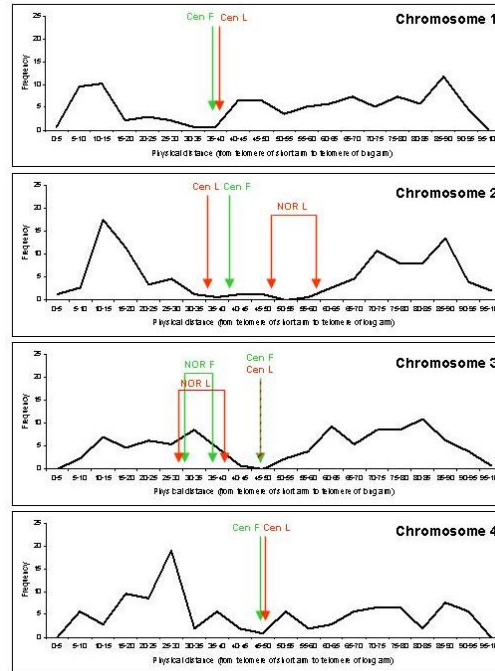
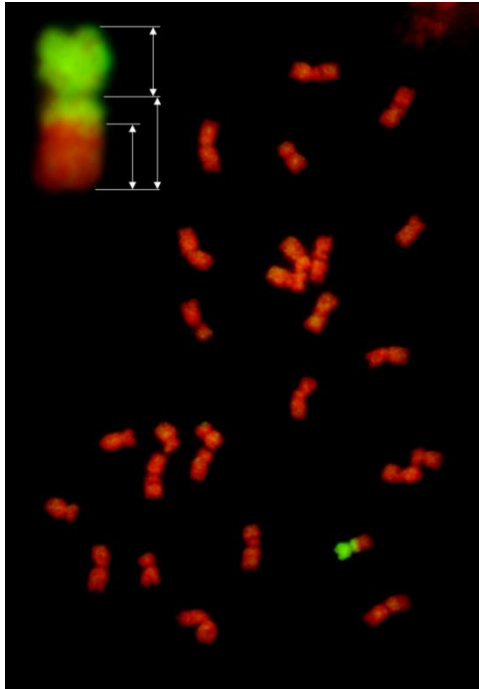


Genomová *in situ* hybridizace

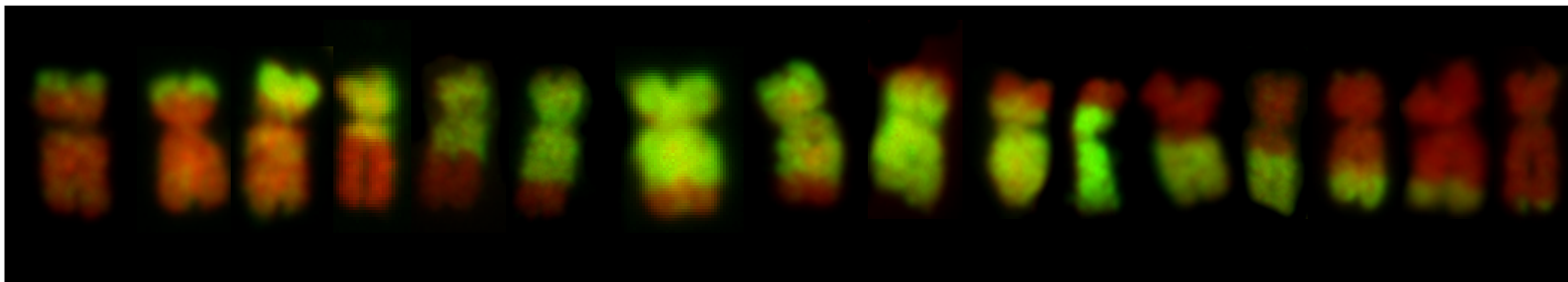
- identifikace rodičovské DNA v mezidruhových hybridech
- sonda – veškerá genomická DNA



Distribuce homoeologních rekombinací

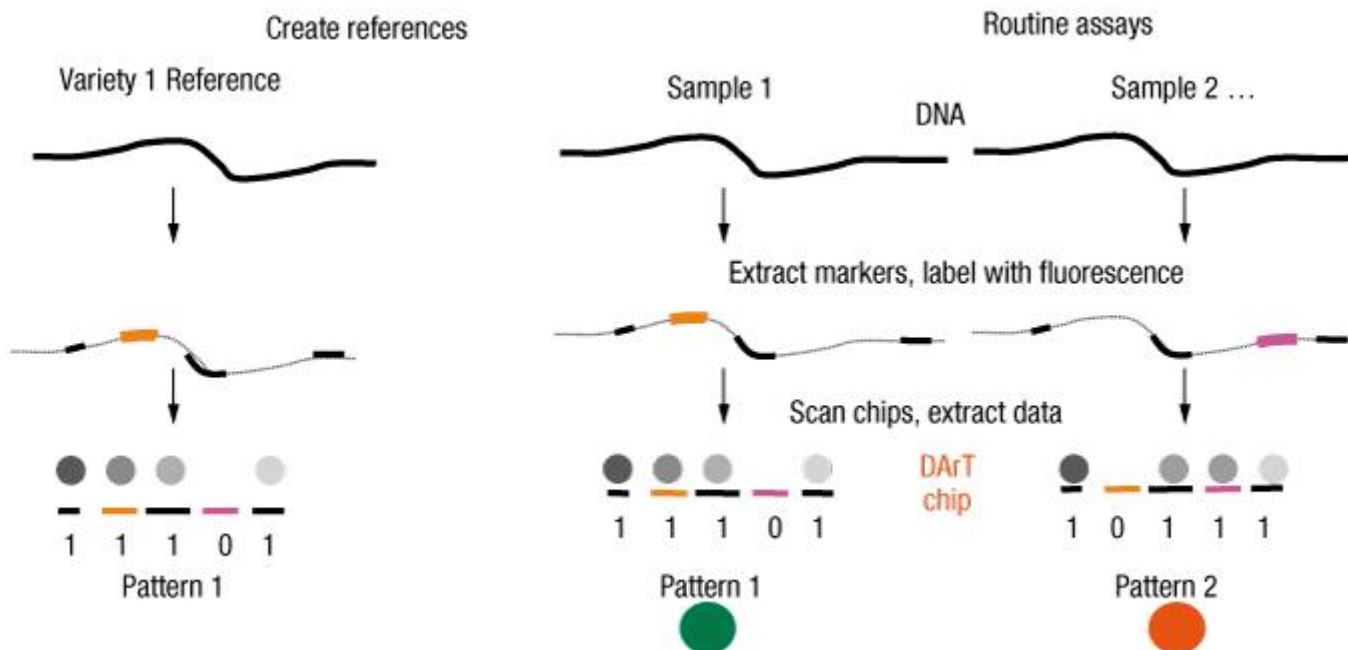


o přenos libovolného fragmentu je možný



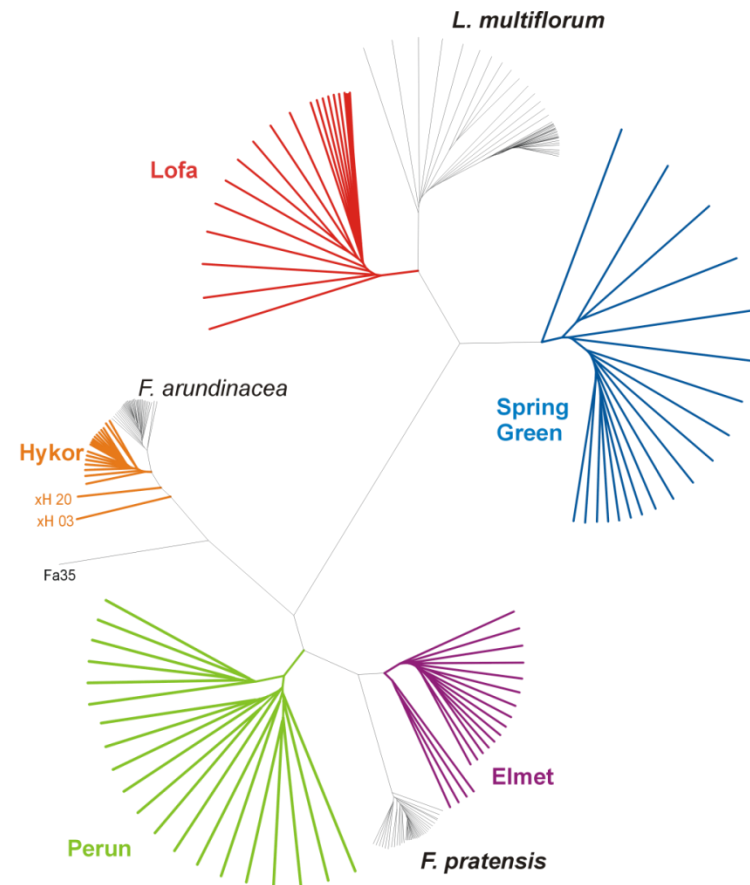
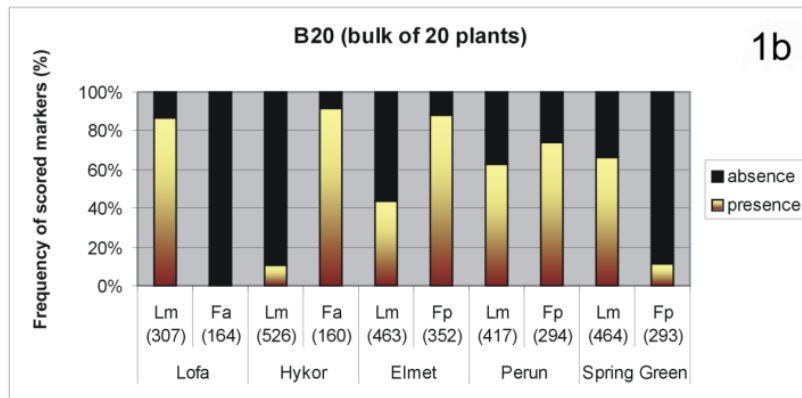
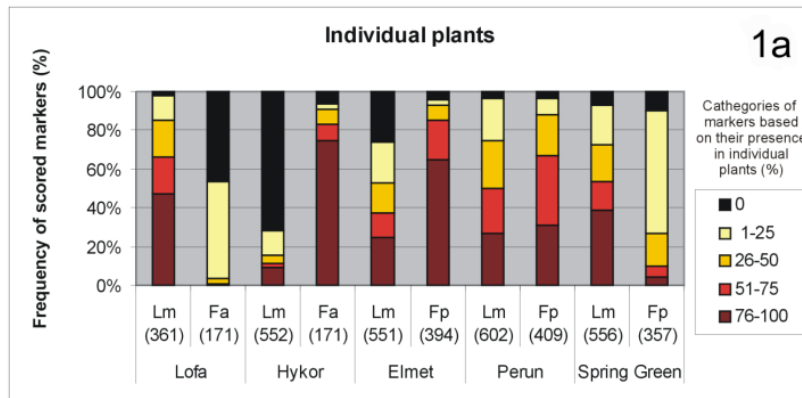
Molekulární markery - DArT

- DArT = Diversity Arrays Technology (www.diversityarrays.com)
- pro vývoj není nutná znalost sekvenace
- tisíce markerů v jedné reakci
- cena $\approx 1\,000$ Kč/vzorek



Genetická variabilita a genomové složení

- analýza čistých druhů – druhově/rodově specifické markery
- detekce markerů v jednotlivých hybridech



Molekulární markery - SNP

- polymorfismus jednotlivých nukleotidů
 - nejčastější typ polymorfismu
 - vývoj sekvenováním/resekvenováním různých genotypu
 - v našem případě jsem sekvenovali transkriptom jílku mnohokvětého a kostřavy luční
-
- RNA byla připravena z listů
 - 2x100bp čtení
-
- 20 vzorků pro druh
-
- **15 – 73 milionů čtení na vzorek**



Identifikace SNP

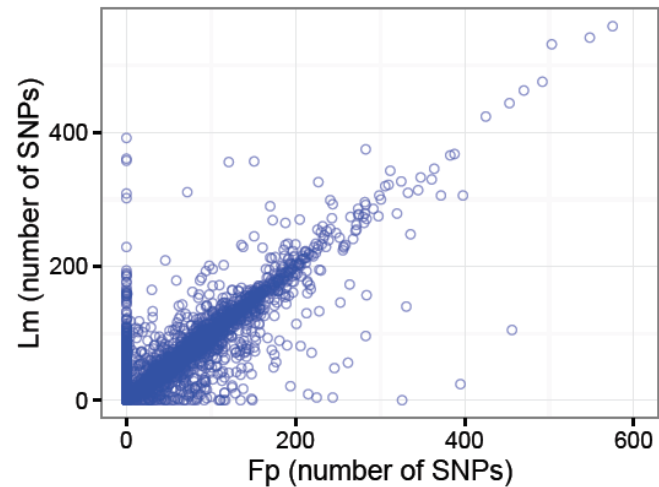
- mapování sekvenačních čtení na transkriptom

referenční transkript

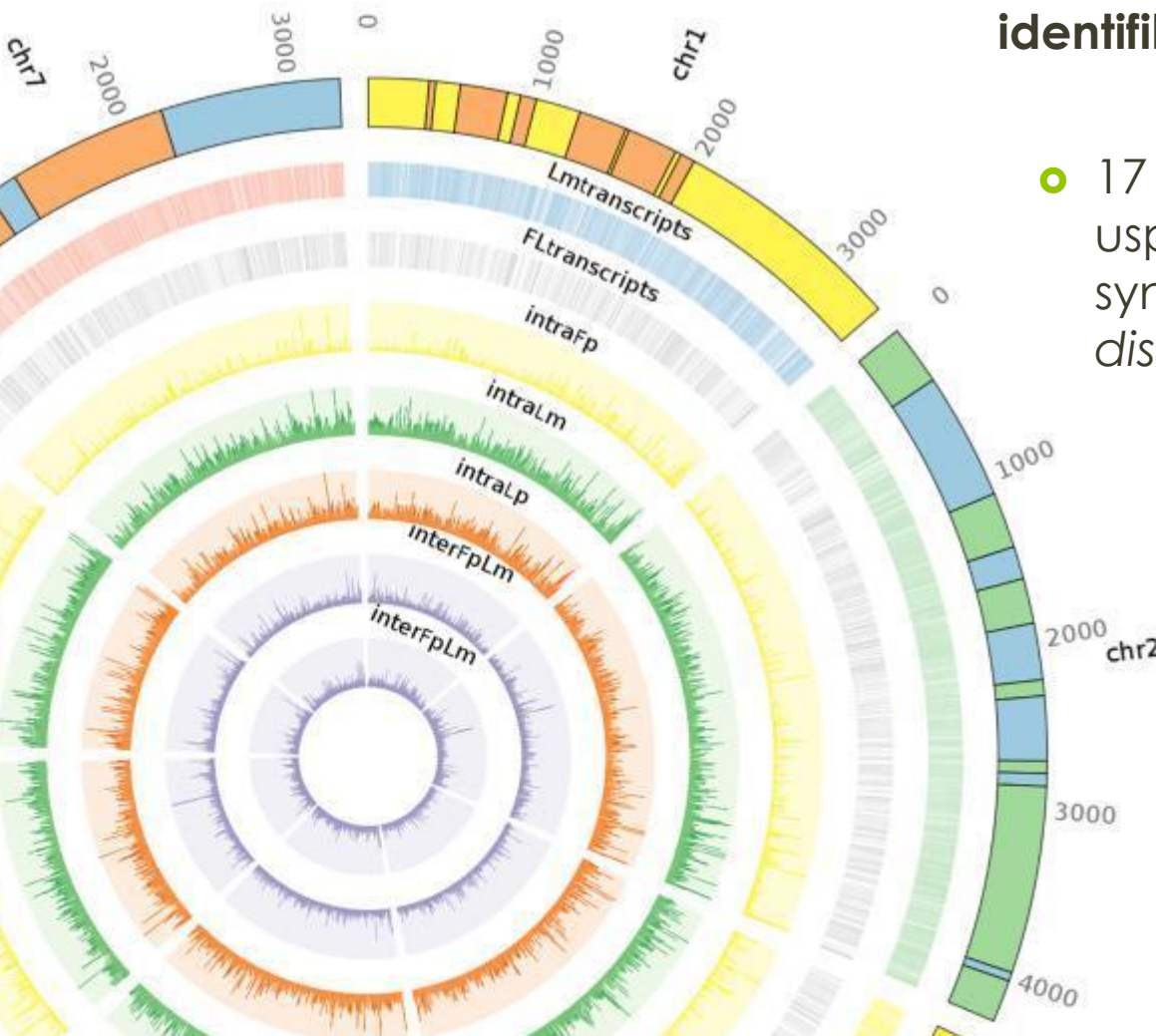


diagnostický T/C SNP

- malé rozdíly při použití jílek a kostřavy jako reference



Přiřazení transkriptů a SNP na chromozomy



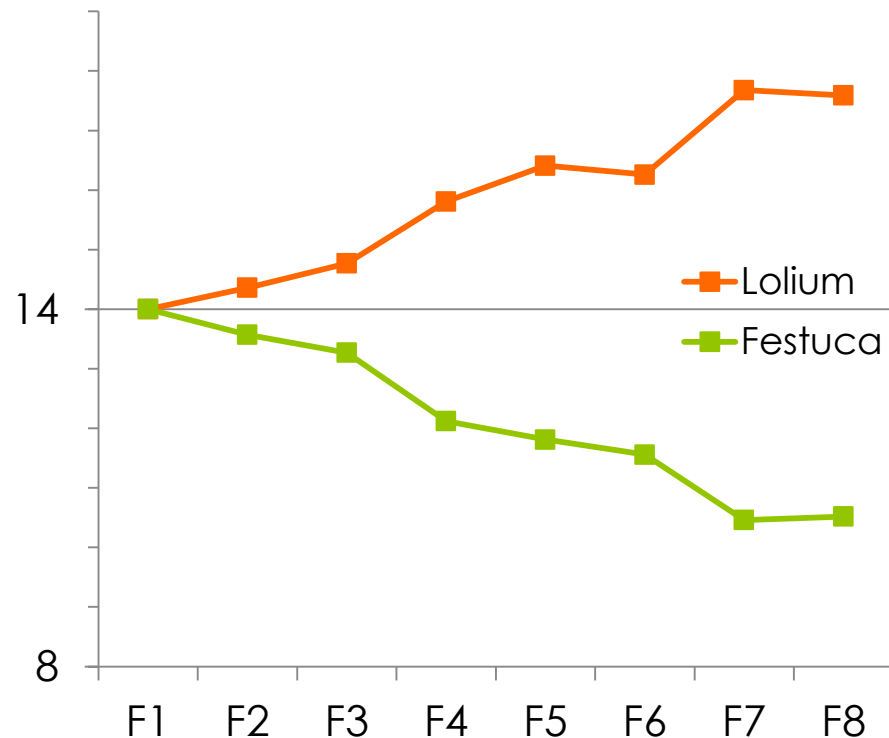
- 21 992 mezidruhových SNP identifikováno v 4 554 genech

- 17 768 transkriptů uspořádáno na základě syntenie jílku vytrvalého s *B. distachyon*

- využití pro identifikaci hybridů a studium exprese genetické informace

Eliminace genomu košťavy ve Festuloliích

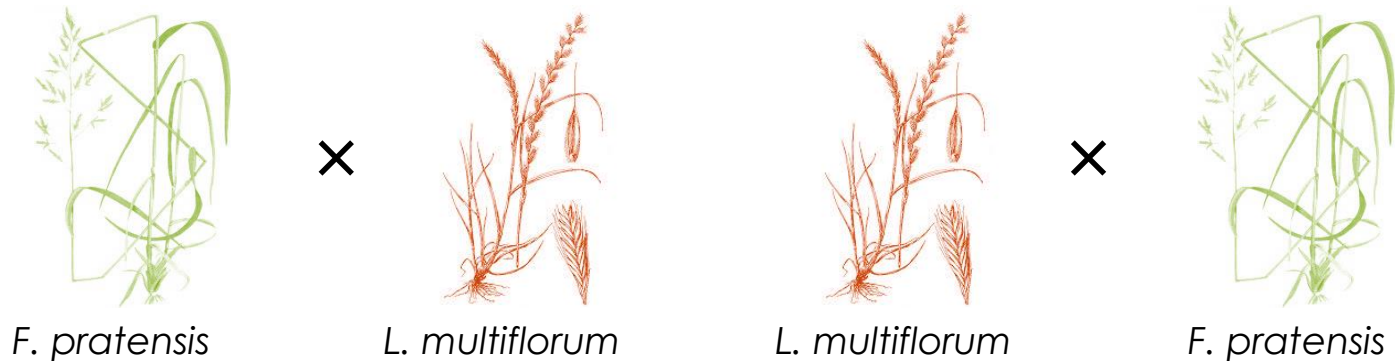
- *Lolium* dominuje ve všech komerčních amfiploidních kultivarech
- Eliminace chromosomů košťavy byla pozorována u následných generací *Festulolií*



Rostlinný materiál pro studium exprese

- reciproké křížení mezi tetraploidem *F. pratensis* cv. „Westa“ a tetraploidem *L. multiflorum* cv. „Mitos“

Rodiče



F1 hybridi

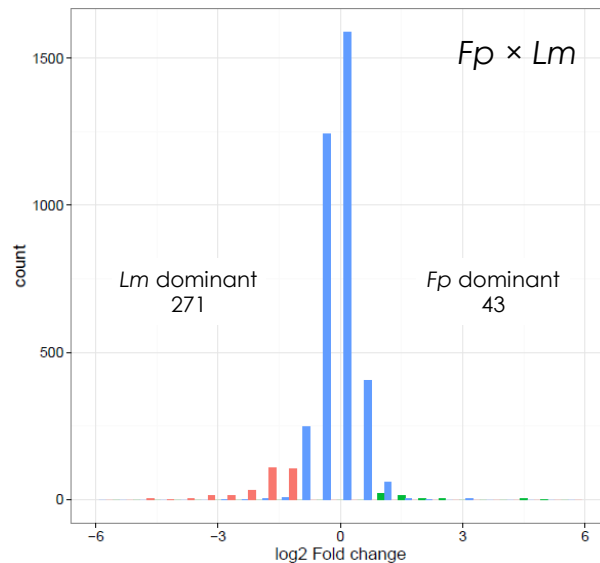
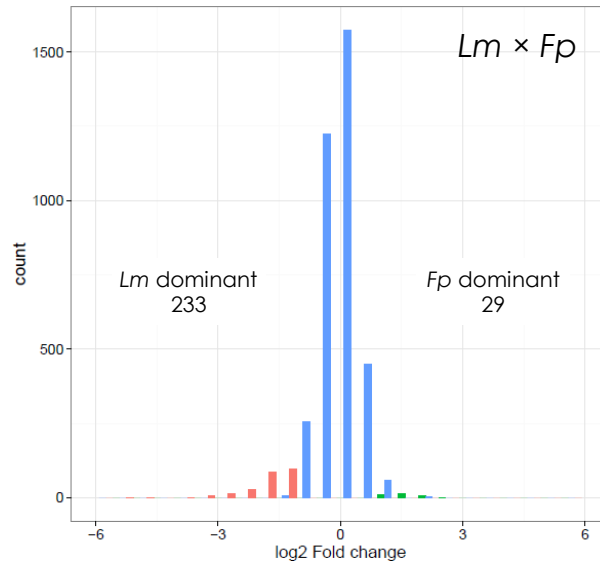


F2 hybridi

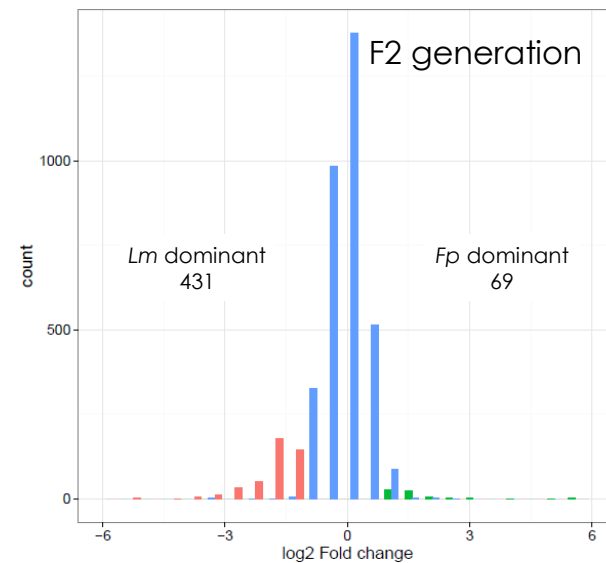


neprodukují semena

Alelově specifická exprese u hybridů



- analyzováno okolo 3 800 genů
- $\approx 7 - 8\%$ genů exprimováno preferenčně z jedné alely
 - fold change > 2
 - $P < 0.05$
- jílek dominuje v F1 potomstvu u obou křížení



Závěr

- cytogenetické a molekulární techniky se mohou uplatnit při šlechtění rostlin
- GISH a molekulární markery usnadňují identifikaci hybridních rostlin
- rychlejší výběr vhodných rostlin pomocí molekulárních markerů
- při šlechtění hybridů může docházet k posunu směrem k jednomu z rodičů
- přenos genetické informace na potomstvo, neznamená vždy i její vyjádření

Poděkování

- Ústav experimentální botaniky, Olomouc
 - Jaroslav Doležel, David Kopecký
- DLF, Hladké Životice
 - Vladimír Černoch
- University of California, Riverside, USA
 - Adam Lukaszewski, James Baird
- ILVO, Melle, Belgie
 - Tom Ruttink
- ETH, Zurich, Švýcarsko
 - Bruno Studer
- Institute of Plant Genetics, Poznań, Polsko
 - Zbigniew Zwierzykowski
- Norwegian University of Life Sciences, Ås, Norsko
 - Odd Arne Rognli
- Grantová agentura ČR
- Ministerstvo školství, mládeže a tělovýchovy
- Ministerstvo zemědělství

