

WYNIKI

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2017 roku Genetyczne podłoże męskiej sterylności pszenżyta z różnymi cytoplazmami oraz możliwość wykorzystania badanych cytoplazm do tworzenia systemów CMS u pszenicy

Temat badawczy 1

Wytworzenie populacji mapujących i mapowanie porównawcze genów kontrolujących męską płodność w różnych cytoplazmach sterylizujących pszenżyta.

Wyniki (opisać)

W doświadczeniu zlokalizowanym w Prusach koło Krakowa, populacje F₂, dla kolejnych cytoplazm T, P, A, V (tab. 1) reprezentowane były odpowiednio przez 203, 215, 230 i 195 roślin. Ocenę roślin prowadzono w czasie kwitnienia i weryfikowano na podstawie zawiązania ziaren w 5 zaizolowanych kłosach.

Tabela 1. Liczba i procent (w nawiasie) roślin w poszczególnych klasach męskiej płodności u mieszańców F₂, otrzymanych z krzyżowania 4 linii męskosterylnych: cms Salvo 15/1, cms Baltiko 1, cms Zorro 1 i cms Salvo 15/1, odpowiednio w cytoplazmach: T – *T. timopheevi*, P – *Pampa*, A – *A. sharonensis*, V – *Ae. ventricosa* z linią przywracającą płodność DAD 282/00 – Prusy 2017

Cytoplazma	Klasa męskiej płodności				
	1	2	3	4	5
T	52 (25,6)	33 (16,3)	27 (13,3)	28 (13,8)	63 (31,0)
P	39 (18,1)	41 (19,1)	11 (5,1)	16 (7,4)	108 (50,2)
A	91 (39,6)	26 (11,3)	20 (8,7)	20 (8,7)	73 (31,7)
V	62 (31,8)	31 (15,9)	9 (4,6)	12 (6,2)	81 (41,5)

Klasa męskiej płodności według średniego zawiązania ziaren na kłos pod izolatorem:

- 1: 0
- 2: 0,1 – 9,9
- 3: 10,0 – 19,9
- 4: 20,0 – 29,9
- 5: powyżej 30,0

W obrębie każdej populacji obserwowano zróżnicowaną liczbę ziaren z kłosa, zawiązanych pod izolatorami pojedynczych roślin. Na tej podstawie przyporządkowano rośliny do poszczególnych klas męskiej płodności. Z wyjątkiem populacji z cytoplazmą P najliczniejsze były skrajne klasy męskiej płodności, tj. 1 i 5 (tab. 1). W populacjach z cytoplazmą T, P i V największy udział, stanowiły rośliny w pełni męskopłodne (klasa 5). W populacji z cytoplazmą A najwięcej było roślin w pełni męskosterylnych, a drugą pod względem liczebności była grupa roślin w pełni męskopłodnych. W żadnej z populacji otrzymany rozkład cechy nie jest zbliżony do rozkładu normalnego

Tabela 2. Liczba i procent (w nawiasie) roślin w poszczególnych klasach męskiej płodności u mieszańców F₂, otrzymanych z krzyżowania 4 linii męskosterylnych: cms Salvo 15/1, cms Baltiko 1, cms Zorro 1 i cms Salvo 15/1, odpowiednio w cytoplazmach: T – *T. timopheevi*, P – *Pampa*, A – *A. sharonensis*, V – *Ae. ventricosa* z linią przywracającą płodność DAD 282/00 – Szczecin 2017

Cytoplazma	Klasa męskiej płodności				
	1	2	3	4	5
T	87 (38,8)	55 (24,6)	57 (25,4)	25 (11,2)	0 (0,0)
P	6 (2,3)	116 (44,6)	57 (21,9)	77 (29,6)	4 (1,5)
A	22 (9,8)	157 (69,8)	23 (10,2)	22 (9,8)	1 (0,4)
V	125 (50,6)	68 (27,5)	42 (17,0)	12 (4,9)	0 (0,0)

Wyniki oceny fenotypowej wykonanej w Szczecinie dla tych samych kombinacji mieszańców z czterema cytoplazmami (tab.2) dość znacząco różniły się od rezultatów z Prus. Rośliny zaliczane do najlepiej pylących, które w Prusach stanowiły w każdej z badanych populacji znaczącą część populacji, w Szczecinie identyfikowane były sporadycznie. Największy odsetek roślin z głębokimi objawami męskiej sterylności odnotowano w populacjach z cytoplazmami V i T. Cytoplazma A, która w Prusach była najefektywniejsza w indukowaniu męskiej sterylności, w Szczecinie też wywoływała sterylność większości roślin, ale stopień degenracji pylników nie był tak głęboki i prawie 70% populacji zakwalifikowano do klasy 2 (tab.2). W cytoplazmie Pampa najliczniej reprezentowane były rośliny w klasach fenotypowych 2 i 4 (męskosterylne i męskopłodne, ale z nie w pełni wyrażoną cechą). Podobnie jak w doświadczeniu przeprowadzonym w Prusach – żaden z rozkładów fenotypowych nie wykazywał zgodności z rozkładem normalnym, ale nie wskazywał też na dziedziczenie monogeniczne.

Analizami DArTseq objęto trzy rodzicielskie linie wsobne (dwie męskosterylne: CMS-Salvo 15/1 T, CMS-Baltiko P i wspólną dla obu populacji linię ojcowską DAD282/00). Oceniono też 91 genotypów populacji F2 mieszańca CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00 i 93 osobniki populacji CMS-Baltiko P x DAD282/00. Dla obu badanych populacji uzyskano dane obejmujące wyniki oceny genotypów przy użyciu prawie trzynastu tysięcy markerów SNP (tab.3).

Tabela 3. Markery DArTseq-SNP w populacjach mapujących pszenżyta

Wyszczególnienie	Populacja mapująca F2	
	CMS-Baltiko P x DAD282/00	CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00
Ogólna liczba markerów SNP	12968	12968
Liczba markerów różnicujących linie rodzicielskie	2865	3588
Liczba markerów segregujących w populacji mapującej	2697	3360
Liczba markerów zaliczonych do 21 największych grup sprzężeń	1995	2218
Liczba markerów zmapowanych	1381	1336

Dla pary linii rodzicielskich tworzących populację mapującą z cytoplazmą Pampa (linie CMS Baltiko P i DAD282/00) zidentyfikowano 2865 markerów SNP różnicujących, spośród których większość (prawie 2700) segregowało w badanej populacji mapującej mieszańca F2 (tab.3). Łączenie markerów w grupy sprzężeń wykonano przy wartości krytycznej LOD=15. Przy tej wartości LOD około 74% segregujących markerów połączyło się w 21 dużych grup sprzężeń. Genom pszenżyta zawiera 21 par chromosomów, więc uzyskaną liczbę grup sprzężeń przyjęto za zgodną z oczekiwaniami. Pozostałe markery były niesprężone lub tworzyły małe grupy sprzężeń liczące kilka – kilkanaście markerów. Do konstruowania map genetycznych użyto 1995 markerów (tab.3) tworzących 21 największych grup sprzężeń liczących od 24 do 297 markerów (tab.4). W najliczniejszych grupach sprzężeń część markerów nie została umieszczona na mapach chromosomów – ostatecznie mapy genetyczne (ryc.1-3) zawierają 1381 markerów (tab.3). Grupa sprzężeń nr 17 zawierała najmniej markerów (24) i była najkrótsza (37,5cM) (tab.4, ryc.3). Najwięcej markerów (154) zawiera mapa grupy sprzężeń 16 (tab.4, ryc.2), pomimo że jej długość jest stosunkowo krótka (48,5cM). Najdłuższa mapa została utworzona dla chromosomu reprezentowanego przez grupę sprzężeń nr 11 – długość mapy przekracza 130cM. Mapa ta zawiera zaledwie 49 markerów, ale pochodzą one z jednej z najliczniejszych grup sprzężeń (tab.4), ale w procesie mapowania większość markerów nie została umiejscowiona na mapie (ryc.2).

Liczba markerów różnicujących linie rodzicielskie populacji z cytoplazmą *T. timopheevi* wynosiła 3588 i była nieco większa niż dla pary CMS-Baltiko P i linii DAD282/00 (tab.3). Większość markerów segregowała w populacji mapującej F2. Ze względu na większą ilość markerów, zastosowano nieco większe wartości LOD przy tworzeniu grup sprzężeń – w

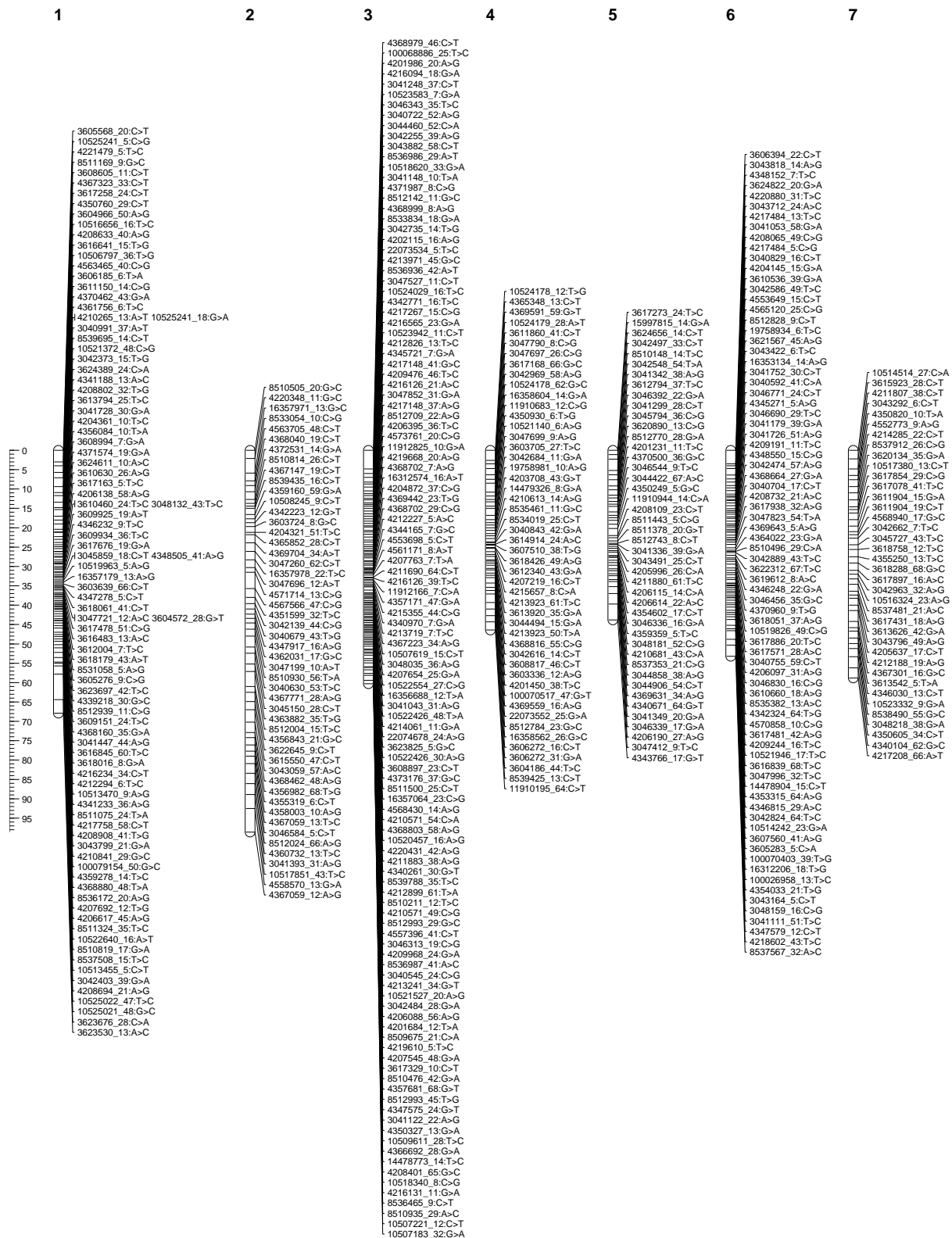
zależności od grupy wartość ta wynosiła od 15 do 20. Przy tych parametrach statystycznych, około 66% markerów segregujących zostało przydzielonych do 21 dużych grup sprzężeń (tab.3). Utworzone grupy sprzężeń dla populacji [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2 (tab.5) liczyły od 41 (grupa 21) do 251 (grupa 5) markerów. Podobnie jak przy mapowaniu populacji z cytoplazmą Pampa, w najliczniejszych grupach sprzężeń utworzone mapy nie zawierały wszystkich markerów (tab.5) – zaledwie 27 markerów zawiera mapa grupy nr 8, a mapa grupy nr 1 zawiera najwięcej markerów – 124 (tab.5, ryc.4-6). Najkrótsza jest mapa grupy sprzężeń o numerze 6 (33,2cM), a najdłuższa mapa grupy 14 (112,4cM).

Tabela 4. Grupy sprzężeń w populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2

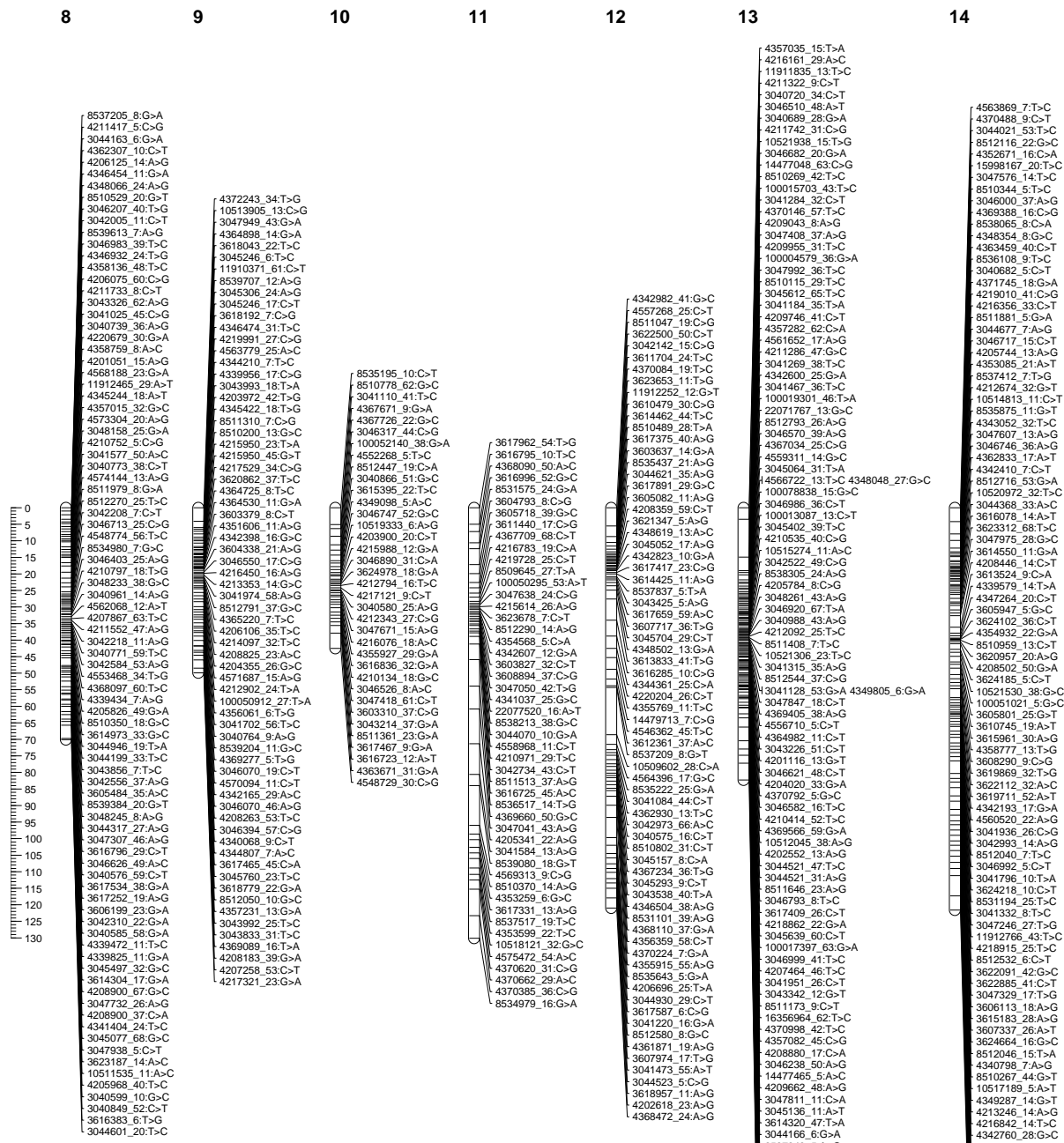
Grupa sprzężeń	Liczba markerów zaliczonych do grupy	Liczba markerów na mapie sprzężeń	Długość mapy [cM]
1	92	92	67.9
2	50	50	98.6
3	116	116	60.3
4	49	49	46.4
5	44	44	43.8
6	78	78	53.2
7	38	38	58.8
8	88	88	70.1
9	68	68	49.9
10	36	36	42.5
11	275	49	130.1
12	266	71	121.0
13	117	117	82.3
14	297	104	121.6
15	26	26	37.7
16	154	154	48.5
17	24	24	37.5
18	64	64	50.4
19	41	41	68.3
20	34	34	59.8
21	38	38	67.1

Tabela 5. Grupy sprzężeń w populacji mapującej [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2

Grupa sprzężeń	Liczba markerów zaliczonych do grupy	Liczba markerów na mapie sprzężeń	Długość mapy [cM]
1	124	124	47.8
2	117	117	52.8
3	64	64	93.2
4	55	55	70.9
5	251	28	46.0
6	187	28	33.2
7	64	64	55.4
8	188	27	38.2
9	53	53	61.8
10	144	49	74.9
11	94	94	62.7
12	56	56	49.8
13	187	35	39.8
14	99	99	112.4
15	149	57	106.1
16	40	40	44.1
17	59	59	72.3
18	49	49	50.4
19	84	84	50.3
20	113	113	59.2
21	41	41	98.2



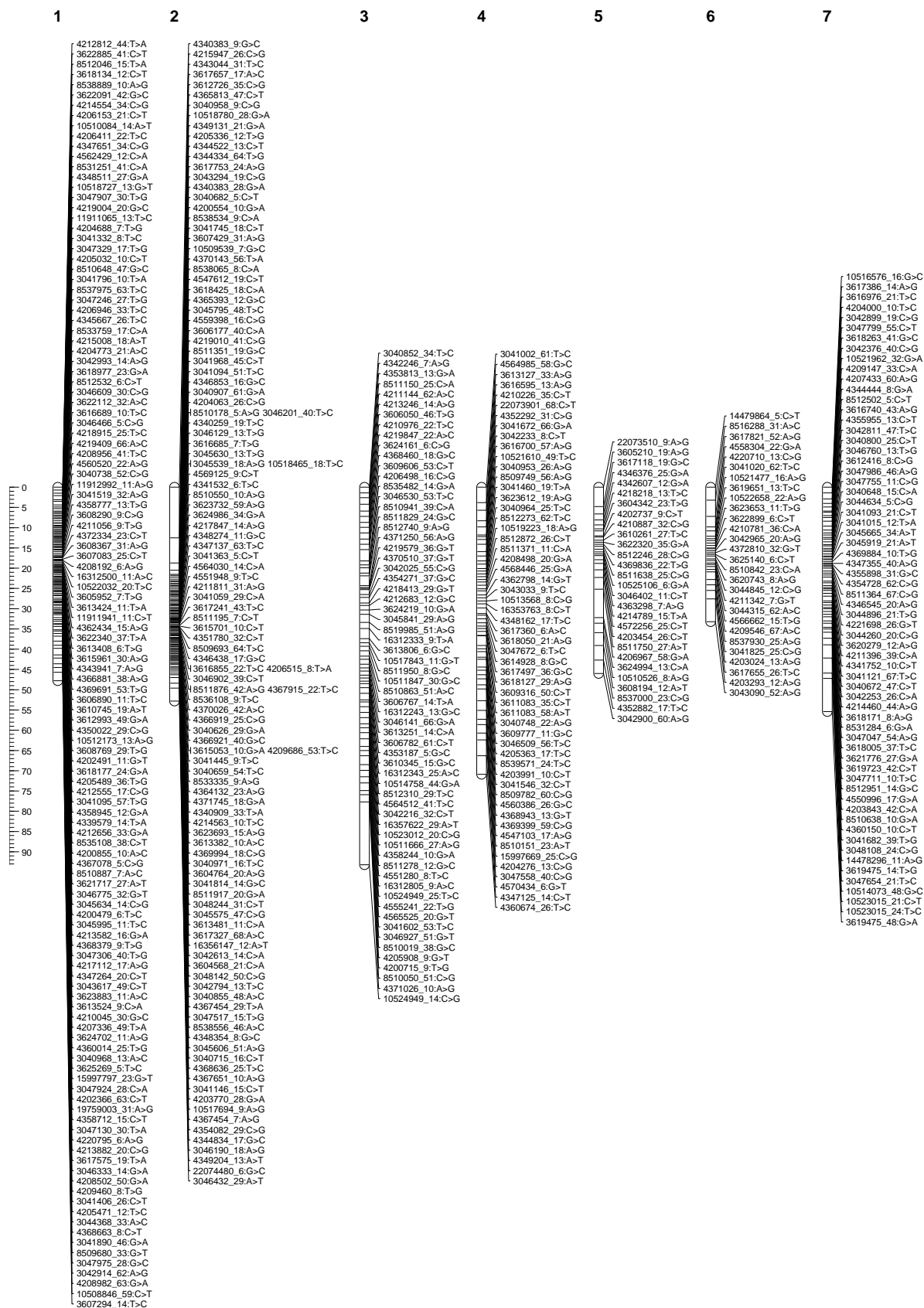
Ryc.1 Mapy genetyczne grup sprzężeń 1-7 dla populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2



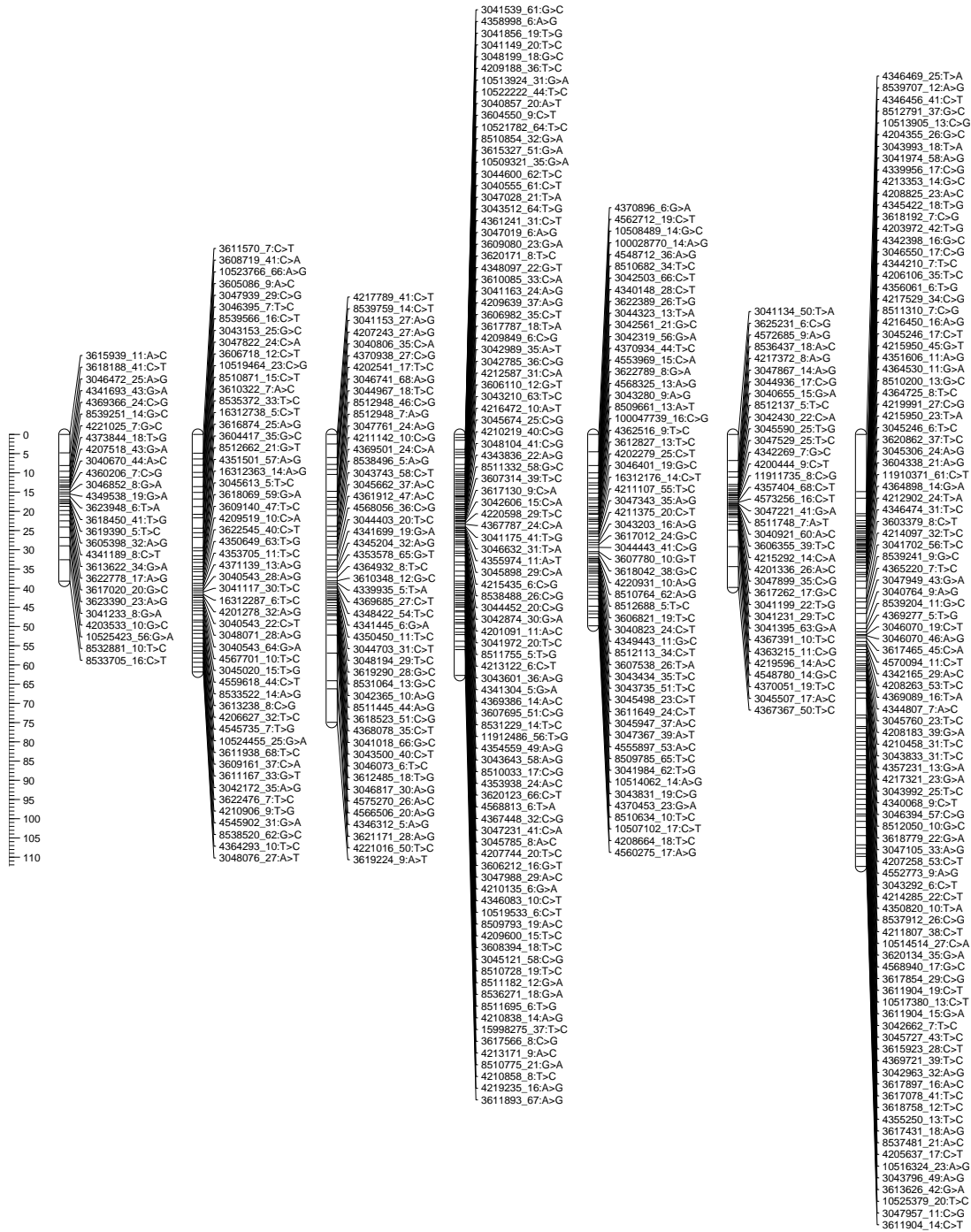
Ryc.2 Mapy genetyczne grup sprzężeń 8-14 dla populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2



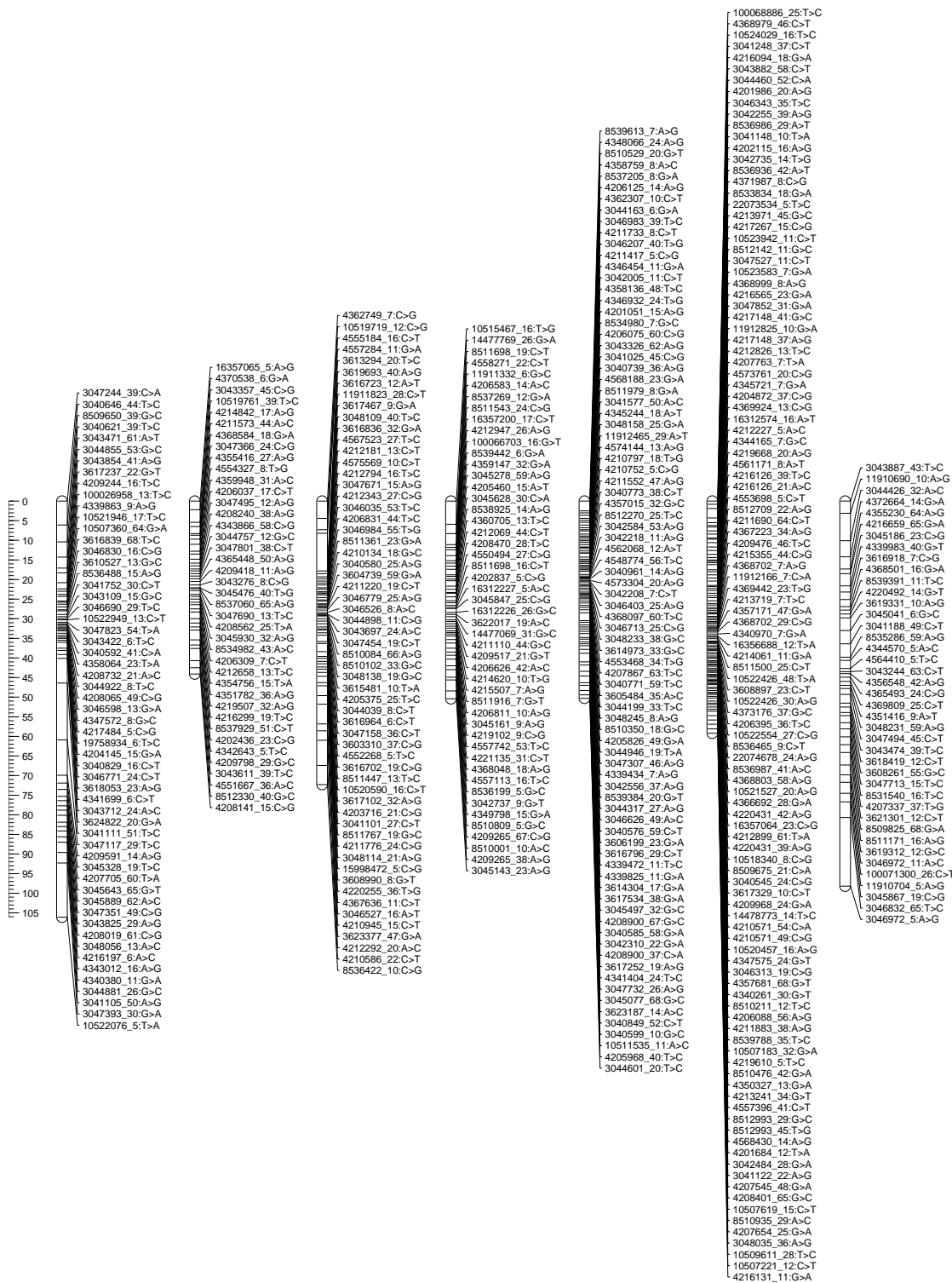
Ryc.3 Mapy genetyczne grup sprzężeń 15-21 dla populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2



Ryc.4 Mapy genetyczne grup sprzężeń 1-7 dla populacji mapującej [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2



Ryc.5 Mapy genetyczne grup sprzężeń 8-14 dla populacji mapującej [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2



Ryc.6 Mapy genetyczne grup sprzędzeń 15-21 dla populacji mapującej [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2

Wyniki oceny fenotypowej mieszańca [CMS-19 x Stan I]F₂ w dwóch wersjach cytoplazmatycznych (z cytoplazmami T i Pampa) ujawniły wysoką efektywność amerykańskiej linii StanI w przywracaniu płodności u pszenżyta z cytoplazmą T (tab.6). Wśród 50 ocenionych roślin pokolenia F₂ nie było żadnej zakwalifikowanej do klasy 1, a 80% populacji mieściło się w dwóch klasach płodności: 4 i 5. Jednocześnie StanI był słabym restorerem dla cytoplazmy P – większość populacji (ponad 80%) została oceniona w kategoriach 1 i 2, czyli męskosterylnych z mniej lub bardziej intensywnie wyrażonymi objawami męskiej sterility.

Tabela 6. Liczba roślin w poszczególnych klasach męskiej płodności u mieszańców F₂, otrzymanych z krzyżowania dwóch wersji linii CMS-19 (z cytoplazmami T i P) z restorerem StanI – Szczecin 2017

Cytoplazma	Klasa męskiej płodności				
	1	2	3	4	5
T	0	2	8	34	6
P	14	32	4	4	0

Temat badawczy 2

Identyfikacja przydatnych dla hodowli markerów molekularnych wykazujących sprzężenie z genami kontrolującymi męską płodność u pszenżyta z cytoplazmami *T. timopheevi*, CMS-Pampa. Weryfikacja skuteczności tych markerów w obrębie różnych genetycznie mieszańców.

Wyniki (opisać)

Spośród par starterów wybranych w 2016 roku (por. sprawozdanie 2016), wszystkie generowały produkty polimorficzne w obrębie obu analizowanych populacji F₂. Większość roślin pokolenia F₂ charakteryzowała się obecnością produktu / ów charakterystycznego tylko dla jednej z form rodzicielskich, ale były też takie które posiadały produkty obu form rodzicielskich (tab.7).

Tabela 7. Wielkości polimorficznych fragmentów mikrosatelitarnych [pz] amplifikowanych z użyciem 4 wybranych par starterów SSR w obrębie dwóch populacji mapujących

CMS-19T x Bolero (MTP 161107 DBT)					CMS-19P x Bolero (MTP 161107 DBP)				
Rodzice i nr rośliny F ₂	SWES 217	SWES 209	SWES 131	SWES 135	Rodzice i nr rośliny F ₂	SWES 217	SWES 209	SWES 131	SWES 135
CMS 19T-♀	182	306	239,249	404	CMS 19P-♀	182	306	239,249	404
Bolero-♂	188	315	239	413	Bolero-♂	188	315	239	413
1	188	315	239	404	1	182	306,315	239	413
2	182	306,315	239	404	2	188	306,315	249	404
3	182	306,315	249	413	4	182	306,315	239,249	?
4	182	306,315	239,249	404	5	188	315	239,249	404
5	182	306,315	249	404	6	182	306,315	239,249	404
6	182	306	249	404	7	182	306,315	239,249	413
7	182	306	249	404	8	182	?	249,239	404
8	188	315	239,249	404	9	182	306,315	249	404
9	182	306,315	249	404	10	188	306,315	239	404
10	182	306,315	239,249	404	11	182	306,315	239,249	413
12	182	306,315	249	413	12	188	306,315	249	404
14	188	315	239	413	13	182	306,315	239,249	413
15	182	306	239	404	14	182	306,315	239,249	404
16	188	306,315	239	413	15	182	306,315	249	404
17	188	306,315	239,249	413	16	182	306,315	239	413
18	188	306,315	239,249	404	17	182	306,315	239,249	413

19	182	306,315	249	404	18	182	306,315	239,249	413
21	182	306,315	239	413	19	182	306,315	239,249	404
22	182	306,315	239	404	20	182	306,315	239	413
23	182	306	239	404	21	188	315	239	413
24	182	315	239,249	404	22	182	306,315	239,249	404
25	182	306	239,249	413	23	182	306,315	239,249	413
26	188	306,315	239,249	413	24	182	306,315	239,249	413
27	182	315	249	404	25	182	306,315	239	413
28	182	306,315	239	404	26	182	306,315	239,249	413
30	188	306,315	239	404	27	182	306,315	239,249	413
31	188	315	239	413	28	182	306,315	239	413
32	182	306,315	239	413	30	182	306	249	404
33	182	306,315	239	413	31	182	306	239,249	404
34	188	306	239	413	32	182	306,315	239,249	413
35	188	306,315	239	413	33	182	306,315	239	413
38	188	306	249	404	34	182	306,315	239,249	404
39	188	306	249	404	35	188	315	239,249	404
40	182	306,315	239,249	404	37	182	306,315	239,249	404
41	182	306,315	239,249	413	38	182	306,315	239,249	404
42	182	306	239	413	39	182	306,315	239	404
43	182	306	239,249	404	40	182	306,315	239,249	404
44	182	315	239	413	41	182	306,315	239,249	413
45	182	306,315	239	404	42	188	315	239,249	404
46	188	306	239	413	43	182	306	239	404
47	182	315	239,249	404	44	188	315	239,249	404
48	182,188	306	239	404	45	182	306,315	239,249	413
49	182	306	239	413	46	182	306	239	413
50	182	306,315	249	404	47	182	306	249	413
51	182	306	249	413	48	182	306	239,249	413
52	188	306,315	249	413	49	182	306	239,249	413
53	182	306,315	239	413	50	182	306,315	239,249	413
54	182	306,315	249	413	51	182	?	239,249	413
55	182	306	239	413	52	182	306,315	239,249	413
56	188	315	239,249	413	53	182	306,315	249	404
57	182	306,315	249	404	54	182	?	239,249	?
58	182	306	239	413	56	182	306	239,249	413
59	?	306,315	239,249	413	57	182	306,315	239,249	413
60	182	?	239	413	58	182	306,315	249	413
61	182	306	239	404	59	182	306,315	239,249	404
62	182	306	239	404	60	182	306	239,249	404
63	182	306,315	249	404	61	182	306	239	413
64	188	315	239	404	63	182	306,315	239	413
65	182	306,315	239	413	66	188	306,315	239,249	413
66	182	306	239	404	67	188	306	239	413
67	188	315	239	404	68	182	306,315	239	?
68	188	315	239	404	69	182	306,315	239	404
69	182	306,315	239,249	413	70	188	306,315	239	413
70	182	306	239	413	71	188	306,315	239,249	413
71	182	306	249	404	72	182	306	239,249	413
72	182,188	306,315	249	413	73	182	306,315	239,249	413
73	182,188	?	249	413	74	182	306,315	239	413
74	188	315	249	413	76	188	315	239,249	413
75	182,188	315	249	413	77	182	?	239,249	413
76	182	315	249	404	78	182	?	239	413
77	182	306,315	239,249	404	79	182	?	239,249	413
78	182	306,315	239,249	413	80	188	315	239,249	413
79	182	306,315	249	404	81	182	306,315	239,249	413
80	182	306	239,249	413	82	182	?	239,249	413
81	182,188	306,315	249	413	83	182	306	239,249	413
82	182,188	306,315	239	413	84	188	315	239,249	413
83	182	306	249	413	85	182	306	239,249	413
84	182	306,315	239	413	86	182	306	239,249	?

36	182	306	239	413	87	182	306	239,249	?
87	182	315	239	413	88	182	?	239,249	?
88	188	315	249	404	89	188	315	239	413
89	182	306,315	239	413	90	182	306,315	239,249	404
90	188	315	239,249	404	91	182	306,315	239,249	413
91	182	306,315	239,249	413	92	182	306,315	249	413
92	182	306	239	404	93	182	306,315	239,249	?
93	188	315	239,249	413	94	182	306	239,249	?
94	182	306	249	413	95	182	306,315	239,249	?
95	188	?	249	404	96	182	306	239,249	413
96	182,188	306,315	249	404	97	188	315	239,249	404
97	182,188	306,315	249	404	98	182	306,315	239,249	?
98	182,188	306,315	249	404	99	182	306	239,249	?
99	182,188	306,315	249	413	100	182	306	239,249	413
37	182,188	306,315	249	404	29	182	306	239,249	404
					65	182	306,315	239,249	?
					55	182	306	239	?
					36	182	306	239,249	?

? – niemożliwy odczyt wielkości fragmentu

Spośród nowych 45 testowanych markerów SSR, 9 nie generowało żadnego produktu amplifikacji, a pozostałe 36 pozwoliły na amplifikacje od 1 do 4 produktów. Analiza obecności tych produktów, w przypadku 9 par starterów nie wykazała polimorfizmu pomiędzy formami rodzicielskimi badanych mieszańców F₂. Dla pozostałych 27 par starterów, obserwowano polimorfizm w obrębie analizowanych prób rodzicielskich. Liczba polimorficznych fragmentów wahała się od 1 do 4, a ich wielkość od 106 do 384 pz. Odczytane wielkości nie we wszystkich przypadkach odpowiadały jednak oczekiwanym (tab. 8).

Tabela 8. Przybliżone wielkości amplifikowanych produktów SSR u form rodzicielskich dwóch populacji F₂

Startery	Oczekiwany produkt [pz]	Obserwowany produkt [pz]		
		CMS-19T	Bolero	CMS-19P
Xgwm5	171, 158	106 213	- -	106 213
Xgwm30	196, 205	196	196	196
Xgwm6	207, 196	207 -	207 268	207 -
Xgwm11	202, 213	204 -	- 221	? ?
Xgwm33	116, - (1A); -, 119 (1B)	-	-	-
Xgwm47.1	-, 170 (2A); 150, - (2A); -, 188 (2B)	128 - 169 -	128 156 - 205	128 - 169 -
Xgwm55.1	122, 118; 161, 149	-	102	-
Xgwm60	190, 224	-	-	-
Xgwm66	-, 218 (4B); 158, 137(5B)	-	-	-
Xgwm68	-, 166 (5B); -, 180(7B)	156	156	156
Xgwm77	-, 135	- 280	165 280	- 280
Xgwm88	162, -	160	160	160
Xgwm95	128, 116	128 -	- 142	128 -
Xgwm107	188, -	187	187	187
Xgwm114	168, 142	-	-	-
Xgwm120	162, 174	- 144	128 -	- 144
Xgwm122	147, 131	172	-	172

		194	194	194
Xgwm126	196, -	206	206	206
Xgwm129	-, 223 (2B); 217, 220 (5A)	240	-	240
Xgwm135	153, 176	114 174	114 174	114 174
Xgwm136	278, 321	384	-	-
Xgwm146	174, -	174 -	- 184	174 -
Xgwm154	102, 120	- 122	115 -	- 122
Xgwm155	143, 127	141	141	141
Xgwm156	300, 279	141 260 291	- 260 291	141 260 291
Xgwm160	184, 196	188 208	188 -	188 208
Xgwm169	220, 193	208 250 283	208 - -	208 250 283
Xgwm179	181, -	-	-	-
Xgwm186	132, 106	132	-	132
Xgwm210	303, -	196 -	- -	196 221
Xgwm213	162, 198	- 156	149 -	- 156
Xgwm219	184, 153	- 182	156 -	- 182
Xgwm259	105, -	-	-	-
Xgwm274	184, 177 (1B); -, 154 (7B)	151 188	- -	- -
Xgwm282	274, 193	-	-	-
Xgwm332	290, 211	196 - 253	196 211 -	196 - 253
Xgwm344	121, -	121	121	121
Xgwm397	175, 193	-	-	-
Xgwm427	195, 184,	-	-	-
Xgwm459	118, 126	- -	- 157	140 -
Xgwm617	154, 164 (5A); 133, - (6A)	121 164 -	- - 192	121 164 -
Xgwm644	152, - (6B); 193, - (7B)	- 160	152 -	- 160
Xgwm666	98, 100 (1A); 96, 92 (3A); 106, - (3A); 110, 114 (5A); 87, - (7A)	117 - 137	- 133 -	117 - 137
Xgwm635	109, -	107 -	- 115	107 -
Xgwm600-f	140, 160; 150, 170	136 160	136 160	136 160

- brak produktu

Poza 45 markerami SSR w badaniach użyto 25 markerów COS. Część markerów nie generowała produktów amplifikacji, ale były to przypadki nieliczne (4 markery spośród 25 testowanych). Większość z użytych markerów pozwalała na otrzymanie produktów amplifikacji i ujawniała polimorfizm genetyczny między liniami rodzicielskimi (tab.9), ale przeważnie niezbędne było zastosowanie enzymów restrykcyjnych do cięcia produktów PCR.

Tabela 9 Zestawienie markerów COS użytych do oceny polimorfizmu form rodzicielskich obu populacji mapujących.

Nr	marker	Enzym restrykcyjny ¹⁾	CMS19-P ²⁾	Bolero ²⁾	Enzym restrykcyjny ¹⁾	CMS19-T ²⁾	Bolero ²⁾
1	TC176835						
2	TC110922	H+E	500, 450	500	H+E	500, 450	500
3	TC122582						
4	TC80147	H+E		600	H+E	580, 500	600
5	tcos1514		1000	1000		1000	1000
6	tcos1520		780	800		780	800
7	tcos1524	H+D	700, 600, 520	700, 520	H+D	700, 600, 520	700, 520
8	tcos1547						
9	tcos1555	Taq	800, 700, 600	700, 600	Taq	800, 700, 600	700, 600
10	tcos493	R+X	500, 400, 390	500, 220	R+X	500, 400, 390	500, 220
11	TC281179		400	400		400	400
12	TC300731					—	—
13	c11822	H+D	600, 550	1000, 600	H+D		1000, 600
14	c27559	Taq	220, 200, 180, 100	220, 200, 180, 120, 100, 80	Taq	220, 200, 180, 100	220, 200, 180, 120, 100, 80
15	c5623_1		900	900		900	900
16	c2624		1500	1500		1500	1500
17	c28385	R+X	700, 420, 400	700, 300, 150	R+X	700, 420, 400	700, 300, 150
18	c3116a_2	H+E	440	440, 420	H+E	440	440, 420
19	c3116a_3		1700	1700		1700	1700
20	c22526	H+D	380, 280	380, 300, 280	H+D	380, 280	380, 300, 280
21	c22574		100	100		100	100
22	c31535	Taq	280, 240, 200	280, 200	Taq	280, 240, 200	280, 200
23	Tactg941965		600	600		600	600
24	c110579	H+D	120, 50	120, 100	H+D	120, 50	120, 100
25	c29331		1100	1100		1100	1100

¹⁾ Enzymy restrykcyjne użyte do ujawnienia polimorfizmu

²⁾ Wielkości produktów po amplifikacji (opcjonalnie po strawieniu przez restryktrazy)

Temat badawczy 3

Ocena różnic pomiędzy genomami mitochondrialnymi i próba identyfikacji czynników wywołujących męską sterylność u pszenżyta z różnymi cytoplazmami

Wyniki (opisać)

Analiza wyników sekwencjonowania mtDNA

Liczby otrzymanych odczytów sekwencyjnych zawierały się w przedziale od 499 426 (linia 19N) do 604 137 (linia CMS 19P). Sumaryczna długość odczytanych sekwencji wynosiła 227 (linia 19N), 237 (linia CMS 19T) oraz 270 Mb (linia CMS 19P). Parametry N50 oraz N95, określają długość odczytu, dla której odpowiednio 50 i 95% całkowitej długości (wszystkich) odczytów znajduje się w odczytach o długości większej lub równej wartości N50/N95. Średnie wartości tych parametrów wynosiły 249 bp (N50) oraz 160 bp (N95). W uzyskanych sekwencjach zawartość G+C wynosiła średnio 47% (tab. 10).

Tabela 10. Podsumowanie wyników sekwencjonowania mitochondrialnego DNA trzech linii pszenżyta.

Linia	Rodzaj odczytów	Liczba otrzymanych odczytów	Całkowita liczba nukleotydów	%GC	Długość odczytów			N50	N95
					Min.	Maks.	Średnia		
19N	1	499 426	117 584 579	50	36	251	235,44	251	181
	2	499 426	109 157 619	49	36	251	218,57	249	148
CMS 19T	1	532 539	122 958 170	48	36	251	230,89	250	172
	2	532 539	114 167 523	47	36	251	214,38	247	144
CMS 19P	1	604 137	138 482 084	44	36	251	229,22	251	166
	2	604 137	131 754 124	44	36	251	218,09	248	150

Jakość sekwencjonowania jest wyrażana parametrami Q20 i Q30. Q20 to procent nukleotydów o wskaźniku jakości Phred większym niż 20. Średnie wartości Q20 dla odczytów typu *forward* wynosiły 98% i były wyższe o około 8% od średnich wartości tego parametru dla odczytów typu *reverse*. Q30 to procent nukleotydów o wskaźniku jakości Phred większym niż 30. Średnie wartości Q30 dla odczytów typu *forward* wynosiły 96,7% i były wyższe o około 10% od średnich wartości tego parametru dla odczytów typu *reverse* (tab. 11).

Tabela 11. Parametry jakościowe wyników sekwencjonowania mitochondrialnego DNA trzech linii pszenżyta.

Linia	Rodzaj odczytów	Wskaźnik jakości Phred			Q20	Q30
		Min.	Maks.	Średnia		
19N	1 (<i>forward</i>)	12	40	36,98	97,85	96,47
	2 (<i>reverse</i>)	12	40	34,18	90,18	85,74
CMS 19T	1 (<i>forward</i>)	12	40	37,06	97,94	96,58
	2 (<i>reverse</i>)	12	40	34,32	90,41	86,19
CMS 19P	1 (<i>forward</i>)	12	40	37,28	98,09	97,05
	2 (<i>reverse</i>)	12	40	34,52	90,47	86,71

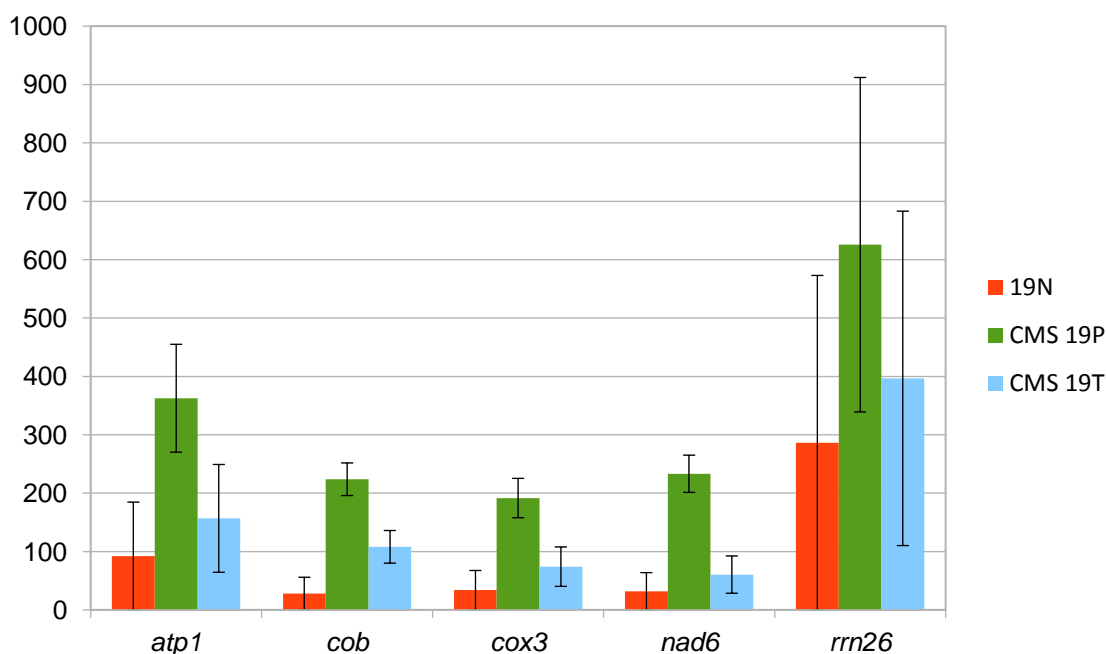
Mapowanie odczytów do sekwencji konsensusowych

W celu sprawdzenia, z jakim pokryciem dokonano sekwencjonowania mitochondrialnego DNA badanych linii pszenżyta, uzyskane odczyty zmapowano do pięciu wybranych mitochondrialnych sekwencji konsensusowych pochodzenia roślinnego (tab. 12, ryc. 7). Najniższe pokrycie otrzymano dla sekwencji *cob* w linii 19N – wyniosło ono 28×. Z kolei najwyższe pokrycie otrzymano dla sekwencji *rrn26* – np. w linii CMS 19P wyniosło ono ponad 626×. Najniższe średnie pokrycie sekwencji konsensusowych wynosiło 94,5× (linia 19N), natomiast najwyższe – 327,3× (linia CMS 19P).

Tabela 12. Podsumowanie mapowania odczytów do sekwencji konsensusowych.

Sekwencja	Długość sekwencji [bp]	Linia					
		19N		CMS 19P		CMS 19T	
		Pokrycie	Odchylenie standardowe	Pokrycie	Odchylenie standardowe	Pokrycie	Odchylenie standardowe
<i>atp1</i>	1 443	92,34	117,18	362,64	177,94	156,77	188,96
<i>cob</i>	1 163	27,96	8,12	223,74	78,54	108,02	17,75
<i>cox3</i>	797	33,73	5,91	191,55	21,10	73,99	8,61
<i>nad6</i>	583	31,91	6,21	233,18	66,03	60,41	9,23
<i>rrn26</i>	2 625	286,46	245,86	625,59	320,76	396,61	359,71
Wartości średnie							
		94,48	76,65	327,34	132,87	159,16	116,85

Pokrycie [x]



Ryc. 7. Pokrycie pięciu mitochondrialnych sekwencji konsensusowych (*atp1* – *rrn26*) odczytami sekwencyjnymi z mtDNA trzech linii pszenżyta: 19N, CMS 19P i CMS 19T.

Temat badawczy 4

Próba wytworzenia męskosterylnych linii pszenżyta z nowymi źródłami cytoplazmy sterylizującej oraz ocena nowych genotypów pszenżyta i pszenicy pod kątem zdolności do utrzymywania męskiej sterility i przywracania płodności w cytoplazmie *T. timopheevi*.

Wyniki (opisać)

Jedenaście mieszańców F₁ pszenżyta spośród 48 badanych miało przywróconą męską płodność w obu miejscowościach, na co wskazuje indeks restoracji powyżej 80% i duża liczba ziaren zawiązanych w izolowanych kłosach (tab. 13, 14). Rody ojcowskie użyte do tworzenia tych mieszańców mogą być dobrymi restorerami w hodowli heterozyjnej. Żaden mieszańiec w cytoplazmie *T. timopheevi* i *Ae. ventricosa* nie był męskosterylny. Mieszańce z wykorzystaniem rodów DL 386 i DL 1146, jako formy ojcowskiej, były w pełni męskosterylne w cytoplazmie

Pampa i *Ae. sharonensis* w Prusach, lecz w Laskach zawiązywały pojedyncze ziarna w izolowanych kłosach. Mieszańce z odmianą Subito w cytoplazmie *Pampa* oraz z rodem DL 1113 w cytoplazmie *Ae. sharonensis* były także męskosterylne w Prusach i charakteryzowały się wiązaniem pojedynczych ziaren w izolowanych kłosach, w Laskach. Bardzo małym wiązaniem ziarna pod izolatorami w obu miejscowościach charakteryzowały się ponadto mieszańce z Subito i DL 643 w cytoplazmie *Ae. sharonensis* oraz z DL 1261 w cytoplazmie *Ae. sharonensis* i *Ae. ventricosa* (tab. 14). Pozostałe mieszańce (ponad połowa badanych), niezależnie od rodzaju cytoplazmy, wykazywały niepełną restorację, w kilku przypadkach wyraźnie różną w obu miejscowościach. Obserwowano także dużą zmienność restoracji wśród poszczególnych roślin u niektórych mieszańców: od pełnej sterylności po całkowitą męską płodność. Wyniki pokazują, że ocena przywracania męskiej płodności u mieszańców F₁ i identyfikacja stabilnych restorerów i dopełniaczy dla każdej z badanych cytoplazm powinna być prowadzona w kilku środowiskach. Sugerują także, że u pszenżyta częstość genotypów nierestorujących dla cytoplazmy *Pampa* i *A. sharonensis* jest większa niż dla cytoplazm *T. timopheevi* i *Ae. ventricosa*.

Rozpoczęto krzyżowania wypierające mieszańców w odpowiednich cytoplazmach z liniami S₁ odmiany Subito oraz rodów DL 386 i DL 1113 w celu otrzymania nowych linii męskosterylnych, a linie ojcowskie poddano samozapyleniu.

Tabela 13. Indeks restoracji (%) w dwóch miejscowościach (P – Prusy, L – Laski) mieszańców F₁ otrzymanych w wyniku krzyżowań męskosterylnych linii pszenżyta w różnych cytoplazmach z rodami, 2017

Forma ojcowska	Linia mateczna							
	(T) cms Salvo		(P) cms Baltiko		(A) cms Zorro		(V) cms Salvo	
	P	L	P	L	P	L	P	L
Subito	97,8	97,4	0,0	50,0	6,5	40,7	95,2	100,0
DL 593	100,0	95,5	85,7	67,6	85,0	58,8	70,0	68,2
DL 122	63,5	100,0	66,7	54,2	42,3	55,8	51,9	80,4
DL 643	94,4	82,1	100,0	56,2	22,2	46,9	71,4	87,5
DL 386	90,4	84,6	0,0	37,5	0,0	25,0	62,0	91,2
DL 1113	88,0	97,2	52,5	45,5	0,0	33,3	76,9	92,3
DL 1146	55,0	53,1	0,0	40,9	0,0	35,7	90,0	47,1
DL 402	60,0	97,1	100,0	63,3	83,3	61,9	75,0	95,8
DL 525	82,6	92,1	73,9	62,5	85,7	87,5	76,1	94,4
DL 1153	44,0	60,7	95,5	80,8	43,5	35,7	50,0	50,0
DL 1261	50,0	61,1	94,4	53,6	11,1	36,8	50,0	50,0
DL 1410	87,5	84,8	100,0	96,7	51,9	41,7	82,7	62,5

T – *T. timopheevi*, P – *Pampa*, A – *A. sharonensis*, V – *Ae.ventricosa*

Tabela 14. Liczba ziaren na izolowany kłos w dwóch miejscowościach (P – Prusy, L – Laski) mieszańców F₁ otrzymanych w wyniku krzyżowań męskosterylnych linii pszenżyta w różnych cytoplazmach z rodami, 2017

Forma ojcowska	Linia mateczna							
	(T) cms Salvo		(P) cms Baltiko		(A) cms Zorro		(V) cms Salvo	
	P	L	P	L	P	L	P	L
Subito	51,7	52,2	0,0	2,6	0,3	1,5	45,8	55,2
DL 593	40,8	38,6	40,9	23,7	46,4	15,7	30,3	25,0
DL 122	23,5	43,2	21,4	19,0	12,6	15,7	17,0	33,5
DL 643	45,5	37,5	67,4	14,6	2,1	1,8	27,6	39,6
DL 386	38,6	50,6	0,0	1,0	0,0	0,7	24,2	41,2
DL 1113	35,8	50,4	7,8	6,0	0,0	1,7	31,1	37,0
DL 1146	14,3	8,7	0,0	1,5	0,0	2,4	34,5	8,5
DL 402	25,0	46,2	56,1	20,2	38,8	25,0	31,4	48,6
DL 525	33,5	41,4	27,3	21,0	42,1	46,2	29,5	44,7
DL 1153	11,9	19,3	49,5	39,7	8,7	0,6	17,7	19,3
DL 1261	14,5	18,9	49,2	11,5	0,5	1,2	3,0	2,3
DL 1410	42,6	36,6	64,4	62,0	16,6	2,5	31,2	24,8

T – *T. timopheevi*, P – *Pampa*, A – *A. sharonensis*, V – *Ae.ventricosa*

Wszystkie mieszańce F₁ pszenicy były męskosterylne w obu miejscowościach (tab. 15, 16). Badane rody ojcowskie nie mają genów przywracających męską płodność mieszańcom z cytoplazmą *T. timopheevi*. Rozpoczęto krzyżowania wypierające tych mieszańców, odpowiednio z 5 liniami S₁ każdego rodu w celu otrzymania pokolenia BC₁ i weryfikacji braku genów restorerów u badanych rodów, a linie ojcowskie poddano samozapyleniu.

Tabela 15. Indeks restoracji (%) w dwóch miejscowościach (P – Prusy, L – Laski) mieszańców F₁ otrzymanych w wyniku krzyżowań męskosterylnej linii pszenicy z cytoplazmą T. z rodami, 2017

Forma ojcowska	Linia mateczna	
	(T) cms Grana	
	P	L
DL 325	0,0	0,0
DL 423	0,0	0,0
DL 237	0,0	0,0
DL 312	0,0	0,0
DL 375	0,0	0,0

T – *T. timopheevi*

Tabela 16. Liczba ziaren na izolowany kłos w dwóch miejscowościach (P – Prusy, L – Laski) mieszańców F₁ otrzymanych w wyniku krzyżowań męskosterylnej linii pszenicy z rodami, 2017

Forma ojcowska	Linia mateczna	
	(T) cms Grana	
	P	L
DL 325	0,0	0,0
DL 423	0,0	0,0
DL 237	0,0	0,0
DL 312	0,0	0,0
DL 375	0,0	0,0

T – *T. timopheevi*

Opublikowane streszczenia:

Orłowska M., Sobczyk M., Simlat M., Góral H., Warzecha T., Stojałowski S., 2017. Wykorzystanie markerów DArTseq do konstrukcji mapy sprzężeń u mieszańca międzyliniowego pszenżyta z cytoplazmą Pampa. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” – Streszczenia, Zakopane, 30 stycznia - 3 lutego 2017, ISBN 83-891172-87-9: 134

Wykorzystanie markerów DArTseq do konstrukcji mapy sprzężeń u mieszańca międzyliniowego pszenżyta z cytoplazmą Pampa

Marta Orłowska¹, Martyna Sobczyk¹, Magdalena Simlat², Halina Góral², Tomasz Warzecha², Stefan Stojałowski¹

¹ Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie
² Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
 marta.orłowska@zut.edu.pl

Wstęp

U pszenżyta istnieje kilka źródeł cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS), które mogą znaleźć zastosowanie w hodowli odmian mieszańcowych. Największe nadzieje wiąże się z próbami wykorzystania systemu CMS *Triticum timopheevi*, który został przeniesiony do pszenżyta z pszenicy. Jednym ze źródeł CMS stanowiących alternatywę dla cytoplazmy *T. timopheevi* jest żytni system CMS-Pampa. System ten został wprowadzony do pszenżyta. Możliwość jego wykorzystania w praktyce zależy od wielu czynników. Wśród nich istotnym zagadnieniem jest skuteczność działania genów jądrowych (tzw. restorerów) przywracających płodność pszenżyta z cytoplazmą sterylizującą. Oszacowanie liczby i efektywności genów zaangażowanych w ten proces jest możliwe w oparciu o odpowiednio przygotowane mapy genetyczne.

Cel

Celem badań było skonstruowanie map sprzężeń chromosomów pszenżyta z wykorzystaniem markerów molekularnych DArTseq. Zostaną one wykorzystane do poszukiwania regionów genomu zawierających geny przywracające płodność w systemie CMS-Pampa.

Materiał i metody

Formą mateczną mieszańca, który pozwolił na otrzymanie populacji mapującej była wyhodowana w Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie męskosterylna linia CMS-19P. Męskosterylne rośliny zapylono pyłkiem linii Bolero 14/1. Otrzymane mieszańce F1 były męskopłodne. Płodność roślin pokolenia F2 stanowiącego populację mapującą oceniano wzrokowo przy użyciu pięciu stopniowej skali bonitacyjnej, opracowanej przez Góral (2002). Z liści badanych roślin wyizolowano DNA i poddano je analizie DArTseq. Technologia DArTseq jest oparta o wykorzystanie metod sekwencjonowania nowej generacji (NGS) i pozwala na wygenerowanie dużych ilości markerów molekularnych wykazujących dominowanie (Silico-DArT) lub kodominację (SNP). Do konstruowania map sprzężeń użyto markery SNP z uwagi na ich kodominujący charakter. Mapowanie wykonano w oparciu o program komputerowy JoinMap.

Wyniki

Spośród 5967 markerów SNP otrzymanych w wyniku analizy DArTseq w populacji [CMS-19P x Bolero]F2, 1894 markery polimorficzne użyto do konstruowania map sprzężeń. Przy wartości krytycznej 20 parametru LOD uzyskano 8 dużych grup sprzężeń zawierających co najmniej 45 markerów oraz kilkanaście drobnych grup liczących po kilka-kilkaście loci. Dla ośmiu dużych grup sprzężeń skonstruowano mapy genetyczne (rys.1) o długościach od 31,9 do 94,2cM (tab.1). Łącznie w obrębie map sprzężeń znalazły się 764 markery SNP, a łączna długość utworzonej mapy to 480,4 cM.

Tabela 1. Charakterystyka grup sprzężeń utworzonych w obrębie populacji mapującej [CMS-19P x Bolero]F2

Grupa sprzężeń	Liczba markerów	Długość mapy (cM)	Przypuszczalny fragment chromosomu
1	157	50,3	5R (1R)
2	86	31,9	Brak danych
3	147	87,7	6B
4	143	94,2	6R
5	81	50,2	2R
6	52	56,7	5R
7	52	45,4	7R (3B, 5B)
8	46	64,0	7B (5R)
Ogółem	764	480,4	



Rys. 1. Mapa genetyczna ośmiu grup sprzężeń markerów SNP-DArTseq w populacji [CMS-19P x Bolero]F2

Poster: Orłowska M., Sobczyk M., Simlat M., Góral H., Warzecha T., Stojalowski S., 2017.

Wykorzystanie markerów DArTseq do konstrukcji mapy sprzężeń u mieszańca międzyliniowego pszenżyta z cytoplazmą Pampa. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” Zakopane, 30 stycznia - 3 lutego 2017