

## WYNIKI

### **z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2018 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.

Kwitnienie roślin badanych w Szczecinie czterech populacji mapujących przebiegało w warunkach dość nietypowych, jak na ten region kraju. Czas kwitnienia poprzedził około 4-tygodniowy okres bez opadów, samo kwitnienie też przebiegało w czasie suszy i przy wysokich temperaturach powietrza. W rezultacie, rośliny kwitły bardzo dynamicznie – czas kwitnienia był krótki i pylniki bardzo szybko zasychały. Być może z tego powodu wizualna ocena pylenia prawie nie dawała podstaw do klasyfikowania roślin na 5 (tab.1), podczas gdy zawiązywanie ziaren pod izolatorami było u roślin płodnych na dobrym poziomie. Tylko siedem roślin u mieszańca z cytoplazmą *T. timopheevi* zostało ocenionych jako w pełni męskopłodne. W pozostałych mieszańcach takich ocen nie było w ogóle, chociaż każda z populacji liczyła powyżej 170 ocenionych roślin (tab.1).

**Tabela 1.** Liczba i procent (w nawiasie) roślin w poszczególnych klasach męskiej płodności u mieszańców F<sub>2</sub>, 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 2018

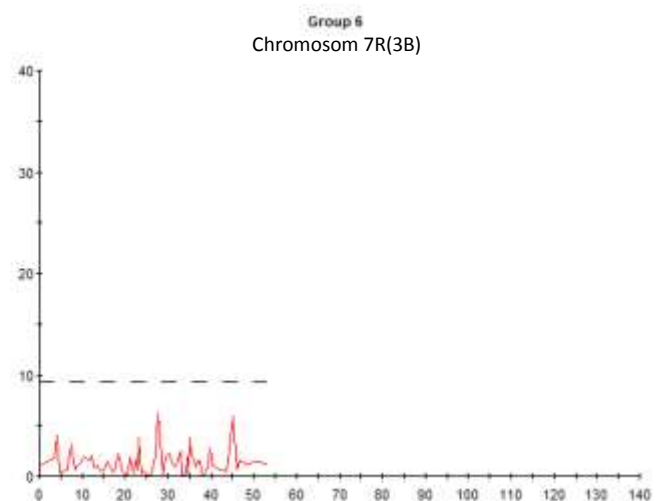
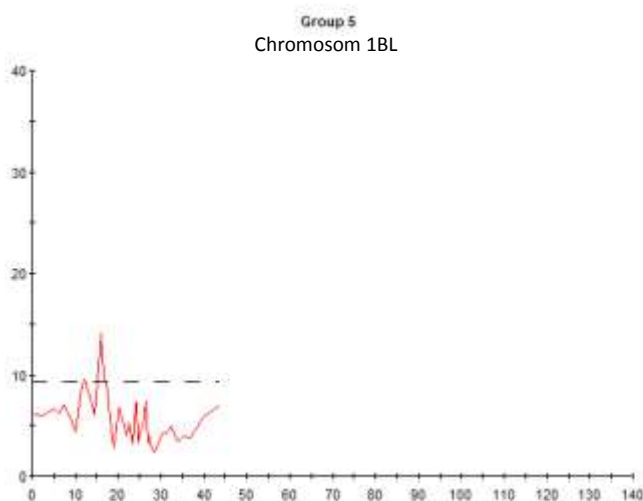
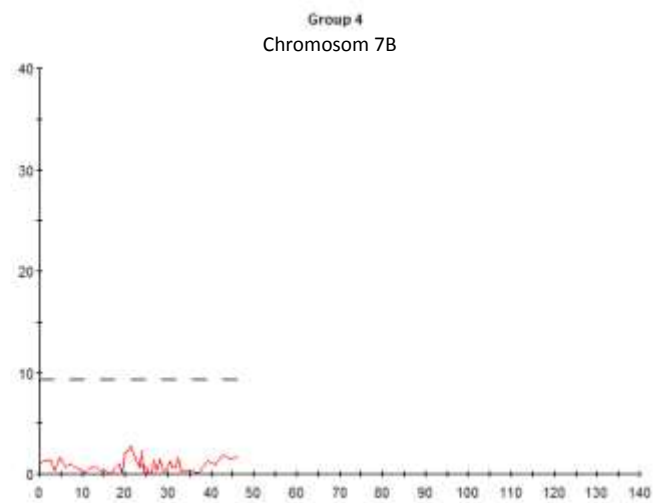
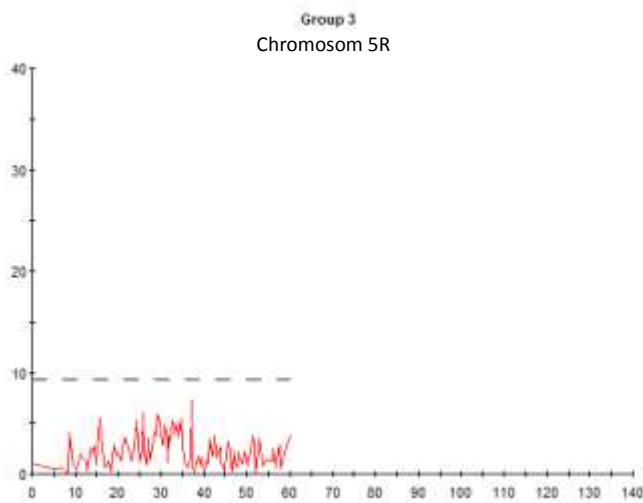
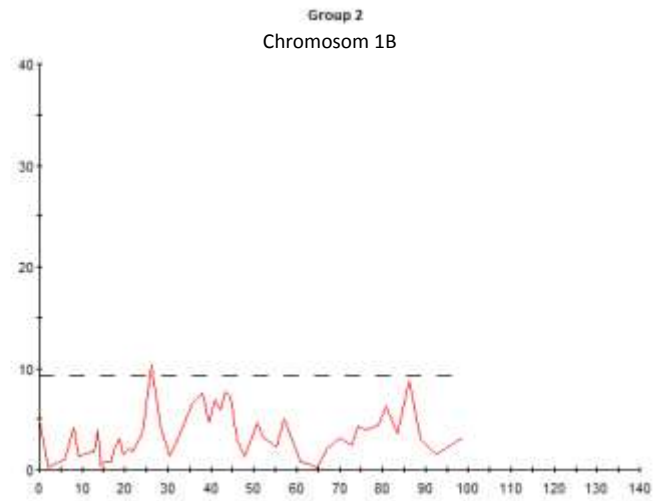
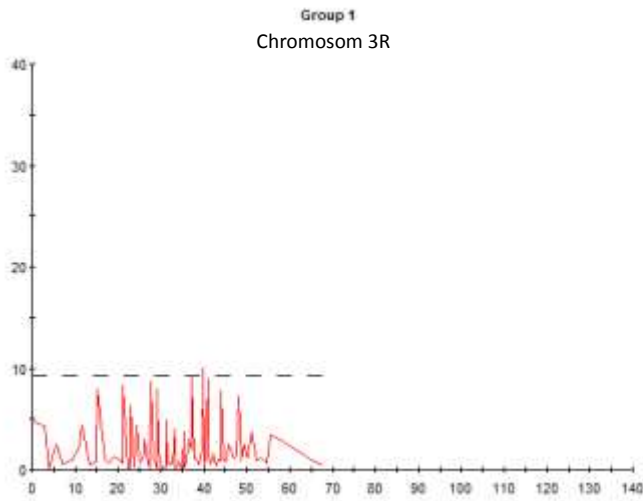
Cytoplazma	Klasa męskiej płodności				
	1	2	3	4	5
T	53 (29,9)	38 (21,5)	45 (25,4)	34 (19,2)	7 (4,0)
P	50 (24,4)	82 (40,0)	61 (29,8)	12 (5,8)	0 (0,0)
A	57 (25,0)	79 (34,6)	61 (36,8)	31 (13,6)	0 (0,0)
V	76 (44,7)	38 (22,3)	46 (27,1)	10 (5,9)	0 (0,0)

Analizami DArTseq objęto dwie populacje mapujące [CMS-Salvo T x DAD282/00]F<sub>2</sub> oraz [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F<sub>2</sub> (po 90 osobników z każdej) oraz trzy rodzicielskie linie wsobne (dwie męskosterylne: CMS-Salvo 15/1 T, CMS-Baltiko P i wspólną da obu populacji linię ojcowską DAD282/00). Analizy dotyczyły kolejnych osobników z populacji, które wstępnie analizowano już 2017 roku. Jako poziom krytyczny wartości LOD przy tworzeniu grup sprzężeń przyjęto 15,0. Analizę Regression Mapping (RM) wykonano dla grup sprzężeń liczących co najmniej 20 markerów (mniejsze grupy sprzężeń pominięto w analizie mapowania, ale markery w nich zawarte brano pod uwagę przy ocenie związku z płodnością). Spośród niemal 13 tysięcy markerów SNP uzyskanych metodą DArTseq po około 10% zostało włączonych do konstruowanych 21 grup sprzężeń dla każdej z populacji.

Mapy chromosomów w populacji [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F<sub>2</sub> mają długość od 37 do 130cM (ryc. 1-4; tab.2). Mapy na rycinach 1-4 są ujęte na osi OX, a oś OY zawiera wartości statystyki K informującej o istotności statystycznej związku markerów z płodnością roślin (przekroczenie przez czerwną linię przerywanej linii poziomej oznaczającej poziom istotności wskazuje na lokalizację QTLa na mapie).

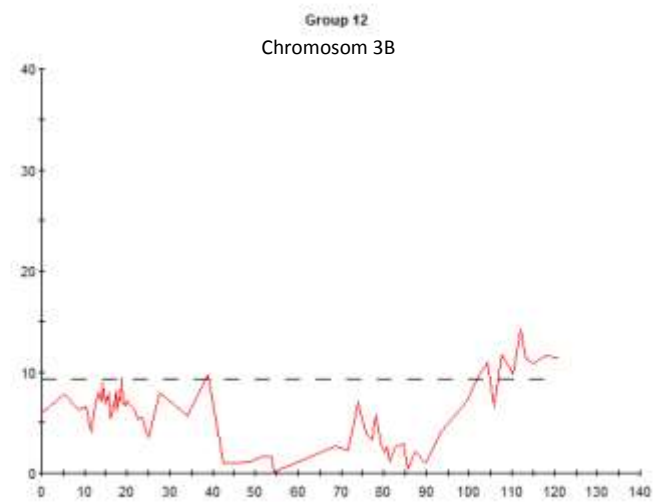
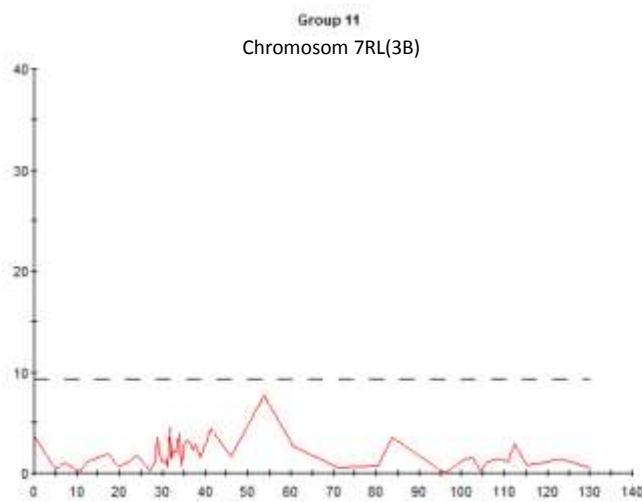
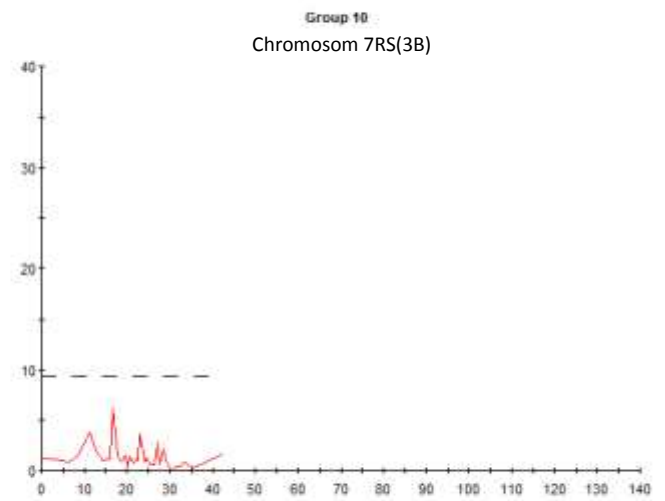
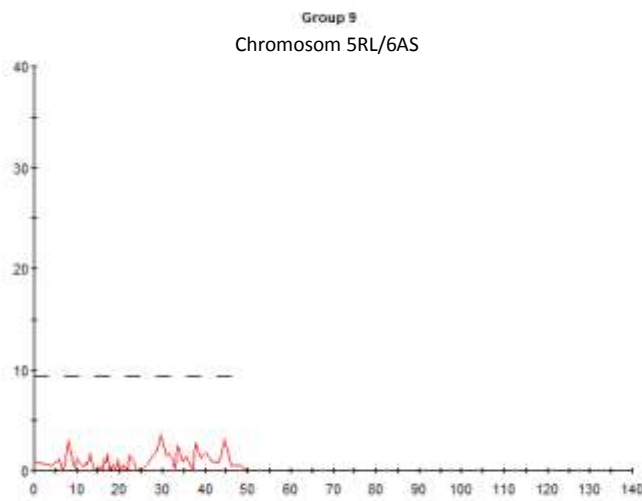
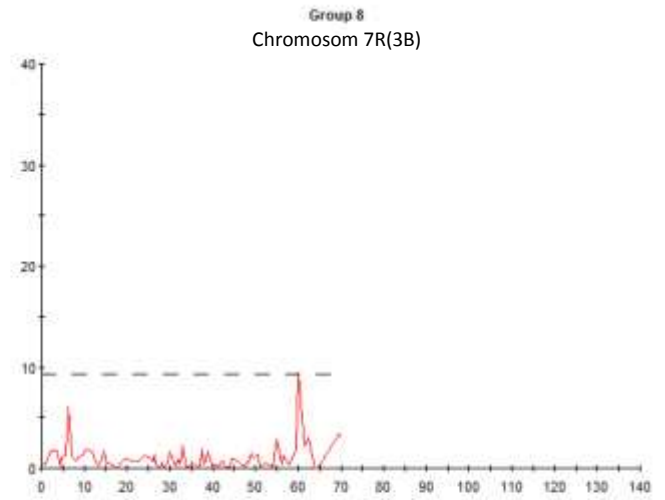
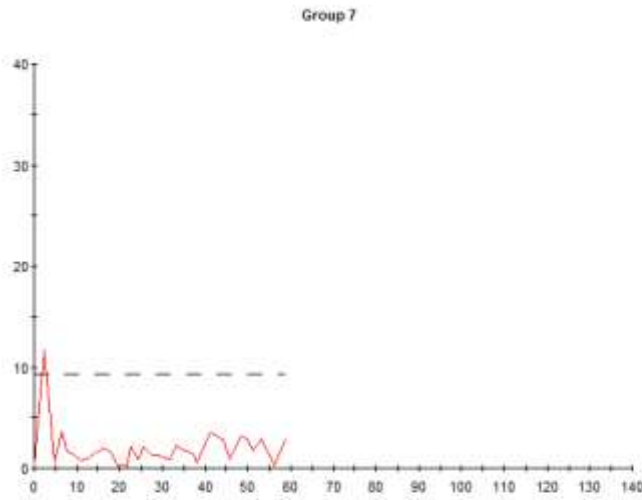
Długość map tylko częściowo zależy od liczby markerów znajdujących się w grupie sprzężeń (tab.2). Najliczniejsze grupy sprzężeń (grupa 3, 13 i 16) nie tworzą najdłuższych map. Mała liczba markerów na mapie była jednak przyczyną problemów z jednoznacznym przypisaniem grupy sprzężeń do konkretnego chromosomu. W populacji [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F<sub>2</sub> nie udało się na drodze mapowania porównawczego zidentyfikować lokalizacji chromosomowej trzech grup sprzężeń onumerach 7, 17 i 21 (ryc. 1, 3, 4; tab.2), z których każda składała się z niespełna 40 markerów. W przypadku kilku grup sprzężeń lokalizacja chromosomowa nie jest jednoznaczna – dotyczy to w szczególności grupy nr 9 (chromosom 5R lub 6A) i 19 (chromosom 2A lub 5A). Problematyczna jest też identyfikacja chromosomów 7R i 3B, które ze względu na translokacje nie były jednoznacznie określone na mapie referencyjnej. Niektóre grupy sprzężeń zostały przypisane do tego samego chromosomu, co oznacza że wysoki poziom LOD przyjęty jako wartość krytyczna doprowadził do podziału mapy niektórych chromosomów na dwa niezależne odcinki. Jeśli pozwalały na to dane, to w takich grupach sprzężeń określano, na którym ramieniu (krótkim – S, czy długim – L) znajduje się dana grupa markerów.

# [CMS-Baltiko P x DAD182/00] F2



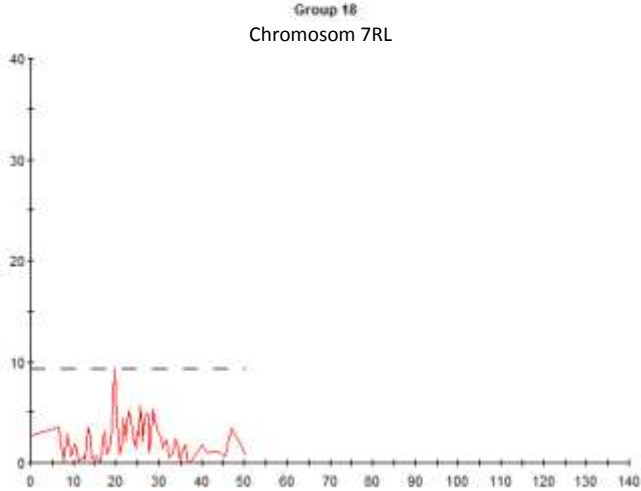
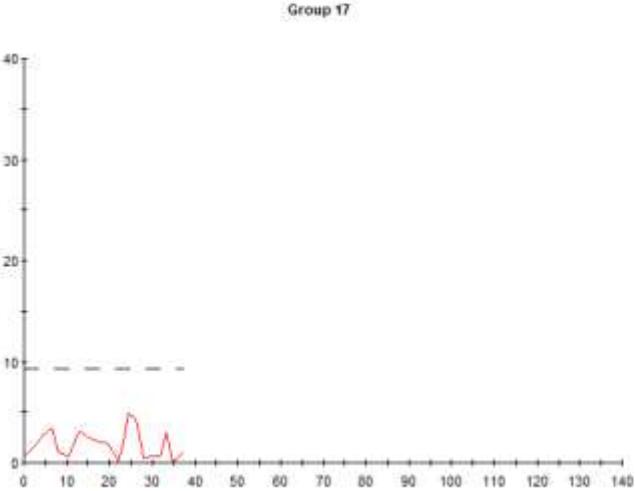
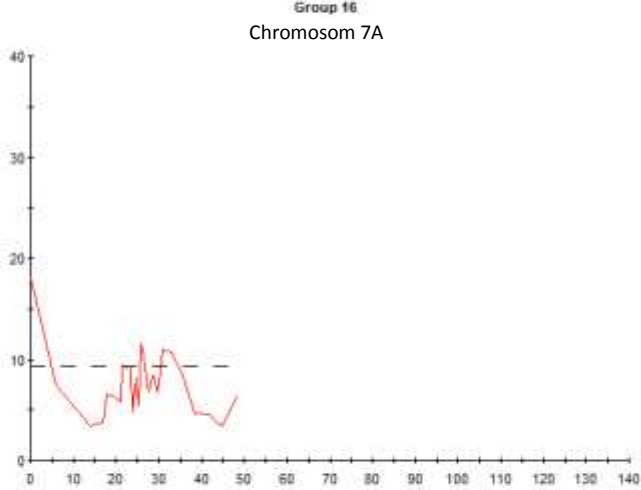
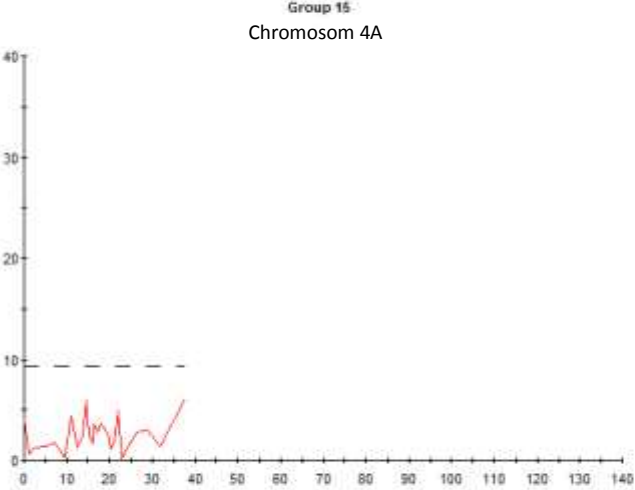
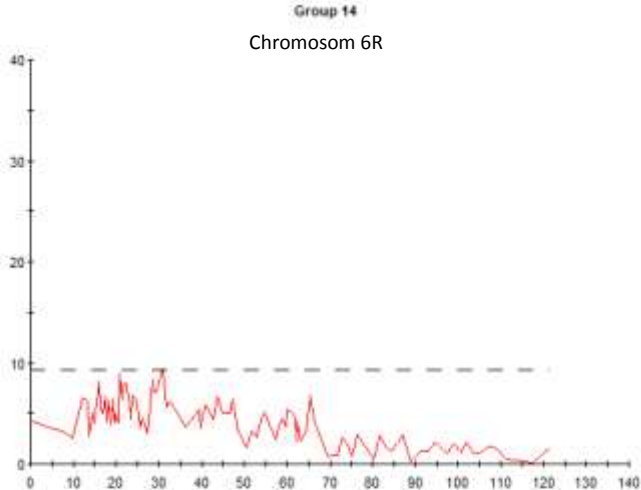
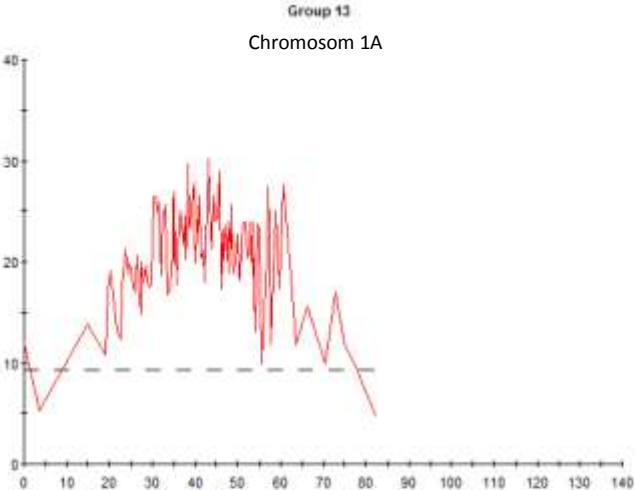
**Ryc.1** Identyfikacja QTLi płodności na mapach grup sprzężeń 1-6 w populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2

# [CMS-Baltiko P x DAD182/00] F2



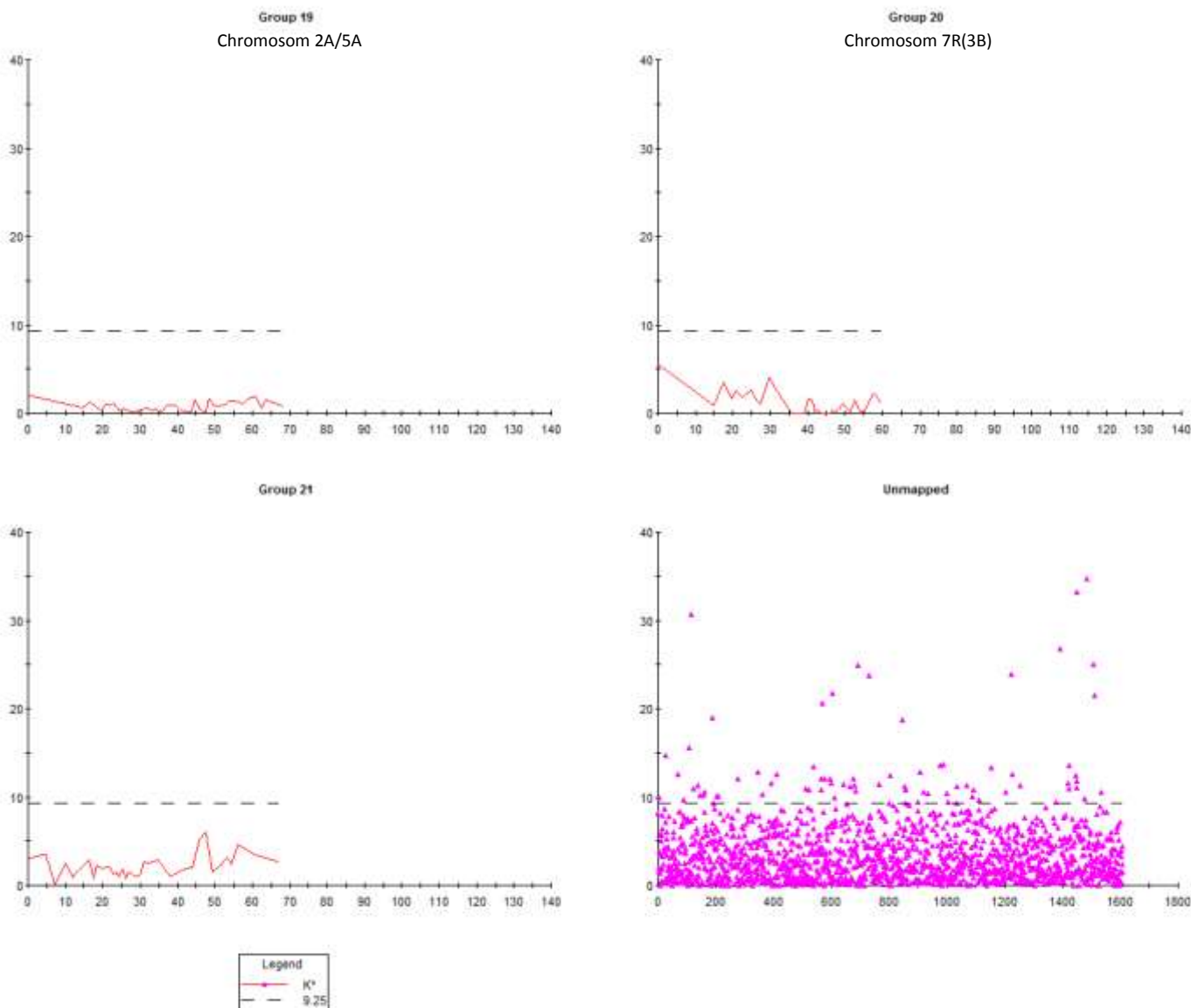
**Ryc.2** Identyfikacja QTLi płodności na mapach grup sprzężeń 7-12 w populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2

# [CMS-Baltiko P x DAD182/00] F2



**Ryc.3** Identyfikacja QTLi płodności na mapach grup sprzężeń 13-18 w populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2

### [CMS-Baltiko P x DAD182/00] F2



**Ryc.4** Identyfikacja QTLi płodności na mapach grup sprzężeń 19-21 oraz wśród markerów niezmapowanych w populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2

Najefektywniejszy QTL dla płodności pszenżyta z cytoplazmą Pampa zidentyfikowano na chromosomie 1A (grupa sprzężeń 13) (ryc.3). Jego efekt fenotypowy jest statystycznie istotny w obrębie prawie całej grupy sprzężeń. Dodatkowe QTL o wyraźnie mniejszych efektach fenotypowych zlokalizowano na chromosomach 1B, 3B, 7A (ryc. 1-3). Na chromosomach 1B, 3R, 6R i w nieprzypisanej do chromosomu grupie 7 znajdowały obszary, gdzie wartości statystyki K nieznacznie przekraczały poziom statystycznej istotności, co sugeruje, że tam mogą się znajdować bardzo słabe geny kontrolujące pylenie pszenżyta z cytoplazmą Pampa. Należy zauważyć, że dość liczna grupa markerów niezlokalizowanych na mapie wykazywała silny związek z męską płodnością roślin, co oznacza że poza obszarem genomu objętym przez mapę genetyczną, znajduje się przynajmniej jeden dodatkowy gen o relatywnie silnym działaniu.

**Tabela 2.** Charakterystyka grup sprzężeń w populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2

Grupa sprzężeń	Chromosom	Liczba markerów	Długość mapy [cM]	Wartość K max
1	3R	92	68	10,02*
2	1B	50	99	10,27*
3	5R	116	60	7,30
4	7B	49	46	2,73
5	1BL	44	44	14,05*
6	7R(3B)	78	53	6,12
7		38	59	11,65*
8	7R(3B)	88	70	9,09
9	5RL/6AS	68	50	3,52
10	7RS(3B)	36	42	6,11
11	7RL(3B)	49	130	7,70
12	3B	71	121	14,16*
13	1A	117	82	30,13*
14	6R	104	122	9,47*
15	4A	26	38	6,10
16	7A	154	48	18,13*
17		24	37	4,96
18	7RL	64	50	9,23
19	2A/5A	41	68	2,04
20	7R(3B)	34	60	5,57
21		38	67	6,08
Niezmapowane	-	1609	-	34,67*

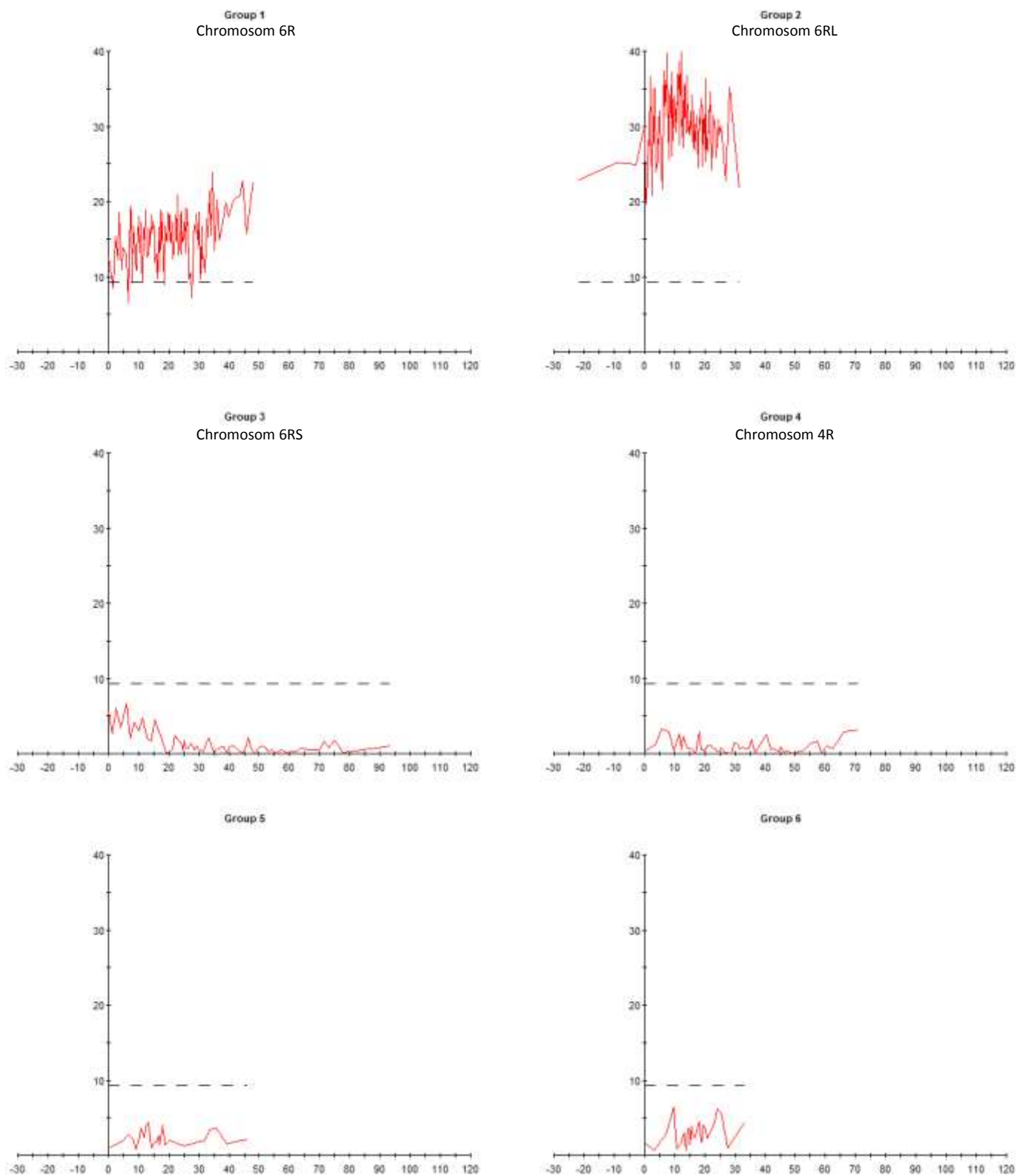
\* - statystycznie istotne

Długości map chromosomów mieszańca [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2 mieszczą się w granicach od 33cM do 112cM i zawierają od 27 do 124 markerów (ryc. 5-8; tab.3). W tej populacji mapującej również grupy sprzężeń o małej liczbie markerów trudno było przypisać do konkretnych chromosomów. Co prawda grupa 8 licząca 27 markerów została powiązana z chromosomem 7A, ale w przypadku grup o numerach 5, 6, 13 i 18 lokalizacja chromosomowa pozostaje nieznaną. Grupy te liczyły, odpowiednio 28, 28, 35 i 49 markerów. W przypadku dwóch grup sprzężeń liczących mniej niż 50 markerów (grupy nr 10 i 21) lokalizacja chromosomowa była niejednoznaczna. W przypadku grupy nr 10 wątpliwości dotyczyły dwóch chromosomów homeologicznych z grupy 2: 2R/2B, co może wynikać z obecności podobnych sekwencji DNA na tych chromosomach (markery DArTseq są oparte o analizy sekwencji DNA z sekwenatorów nowej generacji). W grupie sprzężeń nr 21 problem dotyczy chromosomów z genomu A: 2A i 5A, czyli tych samych, które były w sposób niejednoznaczny identyfikowane w populacji [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2.

Kilka grup sprzężeń było przypisywanych do tych samych chromosomów. Prawdopodobnie markery z tych chromosomów zostały rozdzielone do różnych grup sprzężeń w wyniku wysokiego poziomu wartości krytycznej LOD użytej w pierwszej fazie mapowania. Problem dotyczy głównie żytnich chromosomów 5R i 6R (ryc. 5-8; tab.3).

Najsilniejsze QTL związane z męską płodnością pszenżyta z cytoplazmą T. timopheevi zaobserwowano na chromosomie 6R (ryc.5) – w obrębie grup sprzężeń 1 i 2. Największe wartości statystyki K odnotowano w grupie 2 przypisanej do długiego ramienia chromosomu 6R. Krótkie ramie (6RS) reprezentowane przez grupę sprzężeń nr 3 nie zawierało genów istotnych dla pylenia roślin. Słabsze QTL zidentyfikowano na chromosomach 7A i 5A, a także, które były na granicy statystycznej istotności – na chromosomie 7B i grupach niejednoznacznie przypisanych do chromosomów: 2RS/2BL, 2AL/5AL i 7R(3B).

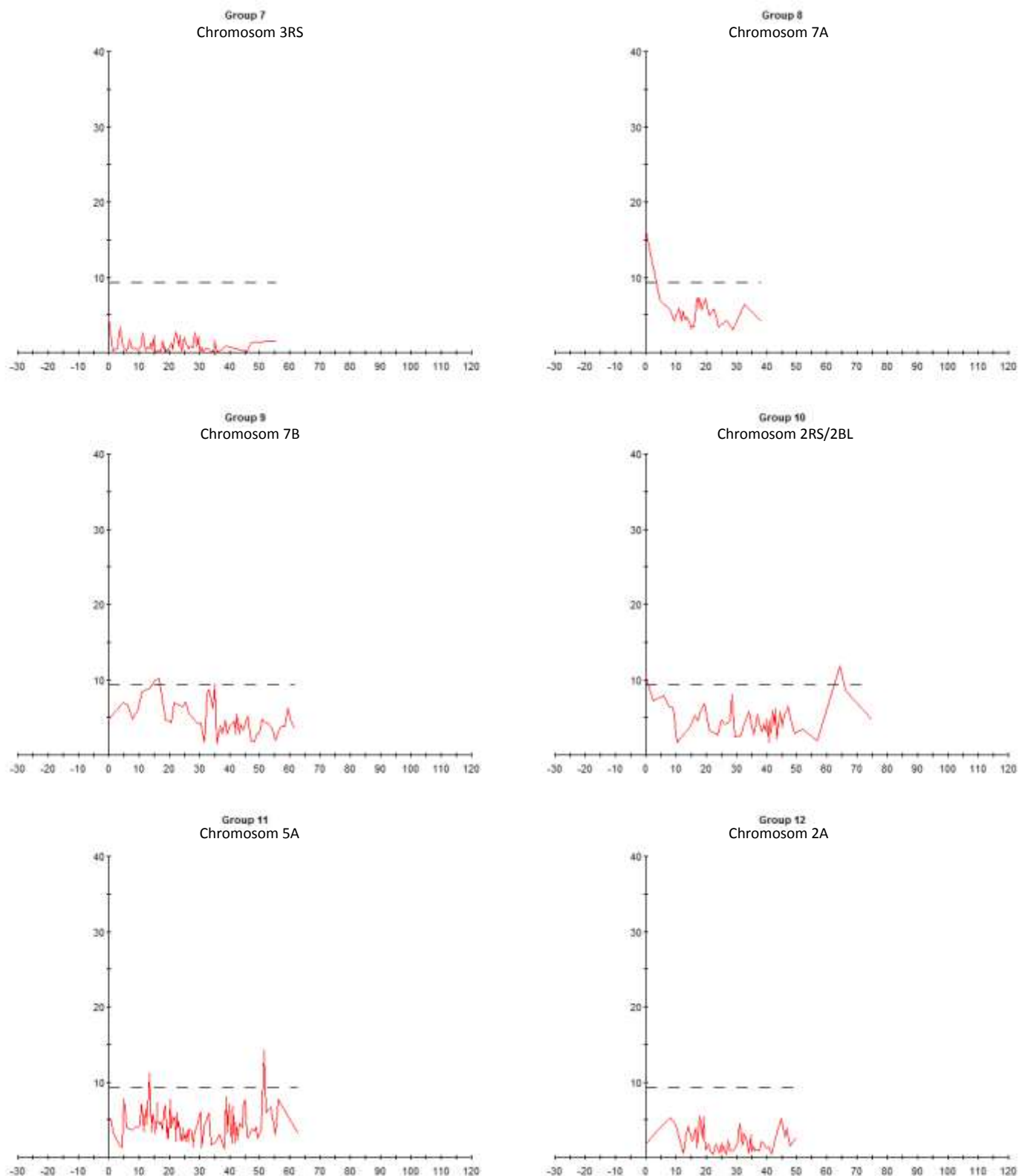
## [CMS-Salvo 15/1 T x DAD182/00] F2



**Ryc. 5** Identyfikacja QTLi płodności na mapach grup sprzężeń 1-6 w populacji mapującej [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2

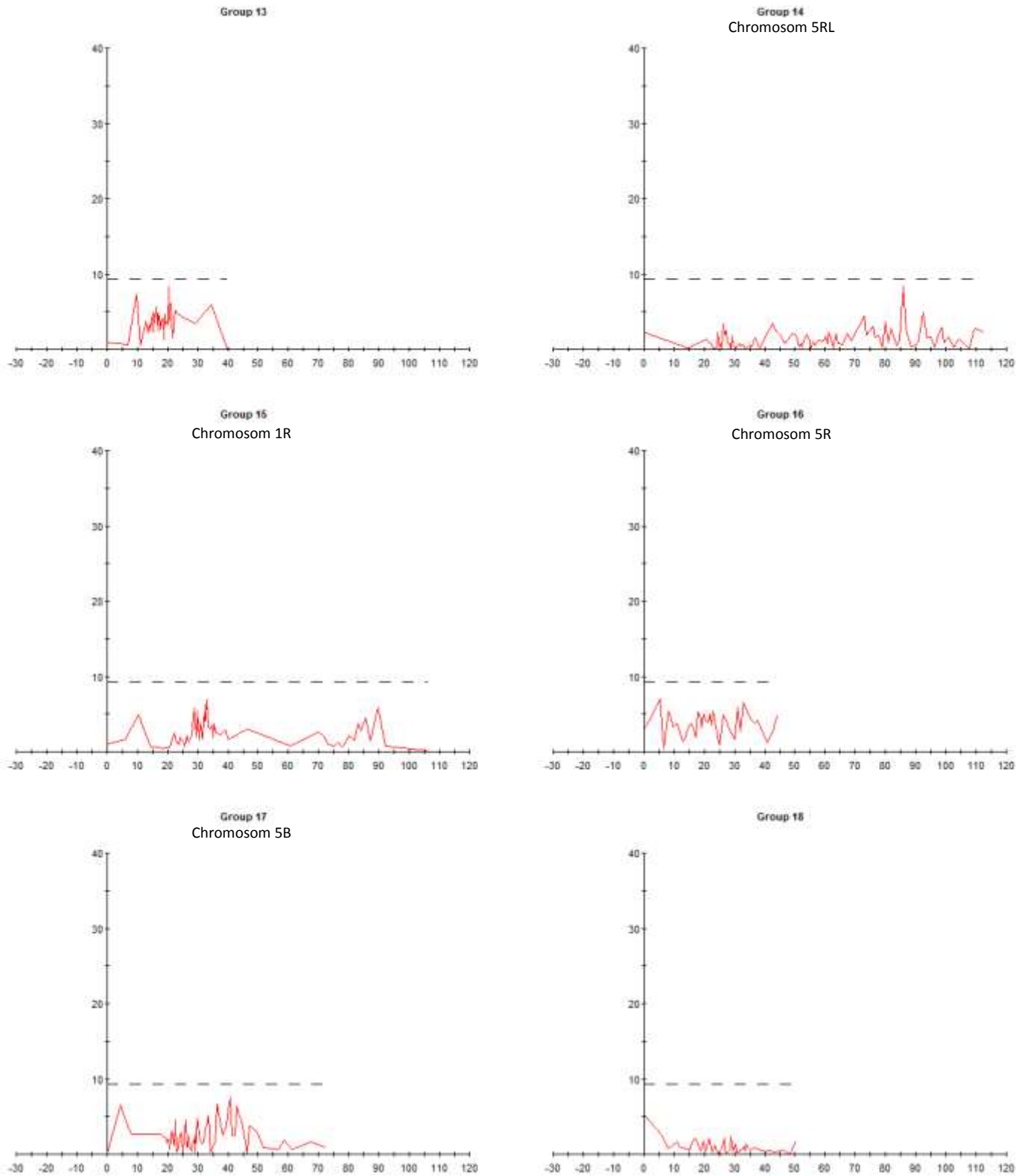


## [CMS-Salvo 15/1 T x DAD182/00] F2



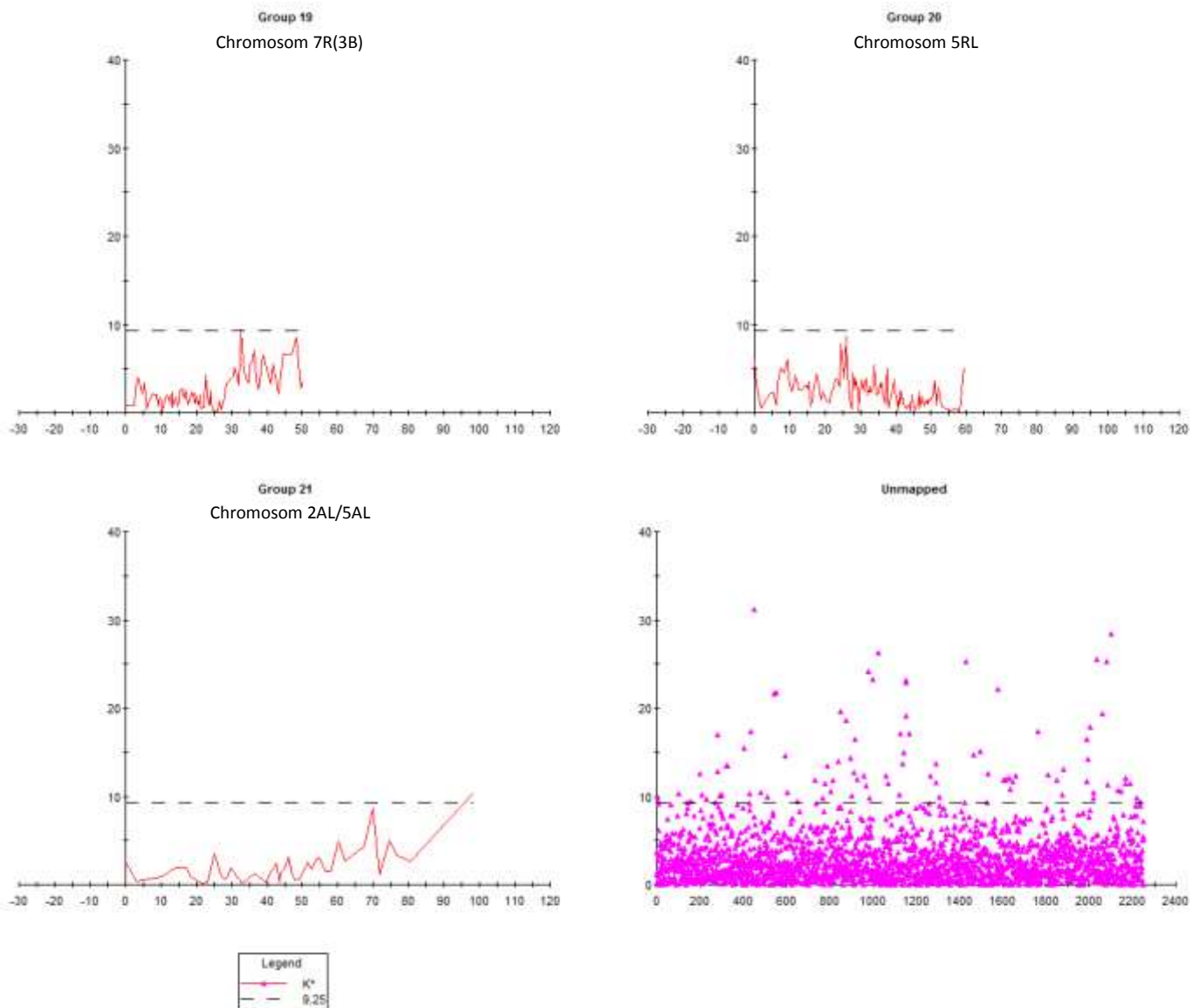
**Ryc.6** Identyfikacja QTLi płodności na mapach grup sprzężeń 7-12 w populacji mapującej [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2

## [CMS-Salvo 15/1 T x DAD182/00] F2



**Ryc.7** Identyfikacja QTLi płodności na mapach grup sprzężeń 13-18 w populacji mapującej [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2

## [CMS-Salvo 15/1 T x DAD182/00] F2



**Ryc. 8** Identyfikacja QTLi płodności na mapach grup sprzężeń 19-21 oraz wśród markerów niezmapowanych w populacji mapującej [CMS-Salvo 15/1 T x DAD282/00]F2

Podobnie, jak w przypadku populacji mapującej [CMS-Baltiko P x DAD282/00]F2, pewna grupa markerów wykazujących wysoce istotny statystycznie związek z pyleniem roślin znajduje się w obrębie markerów niezmapowanych. Poza wytypowanymi na wyżej opisanej mapie obszarami genomu pszenżyta znajdują się geny mające duże znaczenie dla męskiej płodności roślin pszenżyta z cytoplazmą T. timopheevi.

**Tabela 3.** Charakterystyka grup sprzężeń w populacji mapującej [CMS-Salvo T x DAD282/00]F2

Grupa sprzężeń	Chromosom	Liczba markerów	Długość mapy [cM]	Wartość K max
1	6R	124	48	23,87*
2	6RL	117	53	39,89*
3	6RS	64	93	6,73
4	4R	55	71	3,28
5		28	46	4,36
6		28	33	6,40
7	3RS	64	55	4,63
8	7A	27	38	16,24*
9	7B	53	62	10,13*
10	2RS/2BL	49	75	11,78*
11	5A	94	63	14,19*
12	2A	56	50	5,56
13		35	40	8,28
14	5RL	99	112	8,40
15	1R	57	106	6,91
16	5R	40	44	6,99
17	5B	59	72	7,49
18		49	50	5,22
19	7R(3B)	84	50	9,40*
20	5RL	113	59	8,69
21	2AL/5AL	41	98	10,38*
Niezmapowane	-	2252	-	31,22*

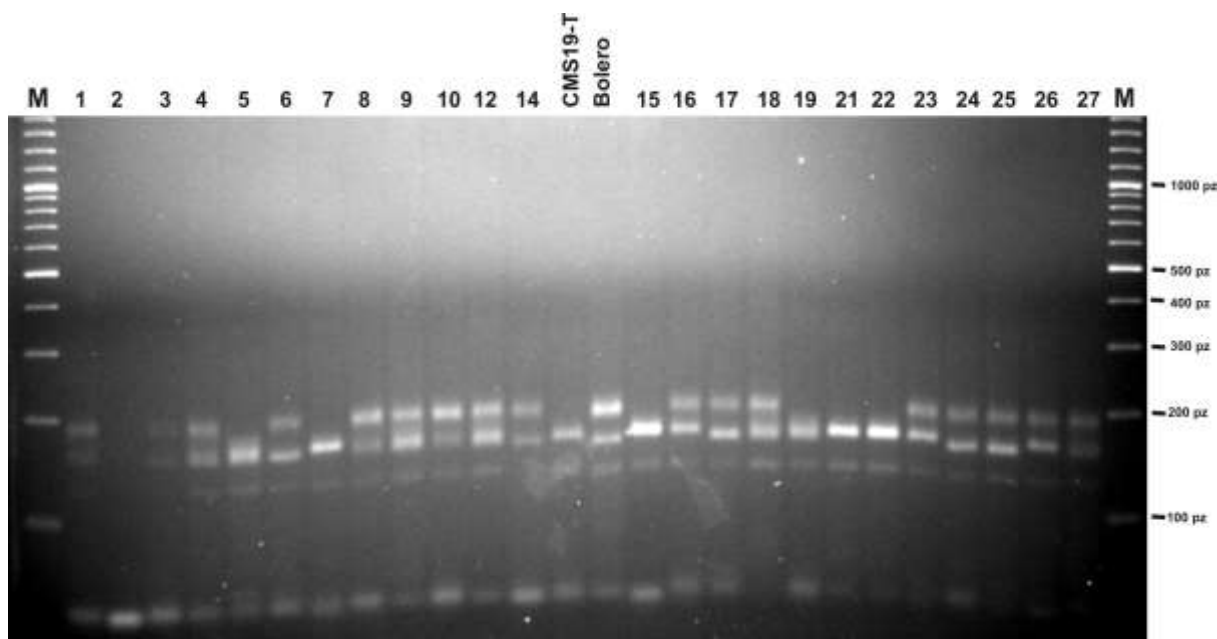
\* - statystycznie istotne

#### Temat badawczy 2

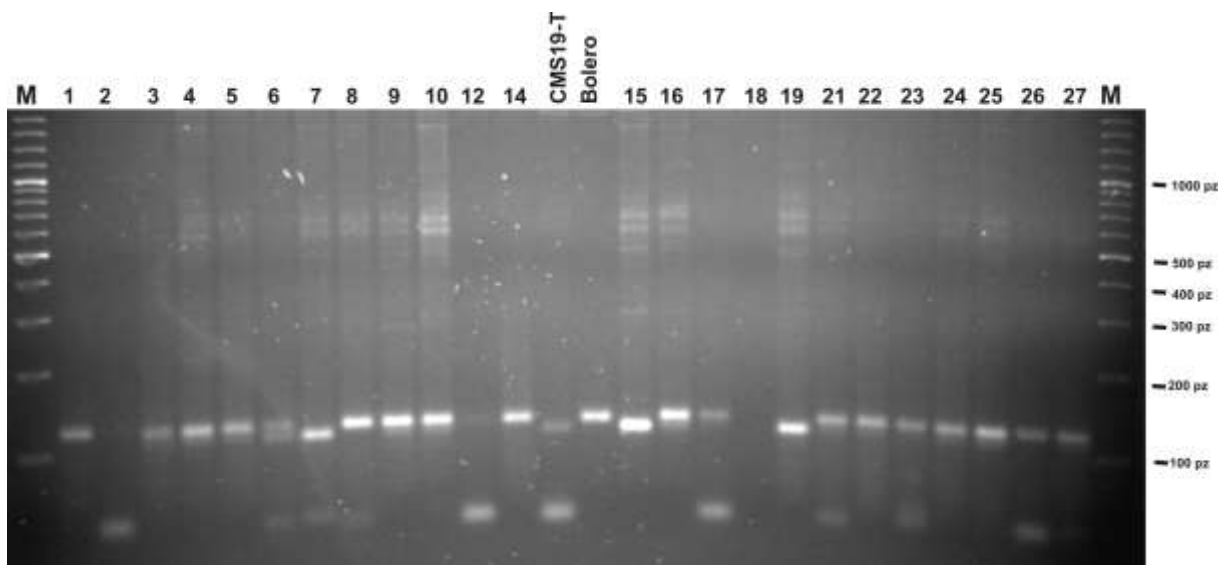
Identyfikacja przydatnych dla hodowli markerów molekularnych wykazujących sprzężenie z genami kontrolującymi męską płodność u pszenżyta z cytoplazmami *T. timopheevi*, CMS-Pampa. Weryfikacja skuteczności tych markerów w obrębie różnych genetycznie mieszańców.

Wśród testowanych 45 par starterów SSR i COS, dwadzieścia siedem nie ujawniało polimorfizmu między liniami rodzicielskimi populacji mapujących (cztery nie dawały produktów amplifikacji, pozostałe dawały produkty monomorficzne). Spośród markerów polimorficznych dla mieszańców między liniami CMS-19 z restorerem Bolero 14/1 wybrano dwanaście markerów do analiz w pełnej populacji mapującej. Były to następujące pary starterów: Swes 217, Swes 209, Swes 131, Swes 135, Xgwm47.1, Xgwm77, Xgwm95, Xgwm120, Xgwm219, Xgwm213, Xgwm332, Xgwm617.

Zastosowane startery generowały produkty polimorficzne w obrębie analizowanych populacji F<sub>2</sub>. Większość roślin pokolenia F<sub>2</sub> charakteryzowała się obecnością produktu / ów charakterystycznego tylko dla jednej z form rodzicielskich (markery dominujące), ale były też takie które posiadały produkty obu form rodzicielskich (markery kodominujące) (Ryc. 9-10; Tab.5-6). Więcej polimorficznych markerów SSR zidentyfikowano w obrębie populacji [CMS-19T x Bolero 14/1]F<sub>2</sub> (tab.5), nieco mniejszy polimorfizm był obserwowany w populacji z cytoplazmą Pampa [CMS-19P x Bolero 14/1] (tab.6). Część markerów dawała produkty PCR o ograniczonej stabilności, co objawiało się brakiem produktów PCR u niektórych genotypów lub trudnościami przy ich identyfikacji. Tego rodzaju markery mają ograniczoną przydatność w komercyjnej hodowli.



**Ryc. 9** Obraz produktów PCR uzyskanych przy użyciu starterów Xgwm47-f/r dla i roślin pokolenia F<sub>2</sub> (fragment analiz obejmujących genotypy 1-27) i ich form rodzicielskich: CMS19-T, Bolero. Elektroforezę prowadzono w żelu agarozowym o stężeniu 2,5% przez 4 h. M – wzorzec wielkości fragmentów DNA 100bp Plus (Fermentas)



**Ryc. 10** Obraz produktów PCR uzyskanych przy użyciu starterów Xgwm95-f/r dla i roślin pokolenia F2 (fragment analiz obejmujących genotypy 1-27) i ich form rodzicielskich: CMS19-T, Bolero. *Elektroforezę prowadzono w żelu agarozowym o stężeniu 2,5% przez 4 h. M – wzorzec wielkości fragmentów DNA 100bp Plus (Fermentas)*

**Tabela 5.** Wielkości polimorficznych fragmentów mikrosatelitarnych [pz] amplifikowanych z użyciem wyselekcjonowanych par starterów SSR w obrębie populacji mapującej [CMS-19T x Bolero 14/1]F2

Rodzice i nr rośliny F <sub>2</sub>	Swes 217	Swes 209	Swes 131	Swes 135	Xgwm 47.1	Xgwm 77	Xgwm 95	Xgwm 120	Xgwm 219	Xgwm 213	Xgwm 332	Xgwm 617
CMS 19T +O	182	306	249 239	404	169	-	128	144	182	156	253	192 164 121
Bolero O <sub>3</sub>	188	315	239	413	205 156	165	142	128	156	149	211	192
1	188	315	239	404	205 169	165	142	144	156	156 149	253 211	192 164 121
2	182	315 306	239	404	- -	165	142 128 ?	144	182 156	156 149	211	192 164 121
3	182	315 306	249	413	205 156	165	142	128	182 156	156 149	253	192 164 121
4	182	315 306	249 239	404	205 156	-	142	144	182	156 149	253	192 164
5	182	315 306	249	404	169	-	142	144	182 156	156 149	253	192 ? 164 ? 121 ?
6	182	306	249	404	205 156	-	142 128	128	182 156	156 149	253	192 ? 164 ? 121 ?
7	182	306	249	404	169	165	128	144	156	156 149	253	192 164 121
8	188	315	249 239	404	205 156	165	142	128	182	149	253	192 164 121
9	182	315 306	249	404	205 156	165	142	144	182 156 ?	156 149	253	192 164 121
10	182	315 306	249 239	404	205 156	165	142	144	182	156 149	253	192 164 121
12	182	315 306	249	413	205 156	-	142 ?	144	156	156	253	192 121
14	188	315	239	413	205 156	165	142	144	182	156	253 211	192
15	182	306	239	404	169	165	128	144	182 156	149	253 211	164 121
16	188	315 306	239	413	205 169	165	142	144	182 ? 156 ?	149	253	-
17	188	315 306	249 239	413	205 156	165	142	128	182 156	156 149	253	192 164 121
18	188	315 306	249 239	404	205 156	-	-	144	156	156 149	211	192 121
19	182	315 306	249	404	156	-	128	144	156	156 149	253	192
21	182	315 306	239	413	169	165	142	144	182 156	156 149	253 211	192 164 121
22	182	315 306	239	404	169	165	142	144	182 156	156 149	253 211	192
23	182	306	239	404	205 169	165	142	144	182	149	211	164
24	182	315	249 239	404	205 156	165	142	128	156	156 149	253 211	-

25	182	306	249 239	413	205 156	165	142	128	156	156 149	253 211	164
26	188	315 306	249 239	413	205 169	165	142	144	182 156	156	253	164
27	182	315	249	404	205 169	-	142	144	156	149	253 211	192 164
28	182	315 306	239	404	156	-	128	128	182	156 149	253 211	-
30	188	315 306	239	404	205 169	165	142	144	156	156	253 211	192 164 121
31	188	315	239	413	205 169	-	142	144	182 156	156 149	253 211	192 164
32	182	315 306	239	413	156	165	142 128	128	182 156	156	253	164 121
33	182	315 306	239	413	205 169	165	-	144	156	149	253 211	164 121
34	188	306	239	413	205 156	165	128	128	182 156	156 149	253	192 121
35	188	315 306	239	413	205 156	-	142	144	182 156 ?	156 149	253	192 121
38	188	306	249	404	205 169	-	142	144	156	156 149	253 211	164 121
39	188	306	249	404	205 169	165	142	144	182 156	156 149	253	192 164
40	182	315 306	249 239	404	205 156	165	142	144	182	156	253 211	164 121
41	182	315 306	249 239	413	205 156	165	142	144	156	156	253	-
42	182	306	239	413	169	165	128	144	182 156	156 149	253 211	164 121
43	182	306	249 239	404	156	165	128	128	182 156	149	253 211	192 164 121
44	182	315	239	413	205 156	-	128	144	182 156 ?	156	253 211	192 164
45	182	315 306	239	404	205 156	165	142	144	182	156	253	192
46	188	306	239	413	205 169	165	142	144	182 156	156	253	164
47	182	315	249 239	404	205 169	165	142	144	182 156	156	253	164 121
48	188 182	306	239	404	205 156	165	142	144	182 156	156	253	-
49	182	306	239	413	169	165	128	144	182	156 149	253 211	192 121
50	182	315 306	249	404	205 169	165	142 128 ?	144	182 156	156 149	253	164 121
51	182	306	249	413	156	165	128	128	182 156	149	253 211	-
52	188	315 306	249	413	205 156	-	142 128 ?	144	182 156	156	253 211	192 164
53	182	315 306	239	413	205 156	-	142 128?	144	156	149	253	164



54	182	315 306	249	413	205 156	-	142 128 ?	144	182 156	156	211	192 164
55	182	306	239	413	169	165	128	144	182 156	156 149	-	192 164
56	188	315	249 239	413	205 156	165	142	144	182 156	156	211	192 164 121
57	182	315 306	249	404	205 156	-	142	144	182 156	156 149	253	192 164 121
58	182	306	239	413	156	165	128	144	156	156 149	253	192 164 121
59	?	315 306	249 239	413	205 156	165	142	144	156	156	253	192 164 121
60	182	?	239	413	169	165	128	144	156	156	253	192 164 121
61	182	306	239	404	169	165	128	144	182 156	156 149	253	192 164 121
62	182	306	239	404	169	165	128	144	182 156	156 149	211	?
63	182	315 306	249	404	205 156	-	142 ?	128	182 156	156 149	211	192 164 121
64	188	315	239	404	205 156	165	142 ?	?	156	?	211	192 164 121
65	182	315 306	239	413	205 156	165	142 128	128	182	156	211	192 164 121
66	182	306	239	404	156	-	128	128	182 156	156	253	192 164 121
67	188	315	239	404	205 169	165	142	144	182 156	156	253	192 164 121
68	188	315	239	404	205 156	165	142	144	182 156	?	253	192 164 121
69	182	315 306	249 239	413	205 169	-	142	144	182	156 149	253	192 164 121
70	182	306	239	413	205 169	165	128	144	182 156	156 149	253	192 164 121
71	182	306	249	404	205 156	165	128	144	182	156 149	253	192 164
72	188 182	315 306	249	413	205 156	165	142	144	182 156	156 149	253	192 164
73	188 182	?	249	413	205 156	165	142	144	182 156	156 149	253	192 164 121
74	188	315	249	413	205 156	-	142	144	182 156	156 149	211	192 164 121
75	188 182	315	249	413	205 156	165	142	128	182	156 149	253	192 121

76	182	315	249	404	156	-	128	128	182 156	156	253	192
77	182	315 306	249 239	404	205 169	-	142	?	182	156	253	192 164 121
78	182	315 306	249 239	413	156	-	142	128	-	156 149	253	192 164 121
79	182	315 306	249	404	205 156	165	142	144	156	156	211	192 164 121
80	182	306	249 239	413	169	-	128	144	156	156 149	253	192 164 121
81	188 182	315 306	249	413	205 156	-	142	144	-	156 149	253 211	192 164 121
82	188 182	315 306	239	413	205 169	165	142	144	156	?	253	192 164 121
83	182	306	249	413	205 156	165	128	144	182 156	156 149	253	192 164 121
84	182	315 306	239	413	205 169	165	142	144	182 ?	156 149	253	192 164 121
36	182	306	239	413	169	-	128	144	-	156 149	253	192 164 121
87	182	315	239	413	169	165	128	128	156	156 149	211	192 164 121
88	188	315	249	404	205 169	-	142	144	182	156	253	192 164 121
89	182	315 306	239	413	205 169	165	142	144	156	156 149	253	192 164 121
90	188	315	249 239	404	205 169	-	142	144	182	156 149	253	192 164 121
91	182	315 306	249 239	413	205 156	165	142 128	128	156	156 149	253	192 164 121
92	182	306	239	404	169	-	128	144	182 156	156 149	253	192 164 121
93	188	315	249 239	413	205 156	-	142	144	182 156	156 149	253	192 164 121
94	182	306	249	413	169	-	128	144	156	156 149	253	192 164 121
95	188	?	249	404	205 169	165	142	144	156	156 149	253	192 164 121
96	188 182	315 306	249	404	205 156	-	142	128	-	156 149	211	192 164 121
97	188 182	315 306	249	404	205 156	-	142	144	182	156	253	192 164 121
98	188 182	315 306	249	404	169	165	142	144	156	156 149	211	192 164 121
99	188 182	315 306	249	413	205 156	165	142	128	182 156	156 149	253	192 164 121
37	188 182	315 306	249	404	205 169	-	142	144	182 156	156 149	211	192 164 121

- brak produktu amplifikacji

? trudność w zdefiniowaniu produktu amplifikacji

**Tabela 6.** Wielkości polimorficznych fragmentów mikrosatelitarnych [pz] amplifikowanych z użyciem wyselekcjonowanych par starterów SSR w obrębie populacji mapującej [CMS-19P x Bolero 14/1]F2

Rodzice i nr rośliny F <sub>2</sub>	Swes 217	Swes 209	Swes 131	Swes 135	Xgwm 47.1	Xgwm 95	Xgwm 120	Xgwm 219	Xgwm 213	Xgwm 617
<b>CMS 19P</b> ♀	182	306	249 239	404	169	128	144	182	156	192 164 121
<b>Bolero</b> ♂	188	315	239	413	205 156	142	128	156	149	192
1	182	315 306	239	413	205 156	142 128	?	182 156	156 149	164 121
2	188	315 306	249	404	205 169	142	144	182 156	156 149	?
4	182	315 306	249 239	?	205 169	?	144 128	182 156	156 149	121 164
5	188	315	249 239	404	205 156	142	144 128	182 156	156	192 164 121
6	182	315 306	249 239	404	205 156	142 128	144 128	182 ? 156	149	192 164 121
7	182	315 306	249 239	413	205 169	142 128	144	182 156	149	?
8	182	?	249 239	404	205 169	142 128	144 128	182 156	149	121
9	182	315 306	249	404	169, 205	142 128	144 128	182 156	156	164 121
10	188	315 306	239	404	205 169	142	144 128	182 ? 156	149	164 121
11	182	315 306	249 239	413	?	142 128	144	182 ? 156	156	121, 164, 192
12	188	315 306	249	404	205 169	142	144 128	182 156	156 149	164 121
13	182	315 306	249 239	413	?	142 128	144 128	182	156 149	164 121
14	182	315 306	249 239	404	205 169	142 128	144 128	182 156	156 149	121
15	182	315 306	249	404	205 156	142 128	144	182 156	149	192 164 121
16	182	315 306	239	413	205 169	142 128	?	182 156	156 149	121
17	182	315 306	249 239	413	169, 205	142 128	144 128	182 156	156	164 121
18	182	315 306	249 239	413	205 169	?	144 128	182	149	?
19	182	315 306	249 239	404	205 156	?	144 128	182	149	192 164 121
20	182	315 306	239	413	205 156	?	144	182	156	192 164 121
21	188	315	239	413	205 156	?	144	182	149	192 164 121
22	182	315 306	249 239	404	205 156	?	128	182 156	149	?
23	182	315 306	249 239	413	205 156	?	128	182	156	192 164 121
24	182	315 306	249 239	413	?	?	144	182 156	156	192

25	182	315 306	239	413	?	?	128	182 156	149	164 121
26	182	315 306	249 239	413	205 169	?	144	182 156	156 149	192 164 121
27	182	315 306	249 239	413	?	?	144 128	182 156	156	164
28	182	315 306	239	413	205 169	?	144 128	? 156	149	164 121
30	182	306	249	404	205 156	?	128	182 156	156	164
31	182	306	249 239	404	205 156	?	128	182 156	156 149	164 121
32	182	315 306	249 239	413	205 169	?	144	182 156	156 149	192 164 121
33	182	315 306	239	413	205 169	?	144 128	182 156	156	164 121
34	182	315 306	249 239	404	205 169	?	144	182 156	156	192 164 121
35	188	315	249 239	404	205 169	142	144 128	182 156	156 149	164 121
37	182	315 306	249 239	404	?	128	144 128	182	156 149	?
38	182	315 306	249 239	404	?	142 128	144	182 156	156 149	192 164 121
39	182	315 306	239	404	205 169	142 128	128	182 156	156 149	?
40	182	315 306	249 239	404	?	142 128	144	182 156	156 149	?
41	182	315 306	249 239	413	?	142 128	144	182 156	156 149	?
42	188	315	249 239	404	?	142	128	182	156 149	121
43	182	306	239	404	?	128	144 128	182 156	156	192 164
44	188	315	249 239	404	?	142	144 128	182 156	156	164 121
45	182	315 306	249 239	413	?	142 128	144 128	156	156	164
46	182	306	239	413	?	142 128	144 128	156	156	192 164 121
47	182	306	249	413	?	128	144 128	182 156	149	192 164 121

48	182	306	249 239	413	?	128	144 128	156	149	192 164 121
49	182	306	249 239	413	?	128	144 128	156	?	?
50	182	315 306	249 239	413	?	142 128	144	182	156	192 164 121
51	182	?	249 239	413	?	142 128	144 128	182	156	164
52	182	315 306	249 239	413	205 156	142 128	144 128	182	156 149	?
53	182	315 306	249	404	205 169	142 128	144 128	182 156	156 149	164
54	182	?	249 239	?	205 169	142 128	144 128	182 156	156 149	192 164
56	182	306	249 239	413	205 169	128	144 128	182 156	156 149	164 121
57	182	315 306	249 239	413	205 169	128 ?	128	182	156 149	164 121
58	182	315 306	249	413	205 169	128	128	182	156 149	164 121
59	182	315 306	249 239	404	205 169	?	144	182	?	164 121
60	182	306	249 239	404	205 169	128	144	182 156	?	?
61	182	306	239	413	205 169	128	144	182	156 149	164 121
63	182	315 306	239	413	205 169	142 128	144 128	182 156	156	164 121
66	188	315 306	249 239	413	205 156	128	144 128	182 156	156 149	164 121
67	188	306	239	413	205 156	142 128	144 128	182 156	156 149	192 164 121
68	182	315 306	239	?	205 156	142 128	? 128	182 156	156 149	?
69	182	315 306	239	404	205 156	142 128	? 128	182 156	156 149	192 164
70	188	315 306	239	413	205 156	?	144 128	182 156	156 149	192 164 121
71	188	315 306	249 239	413	205 156	?	144 128	182	156	?
72	182	306	249 239	413	205 156	?	?	182	156 149	164 121

73	182	315 306	249 239	413	205 156	?	?	182	156 149	164 121
74	182	315 306	239	413	205 156	?	?	182	156	164 121
76	188	315	249 239	413	205 156	?	144	182 156	156	192 164 121
77	182	?	249 239	413	205 156	?	144	182 156	156	?
78	182	?	239	413	205 156	?	128	182 156	156	164 121
79	182	?	249 239	413	205 156	?	144	182 156	?	192 164 121
80	188	315	249 239	413	205 156	?	128	182 156	?	164 121
81	182	315 306	249 239	413	205 156	?	128	182 156	?	164 121
82	182	?	249 239	413	205 169	?	144	182 156	?	164 121
83	182	306	249 239	413	205 169	?	144	182 156	?	164 121
84	188	315	249 239	413	205 156	?	144	182 156	?	164
85	182	306	249 239	413	205 156	?	?	182 156	?	164 121
86	182	306	249 239	?	205 156	?	144 128	182 156	?	164 121
87	182	306	249 239	?	205 156	?	144 128	182 156	?	164 121
88	182	?	249 239	?	205 169	?	?	?	?	?
89	188	315	239	413	205 169	142	144 128	?	?	164 121
90	182	315 306	249 239	404	205 169	142 128	144	?	?	164 121
91	182	315 306	249 239	413	?	142 128	144 128	?	?	164 121
92	182	315 306	249	413	?	142 128	144	?	?	164 121
93	182	315 306	249 239	?	?	142 128	144 128	?	?	164 121
94	182	306	249 239	?	?	142 128	144	?	?	164 121
95	182	315 306	249 239	?	?	142 128	144 128	?	?	164 121
96	182	306	249 239	413	?	142 128	144 128	?	?	164 121
97	188	315	249 239	404	?	142	144 128	?	?	164 121
98	182	315 306	249 239	?	?	142 128	144 128	182	?	164 121
99	182	306	249 239	?	?	142 128	144 128	182 156	?	164 121
100	182	306	249 239	413	?	142 128	144 128	?	?	164 121

29	182	306	249 239	404	?	142 128	144 128	156	?	164 121
65	182	315 306	249 239	?	?	142 128	144	?	?	164 121
55	182	306	239	?	?	128	144 128	?	?	164 121
36	182	306	249 239	?	?	128	144 128	182	?	164 121

- brak produktu amplifikacji

? trudność w zdefiniowaniu produktu amplifikacji

### Temat badawczy 3

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

#### Asemlacja i adnotacja mtDNA linii 19N

Program NOVOPlasty złożył odczyty sekwencyjne tej linii w 23 kontigach. Rozmiar najdłuższego kontigu wyniósł 76 995 bp, natomiast najkrótszego – 257 bp. Na podstawie uzyskanych kontigów program złożył 10 alternatywnych wersji genomu mitochondrialnego (tab. 6). Spośród otrzymanych złożań dwa największe miały tę samą długość wynoszącą 393 070 bp. Najkrótsze złożenie miało rozmiar 275 235 bp.

**Tabela 6.** Długości złożań genomu mitochondrialnego linii 19N.

Długość [bp]	393070, 393070, 383288, 383288, 343631, 324674, 324674, 314892, 314892, 275235
--------------	--

Spośród dwóch najdłuższych złożań jedno zostało otrzymane z 11, a drugie z 13 kontigów. Adnotacja wykonana na bazie homologii sekwencyjnej z mtDNA pszenicy zwyczajnej (GenBank: AP008982.1) wykazała obecność w obydwu złożań takiego samego zestawu 49 genów (tab. 7). Spośród nich 42 wykazywało przynajmniej 95% homologię do odpowiednich genów pszenicy (tego typu zadnotowane geny traktowano jako kompletne). Do dalszych analiz wybrano złożenie otrzymane z 13 kontigów. Nie udało się zadnotować łącznie 10 genów – *ccmFN*, *cox3*, *matR*, *mttB*, *nad3*, *rpl2-p*, *rpl5*, *rps12*, *trnE* oraz *trnS-1*. Spośród tej puli dziewięciu genów – *ccmFN*, *cox3*, *matR*, *nad3*, *rpl2-p*, *rpl5*, *rps12*, *trnE* oraz *trnS-1* – nie wykryto nie tylko w obrębie wybranego złożań, ale również w żadnym spośród 23 wygenerowanych kontigów.

**Tabela 7.** Lista sekwencji kodujących (genów bądź ich fragmentów) zadnotowanych w obrębie wybranego złożań genomu mitochondrialnego linii 19N.

Rozmiar złożań [bp]	Sekwencje kodujące
393 070	<i>atp1</i> , <i>atp4</i> , <i>atp6</i> , <i>atp8</i> , <i>atp9</i> , <i>ccmC</i> , <i>ccmFC</i> , <i>cob</i> , <i>cox1</i> , <i>cox2</i> , <i>mttB</i> , <i>nad1</i> , <i>nad2</i> , <i>nad4</i> , <i>nad4L</i> , <i>nad5</i> , <i>nad6</i> , <i>nad7</i> , <i>nad9</i> , <i>orf173</i> , <i>orf349</i> , <i>orf359</i> , <i>rpl16</i> , <i>rps1</i> , <i>rps13</i> , <i>rps19-p</i> , <i>rps2</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7</i> , <i>rrn18</i> , <i>rrn26</i> , <i>rrn26-p</i> , <i>rrn5</i> , <i>trnA</i> , <i>trnC</i> , <i>trnD</i> , <i>trnF</i> , <i>trnfM</i> , <i>trnI</i> , <i>trnK</i> , <i>trnM</i> , <i>trnN</i> , <i>trnP</i> , <i>trnQ</i> , <i>trnS-2</i> , <i>trnS-3</i> , <i>trnW</i> , <i>trnY</i>

Spośród zidentyfikowanych sekwencji kodujących 36 stanowiły kompletne geny niepodzielone, z których 15 występowało w co najmniej dwóch różnych lokalizacjach w obrębie omawianego złożań (tab. 8, ryc. 11).

**Tabela 8.** Lista genów niepodzielonych zadnotowanych w obrębie wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii 19N z zaznaczeniem liczby kopii.

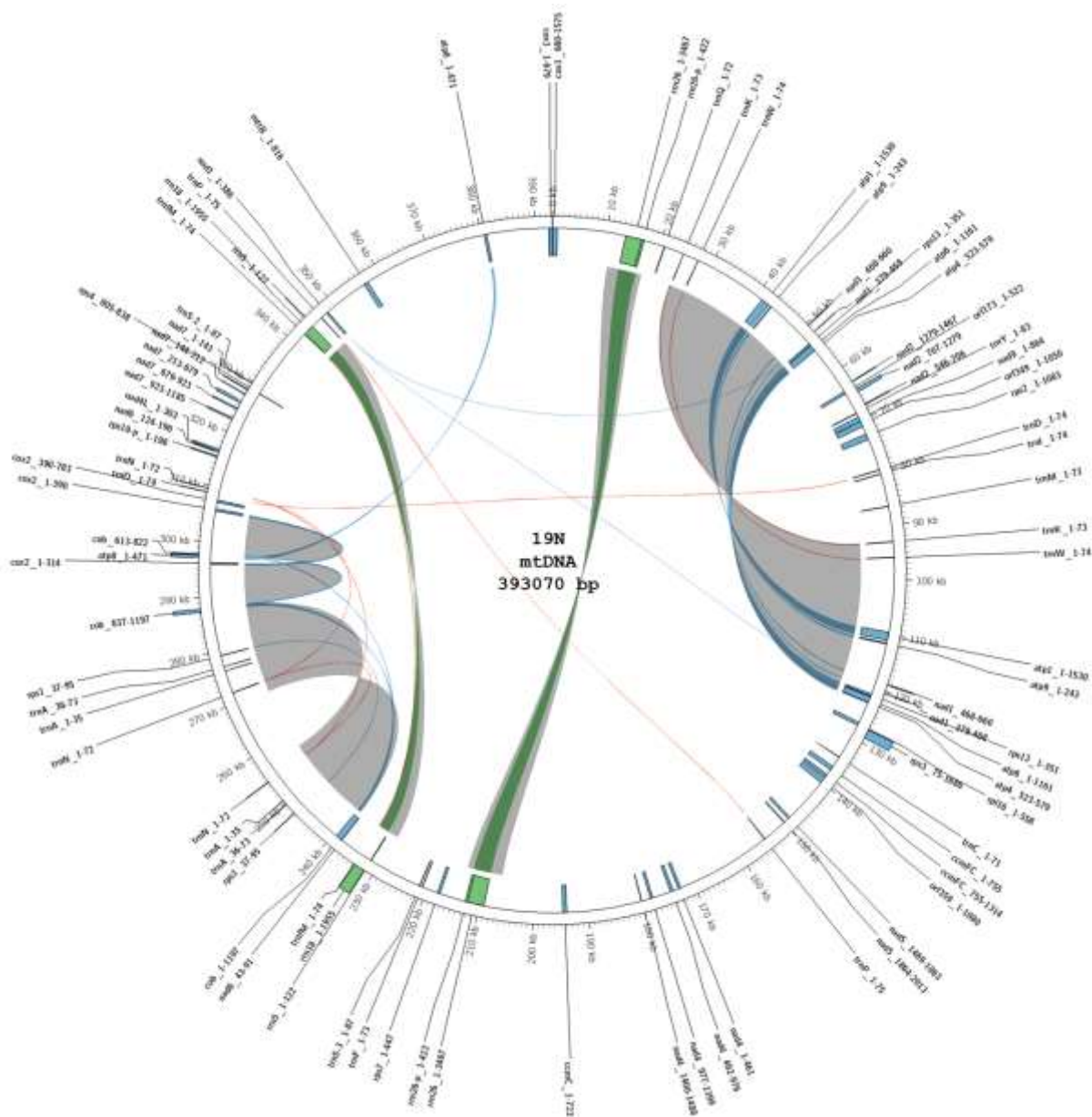
Gen	Liczba kopii	Gen	Liczba kopii	Gen	Liczba kopii
<i>atp1</i>	2	<i>rpl16</i>	1	<i>trnF</i>	1
<i>atp6</i>	2	<i>rps13</i>	2	<i>trnfM</i>	2
<i>atp8</i>	2	<i>rps19-p</i>	1	<i>trnI</i>	1
<i>atp9</i>	2	<i>rps2</i>	1	<i>trnK</i>	2
<i>ccmC</i>	1	<i>rps3</i>	1	<i>trnM</i>	1
<i>cob</i>	1	<i>rps7</i>	1	<i>trnN</i>	3
<i>mttB</i>	1	<i>rrn18</i>	2	<i>trnP</i>	2
<i>nad4L</i>	1	<i>rrn26</i>	2	<i>trnQ</i>	1
<i>nad9</i>	1	<i>rrn26-p</i>	2	<i>trnS-2</i>	1
<i>orf173</i>	1	<i>rrn5</i>	2	<i>trnS-3</i>	1
<i>orf349</i>	1	<i>trnC</i>	1	<i>trnW</i>	2
<i>orf359</i>	1	<i>trnD</i>	2	<i>trnY</i>	1

Adnotacja wykazała obecność sześciu kompletnych genów podzielonych. Większość z nich występowała jako pojedyncze kopie. Wyjątkiem był gen *trnA*, który występował w dwóch różnych lokalizacjach w obrębie wybranego złożenia (tab. 9, ryc. 11).

**Tabela 9.** Lista genów podzielonych zadnotowanych w obrębie wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii 19N z zaznaczeniem liczby kopii.

Gen	Liczba fragmentów (egzonów)	Liczba kopii
<i>ccmFC</i>	2	1
<i>cox1</i>	2	1
<i>cox2</i>	2	1
<i>nad4</i>	4	1
<i>nad7</i>	5	1
<i>trnA</i>	2	2





**Ryc. 11.** Graficzna prezentacja wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii 19N. Kolorem niebieskim oznaczono geny kodujące białka, kolorem zielonym – geny kodujące rRNA, kolorem pomarańczowym – geny kodujące tRNA. W centralnej części ryciny znacznikami taśmowymi wyróżniono sekwencje zduplikowane. Znaczniki kolorowe odpowiadają sekwencjom kodującym, natomiast szare – niekodującym.

### Asemlacja i adnotacja mtDNA linii CMS 19T

W wyniku asemlacji program NOVOPlasty złożył odczyty sekwencyjne tej linii w 21 kontigów. Rozmiar najdłuższego kontigu wynosił 131 005 bp, natomiast najkrótszego – 1 129 bp. Na podstawie uzyskanych kontigów program złożył 14 alternatywnych wersji genomu mitochondrialnego (tab. 10). Rozmiar najdłuższego złożenia wynosił 422 659 bp, natomiast najkrótszego – 41 715 bp.

**Tabela 10.** Długości złożenia genomu mitochondrialnego linii CMS 19T.

Długość [bp]	422659, 355443, 327747, 325763, 301473, 260531, 246740, 230851, 206561, 203182, 139946, 125554, 108270, 41715
--------------	---

Do dalszych analiz wybrano najdłuższe złożenie (422 659 bp) składające się z 14 kontigów.

W wyniku adnotacji, spośród 59 genów mitochondrialnych występujących u pszenicy (GenBank: AP008982.1), 52 zostały zidentyfikowane w obrębie wybranego złożenia linii CMS 19T (tab. 11). Spośród nich 47 wykazywało przynajmniej 95% homologię do odpowiednich genów pszenicy. Nie udało się zadnotować łącznie siedmiu genów – *ccmFC*, *ccmFN*, *cox1*, *matR*, *nad4*, *orf359* oraz *trnC*. Spośród tej puli genu *orf359* nie wykryto nie tylko w obrębie wybranego złożenia, ale również w żadnym spośród 21 wygenerowanych kontigów.

**Tabela 11.** Lista sekwencji kodujących (genów bądź ich fragmentów) zadnotowanych w obrębie wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii CMS 19T.

Rozmiar złożenia [bp]	Sekwencje kodujące
422 659	<i>atp1</i> , <i>atp4</i> , <i>atp6</i> , <i>atp8</i> , <i>atp9</i> , <i>ccmB</i> , <i>ccmC</i> , <i>cob</i> , <i>cox2</i> , <i>cox3</i> , <i>mttB</i> , <i>nad1</i> , <i>nad2</i> , <i>nad3</i> , <i>nad4L</i> , <i>nad5</i> , <i>nad6</i> , <i>nad7</i> , <i>nad9</i> , <i>orf173</i> , <i>orf349</i> , <i>rpl16</i> , <i>rpl2-p</i> , <i>rpl5</i> , <i>rps1</i> , <i>rps12</i> , <i>rps13</i> , <i>rps19-p</i> , <i>rps2</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7</i> , <i>rrn18</i> , <i>rrn26</i> , <i>rrn26-p</i> , <i>rrn5</i> , <i>trnA</i> , <i>trnD</i> , <i>trnE</i> , <i>trnF</i> , <i>trnFM</i> , <i>trnI</i> , <i>trnK</i> , <i>trnM</i> , <i>trnN</i> , <i>trnP</i> , <i>trnQ</i> , <i>trnS-1</i> , <i>trnS-2</i> , <i>trnS-3</i> , <i>trnW</i> , <i>trnY</i>

Spośród zidentyfikowanych sekwencji kodujących 43 stanowiły kompletne geny niepodzielone, z których 18 występowało w dwóch różnych lokalizacjach, natomiast 3 inne geny – *trnD*, *trnK* oraz *trnS-1* – występowały w trzech różnych lokalizacjach w obrębie złożenia (tab. 12, ryc. 12).

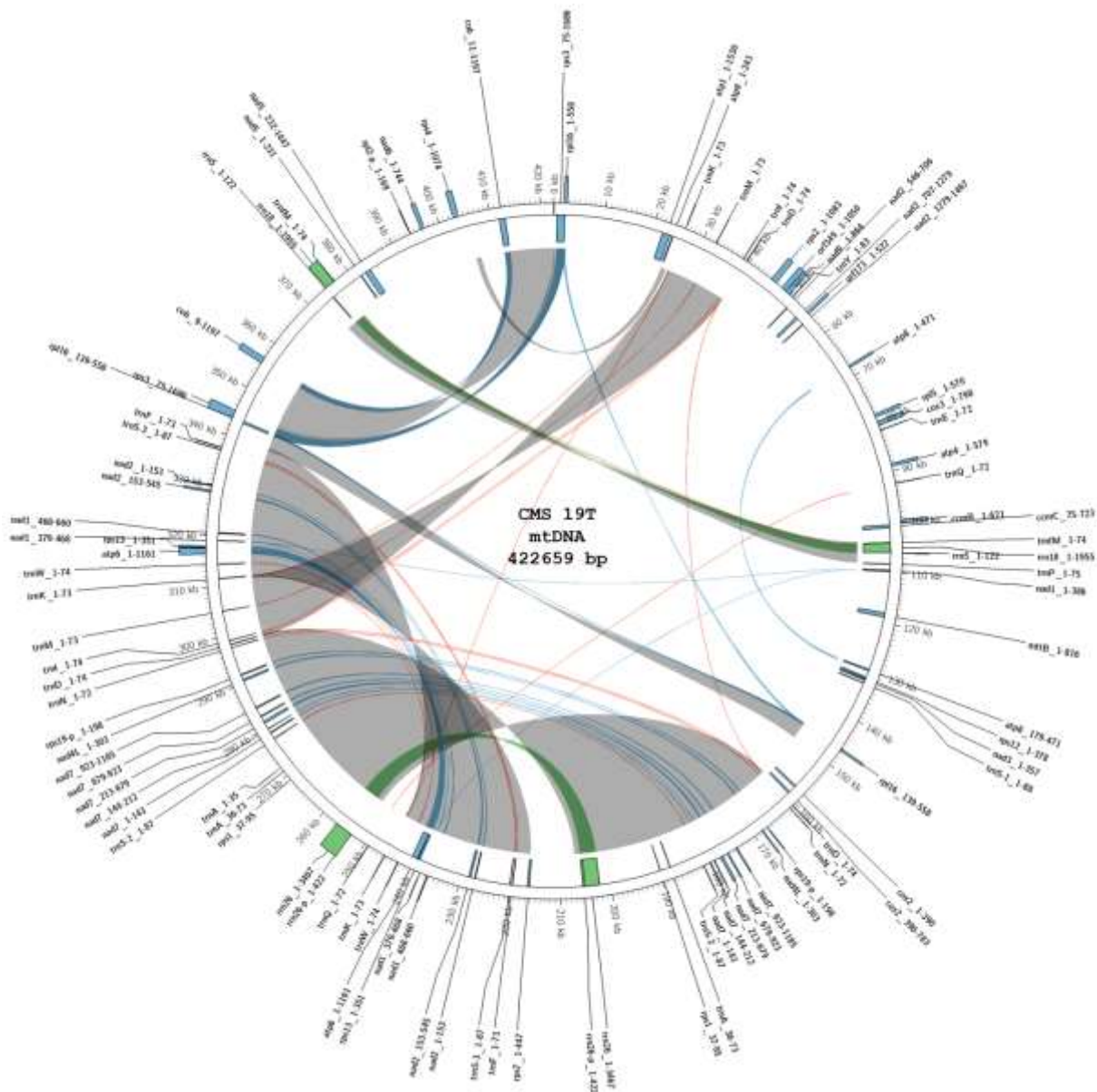
**Tabela 12.** Lista genów niepodzielonych zadnotowanych w obrębie wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii CMS 19T z zaznaczeniem liczby kopii.

Gen	Liczba kopii	Gen	Liczba kopii	Gen	Liczba kopii
<i>atp1</i>	1	<i>rpl16</i>	1	<i>trnD</i>	3
<i>atp4</i>	1	<i>rpl2-p</i>	1	<i>trnE</i>	1
<i>atp6</i>	2	<i>rpl5</i>	1	<i>trnF</i>	2
<i>atp8</i>	1	<i>rps12</i>	1	<i>trnfM</i>	2
<i>atp9</i>	1	<i>rps13</i>	2	<i>trnI</i>	2
<i>ccmB</i>	1	<i>rps19-p</i>	2	<i>trnK</i>	3
<i>cob</i>	2	<i>rps2</i>	1	<i>trnM</i>	2
<i>cox3</i>	1	<i>rps3</i>	2	<i>trnN</i>	2
<i>mttB</i>	1	<i>rps4</i>	1	<i>trnP</i>	1
<i>nad3</i>	1	<i>rps7</i>	1	<i>trnQ</i>	2
<i>nad4L</i>	2	<i>rrn18</i>	2	<i>trnS-1</i>	3
<i>nad6</i>	1	<i>rrn26</i>	2	<i>trnS-3</i>	2
<i>nad9</i>	1	<i>rrn26-p</i>	2	<i>trnW</i>	2
<i>orf173</i>	1	<i>rrn5</i>	2	<i>trnY</i>	1
<i>orf349</i>	1				

Adnotacja wykazała obecność czterech kompletnych genów podzielonych. Większość z nich była reprezentowana przez pojedyncze kopie. Wyjątkiem był gen *nad7*, który występował w dwóch różnych lokalizacjach w obrębie wybranego złożenia (tab. 13, ryc. 12).

**Tabela 13.** Lista genów podzielonych zadnotowanych w obrębie wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii CMS 19T z zaznaczeniem liczby kopii.

Gen	Liczba fragmentów (egzonów)	Liczba kopii
<i>cox2</i>	2	1
<i>nad2</i>	5	1
<i>nad7</i>	5	2
<i>trnA</i>	2	1



**Ryc. 12.** Graficzna prezentacja wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii CMS 19T. Kolorem niebieskim oznaczono geny kodujące białka, kolorem zielonym – geny kodujące rRNA, kolorem pomarańczowym – geny kodujące tRNA. W centralnej części ryciny znacznikami taśmowymi wyróżniono sekwencje zduplikowane. Znaczniki kolorowe odpowiadają sekwencjom kodującym, natomiast szare – niekodującym.

#### Asemlacja i adnotacja mtDNA linii CMS 19P

W wyniku asemlacji program NOVOPlasty złożył odczyty sekwencyjne tej linii w 33 kontigach. Rozmiar najdłuższego kontigu wynosił 92 437 bp, natomiast najkrótszego – 460 bp. Na podstawie uzyskanych kontigów program złożył 118 alternatywnych wersji genomu mitochondrialnego (tab. 14). Najdłuższe złożenie genomu wynosiło 507 693 bp, natomiast najkrótsze – 51 153 bp.

**Tabela 14.** Długości złożeń genomu mitochondrialnego linii CMS 19P.

Długość [bp]	507693, 501740, 501740, 507693, 502241, 508194, 508194, 502241, 460295, 454342, 460295, 454342, 460796, 338841, 339341, 520061, 433425, 520061, 513607, 514108, 433926, 427472, 513607, 345295, 514108, 514108, 460796, 454843, 427973, 454843, 345294, 519560, 433926, 339342, 519560, 519560, 513607, 427973, 520061, 344794, 346956, 421408, 326974, 352909, 421408, 332927, 427361, 427361, 333428, 434427, 351358, 327475, 428474, 345405, 380074, 439840, 439840, 265073, 386027, 445793, 380575, 380575, 386528, 271026, 386528, 279576, 445793, 439339, 285529, 445292, 286030, 253096, 265074, 410012, 246642, 351859, 271027, 298007, 363225, 357272, 303960, 280077, 345906, 271527, 440341, 252595, 247143, 410012, 446294, 265574, 381076, 363726, 387029, 265575, 357773, 271528, 298508, 304461, 342543, 253207, 335744, 259160, 235246, 259661, 253708, 336245, 205809, 253677, 211762, 212263, 206310, 167777, 161479, 186208, 96761, 90808, 86395, 51153
--------------	--

W wyniku adnotacji, spośród 59 genów mitochondrialnych występujących u pszenicy (GenBank: AP008982.1), 50 odnaleziono w obrębie najdłuższego złożeń mtDNA pszenicy (tab. 15). Spośród nich 40 wykazywało przynajmniej 95%-ową homologię do odpowiednich genów pszenicy. Jednak adnotacja wykazała w drugim co wielkości złożeń większą liczbę kompletnych sekwencji kodujących (41 genów) aniżeli w najdłuższym złożeń (40 genów). Do dalszych analiz wybrano zatem złożeń o największej liczbie zadnotowanych kompletnych genów (501 740 bp). Złożeń to zostało otrzymane z 17 kontigów.

Nie udało się zadnotować łącznie 9 genów – *mttB*, *nad4L*, *orf349*, *rpl5*, *rps2*, *trnA*, *trnP*, *trnW* oraz *trnY*. Spośród tej puli geny *rpl5*, *trnA* oraz *trnW* nie występują nie tylko w obrębie wybranego złożeń, ale również w żadnym spośród 33 wygenerowanych kontigów.

**Tabela 15.** Lista sekwencji kodujących (genów bądź ich fragmentów) zadnotowanych w obrębie wybranego złożeń genomu mitochondrialnego linii CMS 19P.

Rozmiar złożeń [bp]	Sekwencje kodujące
501 740	<i>atp1</i> , <i>atp4</i> , <i>atp6</i> , <i>atp8</i> , <i>atp9</i> , <i>ccmB</i> , <i>ccmC</i> , <i>ccmFC</i> , <i>ccmFN</i> , <i>cob</i> , <i>cox1</i> , <i>cox2</i> , <i>cox3</i> , <i>matR</i> , <i>nad1</i> , <i>nad2</i> , <i>nad3</i> , <i>nad4</i> , <i>nad5</i> , <i>nad6</i> , <i>nad7</i> , <i>nad9</i> , <i>orf173</i> , <i>orf359</i> , <i>rpl16</i> , <i>rpl2-p</i> , <i>rps1</i> , <i>rps12</i> , <i>rps13</i> , <i>rps19-p</i> , <i>rps3</i> , <i>rps4</i> , <i>rps7</i> , <i>rrn18</i> , <i>rrn26</i> , <i>rrn26-p</i> , <i>rrn5</i> , <i>trnC</i> , <i>trnD</i> , <i>trnE</i> , <i>trnF</i> , <i>trnFM</i> , <i>trnI</i> , <i>trnK</i> , <i>trnM</i> , <i>trnN</i> , <i>trnQ</i> , <i>trnS-1</i> , <i>trnS-2</i> , <i>trnS-3</i>

Spośród zidentyfikowanych sekwencji kodujących 37 stanowiły kompletne geny niepodzielone, z których 17 występowało w co najmniej dwóch różnych lokalizacjach w obrębie wybranego złożeń (tab. 16, ryc. 13).

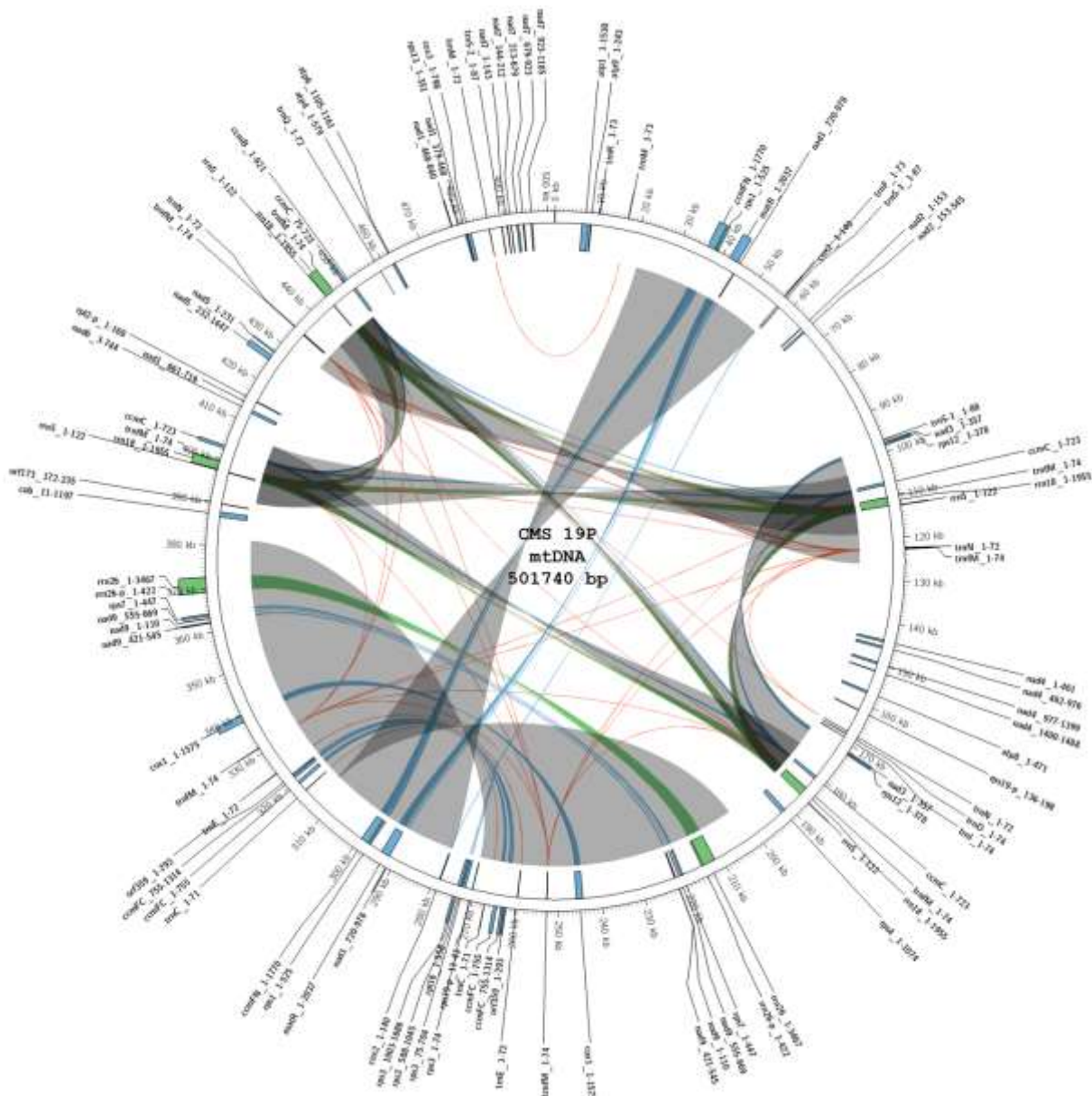
**Tabela 16.** Lista genów niepodzielonych zadnotowanych w obrębie wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii CMS 19P z zaznaczeniem liczby kopii.

Gen	Liczba kopii	Gen	Liczba kopii	Gen	Liczba kopii
<i>atp1</i>	1	<i>trnF</i>	1	<i>rps12</i>	2
<i>atp4</i>	1	<i>trnI</i>	1	<i>rps7</i>	2
<i>atp8</i>	1	<i>trnK</i>	1	<i>rrn26</i>	2
<i>atp9</i>	1	<i>trnQ</i>	1	<i>rrn26-p</i>	2
<i>ccmB</i>	1	<i>trnS-1</i>	1	<i>trnC</i>	2
<i>cob</i>	1	<i>trnS-2</i>	1	<i>trnE</i>	2
<i>cox3</i>	1	<i>trnS-3</i>	1	<i>trnM</i>	2
<i>nad6</i>	1	<i>ccmFN</i>	2	<i>ccmC</i>	3
<i>rpl16</i>	1	<i>cox1</i>	2	<i>trnN</i>	3
<i>rpl2-p</i>	1	<i>matR</i>	2	<i>rrn18</i>	4
<i>rps13</i>	1	<i>nad3</i>	2	<i>rrn5</i>	4
<i>rps4</i>	1	<i>rps1</i>	2	<i>trnfM</i>	8
<i>trnD</i>	1				

Adnotacja wykazała obecność czterech kompletnych genów podzielonych. Spośród nich jeden – *ccmFC* – występował w dwóch różnych lokalizacjach w obrębie omawianego złożenia (tab. 17, ryc. 13).

**Tabela 17.** Lista genów podzielonych zadnotowanych w obrębie wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii CMS 19P z zaznaczeniem liczby kopii.

Gen	Liczba fragmentów (egzonów)	Liczba kopii
<i>ccmFC</i>	2	2
<i>nad4</i>	4	1
<i>nad7</i>	5	1
<i>rps3</i>	4	1



**Ryc. 13.** Graficzna prezentacja wybranego złożenia genomu mitochondrialnego linii CMS 19P. Kolorem niebieskim oznaczono geny kodujące białka, kolorem zielonym – geny kodujące rRNA, kolorem pomarańczowym – geny kodujące tRNA. W centralnej części ryciny znacznikami taśmowymi wyróżniono sekwencje zduplikowane. Znaczniki kolorowe odpowiadają sekwencjom kodującym, natomiast szare – niekodującym.

### Identyfikacja polimorfizmów różnicujących mtDNA poszczególnych cytoplazm

Program Platypus uwidoczniał łącznie 88 polimorfizmów, spośród których dla 69 został określony genotyp u wszystkich trzech badanych cytoplazm. Spośród tych 69 polimorfizmów 33 to indele, a 36 to polimorfizmy typu MNP (ang. *multiple nucleotide polymorphism*). Nie stwierdzono obecności polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP, ang. *single nucleotide polymorphism*). Najdłuższe zidentyfikowane polimorficzne fragmenty DNA (od 13 do 66 bp) reprezentowały kategorię MNP. Wyjątkiem był pojedynczy indel fragmentu o długości 53 bp. Spośród omawianych 69 polimorfizmów, 30 występowało w obrębie sekwencji rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne.

#### 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*.

W 2018 roku temat realizowano wykonując następujące zadania:

#### 4.1. Tworzenie 4 linii alloplazmatycznych pszenżyta w 4 cytoplazmach poprzez krzyżowanie wsteczne z liniami dopełniającymi lub restorerami. Ocena linii z obcymi cytoplazmami pod względem męskiej płodności.

W 2018 roku wykastrowano przed kwitnieniem po 6 kłosów na każdej linii matecznej. W czasie kwitnienia zapyłono ręcznie wykastrowane i zaizolowane kłosa odpowiednią formą ojcowską, uzyskując kolejne pokolenie linii. Linie ojcowskie poddano ścisłemu chowowi wsobnemu zbierając ziarno po samozapyleniu z zaizolowanych kłosów na poszczególnych roślinach. Jednocześnie na roślinach każdej linii matecznej przed kwitnieniem zaizolowano po 5 kłosów w celu kontroli męskiej płodności.

Linia DAD 1 w każdej cytoplazmie była męskopłodna. Indeks restoracji zawierał się w granicach 70,0 – 95,0 %. Linia Salvo 15 była w pełni męskosterylna. Pozostałe dwie linie wykazały specyficzną reakcję na rodzaj cytoplazmy. Linia Baltiko 1 była męskosterylna w cytoplazmie *Pampa* i męskopłodna w cytoplazmie *Ae. sharonensis*, a linia Zorro 1 męskosterylna w cytoplazmach *Pampa* i *Ae. sharonensis* oraz męskopłodna w cytoplazmach *T. timopheevi* i *Ae. ventricosa* (tab. 19).

**Tabela 19.** Indeks restoracji (%) 4 linii pszenżyta w 4 cytoplazmach, 2018

Linia ojcowska	Cytoplazma			
	<i>T. timopheevi</i>	<i>Pampa</i>	<i>Ae. sharonensis</i>	<i>Ae. ventricosa</i>
DAD 1	80,0 (BC <sub>10</sub> )	90,0 (BC <sub>9</sub> )	95,0 (BC <sub>9</sub> )	70,0 (BC <sub>5</sub> )
Salvo 15	0,0 (BC <sub>10</sub> )	0,0 (BC <sub>9</sub> )	0,0 (BC <sub>6</sub> )	0,0 (BC <sub>10</sub> )
Baltiko 1	44,4 (BC <sub>7</sub> )	0,0 (BC <sub>9</sub> )	100,0 (BC <sub>6</sub> )	45,0 (BC <sub>5</sub> )
Zorro 1	85,0 (BC <sub>6</sub> )	0,0 (BC <sub>6</sub> )	0,0 (BC <sub>9</sub> )	77,8 (BC <sub>5</sub> )

BC – kolejne pokolenie linii

#### 4.2. Ocena płodności mieszańców F<sub>1</sub> z krzyżowania 4 linii męskosterylnych pszenżyta, każda w innej cytoplazmie (*T. timopheevi*, *Pampa*, *Ae. sharonensis*, *Ae. ventricosa*), z rodami pszenżyta oraz mieszańców F<sub>1</sub> pszenicy z cytoplazmą *T. timopheevi*.

Oceniono 1000 roślin pszenżyta należących do 40 mieszańców F<sub>1</sub> (średnio 25 roślin dla każdego mieszańca). Ocenę prowadzono w czasie kwitnienia i weryfikowano na podstawie zawiązania ziaren w 5 zaizolowanych kłosach. Prawie połowa mieszańców F<sub>1</sub> pszenżyta miała w dużym stopniu, choć nie w pełni, przywróconą męską płodność, na co wskazuje indeks restoracji ponad 80% i duża liczba ziaren zawiązanych w izolowanych kłosach (tab. 20). Rody ojcowskie użyte do tworzenia tych mieszańców mogą być dobrymi restorerami w hodowli heterozyjnej. Żaden mieszaniec F<sub>1</sub> w cytoplazmie *T.*



*timopheevi* i *Ae. ventricosa* nie był męskosterylny. Mieszańce z wykorzystaniem odmiany Kasyno i rodu DC 371, jako formy ojcowskiej, były męskosterylne w cytoplazmie *Pampa*. Mieszańce otrzymane z rodem DC 07221, jako formą ojcowską były męskosterylne w cytoplazmach *Pampa* i *Ae. sharonensis*. Pozostałe mieszańce miały nie w pełni przywróconą męską płodność, charakteryzując się indeksem restoracji od kilku do kilkudziesięciu procent.

Dwa mieszańce F<sub>1</sub> pszenicy z cytoplazmą *T. timopheevi*, spośród pięciu badanych, były w pełni męskosterylne (tab. 21). Pozostałe osadzały pojedyncze ziarna w wyniku samozapylenia. Badane rody ojcowskie użyte do ich tworzenia nie mają genów przywracających męską płodność.

**Tabela 20.** Indeks restoracji (IR, %) i liczba ziaren na kłos w zaizolowanych kłosach (LZ) u mieszańców F<sub>1</sub> otrzymanych w wyniku krzyżowań męskosterylnych linii pszenicy w różnych cytoplazmach z rodami, 2018

Forma ojcowska	Linia mateczna							
	(T) cms Salvo		(P) cms Baltiko		(A) cms Zorro		(V) cms Salvo	
	IR, %	LZ	IR, %	LZ	IR, %	LZ	IR, %	LZ
Kasyno	50,0	8,1	0,0	0,0	7,7	0,1	46,2	9,7
DC 371	52,0	16,9	0,0	0,0	4,0	0,1	56,2	13,7
DD 278	88,0	35,5	86,4	61,3	3,8	0,5	88,0	34,6
DC 719	59,6	22,7	96,0	55,9	98,1	52,5	62,0	25,9
DC 07221	52,0	9,1	0,0	0,0	0,0	0,0	46,0	7,4
DC 08065	88,0	37,0	84,0	43,0	82,0	35,8	87,0	40,3
DS 4550/10-1	87,5	44,4	88,0	53,8	96,2	54,4	94,2	49,9
DC 10047-229	43,8	2,8	6,0	0,1	18,0	1,6	45,5	2,6
DD 144	50,0	5,2	60,4	19,3	55,8	18,8	47,9	4,0
DD 167	88,5	43,0	18,0	1,3	38,0	7,8	91,7	45,8

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

**Tabela 21.** Indeks restoracji (IR, %) i liczba ziaren na kłos w zaizolowanych kłosach (LZ) u mieszańców F<sub>1</sub> otrzymanych w wyniku krzyżowań męskosterylnej linii pszenicy z rodami, 2018

Forma ojcowska	Linia mateczna - (T) cms Grana	
	IR, %	LZ
DNKO 28	0,0	0,0
DNKO 30	13,5	5,2
DNKO 33	4,0	0,1
DNKO 34	2,2	0,04
DNKO 37	0,0	0,0

T – *T. timopheevi*

Opublikowane streszczenia:

*M. Orłowska, M. Sobczyk, H. Góral, T. Warzecha, M. Simlat S. Stojalowski; "FERTILITY ASSESSMENT IN WINTER TRITICALE F2 HYBRIDS WITH DIFFERENT SOURCES OF CYTOPLASMIC MALE STERILITY"; 7th International Conference for Young Researchers, Multidirectional Research in Agriculture, Forestry and Technology, 16-17 April 2018, Kraków; str.45*