

WYNIKI
z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016 roku
Poszukiwanie wspólnych mechanizmów dziedziczenia płodności roślin z cytoplazmą
CMS - C oraz z cytoplazmą CMS-Pampa

Temat badawczy 1

Precyzyjne określenie na mapach genetycznych lokalizacji głównych genów restorerowych dla obu systemów CMS, identyfikacja genów pobocznych, porównanie lokalizacji.

Cel tematu badawczego 1

Ocena płodności roślin z genem Rfp1 obecnym w odmianie F1 i w mieszańcach z udziałem Rfp1 - porównanie lokalizacji badanego genu względem genu Rfc1 – cel osiągnięty

Materiały i metody (*opisać jak w publikacji*)

Materiałem badawczym ocenionym fenotypowo w 2016 roku były rośliny odmian mieszańcowych Visello F1, Palazzo F1, Skaltio F1 i Konto F1 (łącznie 400 roślin). Ocena fenotypowa została przeprowadzona w warunkach polowych w oparciu o obserwacje wzrokowe przy zastosowaniu skali bonitacyjnej Geigera i Morgensterna (1975). Oceniane rośliny zostały przed kwitnieniem zaizolowane przezroczystymi izolatorami z tofofanu w celu zweryfikowania poprawności obserwacji wzrokowych na podstawie oceny zawiązywania ziaren pod izolatorami. W oparciu o wyniki oceny fenotypowej oraz na podstawie charakterystyki odmian wytypowano odmiany w których występuje główny gen restorerowy Rfp1, oraz te, u których obecne są wyłącznie słabsze (poboczne) geny przywracające płodność.

Odmiana Visello F1, u której stwierdzono obecność genu Rfp1, została poddana genotypowaniu metodą DArTseq (wariant metody GBS). Metoda ta jest oparta o wykorzystanie technik NGS - sekwencjonowania nowej generacji (ang. *Next Generation Sequencing*) i polega na uzyskaniu z nowoczesnych, wysokowydajnych sekwenatorów DNA, danych, które po analizie bioinformatycznej służą do genotypowania roślin generując duże ilości markerów molekularnych, głównie z kategorii SNP (ang. *Single Nucleotide Polymorphism*). Zastosowany został wariant metody GBS o nazwie DArTseq, który został opracowany przez firmę Diversity Arrays Technology Pty (Canberra, Australia) i z sukcesem zaadoptowany do analiz genomu żyta.

Mapowanie genetyczne o charakterze porównawczym prowadzono na niebadanych dotąd osobnikach dwóch populacji mapujących: [544C x Ot0-20]BC5F2 z cytoplazmą C oraz [541P x IRAN IX]BC5F2 z cytoplazmą Pampa. Po około 90 osobników każdej z tych populacji wraz z formami rodzicielskimi poddano analizom przy użyciu markerów DArTseq. Dodatkowe osobniki z obu populacji mapujących poddano analizom przy użyciu markerów opartych o technikę PCR.

Konstruowanie grup sprzężeń wykonywano przy użyciu programu JoinMap 3.0 wykorzystującego algorytm Regression Mapping (RM). Grupowanie wykonywano w oparciu o funkcję LOD, a dystanse na mapach określano w centyMorganach (cM) przy zastosowaniu funkcji Kosmabi.

Wyniki (*opisać*)

Oceną fenotypową płodności objęto łącznie 400 roślin: 150 pochodzących z odmiany Visello F1, 100 z Palazzo F1, 50 ze Skaltio F1 i 100 z Konto F1. Zastosowano dwie metody oceny płodności, które dały bardzo wysoce skorelowane rezultaty (tab.1)

W każdej z odmian obecne były rośliny w pełni męskopłodne, częściowo płodne, jak i całkowicie męskosterylne. Przyjęto założenie, że przy obecności w danej odmianie silnego genu restorerowego Rfp1, częstotliwość roślin silnie pyłących będzie znacząca. Jedyną odmianą, u której ponad 50% roślin zostało ocenionych w skali Geigera i Morgensterna (1975) na 9 była odmiana Visello F1 (tab.2). W odmianie Palazzo F1 mniej więcej co trzecia

badana roślina wykazywała podobny poziom pylenia, a w odmianach Konto F1 i Skaltio F1 roślin o tak wysokim poziomie męskiej płodności prawie nie było.

Tabela 1

Współczynniki korelacji pomiędzy wynikami wzrokowej oceny pylenia roślin a oceną zawiązywania ziaren pod izolatorami

Nazwa odmiany	Współczynnik korelacji
Palazzo F1	0,94
Visello F1	0,81
Konto F1	0,79
Skaltio F1	0,89

Tabela 2

Wyniki oceny wzrokowej pylenia roślin odmian mieszańcowych (wg skali Geigera i Morgensterna)

Odmiana	Męskosterylne			Częściowo płodne			Męskopłodne			Suma
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Palazzo F1	0	1	30	16	9	4	2	2	36	100
Visello F1	0	4	23	12	11	6	3	6	85	150
Konto F1	0	1	32	24	16	10	7	4	6	100
Skaltio F1	0	1	17	15	5	2	1	4	5	50
Ogółem	0	7	102	67	41	22	13	16	132	400

Przy ocenie częstotliwości występowania w obrębie badanych odmian trzech podstawowych kategorii fenotypowych (rośliny męskosterylne, częściowo płodne i męskopłodne) również zauważalne jest bardzo efektywne przywrócenie męskiej płodności w odmianie Visello F1 (tab.3). Co prawda obserwowano tu obecność roślin sterylnych, ale stanowiły one niespełna 20% badanej grupy roślin, podczas gdy w każdej z pozostałych odmian udział roślin niepłodnych przekraczał 30%. Dotyczyło to m. in. odmiany Palazzo F1 zaliczanej do odmian oznaczanych symbolem „pollen plus”. Z drugiej strony w odmianie tej występowało stosunkowo dużo roślin męskopłodnych – stanowiły około 40% badanych genotypów.

Tabela 3

Procentowy udział roślin męskosterylnych, częściowo płodnych i męskopłodnych w badanych odmianach mieszańcowych żyta.

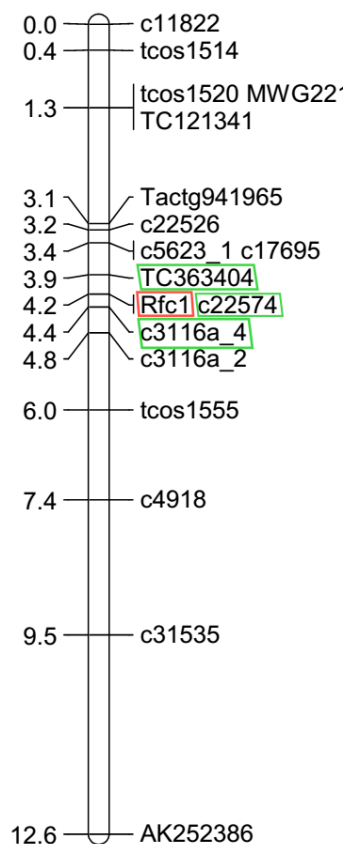
Odmiana	Męskosterylne	Częściowo płodne	Męskopłodne
Palazzo F1	31	29	40
Visello F1	18	19	63
Konto F1	33	50	17
Skaltio F1	36	44	20

Do analiz genotypowych przy pomocy techniki DArTseq wybrano losowo 90 roślin z odmiany Visello F1. Rośliny reprezentowały zróżnicowany poziom płodności. Zastosowana technika genotypowania pozwala na uzyskanie dwóch typów markerów: SNP, które wykazują charakter kodominujący (pozwalają na identyfikację heterozygot) oraz Silico-DArT o charakterze dominującym. W wyniku analiz otrzymano 23782 markery SNP oraz 55542 markery Silico-DArT. Dane te będą w kolejnych latach badań użyte do mapowania asocjacyjnego.

W roku 2016 kontynuowano prace nad zagęszczeniem i zwiększeniem rozdzielczości map genetycznych długiego ramienia chromosomu 4R, gdzie zlokalizowane są geny Rfp1 i Rfc1 (główne geny przywracające płodność żyta z cytoplazmami Pampa i CMS-C). Badaniem objęto dwie populacje mapujące: [544C x Ot0-20]BC5F2-3 z cytoplazmą C oraz [541P x IRAN IX]BC5F2 z cytoplazmą Pampa. Konstruowanie map genetycznych oparto o dwie metody: DArTseq oraz PCR.

Do analizy metodą PCR wykorzystano przede wszystkim udostępnione przez dr B. Hackaufa (Julius Kuhn Institut, Gross Luesewitz, Germany) markery COS (ang. Conserved Ortholog Set). Przetestowano ogółem 51 markerów spośród których 37 wykazywało polimorfizm w

obrębie populacji [544C x Ot0-20]BC5F2 i zostało użytych do skonstruowania szkieletowej mapy chromosomu 4RL (rys.2). Do dalszych badań na większej liczbie osobników wybrano 3 markery zlokalizowane w sąsiedztwie genu Rfc1.



Rys.2 Szkieletowa mapa genetyczna chromosomu 4RL wykonana przy zastosowaniu markerów cos. Zielonymi ramkami wskazano markery wybrane do analiz na poszerzonym zestawie osobników, czerwoną ramką wskazano lokalizację genu Rfc1.

Analizy populacji mapującej [544C x Ot0-20]BC5F2 metodą DArTseq dostarczyły danych o 33888 markerach SNP. Spośród tych markerów 5497 ujawniało polimorfizm genetyczny między liniami rodzicielskimi 544C i Ot0-20. Ze względu na przeprowadzone w trakcie tworzenia populacji mapującej krzyżowania wsteczne wypierające, większość markerów niezwiązanych z przywracaniem płodności zostało wyeliminowanych i tylko niespełna 15% spośród nich segregowało i zostało użyte do konstruowania mapy genetycznej. Mapowanie genetyczne przeprowadzono w oparciu o 783 markery DArTseq oraz 9 markerów otrzymanych metodą PCR. Utworzono grupę sprzężeń przy poziomie LOD=14, która liczyła 266 loci – 258 markerów DArTseq-SNP, 7 markerów PCR oraz locus Rfc1. Uzyskana w oparciu o te dane mapa genetyczna długiego ramienia chromosomu 4R została przedstawiona na rys.3.

Taka sama jak w populacji [544C x Ot0-20]BC5F2 ilość markerów DArTseq (33888) została otrzymana dla zawierającej cytoplazmę Pampa populacji [541P x IRAN IX]BC5F2. Ze względu na populacyjny charakter formy ojcowskiej IRAN IX, nie było możliwe oszacowanie liczby markerów różnicujących formy rodzicielskie. Do konstruowania mapy sprzężeń wybrano markery segregujące zgodnie z monogenicznym modelem dziedziczenia, który oszacowano statystycznie przy pomocy klasycznego testu Chi-kwadrat. Ostatecznie do mapowania użyto 737 markerów DArTseq-SNP oraz 3 markery otrzymane metodą PCR. Grupa sprzężeń użyta do skonstruowania mapy genetycznej została utworzona przy LOD=6 i zawierała 28 loci: locus Rfp1, 3 markery PCR (COS i SCAR) oraz 24 markery DArTseq-SNP. Mapa genetyczna długiego ramienia chromosomu 4R dla populacji mapującej [541P x IRAN IX]BC5F2 została zaprezentowana na rys. 4.

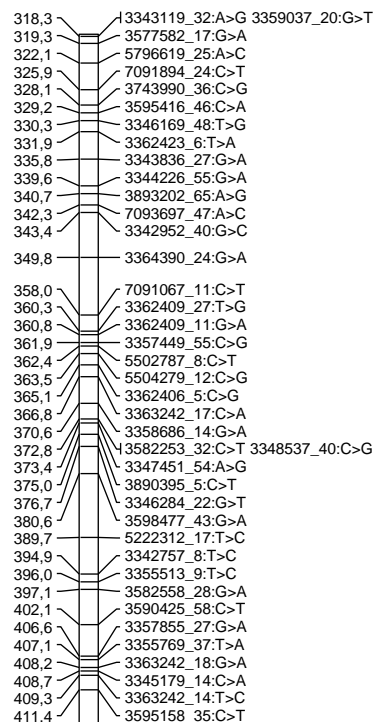
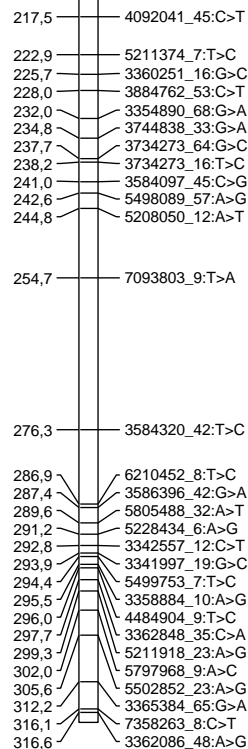
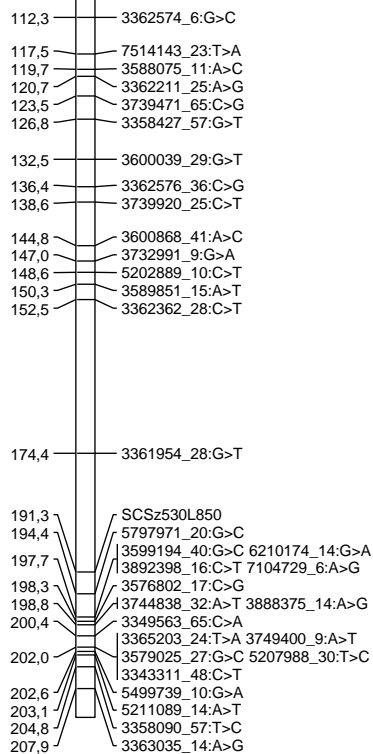
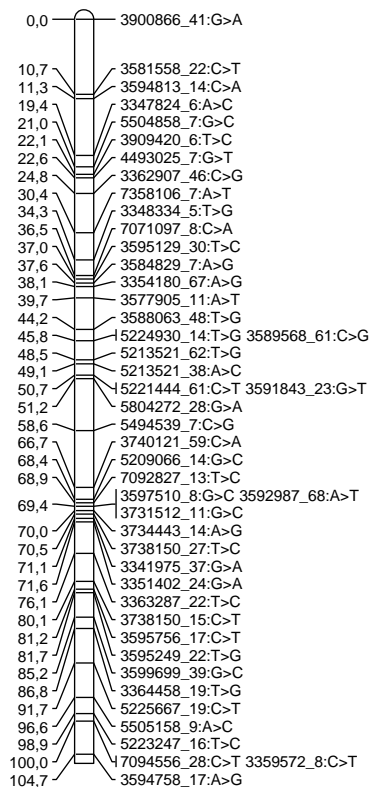
Utworzone mapy genetyczne dla obu badanych populacji mapujących zostaną w kolejnych latach badań użyte do skonstruowania map zintegrowanych, w których uwzględnione będą dane o segregacjach wszystkich znanych markerów w różnych populacjach mapujących.

4RL [1]

4RL [2]

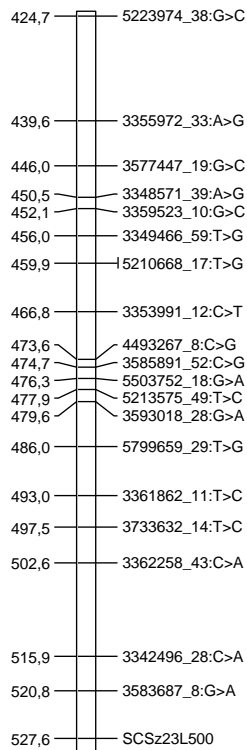
4RL [3]

4RL [4]

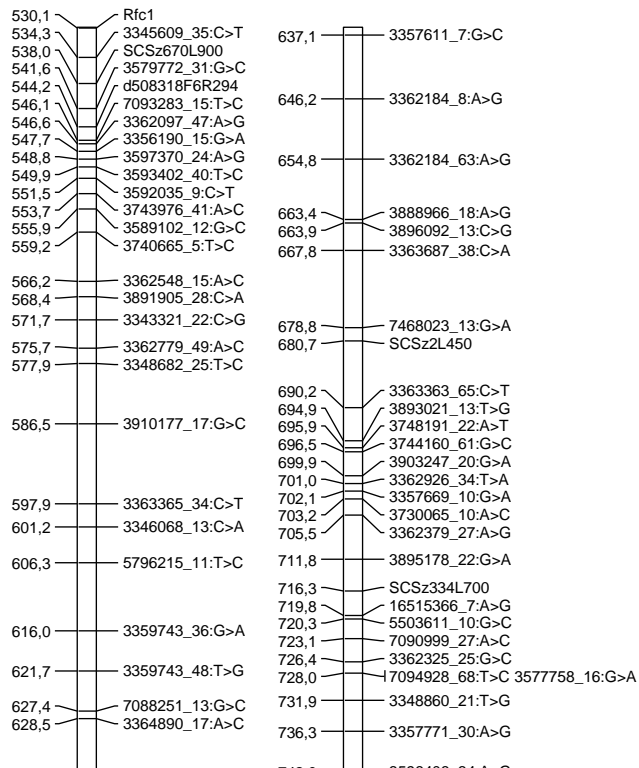


Rys.3a. Mapa genetyczna chromosomu 4RL w populacji [544C x Ot0-20]BC5F2 (cz.1)

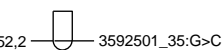
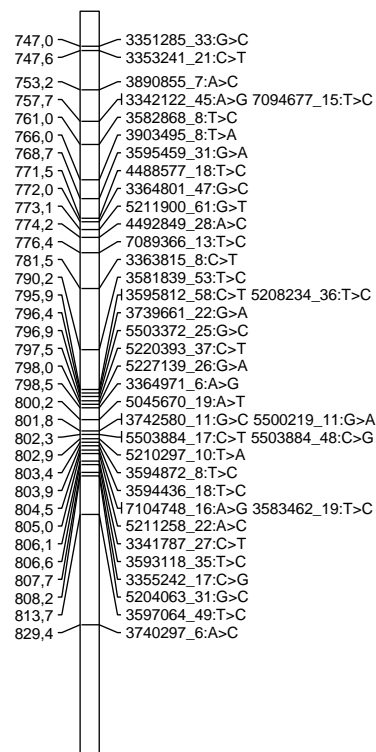
4RL [5]



4RL [6]

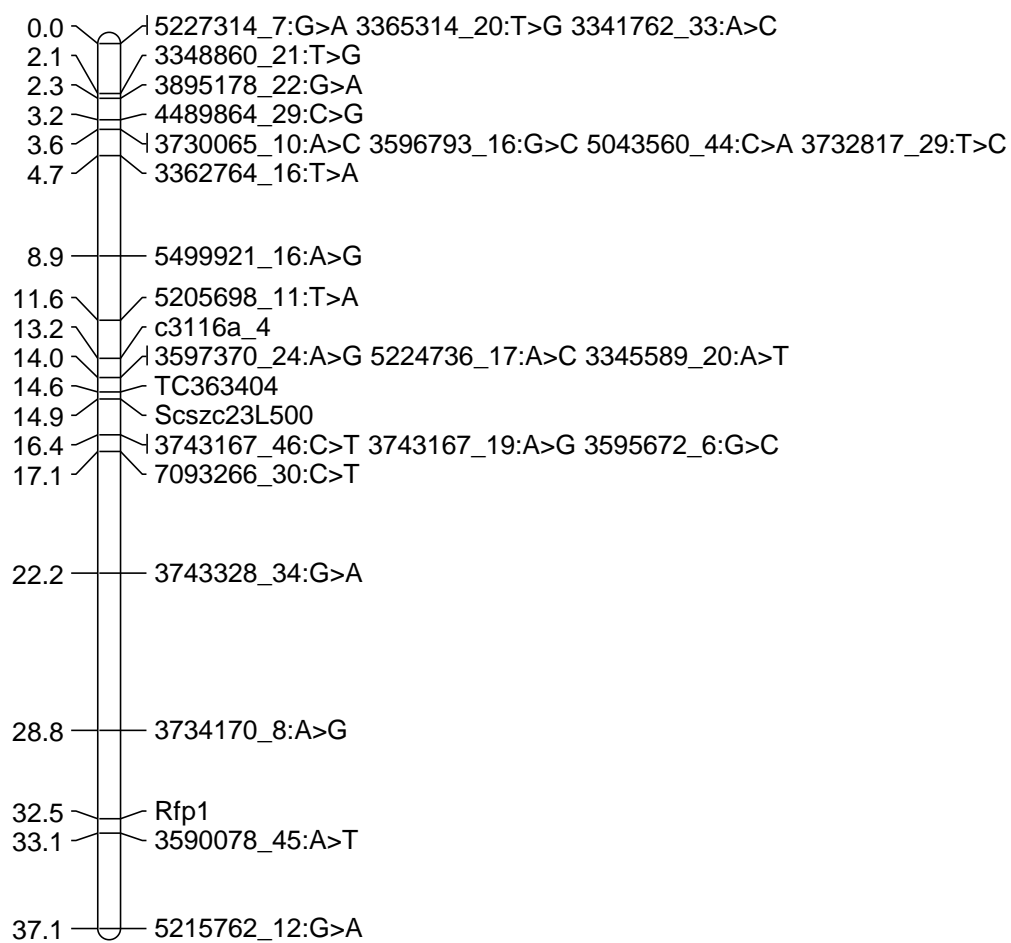


4RL [8]



Rys.3b. Mapa genetyczna chromosomu 4RL w populacji [544C x Ot0-20]BC5F2 (cz.2)

4RL



Rys.4. Mapa genetyczna chromosomu 4RL dla populacji [541P x IRAN IX]BC5F2

Dyskusja *(opisać jak w publikacji)*

Lokalizacja genu *Rfc1* na długim ramieniu chromosomu 4RL jest w pełni zgodna z wcześniejszymi doniesieniami (Stojałowski i in. 2004; 2011). W tym samym obszarze genomu żyta lokalizowano gen *Rfp1*, który w efektywny sposób przywraca płodność w mieszańcach żyta z cytoplazmą Pampa (Miedaner i in. 2000; Stracke i in. 2003; Hackauf i in. 2012). Hackauf i in. (2012) zmapowali w bliskim sąsiedztwie genu *Rfp1* szereg markerów PCR otrzymanych w oparciu o porównawczą analizę sekwencji DNA gatunków modelowych (ryż, kłosownica dwukłosa) i spokrewnionych z żytem zbóż (gł, jęczmień i pszenica). Markery te zostały określone nazwą Conserved Ortholog Set (COS). Ich zaletą jest duża transferowalność (ang. transfer-ability) – stosunkowo często jest możliwe wykrywanie polimorfizmu w różnych materiałach hodowlanych przy użyciu tego samego markera (Hackauf – inf. ustna).

Analizy fenotypowe w obrębie czterech odmian mieszańcowych wskazują, że dwie z nich (Skaltio F1 i Konto F1) nie posiadają wystarczająco silnych genów restorerowych. Przynajmniej przywracanie męskiej płodności u tych odmian jest możliwe dzięki mniej efektywnym genom restorerowym zlokalizowanym na chromosomach 1R (Wricke 1993) i 3R (Miedaner i in. 2000). Zgodne z obserwacjami Geigera i in. (1995), wpływ środowiska na płodność roślin żyta jest szczególnie istotny w obrębie form z częściowo przywróconą płodnością co czyni te odmiany wrażliwymi na niekorzystne czynniki klimatyczne, które mogą wystąpić w okresie kwitnienia. Odmiana Palazzo F1 prawdopodobnie posiada wprowadzony efektywny gen *Rfp1* z chromosomu 4RL (Miedaner i in. 2000; Stracke i in. 2003; Hackauf i in. 2012), ale występuje on u niespełna połowy roślin tej odmiany, a więc stosunkowo rzadko. Znacznie częściej gen *Rfp1* jest spotykany w roślinach odmiany Visello F1, stąd wybór tej odmiany do analiz genetycznych. Badania wykonane w obrębie odmiany Visello F1 stanowią wstęp do mapowania asocjacyjnego, które można będzie wykonać po zgromadzeniu danych z min. 300 niespokrewnionych genotypów.

Wnioski *(opisać jak w publikacji)*

Stwierdzono znaczne zróżnicowanie pod względem męskiej płodności u czterech badanych odmian mieszańcowych żyta. Odmiana Visello F1 charakteryzowała się najlepszym pyleniem, podczas gdy w odmianach Skaltio F1 i Konto F1 prawie nie występowały rośliny w pełni męskopłodne.

Potwierdzono przydatność markerów COS do konstruowania precyzyjnych map genetycznych żyta.

Temat badawczy 2

Identyfikacja mitochondrialnych czynników wywołujących męską sterylność w cytoplazmie Pampa i porównanie ich z genetycznymi determinantami warunkującymi męską nieplodność w cytoplazmie CMS-C.

Cel tematu badawczego 2

Podjęcie prób sekwencjonowania DNA mitochondrialnego z cytoplazm normalnej, Pampa i CMS-C – cel osiągnięty

Materiały i metody *(opisać jak w publikacji)*

W badaniach nad czynnikami mitochondrialnymi wykorzystane zostały dane sekwencyjne mtDNA otrzymane w roku 2015 z linii izogenicznych zawierających różne cytoplazmy: normalną, CMS-Pampa i CMS-C.

Wykonano analizy bioinformatyczne pozwalające na połączenie otrzymanego bogatego zbioru krótkich sekwencji (36-100nt) w dłuższe ciągi (tzw. contigi). W pierwszym etapie dokonano połączenia danych sekwencyjnych z oddzielnych zbiorów danych stanowiących powtórzenia analiz tych samych obiektów. Tak przygotowane pojedyncze zbiory danych dla każdej z badanych cytoplazm użyto do tworzenia kontigów. Z uwagi na brak sekwencji referencyjnej dla genomu mitochondrialnego żyta zastosowano metodę „de novo assemble”, czyli składanie sekwencji w dłuższe ciągi w oparciu o częściową zgodność pomiędzy końcowymi odcinkami fragmentów sekwencyjnych. Wykorzystano oprogramowanie Geneious 9. W celu uzyskania danych o wysokiej wiarygodności jako parametry graniczne przyjęto następujące wartości krytyczne: min. 25 nukleotydowe fragmenty wspólne dla łączonych odczytów przy min. 80% zgodności tych sekwencji i max. 1 nukleotydowymi przerwami (ang. gaps).

Przed planowanym łączeniem kontigów w skafoldy (dłuższe sekwencje wyższego rzędu) poddano je wstępnej ocenie jakościowej. W pierwszej kolejności dokonano tzw. „blastowania”, tj. przeszukano dostępne bazy danych i oceniono podobieństwo uzyskanych najdłuższych kontigów (po 10 kontigów dla każdej z cytoplazm) do dostępnych sekwencji DNA z innych gatunków roślin. Użyto algorytmu „megablast” na stronie National Center for Biotechnology Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). Następnie przy zastosowaniu oprogramowania Blast2Go rozszerzono analizy na mniejsze kontigi. Celem tych analiz była weryfikacja podobieństwa uzyskanych kontigów do sekwencji zdeponowanych w bazach danych. Druga metoda weryfikacji polegała na analizie sekwencji kontigów i zaprojektowaniu specyficznych starterów PCR. Uzyskanie amplikonów o przewidywanej wielkości przyjęto jako kryterium wskazujące na poprawność sekwencji DNA w analizowanym kontigu. Drugą metodę zastosowano wyłącznie dla wybranych sekwencji z mtDNA cytoplazmy C, zakładając możliwość kontynuowania badań z innymi cytoplazmami w kolejnych latach badań (decyzje uzależniono od skuteczności zastosowanej metody w badaniach w 2016 roku).

Wyniki *(opisać)*

W wyniku analiz „de novo assemble” dla każdej z cytoplazm uzyskano powyżej 1000 kontigów o bardzo zróżnicowanej długościach od około 1400 do ponad 98000 nukleotydów. Z uwagi na ogromną ilość danych, uwagę skoncentrowano na kontigach o największych długościach – powyżej 10000 nukleotydów. Po 10 najdłuższych kontigów dla każdej z cytoplazm poddano dokładniejszym analizom (tab.4). Najkrótsze z nich miały ponad 11000 nukleotydów, a wśród najdłuższych dwa miały ponad 60000, a jeden ponad 93000 nukleotydów.

Tabela 4

Ogólna charakterystyka 10 najdłuższych kontigów wygenerowanych po analizie „de novo assemble” dla każdej z badanych cytoplazm.

Cytoplazma	Min. długość	Max. długość	Łączna długość 10 kontigów
N	17 034	93 708	408 630
CMS-C	11 620	68 233	287 122
CMS-P	12 924	60 036	334 431

Łączna wielkość dziesięciu najdłuższych kontigów była najmniejsza dla cytoplazmy CMS-C (nieco ponad 287 tys. nukleotydów). Najlepsze efekty tego etapu analizy bioinformatycznej

otrzymano dla cytoplazmy normalnej – ponad 400 tys. nukleotydów ujętych w sekwencjach 10 kontigów (tab.4).

Analizy porównawcze z dostępnymi danymi w bazach danych ujawniały znaczne podobieństwo otrzymanych kontigów do różnych sekwencji mtDNA roślin, które zdeponowane są w bazach danych (tab. 5-7). Czasami jednak sekwencje te były również bardzo podobne do sekwencji DNA jądrowego - głównie było to podobieństwo z sekwencją kompletnego chromosomu 3B pszenicy (dane nie pokazane). W przypadku niektórych kontigów wyraźnie widać też słabe „pokrycie” – sekwencja kontigu tylko w obrębie określonego odcinka jest wysoce podobna do tej z bazy danych. Wśród fragmentów wykraczających poza to „pokrycie”, co miało miejsce przeważnie na końcach kontigów, stwierdzano czasami podobieństwo do innych sekwencji genomowych, plastydowych lub nawet pochodzących od mikroorganizmów. Może to wskazywać, że pewna część wyników analizy bioinformatycznej jest błędna, ale na obecnym etapie jest to wyłącznie hipoteza wymagająca weryfikacji w czasie dalszych analiz. Wyniki analiz „megablast” wskazują, że większość analizowanych kontigów powinna być poprawnie złożona.

Pewnym potwierdzeniem są tu również wykonane analizy weryfikacyjne oparte o metodę PCR. Wykorzystując dane o sekwencjach kontigów dla CMS-C zaprojektowano zestaw starterów i wykonano analizy PCR z użyciem mtDNA wszystkich trzech badanych cytoplazm. We wszystkich analizach PCR uzyskano produkty amplifikacji o oczekiwanych długościach. Produkty te były zasadniczo identyczne dla wszystkich analizowanych cytoplazm (rys.5). Jediną zaobserwowaną różnicą między cytoplazmami był dodatkowy, krótszy od oczekiwanego, produkt amplifikacji obecny w cytoplazmie C przy analizie PCR5.

Rozszerzona analiza „blast” obejmująca sekwencje spoza najdłuższych kontigów wykazała jednak, że część otrzymanych złożonych sekwencji o mniejszej długości wykazuje znaczące podobieństwo do DNA genomowego roślin, DNA plastydowego, a także sekwencji pochodzenia bakteryjnego lub od innych mikroorganizmów. Te ostatnie to przypuszczalnie rezultat kontaminacji badanych obiektów roślinnych (etiologowanych kiełków, z których izolowano DNA) przez mikroorganizmy już na etapie kolekcjonowania materiału biologicznego.

Tabela 5
Wyniki analizy megablast dla 10 najdłuższych kontigów żyta z cytoplazmą normalną

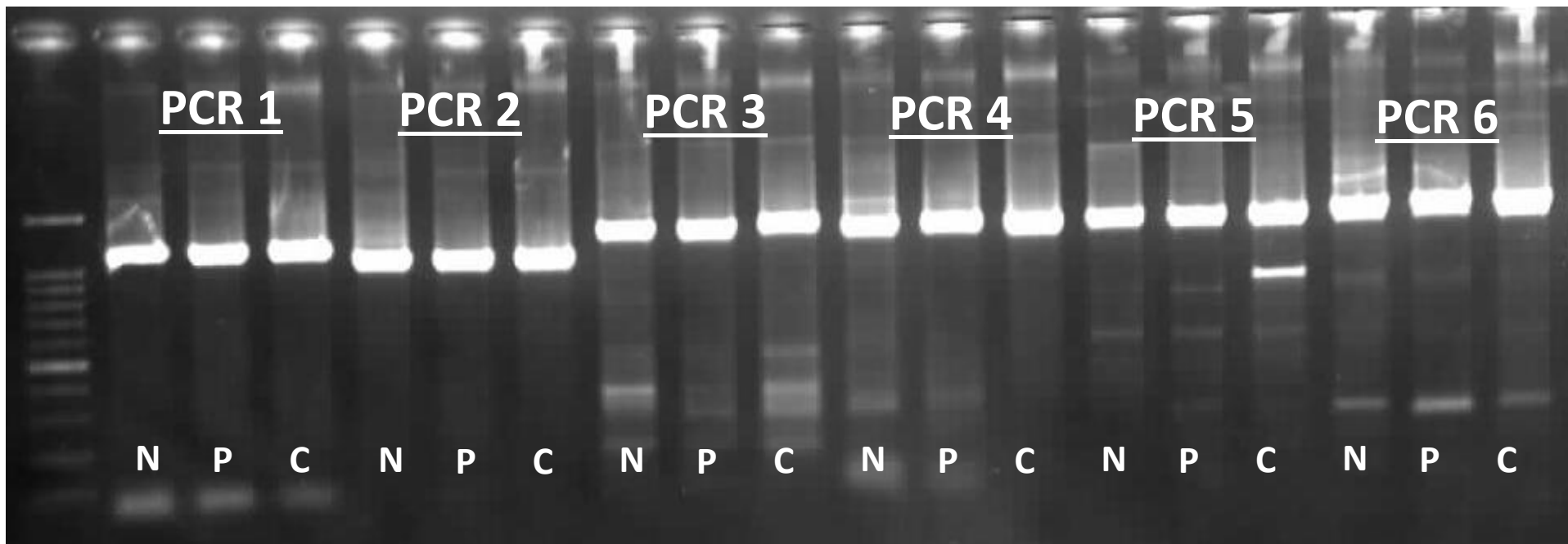
Kontig	Długość	Opis zidentyfikowanej sekwencji w bazie NCBI	„Pokrycie” kontigu przez zgodną sekwencję z bazy	E value	Procent zgodności kontigu z sekwencją z bazy	Kod akcesyjny do sekwencji w bazie danych
1	93708	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	81%	0	99%	GU985444.1
2	70784	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	92%	0	99%	AP013106.1
3	47276	Triticum aestivum cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome	77%	0	99%	EU534409.1
4	43790	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	58%	0	99%	AP013106.1
5	31672	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	76%	0	99%	AP013106.1
6	29483	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	94%	0	99%	AP013106.1
7	29974	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	76%	0	99%	GU985444.1
8	19251	Aegilops speltoides mitochondrial DNA, complete sequence	94%	0	99%	AP013107.1
9	25658	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	55%	0	99%	GU985444.1
10	17034	Lolium perenne mitochondrion, complete genome	69%	0	99%	JX999996.1

Tabela 6
Wyniki analizy megablast dla 10 najdłuższych kontigów żyta z cytoplazmą CMS-C

Kontig	Długość	Opis zidentyfikowanej sekwencji w bazie NCBI	„Pokrycie” kontigu przez zgodną sekwencję z bazy	E value	Procent zgodności kontigu z sekwencją z bazy	Kod akcesyjny do sekwencji w bazie danych
1	68233	Aegilops speltoides mitochondrial DNA, complete sequence	88%	0	99%	AP013107.1
2	34291	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	71%	0	99%	GU985444.1
3	28724	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	30%	0	99%	AP013106.1
4	28924	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	73%	0	99%	AP013106.1
5	29376	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	86%	0	99%	GU985444.1
6	25444	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	99%	0	99%	GU985444.1
7	18072	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	90%	0	99%	GU985444.1
8	21205	Aegilops speltoides mitochondrial DNA, complete sequence	92%	0	99%	AP013107.1
9	21233	Triticum aestivum cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome	90%	0	99%	EU534409.1
10	11620	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	99%	0	99%	AP013106.1

Tabela 7
Wyniki analizy megablast dla 10 najdłuższych kontigów żyta z cytoplazmą Pampa

Kontig	Długość	Opis zidentyfikowanej sekwencji w bazie NCBI	„Pokrycie” kontigu przez zgodną sekwencję z bazy	E value	Procent zgodności kontigu z sekwencją z bazy	Kod akcesyjny do sekwencji w bazie danych
1	60036	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	73%	0	99%	AP013106.1
2	58970	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	56%	0	99%	GU985444.1
3	66519	Aegilops speltoides mitochondrial DNA, complete sequence	79%	0	99%	AP013107.1
4	41285	Triticum aestivum cultivar Chinese Yumai mitochondrion, complete genome	80%	0	99%	EU534409.1
5	30637	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	82%	0	99%	GU985444.1
6	15509	Aegilops speltoides mitochondrial DNA, complete sequence	88%	0	99%	AP013107.1
7	16842	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	98%	0	99%	AP013106.1
8	16465	Triticum aestivum mitochondrion, complete genome	71%	0	99%	GU985444.1
9	12924	Triticum timopheevii mitochondrial DNA, complete sequence	49%	0	99%	AP013106.1
10	15244	Aegilops speltoides mitochondrial DNA, complete sequence	76%	0	99%	AP013107.1



Rys.5. Produkty amplifikacji otrzymane dla różnych cytoplazm żyta w analizach PCR wykorzystujących startery zaprojektowane w oparciu o sekwencje otrzymanych najdłuższych kontigów.

Dyskusja *(opisać jak w publikacji)*

Przyjmując, że mtDNA żyta powinno mieć wielkość porównywalną do spokrwnionej z żytem pszenicy, można zakładać, że badane najdłuższe kontigi zawierają informację genetyczną obejmującą większą część genomu mitochondrialnego. Ogihara i in. (2006) jako pierwsi skompletowali dane o sekwencji mtDNA pszenicy – złożony przez nich genom mitochondrialny liczył około 400 tys. nukleotydów. Zastosowana w opisywanych badaniach metoda sekwencjonowania oparta o urządzenie Illumina Hi-Seq 2000 pozwoliła na uzyskanie obszernych danych sekwencyjnych, ale długości pojedynczych odczytów nie przekraczały 100 nukleotydów. Tego rodzaju dane wymagają bardzo ostrożnie prowadzonej analizy bioinformatycznej, gdyż przy łączeniu tak krótkich sekwencji bardzo łatwo o popełnienie błędu. Wykonane analizy weryfikujące przeprowadzone dla najdłuższych kontigów zasadniczo wskazują, że kontigi powinny być w większości przypadków skonstruowane poprawnie, ale drobne błędy mogą być również obecne.

Wnioski *(opisać jak w publikacji)*

Uzyskano sekwencyjne długich kontigów, które zasadniczo wykazują znaczące podobieństwo do wcześniej poznanych genomów mitochondrialnych roślin.

Analizy PCR wstępnie potwierdziły poprawność wykonanej bioinformatycznej, ale na razie nie ujawniły polimorfizmów między cytoplazmami hodowlanymi żyta.

Temat badawczy 3

Określenie frekwencji alleli płodności dla cytoplazmy C i P w populacjach żyta ozimego.

Cel tematu badawczego 3

Określenie frekwencji roślin męskopłodnych i męskosterylnych w mieszańcach między źródłami CMS-C i CMS-P a polskimi populacjami żyta – cel osiągnięty

Materiały i metody *(opisać jak w publikacji)*

Badania nad frekwencją alleli sterility/płodności wykonano w oparciu o krzyżowania w izolowanych szkółkach typu top-cross lub w namiotach foliowych, gdzie formą mateczną były męskosterylne wersje linii 541 z cytoplazmami C i Pampa, a zapylaczami populacje z polskiej hodowli. Jako formy ojcowskie wykorzystano odmiany populacyjne: D. Amber, D. Diament, Armand, Stanko, Bosmo, Horyzo oraz populacje hodowlane: Szk.99, Szk.89, Szk.75, Szk.86. Uzyskane nasiona mieszańcowe wysiano jesienią 2015 roku na polu doświadczalnym ZUT w Szczecinie stosując rozstaw 20 x 20 cm. Ocenę męskiej płodności wykonywano wzrokowo przy zastosowaniu skali bonitacyjnej opracowanej przez Geigera i Morgensterna (1975). Ponadto, w celu uzyskania kolejnych mieszańców do oceny w następnym roku badań, wysiano cztery izolowane szkółki hodowlane typu top-cross z męskosterylnymi wersjami linii 541 z cytoplazmą P i C oraz zapylaczami w postaci populacji żyta oraz założono sześć namiotów foliowych z roślinami europejskich populacji i męskosterylnych testerów.

Wyniki *(opisać)*

W roku 2016 oceniono męską płodność u 2294 pojedynczych roślin mieszańcowych. Badane mieszańce zostały otrzymane w poprzednim sezonie wegetacyjnym w rezultacie zapylenia męskosterylnych wersji linii 541 z cytoplazmami C i P pyłkiem pochodzącym z polskich populacji żyta – zarejestrowanych odmian uprawnych populacji hodowlanych. Oceną objęto wyłącznie kombinacje mieszańcowe, u których ilość roślin do oceny była większa niż 100. W przybliżeniu połowę przebadanych osobników stanowiły rośliny z cytoplazmą Pampa i CMS-C (tab. 8). Najliczniej (po około 600 roślin) reprezentowane były rośliny zaliczone do klas fenotypowych: 9 – rośliny w pełni męskopłodne, bardzo silnie pyłące oraz 3 – rośliny męskosterylne, ale o niezbyt silnych objawach męskiej sterility (tab.8). Rośliny wykazujące objawy bardzo głębokiej sterility (1 w skali Geigera i Morgensterna) nie pojawiały się, gdy obecna była cytoplazma C, przy obecności cytoplazmy Pampa zidentyfikowano 9 takich roślin. Rośliny o najsilniejszych objawach płodności zidentyfikowane były ponad dziesięć razy częściej w mieszańcach z cytoplazmą C.

Relacje między źródłami CMS stają się lepiej widoczne po połączeniu dziewięciu klas bonitacyjnych w kategorie fenotypowe (rośliny męskosterylne, częściowo płodne i męskopłodne) oraz przekalkulowaniu liczebności roślin w tych kategoriach na ich procentową frekwencję (tab.9). Można

tutaj wyraźnie zauważyć wyraźną różnicę pod względem obecności genotypów dopełniających i restorerowych dla dwóch badanych źródeł CMS. Udział genotypów dopełniających dla cytoplazmy C jest we wszystkich badanych populacjach niewielki (od kilku do najwyżej kilkunastu procent), a efektywne restorery stanowią mniej więcej 50-75% w każdej z badanych populacji. (tab.9). W przypadku mieszańców z cytoplazmą CMS-Pampa dominują formy nieprzywracające płodności – w większości badanych populacji stanowiły one od 85 do ponad 95 % genotypów. Jedynie odmiana Dańkowskie Amber ujawnia mniejszy udział genotypów typu „non-restorer”, ale i tak jest to ponad połowa całej populacji.

Tabela 8

Płodność mieszańców między męskosterylnymi źródłami cytoplazm CMS-P i CMS-C, a polskimi populacjami żyta ozimego (liczebność roślin w poszczególnych klasach fenotypowych).

Populacja	CMS	Męskosterylne			Częściowo płodne			Męskopłodne			Suma
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
D. Amber	C	0	0	42	12	8	6	5	8	65	146
Armand	C	0	0	29	6	4	2	2	1	68	112
Szk99	C	0	6	21	3	7	0	2	5	102	146
Szk89	C	0	10	68	11	6	5	5	13	150	268
Szk75	C	0	3	23	7	7	8	4	14	127	193
Szk86	C	0	3	62	12	4	5	1	3	101	191
D. Amber	P	0	4	62	14	9	6	2	4	17	118
Bosmo	P	1	50	112	2	1	0	0	0	2	168
Szk99	P	1	81	79	4	1	0	0	1	1	168
Szk89	P	5	92	140	7	0	0	1	0	4	249
Szk75	P	0	84	136	3	2	1	2	1	4	233
Szk86	P	2	111	155	10	5	5	4	4	6	302
Ogółem		9	444	929	91	54	38	28	54	647	2294
	w tym z CMS-C	0	22	245	51	36	26	19	44	613	1056
	w tym z CMS-P	9	422	684	40	18	12	9	10	34	1238

Odsetek roślin ocenionych jako męskosterylne (MS), częściowo płodne (CP) i męskopłodne (MP) wśród mieszańców między męskosterylnymi wersjami linii 541, a populacjami żyta.

Populacja	Cytoplazma	MS	CP	MP
D. Amber	C	28.77	17.81	53.42
Armand	C	25.89	10.71	63.39
Szk99	C	18.49	6.85	74.66
Szk89	C	29.10	8.21	62.69
Szk75	C	13.47	11.40	75.13
Szk86	C	34.03	10.99	54.97
D. Amber	P	55.93	24.58	19.49
Bosmo	P	97.02	1.79	1.19
Szk99	P	95.83	2.98	1.19
Szk89	P	95.18	2.81	2.01
Szk75	P	94.42	2.58	3.00
Szk86	P	88.74	6.62	4.64
Ogółem	C	25.28	10.70	64.02
	P	90.06	5.65	4.28

Dyskusja *(opisać jak w publikacji)*

Niewielka częstotliwość występowania w europejskich populacjach żyta genotypów skutecznie przywracających płodność w systemie CMS Pampa była sygnalizowana już pod koniec XX wieku (Geiger i in. 1995; Miedaner i in 1997), ale doniesienia te miały dość ogólnikowy charakter. W polskich populacjach żyta obserwowano znaczący udział restorerów dla cytoplazmy C (Łapiński i Stojalowski 1997), ale tutaj również badania nie miały charakteru kompleksowego i pozwalały na jedynie ogólną charakterystykę materiałów hodowlanych. Uzyskane wyniki zasadniczo są zgodne z wcześniejszymi doniesieniami, a ukazują istnienie pewnych różnic między populacjami, szczególnie w odniesieniu do cytoplazmy Pampa.

Wnioski *(opisać jak w publikacji)*

We wszystkich ocenionych populacjach przeważały genotypy przywracające męską płodność w systemie CMS-C.

Większość przebadanych populacji zawierała niewiele form restorerowych dla cytoplazmy Pampa, ale zaobserwowano pod tym względem wyraźne zróżnicowanie – w większości populacji genotypy przywracające płodność były prawie nieobecne, ale w odmianie Dańkowskie Amber stanowiły niemal 20% osobników.

Ogólnie oceniane populacje żyta składają się z genotypów, które przeważnie utrzymują męską sterylność w cytoplazmie Pampa, ale przywracają płodność w systemie CMS-C.

Temat badawczy 4

Ocena zdolności kombinacyjnej linii męskosterylnych z cytoplazmą C na tle linii zawierających cytoplazmę Pampa.

Cel tematu badawczego 4

Ocena zdolności kombinacyjnej wybranych linii męskosterylnych z cytoplazmą C (na tle linii zawierających cytoplazmę Pampa) – cel osiągnięty

Materiały i metody *(opisać jak w publikacji)*

Ocenę zdolności kombinacyjnej 30 linii męskosterylnych z cytoplazmami C (12 linii) i P (18 linii) wykonywano w doświadczeniu polowym trój-powtórzeniowych założonych w dwóch miejscowościach metodą wzorcową (wzorzec co 6 poletko). Obiektami badawczymi w doświadczeniu były mieszańce wyżej wymienionych linii męskosterylnych zapylnych w szkółce top-cross populacją syntetyczną SR27. Wielkość poletek doświadczalnych do zbioru: 5m². Oceniano plon i podstawowe cechy użytkowe (wysokość, wyleganie itp.).

W celu wytworzenia nasion do oceny zdolności kombinacyjnej linii w kolejnym roku badań założono izolowaną szkółkę typu top-cross z zapylaczem SR27 oraz liniami męskosterylnymi z cytoplazmą C i P.

Wyniki *(opisać)*

Wszystkie badane w 2016 roku linie dawały mieszańce plonujące wyraźnie gorzej niż odmiany wzorcowe (tab.10). Jednocześnie ponad połowa badanych mieszańców eksperymentalnych z cytoplazmami CMS-C i CMS-Pampa plonowała lepiej niż liniowo-populacyjna odmiana mieszańcowa Gradan F1. Najslabiej plonujący mieszaniec w całym doświadczeniu posiadał cytoplazmę CMS-C: 711C_X_732_S73. Była to forma żyta posiadająca dominujący gen karłowatości, dzięki czemu badany mieszaniec był wyraźnie niższy od pozostałych i charakteryzował się małą podatnością na wyleganie (tab.10). Niestety te korzystne cechy wiązały się ze słabym poziomem plonowania, co w chwili obecnej dyskwalifikuje testowany genotyp w pracach nad tworzeniem odmian mieszańcowych.

Wśród pozostałych analizowanych w doświadczeniu cech obserwowane zróżnicowanie nie miało wyraźnego związku ze źródłem cytoplazmy sterylizującej. Najwyższe z badanych genotypów, należały zarówno do mieszańców z cytoplazmą C, jak i Pampa. Termin kłoszenia również nie zależał od typu cytoplazmy sterylizującej użytej do wytworzenia mieszańca. W roku 2016 na doświadczeniach nie zaobserwowano istotnego porażenia przez choroby.

Tabela 10

Średni plon ziarna oraz inne cechy użytkowe mieszańców F₁ zaobserwowane w doświadczeniu z mieszańcami żyta założonym metodą wzorcową w trzech miejscowościach. Pogrubioną czcionką zaznaczono mieszańce z CMS-C.

Lp.	Nazwa mieszańca	Plon (kg/pol.)	Plon [% wz.]	Przezimowanie	Wysokość [cm]	Wyleganie
1	KWS_BONO_WZ	5.2	99.56	7.96	138.37	5.83
2	STAKKATO_WZ	5.24	100.44	8.09	139.91	7.26
3	S477/14	4.27	81.87	8.59	151.83	4.56
4	S482/14	4.44	85.03	8.34	157.04	7.35
5	S489/14	4.75	90.94	8.46	156.85	6.6
6	S491/14	4.37	83.73	8.44	154.42	5.48
7	S493/14	4.64	88.91	8.25	148.11	6.78
8	520B/14	4.45	85.34	8.34	152.54	5.85
9	579B/14	4.91	94.13	8.48	146.25	6.43
10	590B/14	4.16	79.7	8.2	142.6	6.55
11	636B/14	4.89	93.68	8.2	150.6	6.05
12	LS_218P/13	4.13	79.08	8.3	148.04	5.33
13	LS_231P/13	4.84	92.67	8.34	149.21	7.68
14	LS_237P/13	4.86	93.03	8.46	150.19	5.93
15	LS_245P/13	4.43	84.82	8.43	152.25	5.26
16	LS_255P/13	4.69	89.9	8.59	148.95	6.28
17	LS_256P/13	4.8	91.98	8.49	152.14	5.46
18	LS_271P/13	4.65	89.03	8.44	151.96	5.77
19	LS_312P/13	4.91	94.05	8.43	151.17	4.73
20	LS_367P/13	4.42	84.65	8.09	153.41	4.76
21	ZUT_14_1108	4.91	94.14	8.61	153.01	7.78
22	ZUT_14_1109	4.79	91.7	8.26	156.83	6.89
23	ZUT_14_1118	4.59	88	8.25	152.61	6.95
24	ZUT_14_1120	4.46	85.45	8.37	151.6	7.22
25	ZUT_14_1130	4.12	78.97	8.1	146.02	5.42
26	ZUT_14_1139	3.95	75.67	8.13	148.52	5.43
27	ZUT_14_1142	4.38	83.83	8.13	156.37	6.17
28	ZUT_14_1149	4.04	77.34	8.4	159	4.93
29	ZUT_14_1151	4.47	85.73	8.11	150.13	6.6
30	ZUT_14_1155	4.47	85.68	8.15	151.47	7.79
31	ZUT_14_1161	4.08	78.15	8.13	146.48	6.63
32	711C_X_732_S73	2.43	46.55	7.94	88.46	8.6
33	GRADAN F1	4.36	83.45	7.82	144.47	7.79
	Średnia ogólna	4.49		8.28	148.51	6.31
	Średnia dla wzorców	5.22		8.03	139.14	6.55

Dyskusja (opisać jak w publikacji)

Wykorzystanie w hodowli różnych źródeł cytoplazmy sterylizującej ma na celu ograniczenie zagrożeń wynikających z ujednolicenia genetycznego plantacji uprawianych na dużych powierzchniach (Geiger i Morgenstern 1982; Łapiński i Stojalowski 2001). Warunkiem niezbędnym do stosowania w praktyce każdego źródła CMS jest jego stabilność fenotypowa w zróżnicowanych warunkach środowiska. Ważny jest jednak również możliwy wpływ genów cytoplazmatycznych na cechy użytkowe tworzonych mieszańców. Jednym z ważnych argumentów przemawiających za stosowaniem cytoplazmy Pampa w komercyjnej hodowli były sugestie Markera i in (1985), że cytoplazma ta przyczynia się do podwyższenia uzyskiwanych plonów, zmniejszenia wysokości roślin i poprawienia odporności na wyleganie. Późniejsze doświadczenia polowe przeprowadzone w Polsce na

genetycznie odrębnych materiałach nie potwierdzały tych obserwacji i wskazywały na brak istotnego wpływu cytoplazmy na wartość gospodarczą mieszańców żyta (Łapiński 1989, Stojałowski i Łapiński 2001). Mieszańce z cytoplazmą C badane w 2016 roku plonowały generalnie na podobnym poziomie jak porównywane z nimi eksperymentalne mieszańce z cytoplazmą Pampa. Jednocześnie poziom plonowania mieszańców eksperymentalnych był wyraźnie gorszy niż odmian komercyjnych. Nie zaobserwowano istotnego wpływu pochodzenia cytoplazmy sterylizującej na pozostałe badane cechy użytkowe.

Wnioski *(opisać jak w publikacji)*

Badane linie męskosterylne z cytoplazmą C i cytoplazmą Pampa charakteryzowały się zróżnicowaną ogólną zdolnością kombinacyjną, a pochodzenie cytoplazmy nie miało wyraźnego wpływu na plonowanie otrzymywanych mieszańców.

Pod względem badanych cech użytkowych prawie wszystkie genotypy z CMS-C nie różniły się od tych z cytoplazmą Pampa.

Jeden z mieszańców z cytoplazmą C, który posiadał dominujący gen karłowatości wyróżniał się obniżoną wysokością roślin i zwiększoną odpornością na wyleganie, ale wiązało się to z niskim poziomem plonowania.

Opublikowane streszczenia:

1. Stojałowski S., Wesołowski W., Szklarczyk M., 2016. W poszukiwaniu różnic genetycznych między cytoplazmami żyta. „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin” - Konferencja Naukowa z okazji 60-lecia Katedry Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Międzyzdroje, 8-10 czerwca 2016, Streszczenia: 68.
2. Orłowska M., Hackauf B., Stojałowski S., 2016. Application of COS markers for comparative mapping of Rfc1 gene in two mapping population of rye. V Kongres Genetyki, Łódź 19-22 września 2016, „Program i materiały kongresowe” red. Andrzej K. Kononowicz, Lucjusz Jakubowski, Maciej Borowiec, Paweł Stączek, Wydawnictwo Grupa Medica s.c., Łódź 2016, ISBN: 978-83-925769-4-5: 296.

Application of COS markers for comparative mapping of Rfc1 gene in two mapping population of rye

Marta Orłowska¹, Bernd Hackauf², Stefan Stojalowski¹

¹ Department of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology, West Pomeranian University of Technology in Szczecin, Poland
² Julius Kühn-Institut, Institute for Breeding Research on Agricultural Crops, Sanitz, Germany

Introduction

Winter rye (*Secale cereale* L.) is one of the most popular winter grain crop cultivated in Poland, Russia, Germany and other European countries. It is commonly grown in Central and East Europe due to its excellent winter hardiness, tolerance to highly acidic soils and drought tolerance. Significant part of rye cultivation area is occupied by hybrid cultivars, which in very efficient way exploit effect of heterosis. Produce of hybrid varieties is more and more popular nowadays. Almost all registered hybrids are produced with use of the Pampa cytoplasmic male sterility (CMS-P) system which was discovered by Geiger and Schnell (1970). Application of new sources of cytoplasmic male sterility is recommended to avoid genetic uniformity of rye plantations. One of CMS systems which can be used as an alternative for Pampa is the cytoplasm CMS-C. Nuclear genes that restore male fertility (Rf) in CMS systems play significant role in hybrid seeds production. For this reason it is necessary to select appropriate genotypes for next stages of breeding process. Promising approach is marker assisted selection (MAS), which is based on markers closely linked to expected gene. Selection of individual genotypes with this method should be easy, fast and correct – recommended for practice breeding. The main restorer gene active in CMS-C system is named Rfc1 and was initially located on chromosome 4R in rye.

Objective

The aim of this study was to determine the precise localization of Rfc1, find closely linked markers to this gene and compare position of conserved orthologous set (COS) markers, tightly.

Material and Methods

The RIL-5 mapping population was produced by crossing inbred line 511N and 2028LM, as 10th generation of recombinant inbred lines. The MOON population was created by hybridization inbred line 511C and 090 20. As a result of 5 backcross received BC5F2 population. Both populations were phenotyped using two methods: evaluation of male fertility using P-rip scale developed by Geiger and Morgenson (1975) and assessment of seed settings in harvested spikes.

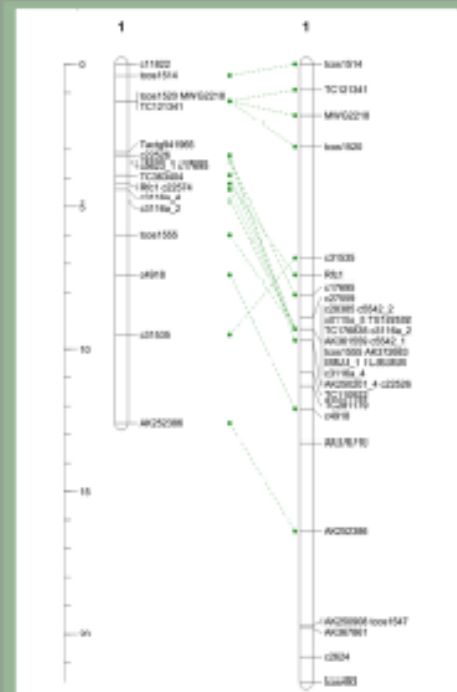
Genomic DNA was extracted from harvested leaves using DNA isolation kit - GenFlux™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit. Polymorphic sites reactions were performed by protocols obtained from Julius Kühn Institute. Different combination of restriction enzymes were used to visualization of SNP polymorphism. Genotyping of individuals was performed with use 51 COS molecular markers, developed and based on comparative genomic studies. Bioinformatic analysis and design molecular map was establish using the JoinMap4 - linkage mapping software.



Results

From RIL-5 population 90 individuals genotyped with the same markers like in MOON mapping population. Polymorphism occurred in 37 of them, 14 were monomorphic. 31 demonstrated codominant character. Total length of mapped 4RL chromosome was 21,2 cM. Marker TC363404 was closely linked with restorer locus Rfc1, the distance between them was approximately 0,5 cM. The other c17695 and tc01520 were in close distance to restorer gene 0,9 cM and 0,8 cM, fig. 1

From MOON population 95 individuals were genotyped using 51 COS markers. Polymorphism occurred in 37 of them, 6 were dominant markers and 31 demonstrated codominant character. Eighteen COS markers were used for construction one linkage group (at LOD=10). Total length of obtained linkage map was 12,6 cM, which gives an average density of 0,7 cM. Markers TC363404, c3116a.4, c22574 were closely linked with restorer locus Rfc1. One of tested markers c22574 demonstrated co-segregation with restorer gene. The Rfc1 was flanked by two remaining markers TC363404 and c3116a.4 and the distance between them was approximately 0,5 cM, fig. 2



Relationships between two constructed genetic maps of the same region of 4RL chromosome, as shown on fig. 3.

Orłowska M., Hackauf B., Stojalowski S., 2016. Application of COS markers for comparative mapping of Rfc1 gene in two mapping population of rye. V Kongres Genetyki, Łódź 19-22 września 2016