

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

Oceną płodności objęto łącznie 500 roślin z sześciu odmian mieszańcowych żyta. Liczebności roślin z czterech odmian były na zbliżonym poziomie. Najmniej licznie reprezentowana była odmiana Konto F1 – 63 genotypy poddane ocenie. Odmiany Bono F1, Skaltio F1 i Picasso F1 liczyły od 64 do 66 roślin. Prawie dwa razy więcej ocenionych roślin pochodziło z odmian Stach F1 i Tur F1 (tab.1). Wyniki wykonanej po zbiorach oceny osadzania ziaren pod izolatorami były istotnie skorelowane z oceną wzrokową – dla wszystkich odmian współczynnik korelacji przekraczał wartość 0,6.

W każdej z badanych odmian dość licznie występowały rośliny w pełni męskosterylne (klasy 1-3 w skali Geigera i Morgensterna). Przeważnie były to rośliny oceniane wzrokowo na 3, ale w odmianach Skaltio F1 oraz Tur F1 zaobserwowano dość dużą liczbę roślin o głębszych objawach sterility (tab.1).

**Tabela 1** 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	
Picasso F1	0	5	23	9	11	9	4	4	1	66
Stach F1	2	4	53	18	9	5	2	4	21	118
Skaltio F1	0	29	21	10	4	0	0	0	0	64
Konto F1	0	0	44	14	3	2	0	0	0	63
Bono F1	0	1	26	5	7	5	2	4	14	64
Tur F1	11	30	35	16	8	9	6	10	0	125
<b>Ogółem</b>	13	69	202	72	42	30	14	22	36	500

Ogółem udział roślin męskosterylnych we wszystkich badanych odmianach w 2018 roku stanowił ponad 55% (tab.2). Odmiany z najliczniej reprezentowaną grupą roślin niewytwarzających pyłku to Skaltio F1 (78% roślin męskosterylnych) i Konto F1 (niemal 70% roślin niepylących).

**Tabela 2** Procentowy udział roślin męskosterylnych, częściowo płodnych i męskopłodnych w badanych odmianach mieszańcowych żyta.

Odmiana	Męskosterylne	Częściowo płodne	Męskopłodne
Picasso F1	42.42	43.94	13.64
Stach F1	50.00	27.12	22.88
Skaltio F1	78.13	21.88	0.00
Konto F1	69.84	30.16	0.00
Bono F1	42.19	26.56	31.25
Tur F1	60.80	26.40	12.80
<b>Ogółem</b>	56.80	28.80	14.40

Rośliny częściowo płodne stanowiły od ponad 20% (Skaltio F1) do niemal 45% (Picasso F1) badanych odmian – ogółem prawie 3 rośliny częściowo płodne przypadają na każde 10 ocenionych roślin (tab.2). Duże zróżnicowanie między odmianami zaobserwowano w odniesieniu do roślin męskopłodnych (MP). W odmianie Bono F1 rośliny MP stanowiły ponad 30% ocenionej populacji. Mniejsze wartości odnotowano dla odmiany Stach F1 – tu frekwencja roślin męskopłodnych przekraczała jednak wciąż poziom 20%. Te dwie odmiany

zawierały najwięcej roślin MP. Dwie kolejne odmiany: Picasso F1 i Tur F1 miały po ok. 13% roślin silnie pyłących. Dwie odmiany to takie, w których nie znaleziono w 2018 roku żadnej rośliny efektywnie pyłacej. W odmianach Skaltio F1 i Konto F1 źródłem pyłku były wyłącznie rośliny częściowo płodne (tab.1, tab.2).

Analizami DArTseq objęto 270 roślin ocenionych fenotypowo pod kątem płodności w 2018 roku. Wybrane rośliny pochodziły z trzech populacji mapujących typu F2 (częściowo też F3) otrzymanych z przekrzyżowania męskosterylnych linii matecznych z restorerami dla systemu CMS-C. Według wyników oceny markerami z chromosomu 4RL badane mieszańce nie powinny posiadać genu *Rfc1*. Badane mieszańce to:

[544C x Ot0-20]B3F2-3

[541C x RIL6047]F2

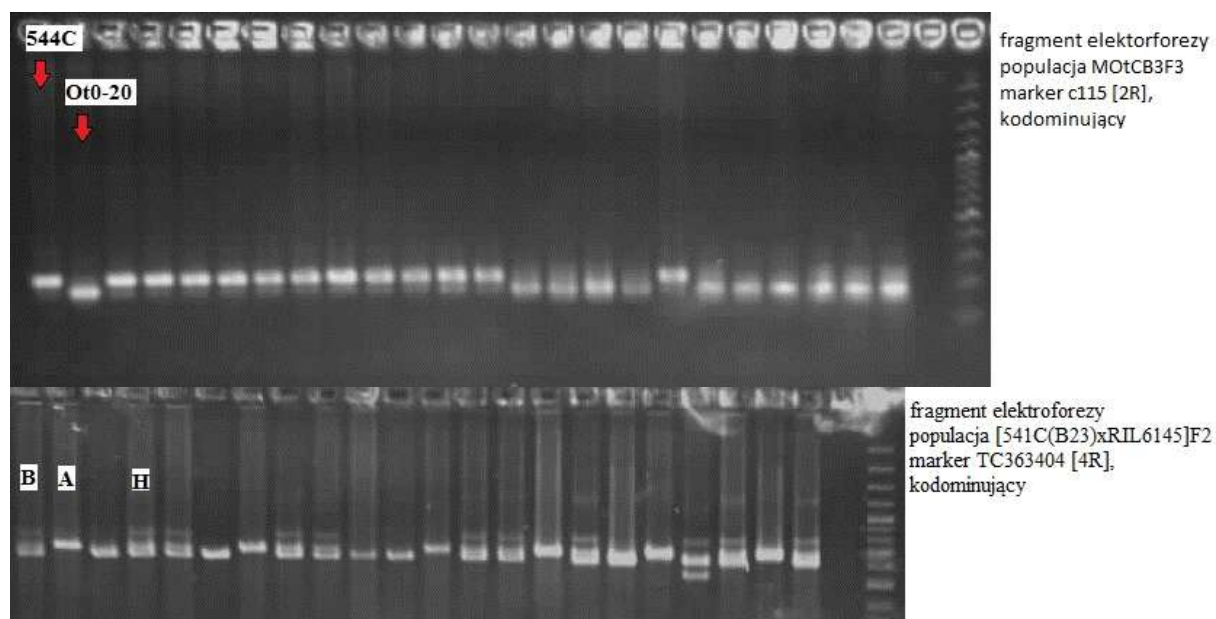
[541C x RIL6145]F2

**Tabela 3** Procentowy udział roślin męskosterylnych, częściowo płodnych i męskopłodnych w trzech badanych populacjach mapujących.

Populacja mapująca	Męskosterylne	Częściowo płodne	Męskopłodne
[544C x Ot0-20]B3F2-3	11.34	79.38	9.28
[541C x RIL6047]F2	17.19	18.75	64.06
[541C x RIL6145]F2	22.54	14.08	63.38
<b>Ogółem</b>	16.38	42.67	40.95

Wyniki oceny fenotypowej w 2018 roku wskazują, że w obrębie pierwszej z badanych populacji ([544C x Ot0-20]B3F2-3) dominującą frakcją stanowiły rośliny częściowo płodne, co jest zgodne z oczekiwaniami dla populacji, w której brakuje silnego genu restorerowego. Dwie pozostałe populacje, w których restorerami były linie RIL6047 i RIL6145 składały się w ponad 60% z roślin o w pełni przywróconej płodności. Wynik ten wskazywał na konieczność zweryfikowania założenia, że w badanych populacjach gen *Rfc1* z chromosomu 4RL był nieobecny.

Poza analizami DArTseq w w/w populacjach mapujących wykonano analizy PCR (ryc.1). Użyto 20 par starterów z chromosomów 2R i 4R (ze względu na to, że nie było w badanym materiale obecnej cytoplazmy Pampa zrezygnowano w analiz w obrębie chromosomu 1R, gdyż dla cytoplazmy C nie były tam lokalizowane dotąd żadne geny restorerowe).



**Ryc.1** Przykłady segregacji markerów PCR z chromosomu 2R i 4R w badanych populacjach mapujących.

W populacji mapującej [544C x Ot0-20]B3F2-3 marker PCR c115 z chromosomu 2R wykazał statystycznie istotny związek z wynikami oceny fenotypowej pylenia (tab.4). W dwóch pozostałych badanych populacjach analiza sprzężeń ujawniła związek pomiędzy genetyczną kontrolą przywracania płodności a markerami z chromosomu 4R. Markery z chromosomu 2R nie były sprzężone z genem/genami przywracającymi płodność w tych dwóch populacjach.

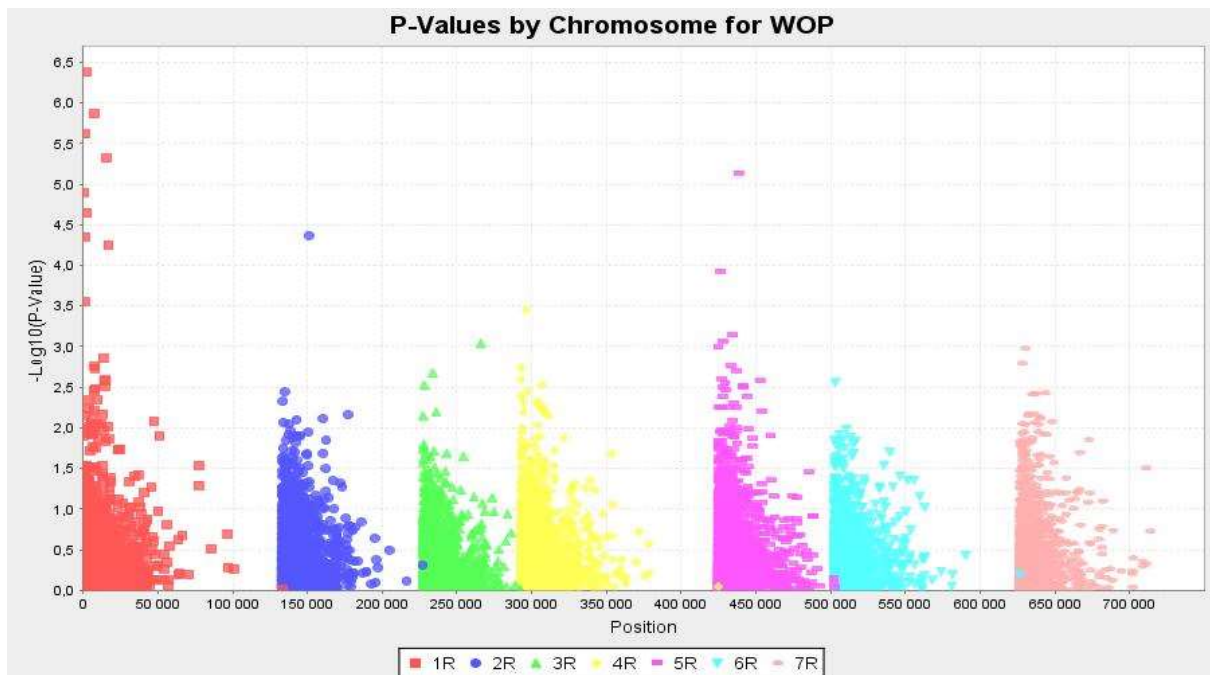
**Tabela 4** Markery PCR wykazujące w teście Kruskala-Wallisa najsilniejszy związek z fenotypową oceną płodności w trzech populacjach mapujących żyta

Populacja	Marker	Chromosom	K*	Prawdopodobieństwo
[544C x Ot0-20]B3F2-3	C115	2R	10.993	P<0,001
[541C x RIL6047]F2	TC363404	4R	15.481	P<0,0005
[541C x RIL6145]F2	TC363404	4R	39.773	P<0,0001

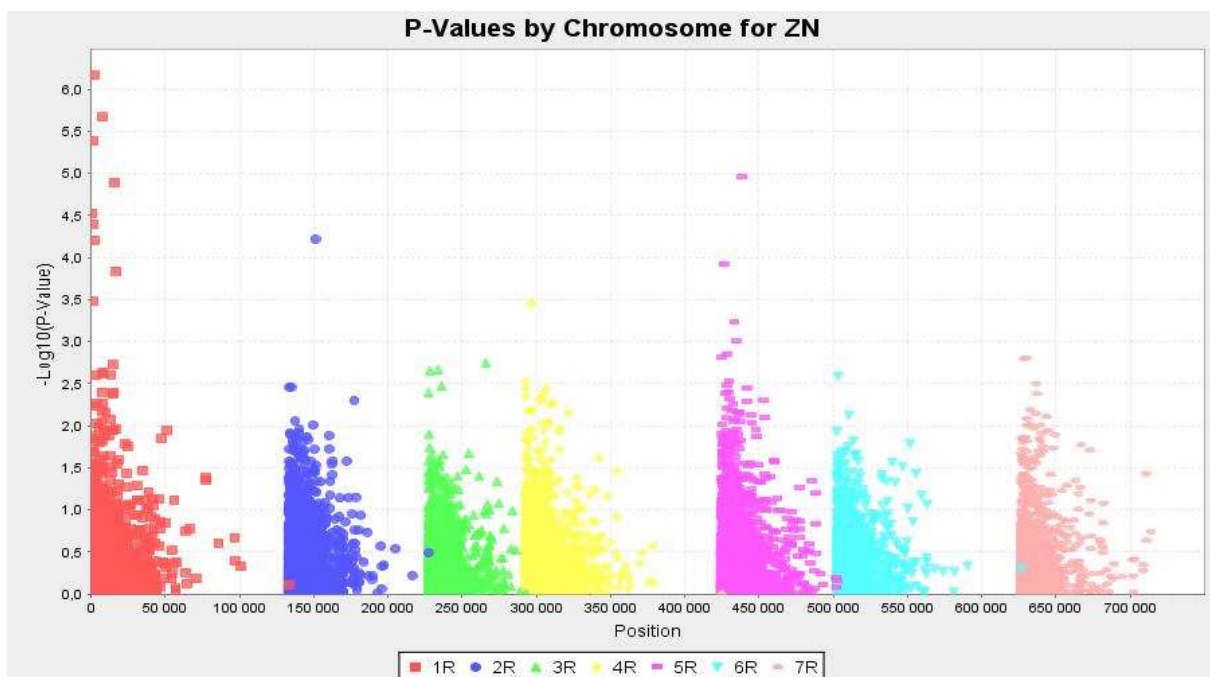
W analizach mapowania asocjacyjnego wykorzystano dane obejmujące 48150 markerów SNP pozyskanych metodą DArTseq. Ze względu na sposób działania programu Tassel, do analizy Hapmap użyto wyłącznie markery, które miały określoną lokalizację chromosomową. Podstawą tej lokalizacji były dane sekwencyjne genomu żyta opublikowane przez Bauer i in. (2017). Na podstawie danych z tej pracy możliwe było określenie przynależności chromosomowej 27983 markerów SNP. W dalszym etapie analizy z puli markerów usunięto markery monomorficzne. Ostatecznie do analizy użyto 12058 markerów SNP.

Wyniki mapowania asocjacyjnego wskazują na istotność markerów SNP zlokalizowanych na chromosomach 1R, 2R, 4R i 5R (ryc.2; ryc.3). Wyniki otrzymane na podstawie danych fenotypowych z oceny wzrokowej i z oceny zawiązywania ziaren pod izolatorami wykazywały bardzo wysoką zgodność. Kryteria istotności statystycznej przyjęte w tej analizie były restrykcyjne, co spowodowało, że spośród ponad 12 tysięcy markerów wytypowano zaledwie 18 wykazujących silną asocjację. Najwięcej z nich było na chromosomie 1R, pozostałe chromosomy (2R, 4R i 5R) zawierały pojedyncze markery (ryc.2; ryc.3). Na chromosomach 3R, 6R i 7R nie wytypowano obecności żadnego markera SNP wykazującego silną asocjację z pyleniem mieszańców żyta.

Analizy asocjacyjne dla markerów dominujących Silico-DArT dotyczyły 96385 markerów. Wśród nich 53941 markerów ujawniało polimorfizm genetyczny w badanym materiale. Związek obecności markera z cechą płodności/sterylności oceniano przy pomocy testu Kruskala-Wallisa przyjmując 10 jako wartość krytyczną statystyki K (co odpowiada poziomowi prawdopodobieństwa P<0,001). Analizując dane fenotypowe z oceny wzrokowej pylenia wytypowano 125 markerów Silico-DArT istotnie związanych z cechą. Nieco mniejsza liczba markerów została wskazana przy analizie danych z osadzania ziaren pod izolatorami – 102 markery. Wśród nich 60 markerów było wysoce istotnie związanych z wynikami fenotypowymi z obu metod oceny płodności.



**Ryc.2** Wykres punktowy typu Manhattan pokazujący rozkład wartości logarytmu dziesiętnego p dla wzrokowej oceny płodności względem markerów SNP na chromosomach badanych odmian mieszańcowych żyta. Wartość krytyczna istotności wynosi 3.00, co odpowiada  $p = 0.001$



**Ryc.3** Wykres punktowy typu Manhattan pokazujący rozkład wartości logarytmu dziesiętnego p dla osadzania ziaren pod izolatorami względem markerów SNP na chromosomach badanych odmian mieszańcowych żyta. Wartość krytyczna istotności wynosi 3.00, co odpowiada  $p = 0.001$

Spośród wyżej wymienionych sześćdziesięciu markerów, obecność dziesięciu związana była z obniżaniem poziomu płodności – ich efekty fenotypowe miały wartości ujemne (tab.5). Próba określenia lokalizacji chromosomowej tych markerów przy użyciu opublikowanych w ostatnich latach map genetycznych żyta zawierających markery otrzymywane technologią DArTseq tylko częściowo zakończyły się sukcesem. Spośród 10 markerów sterylności tylko jeden był umieszczony na mapie

Milczarskiego i in. (2016) – znajdował się na chromosomie 2R. Dwa markery nie mają lokalizacji na żadnej z dwóch użytych map, a kolejny (7466561) zawiera sekwencję zidentyfikowaną w jednym ze skafoldów z pracy Bauer i in. (2017), ale sam skafold nie ma określonej lokalizacji chromosomowej. Pozostałe markery zostały przypisane do chromosomów 1R (cztery markery) i 4R (jeden marker).

**Tabela 5** Markery SilicoDArT związane z męską sterilitynością roślin z odmian mieszańcowych.

Lp.	Marker	Lokalizacja chromosomowa		Ocena wzrokowa		Osadzanie ziaren	
		Milczarski i in. (2016)	Bauer i in. (2017)	K*	Efekt fenotypowy	K*	Efekt fenotypowy
1	3886972			13.575	-3.2947	11.363	-52.9593
2	3343011	2R, poz. 61.5cM		14.705	-2.87432	13.748	-47.2203
3	7466561		0R, scaffold_613759	12.038	-4.02861	11.44	-66.1706
4	3886034			16.299	-2.93158	18.816	-49.1181
5	4487656		1R, scaffold_3920	25.281	-3.72706	22.447	-60.3592
6	5044086		4R, scaffold_266098	11.887	-1.95804	11.743	-31.9804
7	5036254		1R, scaffold_2512	11.596	-2.59118	15.026	-44.2219
8	3882434			16.849	-2.84057	15.586	-46.4747
9	4485654		1R, scaffold_6963	23.434	-3.58458	20.789	-58.0085
10	5213328		1R, scaffold_12698	22.735	-3.21511	21.36	-52.1342

K\* - wartość statystyki K w teście Kruskala-Wallisa (wszystkie wartości wysoce istotne statystycznie)

Markery, których obecność była związana z poprawą efektywności pylenia, a więc miały wartości efektów fenotypowych dodatnie, zostały przypisane do chromosomów 1R (cztery markery), 2R (dwa markery), 4R (jedenaście markerów), 6R (dwa markery) i 7R (dwa markery). Większość markerów nie ma określonej lokalizacji chromosomowej (tab.6). Sekwencje trzech z nich zidentyfikowano w skafoladach sekwencji DNA żyta opublikowanych przez Bauer i in. (2017), ale bez identyfikacji chromosomu. Jeden z nich (3345559) można było przypisać do chromosomu 7R na podstawie mapy Milczarskiego i in. (2016), pozostałe dwa mają nieznaną lokalizację. Tylko jeden marker (3354361) został znaleziony na obu mapach referencyjnych (Milczarski i in. 2016; Bauer i in. 2017) – marker ten w obu pracach był zmapowany na chromosomie 1R.

**Tabela 6** Markery SilicoDArT związane z męską płodnością roślin z odmian mieszańcowych.

Lp.	Marker	Lokalizacja chromosomowa		Ocena wzrokowa		Osadzanie ziaren	
		Milczarski i in. (2016)	Bauer i in. (2017)	K*	Efekt fenotypowy	K*	Efekt fenotypowy
1	5045678		0R, scaffold_621986	23.042	2.83442	15.148	44.5376
2	3347935			20.155	2.62369	13.751	41.8729
3	3363908			20.266	2.48441	14.134	38.9291
4	5201687			11.766	2.3049	15.214	39.2687
5	5206335		2R, scaffold_88449	10.842	1.90091	11.547	31.6177
6	3345559	7R, poz. 139cM	0R, scaffold_641235	14.087	2.33605	20.95	40.7041
7	3601026		4R, scaffold_266191	10.992	1.9931	11.253	33.4837
8	3898699			15.925	3.55373	14.209	58.303
9	3741119	6R, poz. 182.5cM		11.499	2.10916	11.06	34.7028
10	7357533			23.986	2.837	15.307	44.057

11	4499060			18.027	2.51316	11.604	40.0478
12	3739078		4R, scaffold_272320	13.163	2.16369	15.039	36.32
13	5220990			14.319	2.53429	15.844	43.467
14	5039775			27.375	3.87374	21.027	62.2882
15	3589990			14.734	2.80836	14.356	45.9063
16	3582739		0R, scaffold_613759	23.128	2.8807	17.585	46.4732
17	3893589		4R, scaffold_281962	20.815	2.61854	12.924	41.4298
18	3600887			24.489	3.89165	19.912	62.4093
19	3893082			20.396	2.89728	15.506	47.2988
20	5226168		2R, scaffold_126864	12.118	2.25208	10.911	36.4542
21	5139332			14.97	2.07988	10.973	32.0045
22	3362097			20.099	2.6523	15.37	42.9016
23	3732079	6R, 48.6cM		13.43	3.10555	13.318	51.6563
24	3730898			20.083	2.65196	12.634	41.7232
25	5212060			23.187	2.96667	15.615	46.8955
26	3747910		4R, scaffold_266846	10.935	2.45735	11.974	42.2783
27	3602207		1R, scaffold_1905	13.442	4.10185	11.219	65.2541
28	3897032			17.972	2.64996	11.919	42.5529
29	3578703			26.069	3.9066	17.866	60.9257
30	3591530			15.18	2.94497	12.602	47.8724
31	3354361	1R, 81.8cM	1R, scaffold_2512	12.091	2.56836	12.562	42.2396
32	3886389		4R, scaffold_267433	19.613	2.63763	12.584	41.4869
33	3355486	4R, 104.3cM		12.318	2.21111	16.277	38.139
34	3887043		7R, scaffold_612863	11.354	3.58974	11.296	60.41906
35	3902159		4R, scaffold_369000	18.145	2.49169	13.079	39.9121
36	3580471	4R, 79.2cM		11.046	2.11376	13.15	35.8941
37	3905161			22.331	2.72727	14.38	43.6338
38	4490887			31.676	3.3065	24.382	53.1124
39	3587199			10.85	2.55105	13.036	43.5372
40	5214861		1R, scaffold_2475	26.948	3.79205	22.999	61.5408
41	5200988		1R, scaffold_5519	29.286	4.15	23.175	66.3972
42	3346891			19.176	2.79444	12.097	43.9028
43	100124343			10.906	1.89674	12.958	30.978
44	3743922		4R, scaffold_616566	11.998	2.08747	12.953	35.2008
45	3603181			12.103	1.98106	12.066	32.6915
46	5215614			11.535	3.50931	13.764	59.57041
47	5504785		4R, scaffold_368316	13.409	2.24171	13.543	36.0697
48	5200839		4R, scaffold_369000	21.825	2.78601	18.825	45.7872
49	4486393			13.954	2.52317	12.188	42.1784
50	5224471		0R, scaffold_657864	19.213	3.4252	13.356	53.9583

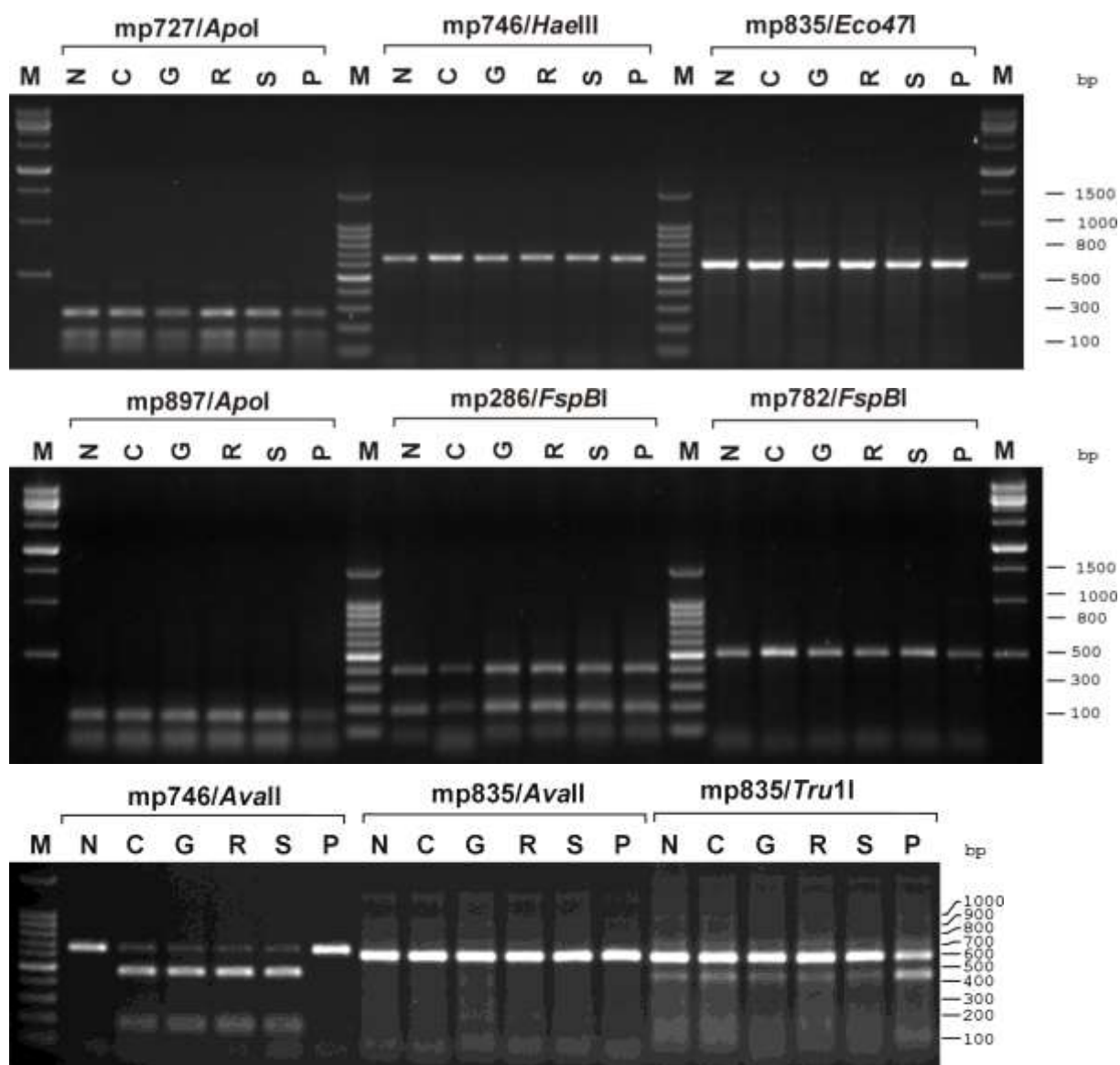
K\* - wartość statystyki K w teście Kruskala-Wallisa (wszystkie wartości wysoce istotne statystycznie)

## 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.

### Weryfikacja różnic sekwencyjnych markerami typu CAPS

Dla sześciu wybranych polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) przeprowadzono konwersję w markery typu CAPS (ang. *cleaved amplified polymorphic sequence*). W tym celu w obrębie sekwencji otaczających te SNPy zakotwiczone startery do PCR i wybrano enzymy restrykcyjne do trawienia odpowiednich produktów. Analizę markerową wykonano dla sześciu obiektów reprezentujących różne cytoplazmy hodowlane żyta – N, C, G, R, S i P. Niestety, w pierwszej serii eksperymentów żaden z zastosowanych markerów nie różnicował badanych obiektów (ryc. 5, zdjęcie górne i środkowe).



**Ryc. 5** Obraz dziewięciu mitochondrialnych markerów CAPS (mp727/ApoI – mp835/TruII) u obiektów reprezentujących różne cytoplazmy hodowlane żyta.

W kolejnej serii eksperymentów dwa spośród wcześniej testowanych produktów amplifikacji (mp746 i mp835) strawiono innymi restryktazami. W przypadku markera mp746/AvaII poskutkowało to uwidocznieniem polimorfizmu różnicującego cytoplazmy typu Vavilovii (C, G, R i S) od cytoplazm N i P (ryc. 5, zdjęcie dolne).

Weryfikacja przydatności wykrytego w 2017 roku markera c40992 do identyfikacji cytoplazmy sterylizującej typu Vavilovii (CMS-V) w materiałach hodowlanych została przeprowadzona w obrębie trzech populacji hodowlanych (Szk.96, Szk.104 i Szk.105). Rośliny z tych populacji analizowano przy użyciu znanych trzech markerów mitochondrialnych *cox1*, *nad6* i *nad2* (Stojałowski i in. 2006) oraz za pomocą nowego markera c40992. Na podstawie wyników analiz PCR typowano rodzaj cytoplazmy hodowlanej i porównywano wyniki. Marker c40992 w wielu przypadkach dawał wynik odmienny niż trzy wcześniej opisane markery, a niezgodności te były widoczne we wszystkich trzech badanych populacjach (tab. 8, 9, 10). Wydaje się, że marker c40992 ujawnia polimorfizm obecny w genomach mitochondrialnych żyta, ale nie jest to polimorfizm związany z typologią cytoplazm hodowlanych żyta, która jest aktualnie stosowana w hodowli (podział na trzy typy: cytoplazma normana, CMS-Pampa i CMS-Vavilovii).

**Tabela 8.** Wyniki identyfikacji typu cytoplazmy w populacji Szk.96 przy zastosowaniu markerów z pracy Stojałowski i in. (2006) oraz markera c40992

Nr rośliny	<u>cox1</u>		<u>nad6</u>	<u>nad2</u>	cytoplazma	<u>c40992</u>		cytoplazma
	[P] 890bp	[V/N] 930bp	[P] 850bp	[V] 800bp		[V] 1000bp	[P/N] 680bp	
1	-	-	-	-	N	-	-	
2	-	+	-	-	N	-	-	
3	-	+	-	-	N	-	-	
4	-	+	+	-	?	-	-	
5	-	+	-	-	N	-	-	
6	-	+	/	-	N	+	-	V
7	-	+	-	-	N	+	-	V
8	-	+	-	-	N	+	-	V
9	-	-	-	-	N	+	-	V
10	-	+	-	-	N	+	-	V
11	-	+	-	-	N	+	-	V
12	-	+	-	-	N	+	-	V
13	-	+	-	-	N	/	-	V
14	-	+	+	-	?	-	-	
15	-	+	-	-	N	+	-	V
16	-	+	-	-	N	-	-	
17	-	+	-	-	N	-	-	
18	-	+	-	-	N	+	-	V
19	-	-	-	-	N	-	-	
20	-	/	-	-	N	-	-	



**Tabela 9.** Wyniki identyfikacji typu cytoplazmy w populacji Szk.104 przy zastosowaniu markerów z pracy Stojałowski i in. (2006) oraz markera c40992

Nr rośliny	cox1		nad6	nad2	cytoplazma	c40992		cytoplazma
	[P] 890bp	[V/N] 930bp	[P] 850bp	[V] 800bp		[V] 1000bp	[P/N] 680bp	
1	-	+	+	-	?	+	-	V
2	-	+	+	-	?	+	-	V
3	-	+	-	-	N	+	-	V
4	-	+	-	-	N	+	-	V
5	-	+	-	-	N	+	-	V
6	-	-	-	-		+	+	?
7	-	+	-	-	N	+	/	V
8	-	+	/	-	N	+	/	V
9	-	+	-	-	N	+	-	V
10	-	+	+	-	?	+	-	V
11	-	+	-	-	N	+	-	V
12	/	+	+	-	P	+	-	V
13	-	+	-	-	N	+	-	V
14	+	-	+	-	P	+	/	V
15	-	+	-	-	N	+	-	V
16	-	+	-	-	N	+	-	V
17	+	-	+	-	P	+	-	V
18	-	+	/	-	N	+	-	V
19	-	+	-	-	N	+	-	V
20	-	+	-	-	N	+	-	V
21	-	+	-	-	N	+	-	V
22	-	+	-	-	N	+	-	V
23	-	+	-	-	N	+	-	V
24	-	+	-	-	N	+	-	V
25	-	+	-	-	N	+	-	V
26	-	+	-	-	N	+	-	V
27	+	-	+	-	P	-	/	P/N
28	-	+	-	-	N	+	/	V
29	/	-	+	-	P	+	/	V
30	-	+	-	-	N	+	-	V
31	-	+	-	-	N	-	-	
32	+	-	+	-	P	+	-	V
33	-	+	-	-	N	+	-	V
34	+	/	+	-	P	+	-	V
35	-	+	-	-	N	+	-	V
36	-	+	-	-	N	+	-	V
37	-	+	-	-	N	+	-	V
38	-	+	-	-	N	+	-	V
39	+	-	+	-	P	+	+	?
40	+	-	+	-	P	+	/	V
41	-	+	+	-	?	+	-	V
42	-	+	/	-	N	+	-	V
43	+	-	+	-	P	+	/	V

44	+	-	+	-	P	+	-	V
45	-	+	+	-	?	+	-	V
46	-	+	-	-	N	+	-	V

**Tabela 10** Wyniki identyfikacji typu cytoplazmy w populacji Szk.105 przy zastosowaniu markerów z pracy Stojałowski i in. (2006) oraz markera c40992

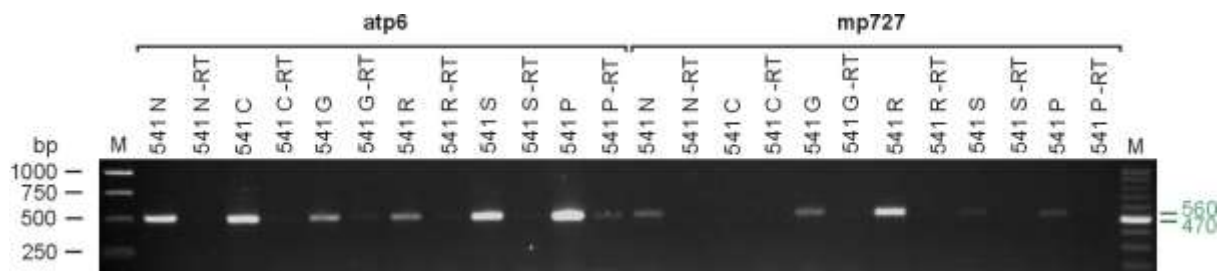
Nr rośliny	cox1		nad6	nad2	cytoplazma	c40992		cytoplazma
	[P] 890bp	[V/N] 930bp	[P] 850bp	[V] 800bp		[V] 1000bp	[P/N] 680bp	
1	-	+	-	-	N	+	-	V
2	-	+	-	-	N	+	-	V
3	-	+	+	-	?	+	-	V
4	-	/	+	-	N	+	-	V
5	-	+	-	-	N	+	-	V
6	+	-	+	-	P	+	-	V
7	+	-	+	-	P	+	+	?
8	+	-	+	-	P	+	-	V
9	+	-	+	-	P	+	+	?
10	+	-	+	-	P	+	+	?
11	-	+	-	+	V	+	-	V
12	-	+	-	+	V	+	-	V
13	-	+	-	+	V	+	-	V
14	-	+	-	+	V	+	-	V
15	-	+	-	+	V	+	-	V
16	-	+	-	+	V	+	-	V
17	-	+	-	+	V	+	-	V
18	-	+	-	+	V	+	-	V
19	+	-	+	-	P	+	+	?
20	+	-	+	-	P	+	+	?
21	-	+	-	+	V	+	-	V
22	-	+	-	+	V	+	-	V
23	-	+	-	-	N	+	/	V
24	-	+	-	+	V	+	-	V
25	-	+	-	+	V	+	-	V
26	+	-	+	-	P	+	/	V
27	+	-	+	-	P	+	+	?
28	-	+	-	-	N	+	+	?
29	-	+	-	-	N	+	-	V
30	+	-	+	-	P	+	-	V
31	-	+	-	+	V	+	-	V

### Analizy RT-PCR

Niżej opisanymi eksperymentami objęto sześć wariantów linii 541 – każdy z nich cechowała obecność innej cytoplazmy. Do amplifikacji cDNA tych materiałów wykorzystano 1 parę starterów kontrolnych (dla genu *atp6*), 12 par starterów zakotwiczonych w sąsiedztwie polimorfizmów sekwencyjnych (wykazanych bioinformatycznie, dla sekwencji oznaczonych *mp* oraz *c40992*) oraz 5 par starterów zakotwiczonych w obrębie genów wykazujących związek z wcześniej opublikowanymi mitochondrialnymi regionami markerowymi (Stojałowski i in. 2006, dla genów *cox1*, *nad6* i *nad2*).

Po reakcji ze starterami kontrolnymi *atp6-f* i *atp6-r* u wszystkich roślin obserwowano produkt o wielkości 470 bp (ryc. 6).

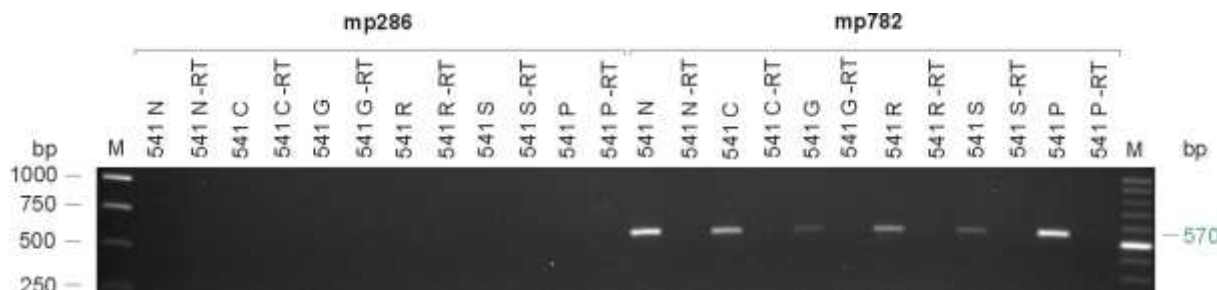
Po użyciu starterów *mp727-f* i *mp727-r* otrzymano produkt o wielkości 560 bp. Jego amplifikację obserwowano u obiektów 541 N, 541 G, 541 R, 541 S i 541 P. U obiekcie 541 C nie zaobserwowano amplifikacji. Wydajność amplifikacji tego produktu była najsilniejsza dla obiektu 541 R. Pozostałe obiekty charakteryzowały się słabszą amplifikacją produktu o wielkości 560 bp (ryc. 6).



**Ryc. 6.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *atp6-f/atp6-r* oraz *mp727-f/mp727-r*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkryptazy; M – wzorzec wielkości fragmentów DNA.

Po użyciu starterów *mp286-f* i *mp286-r* nie otrzymano produktów amplifikacji (ryc. 7).

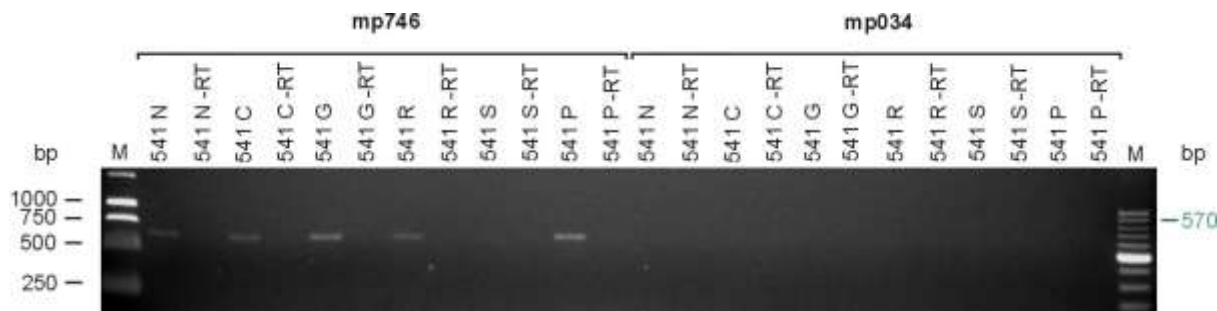
Po reakcji ze starterami *mp782-f* i *mp782-r* otrzymano produkt o wielkości 570 bp. Jego amplifikację obserwowano u wszystkich obiektów. Wydajność amplifikacji tego produktu była najsilniejsza dla obiektów 541 N i 541 P (ryc. 7).



**Ryc. 7.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *mp286-f/mp286-r* oraz *mp782-f/mp782-r*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkryptazy; M – wzorzec wielkości fragmentów DNA.

Po reakcji ze starterami *mp746-f* i *mp746-r* otrzymano produkt o wielkości 570 bp. Jego amplifikację obserwowano u wszystkich obiektów. Wydajność amplifikacji tego produktu była najsłabsza dla obiektu 541 S (ryc. 8).

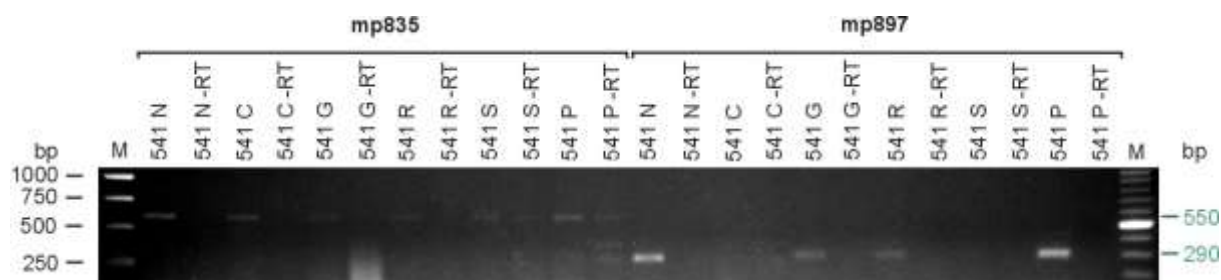
Po użyciu starterów *mp034-f* i *mp034-r* nie otrzymano produktów amplifikacji (ryc. 8).



**Ryc. 8.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *mp746-f/mp746-r* oraz *mp034-f/mp034-r*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkryptazy; M – wzorzec wielkości fragmentów DNA.

Po użyciu starterów mp835-f i mp835-r otrzymano produkt o wielkości 550 bp. Produkt ten pojawił się u wszystkich obiektów. Wydajność amplifikacji tego produktu była bardzo niska (ryc. 9).

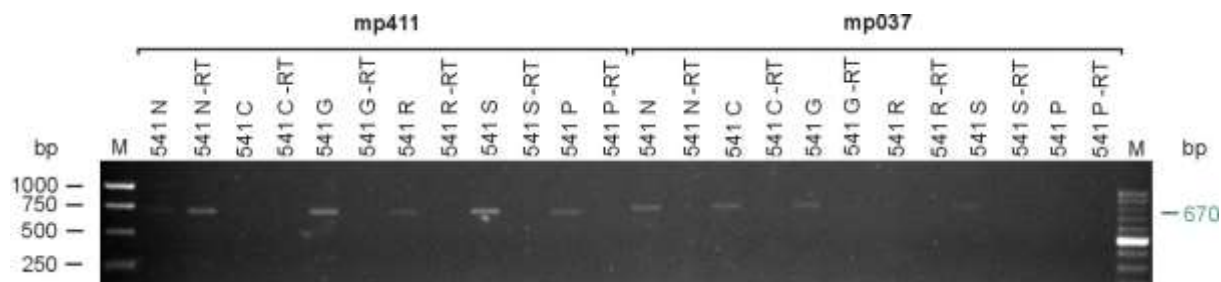
Startery mp897-f i mp897-r generowały produkt o wielkości 290 bp. Produkt ten wystąpił u obiektów 541 N, 541 G, 541 R i 541 P (nie wystąpił u obiektów 541 C oraz 541 S). Największą wydajność amplifikacji zaobserwowano u obiektów 541 N oraz 541 P (ryc. 9).



**Ryc. 9.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *mp835-f/ mp835-r* oraz *mp897-f/ mp897-r*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkryptazy; M – wzorzec wielkości fragmentów DNA.

Po użyciu starterów mp411-f i mp411-r otrzymano produkt o wielkości 670 bp. Jego amplifikację obserwowano u obiektów 541 N, 541 G, 541 R, 541 S i 541 P (produkt ten nie wystąpił u obiekcie 541 C). Największą wydajność amplifikacji zaobserwowano u obiektów 541 G oraz 541 S (ryc. 10).

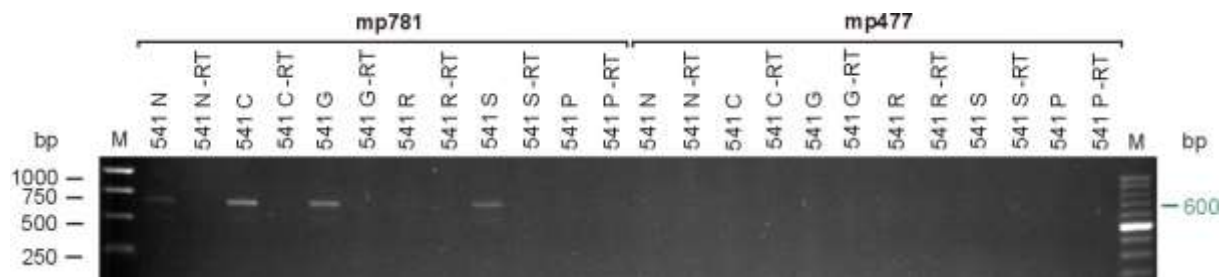
W wyniku reakcji z zastosowaniem starterów mp037-f i mp037-r uzyskano amplifikację produktu o wielkości 670 bp. Wystąpił on u obiektów 541 N, 541 C, 541 G i 541 S (nie wystąpił u obiektów 541 R oraz 541 P). Wydajność amplifikacji tego produktu była niska (ryc. 10).



**Ryc. 10.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *mp411-f/ mp411-r* oraz *mp037-f/ mp037-r*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkryptazy; M – wzorzec wielkości fragmentów DNA.

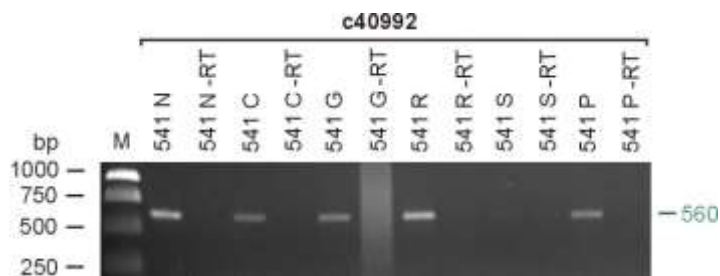
Po reakcji ze starterami mp781-f i mp781-r obserwowano produkt o wielkości 600 bp. Wystąpił on u obiektów 541 N, 541 C, 541 G oraz 541 S (nie wystąpił u obiektów 541 R oraz 541 P). Najmniejszą wydajność amplifikacji stwierdzono u obiekcie 541 N (ryc. 11).

Po użyciu starterów mp477-f i mp477-r nie otrzymano produktów amplifikacji (ryc. 11).



**Ryc. 11.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *mp781-f/ mp781-r* oraz *mp477-f/ mp477-r*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkryptazy; M – wzorzec wielkości fragmentów DNA.

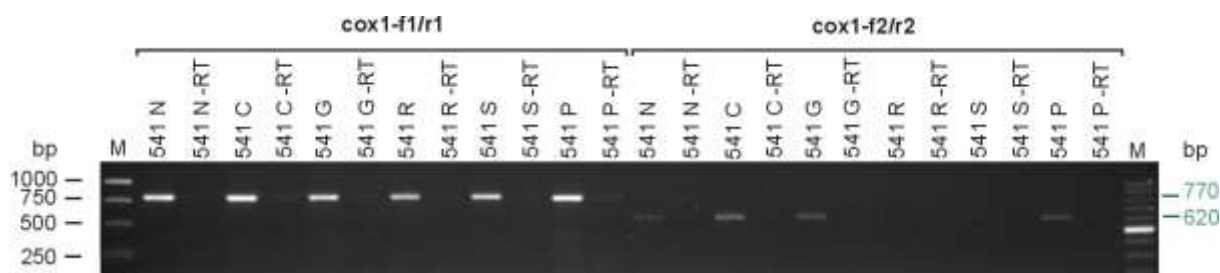
Po reakcji ze starterami c40992-f i c40992-r obserwowano produkt o wielkości 560 bp. Wystąpił on u obiektów 541 N, 541 C, 541 G, 541 R oraz 541 P (nie wystąpił u obiekcie 541 S). Największą wydajność amplifikacji stwierdzono u obiektów 541 N oraz 541 R (ryc. 12).



**Ryc. 12.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *c40992-f/ c40992-r*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkrypcji; M – wzorec wielkości fragmentów DNA.

Po użyciu starterów *cox1-f1* i *cox-r1* otrzymano produkt o wielkości 770 bp. Jego silną amplifikację obserwowano u wszystkich badanych obiektów (ryc. 13).

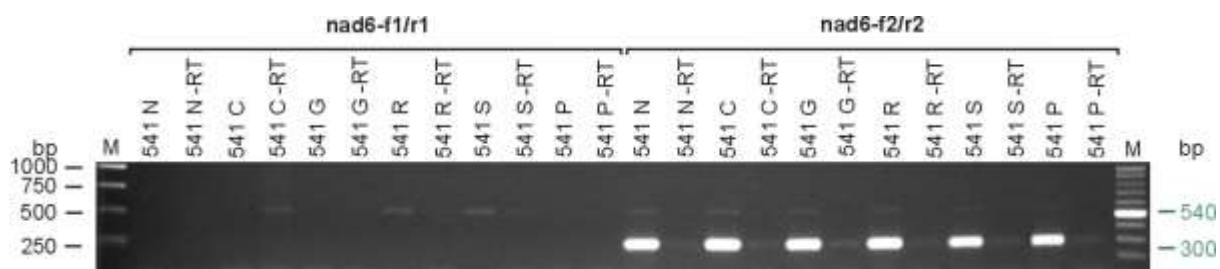
W wyniku reakcji z zastosowaniem starterów *cox1-f2* i *cox-r2* uzyskano amplifikację produktu o wielkości 620 bp. Wystąpił on u obiektów 541 N, 541 C, 541 G i 541 P (nie wystąpił u obiektów 541 R i 541 S). Wydajność amplifikacji tego produktu była niska (ryc. 13).



**Ryc. 13.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *cox1-f1/ cox1-r1* oraz *cox1-f2/ cox1-r2*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkrypcji; M – wzorec wielkości fragmentów DNA.

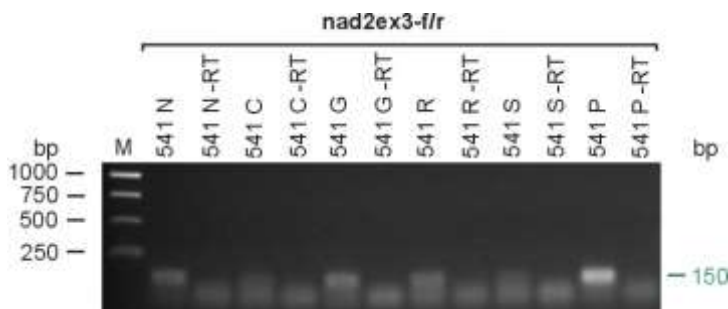
Po reakcji ze starterami *nad6-f1* i *nad6-r1* u obiektów 541 R i 541 S obserwowano produkt o wielkości 540 bp. Produkt ten nie wystąpił u obiektów 541 N, 541 C, 541 G oraz 541 P. Wydajność jego amplifikacji była bardzo niska (ryc. 14).

Po użyciu starterów *nad6-f2* i *nad6-r2* otrzymano produkt o wielkości 300 bp. Jego amplifikację obserwowano u wszystkich obiektów. Wydajność amplifikacji tego produktu była wysoka (ryc. 14).



**Ryc. 14.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *nad6-f1/ nad6-r1* oraz *nad6-f2/ nad6-r2*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkrypcji; M – wzorec wielkości fragmentów DNA.

Po użyciu starterów *nad2ex3-f* i *nad2ex3-r* otrzymano produkt o wielkości 150 bp. Jego amplifikację obserwowano u obiektów 541 N, 541 G, 541 R i 541 P (nie zaobserwowano u obiektów 541 C oraz 541 S). Wydajność amplifikacji tego produktu była najsilniejsza dla obiektu 541 P (ryc. 15).



**Ryc. 15.** Produkty RT-PCR uzyskane przy użyciu starterów *nad2ex3-fl nad2ex3-r*; -RT – kontrola bez odwrotnej transkryptyzy; M – wzorec wielkości fragmentów DNA.

### Temat badawczy 3

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

W roku 2018 oceniono męską płodność 690 roślin mieszańcowych pochodzących z zapylenia męskosterylnych wersji linii 541 z cytoplazmami C i P pyłkiem pochodzącym z europejskich populacji żyta. Niespełna połowę przebadanych osobników stanowiły rośliny z cytoplazmą Pampa, roślin z CMS-C było nieznacznie więcej (tab. 11). Rośliny wykazujące objawy bardzo głębokiej sterylności (1 w skali Gegera i Morgensterna) nie zostały znalezione w żadnej z badanych populacji.

**Tabela 11** 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	
Hungarian Giant	C	0	1	3	0	0	0	0	3	48	55
Landsorte K9538	C	0	6	19	3	6	3	4	6	16	63
Szk. 14/15	C	0	0	14	2	2	1	1	2	41	63
Szk. 15/15	C	0	1	6	1	2	2	1	4	58	75
Szk.88	C	0	1	6	1	0	2	0	1	51	62
Vjatka	C	0	1	8	0	0	0	1	3	25	38
D.ZłotexStanko	P	0	21	35	3	1	0	0	0	7	67
Hungarian Giant	P	0	36	52	1	1	1	2	0	0	93
Landsorte K9538	P	0	24	27	0	0	0	0	0	0	51
Szk.88	P	0	35	32	0	0	1	0	0	0	68
Vjatka	P	0	24	27	0	2	0	0	1	1	55
<b>Ogółem</b>		<b>0</b>	<b>150</b>	<b>229</b>	<b>11</b>	<b>14</b>	<b>10</b>	<b>9</b>	<b>20</b>	<b>247</b>	<b>690</b>
	w tym z CMS-C	0	10	56	7	10	8	7	19	239	356
	w tym z CMS-P	0	140	173	4	4	2	2	1	8	334

Mieszańce z cytoplazmą Pampa, niezależnie od pochodzenia populacji zapyłającej, charakteryzowały się bardzo dużym udziałem roślin męskosterylnych ocenianych w skali Geigera i Morgensterna na 2-3. Udział roślin męskosterylnych w mieszańcach z cytoplazmą Pampa mieścił się w granicach od ponad 82% (polska populacja D.ZłotexStanko) do 100% (Landsorte K9538 z byłej Jugosławii) (tab.12). Frekwencja roślin męskopłodnych (oceny 7-9 w skali Geigera i Morgensterna) u mieszańców z cytoplazmą Pampa była na bardzo niskim poziomie – od 0 (Landsorte K9538 i Szk.88) do 3,6% (Vjatka z Rosji), ale z jednym wyjątkiem. Mieszańców męskopłodnych między 541P a populacją D.ZłotexStanko było nieco ponad 10%.

**Tabela 12** 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
Hungarian Giant	C	7.27	0.00	92.73
Landsorte K9538	C	39.68	19.05	41.27
Szk. 14/15	C	22.22	7.94	69.84
Szk. 15/15	C	9.33	6.67	84.00
Szk.88	C	11.29	4.84	83.87
Vjatka	C	23.68	0.00	76.32
D.ZlotexStanko	P	83.58	5.97	10.45
Hungarian Giant	P	94.62	3.23	2.15
Landsorte K9538	P	100.00	0.00	0.00
Szk.88	P	98.53	1.47	0.00
Vjatka	P	92.73	3.64	3.64
<b>Ogółem</b>	<b>C</b>	<b>18.54</b>	<b>7.02</b>	<b>74.44</b>
	<b>P</b>	<b>93.71</b>	<b>2.99</b>	<b>3.29</b>

Mieszańce z cytoplazmą C charakteryzowały się w prawie wszystkich badanych kombinacjach krzyżowań dominującym udziałem roślin męskopłodnych (tab.10). Jedynie w mieszańcach linii 541C z jugosłowiańską populacją Landsorte K9538 udział roślin męskopłodnych wyniósł znacznie poniżej 50% i był niewiele większy od frekwencji roślin męskosterylnych (tab.11). Rośliny częściowo płodne (CP), tj. klasyfikowane w zakresie od 4 do 6 w skali Geigera i Morgensterna, stanowiły najmniej liczną kategorię fenotypową, niezależnie od rodzaju cytoplazmy sterylizującej.

#### Temat badawczy 4

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

Wszystkie badane w 2018 roku linie dawały mieszańce plonujące wyraźnie gorzej niż odmiany wzorcowe (tab.13). Plony mieszańców eksperymentalnych stanowiły od nieco ponad 60% do niespełna 85% średniego plonu wzorców. Mieszańce eksperymentalne z udziałem trzech linii męskosterylnych z cytoplazmą C należały do najslabiej plonujących – poniżej 70% plonu wzorców. Podobny poziom plonowania odnotowano dla ośmiu mieszańców eksperymentalnych z cytoplazmą Pampa. Wśród linii z cytoplazmą C najlepszy wynik dała linia ZUT\_160086P – ponad 75% plonu wzorca. Pozostałe dwie też należały do słabo plonujących, ale uwzględniając statystyczną istotność otrzymanych wyników, można je zakwalifikować do licznej grupy linii charakteryzujących się przeciętną wartością kombinacyjną.

Pod względem pozostałych badanych w doświadczeniu cech użytkowych mieszańce z cytoplazmą C ocenione zostały na poziomie zbliżonym do tych, w których formy mateczne zawierały cytoplazmę Pampa. Poziom wylegania był znikomy ze względu na warunki pogodowe (długotrwały brak opadów) wiosną 2018 roku. Odmiany wzorcowe wyróżniały się nieco mniejszą wysokością niż mieszańce eksperymentalne. Porażenie przez rdzę brunatną było dość silne (wyniki ocen w granicach 4-5 w skali 9-stopniowej), ale żaden z mieszańców nie wyróżniał się wyraźnie większą odpornością.

**Tabela 13** Średni plon ziarna oraz inne cechy użytkowe mieszańców F<sub>1</sub> zaobserwowane w doświadczeniu z mieszańcami żyta założonym metodą wzorcową w trzech miejscowościach. Pogrubioną czcionką zaznaczono mieszańce z CMS-C, kursywą odmiany wzorcowe.

Lp.	Nazwa mieszańca	Plon (kg/pol.)	Plon [% wz.]	Rdza brunatna	Wysokość [cm]	Wyleganie
1	<i>KWS Serafino (wz.)</i>	4.40	101.25	4.7	114.3	8.5
2	<i>KWS Binntto (wz.)</i>	4.29	98.74	4.5	113.0	8.5
3	S_341P/16	3.62	83.39	4.7	115.2	8.5
4	NS_195P/16	3.49	80.43	4.3	118.7	8.2
5	NS_144P/16	3.40	78.36	4.5	127.3	8.3
6	NS_198P/16	3.40	78.27	4.8	116.8	8.2
7	NS_162P/16	3.38	77.72	4.5	121.8	8.3
8	NS_178P/16	3.37	77.59	4.7	117.8	8.3
9	S_284P/16	3.35	77.08	5.0	118.5	8.3
10	NS_147P/16	3.31	76.30	4.3	120.5	8.5
11	NS_149P/16	3.31	76.19	4.5	121.7	8.3
12	NS_177P/16	3.30	75.95	4.3	124.0	8.5
13	S_339P/16	3.29	75.65	4.5	123.3	8.3
<b>14</b>	<b>ZUT_160086P</b>	3.28	75.60	4.3	125.8	8.3
15	NS_203P/16	3.24	74.51	4.5	125.0	8.5
16	NS_188P/16	3.17	72.90	4.3	118.3	8.3
17	NS_180P/16	3.15	72.58	4.3	123.7	8.3
18	NS_155P/16	3.11	71.63	4.7	117.0	8.3
19	NS_184P/16	3.10	71.36	4.2	124.2	8.3
20	NS_206P/16	3.06	70.46	4.3	119.2	8.0
21	NS_151P/16	3.04	70.02	4.3	117.8	8.3
22	NS_207P/16	3.04	69.94	4.7	118.0	8.5
<b>23</b>	<b>ZUT_160062P</b>	3.03	69.80	4.7	129.2	8.3
24	S_291P/16	3.00	69.17	4.3	119.2	8.5
25	NS_190P/16	2.97	68.46	4.3	125.8	8.5
<b>26</b>	<b>ZUT_160092P</b>	2.97	68.36	4.3	117.2	8.3
27	NS_158P/16	2.96	68.24	4.5	118.8	8.0
28	NS_142P/16	2.91	66.93	4.5	124.7	8.5
29	NS_154P/16	2.87	66.16	4.3	118.3	8.3
<b>30</b>	<b>ZUT_160091P</b>	2.82	64.99	4.5	123.3	8.5
31	NS_208P/16	2.80	64.41	4.5	126.0	8.0
32	NS_204P/16	2.67	61.43	4.5	119.3	8.0
Średnia ogólna		3.22		4.48	120.74	8.34
<i>Średnia dla wzorców</i>		<i>4.34</i>		<i>4.58</i>	<i>113.67</i>	<i>8.50</i>

Opublikowane streszczenia:

Hanek M., Stojalowski S. „Markery DArT związane z genami kontrolującymi pylenie żyta z cytoplazmą sterylizującą Pampa” Ogólnopolska konferencja naukowa „Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy” Lublin, 25-27 czerwca 2018, Streszczenia, s.19