

pieczętka

**SPRAWOZDANIE O STANIE REALIZACJI ZADANIA**  
z wykonania badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej  
w 2012 roku

1. Nr decyzji MRiRW: **HOR hn 801-3/12 zadanie nr 21**
2. Nazwa tematu: **Poszukiwania wspólnych mechanizmów dziedziczenia płodności roślin z cytoplazmą CMS-C oraz cytoplazmą CMS-Pampa**
3. Podmiot realizujący temat: **Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie**
4. Wydział/Pracownia/ Pracownie: **Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa, Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin**
5. Kierownik tematu (zgodnie z kartą tematu): **dr hab. Stefan Stojalowski**  
Wykonawcy: **mgr inż. Monika Hanek, mgr inż. Aleksandra Bobrowska, dr Beata Myśków, dr hab. Mirosław Tyrka, dr Marek Szklarczyk, mgr inż. Przemysław Tomczak**
6. **Informacja o realizacji prac w roku 2012**
  - a) **Materiały i metody:**

Zadanie 1. Ocena, czy w egzotycznych populacjach żyta ozimego występują allele płodności dla cytoplazm CMS-C i CMS-P oraz czy populacje te znacząco różnią się pod tym względem od polskich populacji żyta.

W roku 2012 badaniami objęto osiem populacji o egzotycznym pochodzeniu (Iran lub Ameryka Południowa): Altevogt 14159, Altevogt 14160, Altevogt 14161, IRAN I, IRAN IX, San Jose, Pico Massaux, Trenelense. Ziarno badanych obiektów otrzymano z Uniwersytetu w Hohenheim (od profesorów H.H. Geigera i T. Miedanera) wraz z informacją, że populacje te były źródłem genów bardzo efektywnie przywracających płodność pręcikowia u roślin z cytoplazmą Pampa. Krzyżowania każdej z badanych populacji z męskosterylnymi wersjami linii wsobnej 541 przeprowadzono w namiotach foliowych. Nasiona szesnastu mieszańców (dwa źródła CMS i osiem komponentów ojcowskich) wysiano punktowo w rozstawie 20x25 cm jesienią 2011 na polu stacji doświadczalnej Hala Wegetacyjna Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Dodatkowo, w celach porównawczych wysiano mieszańce, w których zapylaczami były cztery polskie populacje żyta: Szk.63, Szk.73, Szk.75 i Szk.91. Jako testery dla tych polskich populacji zastosowano męskosterylne mieszańce proste. Ocenę płodności/sterylności roślin wykonano wzrokowo w okresie kwitnienia stosując 9-

stopniową skalę bonitacyjną opracowaną przez Geigera i Morgensterna (1975). Ogółem oceniono ponad trzy tysiące pojedynków. W obrębie każdej z badanych kombinacji (źródło CMS x populacja) oceniono nie mniej niż 70 roślin.

Zadanie 2. Poszukiwania mitochondrialnych czynników genetycznych wywołujących męską sterylność w cytoplazmie Pampa poprzez analizy ekspresji genów mitochondrialnych.

Do analizy ekspresji genów mitochondrialnych wykorzystano cDNA otrzymane w reakcji odwrotnej transkrypcji w obecności losowych starterów dziewięcionukleotydowych. Jako matrycę do syntezy cDNA zastosowano całkowite RNA uzyskane z etiolowanych kielków linii wsobnej 541 w trzech wariantach cytoplazmatycznych. W liniach z cytoplazmami sterylizującymi CMS-C oraz Pampa sprawdzano różnice poziomu ekspresji genów, zaś linia 541N z cytoplazmą niesterylizującą, posłużyła w doświadczeniu jako kalibrator, czyli tkanka kontrolna, do której odnoszono otrzymane wyniki. Do badań wybrano trzy fragmenty konserwatywnych sekwencji genów mitochondrialnych oznaczonych symbolami: nad2ex1 oraz nad7ex5. Wyboru par starterów dokonano w oparciu o analizy RT-PCR przeprowadzone we wcześniejszych latach badań, kierując się jakością uzyskanych uprzednio transkryptów. Gen referencyjny, pełniący funkcję normalizatora, stanowiła sekwencja rRNA z małej podjednostki rybosomalnej oznaczonej jako 18S. Po sporządzeniu, dla układu, krzywej kalibracyjnej w celu sprawdzenia wydajności reakcji, wybrano odpowiednią do dalszych analiz wartość docelowego stężenia cDNA, którą otrzymano po 4-krotnym rozcieńczeniu matrycy wyjściowej. Do porównania poziomu ekspresji genów zastosowano metodę podwójnej delty, opartej na matematycznej analizie wartości Ct badanego genu w stosunku do Ct genu referencyjnego. Wartość Ct oznacza numer cyklu w fazie wykładniczej, gdy wartość fluorescencji znacząco wzrasta z cyklu na cykl. Celem wyeliminowania błędów, każda próba analizowana była w trzech powtórzeniach. Skrajne wartości Ct powtórzenia, które znacząco odbiegały od pozostałych odrzucano, a otrzymane wyniki stanowiły średnią arytmetyczną Ct jednej próby.

Zadanie 3. Opracowanie precyzyjnej mapy genetycznej chromosomu 4RL i próba zlokalizowania na niej locus genu kontrolującego płodność w cytoplazmie Pampa.

Do analiz, których celem było określenie lokalizacji głównego genu przywracającego płodność u roślin z cytoplazmą Pampa wykorzystano populację mapującą wytworzoną na bazie mieszańca między męskosterylną linią S305P, a losowo wybraną rośliną z odmiany mieszańcowej Gonello F1. Uzyskane potomstwo pokolenia F2 wysiano na terenie Hali Wegetacyjnej ZUT w Szczecinie. Rośliny populacji mapującej rosące w rozstawie 20 x 20cm oceniono pod kątem płodności dwiema metodami: wykonując obserwacje wzrokowe przy zastosowaniu skali bonitacyjnej Geigera i Morgensterna (1975) oraz izolując od 1 do 5 kłosów na każdej roślinie i oceniając odsetek osadzonych ziaren. Liście badanych roślin ścięto wiosną 2012 roku, wyizolowano DNA i po zakończeniu oceny fenotypowej płodności, wybrano genotypy do analiz metodą DArT (Diversity Array Technology). Wykonano też analizy metodą PCR-SCAR przy zastosowaniu znanych markerów zlokalizowanych na długim ramieniu chromosomu 4R. Dokonano też próby zaprojektowania w oparciu o udostępnione sekwencje klonów DArT nowych markerów SCAR.

Zadanie 4. Ocena przydatności markerów z chromosomu 4RL do prac selekcyjnych z zastosowaniem cytoplazmy Pampa, CMS-C i obu tych cytoplazm jednocześnie.

O ewentualnej przydatności markerów w hodowli nowych linii dopełniających decyduje siła sprzężenia danego markera z genem męskiej sterility oraz zdolność rozdzielcza markera, która zależy od polimorfizmu jaki dany marker wykazuje w zróżnicowanych materiałach genetycznych. Ocenę polimorfizmu markerów PCR-SCAR z chromosomu 4RL przeprowadzono na zbiorze około 50 linii wsobnych, z których większość została wytworzona w ramach programów hodowli mieszańców żyta opartych o system CMS-Pampa. Uzyskane dane o polimorfizmie produktów PCR-SCAR wykorzystano do wyliczenia wartości współczynnika PIC (polymorphic information content) informującego o przydatności danego markera do rozróżniania badanych genotypów (Powell i in. 1996).

$$PIC = 1 - \sum_{i=1}^n p_i^2$$

gdzie  $p_i$  oznacza częstotliwość występowania  $i$ -tego allele.

**b) Szczegółowe omówienie wykonanych prac i uzyskanych wyników (łącznie dla wszystkich pracowni realizujących temat).**

Zadanie 1. Ocena, czy w egzotycznych populacjach żyta ozimego występują allele płodności dla cytoplazm CMS-C i CMS-P oraz czy populacje te znacząco różnią się pod tym względem od polskich populacji żyta.

W roku 2012 oceniono prawie trzy tysiące trzysta pojedynków - nie mniej niż po 70 roślin w obrębie każdej z badanych kombinacji (źródło CMS x populacja). Najliczniej 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 sterylności (tab.1). Rośliny wykazujące objawy bardzo głębokiej sterylności (1 w skali Gegeera i Morgensterna) prawie nie pojawiały się, gdy obecna była cytoplazma C (zaledwie 24 zidentyfikowane przypadki). Przy obecności cytoplazmy Pampa liczebność tego rodzaju form była wyraźnie większa (171 roślin). Odwrotną zależność można zauważyć w obrębie roślin o najsilniejszych objawach płodności – rośliny w tej kategorii były niemal dwukrotnie częściej spotykane, gdy posiadały cytoplazmę C. Faktem jest jednak, że w niektórych kombinacjach krzyżowań z udziałem źródła Pampa ta klasa fenotypów też była dość licznie reprezentowana. W szczególności dotyczyło to mieszańców z udziałem pięciu badanych populacji pochodzących z Iranu.

Tabela 1

Plodność mieszańców między męskosterylnymi źródłami cytoplazm CMS-P i CMS-C, a egzotycznymi i 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	
Altevoigt14159	P	1	5	17	4	4	3	6	29	76	145
	C	1	10	20	11	0	3	0	6	20	71
Altevoigt14160	P	0	9	42	6	1	3	1	12	50	124
	C	3	4	30	2	1	1	1	3	44	89
Altevoigt14161	P	6	20	26	4	3	2	0	6	54	121
	C	3	4	10	2	1	5	6	15	76	122
IRAN I	P	2	23	23	5	2	2	2	5	67	131
	C	3	22	20	8	4	4	2	16	55	134
IRAN IX	P	4	32	15	4	0	0	2	8	66	131
	C	4	27	32	8	1	1	5	10	37	125
Pico Massaux	P	5	22	32	11	1	0	2	4	48	125
	C	4	8	4	4	1	3	3	9	100	136
San Jose	P	16	50	54	9	0	1	0	1	12	143
	C	2	6	20	8	1	0	6	15	74	132
Trenelense	P	10	41	18	3	2	0	6	13	59	152
	C	1	4	15	7	2	2	3	18	98	150
Szk.63	P	8	22	37	9	8	3	6	11	37	141
	C	1	1	12	3	1	7	7	14	84	130
Szk.73	P	40	44	52	11	3	4	0	4	2	160
	C	1	3	12	0	1	1	5	9	53	85
Szk.75	P	49	46	30	14	4	4	2	6	17	172
	C	1	3	28	2	6	4	8	15	125	192
Szk.91	P	30	41	64	14	2	1	1	6	10	169
	C	0	1	19	64	4	2	0	6	114	210
Ogółem		195	448	632	213	53	56	74	241	1378	3290
w tym z CMS-P		171	355	410	94	30	23	28	105	498	1714
w tym z CMS-C		24	93	222	119	23	33	46	136	880	1576

Relacje między źródłami CMS stają się lepiej widoczne po połączeniu dziewięciu klas bonitacyjnych w kategorii fenotypowe (rośliny męskosterylne, częściowo płodne i męskopłodne) oraz przekalkulowaniu liczebności roślin w tych kategoriach na ich procentową frekwencję (tab.2). Można tutaj również zauważyć wyraźną różnicę pod względem obecności genotypów dopełniających i restorerujących w obrębie populacji pochodzących z różnych regionów świata. Mieszańce, które otrzymano po zapyleniu źródeł CMS pyłkiem populacji pochodzących z Iranu (tj. Altevoigt 14159, Altevoigt 14160, Altevoigt 14161, IRAN I i IRAN IX) charakteryzują się względnie podobnym odsetkiem form męskosterylnych i męskopłodnych. Przeważnie udział

tych, które mają przywróconą płodność jest nieco większy, gdy obecna jest cytoplazma typu C, a męskosterylnych przy obecności cytoplazmy Pampa, ale różnice te nie są wielkie i uznanie ich za istotne wymaga zweryfikowania wyników badań w innych warunkach środowiskowych (w kolejnych sezonach wegetacyjnych). W przypadku populacji Altevogt 14159 zaobserwowano nawet nieco lepsze przywracanie płodności w cytoplazmie Pampa niż w cytoplazmie C.

Tabela 2

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

Populacja	Cytoplazma	MS	CP	MP
Altevogt 14159	CMS-P	15,86	7,59	76,55
	CMS-C	43,66	19,72	36,62
Altevogt 14160	CMS-P	41,13	8,06	50,81
	CMS-C	41,57	4,49	53,93
Altevogt 14161	CMS-P	42,98	7,44	49,59
	CMS-C	13,93	6,56	79,51
IRAN I	CMS-P	36,64	6,87	56,49
	CMS-C	33,58	11,94	54,48
IRAN IX	CMS-P	38,93	3,05	58,02
	CMS-C	50,40	8,00	41,60
Pico Massaux	CMS-P	47,20	9,60	43,20
	CMS-C	11,76	5,88	82,35
San Jose	CMS-P	83,92	6,99	9,09
	CMS-C	21,21	6,82	71,97
Trenelense	CMS-P	45,39	3,29	51,32
	CMS-C	13,33	7,33	79,33
Szk.63	CMS-P	47,52	14,18	38,30
	CMS-C	10,77	8,46	80,77
Szk.73	CMS-P	85,00	11,25	3,75
	CMS-C	18,82	2,35	78,82
Szk.75	CMS-P	72,67	12,79	14,53
	CMS-C	16,67	6,25	77,08
Szk.91	CMS-P	79,88	10,06	10,06
	CMS-C	9,52	33,33	57,14
Ogółem	CMS-P	54,61	8,58	36,81
	CMS-C	21,51	11,10	67,39

Trzy badane populacje pochodzące z Ameryki Południowej (Pico Massaux, San Jose i Trenelense) oraz cztery populacje polskie wyraźnie różnią się od populacji irańskich.

Przywracają one bardzo skutecznie płodność w cytoplazmie C (za wyjątkiem Szk.91, udział roślin całkowicie męskopłodnych mieści się w granicach 70-85%). W cytoplazmie Pampa również są one w stanie przywrócić zdolność do tworzenia płodnego pyłku, ale w znacznie mniejszym stopniu. Rośliny całkowicie płodne stanowiły w badanej grupie obiektów niespełna 37% mieszańców ze źródłem CMS-P, a ponad 67% roślin z cytoplazmą CMS-C (tab.2). Zdolność do dopełniania męskiej sterylności u trzech badanych populacji południowoamerykańskich była zbliżona do tego co się obserwuje w odmianach polskich (poniżej 20%). Ogółem ponad połowa badanych roślin z cytoplazmą Pampa była męskosterylna, podczas gdy analogiczne formy z cytoplazmą C stanowiły niewiele ponad 20%.

Zadanie 2. Poszukiwania mitochondrialnych czynników genetycznych wywołujących męską sterylność w cytoplazmie Pampa poprzez analizy ekspresji genów mitochondrialnych.

Oceniono poziom ekspresji mitochondrialnych genów nad2ex1 oraz nad7ex5 w męskosterylnych liniach wsobnych żyta, oznaczonych jako 541, z dziedzicznie odmiennymi cytoplazmami sterylizującymi typu CMS-C oraz CMS-Pampa. Jako kalibrator, względem którego oceniany był poziom ekspresji badanych genów, w obu reakcjach posłużyła linia 541N z cytoplazmą niesterylizującą, a jako gen referencyjny wybrano podjednostkę 18s rRNA. Do określenia poziomu ekspresji badanych genów zastosowano metodę podwójnej delty. W przypadku cytoplazmy sterylizującej typu CMS-C poziom ekspresji genu nad2ex1 (tab.3) był prawie trzykrotnie wyższy ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 3,84$ ), a ekspresja genu nad7ex5 (tab.4) zachodziła na tym samym poziomie ( $2^{-\Delta\Delta Ct} = 1,15$ ). Natomiast w przypadku cytoplazmy CMS-Pampa poziom ekspresji badanych genów był niższy ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$  dla genów nad2ex1 i nad7ex5 wynosiła odpowiednio 0,474 i 0,757). Niezbędne jest zweryfikowanie uzyskanych danych w trakcie dalszych prac badawczych i określenie, czy mogą mieć one związek z determinacją męskiej sterylności.

Tabela 3

Wyniki analizy ekspresji genu nad2ex1 obliczone metodą podwójnej delty.

Gen	Nazwa linii	Średnia wartość Ct	Odchylenie standardowe Ct	2- $\Delta\Delta$ Ct
nad2ex1	541C	15,74	0,05	3,84
	541P	17,92	0,03	0,474
	541N	17,20	0,09	
18s rRNA	541C	15,05	0,17	
	541P	14,21	0,08	
	541N	14,57	0,15	

Tabela 4

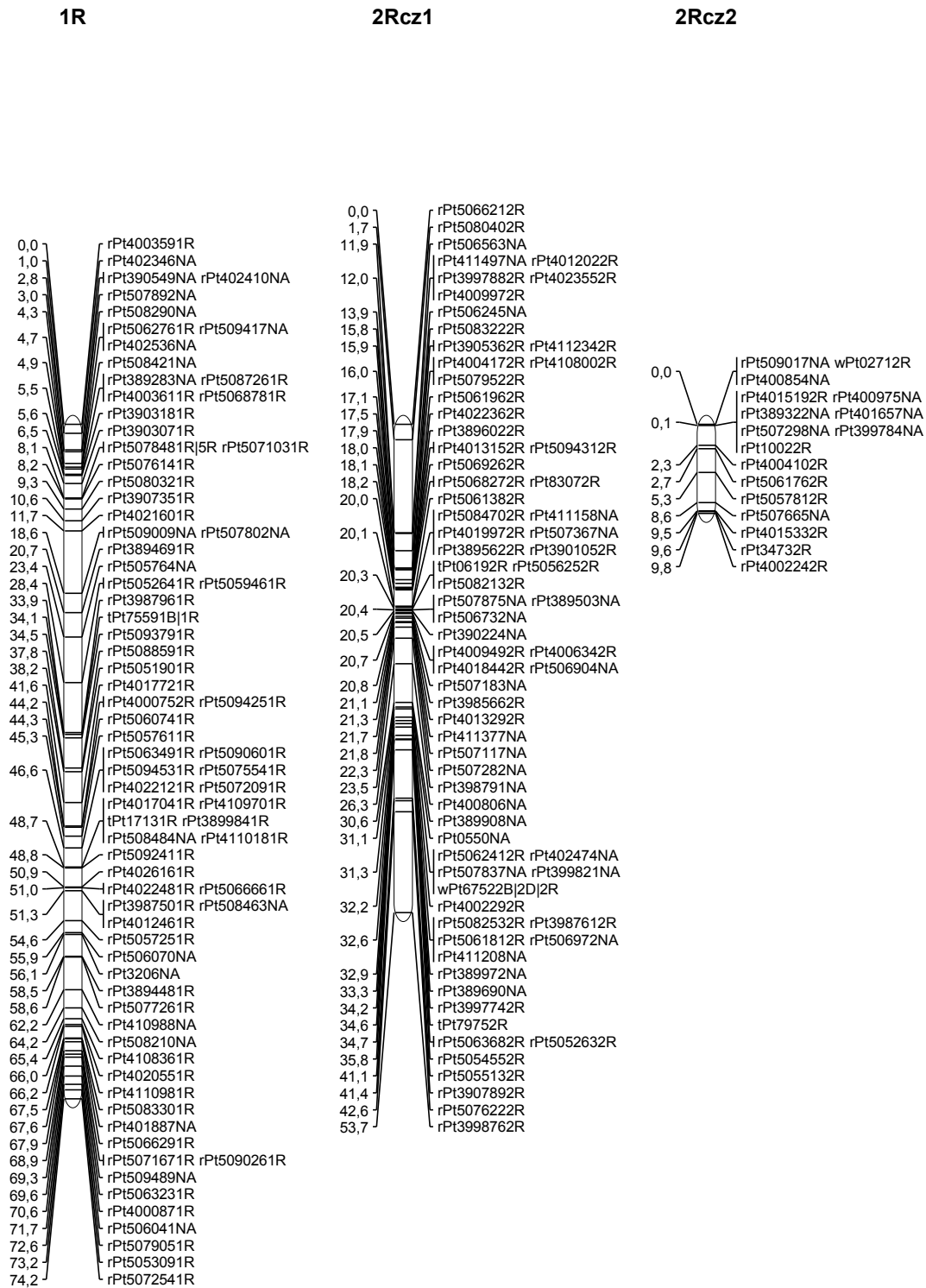
Wyniki analizy ekspresji genu nad7ex5 obliczone metodą podwójnej delty.

Gen	Nazwa linii	Średnia wartość Ct	Odchylenie standardowe Ct	2- $\Delta\Delta$ Ct
nad7ex5	541C	17,65	0,04	1,15
	541P	17,40	0,06	0,757
	541N	17,69	0,20	
18s rRNA	541C	15,39	0,07	
	541P	14,53	0,09	
	541N	15,22	0,40	

Zadanie 3. Opracowanie precyzyjnej mapy genetycznej chromosomu 4RL i próba zlokalizowania na niej locus genu kontrolującego płodność w cytoplazmie Pampa.

Analizy markerów DArT w obrębie populacji mieszańca F2 między linią męskosterylną S305P a losowo wybraną rośliną z odmiany mieszańcowej GonelloF1 pozwoliły na uzyskanie danych o 3359 markerach. Po odrzuceniu markerów monomorficznych do tworzenia grup sprzężeń wybrano 1540 markerów. Wykonano też w obrębie badanej populacji analizy PCR-SCAR z markerami z chromosomu 4RL, ale tylko jeden z zastosowanych markerów (SCSz23L500) okazał się polimorficzny. W oparciu o sekwencje DNA klonów DArT zaprojektowano też pięć dodatkowych markerów SCAR, z których trzy zostały włączone do analiz związanych z konstruowaniem mapy sprzężeń. Utworzona mapa genetyczna badanego mieszańca obejmuje wszystkie siedem chromosomów, z których większość jest reprezentowana przez 2-3 grupy (rys.1 a-e).



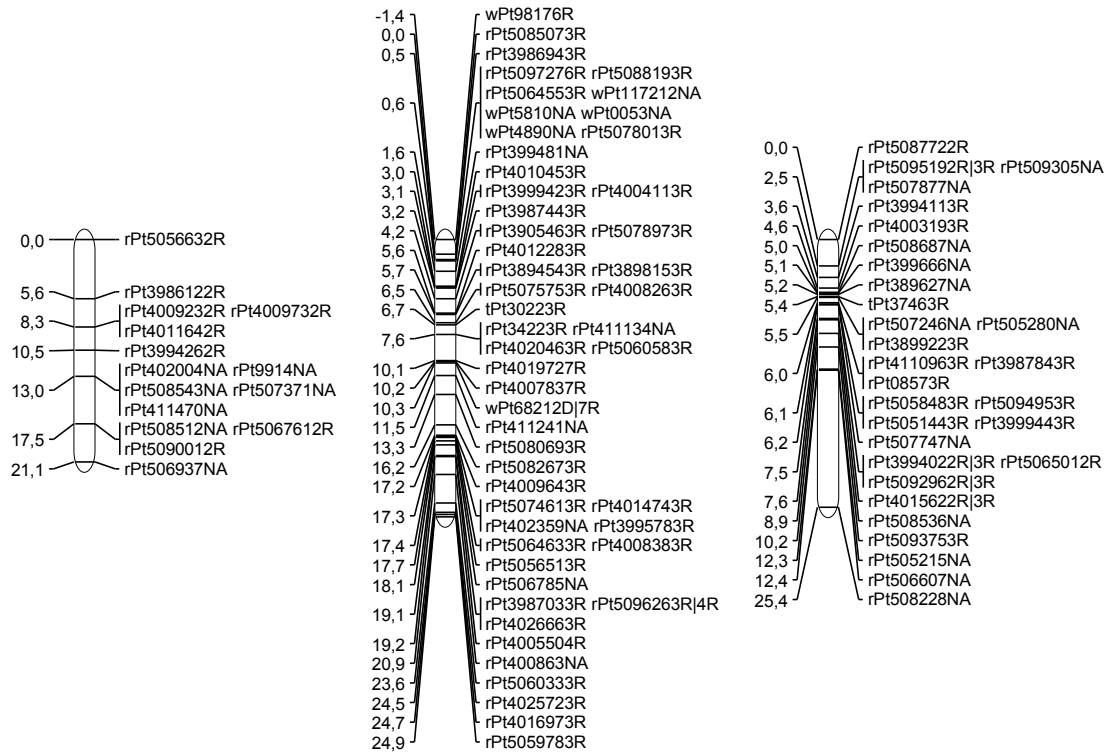


Rys. 1a. Mapa genetyczna mieszańca [S305P x Gonello 249-1]F2

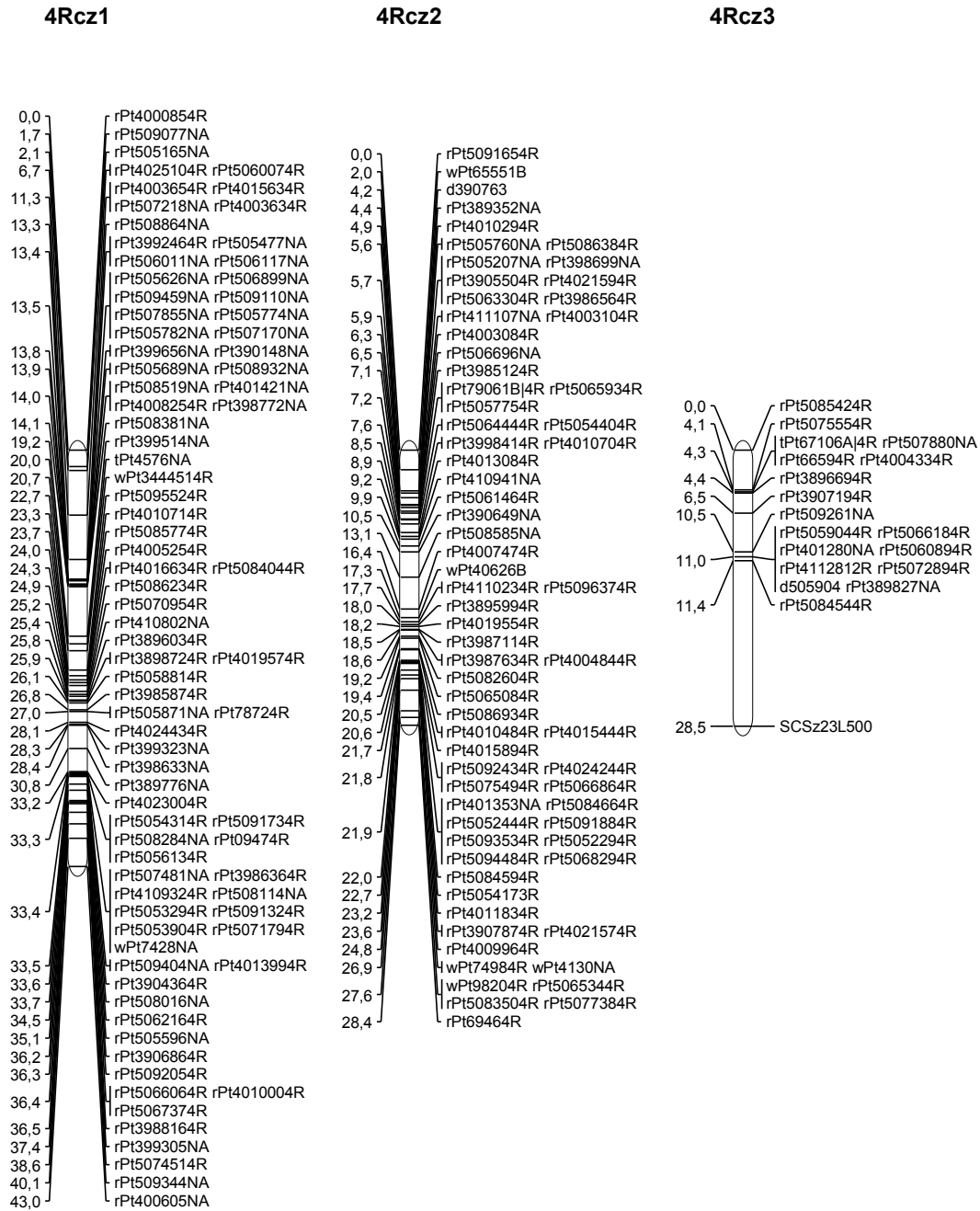
2Rcz3

3Rcz1

3Rcz2

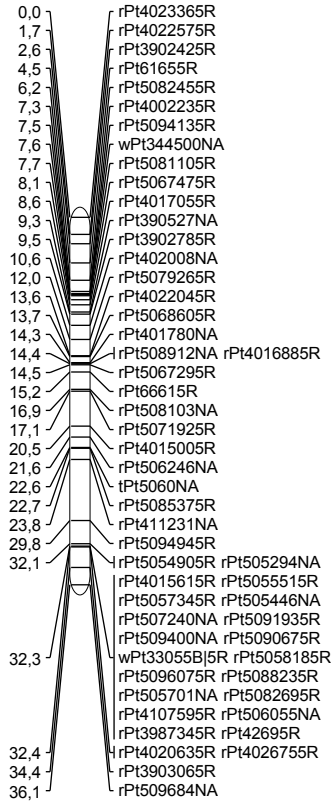


Rys.1b. Mapa genetyczna mieszańca [S305P x Gonello 249-1]F2

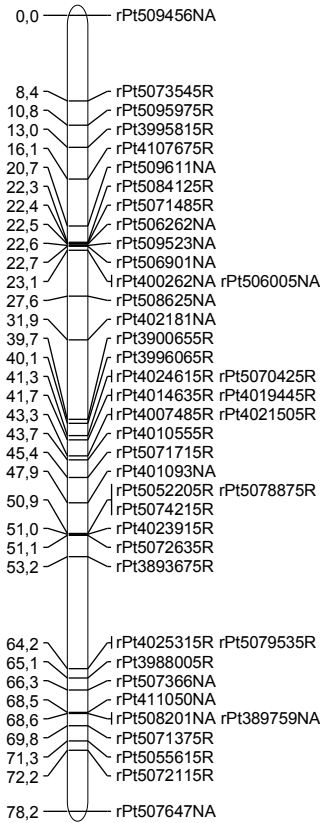


Rys.1c. Mapa genetyczna mieszańca [S305P x Gonello 249-1]F2

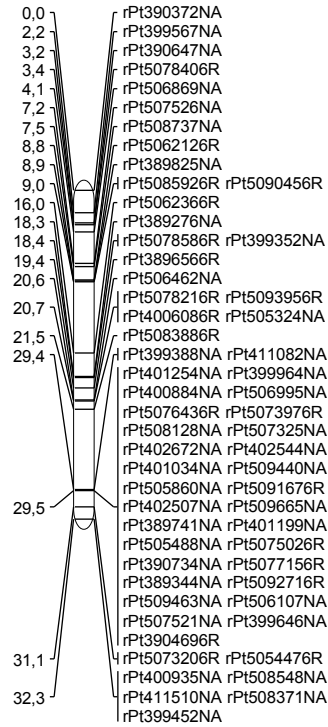
5Rcz1



5Rcz2



6Rcz1

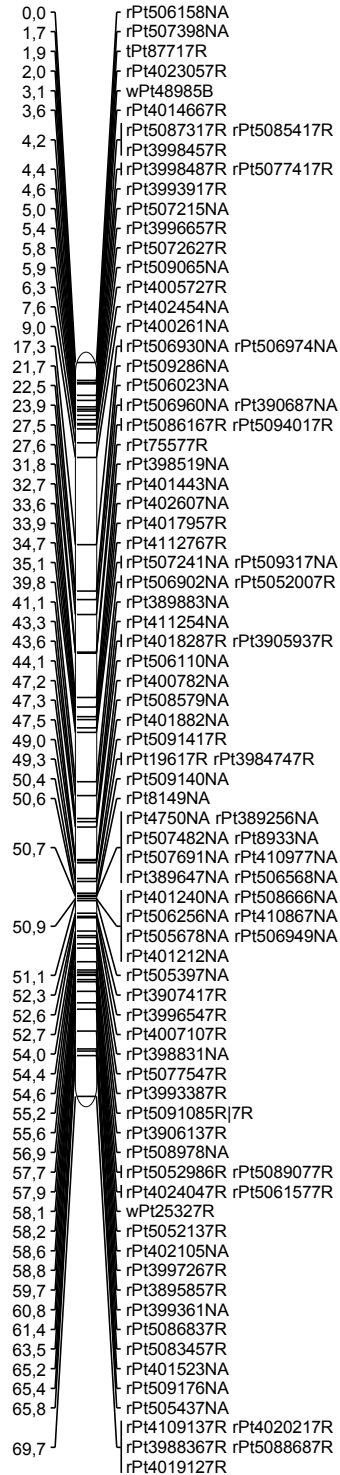
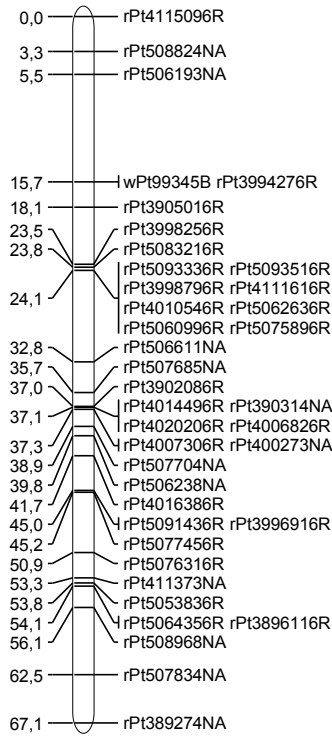
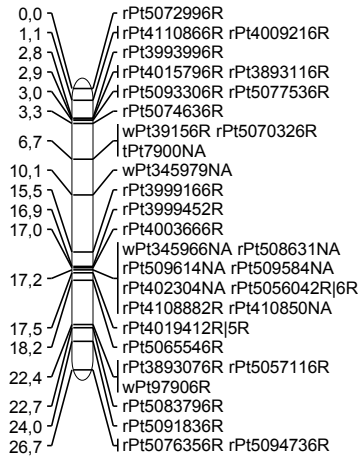


Rys.1d. Mapa genetyczna mieszańca [S305P x Gonello 249-1]F2

6Rcz2

6Rcz3

7R



Rys.1e. Mapa genetyczna mieszańca [S305P x Gonello 249-1]F2

Analizy mapowania interwałowego oraz testu Kruskala-Wallisa wskazują na lokalizację genów przywracających płodność u badanego mieszańca z cytoplazmą P na chromosomach 4R i 1R. Słabsze wskaźniki związku między markerami, a genami kontrolującymi płodność, odnotowano też na chromosomach 2R i 3R, ale wyniki te wymagają weryfikacji w dalszych badaniach.

Zadanie 4. Ocena przydatności markerów z chromosomu 4RL do prac selekcyjnych z zastosowaniem cytoplazmy Pampa, CMS-C i obu tych cytoplazm jednocześnie.

Najwyższe wartości współczynnika PIC zaobserwowano w przypadku markerów, które w podobnej liczbie linii ujawniały oba warianaty alleliczne (obecność prążka i brak prążka markerowego). Do tej grupy markerów należały produkty PCR: SCP14M55, SCY09d i SCSz334L700 (tab.5). Brak zdolności do rozróżniania badanych genotypów wykazywały marker SCP12M56 (z powodu braku genotypów, u których był obecny prążek markerowy) oraz marker SCSz530L850 (który generował prążek markerowy u większości badanych linii).

Tabela 5

Zbiorcze wyniki analiz PCR-SCAR w obrębie zestawu linii wsobnych żyta.

Marker	Liczba linii		PIC
	z prążkiem	bez prążka	
SCSz2L450	14	36	0,40
SCSz23L500	39	11	0,34
SCSz334L700	17	33	0,45
SCSz530L850	41	9	0,30
SCSz670L900	38	12	0,36
SCP12M56	0	50	0,00
SCP14M55	18	32	0,46
SCY09d	17	33	0,45

**Celem badań jest** bliższe poznanie podobieństw i różnic w genetycznej determinacji męskiej sterility u żyta z cytoplazmą Pampa i zaliczaną do typu Vavilovii cytoplazmą C.

Zatwierdzony harmonogram na rok 2011 przewidywał wykonanie prac badawczych w ramach następujących długookresowych zadań:

Zadanie 1. Ocena, czy w egzotycznych populacjach żyta ozimego występują allele płodności dla cytoplazm CMS-C i CMS-P oraz czy populacje te znacząco różnią się pod tym względem od polskich populacji żyta.

Zadanie 2. Poszukiwania mitochondrialnych czynników genetycznych wywołujących męską sterylność w cytoplazmie Pampa poprzez analizy ekspresji genów mitochondrialnych..

Zadanie 3. Opracowanie precyzyjnej mapy genetycznej chromosomu 4RL i próba zlokalizowania na niej locus genu kontrolującego płodność w cytoplazmie Pampa.

Zadanie 4. Ocena przydatności markerów z chromosomu 4RL do prac selekcyjnych z zastosowaniem cytoplazmy Pampa, CMS-C i obu tych cytoplazm jednocześnie.

**Harmonogram prac w bieżącym roku sprawozdawczym był realizowany zgodnie z planem**