

WYNIKI

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016 roku Genetyczne podłoże męskiej sterility pszenżyta z różnymi cytoplazmami oraz możliwość wykorzystania badanych cytoplazm do tworzenia systemów CMS u pszenicy

Temat badawczy 1

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

Cel zadania badawczego: Ocena fenotypowa męskiej płodności/sterylności w obrębie trzech mieszańców pszenżyta z cytoplazmami *T. timopheevi* i CMS-Pampa, skonstruowanie dla jednej z nich mapy sprzężeń i określenie na niej przypuszczalnych rejonów zawierających geny kontrolujące przywracanie płodności u pszenżyta oraz wytworzenie populacji mapującej do planowanego mapowania porównawczego restorerów skutecznych w cytoplazmie *Ae. sharonensis*. – cel zrealizowany

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

Materiałem badawczym ocenianym fenotypowo w 2016 roku były rośliny mieszańców F2 otrzymanych w wyniku zapylenia męskosterylnej linii L19 występującej w dwóch wersjach cytoplazmatycznych: z cytoplazmą *T. timopheevi* i cytoplazmą Pampa (z żyta uprawnego), pyłkiem trzech linii pszenżyta: Bolero 14/1, Stan I i Krakowiak. Ocena fenotypowa męskiej płodności została wykonana na około 90 osobnikach każdej kombinacji mieszańcowej. Badania prowadzono na polu stacji doświadczalnej ZUT w Szczecinie. Rośliny na polu były wysadzone ręcznie w szerokiej rozstawie 20 x 20 cm. Do oceny wykorzystano dwie metody: wzrokową ocenę pylenia roślin przy użyciu 5-stopniowej skali bonitacyjnej opracowanej przez Góral (2002) oraz ocenę zawiązywania ziaren w kłosach pod izolatorami. Na początku strzelania w źdźbło pobrano i zamrożono w -70 stopniach C fragmenty liści z roślin badanych mieszańców w celu późniejszej izolacji DNA i wykonania analiz genetycznych.

Spośród ocenionych trzech kombinacji krzyżowania (z których każda występowała w dwóch wersjach cytoplazmatycznych) do analiz DNA wybrano jedną. Podstawą wyboru były m.in. zgodne wyniki obu metod oceny fenotypowej. Po wyizolowaniu DNA osobniki wybranej populacji mapującej poddane zostały analizom DArTseq - wysoko-przepustowej techniki genotypowania oferowanej przez firmę Diversity Arrays Technology Pty. Technologia ta generuje dwie kategorie markerów molekularnych: Silico-DArT (markery dominujące) oraz SNP (markery kodominujące pozwalające na identyfikację heterozygot w populacjach mapujących).

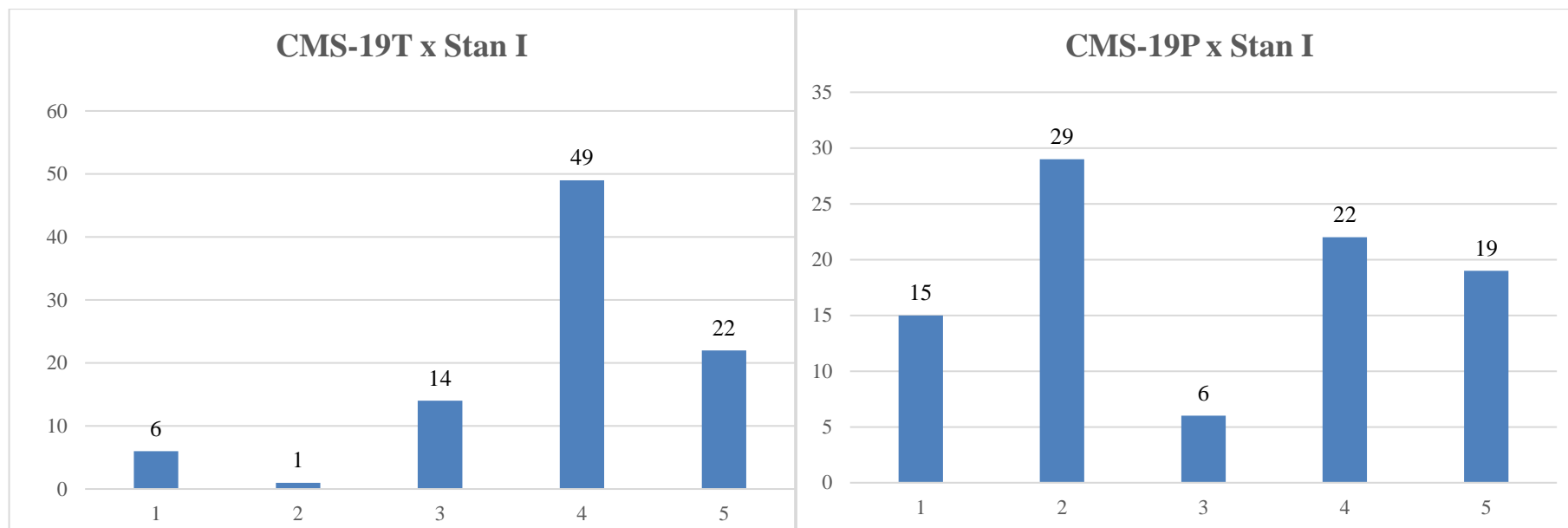
Konstruowanie grup sprzężeń wykonywano przy użyciu programu JoinMap 3.0 wykorzystującego algorytm Regression Mapping (RM). Grupowanie wykonywano w oparciu o funkcję LOD przy wartości krytycznej 20, a dystanse na mapach określano w centyMorganach (cM) przy zastosowaniu funkcji Kosambi.

Dodatkowo ocenie fenotypowej pod kątem męskiej płodności poddano około 20 linii blisko-izogenicznych w stosunku do męskosterylnej linii CMS-Salvo 15/1 oraz cztery mieszańce F2 między czterema męskosterylnymi liniami pszenżyta z cytoplazmami *T. timopheevi* (CMS-T), *Ae. Sharonensis* (CMS-A), *Ae. Ventricosa* (CMS-V) i CMS-Pampa (CMS-P) zapylnych wspólnym restorerem DAD182/00. Wyniki tej wstępnej oceny przeprowadzono na około 100 osobnikach w celu określenia przydatności w/w mieszańców do mapowania genów restorerowych działających w różnych cytoplazmach sterylizujących pszenżyta (pozytywny wynik oceny skutkowało decyzją o założeniu w dwóch miejscowościach doświadczenia polowego z populacjami mapującymi przeznaczonymi do mapowania porównawczego).

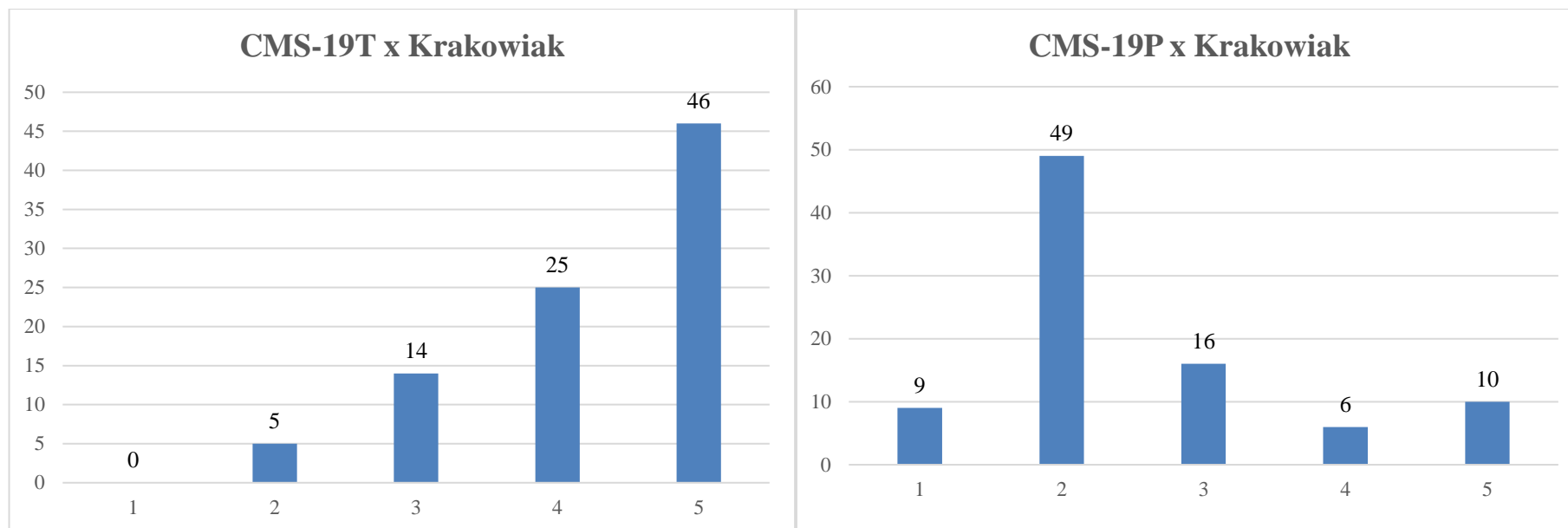
Wyniki (opisać)

Wszystkie trzy kombinacje mieszańców międzyliniowych występujące w dwóch wersjach cytoplazmatycznych (z cytoplazmą *T. timopheevi* i CMS-Pampa), które oceniano w warunkach polowych charakteryzowały się obecnością roślin o zróżnicowanym poziomie męskiej

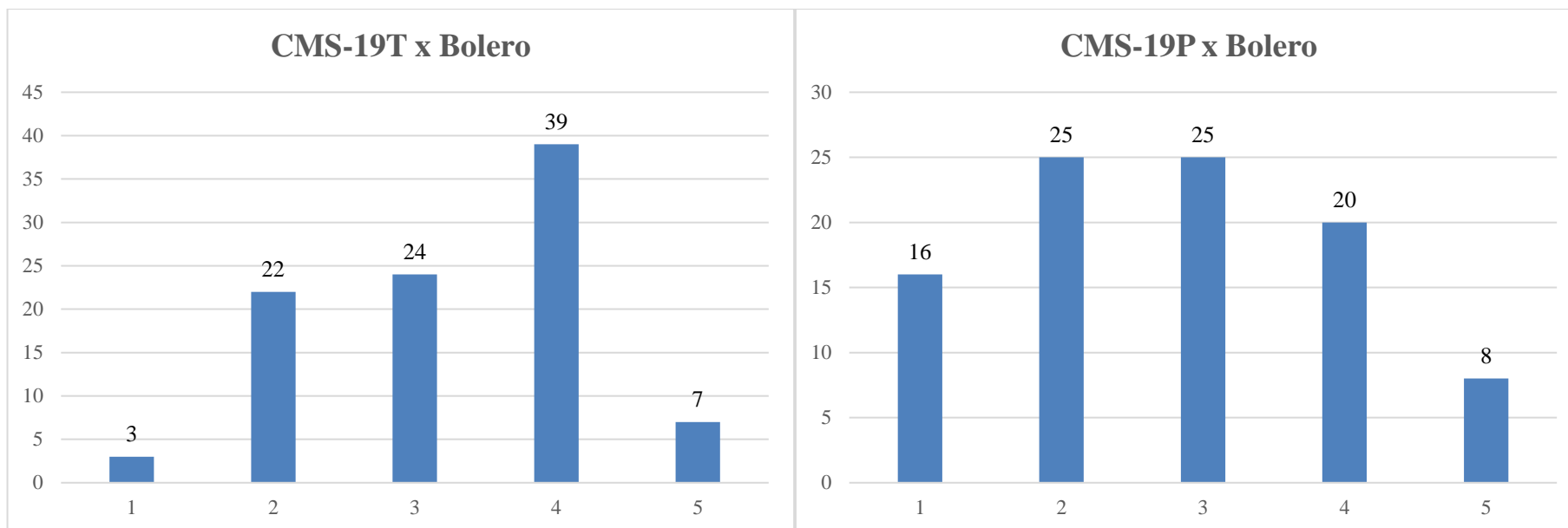
plodności. W pokoleniu F2 mieszańca między linią CMS-19T (z cytoplazmą *T. timopheevi*) a linią Stan I obserwowano przewagę roślin całkowicie lub prawie całkowicie męskopłodnych (rys.1). Analogiczne genotypy w cytoplazmie Pampa dzieliły się w miarę równomiernie pomiędzy kategorie form męskosterylnych i męskopłodnych..



Rys.1 Rozkład fenotypowy męskiej płodności (wg 5-stopniowej skali bonitacyjnej opracowanej przez Góral 2002) w populacjach mapujących mieszańców F2 otrzymanych po skrzyżowaniu męskosterylnych wersji linii CMS-19 z linią Stan I



Rys.2 Rozkład fenotypowy męskiej płodności (wg 5-stopniowej skali bonitacyjnej opracowanej przez Góral 2002) w populacjach mapujących mieszańców F2 otrzymanych po skrzyżowaniu męskosterylnych wersji linii CMS-19 z linią Krakowiak



Rys.3 Rozkład fenotypowy męskiej płodności (wg 5-stopniowej skali bonitacyjnej opracowanej przez Góral 2002) w populacjach mapujących mieszańców F2 otrzymanych po skrzyżowaniu męskosterylnych wersji linii CMS-19 z linią Bolero 14/1

Linia Krakowiak w sposób bardzo skuteczny przywracała płodność w mieszańcach z cytoplazmą *T. timopheevi*, ale przy obecności cytoplazmy Pampa okazała się być mało efektywnym restorerem (rys.2). Linia Bolero 14/1 w sposób porównywalny przywracała męską płodność w obu badanych cytoplazmach (rys.3). Jednocześnie u mieszańców z udziałem tej linii ojcowskiej rozkłady fenotypowe w pokoleniu F2 były najbardziej zbliżone do rozkładu normalnego. Taki rozkład jest metodycznie pożądanym przy próbach zastosowania metody mapowania w przedziałach (ang. Interval Mapping – IM) do lokalizowania genów odpowiedzialnych za dziedziczenie cech o złożonym podłożu genetycznym. Wyniki oceny wzrokowej były u mieszańców między CMS-19 a linią Bolero 14/1 wysoce istotnie skorelowane (wartości wsp. korelacji powyżej 0,7) z rezultatami oceny zawiązywania ziaren pod izolatorami (tab.1). Ta kombinacja krzyżowania została wybrana do analiz przy użyciu technologii DArTseq. Genotypowaniem objęto po 90 roślin mieszańca między linią CMS-19 a Bolero z cytoplazmą *T. timopheevi* i Pampa (łącznie 180 genotypów) oraz linie rodzicielskie.

Tabela 1

Współczynniki korelacji pomiędzy wynikami oceny męskiej płodności opartymi o obserwacje wzrokowe pylenia i zawiązywanie ziaren pod izolatorami.

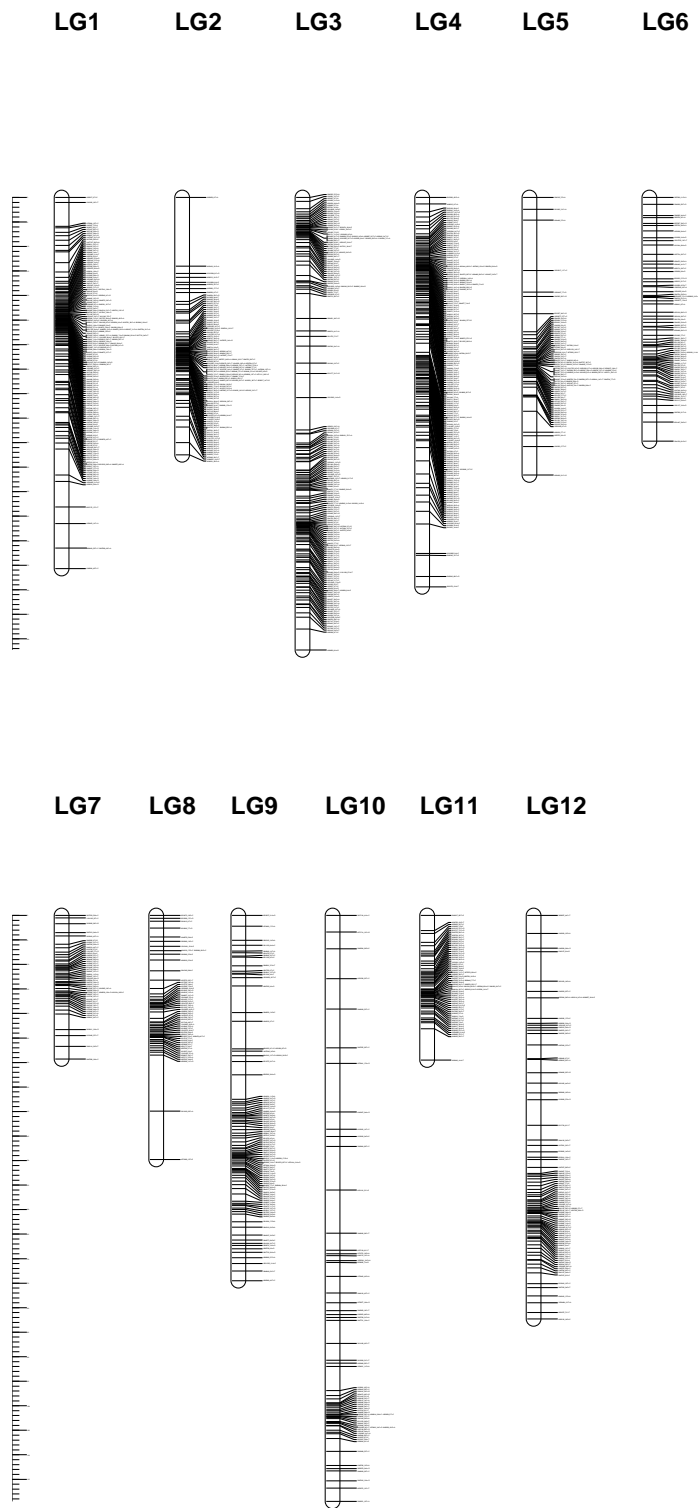
Mieszaniec F2	Wsp. korelacji
CMS-19T x Stan I	0,633
CMS-19P x Stan I	0,887
CMS-19T x Krakowiak	0,592
CMS-19P x Krakowiak	0,861
CMS-19T x Bolero	0,739
CMS-19P x Bolero	0,783

Do tworzenia grup sprzężeń w obrębie mieszańca [CMS-19T x Bolero]F2 użyto kodominujących markerów SNP, których w wyniku analizy techniką DArTseq otrzymano łącznie 5967. Spośród nich do mapowania wybrano 2148 markerów, które różnicowały linie rodzicielskie CMS-19T i Bolero 14/1. W wyniku grupowania przy poziomie LOD=20 powstało 12 większych grup sprzężeń liczących co najmniej 50 markerów oraz kilkadziesiąt drobnych grup liczących przeważnie po kilka-kilkanaście markerów. Większe grupy stanowiące znaczące fragmenty chromosomów pszenicyta wykorzystano do analizy Regression Mapping w celu skonstruowania map genetycznych. Finalnie w obrębie utworzonych map znalazło się łącznie 1269 markerów (tab.2). Największą liczbę markerów zawierały grupy sprzężeń 1, 3 i 4 (każda około 180 markerów), ale największą długość miała mapa grupy sprzężeń 10 (prawie 120cM) licząca zaledwie 67 markerów i charakteryzująca się w związku z tym stosunkowo małą gęstością (rys.4)

Tabela 2

Charakterystyka grup sprzężeń utworzonych w obrębie populacji mapującej [CMS-19T x Bolero]F2

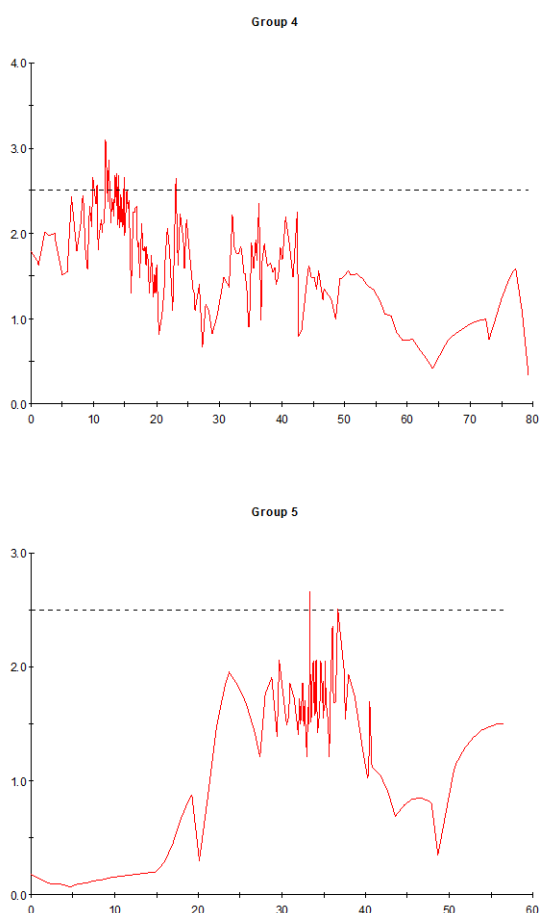
Grupa sprzężeń	Liczba markerów	Długość mapy (cM)	Przypuszczalny fragment chromosomu
1	178	75.7	Brak danych
2	136	52.5	6B (6BL)
3	185	92.2	7B
4	182	79.3	6R
5	93	56.5	Brak danych
6	70	49.6	5A
7	50	29.3	Brak danych
8	55	49.8	5R (5RL)
9	98	74.5	7R (7RL)
10	67	119.5	1B
11	67	29.5	2R (2RS)
12	88	82.3	Brak danych
Ogółem	1269	790.7	



Rys. 4. Mapa genetyczna dwunastu grup sprzężeń markerów SNP-DArTseq w populacji [CMS-19T x Bolero]F2

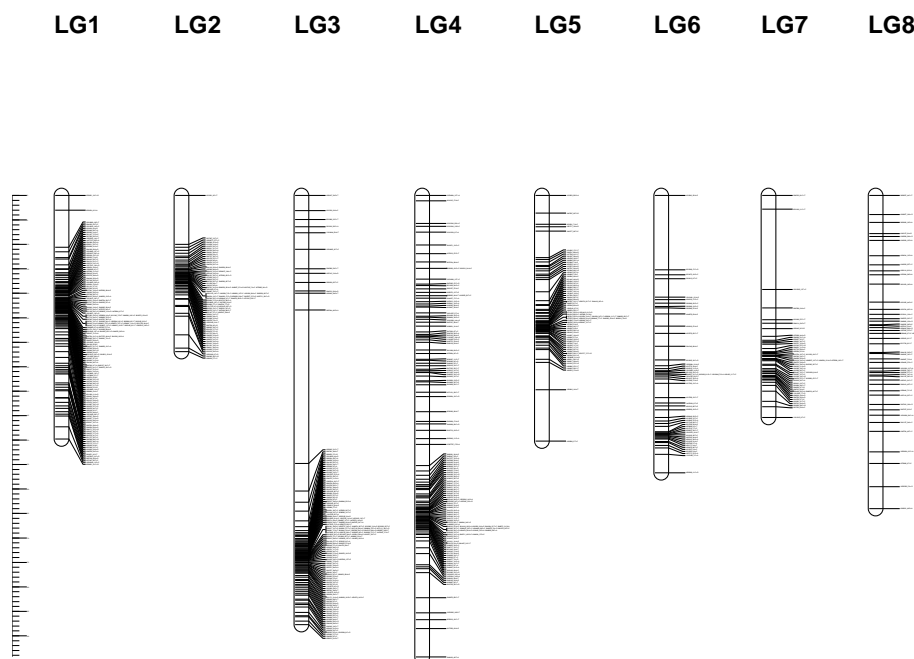
Pewne trudności napotkano przy identyfikowaniu lokalizacji chromosomowej otrzymanych grup sprzężeń. Poszukiwano polimorficznych markerów PCR oraz markerów DArTseq o znanej lokalizacji chromosomowej. Osiem z dwunastu grup sprzężeń przypisano do konkretnych chromosomów (ramion chromosomowych) pszenżyta (tab.2). Wśród zidentyfikowanych chromosomów jeden pochodził z genomu A (5A), trzy z genomu B (1B, 6B, 7B) i cztery z genomu R (2R, 5R, 6R, 7R).

Próbie określenia lokalizacji na utworzonych mapach sprzężeniowych genów odpowiedzialnych za przywracanie męskiej płodności zrealizowano przy zastosowaniu metody mapowania interwałowego. Tylko w przypadku dwóch grup sprzężeń – 4 (chromosom 6R) i 5 (chromosom dotąd niezidentyfikowany) krzywa LOD przekroczyła poziom istotności określony na $LOD=2,5$ (rys.5). Zarówno przebieg krzywej, jak i wartości parametrów wykrytych QTLi wskazują na obecności genów o słabym efekcie fenotypowym. Dodatkowo wykonana analiza danych testem nieparametrycznym Kruskala-Wallsa wykazała statystycznie istotny związek z genami restorerowymi zaledwie 71 markerów SNP-DArTseq. Wśród nich 58 znajdowało się w obrębie wymienionych dwóch grup sprzężeń, a pozostałe 13 markerów nie były włączone do skonstruowanych map (znajdowały się wśród markerów tworzących wspomniane powyżej drobne grupy sprzężeń).



Rys.5. Przebieg krzywych LOD w obrębie grup sprzężeń 4 (chromosom 6R) i 5

Spośród 5967 markerów SNP otrzymanych w wyniku analiz DArTseq w populacji [CMS-19P x Bolero]F₂, 1894 markery polimorficzne użyto do konstruowania map sprzężeń. Przy wartości krytycznej parametru LOD uzyskano 8 dużych grup sprzężeń zawierających co najmniej 45 markerów oraz kilkanaście drobnych grup liczących po kilka-kilkanaście loci. Dla ośmiu dużych grup sprzężeń skonstruowano mapy genetyczne (rys.6) o długościach od 31,9 do 94,2cM (tab.3). Łącznie w obrębie map sprzężeń znalazły się 764 markery SNP, a łączna długość utworzonej mapy to 480,4cM.



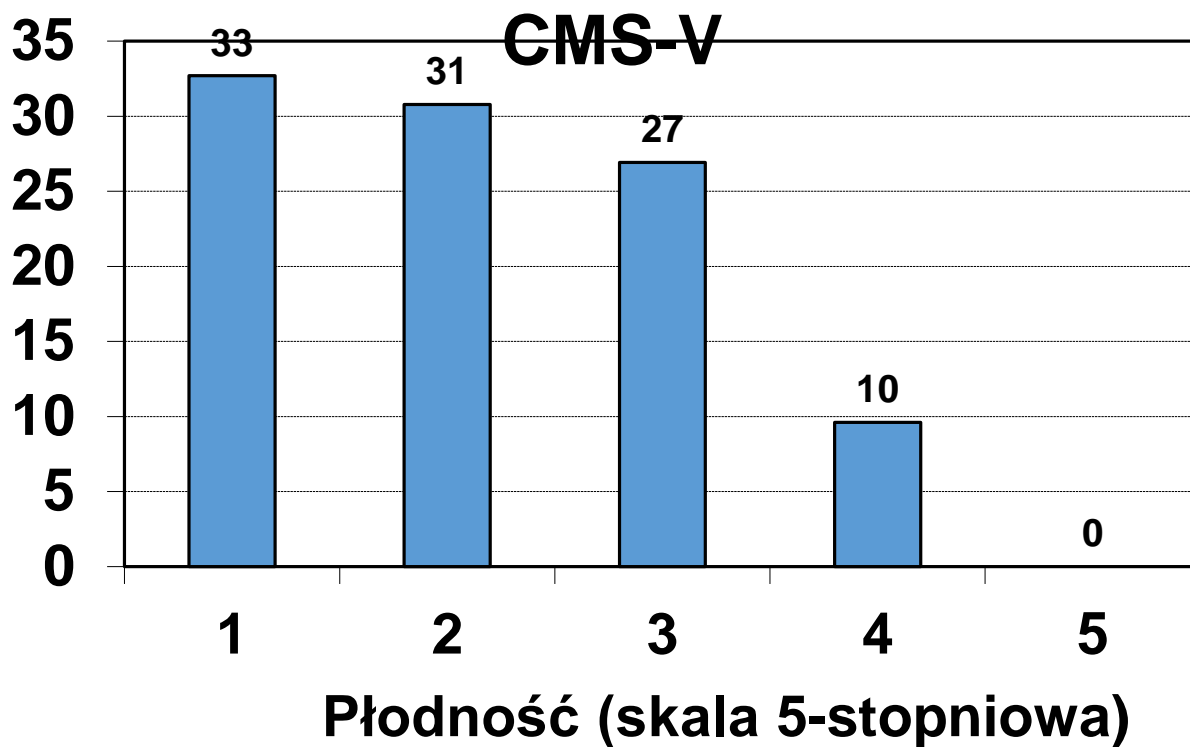
Rys. 6. Mapa genetyczna ośmiu grup sprzężeń markerów SNP-DArTseq w populacji [CMS-19P x Bolero]F2

Tabela 3

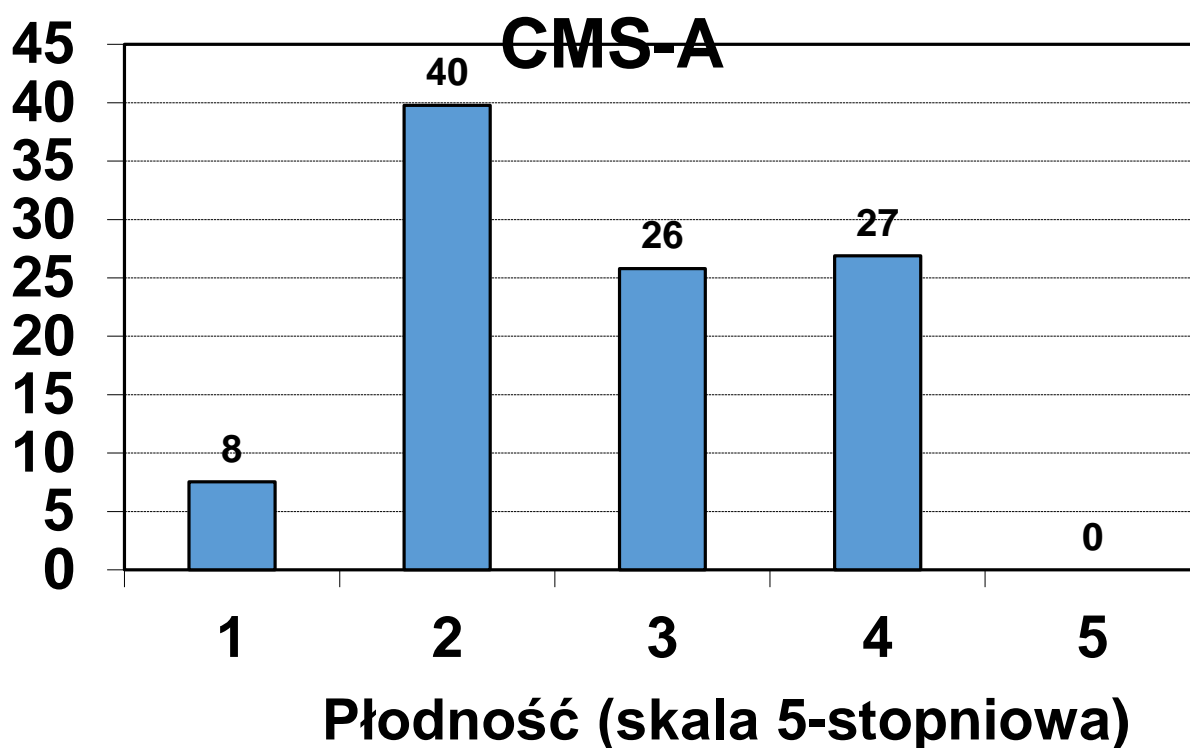
Charakterystyka grup sprzężeń utworzonych w obrębie populacji mapującej [CMS-19P x Bolero]F2

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

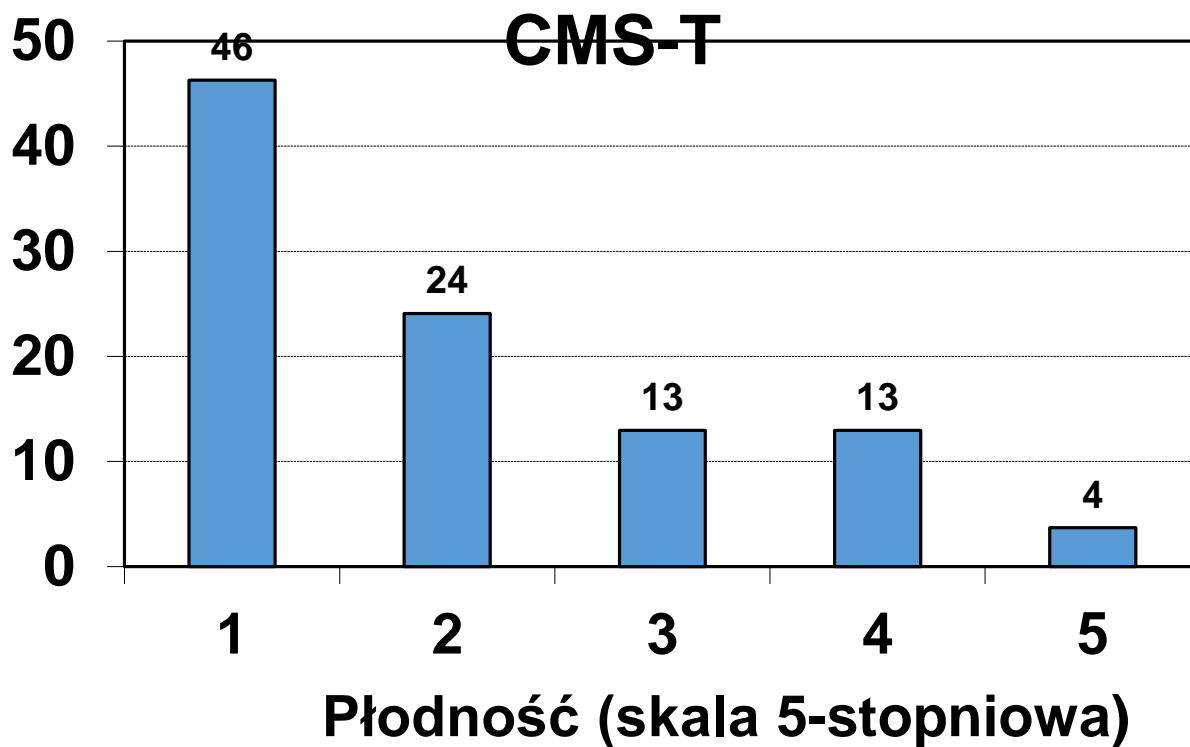
Ocena fenotypowa liczących po około 100 osobników populacji F2 pszenżyta z czterema źródłami CMS (CMS-V, CMS-A, CMS-T i CMS-P), w których uniwersalnym restorerem był ród DAD182/00 ujawniła zróżnicowanie w obrębie każdego z badanych obiektów (rys.6-9). Ogólnie – najmniej liczną kategorią fenotypową były rośliny z przywróconą w pełni płodnością (oceniene na 5 w skali bonitacyjnej wg Góral 2002). W mieszańcach z CMS-V i CMS-A nie było takich roślin w ogóle (rys. 6 i 7), przy obecności cytoplazm CMS-T i CMS-P (rys. 8 i 9) były to pojedyncze osobniki. W cytoplazmach CMS-V i CMS-T najliczniejszymi kategoriami fenotypowymi były formy całkowicie męskosterylne, podczas gdy w pozostałych dwóch cytoplazmach najczęściej pojawiały się osobniki częściowo płodne.



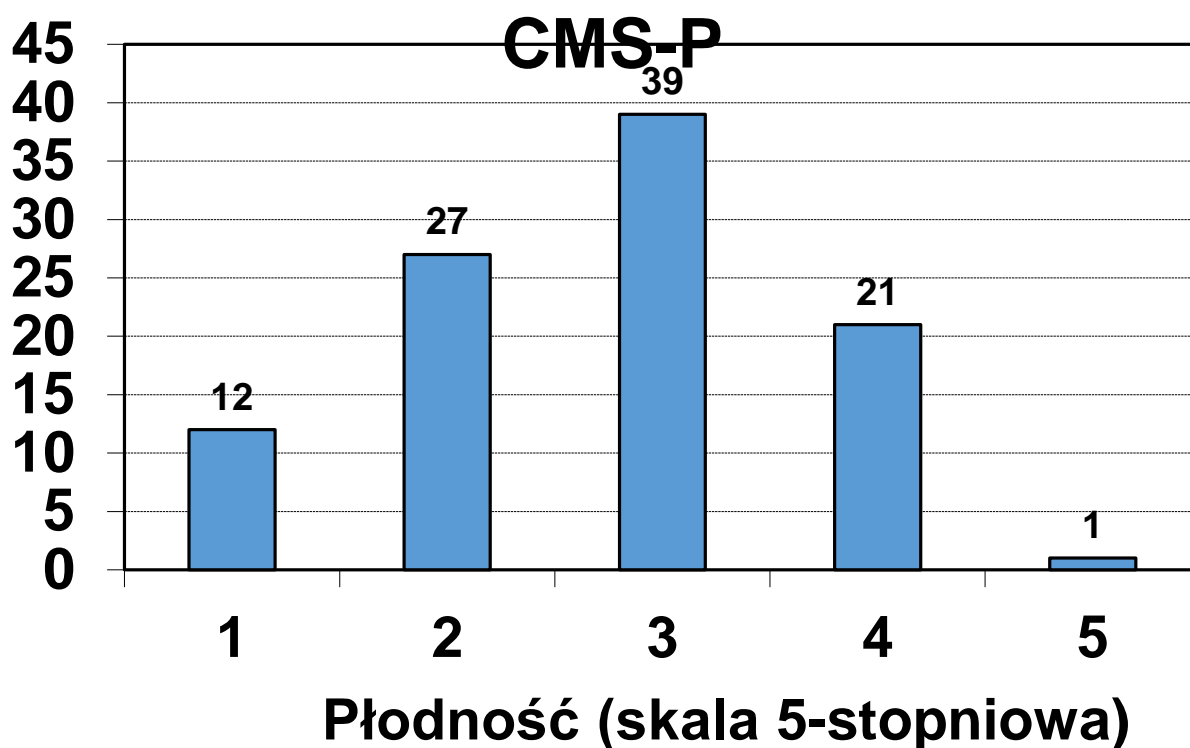
Rys. 6. Wyniki oceny męskiej płodności u mieszańca F2 pszenżyta z cytoplazmą CMS-V



Rys. 7. Wyniki oceny męskiej płodności u mieszańca F2 pszenżyta z cytoplazmą CMS-A



Rys. 8. Wyniki oceny męskiej płodności u mieszańca F2 pszenżyta z cytoplazmą CMS-T



Rys. 9. Wyniki oceny męskiej płodności u mieszańca F2 pszenżyta z cytoplazmą CMS-P

Wyniki tej wstępnej oceny zmienności fenotypowej w obrębie mieszańców z czterema typami cytoplazmy pozwoliły na podjęcie decyzji o założeniu większego doświadczenia polowego w dwóch lokalizacjach (Szczecin i Kraków), gdzie w kolejnym sezonie wegetacyjnym planowane jest zebranie danych fenotypowych niezbędnych do mapowania porównawczego genów restorerowych.

Dyskusja *(opisać jak w publikacji)*

Wyniki oceny męskiej płodności roślin pochodzących z różnych mieszańców pszenżyta wskazują na dość złożony mechanizm dziedziczenia tej cechy. W populacjach F2 pojawiały się rozkłady o różnych kształtach od zbliżonych do normalnego po typowo bimodalne. Złożony charakter dziedziczenia przywracania płodności w systemach CMS pszenżyta był wcześniej opisywany (Góral i in. 2010). Niewiele wiadomo o lokalizacji genów odpowiadających za przywracanie płodności. Analizy cytogenetyczne wskazywały na obecność genów restorerowych na chromosomach 4R i 6R (Curtis i Lukaszewski 1993). Wyniki mapowania wykonanego na jednej populacji mapującej potwierdzały znaczenie chromosomu 6R z jednoczesnym wskazaniem, że na chromosomach 6A i 6b też są zlokalizowane geny przywracające płodność (Stojałowski i in. 2013). Uzyskane wyniki opisane powyżej stanowią kolejne potwierdzenie znaczenia chromosomu 6R, ale sugerują jednocześnie, że jest tu zlokalizowany tylko jeden z co najmniej kilku genów regulujących przywracanie męskiej płodności u pszenżyta.

Dotychczas skonstruowano niewiele pełnych map genetycznych pszenżyta. Pierwsze mapy dla pojedynczych populacji mapujących, które zaczęły się pojawiać na początku obecnej dekady były przeważnie niekompletne (nie obejmowały wszystkich chromosomów w całości (Tyrka i in. 2011; Stojałowski i in. 2013). Jedynie w pracy Alheit i in. (2011) opartej o markery DArT, w której mapa została utworzona w wyniku integracji danych z pięciu populacji mapujących, mapa pszenżyta jest kompletna. Niestety użyte w pracy markery DArT (markery otrzymywane techniką mikromacierzy) nie były analizowane w populacji [CMS-19T x Bolero]F2, gdyż użyto bardziej efektywnej techniki DArTseq (bazującej na nowych metodach sekwencjonowania NGS). Markery tego typu zostały ostatnio użyte do skonstruowania nowej mapy genetycznej pszenżyta (Tyrka i in. 2015), która okazała się bardzo pomocnym narzędziem przy identyfikowaniu lokalizacji chromosomowej utworzonych grup sprzężeń.

Wnioski *(opisać jak w publikacji)*

Przywracanie męskiej płodności u pszenżyta znajduje się pod kontrolą większej liczby genów o stosunkowo słabym działaniu. Tego rodzaju geny są trudne do zlokalizowania na mapach chromosomowych.

Chromosom 6R u pszenżyta zawiera geny restorerowe, ale siła ich działania nie jest wystarczająca do pełnego przywracania męskiej płodności.

Temat badawczy 2

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

Cel: Zaprojektowanie starterów PCR pozwalających na rozpoczęcie poszukiwań przydatnych w hodowli markerów wykazujących sprzężenie z głównymi genami kontrolującymi męską płodność u pszenżyta z cytoplazmami *T. timopheevi* i CMS-Pampa – cel zrealizowany.

Materiały i metody *(opisać jak w publikacji)*

Realizacja zadania jest oparta o dane otrzymane z genotypowania populacji mapującej wykonywanego w zadaniu 1. Na podstawie danych sekwencyjnych uzyskanych z analiz DArTseq (komercyjny wariant metody GBS) wykonanych przez firmę Diversity Arrays Technology Pty. oraz sekwencji dostępnych w bazach danych, które zlokalizowane są w obszarach zainteresowań zaprojektowano w 2016 roku 20 par starterów. Markery otrzymane metodą PCR z użyciem tych starterów oceniono pod kątem wykrywania polimorfizmu DNA pomiędzy formami rodzicielskimi populacji mapujących.

Przed przygotowaniem reakcji PCR, uzyskane izolaty DNA rozcieńczano wodą MilliQ do uzyskania stężenia końcowego 10 ng/μl.

Mieszanina do reakcji PCR zawierała:

- 12,3 μl H₂O
- 2,0 μl 10 x bufor PCR [Fermantas]
- 2,0 μl MgCl₂ (25 mM) [Fermantas]
- 0,5 μl dNTP (10 mM) [Fermantas]
- 0,5 μl starter forward (10 μM) [Proligo]

- 0,5 µl starter reverse (10 µM) [Proligo]
- 0,2 µl polimeraza Taq (5U/µl) [Fermantas]
- 2,0 µl DNA

Amplifikacje prowadzono w termocyklerze firmy Eppendorf, a profil temperaturowy reakcji przedstawiał się następująco:

- | | | |
|----------------------------|------------|-----|
| - początkowa denaturacja | 94°C/30s | |
| - denaturacja | 94°C/30s | |
| - przyłączenie starterów | 40°C/1min | 35x |
| - amplifikacja DNA | 72°C/2min | |
| - końcowa amplifikacja DNA | 72°C/10min | |
| - chłodzenie | 4°C | |

Sprawdzenie wydajności amplifikacji przeprowadzono na 2% żelach agarozowych zawierających bromek etydyny. Właściwą weryfikację długości amplifikowanych fragmentów (wykrywanie niewielkich różnic w wielkości amplikonów) przeprowadzono rozdzielając produkty PCR w 10% żelach polikryloamidowych w buforze 1xTBE przy natężeniu pola 10 V/cm przez 5 h. W celu wizualizacji produktów reakcji wykonano barwienie żelu (30 min) w roztworze bromku etydyny o stężeniu 0,5 µg/1 ml i podświetlanie światłem UV.

Wyniki *(opisać)*

Markery PCR otrzymywane w wyniku amplifikacji z użyciem starterów zaprojektowanych do sekwencji otrzymanych jako wynik analizy techniką DArTseq nie ujawniały polimorfizmu genetycznego w badanym materiale. Z uwagi na fakt, że fragmenty amplifikowanego DNA były bardzo krótkie nie było możliwości zaprojektowania innych wersji starterów lub wykorzystania enzymów restrykcyjnych, które mogłyby pomóc w uzyskaniu polimorficznych markerów. Wśród badanych markerów część została zaprojektowana w oparciu o znaną lokalizację genu restorerowego na chromosomie 6R. Sekwencje DNA żyta zdeponowane w bazach danych NCBI oraz GABI wybrano na podstawie ich lokalizacji i zaprojektowano dodatkową serię starterów. Niestety markery te również okazały się w większości monomorficzne lub startery nie inicjowały amplifikacji, albo też generowały produkty mało specyficzne. Dokładna analiza porównawcza wielkości amplikonów u form rodzicielskich CMS-19T, CMS-19P oraz Bolero (populacje użyte do konstruowania map sprzężeń w temacie badawczym 1) wykazała polimorfizm w przypadku 6 markerów: SWES 131, SWES, 135, SWES 188, SWES 204, SWES 209 i SWES 217 (tab.4). Spośród nich tylko dwa ostatnie ujawniały różnice pozwalające na zastosowanie ich do mapowania porównawczego dla obu badanych populacji mapujących (wykryte różnice dotyczyły linii ojcowskiej oraz obu wariantów linii matecznej). Niestety wykryte różnice w wielkości produktów są niewielkie (poniżej 10 nukleotydów), w związku z czym wymagają wykonywania analiz w żelach poliaryloamidowych.

Tabela 4.

Wyniki analiz PCR dla 20 markerów

Startery	Oczekiwany produkt [pz]	Obserwowany produkt [pz]		
		CMS-19T	Bolero	CMS-19P
SWES 1 (f/r)	300	300	300	300
SWES 3 (f/r)	170	170	170	170
SWES 12 (f/r)	280	-	-	-
SWES 19 (f/r)	215	189	189	189
SWES 48 (f/r)	300	295	295	295
SWES 71 (f/r)	178	178	178	178
SWES 131 (f/r)	290/285	282, 239	239	282, 249, 239
SWES 135 (f/r)	404	404	413	413
SWES 149 (f/r)	275	250	250	250
SWES 166 (f/r)	100	100	100	100
SWES 180 (f/r)	242	248	248	248
SWES 184 (f/r)	242	270	270	270
SWES 188 (f/r)	309	274	-	270
SWES 195 (f/r)	238	-	-	-
SWES 204 (f/r)	260	269, 239, 234	269, 231	234
SWES 207 (f/r)	265	249, 239	249, 239	249, 239
SWES 209 (f/r)	300	306	315	306
SWES 217 (f/r)	145	182	188	182
SWES 250 (f/r)	275	-	-	-
SWES 251 (f/r)	640	-	-	-

Dyskusja *(opisać jak w publikacji)*

Pszenżyto należy do gatunków uprawnych, które mają zauważalne znaczenie w skali globalnej, a w gospodarce rolnej krajów Europy Środkowej należą do najważniejszych zbóż. Pomimo tego, wiedza na temat genetyki pszenżyta jest wciąż bardzo ograniczona. Pierwsze mapy genetyczne pszenżyta zaczęły powstawać dopiero w ostatnich latach (Tyrka i in. 2011; 2015; Alheit i in. 2011; Stojałowski i in. 2013) i w wielu przypadkach nie obejmowały całego genomu. Jest to o tyle zaskakujące, że mapy genetyczne gatunków rodzicielskich pszenżyta: pszenicy i żyta znane są już od ponad 20 lat. Można przypuszczać, że problem z analizami pszenżyta wynika z jednej strony z jego mniejszej stabilności cytogenetycznej, a z drugiej strony z ograniczonej zmienności genetycznej – pszenżyto jest gatunkiem nowym i nie było dość czasu, aby naturalna zmienność wynikająca ze spontanicznych mutacji mogła się znacząco rozwinąć. Stąd też trzeba się liczyć z ograniczoną efektywnością prac badawczych zmierzających do otrzymania przydatnych w hodowli pszenżyta markerów DNA. W czasie przeprowadzonych badań uzyskano tylko dwa markery przydatne do mapowania porównawczego genów restorerowych. Oba markery wymagają wykonywania analiz w żelach poliarylamidowych, co ze względu na pracochłonność ogranicza ich przydatność dla komercyjnej hodowli.

Wnioski *(opisać jak w publikacji)*

Bezpośrednie wykorzystanie sekwencji markerów DArTseq do projektowania markerów PCR nie przyniosło pozytywnych rezultatów – nie uzyskano markerów polimorficznych.

Wykorzystanie dostępnych baz danych o sekwencjach DNA roślin zbożowych pozwala na uzyskanie polimorficznych markerów PCR o potencjalnej przydatności w pracach hodowlanych, ale efektywność tego rodzaju działań nie jest wysoka.

Temat badawczy 3

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

Cel: przygotowanie materiału biologicznego do oceny różnic pomiędzy genomami mitochondrialnymi pszenżyta z cytoplazmami *T. timopheevi* i CMS-Pampa – cel zrealizowany.

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

Badania w 2016 roku polegały na namnożeniu nasion męskosterylnych wersji linii CMS-Salvo 15/1 z cytoplazmą *T. timopheevi* oraz linii 19 z cytoplazmami *T. timopheevi* oraz CMS-Pampa, jak również ich męskopłodnych analogów. Z uzyskanych nasion wytworzono etiolowane kielki zawierające różne cytoplazmy: normalną (partie kielków oznaczone N13 i N15), CMS-*Timopheevi* (T13 i T15) oraz Pampa (P13 i P15).

Izolacja mitochondriów

1. Około 20 g etiolowanych 1-tygodniowych kielków homogenizowano blenderem kuchennym w 180 ml buforu homogenizacyjnego.
2. Homogenat przefiltrowywano przez pojedynczą warstwę tkaniny do kolby. Uzyskany filtrat przelewano do butelki wirowniczej o poj. 250 ml. Wypełnione butelki równoważono, a następnie wirowano przez 10 minut przy 2 300 rcf (rotor Sorvall F16-250).
3. Nadsącz przelewano do nowych butelek wirowniczych o poj. 250 ml, które równoważono i wirowano przez 20 minut przy 20 600 rcf (rotor Sorvall F16-250).
4. Uzyskany osad zawieszano w 10 ml buforu do DNazy. Do zawiesiny dodawano 100 µl 1 M MgCl₂ oraz 94 µl r-ru DNazy [5 mg DNazy I (Sigma DN25) + 500 µl buforu do DNazy]. Całość inkubowano w 4°C przez 45 minut mieszając zawartość butelki co 15 minut.
5. Po inkubacji do mieszaniny dodawano 45 ml buforu stopującego i wirowano przez 20 minut przy 20 600 rcf (rotor Sorvall F16-250).
6. Nadsącz usuwano, natomiast osad zawieszano w 1 ml medium Y. Uzyskaną zawiesinę nakładano na skokowy gradient Percollu:
7. Gradienty wirowano przez 20 minut przy 18 000 rcf (rotor Sigma 12148-H).
8. Po wirowaniu pipetą usuwano górne frakcje gradientu zanieczyszczone plastydami, a następnie pipetą ustawioną na 200 µl odbierano około 600 µl frakcji mitochondriów do próbówki o poj. 1,5 ml. Do odebranej zawiesiny mitochondriów dodawano 1 ml medium Y, całość mieszano przez kilkukrotne odwrócenie próbówki i wirowano przez 20 minut przy 18 000 rcf (rotor Sigma 12148-H).
9. Po usunięciu nadsączu osad mitochondriów zamrażano w ciekłym azocie, a następnie umieszczano w zamrażarce w -80°C.

Wszystkie wirowania wykonywano w temp. 4°C. Poza wirowaniami i inkubacją z DNazą próby były przetrzymywane w lodzie.

Posłużyła ona do wyizolowania i oczyszczenia DNA mitochondrialnego wg następującej metodyki:

Izolacja mitochondrialnego DNA (mtDNA)

Izolację mtDNA wykonano przy użyciu zestawu Qiagen Plant Mini Kit, w którym oryginalne kolumny adsorpcyjne zastąpiono kolumnami typu III firmy Dongsheng Biotech.

1. Zamrożone osady mitochondriów rozpuszczano w 400 µl buforu AP1, a następnie próby inkubowano w 65°C przez 10 minut. Nie dodawano RNazy.
2. Do preparatów dodawano 130 µl buforu AP2, zawartość probówek mieszano na wortexie, a następnie próby inkubowano w lodzie przez 5 minut.
3. Próby wirowano przez 5 minut przy 18 000 rcf.
4. Nadsącz odbierano do nowych probówek o poj. 1,5 ml i ponownie wirowano przy takich samych parametrach (w odebranym nadsączu były widoczne zanieczyszczenia).

5. Nadsącz odbierano do nowych probówek o poj. 1,5 ml i dodawano 1,5 objętości buforu AP3. Zawartość probówek mieszano przez pipetowanie, a następnie nakładano na kolumnę adsorpcyjną i wirowano przez 1 minutę przy 8 000 rcf.
6. Kolumny przepłukiwano dwukrotnie 500 µl buforu AW, po każdym płukaniu wirując je przez 1 minutę przy 8 000 rcf, po czym kolumny suszono wirując je dodatkowo przy 18 000 rcf przez 5 minut.
7. Elucję wykonywano dwukrotnie 40 µl buforu TE. Po nałożeniu buforu kolumny inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 1 minutę przy 8 000 rcf.
8. Probówki z roztworem mtDNA umieszczano w zamrażarce w -20°C.

Oczyszczanie mitochondrialnego DNA

Oczyszczanie mtDNA wykonywano przy wykorzystaniu roztworów sporządzonych we własnym zakresie na podstawie składu odpowiednich roztworów z zestawu Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System firmy Promega. Do oczyszczania wykorzystywano kolumny adsorpcyjne typu III firmy Dongsheng Biotech. Przed oczyszczaniem pulowano próby z I i II elucji danego preparatu DNA.

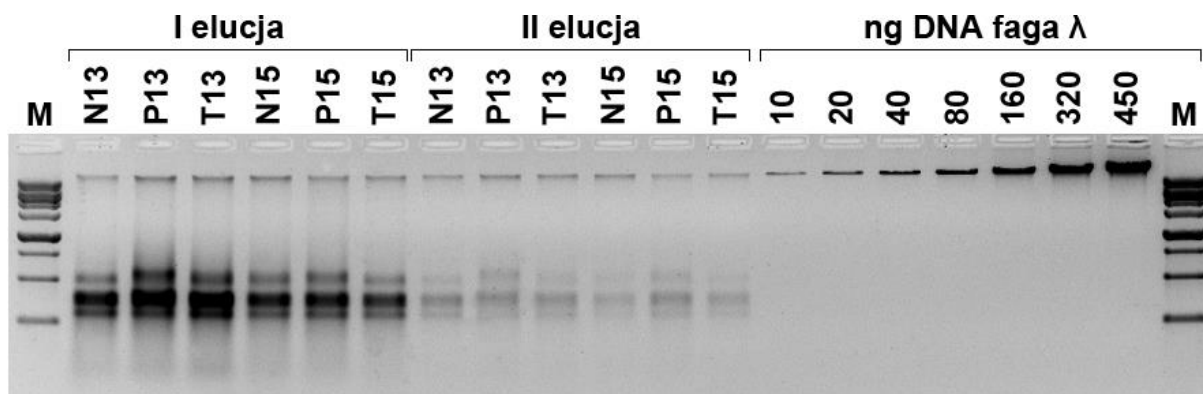
1. Do 70 µl spulowanych prób mtDNA dodawano 7 µl RNazy A (10 µg/ml, Sigma R4875). Próby inkubowano przez 1 godzinę w 37°C.
2. Do preparatów dodawano Membrane Binding Solution (w stosunku 1 : 1 v/v) i całość dokładnie mieszano przez pipetowanie. Otrzymaną mieszaninę nakładano na złożę krzemionkowe kolumn i kolumny inkubowano przez 1 minutę w temp. pokojowej.
3. Kolumny wirowano przez 1 minutę przy 16 000 rcf.
4. Kolumny przenoszono do nowych probówek zbiorczych. Dodawano 500 µl Membrane Wash Solution i wirowano przez 1 minutę przy 16 000 rcf.
5. Kolumny przenoszono do nowych probówek zbiorczych. Dodawano 500 µl Membrane Wash Solution i wirowano przez 5 minut przy 16 000 rcf.
6. Kolumny przenoszono do nowych probówek zbiorczych. Wieczka kolumn otwierano i wirowano dodatkowo przez 1 minutę przy 16 000 rcf.
7. Kolumny przenoszono do nowych probówek o poj. 1,5 ml. Dodawano 40 µl 10 mM Tris pH 8,0; inkubowano przez 1 minutę w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 1 minutę przy 16 000 rcf (I elucja).
8. Kolumny przenoszono do nowych probówek o poj. 1,5 ml. Dodawano 30 µl 10 mM Tris pH 8,0; inkubowano przez 1 minutę w temperaturze pokojowej, a następnie wirowano przez 1 minutę przy 16 000 rcf (II elucja).
9. Otrzymane preparaty mtDNA umieszczano w zamrażarce w -20°C.

Jakość wyizolowanych preparatów mtDNA oceniano na podstawie ich rozdziału elektroforetycznego w 1% żelu agarozowym z dodatkiem bromku etydyny o stężeniu 1,33 µg/ml. Rozdział prowadzono w buforze TBE przy natężeniu pola 4 V/cm przez 1,5 godziny. Na żel nakładano 3 µl preparatu mtDNA z dodatkiem 2 µl buforu obciążającego (6x Loading Dye, Fermentas) oraz 7 µl wody. Równoległe z preparatami mtDNA na żel nakładano 5 µl wzorca wielkości fragmentów DNA (1 kb ladder, Dongsheng Biotech) oraz zróżnicowane ilości DNA faga λ.

Wyniki (opisać)

Do izolacji mitochondrialnego DNA (mtDNA) pszenżyta wykorzystano sześć partii kielków: N13, P13, T13, N15, P15 oraz T15.

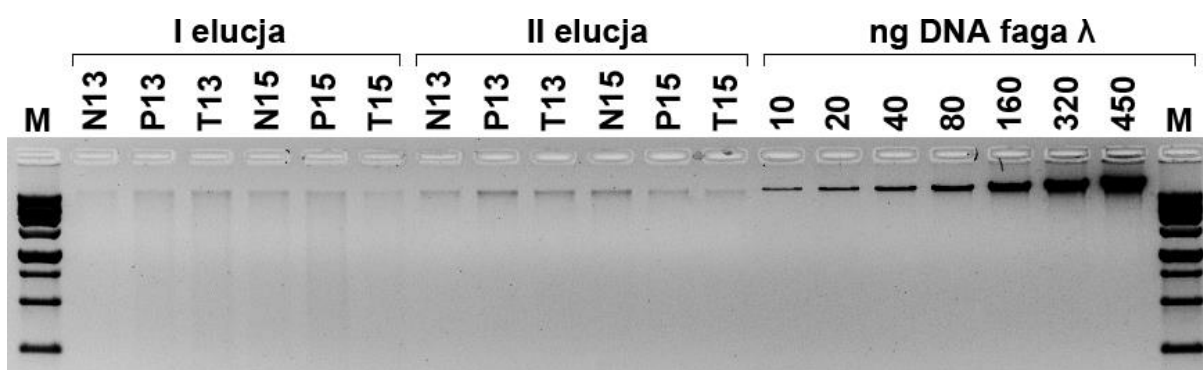
W rezultacie przeprowadzonej izolacji mitochondriów oraz mitochondrialnego DNA uzyskano próby o stężeniach DNA rzędu kilku ng/µl (rys. 11).



Rys. 11. Obraz elektroforetyczny uzyskanych preparatów mtDNA pszenżyta. Równolegle rozdzielano wzorzec wielkości fragmentów DNA (M) oraz zróżnicowane ilości (10 – 450 ng) DNA faga λ (Thermo Scientific SD0011).

W próbach tych odnotowano także obecność znacznych ilości rybosomalnego RNA. Z tego względu próby mtDNA poddano obtrawianiu RNazą A i dodatkowej rundzie oczyszczania na kolumnach adsorpcyjnych. Inspekcja oczyszczonych prób mtDNA (rys. 12) wykazała brak zanieczyszczeń rybosomalnym RNA. Efektem ubocznym wykonanego doczyszczania było jednak obniżenie ilości DNA w próbach – w większości z nich jest ono mniejsze niż 1 ng/ μ l. Szczególnie niskie wartości koncentracji odnotowano dla próby N13 z I elucji (rys.12).

Pozostałe pięć izolowanych obiektów też charakteryzowało się niskim stężeniem, ale uznano, że spełniają one kryteria niezbędne do wykorzystania ich do dalszych badań na poziomie sekwencyjnym.



Rys. 12. Obraz elektroforetyczny oczyszczonych (obtrawianie RNazą A i II runda oczyszczania na kolumnach adsorpcyjnych) preparatów mtDNA pszenżyta. Równolegle rozdzielano wzorzec wielkości fragmentów DNA (M) oraz zróżnicowane ilości (10 – 450 ng) DNA faga λ .

Dyskusja *(opisać jak w publikacji)*

Izolacja DNA mitochondrialnego zbóż jest najefektywniejsza, gdy materiał biologiczny stanowią etiolowane 10-14 dniowe kielki (Tudzynski i in. 1986). Zastosowana w aktualnym projekcie metoda izolacji dała bardzo dobre wyniki przy analizach cytoplazm żytnich i zaowocowała opracowaniem pierwszych markerów diagnostycznych dla rodzaju cytoplazmy hodowlanej u żyta (Stojałowski i in. 2006). Pewnym zaskoczeniem były problemy z uzyskaniem preparatów mtDNA pszenżyta o zadowalającej czystości. Dodatkowa runda oczyszczania spowodowała, że koncentracja DNA została znacząco obniżona w finalnych preparatach, ale dla 5 obiektów pozostaje wciąż w granicach, które pozwalają na użycie otrzymanych ekstraktów do sekwencjonowań wysokoprzepustowych nowej generacji (NGS). Obecnie do uzyskania biblioteki DNA w systemie firmy Illumina (jeden z wariantów NGS) wystarcza nawet 1 ng DNA (informacja od Emily Kumimoto z Genome Center, University of California-Davis). Biorąc pod uwagę możliwość łączenia prób reprezentujących tą samą cytoplazmę, ilości mtDNA jakie zostały zabezpieczone są rzędu kilkudziesięciu nanogramów.

Wnioski *(opisać jak w publikacji)*

Uzyskano i zabezpieczono 5 prób mtDNA reprezentujących trzy cytoplazmy pszenżyta (normalna, CMS-T i CMS-P) w celu wykonania analiz sekwencjonowania metodami nowej generacji (NGS)

Temat badawczy 4

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

Cel: próba wytworzenia nowych linii alloplazmatycznych pszenżyta. Scharakteryzowanie nowych genotypów pod kątem zdolności do utrzymywania męskiej sterylności i przywracania płodności w cytoplazmie *T. timopheevi* – cel zrealizowany.

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

Genotypami, które wykorzystano w 2016 roku do tworzenia linii alloplazmatycznych (linii różniących się cytoplazmami) były cztery linie wsobne pszenżyta: DAD1, Baltiko 1, Zorro 1 i Salvo 15. Wykonano krzyżowania wsteczne w celu wprowadzenia wymienionych genotypów do czterech cytoplazm sterylizujących: *T. timopheevi*, Pampa, *Ae. sharonensis* i *Ae. ventricosa*. Krzyżowania wykonywano ręcznie w warunkach polowych przy jednoczesnej ocenie męskiej płodności roślin matecznych.

Ponadto w celu oceny męskiej płodności w obrębie 20 mieszańców F1 pszenżyta z różnymi cytoplazmami sterylizującymi oraz 5 mieszańców pszenicy z cytoplazmą sterylizującą *T. timopheevi*, wykonano rozmnożenia linii męskosterylnych niezbędnych do prowadzenia dalszych badań oraz krzyżowania nowych odmian lub rodów pszenżyta i pszenicy ze źródłami męskiej sterylności.

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

Przy ocenie płodności stosowano skalę bonitacyjną 5-stopniową zaproponowaną przez Góral (2002) oraz określano zawiązywanie ziaren pod izolatorami przyjmując następujące kryteria:

- Brak ziarna w wyniku samozapylenia (0 ziaren na kłos) rośliny świadczy o męskiej sterylności,
- Pełne uziarnienie (powyżej 30 ziaren na kłos) świadczy o męskiej płodności.
- Rośliny zawiązujące od 1 do 29 ziaren na kłos kwalifikowano jako pośrednie.

Stosując tę umowną skalę obliczono indeks restoracji według wzoru: $N + 0,5 P$, gdzie N - % roślin męskopłodnych, P - % roślin pośrednich.

Wyniki (opisać)

Tegoroczna kontrola męskiej płodności linii pszenżyta potwierdziła interakcję genotypu linii z cytoplazmą w ekspresji męskiej płodności/sterylności. Linia DAD 1 była męskopłodna w każdej z cytoplazm, linia Salvo 15 – męskosterylna, a linie Baltiko 1 i Zorro1 męskosterylne, pośrednie lub męskopłodne w zależności od rodzaju cytoplazmy (tab.5).

Linia pszenicy Grana z cytoplazmą *T. timopheevi* była męskosterylna. Również pełną sterylność odnotowano u pięciu mieszańców między pszenicą Grana z cytoplazmą *T. timopheevi*, a pięcioma rodami pszenicy (tab.6).

Zróznicowany poziom pylenia zaobserwowano u dwudziestu badanych mieszańców F1 pszenżyta (tab.7). Większość badanych rodów ojcowskich przywracała męską płodność we wszystkich czterech badanych cytoplazmach sterylizujących, ale nie była to restoracja pełna. Ród DL 1146/10 w cytoplazmach P (Pampa) i A (*Ae. sharonensis*) dawał mieszańce F1 całkowicie sterylne.

Tabela 5

Indeks restoracji (%) 4 linii pszenżyta w różnych cytoplazmach

Linia ojcowska	Cytoplazma			
	<i>T. timopheevi</i>	<i>Pampa</i>	<i>Ae. sharonensis</i>	<i>Ae. ventricosa</i>
DAD 1	85,0 (BC ₈)	100,0 (BC ₇)	100,0 (BC ₇)	91,1 (BC ₃)
Salvo 15	0,0 (BC ₈)	0,0 (BC ₇)	0,0 (BC ₄)	0,0 (BC ₈)
Baltiko 1	83,0 (BC ₅)	0,0 (BC ₇)	100,0 (BC ₄)	78,0 (BC ₃)
Zorro 1	92,0 (BC ₄)	0,1 (BC ₄)	0,0 (BC ₇)	55,0 (BC ₃)

Tabela 6

Indeks restoracji męskiej płodności u 5 mieszańców odmiany Grana z cytoplazmą *T. timopheevi* zapylonych przez 5 rodów ojcowskich

Ród ojcowski	Indeks restoracji (%)
DL 325/11	0,0
DL 423/11	0,0
DL 237/12	0,0
DL 312/12	0,0
DL 375/12	0,0

Tabela 7

Płodność 20 mieszańców F1 pszenżyta (5 linii ojcowskich w 4 cytoplazmach*)

Ród ojcowski	Cytoplazma			
	<i>T. timopheevi</i>	<i>Pampa</i>	<i>Ae. sharonensis</i>	<i>Ae. ventricosa</i>
Indeks restoracji (%)				
DL 593/07	88,9	58,3	50,0	50,0
DL 643/09	45,0	100	20,0	50,0
DL 1146/10	50,0	0,0	0,0	55,0
DL 402/11	50,0	68,8	55,6	55,0
DL 1261/12	59,0	100	11,1	50,0

*cms Salvo 15, cms Baltiko 1, cms Zorro 1 i cms Salvo 15 odpowiednio w cytoplazmach: (T) *T. timopheevi*, (P) *Pampa*, (A) *Ae. sharonensis*, (V) *Ae. ventricosa*

Przygotowano (przycięcie plewek i ości) i zaizolowano po 10 kłosów na roślinach męskosterylnych linii: cms Salvo 15, cms Baltiko 1, cms Zorro 1 i cms Salvo 15 odpowiednio w cytoplazmach: *T. timopheevi* (CMS-T), *Pampa* (CMS-P), *Ae. sharonensis* (CMS-A), *Ae. ventricosa* (CMS-V) do zapylenia 12 rodami pszenżyta ozimego oraz po 10 kłosów linii cms Grana pszenicy z cytoplazmą *T. timopheevi* do zapylenia 5 rodami pszenicy. W czasie kwitnienia wykonano dwukrotne ręczne zapylenia pod izolatorem (48 kombinacji pszenżyta i 5 kombinacji pszenicy). Uzyskano zróżnicowaną liczbę ziaren mieszańców F1 (tab. 8, 9).

Tabela 8.

Liczba ziaren F₁ otrzymanych w wyniku ręcznych krzyżowań męskosterylnych linii pszenżyta w różnych cytoplazmach z rodami, 2016

Forma ojcowska	Linia mateczna (cytoplazma)			
	cms Salvo (CMS-T)	cms Baltiko (CMS-P)	cms Zorro (CMS-A)	cms Salvo (CMS-V)
Subito	120	114	219	70
DL 593	119	89	124	118
DL 122	70	92	218	110
DL 643	209	122	218	95
DL 386	189	240	224	74
DL 1113	133	131	180	72
DL 1146	95	214	95	160
DL 402	86	183	248	97
DL 525	111	119	189	81
DL 1153	65	218	126	65
DL 1261	187	170	195	88
DL 1410	198	203	223	70

Tabela 9.

Liczba ziaren F₁ otrzymanych w wyniku ręcznych krzyżowań męskosterylnej linii pszenicy z rodami, 2016

Forma ojcowska	Linia mateczna (cytoplazma)
	cms Grana (CMS-T)
DL 325	150
DL 423	135
DL 237	125
DL 312	138
DL 375	143

Dyskusja (opisać jak w publikacji)

Szereg obcych gatunkowo cytoplazm może wywoływać męską sterylność u pszenżyta (Cauderon i in. 1985; Nalepa 1990; Łapiński 2005; Góral 2013). Wśród nich przede wszystkim cytoplazmy *T. timopheevi* (CMS-T) i *Ae. sharonensis* (CMS-A) były wymieniane przez Nalepę (1990) jako najbardziej perspektywiczne w hodowli odmian mieszańcowych. Wprowadzenie do pszenżyta cytoplazmy Pampa (Łapiński 2005) poszerzyło grupę potencjalnie użytecznych źródeł CMS, która została ostatnio (Góral 2013) uzupełniona przez cytoplazmę *Ae. Ventricosa* (CMS-V). Uzyskane wyniki potwierdzają skuteczność wymienionych cytoplazm w utrzymywaniu męskiej sterylności u roślin pszenżyta. Cytoplazma *T. timopheevi* jest też stabilnym źródłem CMS w hodowli pszenicy.

Wnioski (opisać jak w publikacji)

Cytoplazmy sterylizujące CMS-T, CMS-P, CMS-A i CMS-V mogą być wykorzystane do tworzenia stabilnych fenotypowo linii męskosterylnych pszenżyta

Cytoplazma CMS-T (*T. timopheevi*) skutecznie utrzymuje męską sterylność roślin pszenicy

Opublikowane streszczenia:

Sobczyk M., Góralska M., Orłowska M., Góral H., Warzecha T., Simlat M., Stojalowski S. 2016.

Męska płodność mieszańców F2 pszenżyta z cytoplazmami sterylizującymi *T. timopheevi* i CMS-Pampa. „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: 66.

Sobczyk M., Góralska M., Orłowska M., Góral H., Warzecha T., Simlat M., Stojalowski S. 2016. The use of GBS method for mapping the male RF genes in triticales with sterility-inducing cytoplasm of *T. timopheevi*. 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: 129