

pieczętka

SPRAWOZDANIE O STANIE REALIZACJI ZADANIA
z wykonania badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej
w 2013 roku

1. Nr decyzji MRiRW: **HOR hn 801-12/13 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 2013**
 - 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.

Zadanie w 2013 roku realizowano poprzez wzrokowe obserwacje pylenia roślin otrzymanych z krzyżowań pomiędzy męskosterylnymi roślinami z cytoplazmą C i cytoplazmą P, a badanymi egzotycznymi populacjami żyta ozimego. Źródło męskiej sterility stanowiły dwie wersje cytoplazmatyczne linii 541. Obie wersje są po minimum 16 krzyżowaniach wstecznych wypierających, więc można je traktować jako linie izogeniczne. W realizowanych doświadczeniach formy ojcowskie stanowiło osiem populacji otrzymanych z Uniwersytetu w Hohenheim, o których wiadomo, że są źródłem efektywnych restorerów dla cytoplazmy Pampa (Geiger i Miedaner 1996). Wśród badanych populacji trzy to populacje południowoamerykańskie (San Jose, Pico Massaux, Trenelense), a pozostałych pięć pochodzi z terenu Iranu (Altevogt 14159, Altevogt 14160, Altevogt 14161, IRAN I, IRAN IX). Ocena płodności wykonywana była wzrokowo, przy zastosowaniu skali Geigera i Morgensterna (1975). Ponadto, w celach porównawczych, analizami objęto trzy polskie populacje żyta, które użyto do zapylenia męskosterylnych źródeł (mieszance proste) cytoplazmy Pampa i CMS-C.

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

Analizy mitochondrialnych czynników warunkujących męską sterylność wykonywano w oparciu o metodę PCR z zastosowaniem starterów komplementarnych do konserwatywnych sekwencji genów mitochondrialnych. Poszukiwano różnic między genomami mitochondrialnymi cytoplazmy normalnej i CMS-Pampa na poziomie sekwencji DNA oraz poprzez analizę ekspresji np. na poziomie transkryptów przy zastosowaniu metod RT-PCR oraz Real-Time PCR. Materiał badawczy stanowiła linia 541 z cytoplazmą Pampa i jej analog z cytoplazmą normalną.

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 6-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.

W ramach prób określenia lokalizacji na chromosomie 4RL głównych genów restorerowych w systemach CMS-P i CMS-C wykonano oceny płodności mieszańców wstecznych z udziałem dwóch wersji cytoplazmatycznych linii matecznej 541 (z cytoplazmą Pampa i CMS-C). Rośliny oceniono wzrokowo w warunkach polowych przy zastosowaniu skali bonitacyjnej Geigera i Morgensterna (1975).

Mieszańce wsteczne, u których stwierdzono przywrócenie płodności (przy obecności cytoplazmy Pampa i CMS-C) zostały poddane analizom molekularnym przy użyciu markerów DArTseq (nowy wariant markerów generowanych przez Diversity Array Technology wykorzystujący do genotypowania sekwenatory nowej generacji). Jako genotyp porównawczy wykorzystano linię 541 (uniwersalny dopełniacz dla obu badanych systemów CMS).

Przeprowadzono też analizy z wykorzystaniem metody PCR do pozyskiwania markerów COS (Conserved Ortholog Set markers) opracowanych w ostatnim okresie w niemieckim instytucie Julius Kuhn Institut, oddział Gross-Luesewitz (Hackauf i in. 2012). Analizy wykonano w obrębie populacji mapującej [S305PxGonello 249-1]F2. Uzyskane dane posłużyły do rozwinięcia konstruowanej przez ostatnie dwa lata mapy długiego ramienia chromosomu 4RL.

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 wybranych markerów SCAR i COS z chromosomu 4RL przeprowadzono na zbiorze około 40 linii wsobnych wytworzonych w ramach programów hodowli mieszańców żyta opartych o system CMS-Pampa oraz około 70 linii z programu hodowli mieszańców z cytoplazmą CMS-C. 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 allela.

- 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 2013 oceniono ponad trzy tysiące trzysta pojedynków - nie mniej niż po 100 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 pylące oraz 3 – rośliny męskosterylne, ale o niezbyt silnych objawach męskiej sterility (tab.1). Rośliny wykazujące objawy bardzo głębokiej sterility (1 w skali Gegeera i Morgensterna) prawie nie pojawiały się, gdy obecna była cytoplazma C (zaledwie 7 zidentyfikowanych przypadków). Przy obecności cytoplazmy Pampa liczebność tego rodzaju form była wyraźnie większa (74 rośliny). 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.

Relacje między źródłami CMS stają się lepiej widoczne po połączeniu dziewięciu klas bonitacyjnych w kategorie fenotypowe (rośliny męskosterylne, częściowo płodne i męskopłodne) oraz przekalkulowaniu liczebności roślin w tych kategoriach na ich procentową frekwencję (tab.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. Altevogt 14159, Altevogt 14160, Altevogt 14161, IRAN I i IRAN IX) charakteryzują się względnie podobnym odsetkiem form męskosterylnych i męskopłodnych niezależnie od typu cytoplazmy sterylizującej. Odsetek roślin z przywróconą płodnością przeważnie przekracza 50% u wszystkich pięciu badanych populacji irańskich (tab.2).

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	7	32	14	4	6	6	19	89	178
	C	0	3	37	15	7	3	6	10	62	143
Altevoigt14160	P	2	12	27	6	4	3	2	17	90	163
	C	0	9	34	11	5	4	4	14	41	122
Altevoigt14161	P	5	10	45	7	2	5	6	15	70	165
	C	0	3	36	10	6	5	5	19	95	179
IRAN I	P	1	2	36	4	1	1	11	19	67	142
	C	3	3	36	8	3	6	2	14	69	144
IRAN IX	P	2	11	43	5	1	3	3	8	74	150
	C	0	2	45	12	6	4	2	14	47	132
Pico Massaux	P	1	19	98	22	4	2	4	11	6	167
	C	1	3	34	8	4	3	10	27	88	178
San Jose	P	11	15	88	10	3	8	5	11	6	157
	C	1	9	38	12	6	4	5	22	76	173
Trenelense	P	3	1	35	5	3	4	8	11	33	103
	C	0	3	18	5	3	6	2	18	80	135
Szk.46	P	13	16	73	14	10	4	4	9	7	150
	C	2	4	24	11	1	2	0	8	126	178
Szk.81	P	20	18	80	18	5	7	5	8	3	164
	C	0	1	18	8	3	3	1	3	100	137
Szk.85	P	15	13	82	11	5	2	0	2	0	130
	C	0	1	16	3	1	0	2	12	89	124
Ogółem		81	165	975	219	87	85	93	291	1318	3314
	w tym z CMS-P	74	124	639	116	42	45	54	130	445	1669
	w tym z CMS-C	7	41	336	103	45	40	39	161	873	1645

Populacje południowoamerykańskie i polskie znacznie lepiej przywracały płodność w mieszańcach z cytoplazmą C w porównaniu do cytoplazmy Pampa. Przeważnie odsetek roślin z przywróconą w pełni płodnością stanowił około 75%, gdy obecna była cytoplazma C, a nie przekraczał 15% w cytoplazmie Pampa. Jedynie pochodzące z Ameryki Południowej Trenelense przywracało płodność u żyta z CMS-P wyraźnie lepiej (około 50% roślin męskopłodnych), ale wciąż nie tak skutecznie jak w cytoplazmie C (tab.2). Zdolność do dopełniania męskiej sterylności u trzech badanych populacji południowoamerykańskich była nieznacznie wyższa (15-27%) od tego co się obserwuje w odmianach polskich (13-17%).

Ogółem ponad połowa badanych roślin z cytoplazmą Pampa była męskosterylna, podczas gdy analogiczne formy z cytoplazmą C stanowiły nie więcej niż 25% (tab.2).

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	22,47	13,48	64,04
	CMS-C	27,97	17,48	54,55
Altevogt 14160	CMS-P	25,15	7,98	66,87
	CMS-C	35,25	16,39	48,36
Altevogt 14161	CMS-P	36,36	8,48	55,15
	CMS-C	21,79	11,73	66,48
IRAN I	CMS-P	27,46	4,23	68,31
	CMS-C	29,17	11,81	59,03
IRAN IX	CMS-P	37,33	6,00	56,67
	CMS-C	35,61	16,67	47,73
Pico Massaux	CMS-P	70,66	16,77	12,57
	CMS-C	21,35	8,43	70,22
San Jose	CMS-P	72,61	13,38	14,01
	CMS-C	27,75	12,72	59,54
Trenelense	CMS-P	37,86	11,65	50,49
	CMS-C	15,56	10,37	74,07
Szk.46	CMS-P	68,00	18,67	13,33
	CMS-C	16,85	7,87	75,28
Szk.81	CMS-P	71,95	18,29	9,76
	CMS-C	13,87	10,22	75,91
Szk.85	CMS-P	84,62	13,85	1,54
	CMS-C	13,71	3,23	83,06
Ogółem	CMS-P	50,15	12,16	37,69
	CMS-C	23,34	11,43	65,23

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

Analizę ekspresji genów mitochondrialnych przeprowadzono na cDNA uzyskanym w reakcji odwrotnej transkrypcji (RT-PCR) w obecności losowych starterów dziewięcionukleotydowych. Matrycę do syntezy cDNA stanowiło całkowite RNA pozyskane z etiolowanych kielków dwóch wersji cytoplazmatycznych linii wsobnej 541. W doświadczeniu badano poziom ekspresji genów

linii 541 z cytoplazmą sterylizującą typu Pampa względem linii zawierającej cytoplazmę normalną, która w eksperymencie posłużyła jako kalibrator, czyli tkanka kontrolna, do której odnoszono otrzymane wyniki. W programie Primer 3 zaprojektowano 33 pary starterów komplementarnych do czterech konserwatywnych sekwencji genów mitochondrialnych. Sekwencje DNA pozyskano z bazy danych NCBI, a do projektowania starterów wykorzystano głównie rekord zawierający kompletne mtDNA pszenicy zwyczajnej. Uzyskano produkty amplifikacji dla czterech eksonów genu nad2 oraz dla genów atp1 i cox1. Do badań wybrano dziewięć markerów (fragmentów amplifikowanych genów) oznaczonych symbolami: nad2a f2r2, nad2a f3r3, nad2b f1r1, nad2b f3r3, nad2d f3r3, nad2e f1r1, atp1 f1r1, atp1 f2r2, cox1 f4r4. Wyboru par starterów dokonano w oparciu o analizy RT-PCR, kierując się jakością uzyskanych uprzednio transkryptów. Gen referencyjny, pełniący funkcję normalizatora, stanowiła sekwencja rRNA z małej podjednostki rybosomalnej oznaczonej jako 18s. Po przygotowaniu krzywej kalibracyjnej dla układu doświadczenia, w celu sprawdzenia wydajności reakcji, wybrano odpowiednią do dalszych analiz wartość docelowego stężenia cDNA, którą otrzymano po 6-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. Każda próba analizowana była w jednej reakcji w dwóch powtórzeniach, a otrzymane wyniki stanowiły średnią arytmetyczną Ct jednej próby. Rezultaty analizy pozwalają twierdzić, że na poziomie mRNA w mitochondriach męskosterylnej linii 541 z cytoplazmą Pampa zachodzi ekspresja badanych genów na poziomie bardzo zbliżonym do tego, jaki jest obserwowany u tej samej linii z cytoplazmą normalną (tab.3).

Tabela 3

Wyniki analizy ekspresji genów nad2, atp1 i cox1 obliczone metodą podwójnej delty.

Marker	Linia	średnia wartość Ct	Ekspresja
18s	541P	22,06	
	541N	24,21	
nad2a f2r2	541P	24,73	4,79
	541N	24,62	
nad2a f3r3	541P	25,59	3,12
	541N	26,1	
nad2b f1r1	541P	24,48	2,75
	541N	25,17	
nad2b f3r3	541P	25,75	1,79
	541N	27,06	
nad2d f3r3	541P	25,23	1,6
	541N	26,7	
nad2e f1r1	541P	22,74	1,65
	541N	24,17	
atp1 f1r1	541P	22,59	1,84
	541N	23,86	
atp1 f2r2	541P	22,08	3,48
	541N	22,43	
cox1 f4r4	541P	23,74	1,83
	541N	25,02	

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

Wyniki analiz DArTseq w obrębie populacji linii otrzymanych na drodze krzyżowań wstecznych wypierających pozwoliły na uzyskanie danych o segregacji ponad 20 tysięcy markerów. Analiza porównawcza linii 541 z zestawem szesnastu blisko izogenicznych linii męskopłodnych z cytoplazmą C pozwoliła na wytypowanie 88 markerów wykazujących istotny związek z genem/genami przywracającymi płodność w tym źródle CMS (tab.4). Analogiczne porównanie linii 541 z zestawem osiemnastu męskopłodnych linii blisko izogenicznych, ale zawierających cytoplazmę Pampa, doprowadziło do wytypowania 75 markerów związanych z przywracaniem płodności (tab.4). Źródłem alleli przywracających płodność w obu typach CMS była populacja IRAN IX, więc zestawione w tabeli 4 markery są związane z genami restorerami o egzotycznym pochodzeniu, ale dużej skuteczności. Ogółem z puli ponad 20 tysięcy markerów wytypowano 110 o największym znaczeniu. Wśród nich aż 52 markery (prawie połowa wytypowanych) były związane z przywracaniem płodności w obu badanych cytoplazmach.

Wynik ten pozwala wstępnie przyjąć hipotezę, że poszukiwane geny restorerowe dla CMS-C i CMS-P nie są tożsame, ale bardzo silnie sprzężone.

Tabela 4

Lista zidentyfikowanych markerów DArTseq wykazujących istotny związek z przywracaniem płodności w cytoplazmach sterylizujących CMS-C i CMS-P

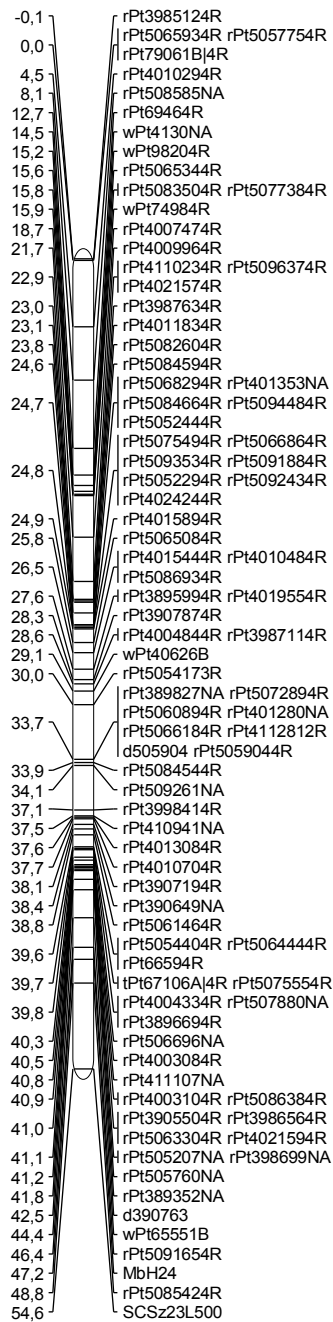
Nazwa markera	Zidentyfikowane SNP (pozycja i kierunek zmian)	Linia 541 (1-marker obecny; 0-brak markera)	Związek z przywracaniem płodności (X) w:	
			CMS-C	CMS-P
XrDs100001871 F 0	36:A>G	1		X
XrDs100002308 F 0	32:G>A	1	X	X
XrDs100002384 F 0	10:T>C	1	X	
XrDs100003368 F 0	66:T>C	1	X	
XrDs100003773 F 0	16:G>A	1	X	X
XrDs100004199 F 0	31:C>T	1	X	
XrDs100007508 F 0	64:T>C	1	X	
XrDs100008109 F 0	50:T>C	1	X	X
XrDs100013070 F 0	22:T>C	1	X	X
XrDs100021394 F 0	30:T>C	1	X	X
XrDs100025531 F 0		0	X	X
XrDs100026324 F 0	38:A>G	1		X
XrDs100026414 F 0		1	X	
XrDs100027261 F 0	61:C>T	1	X	X
XrDs100028207 F 0	11:A>G	1	X	X
XrDs100033264 F 0	52:G>A	1		X
XrDs100037605 F 0	44:G>A	1		X
XrDs100028675 F 0	68:G>A	1	X	
XrDs100030681 F 0		1	X	
XrDs100034056 F 0		1	X	
XrDs100037605 F 0	44:G>A	1	X	
XrDs100042586 F 0	25:C>T	1	X	X
XrDs100042793 F 0	40:T>G	1		X
XrDs3341923 F 0	18:C>T	1	X	
XrDs3341983 F 0	57:T>C	1		X
XrDs3342042 F 0	9:T>C	1	X	X
XrDs3342366 F 0	38:T>C	1	X	
XrDs3342417 F 0	21:T>G	1	X	X
XrDs3345960 F 0	57:G>T	1	X	X
XrDs3346633 F 0	52:G>A	1		X
XrDs3348980 F 0	52:A>G	1	X	X
XrDs3349707 F 0	21:A>T	1	X	
XrDs3352250 F 0	36:T>A	1	X	X
XrDs3354375 F 0	34:C>T	1	X	X
XrDs3354555 F 0	45:A>G	1	X	X
XrDs3355384 F 0		1	X	
XrDs3355620 F 0	23:A>G	1	X	X
XrDs3355917 F 0	22:G>C	1	X	X
XrDs3356032 F 0	43:T>C	1	X	X
XrDs3356462 F 0	36:T>C	1		X
XrDs3357964 F 0	62:T>C	1	X	X
XrDs3358551 F 0	15:C>T	1	X	X

XrDs3361995 F 0	33:T>G	1		X
XrDs3362012 F 0	5:A>C	1	X	
XrDs3362057 F 0	6:A>G	1	X	
XrDs3362167 F 0		1	X	
XrDs3362184 F 0	8:A>G	1	X	X
XrDs3362242 F 0	29:G>A	1	X	
XrDs3362374 F 0	36:T>C	1		X
XrDs3362490 F 0		1	X	X
XrDs3362572 F 0	57:A>G	1	X	X
XrDs3362813 F 0	12:A>G	1		X
XrDs3362900 F 0	7:T>C	1	X	X
XrDs3363309 F 0	33:C>G	1	X	X
XrDs3363320 F 0	26:T>C	1	X	X
XrDs3363544 F 0	66:A>T	1	X	X
XrDs3363579 F 0	36:T>C	1	X	X
XrDs3363966 F 0	14:A>G	1	X	
XrDs3364145 F 0	67:T>C	1	X	X
XrDs3364163 F 0	67:A>C	1		X
XrDs3364464 F 0	34:A>G	1		X
XrDs3364533 F 0		1	X	
XrDs3364537 F 0		1	X	
XrDs3364601 F 0	37:G>A	1	X	X
XrDs3364624 F 0		1	X	X
XrDs3364912 F 0		0	X	
XrDs3365009 F 0	7:A>G	1	X	X
XrDs3576100 F 0		1	X	
XrDs3576628 F 0	33:T>C	1		X
XrDs3576710 F 0	23:A>G	1	X	X
XrDs3578292 F 0	45:G>T	1	X	
XrDs3578973 F 0		1	X	X
XrDs3579409 F 0	8:T>C	1		X
XrDs3579608 F 0	30:A>G	1	X	X
XrDs3579700 F 0		1	X	
XrDs3580061 F 0	10:A>G	1	X	X
XrDs3581035 F 0	68:A>G	0		X
XrDs3581813 F 0		1		X
XrDs3582390 F 0	38:T>C	1	X	X
XrDs3582736 F 0	9:C>T	1		X
XrDs3585346 F 0	35:G>A	1	X	X
XrDs3585794 F 0		1	X	X
XrDs3585836 F 0		1	X	
XrDs3586080 F 0	33:T>C	1	X	X
XrDs3588024 F 0		1	X	
XrDs3589952 F 0	40:G>A	1	X	X
XrDs3592113 F 0	33:C>T	1	X	X
XrDs3594189 F 0		1	X	X
XrDs3594320 F 0	6:C>T	1	X	X
XrDs3595179 F 0	27:G>T	1		X
XrDs3595336 F 0	67:G>A	1	X	X
XrDs3595358 F 0	18:C>T	1	X	X
XrDs3595453 F 0		1		X
XrDs3595459 F 0	47:G>A	1	X	
XrDs3595683 F 0		1	X	

XrDs3595760 F 0		1	X	
XrDs3596033 F 0	14:T>C	1	X	
XrDs3596057 F 0	13:G>C	0		X
XrDs3596063 F 0	45:A>G	1		X
XrDs3596091 F 0		1	X	X
XrDs3596371 F 0		1	X	X
XrDs3596430 F 0	44:C>T	1	X	X
XrDs3596626 F 0		1	X	
XrDs3599928 F 0	10:C>G	1	X	X
XrDs3600627 F 0		1	X	
XrDs3600665 F 0		1	X	
XrDs3601494 F 0	21:A>T	1	X	X
XrDs3601681 F 0	18:T>C	1	X	
XrDs3601738 F 0	46:A>G	1	X	
XrDs3601971 F 0		1		X

Rozbudowa mapy genetycznej zainicjowanej we wcześniejszych latach badań była realizowana w 2013 roku w obrębie populacji mapującej mieszańca F2 [S305PxGonello249-1]. Odmiana Gonello posiada wprowadzone z populacji IRAN IX efektywny gen przywracający płodność, który zlokalizowany jest na długim ramieniu chromosomu 4R. Testowano zestaw opublikowanych w ubiegłym roku markerów COS silnie sprzężonych z głównym genem restorerowym dla cytoplazmy Pampa (Hackauf i in. 2012). Z dwudziestu pięciu markerów COS na zaktualizowanej mapie genetycznej chromosomu 4RL udało się umieścić zaledwie jeden z markerów oznaczony jako MbH24 (rys.1). Pozostałe markery tworzące ten fragment mapy genetycznej to markery otrzymane przy zastosowaniu technologii DArT oraz trzy markery SCAR uzyskane na drodze konwersji fragmentów RAPD oraz konwersji markerów DArT. W sumie na dystansie niespełna 55cM rozlokowanych jest 90 markerów molekularnych (rys.1).

4RL



Rys.1. Zaktualizowana mapa genetyczna chromosomu 4RL w populacji [S305xGonello249-1]F2

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

Wśród pięciu badanych markerów SCAR (oznaczonych symbolami SCSz), najwyższe wartości współczynnika PIC zaobserwowano w przypadku, gdy w podobnej liczbie linii ujawniano oba warianty alleliczne (obecność prążka i brak prążka markerowego). Do tej grupy markerów należały produkty PCR: SCSz23L500 i SCSz334L700 (tab.5). Brak zdolności do rozróżniania badanych genotypów wykazywały marker SCSz670L900 (z powodu braku genotypów, u których był obecny prążek markerowy). Badane markery COS (oznaczone jako MbH) generowały 2-3 produkty amplifikacji odpowiadające wariantom allelicznym. Najlepszą zdolność rozdzielczą w badanym zestawie linii wykazywał marker MbH24, który generował aż trzy warianty alleliczne (tab.5). W przypadku pozostałych dwóch markerów COS jeden z wariantów allelicznych wyraźnie dominował w badanym zestawie linii wsobnych, co znacząco ograniczało ich zdolności rozdzielcze.

Tabela 5

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

Marker	Liczba linii		PIC
	z prążkiem	bez prążka	
SCSz2L450	87	33	0,40
SCSz23L500	77	43	0,46
SCSz334L700	33	46	0,48
SCSz670L900	79	0	0,00
SCSz530L850	34	7	0,28
MbH25 / 1000nt	38	3	0,13
/ 1050nt	4	37	
MbH24 / 650nt	23	18	0,58
/ 700nt	8	33	
/ 750nt	10	31	
MbH21 / 400nt	2	39	0,09
/ 450nt	39	2	

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 2013 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 sterility 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

W jakim stopniu cel badania został osiągnięty – zrealizowano wszystkie zaplanowane na rok 2013 badania uzyskując nowe dane teoretyczne w obrębie każdego z zadań badawczych

7. ***Najważniejsze osiągnięcia.***

- Określono częstotliwość występowania form męskosterylnych i męskopłodnych u mieszańców źródeł CMS-C i CMS-P z ośmioma populacjami żyta pochodzącymi z Iranu i Ameryki Południowej
- Zidentyfikowano 110 nowych markerów wykazujących związek z przywracaniem płodności w cytoplazmach C i P, z czego 52 markery wspólne dla obu systemów CMS
- Rozbudowano wysoko-zagęszczoną mapę chromosomu 4R o nowe markery oparte na metodzie PCR

8. Forma upowszechnienia wyników

Wyniki będą dostępne na specjalnej stronie internetowej Katedry Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin ZUT: <http://www.agro.zut.edu.pl/struktura-wydzialu/katedry/katedra-genetyki-hodowli-i-biotechnologii-roslin.html>

9. Wykaz prac opublikowanych w roku sprawozdawczym dot. danego tematu:

- Hanek M., Bobrowska A., Stojałowski S., 2013. Porównanie przywracania płodności w systemach CMS-Pampa i CMS-C przez irańskie oraz południowoamerykańskie populacje żyta (*Secale cereale* L.). Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych” – streszczenia, Zakopane 4-8 lutego 2013: 358
- Hanek M., Bobrowska A., Stojałowski S., 2013. Poszukiwania markerów molekularnych sprzężonych z genami przywracającymi płodność pręcikowia w odmianach mieszańcowych żyta. Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych” – streszczenia, Zakopane 4-8 lutego 2013: 126

10. Wykaz prac złożonych do druku.

- brak
11. Przyczyny ewentualnych odstępstw od harmonogramu zapisanego w karcie realizacji tematu.
nie dotyczy
 12. Informacja o wynikach współpracy naukowo-technicznej krajowej i z zagranicą (przy współpracy z zagranicą podać kraj, firmę, temat).
Współpraca w zakresie prowadzenia doświadczeń polowych, krzyżowań i oceny materiałów hodowlanych z: Hodowla Roślin DANKO Sp. z o.o. oraz Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o.
 13. W przypadku udziału w konferencjach, sympozjach, szkoleniach i warsztatach itp, w szczególności zagranicznych:
 - a) cel i korzyści oraz stopień wykorzystania do realizacji zadania;
 - b) w jaki sposób wyjazd podniósł wartość merytoryczną realizowanego zadania.Udział kierownika i głównych wykonawców dwóch krajowych konferencjach naukowych związanych tematycznie z genetyką i hodowlą roślin: Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, Zakopane 4-8 lutego 2013 oraz IV Kongres Genetyki, Poznań, 10-13 września 2013. Najistotniejsze korzyści to zapoznanie się z nowymi trendami w zakresie genetyki i hodowli roślin wdrażanymi w wiodących ośrodkach krajowych, możliwość przedyskutowania wyników własnych badań z krajowymi specjalistami oraz zaprezentowanie tych wyników szerokiemu gremium hodowców i naukowców.

Data 5.12.2013.

Podpis kierownika tematu