

Występowanie genów męskiej sterylności w wybranych populacjach żyta ozimego oraz poszukiwanie markerów molekularnych sprzężonych z pobocznymi genami przywracającymi płodność w systemie CMS-C

The occurrence of male sterility genes in selected winter rye populations and the search for molecular markers linked to minor genes restoring fertility in the CMS-C system

Martyna Sobczyk

Praca doktorska wykonana
pod kierunkiem Dr hab. inż. Stefana Stojalowskiego prof. ZUT

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
Wydział Kształtowania Środowiska i Rolnictwa
Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

2023

SPIS TREŚCI

WSTĘP.....	4
HIPOTEZA BADAWCZA	6
CELE PRACY:	6
PRZEGLĄD LITERATURY	7
1.1. Pochodzenie, systematyka, cechy morfologiczne i fizjologiczne żyta.....	7
1.2. Znaczenie gospodarcze żyta ozimego	9
1.3. Cytoplazmatyczna męska sterylność u żyta	11
1.4. Hodowla odmian mieszańcowych żyta ozimego.....	17
1.5. Markery molekularne w badaniach genetycznych i w hodowli żyta ozimego.....	20
MATERIAŁ I METODY	24
2.1. Materiał.....	24
2.2. Metody oceny płodności.....	26
2.3. Materiał biologiczny do oceny występowania różnych typów cytoplazm.....	28
2.4. Tworzenie mieszańców z odmianami populacyjnymi.....	28
2.5. Tworzenie populacji mapującej.....	29
2.6. Izolacja DNA	31
2.7. Markery SCAR.....	32
2.8. Markery COS.....	34
2.9. Markery DArTseq.....	37
2.10. Analizy statystyczne i bioinformatyczne.....	38
WYNIKI.....	39
3.1. Identyfikacja typu cytoplazm z wykorzystaniem markerów typu SCAR	39
3.2. Ocena 4 polskich odmian populacyjnych żyta ozimego pod kątem zdolności do przywracania męskiej płodności w systemach CMS-C i CMS-P.....	41
3.3. Ocena 3 historycznych europejskich odmian populacyjnych żyta ozimego pod kątem zdolności do przywracania męskiej płodności w systemach CMS-C i CMS-P	44
3.4. Podsumowanie oceny populacji żyta pod kątem ich zdolności do przywracania męskiej płodności żyta z CMS-C i CMS-P.....	46
3.5. Wyniki oceny fenotypowej męskiej płodności w kolejnych pokoleniach otrzymanych w obrębie populacji mieszańcowej [544C x MOt]BC _x	48
3.6. Identyfikacja pobocznych genów restorerowych z wykorzystaniem markerów molekularnych	53

3.6.1. Poszukiwanie polimorfizmu genetycznego w obrębie linii rodzicielskich przy pomocy markerów PCR.....	55
3.6.2. Analizy z wykorzystaniem prób zbiorczych.....	56
3.6.3. Mapowanie pobocznego genu przywracającego męską płodność w populacji [544C x MOt]BC1	58
3.7. Analizy DArTseq.....	63
DYSKUSJA	73
4.1. Identyfikacja typów cytoplazm obecnych w europejskich populacjach żyta.....	73
4.2. Przywracanie męskiej płodności w odmianach populacyjnych żyta z cytoplazmą sterylizującą C i P	76
4.3. Identyfikacja genów restorerowych w populacji mapującej [544C x MOt]BC1	79
PODSUMOWANIA I WNIOSKI.....	85
ABSTRACT	86
STRESZCZENIE	88
ZAŁĄCZNIKI.....	91
SPIS TABEL	110
SPIS RYSUNKÓW	111
SPIS LITERATURY	112

WSTĘP

Żyto zwyczajne (*Secale cereale* L.) jest zbożem, które w skali światowej ma znaczenie niewielkie, ale należy do podstawowych roślin uprawnych w Polsce i krajach sąsiednich. Szacuje się, że w 2020 roku globalna produkcja żyta wyniosła ponad 15 milionów ton, z czego produkcja w Europie stanowiła około 13 milionów ton (FAO 2022).

Znaczenie gospodarcze żyta w Polsce jest w dużej części związane z warunkami glebowo-klimatycznymi występującymi w naszym kraju, a kluczową rolę odgrywają: możliwość wystąpienia silnych mrozów w czasie zimy, okresów niedoboru wody wiosną oraz znaczący udział lekkich i kwaśnych gleb w strukturze agrarnej. Pomędzy żytem i pszenicą oraz jęczmieniem istnieje bliskie pokrewieństwo ewolucyjne, a mimo to postęp hodowlany obserwowany w ostatnich kilkudziesięciu latach jest wyraźnie wolniejszy u żyta w porównaniu do dwóch pozostałych w/w zbóż.

Pewne przyspieszenie postępu hodowlanego obserwuje się w obrębie odmian mieszańcowych żyta (Geiger 2007), które zostały zarejestrowane po raz pierwszy w połowie lat 80-tych XX wieku. Produkcja nasienna odmian mieszańcowych żyta oparta jest o systemy cytoplazmatyczno-genowej męskiej sterility (CMS). U żyta znane są dwa tego rodzaju systemy: CMS-Pampa (CMS-P) i CMS-Vavilovii (CMS-V). Cytoplazma Pampa została odkryta w populacji żyta pochodzącej z Argentyny (Geiger i Schnell 1970), natomiast cytoplazma Vavilovii była odkrywana w różnych, głównie europejskich, populacjach źródłowych przez wielu badaczy, a przykładami odkrytych źródeł tej cytoplazmy są: CMS-R (Kobyljanskij 1969), CMS-C (Łapiński 1972), CMS-S (Madej 1975) i CMS-G (Adolf i Winkel 1985). W komercyjnej hodowli odmian mieszańcowych żyta niemal monopolistyczną pozycję ma cytoplazma Pampa. Wynika to z silnego działania sterylizującego CMS-P dla większości genotypów (Geiger 1972, 1982; Madej 1976; Geiger i Miedaner 1996). W 2022 roku w Polsce zarejestrowanych było 29 odmian mieszańcowych żyta, spośród których 28 odmian posiadało cytoplazmę Pampa, a zaledwie jedna (Brandie F1) była wyhodowana w oparciu o cytoplazmę CMS-G (Lista Opisowa Odmian Roślin Rolniczych 2022). W tradycyjnych odmianach populacyjnych żyta spotykamy z różną częstotliwością trzy typy cytoplazm: normalną, CMS-P i CMS-V. W odmianach mieszańcowych, z oczywistych względów, obecne są głównie cytoplazmy sterylizujące. Aktualny stan w Krajowym Rejestrze odmian wskazuje, że wraz z upowszechnianiem odmian mieszańcowych dominującą pozycję w strukturze zasiewów żyta zaczyna zajmować cytoplazma Pampa. Sposobem na uniknięcie ujednolicenia genetycznego zasiewów (pod względem genów zlokalizowanych w

cytoplazmie) i utrzymanie różnorodności w tym obszarze może być wprowadzenie do uprawy większej liczby odmian z cytoplazmą Vavilovii. Mała skala prac hodowlanych z wykorzystaniem cytoplazm zaliczanych do typu CMS-Vavilovii wynika głównie z trudności w otrzymywaniu stabilnych fenotypowo linii męskosterylnych. Jednak warto pamiętać, że dla CMS-V (w odróżnieniu od CMS-P) bez większych przeszkód znajdziemy formy ojcowskie dające w pełni płodne mieszańce F1 (Kobyljanskij 1971, 1982; Madej 1976; Łapiński i Stojałowski 1996). Badania zmierzające do lepszego poznania genetycznych mechanizmów kontrolujących utrzymywanie męskiej sterility i przywracanie męskiej płodności w tym systemie CMS mogą przyczynić się do poprawy efektywności prowadzonych prac hodowlanych i rejestracji kolejnych odmian zawierających alternatywną wobec CMS-Pampa cytoplazmę.

Jednym ze źródeł zaliczanych do typu CMS-Vavilovii jest cytoplazma C odkryta w Akademii Rolniczej w Szczecinie (obecnie Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny) przez prof. M. Łapińskiego (1972). Z dotychczasowych badań wiadomo, że główny gen jądrowy przywracający płodność w cytoplazmie C jest zlokalizowany na długim ramieniu chromosomu 4R (Stojałowski i in. 2004a, 2004b, 2005; Stojałowski 2010). Niewiele wiadomo jednak na temat genów dodatkowych (pobocznych), które u żyta z cytoplazmą CMS-C niewątpliwie są obecne (Łapiński 1990; Stojałowski i Łapiński 1997).

HIPOTEZA BADAWCZA

U żyta ozimego z cytoplazmą sterylizującą C, oprócz głównego genu restorerowego na chromosomie 4R, występuje jeden lub więcej pobocznych genów odpowiedzialnych za przywracanie męskiej płodności. Zlokalizowanie genów pobocznych i opracowanie markerów molekularnych sprzężonych z nimi pozwoli na zwiększenie skuteczności prac hodowlanych. Obecność efektywnych genów przywracających męską płodność w populacjach żyta jest oczekiwana tam, gdzie występują cytoplazmy sterylizujące (ich udział jest czynnikiem wpływającym na przewagę selekcyjną alleli o charakterze restorerowym). Brak występowania cytoplazmy sterylizującej w populacji powoduje, że allele dopełniające (non-restorer) nie podlegają negatywnej selekcji.

CELE PRACY:

- Poszerzenie wiedzy na temat występowania cytoplazm sterylizujących w europejskich populacjach żyta ozimego.
- Ocena frekwencji jądrowych alleli sterylności/płodności w wybranych europejskich populacjach żyta ozimego.
- Określenie chromosomowej lokalizacji pobocznych genów jądrowych kontrolujących przywracanie męskiej płodności w cytoplazmie C oraz próba identyfikacji sprzężonych z w/w genami markerów molekularnych.

PRZEGLĄD LITERATURY

1.1. Pochodzenie, systematyka, cechy morfologiczne i fizjologiczne żyta

Żyto zwyczajne (*Secale cereale* L.) jest zaliczane do gatunków stosunkowo młodych ewolucyjnie. Powstało przypuszczalnie w wyniku krzyżowania *Secale vavilovii* z gatunkami wieloletnimi: *S. anatolicum* i *S. montanum* (Schlegel 2006; Altpeter i Korzun 2007). Z punktu widzenia agronomii nazywane jest uprawą wtórną, ponieważ na początku występowało, jako chwast na polach pszenicy i jęczmienia (Altpeter i Korzun 2007) na Bliskim Wschodzie, a dopiero później uległo udomowieniu. Pierwsze przypadki wykorzystania żyta jako rośliny uprawnej miały miejsce w Persji, środkowej Anatolii i na północ od regionu Morza Czarnego około 3000 lat temu (Miedaner i in. 2022). Udomowienie prawdopodobnie miało miejsce równoległe w kilku miejscach. Ziarna żyta znalezione na stanowiskach neolitycznych w Austrii i Polsce uważane są za formę dziką. Najwcześniejsze znaleziska nasion żyta uprawnego w Europie Środkowej pochodziły z Hallstatt (Austria) z okresu 1000-500 p.n.e. (Schlegel i Korzun 2022).

Żyto ma najlepiej rozwinięty system korzeniowy spośród jednorocznych zbóż. Podobnie jak w przypadku innych traw, system jest wiązkowy. Rozległy system korzeniowy oraz specyficzna ryzosfera sprawiają, że jest to uprawa zbożowa najbardziej odporna na suszę. Nasiona żyta kiełkują już w temperaturze 3-5°C, ale optymalny zakres to 25-31°C. Roślina ta przypomina pszenicę, ale zwykle jest wyższa – żyto generalnie ma najdłuższą łodygę ze wszystkich aktualnie uprawianych drobnoziarnistych zbóż (długość źdźbła prymitywnych form uprawnych dochodzi czasami do 300 cm). Średnia wysokość starszych odmian żyta wynosiła około 150 cm lub więcej, natomiast współczesne, wysokoplonujące odmiany są znacznie niższe (zazwyczaj ok. 120-130 cm) - w szczególności dotyczy to odmian mieszańcowych (Schlegel i Korzun 2022). Żyto jest zwykle uprawiane jako forma ozima, ale dostępne są także odmiany jare. U roślin dnia długiego kwitnienie indukowane jest przez 14 godziną ekspozycję na światło dzienne przy temperaturze 5-10°C. Skrócona długość dnia może spowodować, że żyto ozime pozostanie w stanie wegetatywnym nawet przez 7 lub więcej lat (Schlegel i Korzun 2022).

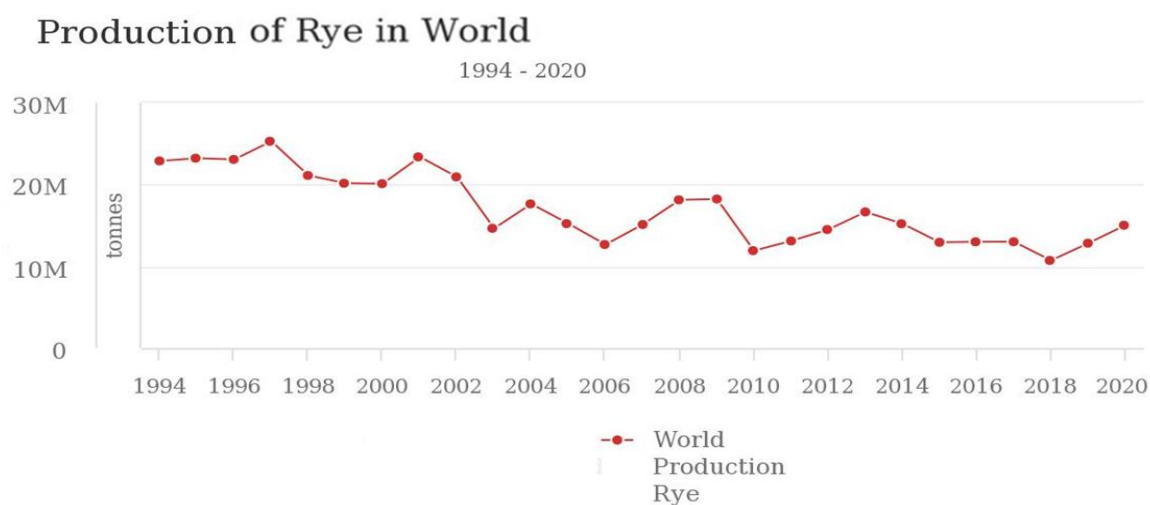
Żyto zwyczajne jest w zasadzie gatunkiem diploidalnym. W każdym z dwóch genomów żyta występuje po siedem chromosomów oznaczanych nazwami od 1R do 7R (Tarkowski i Miazga 1983). Poza formą typową możemy również natrafić na rośliny haploidalne ($n=7$), triploidalne ($3n=21$) i tetraploidalne ($4n=28$). Rośliny haploidalne powstają z niezapłodnionych komórek jajowych w procesie partenogenezy (Tarkowski i

Miazga 1983), albo można je otrzymać na drodze androgenyzy w warunkach *in vitro* wykorzystując mikrospory lub całe pylniki. Dzięki tym dwóm zjawiskom możliwe są działania zmierzające do uzyskania podwojonych haploidów (DH), które pozwalają na szybkie wyhodowanie homozygotycznych linii. Niestety, w hodowli żyta wciąż brakuje metodyki gwarantującej powtarzalność tej procedury. Według założeń teoretycznych podwojone haploidy (DH) charakteryzują się pełną homozygotycznością. Metoda pozwalająca na szybkie otrzymanie idealnie homozygotycznych linii stanowiłaby olbrzymią korzyść dla programów hodowli odmian mieszańcowych (Niemirowicz-Szczytt 2004). Technologia DH znajduje zastosowanie w tworzeniu odmian liniowych między innymi u pszenicy, pszenżyta oraz jęczmienia. Niestety tworzenie linii DH u żyta wciąż pozostaje na etapie eksperymentalnym. Wiąże się to głównie z niskim odsetkiem roślin uzyskanych po regeneracji i stosunkowo wysokim udziałem roślin albinotycznych (Broda i Mikołajczyk 2002; Bartosiewicz i in. 2013; Szechyńska-Hebda i in. 2021; Żur i in. 2022).

1.2. Znaczenie gospodarcze żyta ozimego

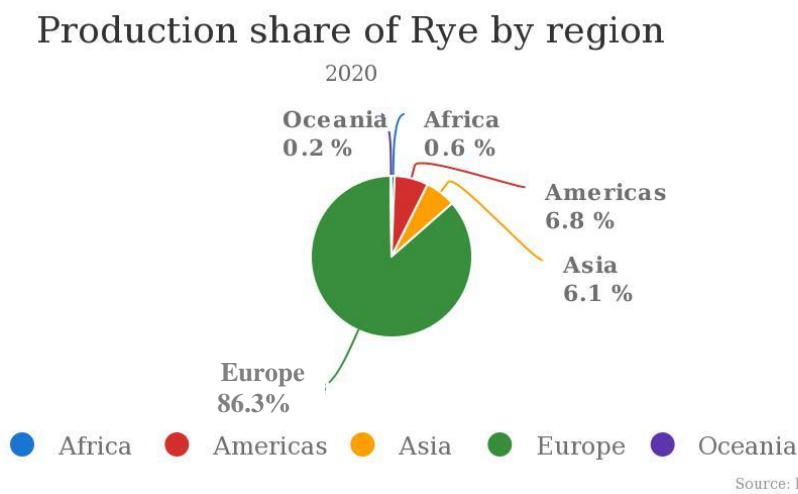
Żyto ozime znajduje wiele zastosowań w gospodarce. W zasadzie można stwierdzić, że jest rośliną wykorzystywaną w całości, chociaż największą wartość użytkową ma ziarno. Żyto jest w Polsce przede wszystkim zbożem paszowym dla zwierząt gospodarskich. Największa część zbiorów ziarna jest przeznaczana na paszę, ale również zielone, niedojrzałe rośliny są wykorzystywane na cele żywieniowe zwierząt. W 2023 roku zarejestrowano w Polsce dwie nowe odmiany (Rolfeed i Rolpower) przeznaczone do produkcji zielonej masy (COBORU 2023). Ważnym kierunkiem użytkowania ziarna żyta jest przemysł zbożowo-młynarski. Mąka żytnia jest bogata w gliadynę, posiada niższą zawartość glutenu niż mąka pszenna oraz zawiera wyższy udział błonnika rozpuszczalnego (Suzuki i in.1999). Ziarno żyta znajduje zastosowanie w produkcji alkoholi takich jak whisky, gin, wódka, piwo czy biber. Z kolei słoma żytnia może stanowić ściółkę dla zwierząt gospodarskich. Zastosowanie żyta w formie rośliny energetycznej zyskuje na popularności ze względu na stosunkowo niskie koszty produkcji. Żyto można wykorzystać jako źródło biomasy, która stanowi substrat do wytworzenia biogazu (Miedaner i in. 2012; Schlegel 2014).

Żyto jest zbożem, które charakteryzuje się znaczną mrozoodpornością i niewielkimi wymaganiami glebowymi (Gąsiorowski 1994). Powyższe cechy żyta spowodowały, iż do początku lat 90-tych XX wieku było ono podstawową rośliną w produkcji rolniczej w Polsce (Kapusta 2016). Obecnie żyto zajmuje czwarte miejsce pod względem powierzchni zasiewów wśród uprawianych w naszym kraju zbóż. Powodem spadku z miejsca pierwszego jest jego słabsza wartość paszowa w porównaniu z pszenicą, pszenżytem i kukurydzą, których popularność ostatnio wyraźnie wzrosła w wyniku zmian klimatycznych i postępów w hodowli (Rys.1) (FAO 2022).



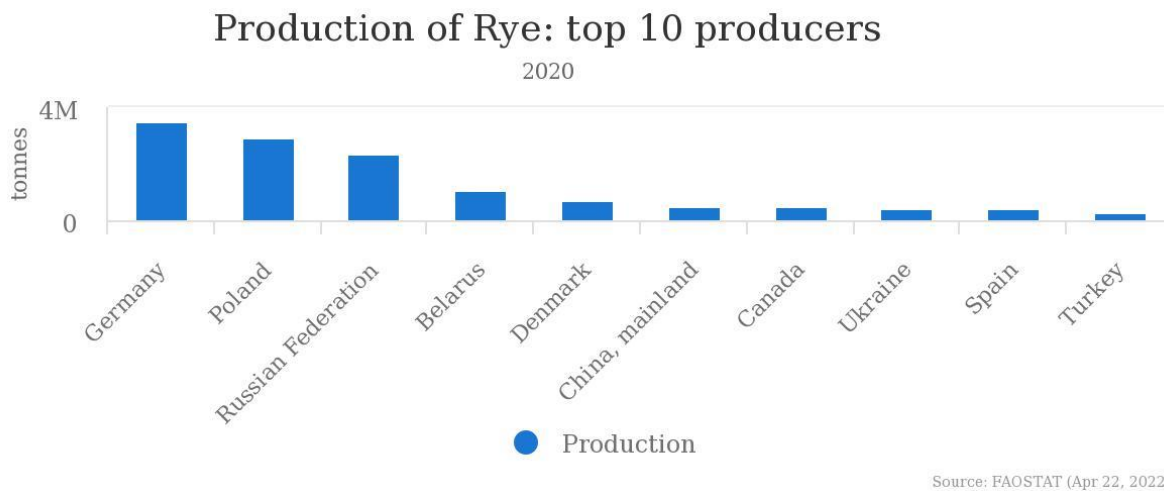
Rys.1. Światowa produkcja żyta w latach 1994-2020 (FAOSTAT 2022).

Według danych statystycznych w 2020 roku całkowita produkcja żyta na świecie wyniosła ponad 15 milionów ton, z czego produkcja w samej Europie to 12 958 658 ton (Rys.2) (FAO 2022).



Rys.2. Procentowy udział w produkcji żyta według regionu - dane z 2020 roku (FAOSTAT 2022).

Nie dziwi, zatem fakt, iż w pierwszej dziesiątce największych producentów żyta znajduje się 6 krajów europejskich, w tym dwie pierwsze pozycje zajmują odpowiednio Niemcy (3 513 400 ton) i Polska (2 904 680 ton) (Rys.3).

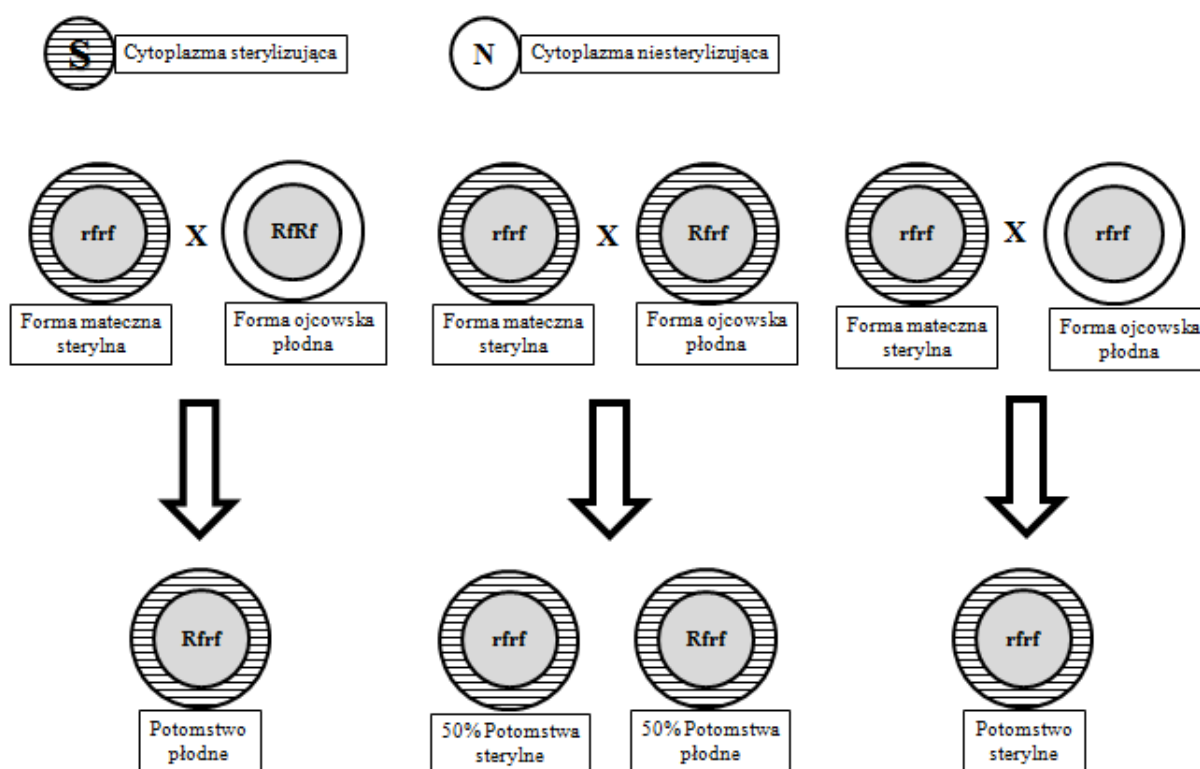


Rys.3. Dziesięć największych światowych producentów żyta - dane z 2020 roku (FAOSTAT 2022).

1.3. Cytoplazmatyczna męska sterylność u żyta

Cytoplazmatyczna męska sterylność (CMS) jest też czasem określana, jako cytoplazmatyczno-genowa męska sterylność. Jest to zjawisko powszechnie występujące wśród roślin jednoliściennych i dwuliściennych (Kaul 1988), które zostało opisane u ponad 150 gatunków (Sofi i in. 2007), w tym u żyta (np.:Kobyljanskij 1969; Geiger i Schnell 1970; Łapiński 1972; Madej 1975; Adolf i Winkel 1985). CMS jest efektem zaburzenia interakcji pomiędzy genami jądrowymi a mitochondrialnymi, czego skutkiem jest brak pyłku lub wytwarzanie pyłku нефunkcjonalnego, co uniemożliwia zapylenie (Tarkowski 1984; Chase 2007). CMS może ujawniać się na różnych etapach rozwojowych: czasami efekty są widoczne już na poziomie morfogenezy kwiatu (zniekształcone pylniki), ale znacznie częściej działanie genów wywołujących męską sterylność obserwujemy w czasie mikrosporoogenezy (nieprawidłowy rozwój tapetum oraz zaburzenia w rozwoju mikrospor) (Ključko i Belousov 1972; Garlicka i Madej 1975; Scoles i Evans 1979; Ivanow i Dymshits 2007).

Zjawisko CMS jest prawie zawsze dziedziczone matecznie (Kaul 1988). Pojawienie się CMS najczęściej jest wynikiem krzyżowań oddalonych: przeważnie międzygatunkowych, a czasem międzyrodzajowych (Kaul 1988; Gobron i in. 2013).



Rys.4. System cytoplazmatycznej męskiej sterylności.

W podstawowym modelu opisującym działanie systemu CMS wyróżnia się dwa rodzaje cytoplazm: niesterylizującą „N” (normalna) i sterylizującą „S”. Według tego modelu genetycznego (wariant najprostszy - monogeniczny) geny cytoplazmatyczne indukujące męską sterylność współdziałają z parą genów jądrowych oznaczonych jako „*Rf*” (ang. *Restorer of fertility*) (Rys.4). Dominujące allele genu *Rf* umożliwiają przywrócenie męskiej płodności u potomstwa zawierającego cytoplazmę sterylizującą „S”. Geny *Rf* są dziedziczone zgodnie z prawami Mendla, natomiast geny cytoplazmatyczne są dziedziczone w linii matecznej. Rośliny niezdolne do produkcji pyłku, występują tylko wtedy, gdy równocześnie występuje cytoplazma sterylizująca (S) wraz z jądrowymi allelami recesywnymi w stanie homozygotycznym (*rfrf*). W momencie, kiedy w jądrze komórkowym występują allele dominujące w stanie homozygotycznym (*RfRf*) lub heterozygotycznym (*Rfrf*), pomimo obecności cytoplazmy sterylizującej (S) dojdzie do przywrócenia męskiej płodności roślin. Tak, więc w trakcie krzyżowania linii rodzicielskich w różnych kombinacjach:

- zapylenie roślin z cytoplazmą sterylizującą i recesywnymi allelami niepłodności (S *rfrf*) pyłkiem roślin z cytoplazmą niesterylizującą i identycznymi recesywnymi allelami niepłodności (N *rfrf*) zakończy się otrzymaniem roślin wyłącznie męskosterylnych (S *rfrf*),
- zapylenie roślin z cytoplazmą sterylizującą i recesywnymi allelami niepłodności (S *rfrf*) pyłkiem roślin z cytoplazmą niesterylizującą/sterylizującą, które zawierają allele dominujące w stanie heterozygotycznym (N/S *Rfrf*) pozwoli uzyskać rośliny męskopłodne (S *Rfrf*) i męskosterylne (S *rfrf*) w stosunku 1:1,
- zapylenie roślin z cytoplazmą sterylizującą i recesywnymi allelami niepłodności (S *rfrf*) pyłkiem roślin z cytoplazmą niesterylizującą/sterylizującą i dominującymi allelami płodności w stanie homozygotycznym (N/S *RfRf*) da nam wyłącznie rośliny męskopłodne (S *Rfrf*),
- zapylenie roślin z cytoplazmą normalną, niezależnie od genów jądrowych, spowoduje, że pojawią się wyłącznie rośliny męskopłodne (Rys.4) (Malinowski 1978).

Na początku drugiej połowy XX wieku w Ameryce Północnej pojawiło się prawdopodobnie pierwsze naukowe doniesienie informujące o zidentyfikowaniu cytoplazmatycznej męskiej sterylności u żyta. Zjawisko CMS zaobserwowane zostało w potomstwach linii wsobnych żyta powstałych na drodze krzyżowania zwrotnego (wewnątrzgatunkowego) (Putt 1954). Najczęściej spotykanym sposobem otrzymywania

źródeł CMS u roślin wyższych jest wprowadzenie genomu jądrowego do obcej gatunkowo cytoplazmy. Według Kaula (1988), który dokonał zestawienia udokumentowanych przypadków odkrycia cytoplazm sterylizujących u wszystkich gatunków roślin wyższych, pozyskanie systemu CMS stosunkowo rzadko bywało efektem krzyżowań wewnątrzgatunkowych. U żyta, poza źródłami spontanicznymi opisanymi w kolejnym akapicie, dwa doniesienia o odkryciu cytoplazm sterylizujących były wynikiem krzyżowań w obrębie gatunku (Putt 1954, Geiger i Schnell 1970). Jedno z tych mieszańcowych źródeł CMS okazało się niezwykle ważne dla hodowli: na Uniwersytecie Hohenheim w mieszańcach argentyńskiej populacji żyta Pampa i linii wsobnych pochodzących z odmiany Petkus odkryto cytoplazmę Pampa (CMS-P) (Geiger i Schnell 1970). Z kolei na Akademii Rolniczej w Szczecinie profesor Mirosław Łapiński w wyniku krzyżowań międzygatunkowych (*Secale cereale* cv. Smolickie z *Secale montanum* Guss.) wyhodował rośliny żyta z cytoplazmą CMS-C (*Cereale* -*S. montanum*) (Łapiński 1972). Co ciekawe, krzyżowania tego typu, będące źródłem CMS u wielu gatunków (Kaul 1988), u żyta nie przyniosły dotąd udokumentowanych sukcesów, poza pracami wykonanymi przez Łapińskiego (1972), w których źródłem cytoplazmy sterylizującej był gatunek uprawny, a z gatunku dzikiego wprowadzono jądrowe geny dopełniające.

Począwszy od końca szóstej dekady XX wieku pojawiło się w literaturze naukowej szereg doniesień o tzw. spontanicznych źródłach CMS, które odkrywano w postaci męskosterylnych roślin znajdujących w odmianach hodowlanych i innych populacjach tego gatunku (m.in. Kobyljanskij 1969, 1971; Madej 1975; Ahokas 1980; Adolf i Winkel 1985). Spontaniczne źródła męskiej sterility odkrywano u żyta, po weryfikacji genetycznej, wykazywały zazwyczaj cytoplazmatyczny charakter dziedziczenia. Przypadki odkrycia spontanicznych źródeł CMS można znaleźć w pracach wykonanych w różnych krajach. W Polsce, w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie dr Lucjan Madej, dzięki analizie kwitnienia około 25 tys. roślin żyta odmiany Smolickie, odkrył cytoplazmę CMS-S, zwaną też Radzików S-128/3 (Madej 1975). W dawnym ZSRR w odmianach żyta Vjatka i Moskovskij Karlik odkryto cytoplazmę CMS-R (Kobyljanskij 1969, 1971). W Niemczech w odmianie żyta Schlägler Alt zidentyfikowano cytoplazmę CMS-G (Adolf i Winkel 1985). Ahokas (1980) raportując odkrycie źródeł CMS w dwóch fińskich odmianach żyta podaje informację o szeregu innych doniesieniach dostępnych w literaturze. Tak duża liczba odkryć spontanicznych źródeł CMS jest zjawiskiem rzadko spotykanym w świecie roślin.

Eksperymenty genetyczne oparte na doświadczeniach polowych umożliwiły wykrycie różnic oraz podobieństw w dziedzicznym podłożu szeregu źródeł CMS u żyta. Na tej

podstawie wysnuto hipotezę, że wszystkie dotąd odkryte źródła cytoplazm sterylizujących można zakwalifikować do dwóch genetycznie odrębnych systemów (typów) CMS. Cytoplazma Pampa (CMS-P) charakteryzowała się wyraźną odrębnością w stosunku do pozostałych cytoplazm, które wykazywały między sobą genetyczne podobieństwo. Dlatego też cytoplazmy te (m.in. CMS-C, CMS-S, CMS-R, CMS-G) zaliczane są do typu CMS-V (Vavilovii) (Geiger 1982; Łapiński i Stojałowski 1996; Stojałowski i in. 2006).

System CMS-P charakteryzuje się silnym działaniem sterylizującym dla większości genotypów żyta wykorzystywanych w europejskiej hodowli odmian populacyjnych. Dzięki powszechnemu występowaniu genotypów dopełniających i ich stabilnemu działaniu w różnych warunkach środowiska, utrzymanie męskiej sterylności u roślin z CMS-P zazwyczaj nie stanowi problemu w hodowli (Geiger 1972, 1982; Madej 1976; Geiger i Miedaner 1996). Problem pojawia się, kiedy chcemy przywrócić mieszańcom heterozyjnym pełną płodność – w europejskich zasobach genowych natrafiamy na brak odpowiednich form ojcowskich (Miedaner i in. 2000, 2005). Znalezienie genotypów ojcowskich zawierających efektywne geny przywracające męską płodność w systemie CMS-Pampa, które jednocześnie gwarantują heterozję tworzonych mieszańców, okazało się zadaniem trudnym i wymagało sięgnięcia po egzotyczne źródła genów.

W przypadku cytoplazm z grupy zaliczonej do systemu CMS-V też natrafiamy na problem z dostępnością odpowiednich komponentów rodzicielskich do hodowli. Dotyczy on form matecznych tworzonych mieszańców. Genotypy dopełniające występują rzadko, a dodatkowo wiele z nich nie wykazuje pełnej stabilności w zmiennych warunkach środowiska. Bez większych przeszkód znajdziemy za to w europejskich zasobach genowych formy ojcowskie, dzięki którym uzyskamy w pełni płodne mieszańce heterozyjne (Kobyłjanskij 1971, 1982; Madej 1976; Łapiński i Stojałowski 1996).

Mechanizm genetyczny przywracania męskiej płodności w systemach cytoplazmatycznej męskiej sterylności u żyta próbowano poznać od wielu lat. W eksperymentach wyjaśniających podłoże genetyczne systemów CMS sięgano po różne metody, zaczynając od genetyki klasycznej, aż po techniki z zakresu genetyki molekularnej. W pierwszym okresie badania prowadzono klasycznymi metodami mendlowskimi – testowano w nich wiele hipotez próbujących wyjaśnić podłoże genetyczne tej cechy. W tych pracach naukowych opisano modele dziedziczenia monogenicznego (Kobyłjanskij 1969; Ključko i Bielousov 1972; Madej 1976), dwugenowego (Madej 1976; Łapiński 1977), trójgenowego (Scoles i Evans 1979; Łapiński 1990; Łapiński i Stojałowski 1997) aż po czterogenowe (Łoś i Ruebenbauer 1982; Ruebenbauer i in. 1984). Z oczywistych względów

doświadczenia te nie pozwalały na określenie położenia postulowanych genów na chromosomach.

Istotny postęp w badaniach nad lokalizacją genów przywracających męską płodność osiągnięto w wyniku użycia do badań serii linii trisomicznych wyprowadzonych z odmiany Esto (Melz i Adolf 1991). Autorzy wykonali krzyżowania linii trisomicznych żyta Esto (seria linii z dodanymi chromosomami od 1R do 6R) z linią dopełniającą z cytoplazmą G. Następnie uzyskane męskopłodne osobniki pokolenia F1 zawierające trisomiczne formy krzyżowano wstecznie z linią męskosterylną. Analiza fenotypowa uzyskanych mieszańców ujawniła szereg odstępstw od wyników krzyżowań z użyciem linii Esto bez dodatkowych chromosomów. Na podstawie uzyskanych wyników Melz i Adolf (1991) sugerują lokalizację genu o najsilniejszym efekcie fenotypowym na chromosomie 4R oraz dwóch mniej znaczących (pobocznych) genów na 3R i 6R. Autorzy tej pracy opisali hipotetyczne trzy geny przy użyciu symboli „*ms*”, zamiast „*Rf*”. Wg Kaula (1988) „*ms*” to symbol wykorzystywany do oznaczania recesywnych genów męskiej sterility w systemach GMS, czyli tych, które są zależne wyłącznie od działania genów jądrowych.

Poprawność lokalizacji genów restorerowych dla cytoplazmy CMS-G zasugerowanych przez Melza i Adolfa (1991) znalazła potwierdzenie w badaniach opartych o zastosowanie markerów molekularnych. W celu określenia lokalizacji głównego genu przywracającego męską płodność zastosowano markery molekularne RFLP, co pozwoliło zmapować gen *Rfg1* (opisany wcześniej jako *ms1*) na długim ramieniu chromosomu 4R (Börner i in 1998). Z najnowszych doniesień wiemy również o zidentyfikowanym pobocznym genie restorerowym *RfNOS1* zlokalizowanym na chromosomie 3RL (Vendelbo i in. 2021), który z dużym prawdopodobieństwem jest tożsamy z *ms2* opisanym przez Melza i Adolfa (1991).

W badaniach systemu CMS-C wykorzystano początkowo markery molekularne RAPD i w efekcie zmapowano na chromosomie 4RL gen *Rfc1* (Stojałowski i in. 2004a, 2004b). Dalsze badania prowadzone z wykorzystaniem markerów typu DArT (Stojałowski i in. 2011) oraz DArTseq (Milczarski i in. 2016) potwierdziły lokalizację genu *Rfc1* – głównego genu, który przywraca męską płodność żyta z cytoplazmą sterylizującą CMS-C. Lokalizacja innych genów, które zgodnie z wcześniejszymi wynikami badań są istotne dla systemu CMS-C (Łapiński 1977, 1990; Stojałowski i Łapiński 1997; Stojałowski i in. 2004b) pozostaje nieznana.

Mapowanie genów restorerowych dla żyta z cytoplazmą Pampa wykonano po raz pierwszy z wykorzystaniem markerów RFLP (Miedaner i in. 2000). Użyte w badaniach trzy źródła genów przywracających płodność (europejskie, południowo-amerykańskie i irańskie)

pozwoły na wskazanie lokalizacji genów determinujących tę cechę na chromosomach: 1RS, 3RL, 4RL, 5R i 6RL. Najsilniejsze efekty fenotypowe wykazywały geny z populacji żyta o pozaeuropejskim rodowodzie (Bliski Wschód oraz Ameryka Południowa), które były obecne na długim ramieniu chromosomu 4R. Markery AFLP pozwoliły na potwierdzenie lokalizacji genu kontrolującego produkcję pyłku żyta z cytoplazmą Pampa na chromosomie 3RL (Bednarek i in. 2002). W celu ułatwienia prac hodowlanych, w oparciu o sekwencje markerów AFLP i RAPD zostały opracowane sekwencje starterów dla markerów SCAR przydatnych do szybkiej identyfikacji genu *Rfp1* pochodzącego z populacji IRAN IX, który jest obecny na chromosomie 4RL (Stracke i in. 2003). Dalszy postęp w badaniach został zainicjowany przez Hackaufa i in. (2012), którzy opracowali szereg nowych markerów dla chromosomu 4RL w oparciu o identyfikację regionów ortologicznych dla *Rfp1* w gatunkach dobrze scharakteryzowanych pod kątem sekwencji DNA: ryżu, *Brachypodium* i sorgo. Następnym krokiem było zmapowanie z pomocą nowych markerów COS zlokalizowanego w tym samym regionie chromosomu 4RL genu *Rfp3*, który wywodzi się z irańskiej populacji Altevogt 14160 (Hackauf i in. 2012 i 2017). Geny oznaczone, jako *Rfp1* i *Rfp3* pochodzą z innych populacji wyjściowych, ale obie te populacje mają bliskowschodni rodowód, więc nie można wykluczyć, że te dwa geny są w istocie tożsame.

1.4. Hodowla odmian mieszańcowych żyta ozimego

Hodowla roślin to po części nauka, której celem jest opracowywanie metod doskonalenia genetycznego roślin uprawnych, ale przede wszystkim działalność w obrębie sektora rolniczej produkcji roślinnej, którego celem jest tworzenie odmian charakteryzujących się unikalnymi cechami pożądanymi ze względu na ich różnorodne zastosowania rolnicze (Sleper i Poehlman 1995). Przyczynia się ona do poprawy, jakości żywności, zarówno w produktach dedykowanych dla ludzi, jak i zwierząt (Hartung i Schiemann 2014). Do najważniejszych cech odmian zbóż uzyskanych dzięki hodowli, zaliczamy przede wszystkim wysoki potencjał plonotwórczy, dużą tolerancję na stesy biotyczne i abiotyczne oraz odpowiednie parametry jakościowe (Verheye 2010).

W obrębie żyta wyróżniamy odmiany populacyjne, mieszańcowe oraz syntetyczne. Odmiany populacyjne uzyskuje się klasycznymi metodami hodowlanymi tzn. poprzez: wybór komponentów rodzicielskich, krzyżowanie, selekcję i rozmnażanie. Główną metodą hodowli odmian populacyjnych jest metoda rezerw polegająca na zebraniu nasion w pierwszym roku z pojedynków i podzieleniu ich na dwie części. Jedną część sieje się w celu oceny potomstwa, a drugą pozostawia w rezerwie. W następnym roku wysiewa się przechowywane nasiona, których potomstwo okazało się najlepsze (Bojanowski 1955). Z kolei odmiana mieszańcowa to odmiana, której materiał siewny jest uzyskiwany za każdym razem przez krzyżowanie określonych zbiorowości roślin, z zachowaniem sposobu i kolejności podanych przez podmiot zachowujący odmianę (PIORIN 2023). Potencjał plonotwórczy odmian mieszańcowych opiera się na wyborze dobrego materiału genetycznego (form rodzicielskich), który w mieszańcach zagwarantuje zwiększony potencjał regeneracyjny, a także wysokie zdolności adaptacyjne (Łapiński i Stojalowski 1997). Trzeci typ odmian żyta, dość nielicznie reprezentowany w rejestrach, to odmiany syntetyczne, które otrzymujemy na drodze swobodnego krzyżowania wybranych linii o wysokiej zdolności kombinacyjnej, które rozmnażamy w izolacji przestrzennej (Spiss i Michalik 2009).

W celu stworzenia odmiany mieszańcowej niezbędne są zaawansowane homozygotyczne linie wsobne. Jednym z problemów, z jakim borykają się hodowcy odmian mieszańcowych jest samoniezgodność żyta. System samoniezgodności stanowi naturalny mechanizm obronny gatunku przed depresją wsobną utrudniający samozapylenie oraz chów wsobny. Kolejnym problemem dla hodowców jest depresja wsobna, występujące w wyniku chowu wsobnego. Charakteryzuje się znacznym obniżeniem żywotności roślin w kolejnych pokoleniach chowu wsobnego, co z kolei przekłada się na problemy w ich uprawie oraz

rozmnażaniu. Aktualnie, dzięki wieloletnim pracom selekcyjnym, materiały hodowlane używane przy tworzeniu komponentów rodzicielskich odmian mieszańcowych wykazują na ogół samozgodność (Wolski 1983; Tarkowski 1984; Spiss i Michalik 2009).

Jednym z najpoważniejszych problemów, z jakim zmuszeni są borykać się hodowcy prowadzący reprodukcję materiałów hodowlanych żyta ozimego jest zachowanie izolacji przestrzennej. Istotne jest rozmnażanie linii wsobnych oraz prowadzenie produkcji kwalifikowanego materiału siewnego w taki sposób, aby nie doszło do zapylenia pyłkiem niewiadomego pochodzenia (Schlegel 2014). Zjawisko cytoplazmatycznej męskiej sterylności stanowi narzędzie pozwalające na efektywną produkcję nasion odmian mieszańcowych, a wdrożenie odmian mieszańcowych w praktyce rolniczej pozwala na pełniejsze wykorzystanie heterozji (Tsa-ftaris 1995). W trakcie badań odmian mieszańcowych żyta ozimego zaobserwowano, że przy niewielkiej ilości pyłku kwiatki są dłużej niezapyłone, a tym samym pozostają otwarte, co zwiększa prawdopodobieństwo wnikięcia zarodników patogenu *Claviceps purpurea* i przekłada się na silniejsze zainfekowanie kłosów przez sporysz. Można więc stwierdzić, że skuteczne przywracanie płodności w systemach CMS oprócz wysokiego plonu może również zmniejszyć porażenie roślin sporyszem (Geiger 1985; Miedaner i in. 2010; 2022). Ma to wpływ na kwestie ekonomiczne związane z uprawą, ponieważ obecność nadmiernej ilości sklerocjów sporyszu w ziarnie uniemożliwia jego sprzedaż (sklerocja te zawierają trujące alkaloidy). Jedynym wyjściem w takiej sytuacji jest czyszczenie ziarna, co skutkuje większym kosztem produkcji. Problem ten jest tym bardziej aktualny, że od 1 stycznia 2022 roku Unia Europejska znacznie zaostrzyła limity dotyczące obecności sporyszu w życie (European Union 2022). Co więcej, już od 1 lipca 2024 roku planowane jest dalsze zmniejszanie limitów. Dlatego efektywne pylenie odmian mieszańcowych musi być priorytetem w hodowli nowych odmian, aby uniknąć nadmiernego porażenia plantacji produkcyjnych przez sporysz (Miedaner i in 2022).

Warto pamiętać, że odmiany mieszańcowe, poza wieloma zaletami związanymi z działaniem efektu heterozji, mają też pewne wady dla ich użytkownika. Zakup nasion odmiany mieszańcowej przez rolnika umożliwia firmom hodowlanym znacząco lepszą kontrolę nad materiałem siewnym niż to było możliwe w przypadku odmian populacyjnych (Arseniuk i Oleksiak 2013). Dodatkowo, działania prowadzące do zawężania genetycznego określonej odmiany do kilku podobnych biotypów będą niosły negatywne skutki dla bioróżnorodności. Trudno tego uniknąć, gdy wymogiem niezbędnym przy rejestrowaniu nowej odmiany jest pozytywny wynik badania OWT (odrębności, wyrównania, trwałości) (Hayes i in.2003). Dlatego pozytywnie należy ocenić fakt, iż trwają prace badawczo-

hodowlane nad alternatywami dla systemu CMS-P. Wśród nich pewne sukcesy przyniosły programy hodowlane, w których otrzymane odmiany heterozyjne oparto na systemie CMS-G. Pierwszą taką odmianą była zarejestrowana na początku XXI wieku w Niemczech odmiana Novus. Oczywiście, dominującym systemem CMS w hodowli nadal pozostaje CMS-Pampa. Hodowla z wykorzystaniem tego systemu CMS była już mocno zaawansowana, kiedy dokonano odkrycia CMS-G (Adolf i Winkel 1985) i rozpoczęto pierwsze programy hodowlane. Obecnie do Krajowego Rejestru wpisanych jest 27 odmian mieszańcowych żyta ozimego: Brandie z koncernu Monsanto, Gradan z Poznańskiej Hodowli Roślin (odmiana liniowo-populacyjna), 18 odmian z firmy KWS (KWS Berado, KWS Dolaro, KWS Florano, KWS Gilmor, KWS Identor, KWS Igor, KWS Initiator, KWS Inspirator, KWS Jethro, KWS Livado, KWS Novor, KWS Pulsor, KWS Rotor, KWS Serafino, KWS Tayo, KWS Trebiano, KWS Vinetto, Piano), 5 odmian z firmy Saaten Union (SU Arvid, SU Dreamer, SU Nasri, SU Performer, SU Perspectiv), odmiana Tur z Hodowli Roślin Smolice (Krajowy Rejestr 2022) oraz Gulden z DANKO Hodowla Roślin (COBORU 2023). Jedynie odmiana Brandie jest oparta o system CMS-G, pozostałe 26 odmian zawiera system CMS-Pampa.

1.5. Markery molekularne w badaniach genetycznych i w hodowli żyta ozimego

Hodowla roślin może być prowadzona za pomocą wielu różnych technik, począwszy od prostego wyboru roślin o pożądanym cechach fenotypowych, poprzez metody wykorzystujące wiedzę o genetycznym podłożu tych cech wraz z lokalizacją chromosomową genów, aż po techniki molekularne pozwalające na selekcję opartą o identyfikację konkretnych sekwencji DNA (Hartung i Schiemann 2014).

Do cech charakteryzujących wartościowy marker molekularny zaliczamy możliwość łatwej identyfikacji, specyficzność gatunkową, wysoki polimorfizm i dziedziczenie kodominujące (Masojć 2009; Tomar i in. 2010). Uwzględniając przebieg analizy polimorfizmów możemy wyróżnić grupy markerów molekularnych: oparte na hybrydyzacji DNA, oparte na PCR (reakcja łańcuchowa polimerazy) i oparte na GBS (genotypowanie przez sekwencjonowanie). Hybrydyzacja DNA jest to zjawisko spontanicznego łączenia się wyznakowanych fragmentów DNA (sondy molekularne) z komplementarną sekwencją DNA. Zastosowanie sond molekularnych umożliwia detekcję fragmentów homologicznych. Reakcja łańcuchowa polimerazy (PCR) jest to metoda powielania łańcuchów DNA w wyniku wielokrotnie powtarzanego cyklu trzech etapów (denaturacja, przyłączanie starterów i wydłużanie łańcucha), które zachodzą w różnych temperaturach. Dzięki zastosowaniu tej metody możemy przeanalizować warianty markerów molekularnych porównując długości otrzymanych fragmentów DNA. W zależności od informacji, jakimi dysponujemy na temat badanego DNA oraz jakie efekty chcemy uzyskać, stosujemy różne modyfikacje PCR. Wymagają one odmiennych składników mieszaniny reakcyjnej oraz innych warunków przeprowadzanych reakcji. Genotypowanie przez sekwencjonowanie (GBS) jest aktualnie jedną z najefektywniejszych metod identyfikacji polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP). W metodzie tej stosuje się trawienie enzymami restrykcyjnymi, aby zmniejszyć złożoność genomu. Uzyskane w wyniku restrykcji fragmenty DNA poddawane są ligacji z adaptorami zawierającymi identyfikatory (ang. *barcode*), a następnie przeprowadza się amplifikację techniką PCR. Otrzymane w ten sposób produkty PCR są analizowane pod względem rozmiaru i tworzą bibliotekę genomową. Kolejnym etapem jest wysokoprępowe sekwencjonowanie (sekwencjonowanie „nowej generacji” - NGS) fragmentów DNA utworzonej biblioteki w połączeniu z wykorzystaniem narzędzi bioinformatycznych (Sztuba-Solińska 2005; Pachota i in. 2016).

Krótką charakterystyką markerów molekularnych wykorzystanych w tej pracy:

- SCAR (ang. *sequence characterised amplified region*)

Fragmety DNA są amplifikowane w reakcji PCR przy użyciu specyficznych par starterów o długości od 15 do 30 par zasad (przeważnie około 20 nt.). Startery SCAR projektowane są do sekwencji nukleotydowych poznanych po sklonowaniu wybranych markerów PCR powiązanych z interesującą nas cechą. Najczęściej źródłem markerów SCAR są fragmenty RAPD (ang. *randomly amplified polymorphic DNA*), ale można je opracować także na bazie markerów AFLP (ang. *amplified fragment length polymorphism*), ISSR (ang. *inter simple sequence repeat*) i innych (Kiran i in. 2010). Dzięki zastosowaniu dłuższych, specyficznych sekwencyjnie par starterów markery typu SCAR nie wykazują niskiej odtwarzalności, która jest zwykle spotykana w przypadku markerów RAPD. Uzyskanie markera kodominującego może być dodatkową zaletą przekształcania RAPD w SCAR, chociaż większość markerów SCAR wykazuje dominację. Główne zalety markerów SCAR to wysoka odtwarzalność i specyficzność względem *locus*, niewielka ilość matrycy DNA potrzebna do wykonania analizy oraz niski koszt (polimorfizmy wykrywane są zazwyczaj w standardowych żelach agarozowych). Dlatego też markery SCAR znajdują szerokie zastosowanie w badaniach dotyczących mapowania genów i selekcji wspomaganej markerami (Paran i Michelmore 1993).

- COS (ang. *conserved ortholog set*)

Jest to grupa markerów opartych o metodę PCR, w której startery projektowane są w oparciu o sekwencje nukleotydowe genów konserwatywnych. Dostępność w bazach danych sekwencji DNA z różnych pod względem pochodzenia genomów, umożliwia identyfikację zestawów ortologicznych genów u gatunków spokrewnionych, które dzięki zastosowaniu narzędzi bioinformatycznych umożliwiają opracowanie odpowiednich markerów. Do zaprojektowania starterów wybierane są geny, które pozostają niezmienione pod względem sekwencji i liczby kopii w trakcie ewolucji roślin. Są one specyficzne dla regionów ortologicznych (pochodzących od wspólnego przodka), co pozwala na porównanie struktury chromosomów u spokrewnionych gatunków, takich jak np. ryż, pszenica, kukurydza, sorgo i jęczmień (Parida i in. 2006). Opracowanie markerów molekularnych reprezentujących geny ortologiczne (markery COS) (Fulton i in. 2002), zostało z powodzeniem zastosowane w życie dla chromosomu 1R (Mago i in. 2005), 2R (Hackauf i Wehling 2005) oraz 7R (Miftahudin i in. 2004; Collins i in. 2008). W 2009 roku opisano konserwatywne

sekwencje ortologiczne między żytem a ryżem zlokalizowane na wszystkich siedmiu chromosomach żyta (Hackauf i in. 2009).

- DArTseq

Ta wysokoprzepustowa technika stanowi swoiste rozwinięcie metody DArT (ang. *Diversity Arrays Technology*). Metoda DArT to technika, która była oparta na hybrydyzacji mikromacierzy wykrywających obecność/brak poszczególnych fragmentów w reprezentacjach genomowych. Aktualnie stosowana technika DArTseq wykorzystuje do generowania markerów metodę GBS (ang. *genotyping by sequencing*) opartą na wysokoprzepustowym sekwencjonowaniu DNA, zamiast hybrydyzacji mikromacierzy (Kilian i Graner 2012). Tym, co wyróżnia technikę DArTseq spośród innych technik GBS jest metoda redukcji złożoności, która jest ukierunkowana na genomowe regiony kodujące. Metoda DArTseq oferuje również relatywnie lepsze pokrycie genomu z wysoką powtarzalnością i generuje markery z mniejszą ilością brakujących danych w porównaniu z innymi metodami GBS (Allan i in. 2020). W technologii DArTseq otrzymujemy dwie grupy markerów: SilcoDArT (obecność/nieobecność określonej sekwencji DNA - markery dominujące) i SNP (polimorfizm pojedynczych nukleotydów obecny w analizowanych fragmentach – markery o charakterze kodominującym) (Li i in. 2015; www.diversityarrays.com).

Markery molekularne stanowią ważne i powszechnie stosowane narzędzie w badaniach genetycznych oraz pracach hodowlanych. Pozwoliły one, między innymi, na opracowanie licznych map genetycznych dla różnych gatunków roślin, dzięki którym mamy możliwość nie tylko dokładniej zapoznać się ze strukturą genomu roślin uprawnych, ale także określać położenie na chromosomach *loci* cech ilościowych (QTL). Dla przykładu, u żyta mapy genetyczne przyczyniły się do zlokalizowania QTLi związanych z aktywnością α -amylazy oraz porostania (Masojć i Milczarski 2005, 2009; Masojć i in. 2007; Myśków i in. 2010, 2012; Tenhola-Roininen i in. 2011) oraz genów determinujących karłowatość żyta (Kubicka i Lewandowska 2003; Stojałowski i in. 2015; Kantarek i in. 2018). Sukcesem zakończyło się również mapowanie genów tolerancji żyta na wolne jony glinu w glebie (Anioł i Gustafson 1984, cyt. za Miftahudin i in. 2002; Gallego i Benito 1997, cyt. za Miftahudin i in. 2002; Gallego i in. 1998; Wiśniewska i Rafalski 2003) i genów odporności na rdze zbożowe (Mago i in. 2002, 2005; Wehling i in. 2003; Roux i in. 2004). Dodatkowo dzięki zastosowaniu markerów molekularnych możemy względnie łatwo i precyzyjnie określić zróżnicowanie materiału pod względem genetycznym oraz oszacować dystans

genetyczny pomiędzy interesującymi nas obiektami (Grzebelus 2009), a także zweryfikować czystość (jednorodność) odmian (Duczmal i Tucholska 2000).

Pierwsza mapa genetyczna żyta oparta o pionierski zestaw markerów molekularnych typu RFLP została opublikowana równo 30 lat temu (Devos i in. 1993). Od tego czasu wdrożono wiele nowych technik badawczych i osiągnięto znaczący postęp w badaniach genomu żyta na poziomie molekularnym. Czasami motorem badań dotyczących żyta była jego podwójna rola: nie tylko, jako europejskiej rośliny uprawnej, ale też istotnego donora wartościowych genów dla ulepszania uprawianej na całym świecie pszenicy (Schlegel 2006). Za najlepiej zbadany uznawany jest chromosom 1R, którego translokacje od kilkudziesięciu lat są wykorzystywane w hodowli pszenicy (Wehling i Roux 2007; Wang i in. 2009; Flusch i in. 2012; Schlegel 2014), a następnie odpowiednio chromosomy: 6R, 5R, 2R, 4R, 7R i 3R. W 2021 roku ukazały się publikacje z pierwszymi opracowaniami sekwencji DNA żyta obejmującymi cały genom (Rabanus-Wallace i in. 2021; Li i in. 2021).

Zrozumienie funkcjonowania skomplikowanych mechanizmów biologicznych odpowiedzialnych za regulacje procesów życiowych żyta jest wysoce istotne dla postępu hodowlanego w obrębie tego gatunku. Zmiany klimatu zachodzą coraz szybciej, o czym świadczy rosnąca średnia temperatura powietrza wynikająca ze stale zwiększającego się stężenia CO₂ i innych gazów cieplarnianych w atmosferze. Coraz częściej obserwujemy ekstremalne zjawiska pogodowe, w szczególności susze. Dlatego też opracowanie nowych odmian odpornych na suszę czy zasolenie, stanowi aktualnie jeden z najważniejszych kierunków hodowli zbóż. Pomimo iż postęp w poznawaniu genetyki żyta jest znaczący, to nie tak szybki jak w przypadku spokrewnionych z nim gatunków, których znaczenie gospodarcze w skali światowej jest dużo większe (np. jęczmień, pszenica, kukurydza, sorgo, ryż i in.).

MATERIAŁ I METODY

2.1. Materiał

Materiał badawczy stanowiły następujące genotypy żyta ozimego:

- Odmiany uprawne pochodzące z polskich ośrodków hodowlanych (w nawiasach podano rok wpisania do Krajowego Rejestru oraz nazwę hodowcy lub podmiotu zachowującego odmianę):
 - Dańkowskie Amber (2010 rok; DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o.),
 - Dańkowskie Diament (2005 rok; DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o.),
 - Armand (2011 rok; Vera-Agra sp. z o.o.),
 - Horyzo (2011 rok; Hodowla Roślin Smolice sp. z o.o. Grupa IHAR),
 - Bosmo (2001 rok; Hodowla Roślin Smolice sp. z o.o. Grupa IHAR),
 - Amilo (1989 rok; DANKO Hodowla Roślin sp. z o.o.),
 - Stanko (2007 rok; Przedsiębiorstwo Nasienne "ROLNAS" sp. z o.o.).
- Odmiany populacyjne żyta o charakterze historycznym, otrzymane z banków genów prowadzonych przez Instytut Genetyki Roślin i Badań nad Roślinami Uprawnymi im. G.W. Leibniza (The Leibniz Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research - IPK, Gatterseben, Germany) oraz Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie (Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych-IHAR). W nawiasach podano numery akcesyjne badanych obiektów w bankach genów:
 - Vjatka (IPK: Akz. Nr: R1902),
 - Landsorte K9538 (IPK: Akz. Nr: R1469),
 - Svalofs St 52404 (IPK: Akz. Nr: R1586),
 - St. Wageningen (IPK: Akz. Nr: R1580),
 - Hungarian Giant (IHAR: 30955).
- Linie wsobne wyhodowane w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Szczecinie przez profesora Mirosława Łapińskiego (Łapiński i Stojałowski 1996.):
 - Linia 541 reprezentowana przez trzy wersje cytoplazmatyczne: dwie męskosterylne z cytoplazmą Pampa (541P) i z cytoplazmą CMS-C (541C) oraz przez wersję męskopłodną z cytoplazmą normalną (541N).
 - Linia 544C – linia męskosterylna z cytoplazmą C
 - Linia Ot-020 – linia męskopłodna przywracająca płodność u żyta z cytoplazmą C

Reprodukcja nasion w/w linii wykorzystywanych w kilku sezonach wegetacyjnych była wykonywana systematycznie w kolejnych latach w szklarni Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie.

Prace polowe obejmowały otrzymywanie mieszańców między wybranymi komponentami rodzicielskimi na drodze ręcznego krzyżowania pojedynków lub losowego przepylenia izolowanych grup roślin. Rozmnożenia linii i otrzymywanie kolejnych generacji mieszańców były realizowane na drodze ścisłego chowu wsobnego. W tym celu na pojedyncze kłosa reprodukowanych roślin nakładane były przed kwitnieniem przezroczyste izolatory z tomofanu (folia paro-przepuszczalna).

Doświadczenia polowe prowadzono w Hali Wegetacyjnej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Nasiona wysiewano w multidonicach, a po kilkunastu dniach wysadzano punktowo w rozstawie roślin 20 x 20 cm w pasach o szerokości 1 metra, między którymi znajdowały się ścieżki pozwalające na swobodną obserwację roślin.

2.2. Metody oceny płodności

Ocenę męskiej płodności roślin przeprowadzano dwiema metodami. Pierwsza z nich polegała na obserwacji kwitnących kłosów i wzrokowej ocenie efektywności ich pylenia. Każdą roślinę oceniano indywidualnie 2-3 razy w czasie kwitnienia z wykorzystaniem 9-stopniowej skali bonitacyjnej opracowanej przez Geigera i Morgensterna (1975). W metodzie tej wyróżniamy trzy główne klasy płodności, a każda z nich jest charakteryzowana przez trzy podkategorie fenotypowe, co pozwala na przypisanie każdej roślinie jednej z dziewięciu klas fenotypowych (Geiger i Morgenstern 1975):

- Rośliny męskosterylne (MS)
 - 1 - charakteryzują się małymi pylnikami, silnie zdegenerowanymi, słabo wysuwanymi poza kwiaty i wyraźnie niezdolnymi do wytwarzania funkcjonalnego pyłku
 - 2 - charakteryzują się pylnikami zdegenerowanymi i brakiem funkcjonalnego pyłku
 - 3 - charakteryzują się cienkimi pylnikami zdegenerowanymi w stopniu umiarkowanym, ale na tyle dużym, że brak jest funkcjonalnego pyłku
- Rośliny częściowo płodne (CP)
 - 4 - charakteryzują się niewielką ilością pyłku zdolnego do zapylenia, który pojawia się w pojedynczych pylnikach
 - 5 - charakteryzują się niewielką ilością pyłku zdolnego do zapylenia obecną w licznych pylnikach
 - 6 - charakteryzują się niewielką ilością pyłku zdolnego do zapylenia, który jest wytwarzany w większości pylników
- Rośliny męskopłodne (MP)
 - 7 - charakteryzują się pylnikami tylko nieznacznie zdegenerowanymi, a także dość dobrą zdolnością pylenia, ale wyraźnie słabszą niż rośliny w pełni męskopłodne
 - 8 - charakteryzują się pylnikami prawie normalnej wielkości, które w większości są dobrze pylące, ale ogólna efektywność pylenia całych kłosów jest nieznacznie mniejsza niż w przypadku roślin w pełni męskopłodnych
 - 9 - charakteryzują się pylnikami normalnej wielkości, a także bardzo dobrą zdolnością pylenia

Druga z zastosowanych metod oceny męskiej płodności roślin oparta była na efektywności zawiązywania ziaren w zaizolowanych kłosach (osadzanie ziaren w kłosie). Na co najmniej jeden kłos z rośliny zakładano izolator z tomofanu, w celu uniknięcia zapylenia obcym pyłkiem (wszystkie ziarna, które były obecne w tych kłosach musiały być rezultatem samozapylenia). Po osiągnięciu pełnej dojrzałości kłosy zbierano, następnie zliczano liczbę kłosek w kłosie i ręcznie młócono poszczególne kłosy. W oparciu o ilość otrzymanych ziarniaków określano procent osadzenia ziarna w izolowanych kłosach. W tym celu liczbę ziaren z kłosa dzielono przez całkowitą liczbę kwiatków w kłosie (typowy kłosek żyta składa się z dwóch kwiatków). Jeśli kłosek było więcej uśredniano tą wartość. Uzyskany wynik podawano w wartościach procentowych - zgodnie ze wzorem:

$$\frac{\text{Średnia liczba ziaren w kłosie}}{\text{Średnia liczba kłosek w kłosie} \times 2} \times 100\%$$

W niektórych latach ocena osadzania ziaren w kłosie została wykonana w uproszczonym wariantcie. Ograniczono się do określenia liczby ziaren w całym zaizolowanym kłosie (określenie liczby kłosek w kłosie pominięto).

2.3. Materiał biologiczny do oceny występowania różnych typów cytoplazm

Europejskie odmiany populacyjne żyta ozimego (Dańkowskie Diament, Bosmo, Amilo, Stanko, Vjatka, Hungarian Giant, Landsorte K9538, Svalofs St 52404, St. Wageningen) zostały wysiane do multidonic, z których pobrano młode liście. Posłużyły one do przeprowadzenia analiz molekularnych dotyczących identyfikacji typu cytoplazmy.

2.4. Tworzenie mieszańców z odmianami populacyjnymi

Wybrane europejskie populacje żyta ozimego (Dańkowskie Amber, Dańkowskie Diament, Armand, Horyzo, Vjatka, Hungarian Giant, Landsorte K9538) były wykorzystane w doświadczeniu polowym, którego celem było zbadanie obecności genów restorerowych i non-restorerowych. W tym celu utworzono mieszańce poprzez krzyżowanie linii wsobnych 541, występujących w dwóch wersjach z cytoplazmą sterylizującą (541C oraz 541P), z poszczególnymi odmianami populacyjnymi żyta ozimego. Na każdym poletku rozmnożeniowym wysadzono po 4 rzędy roślin danej odmiany oraz po 1 rzędzie linii 541C i 541P (Rys.5).

Rządek	Obiekt
1	odmiana np. Armand
2	odmiana np. Armand
3	linia 541C
4	linia 541P
5	odmiana np. Armand
6	odmiana np. Armand

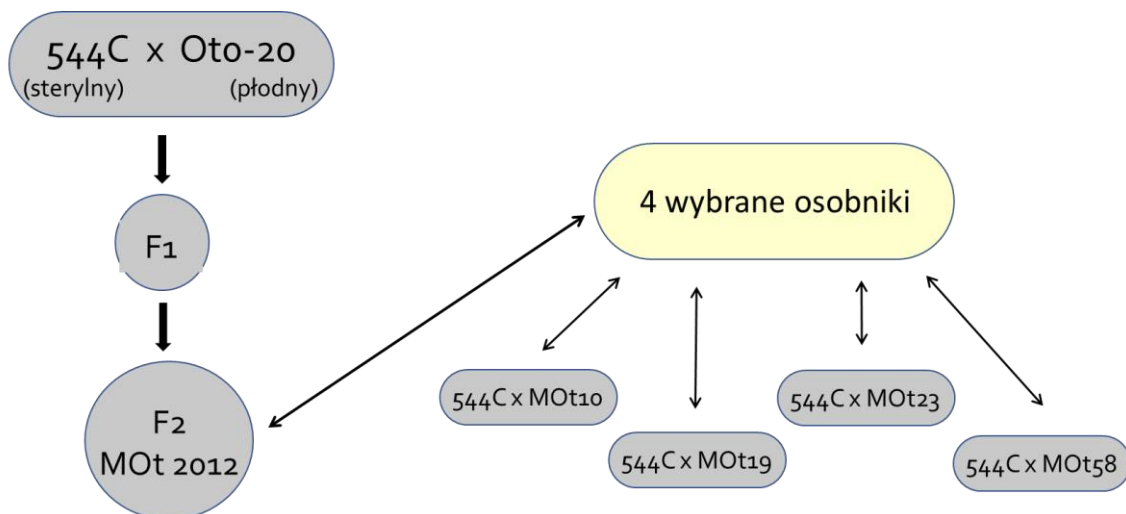
Rys.5. Rozmieszczenie obiektów na poletku rozmnożeniowym, które przed kwitnieniem izolowano namiotem foliowym w celu utworzenia mieszańców testowych.

Krzyżowanie zaszło pod namiotami foliowymi o wymiarach 1 x 1 metra. Każdy namiot obejmował 6 rzędów wchodzących w skład poletka rozmnożeniowego (Rys.5). Uzyskane nasiona wysiewano, a wiosną kolejnego roku wykonywano ocenę męskiej płodności każdej z roślin. Do oceny pylenia w okresie kwitnienia zastosowano 9-stopniową skalę bonitacyjną (Geiger i Morgenstern 1975). Oceniane rośliny rosły na polu doświadczalnym Hali Wegetacyjnej ZUT w Szczecinie w szerokiej rozstawie (20 x 20 cm).

2.5. Tworzenie populacji mapującej

W celu określenia lokalizacji genu pobocznego przywracającego płodność u roślin żyta zwyczajnego (*Secale cereale* L.) z cytoplazmą sterylizującą C posłużono się populacją mapującą [544C x MOt]BC1. Geneza tej populacji przebiegała następująco:

Rośliny pokolenia F₂ mieszańca między linią męskosterylną 544C i linią Ot0-20 poddano analizom z wykorzystaniem markerów molekularnych. Linia Ot0-20 jest efektywnym restorerem męskiej płodności u żyta z cytoplazmą C, zawierającym jeden główny gen przywracania płodności oznaczony symbolem *Rfc1* oraz nieznaną liczbę genów pobocznych (Stojałowski i in. 2004a; Stojałowski 2010). Zastosowanie markerów molekularnych SCAR sprzężonych z genem *Rfc1* (Stojałowski 2010) pozwoliło na wskazanie z dużym prawdopodobieństwem, które z roślin F₂ zawierają gen *Rfc1*. W roku 2012 w czasie kwitnienia rośliny mieszańcowe pokolenia F₂ poddano ocenie fenotypowej płodności wykorzystując 9-stopniową skalę bonitacyjną (Geiger i Morgenstern, 1975). Rośliny, które według oznaczeń markerowych nie zawierały genu *Rfc1*, ale mimo to intensywnie pyliły, zostały użyte do krzyżowań z męskosterylną linią 544C. Spośród badanych 179 roślin pokolenia F₂, wytypowano do krzyżowań 4 genotypy: MOt10, MOt19, MOt23 i MOt58. Po zakończeniu sezonu wegetacyjnego poprawność obserwacji wzrokowych wykonanych w czasie kwitnienia potwierdzono wykonując ocenę stopnia zawiązywania ziarna w zaizolowanym przed kwitnieniem kłosie głównym. Działania te miały na celu wytworzenie populacji mieszańcowej „semi-BC1” (do krzyżowania wstecznego z linią 544C użyto roślin mieszańcowych pokolenia F₂), w której pomimo braku genu *Rfc1* potomstwo zawierało rośliny płodne (Rys.6).



Rys.6. Schemat powstawania populacji mapującej BC1.

Utworzona populacja mapująca [544C x MOt]BC1 składała się łącznie z 64 genotypów (544CxMOt10 - 11; 544CxMOt19 - 24; 544CxMOt23 - 13; 544CxMOt58 - 16). Na populacji mapującej [544C x MOt]BC1 przeprowadzono analizy molekularne z wykorzystaniem markerów typu COS i SCAR oraz wykonano ocenę fenotypową. Następnie (w latach 2013-2015) kontynuowano prowadzenie krzyżowań wstecznych z wykorzystaniem linii 544C po stronie matecznej. Źródłem pyłku były najsilniej pyłące rośliny z kolejnych segregujących potomstw mieszańcowych. W ten sposób uzyskano odpowiednio pokolenia BC2 i BC3. Celem tych zabiegów było wyparcie większości genów pochodzących od linii Ot0-20, pozostawiając jedynie te odpowiedzialne za produkcję pyłku.

Następnie na populacji [544C x MOt]BC3 były prowadzone oceny fenotypowe oraz chów wsobny roślin męskopłodnych. W otrzymanych w wyniku chowu wsobnego pokoleniach F2, F3, F4 i F5 wykonywano oceny płodności dwiema metodami (ocenę wzrokową i ocenę stopnia zawiązywania się nasion).

Dodatkowo na wybranych pojedynkach z populacji mieszańcowych [544C x MOt]BC3F3 oraz [544C x MOt]BC3F4 wykonano analizy molekularne technologią DArTseq.

2.6. Izolacja DNA

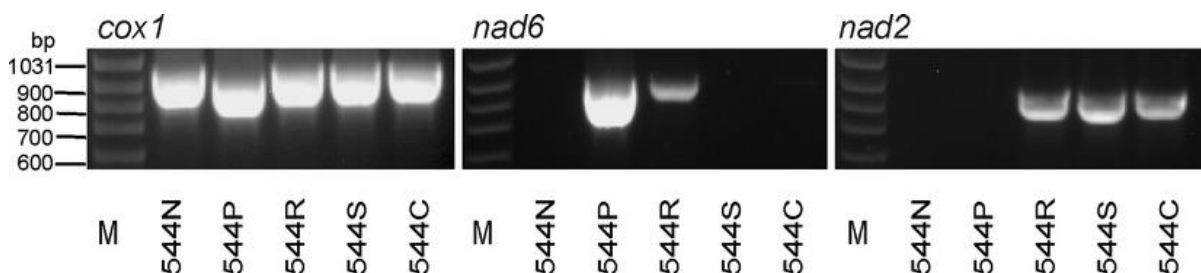
Materiałem do izolacji DNA były młode liście badanych roślin, które zaraz po zebraniu mrożono i przechowywano w temperaturze -70°C . Przed izolacją DNA liście były odważane do polipropylenowych sterylnych probówek 2ml, następnie zastosowano stalowe kulki homogenizacyjne, ciekły azot oraz homogenizator (TissueLyser III QIAGEN), w którym wytrząsano probówki przez 2 minuty przy częstotliwości 20 Hz. Tak przygotowany materiał używano do ekstrakcji DNA przy zastosowaniu dwóch metod.

Izolacja z zastosowaniem 96 dołkowych polipropylenowych sterylnych płytek wraz ze zmodyfikowaną procedurą CTAB (Stein i in. 2001) stanowiła podstawową metodę pozyskiwania DNA (Protokół Z1 w Załącznikach do pracy zawiera szczegółowy opis procedury). Jako metodę uzupełniającą wykorzystywano komercyjny zestaw do izolacji genomowego DNA z roślin - GenElute™ Plant Genomic DNA Miniprep Kit firmy Sigma-Aldrich (procedura zgodnie z zaleceniami producenta).

Po zakończeniu izolacji DNA zastosowano czytnik spektrofotometryczny (Epoch BioTek) z oprogramowaniem Gen 5 1.11 do zmierzenia koncentracji izolatu oraz określenia jego czystości (wartość absorpcji A_{260}/A_{280} nm). Integralność DNA była weryfikowana przy zastosowaniu elektroforezy przeprowadzonej w 1% żelu agarozowym przy napięciu 90 V w czasie około 1,5-2 h (w żelach rozdzielano po 2 μl ekstraktu). Po zakończeniu rozdziału żel agarozowy był inkubowany przez 15 minut w roztworze bromku etydyny (0,1g EtBr w 2 litrach TBE), a następnie otrzymany wynik wizualizowano w świetle UV (G:BOX SynGene) i dokumentowano w programie GeneSnap (version 7.12 SynGene).

2.7. Markery SCAR

W celu identyfikacji typu cytoplazmy u badanych 4 polskich odmian uprawnych żyta ozimego (Dańkowskie Diament, Bosmo, Amilo, Stanko) i 5 europejskich odmian historycznych żyta ozimego (Vjatka, Svalofs St 52404, Landsorte K9538, St. Wageningen, Hungarian Giant) wykorzystano 3 markery molekularne typu SCAR: *cox1*, *nad6* i *nad2* (Rys.7) (Stojałowski i in. 2006). Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowy były zgodne z danymi ujętymi w tabelach 1 i 2.



Rys.7. Rozkład oczekiwanych produktów dla żyta z poszczególnymi cytoplazmami (Normalna, Pampa i trzy cytoplazmy Vavilovii: R, S, C), jakim charakteryzują się markery *cox1*, *nad6* i *nad2* (Stojałowski i in. 2006).

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej, w której zachodziła amplifikacja produktów przy zastosowaniu markerów *cox1*, *nad6* oraz *nad2* dla polskich oraz historycznych europejskich odmian żyta ozimego.

Skład mieszaniny PCR	1 próba dla mieszaniny 20 μ L
Bufor (Promega)	4 μ L
25 mM MgCl ₂	1.2 μ L
10 mM dNTPs	1.2 μ L
Starter _F (5 μ M)	1 μ L
Starter _R (5 μ M)	1 μ L
H ₂ O	10.5 μ L
Polimeraza GoTaqG2 Flexi (5U/ μ L)	0.1 μ L
DNA (25ng/ μ L)	1 μ L
Ogółem	20 μ L

Tabela 2. Profil temperaturowy, według którego prowadzone były analizy PCR-SCAR w termocyklerze (BIO RAD T100 Thermal Cycler) dla polskich oraz historycznych europejskich odmian żyta ozimego.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	94°C	5 min.	1
Denaturacja	92°C	45 s.	35
Annealing	57°C	45 s.	
Elongacja	72°C	90 s,	
Elongacja końcowa	72°C	10 min.	1
Końcowy etap	10°C	∞	

Otrzymane próby z analizy PCR poddano elektroforezie w 1,5% żelu agarozowym. W celu określenia długości produktów amplifikacji zastosowano wzorzec (ThermoScientific™ GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder). Po zakończeniu rozdziału żel agarozowy był inkubowany przez 15 minut w roztworze bromku etydyny (0,1g EtBr w 2 litrach TBE), a następnie otrzymane produkty amplifikacji wizualizowano w świetle UV (G:BOX SynGene) i dokumentowano w programie GeneSnap (version 7.12 SynGene).

2.8. Markery COS

W czasie prowadzonych badań przetestowano 271 markerów molekularnych typu COS (ang. *Conserved Ortholog Set*). Wśród użytych markerów, 43 zostały zaprojektowane na potrzeby tej pracy. Pozostałe 228 markerów zostało udostępnionych przez dr B. Hackaufa, z czego 34 zostały wcześniej opublikowane (Hackauf i in. 2017) (por. Załączniki: Tabela Z1). Wszystkie powyższe markery zostały użyte do analiz na liniach rodzicielskich 544C i Ot0-20. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz profil temperaturowy dla markerów COS były zgodne z danymi w tabelach 3 i 4. Markery COS, które wykazały polimorfizm na liniach rodzicielskich użyto następnie do badań przeprowadzonych na próbach zbiorczych (opis tworzenia prób zbiorczych na stronie 35).

Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej, w której zachodziła amplifikacja produktów przy zastosowaniu 271 markerów molekularnych typu COS na liniach rodzicielskich 544C oraz Ot0-20.

Skład mieszaniny PCR	1 próba dla mieszaniny 20 μL
Bufor (Promega)	4 μL
25 mM MgCl ₂	1.5 μL
10 mM dNTPs	1.5 μL
Starter _F (5 μM)	1 μL
Starter _R (5 μM)	1 μL
H ₂ O	5.9 μL
Polimeraza GoTaqG2 Flexi (5U/ μL)	0.1 μL
DNA (25ng/ μL)	5 μL
Ogółem	20 μL

Dla niektórych markerów molekularnych typu COS niezbędne okazało się zmodyfikowanie standardowego składu mieszaniny reakcyjnej, poprzez zwiększenie koncentracji MgCl₂. Przy analizach z użyciem markera tcos1787 dodawano 2 μl MgCl₂ (zamiast standardowych 1,5 μl), natomiast dla 9 markerów (AK250908, c2624, c3765_2, MWG2218, TC122582, TC363404, TC368552g, TC395749g, tcos1435) ta wartość wyniosła 2,5 μl . Do mieszaniny reakcyjnej z markerem tcos1173 zastosowano 3 μl MgCl₂, a dla markerów COS TC3185g i tcos2138 należało zastosować 4 μl MgCl₂.

Tabela 4. Profil temperaturowy, według którego prowadzone były analizy PCR-COS w termocyklerze (BIO RAD T100 Thermal Cycler) na liniach rodzicielskich 544C oraz Ot0-20.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba cykli
Denaturacja wstępna	95°C	2 min.	1
Denaturacja	94°C	20 s.	35
Annealing	55°C	60 s.	
Elongacja	72°C	3 min.	
Elongacja końcowa	72°C	10 min.	1
Końcowy etap	10°C		∞

Część testowanych markerów musiała mieć zmodyfikowany profil temperaturowy analizy PCR, a dokładnie etap przyłączania starterów (ang. *annealing*). Dla 8 markerów (c35973, CA498871, OSEC, TaAGP-L2, TC368844g, tcos1475, tcos2351, tcos751) należało obniżyć temperaturę tego etapu do 50°C, a z kolei dla 19 markerów COS (c3116a_4, c5542_1, cp29006, TC176835, TC372539g, TC383145g-5, TC408265g, tcos1305, tcos1308, tcos1358, tcos1435, tcos167, tcos2235, tcos233, tcos2629, tcos44, tcos658, tcos968, TNAC1727) należało podnieść temperaturę annealingu do 60°C. Najwyższą temperaturą annealingu, czyli 65°C w analizie PCR, jaką zastosowano charakteryzowało się 6 markerów molekularnych typu COS (c2624, c3765_2, TC112013, TC368630g, TC371388g, tcos1547).

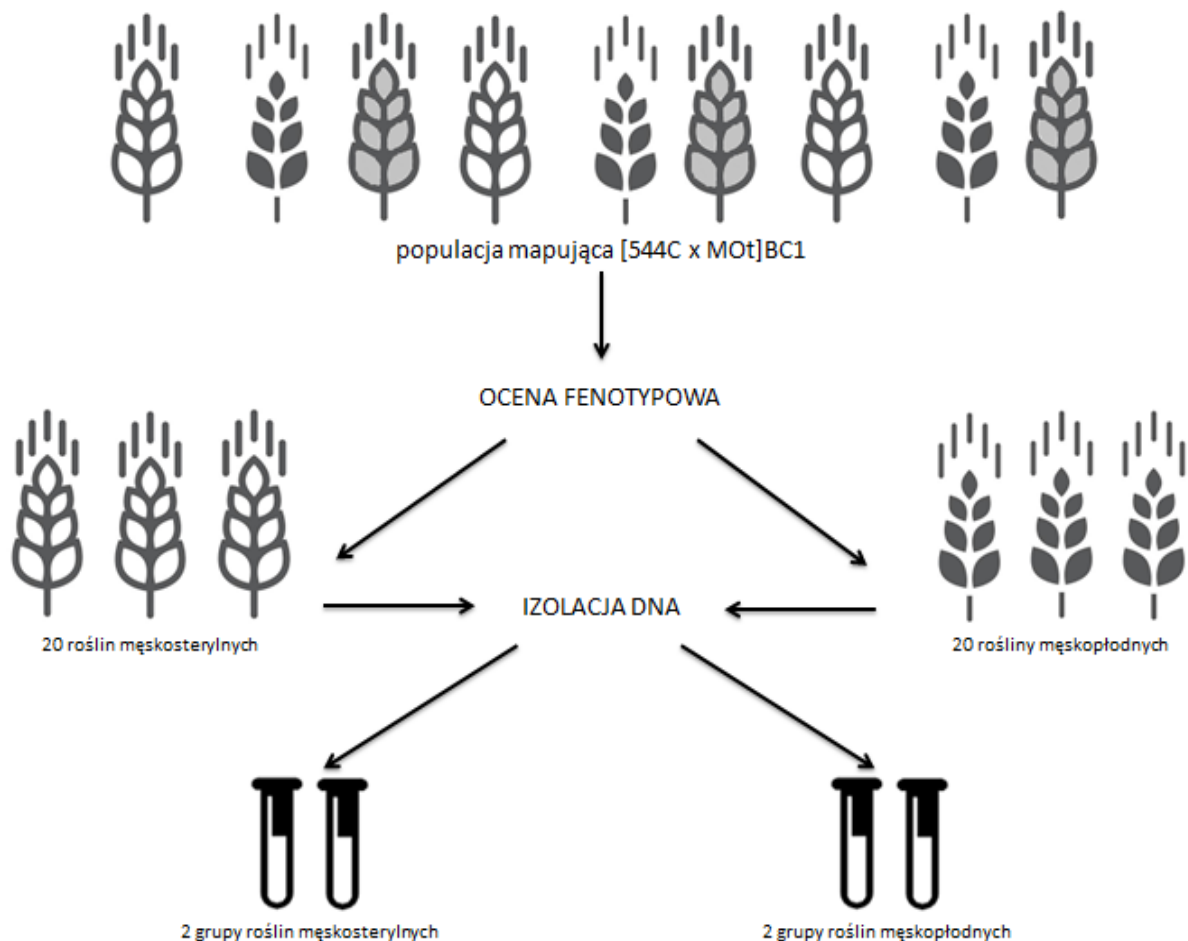
Dla 110 produktów otrzymanych w wyniku analiz PCR z wykorzystaniem markerów COS należało dodatkowo zastosować enzymy restrykcyjne (Hinf I, Hind III, Hae III, Dra I, HinP1 I, EcoR I, Rsa I, Xba I, TaqI), w celu jednoznacznego zaklasyfikowania tych markerów, jako monomorficznych lub polimorficznych (por. Załączniki, Tabela Z2).

Produkty uzyskane po analizie PCR-COS i po cięciu enzymami restrykcyjnymi poddano elektroforezie w 2% żelu agarozowym i wizualizowano w świetle UV.

W celu ograniczenia kosztów analiz molekularnych zastosowano analizy na próbach zbiorczych (BSA ang. *bulked segregant analysis*) (Zou i in. 2016). Utworzono dwie grupy genotypów reprezentujące przeciwstawne fenotypy odnośnie efektu płodności („grupa roślin męskosterylnych”/”grupa roślin męskopłodnych”). Na podstawie wyników oceny wzrokowej pylenia (9-stopniowa skala bonitacyjna Geigera i Morgensterna, 1975) oraz oceny stopnia zawiązywania ziaren wyselekcjonowano z populacji mapującej [544C x MOt]BC1 czterdzieści osobników o skrajnych fenotypach (20 męskosterylnych i 20 męskopłodnych). Następnie w obrębie każdej grupy fenotypów skrajnych wydzielono po dwie podgrupy. W ten sposób utworzono po dwie próby zbiorcze dla grupy obiektów męskosterylnych i kolejne dwie próby zbiorcze dla grupy obiektów męskopłodnych. Każda z tych 4 prób zbiorczych

składała się z 10 unikatowych pojedynków (Rys.8). Utworzenie dwóch podgrup w obrębie każdej grupy skrajnie odmiennych fenotypów miało na celu podniesienie precyzji analiz opartych o metodę BSA. Założono, iż wszystkie obiekty w doświadczeniu miały losowy rozkład alleli w genomie, ale wyjątek powinny stanowić allele powiązane z cechą płodności. Po zastosowaniu markera molekularnego różnica w produktach amplifikacji między dwoma skrajnymi próbkami zbiorczymi potwierdzona w obu podgrupach świadczyła, iż dane *locus* jest powiązane z badaną cechą.

Przygotowane próby zbiorcze zostały następnie wykorzystane do analiz PCR z zastosowaniem wybranych markerów molekularnych typu COS. Wyniki amplifikacji markerów COS umożliwiły selekcję markerów polimorficznych wykazujących korelację z cechą płodności. Markery te zostały następnie wykorzystane w analizach pojedynczych genotypów populacji mapującej [544C x MOt]BC1.



Rys.8. Tworzenie prób zbiorczych w populacji mapującej [544C x MOt]BC1.

2.9. Markery DArTseq

Opracowana przez zespół badawczy dr Andrzeja Kiliana technologia DArTseq opiera się na opatentowanej metodzie redukcji złożoności genomu. Wysokoprzepustowa technologia DArTseq generuje dwa rodzaje danych: SilicoDArT (wynik dla obecności/nieobecności markerów dominujących) oraz SNP (polimorfizm pojedynczych nukleotydów obecny w analizowanych fragmentach DNA) (<https://www.diversityarrays.com/>).

Analizy DArTseq zostały zlecone firmie Diversity Arrays Technology Pty Ltd w Australii, która jest ich jedynym wykonawcą. Ze względu na koszty analiz DArTseq badaniami objęto ograniczoną liczbę genotypów. Analizami DArTseq objęto łącznie 104 osobniki z populacji mapujących [544C x MOt]BC3F3 oraz [544C x MOt]BC3F4, wszystkie uzyskane w sezonie wegetacyjnym 2017/2018. Do analiz DArTseq wysłano preparaty DNA o koncentracji od 50 do 100 ng/ μ l w ilości 30 μ l.

2.10. Analizy statystyczne i bioinformatyczne

Do analiz statystycznych wyników otrzymanych z oceny fenotypowej wykorzystano współczynnik korelacji oraz test χ^2 . Współczynnik korelacji obliczono w programie Microsoft Office Excell, natomiast test χ^2 został przeprowadzony w programie JoinMap5 (Van Ooijen 2018).

W oparciu o publikację Martis i in. (2013) i sekwencje dostępne w bazach danych NCBI (ang. *National Center for Biotechnology Information*; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) oraz GABI (ang. *Genomanalyse im biologischen System Pflanze*; <https://www.gabipd.org/>) zaprojektowano 43 markery molekularne typu COS wykorzystując programy MGAlignIt (Lee i in. 2003) i Primer3 (<http://www.primer3.ut.ee>). Konstruowanie map genetycznych zostało zrealizowane z użyciem programu JoinMap5 (Van Ooijen 2018) wykorzystującego funkcję Kosambi i szacującego odległości między *loci* na chromosomie w centyMorganach (cM). Za minimalną wartość sprzężenia markerów, opisywaną przez funkcję LOD (logarytm ilorazu prawdopodobieństwa) przyjęto 3.

Wyniki otrzymane z analiz DArTseq na populacjach mapujących [544C x MOt]BC3F3 i [544C x MOt]BC3F4 zestawiono z wynikami oceny fenotypowej tych populacji wykorzystując nieparametryczny test Kruskala-Wallisa. Obliczenia wykonano w programie MapQTL5 (Van Ooijen 2004). Działanie to miało na celu zidentyfikowanie markerów DArTseq, które wykazywały najsilniejszą korelację z fenotypowymi wynikami oceny pylenia. Kolejnym krokiem było zmapowanie wskazanych w poprzednim etapie markerów DArTseq na genomie żyta (Rabanus-Wallace i in. 2021). Wykorzystano w tym celu program QIAGEN CLC Genomics Workbench 11 (www.qiagenbioinformatics.com).

WYNIKI

3.1. Identyfikacja typu cytoplazm z wykorzystaniem markerów typu SCAR

Przy pomocy trzech markerów molekularnych typu SCAR (cox1, nad6 oraz nad2) zidentyfikowano rodzaj cytoplazmy obecnej w roślinach wchodzących w skład dziewięciu populacji żyta uprawnego. Badaniami objęto 4 polskie odmiany populacyjne i 5 europejskich odmian historycznych żyta ozimego (Tabele Z3-Z11 w Załącznikach). W obrębie każdej populacji przebadano od 58 do 96 roślin (Tabela 5).

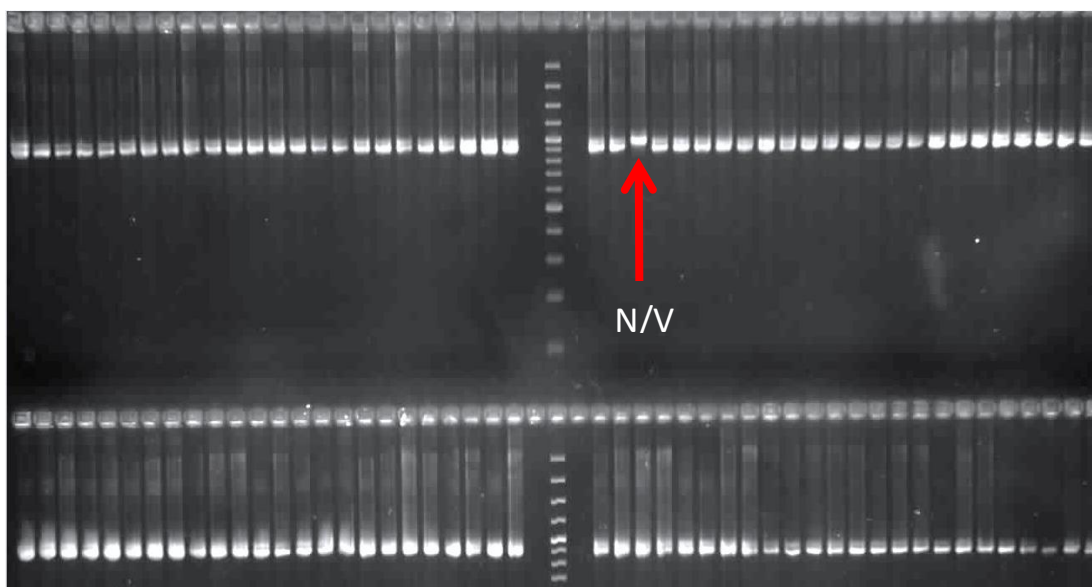
Analizy przeprowadzone w obrębie populacji Dańkowskie Diament wykazały powszechne występowanie cytoplazmy Pampa (P). Cytoplazmę P zawierały wszystkie przebadane rośliny tej odmiany, oprócz jednego osobnika (roślina numer 27), u którego występowała cytoplazma Normalna (N) (Rys.9; Tabela Z3). Z kolei odmiana Bosmo charakteryzowała się obecnością cytoplazmy Vavilovii (V) (54 pojedynki) i cytoplazmy Normalnej (41 pojedynków). Cytoplazma Pampa nie została wykryta w tej odmianie (Tabela Z4). Przeprowadzone badania wykazały, że populacja Amilo charakteryzowała się obecnością cytoplazmy typu Vavilovii u 63 osobników oraz cytoplazmą typu Normalnego u 33 osobników (Tabela Z5). W przypadku odmiany Stanko zidentyfikowano obecność wszystkich trzech cytoplazm żyta: cytoplazmę typu Pampa zawierało 26 genotypów, cytoplazmę typu Normalnego 22 pojedynki, a cytoplazmę Vavilovii 10 roślin (Tabela 5; Tabela Z6).

U żadnej z historycznych odmian europejskich żyta ozimego cytoplazma Pampa nie została zidentyfikowana. Populacje Svalofs St 52404 i Landsorte K9538 charakteryzowały się obecnością wyłącznie cytoplazmy Normalnej (odpowiednio 94 pojedynki i 95 pojedynków objętych badaniami) (Tabele Z7-Z8). W przypadku odmiany Vjatka badania wykazały obecność dwóch typów cytoplazm: Normalnej (44 pojedynki) i Vavilovii (17 pojedynków) (Tabela Z9). Wynik dotyczący obecności cytoplazm w populacji St. Wageningen kształtował się następująco: 83 pojedynki charakteryzowały się cytoplazmą typu Vavilovii, a u 13 pozostałych pojedynków zidentyfikowano cytoplazmę Normalną (Tabela Z10). Analizy wykazały, że w odmianie Hungarian Giant również występowały dwa typy cytoplazm, u 60 pojedynków występowała cytoplazma Vavilovii, natomiast pozostałe 36 roślin charakteryzowało się cytoplazmą Normalną (Tabela 5; Tabela Z11).

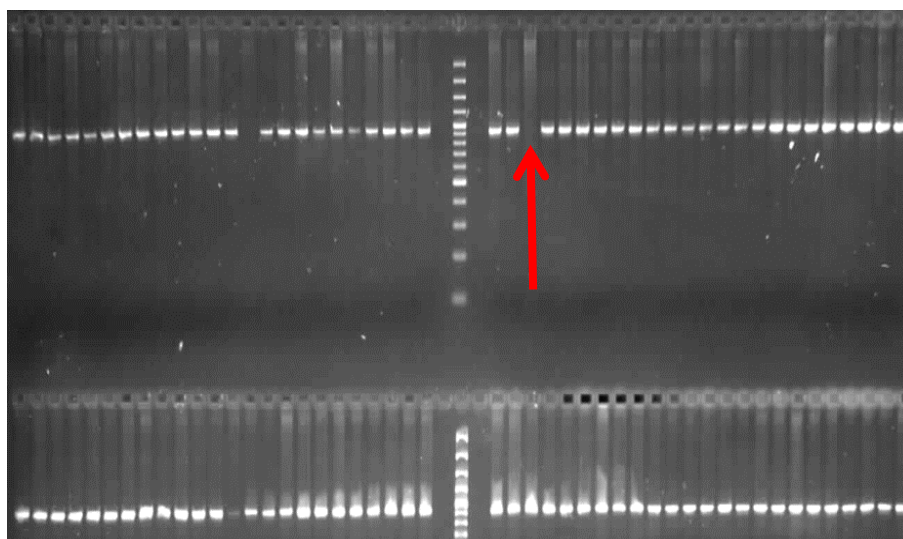
Tabela 5. Liczba roślin z różnymi cytoplazmami w badanych odmianach żyta ozimego

Odmiana	Rodzaj cytoplazmy			Suma
	N	V	P	
D. Diament	1	-	95	96
Bosmo	41	54	-	95
Amilo	33	63	-	96
Stanko	22	10	26	58
Svalofs St 52404	94	-	-	94
Landsorte K9538	95	-	-	95
Vjatka	44	17	-	61
St. Wageningen	13	83	-	96
Hungarian Giant	36	60	-	96

cox1



nad6



Rys.9. Identyfikacja cytoplazm w odmianie populacyjnej D. Diament, za pomocą markerów mitochondrialnych typu SCAR (cox1 i nad6).

3.2. Ocena 4 polskich odmian populacyjnych żyta ozimego pod kątem zdolności do przywracania męskiej płodności w systemach CMS-C i CMS-P

W roku 2015 oceniono męską płodność u 917 pojedynczych roślin mieszańcowych żyta ozimego, natomiast w 2016 roku ocenie poddano 695 roślin. Badane rośliny mieszańcowe zostały otrzymane w rezultacie zapylenia męskosterylnych wersji linii 541 z cytoplazmami C i P pyłkiem pochodzącym z polskich populacji żyta (Dańkowskie Amber, Armand, Dańkowskie Diament i Horyzo). Liczebności roślin poddanych ocenie dla konkretnych kombinacji w poszczególnych latach były mocno zróżnicowane (Tabela 6), co zależało od dostępności nasion oraz przeżywalności roślin w czasie zimy. Najmniej roślin oceniono dla mieszańca 541C x Horyzo w roku 2016 – było to zaledwie 7 pojedynków. W większości przypadków (11 na 16 ujętych w tabeli 6) liczba ocenionych roślin była większa niż 100. Najliczniej reprezentowana w badaniach była kombinacja mieszańca 541P x Horyzo oceniana w 2015 roku – liczyła 169 roślin.

Tabela 6. Płodność mieszańców między męskosterylnymi źródłami cytoplazm CMS-C i CMS-P, a polskimi populacjami żyta ozimego.

Populacja źródło pyłku	CMS	Rok oceny	Liczby roślin zakwalifikowanych do klas fenotypowych opartych o 9-stopniową skalę bonitacyjną Geigera i Morgensterna									Ogółem
			Męskosterylne			Częściowo płodne			Męskopłodne			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
D. Amber	C	2015	0	1	15	11	4	7	5	9	75	127
		2016	0	0	42	12	8	6	5	8	65	146
	P	2015	1	4	29	12	9	6	4	6	14	85
		2016	0	4	62	14	9	6	2	4	17	118
Armand	C	2015	0	0	12	2	1	4	3	7	74	103
		2016	0	0	29	6	4	2	2	1	68	112
	P	2015	7	19	66	9	4	9	2	2	4	122
		2016	2	3	11	0	1	0	1	2	0	20
D. Diament	C	2015	0	0	16	3	8	8	12	11	64	122
		2016	0	0	21	4	1	2	1	0	16	45
	P	2015	2	8	52	16	13	6	4	6	17	124
		2016	0	7	72	13	4	4	3	2	21	126
Horyzo	C	2015	0	1	6	3	4	6	4	2	39	65
		2016	0	0	3	0	0	0	0	0	4	7
	P	2015	5	16	132	7	6	2	0	1	0	169
		2016	0	76	45	0	0	0	0	0	0	121

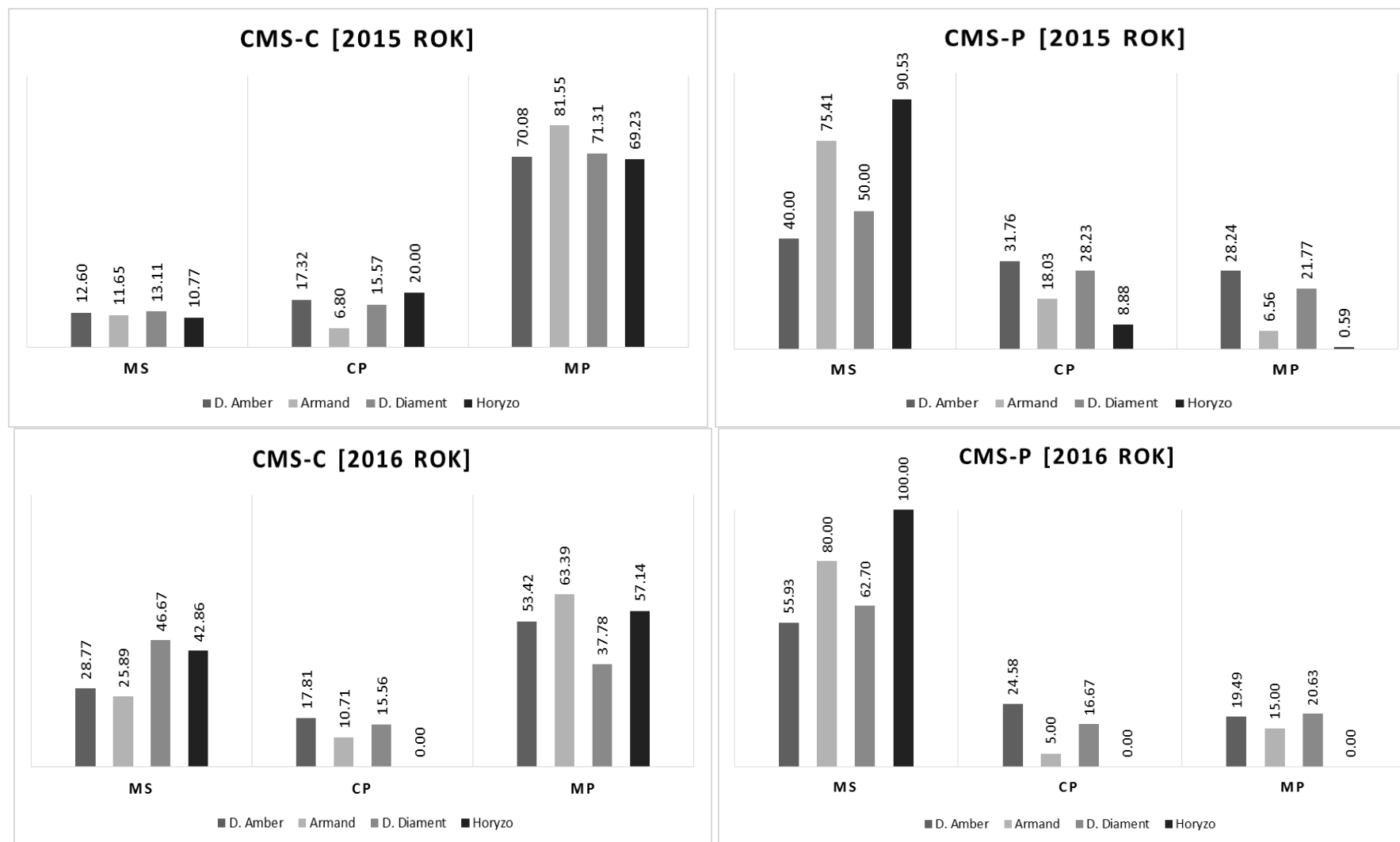
Łącznie przebadanych osobników charakteryzujących się cytoplazmą sterylizującą C (CMS-C) było 727 (w 2015 roku 417; w 2016 roku 310). Oceniono także 885 pojedynków (w 2015 roku 500; w 2016 roku 385) z cytoplazmą sterylizującą typu Pampa (CMS-P). W obrębie analizowanych mieszańców między liniami męskosterylnymi zawierającymi oba rodzaje CMS, a populacjami żyta, najliczniej reprezentowane były rośliny zaliczone do klas fenotypowych: 9 – rośliny w pełni męskopłodne, bardzo silnie pyłące oraz 3 – rośliny męskosterylne, ale o stosunkowo słabych objawach męskiej sterylności. Rośliny wykazujące

objawy bardzo głębokiej sterylności (zaliczane do klasy 1 w oparciu o 9-stopniową skalę bonitacyjną Geigera i Morgensterna) nie występowały, gdy obecna była cytoplazma C, natomiast w obecności cytoplazmy typu Pampa zidentyfikowano 17 takich roślin. Rośliny o najsilniejszych objawach płodności identyfikowane były znacznie częściej (około 5 razy częściej) w mieszańcach, które charakteryzowały się cytoplazmą C (Tabela 7).

Tabela 7. Liczebność roślin mieszańcowych powstałych w wyniku krzyżowań polskich populacji żyta ozimego z źródłami cytoplazmy sterylizującej C oraz P w latach 2015-2016.

Rośliny mieszańcowe z CMS	Liczba roślin oceniona za pomocą 9-stopniowej skali bonitacyjnej									Ogółem
	Męskosterylne			Częściowo płodne			Męskopłodne			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
2015										
Rośliny mieszańcowe z CMS-C	0	2	49	19	17	25	24	29	252	417
Rośliny mieszańcowe z CMS-P	15	47	279	44	32	23	10	15	35	500
2016										
Rośliny mieszańcowe z CMS-C	0	0	95	22	13	10	8	9	153	310
Rośliny mieszańcowe z CMS-P	2	90	190	27	14	10	6	8	38	385

Różnice występujące między źródłami CMS stają się lepiej widoczne, kiedy przyjrzymy się trzem głównym kategoriom fenotypowym (rośliny męskosterylne - MS, częściowo płodne - CP i męskopłodne- MP) porównując ich procentową frekwencję w poszczególnych kombinacjach mieszańcowych (zróznicowana liczebność osobników badanych w każdej kombinacji oraz podział na 9 klas fenotypowych wg skali Geigera i Morgensterna mogą utrudniać widoczność głównych trendów). Przywracanie płodności przez polskie populacje żyta ozimego u mieszańców było efektywniejsze, kiedy charakteryzowały się one cytoplazmą CMS-C. Rośliny męskopłodne stanowiły od 50% do 80% w mieszańcach badanych populacji. Wyjątek stanowiły ocenione w 2016 roku mieszańce pochodzące z krzyżowania odmiany Dańkowskie Diament z linią 541C, u których udział genotypów określonych, jako męskopłodne wynosił niespełna 38%. Porównując wyniki roślin mieszańcowych z cytoplazmą C otrzymane w latach 2015 i 2016 zaobserwowano znaczne rozbieżności. Najprawdopodobniej wynikają one z różnic w warunkach środowiskowych panujących w tych sezonach wegetacyjnych. W przypadku mieszańców z cytoplazmą CMS-P dominowały formy męskosterylne, które w większości badanych roślin mieszańcowych stanowiły od 40 do nawet 100% genotypów. Odmiany Dańkowskie Diament i Dańkowskie Amber zarówno w latach 2015, jak i 2016 charakteryzowały się większą liczbą męskopłodnych mieszańców z CMS-P w porównaniu z odmianami Horyzo i Armand. W obu latach mieszańce z odmianą Horyzo charakteryzowały się znikomym udziałem roślin męskopłodnych z cytoplazmą Pampa (Rys.10).



Rys.10. Procentowy udział roślin zakwalifikowanych do trzech kategorii fenotypowych (MS – męskosterylnie; CP – częściowo męskopłodne; MP – męskopłodne) w mieszańcach pochodzących z zapylenia dwóch wersji cytoplazmatycznych linii 541 (z CMS-C i CMS-P) pyłkiem pochodzącym z czterech polskich odmian populacyjnych żyta ozimego w latach 2015 i 2016.

3.3. Ocena 3 historycznych europejskich odmian populacyjnych żyta ozimego pod kątem zdolności do przywracania męskiej płodności w systemach CMS-C i CMS-P

W roku 2017 oceniono męską płodność 467 roślin mieszańcowych pochodzących z zapylenia męskosterylnych wersji linii 541 z cytoplazmami C i P pyłkiem pochodzącym z historycznych europejskich populacji żyta ozimego (Vjatka, Hungarian Giant i Landsorte K9538). Natomiast w 2018 roku liczba badanych osobników mieszańcowych wyniosła 340. Mieszańce z udziałem wszystkich trzech w/w odmian populacyjnych z linią 541 zawierającą cytoplazmę Pampa w przeważającej części zawierały rośliny męskosterylne (oceny 2 i 3 w skali Geigera i Morgensterna). Dotyczyło to zarówno roślin badanych w 2017, jak i w 2018 roku. Wyniki oceny męskiej płodności w obrębie mieszańców z cytoplazmą CMS-C były zróżnicowane w zależności od źródła pyłku. Mieszańce linii 541C z odmianami Vjatka i Hungarian Giant w większości były silnie męskopłodne (ocena 9 w skali Geigera i Morgensterna). Mieszańce linii z CMS-C z odmianą Landsorte K9538 w obu latach badań charakteryzowały się obecnością roślin męskopłodnych i męskosterylnych w mniej więcej podobnych proporcjach (Rys.11). Dodatkowo, wśród roślin poddanych ocenie w roku 2017, mieszańce z Landsorte K9538 z cytoplazmą C zawierały względnie dużą liczbę roślin częściowo płodnych (4 w skali Geigera i Morgensterna) (Tabela 8).

Tabela 8. Płodność mieszańców między męskosterylnymi źródłami cytoplazm CMS-C i CMS-P, a historycznymi europejskimi populacjami żyta ozimego

Populacja źródło pyłku	CMS	Rok oceny	Liczby roślin zakwalifikowanych do klas fenotypowych opartych o 9-stopniową skalę bonitacyjną Geigera i Morgensterna									Ogółem
			Męskosterylne			Częściowo płodne			Męskopłodne			
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	
Vjatka	C	2017	0	1	11	1	3	2	2	1	45	66
		2018	0	1	8	0	0	0	1	3	25	38
	P	2017	1	18	53	5	1	0	0	1	1	80
		2018	0	24	27	0	2	0	0	1	1	55
Hungarian Giant	C	2017	0	0	4	3	1	1	1	3	62	75
		2018	0	1	3	0	0	0	0	3	48	55
	P	2017	1	14	50	8	3	0	0	0	0	76
		2018	0	36	52	1	1	1	2	0	0	93
Landsorte K9538	C	2017	0	2	31	16	3	3	6	8	23	92
		2018	0	5	16	3	5	2	3	5	14	53
	P	2017	3	24	48	2	0	0	0	0	1	78
		2018	0	22	24	0	0	0	0	0	0	46

Łącznie oceniono pod względem fenotypowym 379 pojedynków (233 w 2017 roku i 146 w 2018 roku) zawierających cytoplazmę sterylizującą CMS-C oraz 428 pojedynków (234 w 2017 roku i 194 w 2018 roku) z cytoplazmą sterylizującą CMS-P. Najliczniej reprezentowane były rośliny zaliczone do klas fenotypowych: 9 – rośliny w pełni męskopłodne, bardzo silnie pyłące oraz 3 – rośliny męskosterylne, ale o stosunkowo słabych objawach męskiej niepłodności. Rośliny wykazujące objawy bardzo głębokiej sterylności (zaliczane do klasy 1 w skali Geigera i Morgensterna) nie występowały, gdy obecna była cytoplazma CMS-C, natomiast zidentyfikowano 5 takich roślin z cytoplazmą typu Pampa. Mieszańce z cytoplazmą CMS-P, charakteryzowały się bardzo dużym udziałem roślin męskosterylnych (Tabela 9).

Tabela 9. Liczebność roślin mieszańcowych powstałych w wyniku krzyżowań historycznych europejskich populacji żyta ozimego z źródłami cytoplazmy sterylizującej C oraz P w latach 2017-2018.

Rośliny mieszańcowe z CMS	Liczba roślin oceniona za pomocą 9-stopniowej skali bonitacyjnej									Ogółem
	Męskosterylne			Częściowo płodne			Męskopłodne			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	
2017										
Rośliny mieszańcowe z CMS-C	0	3	46	20	7	6	9	12	130	233
Rośliny mieszańcowe z CMS-P	5	56	151	15	4	0	0	1	2	234
2018										
Rośliny mieszańcowe z CMS-C	0	7	27	3	5	2	4	11	87	146
Rośliny mieszańcowe z CMS-P	0	82	103	1	3	1	2	1	1	194

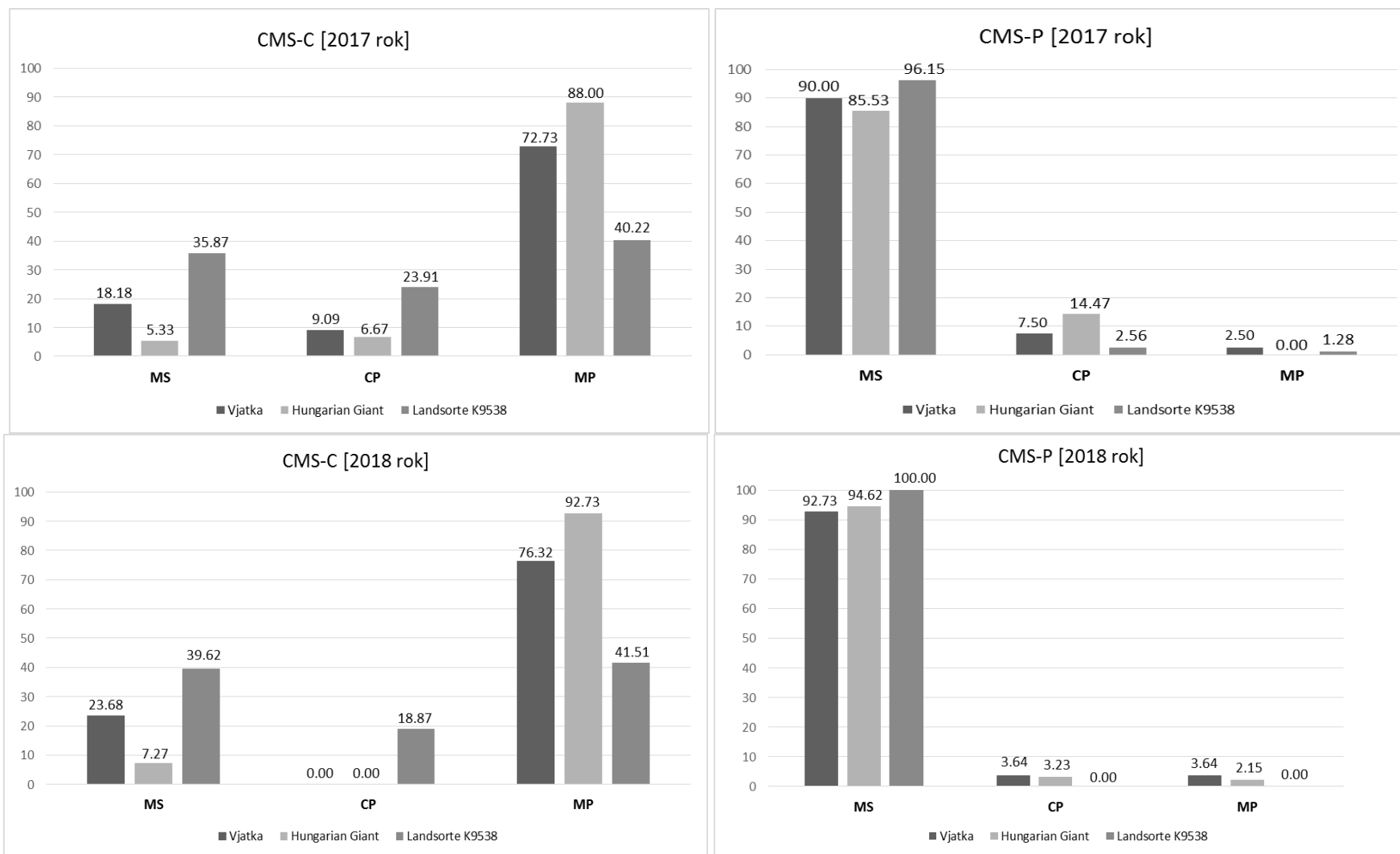
Udział roślin męskosterylnych w trzech kombinacjach mieszańcowych z cytoplazmą Pampa mieścił się w granicach od około 85% do 100%. Frekwencja roślin męskopłodnych u mieszańców z cytoplazmą Pampa była na bardzo niskim poziomie – od 0 do 3,64%. Krzyżowania linii 541P ze wszystkimi trzema badanymi populacjami dawały bardzo podobne rozkłady fenotypowe w obu latach badań. Najważniejsza różnica między sezonami wegetacyjnymi polegała na nieznacznie większym udziale roślin częściowo płodnych i nieco mniejszym w pełni sterylnych w roku 2017 w porównaniu do roku 2018. Dwa mieszańce z cytoplazmą C, w których źródłem pyłku były odmiany Vjatka i Hungarian Giant, charakteryzowały się dominującym udziałem roślin męskopłodnych. Wyraźnie odrębny wynik uzyskano przy ocenie mieszańców z udziałem trzeciej badanej odmiany: udział roślin męskopłodnych w mieszańcach linii 541C z jugosłowiańską populacją Landsorte K9538 wynosił zaledwie około 40%. W przypadku tego mieszańca grupa roślin męskopłodnych wciąż była najliczniejsza wśród trzech klas fenotypowych (MS, CP i MP), ale stanowiła mniej niż połowę ocenionych roślin. Frekwencja roślin męskopłodnych w mieszańcach z odmianą Vjatka w obu latach badań przekraczała 70% przy udziale roślin męskosterylnych w

granicach 18-24%. Najmniejsza frekwencja genotypów dopełniających dla systemu CMS-C została stwierdzona w odmianie Hungarian Giant przy jednoczesnej obecności licznych genotypów skutecznie przywracających męską płodność. Od 88% do prawie 93 % roślin mieszańcowych z tą populacją w roli komponentu ojcowskiego (w zależności od roku badań) stanowiły formy silnie pyłące (Rys.11).

3.4. Podsumowanie oceny populacji żyta pod kątem ich zdolności do przywracania męskiej płodności żyta z CMS-C i CMS-P

Trzy historyczne odmiany populacyjne żyta ozimego objęte badaniami charakteryzowały się znacznie większą frekwencją genotypów dopełniających męską sterylność w systemie CMS-P w porównaniu do czterech odmian uprawnych z polskiej hodowli. Wśród badanych czterech polskich odmian zaobserwowano duże zróżnicowanie pod względem zdolności do przywracania męskiej płodności żyta z cytoplazmą Pampa. To zróżnicowanie jest szczególnie widoczne dla mieszańców z odmianami Dańkowskie Amber i Dańkowskie Diament w porównaniu do pozostałych dwóch odmian. Odmiany zarejestrowane współcześnie przez spółkę DANKO Hodowla Roślin S.A. charakteryzowały się w obu latach badań wyraźnie mniejszą frekwencją osobników dopełniających męską sterylność, a większą genotypów przywracających płodność (częściowo lub w pełni) w porównaniu do odmian z alternatywnych hodowli (odmiany Horyzo i Armand).

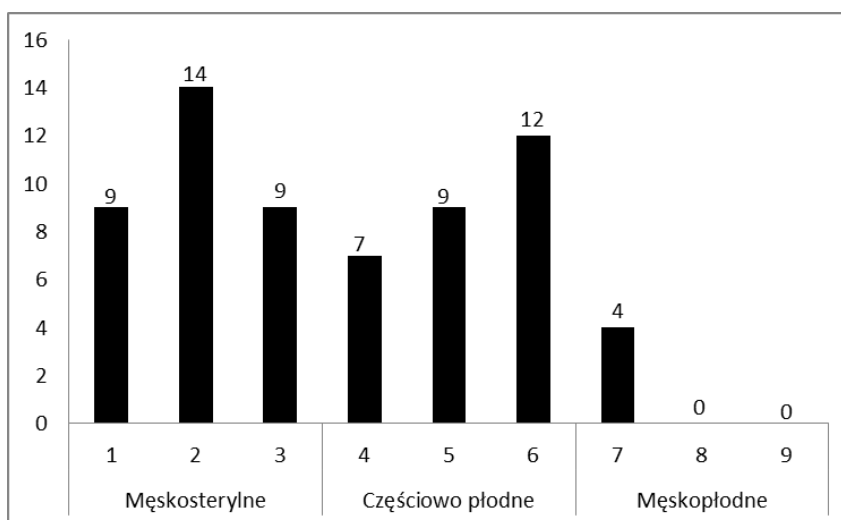
Mieszańce z cytoplazmą C, w których komponentami ojcowskimi były rośliny pochodzące zarówno z historycznych europejskich jak i współczesnych polskich odmian, charakteryzowały się znacznym udziałem pojedynków męskopłodnych (Rys.10; 11). Wyjątek stanowiła populacja Landsorte K9538. Mieszańce z jej udziałem w roli zapylacza zawierały w obu latach badań zbliżone liczebności roślin męskosterylnych i męskopłodnych (Tabela 8), co świadczy, że w jej składzie poza genotypami przywracającymi męską płodność w CMS-C, obecne są również liczne formy dopełniające męską sterylność.



Rys.11. Procentowy udział roślin zakwalifikowanych do trzech kategorii fenotypowych (MS – męskosterylne; CP – częściowo męskopłodne; MP – męskopłodne) w mieszańcach pochodzących z zapylenia dwóch wersji cytoplazmatycznych linii 541 (z CMS-C i CMS-P) pyłkiem pochodzącym z trzech europejskich historycznych odmian populacyjnych żyta ozimego w latach 2017 i 2018.

3.5. Wyniki oceny fenotypowej męskiej płodności w kolejnych pokoleniach otrzymanych w obrębie populacji mieszańcowej [544C x MOt]BC_x

Cykl krzyżowań wstecznych, w wyniku, których uzyskano kolejne pokolenia populacji mapującej [544C x MOt] zainicjowano w 2012 roku. Pyłek z opisanych w Materiale i metodach 4 roślin mieszańca F₂: MOt10, MOt19, MOt23 i MOt58 użyto do zapylania męskosterylnej linii matecznej 544C. Otrzymane pokolenie mieszańców wstecznych oznaczono, jako BC₁, chociaż pierwszy cykl krzyżowania z linią rodzicielską wykonano z użyciem roślin mieszańca F₂, a nie F₁ (co jest standardem przy krzyżowaniach wstecznych). Użyte do krzyżowań 4 rośliny pokolenia F₂ były wstępnie ocenione przy pomocy markerów molekularnych (por. Materiały i metody). Zgodnie z wynikami tych analiz nie powinny posiadać głównego genu restorerowego *Rfc1*, a mimo to były zdolne do intensywnej produkcji pyłku. Otrzymane mieszańce pokolenia BC₁ liczyły 64 osobniki, które segregowały pod względem męskiej sterility/płodności. Połowa roślin została oceniona w skali Geigera i Morgensterna na stopnie od 1 do 3 (czyli rośliny męskosterylne o różnym poziomie ekspresji tej cechy), a kolejne 32 rośliny zostały zakwalifikowane do klas od 4 do 7 (częściowo płodnych i męskopłodnych) (Rys.12).



Rys.12. Liczba roślin zakwalifikowanych do 9 klas wg Geigera i Morgensterna w populacji mapującej [544C x MOt]BC₁ w 2013 roku.

W następnych dwóch latach kontynuowano zapylanie linii męskosterylnej 544C pyłkiem najbardziej męskopłodnych roślin wybranych z kolejnych segregujących pokoleń krzyżowań wstecznych. Pozwoliło to na uzyskanie populacji [544C x MOt]BC₃.

W 2015 roku 9 roślin z pokolenia [544C x MOt]BC₃ o najwyższym poziomie męskiej płodności zostało poddanych samozapyleniu celem uzyskania populacji BC₃F₂. Otrzymane w

ten sposób 178 ziaren wysiano w szklarni do ogrodniczych multidonic, a następnie po kilkunastu dniach 148 uzyskanych siewek wysadzono na polu doświadczalnym Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Ze względu na słabą żywotność roślin skutkującą dużą ilością strat, tylko 102 osobniki zostały poddane ocenie wzrokowej w 9-stopniowej skali bonitacyjnej (Geiger i Morgenstern 1975) oraz ocenie stopnia zawiązywania ziaren w izolowanych kłosach w roku 2016. Uzyskane rośliny mieszańca [544C x MOt]BC3F2 w ani jednym przypadku nie były w pełni męskopłodne. W sumie 38 osobników wykazało męską sterylność (oceny od 1 do 3 w skali Geigera i Morgensterna). Pozostałe 64 rośliny określono jako częściowo płodne (tzn. 4-6 w skali Geigera i Morgensterna), ale tylko jeden osobnik uzyskał ocenę najwyższą równą 6 (Tabela 10).

W 2016 roku pyłące rośliny populacji mieszańcowej [544C x MOt]BC3F2 poddano samozapyleniu w celu uzyskania pokolenia F3. Na polu doświadczalnym Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie wysiano 182 nasiona z pokolenia [544C x MOt]BC3F3. Dodatkowo, ze względu na duży odsetek strat roślin należących do pokolenia [544C x MOt]BC3F2 odnotowany w poprzednim sezonie wegetacyjnym (Tabela Z12), w styczniu 2017 wysiano do wiader w szklarni Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie dodatkowe 201 ziaren tej populacji z partii rezerw. Głęboka depresja wsobna, warunki środowiskowe, choroby oraz inne czynniki prawdopodobnie przyczyniły się do tego, iż na polu doświadczalnym nie wykiełkowało aż 141 nasion (co stanowiło około 77% wysianych materiałów). Straty genotypów w doświadczeniu prowadzonym w szklarni były mniejsze, ale i tak zaobserwowano 38% wypadów (77 nasion nie wykiełkowało). Z tego powodu ocenie fenotypowej poddano zaledwie 41 pojedynków rosnących na polu doświadczalnym i 124 osobniki w szklarni. Rośliny charakteryzujące się pełną męską płodnością, oceniane na 7-9 w skali Geigera i Morgensterna, nie wystąpiły ani w populacji mieszańcowej [544C x MOt]BC3F3 rosnącej na polu doświadczalnym ani w populacji mieszańcowej [544C x MOt]BC3F2 w szklarni. W obu populacjach mieszańcowych występowały wyłącznie pojedynki zaliczane do kategorii roślin męskosterylnych i częściowo płodnych (Tabela 10).

W 2017 roku samozapyleniu poddano męskopłodne rośliny z obu badanych pokoleń populacji mieszańcowej: [544C x MOt]BC3F2 oraz [544C x MOt]BC3F3. Otrzymane nasiona [544C x MOt]BC3F3 oraz [544C x MOt]BC3F4 zostały wysiane jesienią 2017 do multidonic, a następnie wysadzone na polu doświadczalnym Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. W obrębie populacji [544C x MOt]BC3F3

wysadzono 186 roślin, ale ocenie fenotypowej wiosną 2018 roku poddano tylko 64 osobniki (pozostałe nie przetrwały do czasu kwitnienia). Z kolei z populacji [544C x MOt]BC3F4 wysadzono 163 pojedynków, z których ocenie poddano tylko 40 roślin mieszańcowych. Większość roślin utracono w czasie jesienno-zimowym ze względu na ich słabą żywotność i brak odporności na niekorzystne czynniki środowiska. W obu ocenionych populacjach wystąpiła niewielka liczba osobników, które w skali Geigera i Morgensterna zaliczane są do form w pełni męskopłodnych i całkowicie męskosterylnych. Najliczniejszą grupę w obu otrzymanych populacjach mieszańcowych stanowiły rośliny częściowo płodne (4-6 w skali Geigera i Morgensterna) (Tabela 10).

Z populacji mapujących [544C x MOt]BC3F3 i [544C x MOt]BC3F4 badanych w sezonie wegetacyjnym 2017/18 pobrano liście w celu wyizolowania DNA, do przeprowadzenia analiz z użyciem technologii DArTseq.

W 2018 roku poddano samozapyleniu pojedyncze rośliny męskopłodne z populacji mieszańcowych [544C x MOt]BC3F3 i [544C x MOt]BC3F4 celem uzyskania kolejnych pokoleń: BC3F4 i BC3F5. Z uwagi na zaobserwowaną w poprzednich sezonach wegetacyjnych słabą żywotność badanych roślin (Tabela Z12) zdecydowano się na przeprowadzenie oceny fenotypowej w szklarni (zrezygnowano z badań w otwartym polu). Zakładano, że przy bardziej stabilnych warunkach zewnętrznych łatwiej będzie utrzymać rośliny charakteryzujące się słabą żywotnością. Ocenie fenotypowej opartej na liczbie zawiązaných ziaren w izolowanych kłosach, poddano łącznie 259 roślin z otrzymanej populacji mieszańcowej [544C x MOt]BC3F4 oraz 199 roślin z otrzymanej populacji mieszańcowej [544C x MOt]BC3F5. Względnie liczną grupę stanowiły rośliny męskosterylne, które nie zawiązały ziaren w izolowanych kłosach. W populacjach [544C x MOt]BC3F4 i [544C x MOt]BC3F5 ich liczba stanowiła odpowiednio 114 i 53. Najliczniejsze były fenotypy, które w obu badanych populacjach mapujących oceniono, jako częściowo płodne. Zaliczono do nich rośliny, które zawiązały w wyniku samozapylenia mniej niż 20 ziaren w kłosie. Roślin męskopłodnych, u których liczba ziaren w zaizolowanych kłosach wynosiła co najmniej 20, było niewiele zarówno w populacji [544C x MOt]BC3F4, jak i [544C x MOt]BC3F5 (Tabela 11).

Tabela 10. Płodność roślin w kolejnych pokoleniach (od F2 do F4) populacji mapującej [544C x MOt]BC3.

Miejsce siewu	Rok	Pokolenie	Populacja	Liczby roślin zakwalifikowanych do klas fenotypowych opartych o 9-stopniową skalę bonitacyjną Geigera i Morgensterna									Ogólna liczba ocenionych roślin	Wsp. Korelacji
				Męskosterylne			Częściowo płodne			Męskopłodne				
				1	2	3	4	5	6	7	8	9		
pole	2016	BC3F2	544C x MOt10	8	4	7	8	2	0	0	0	0	29	0,52
			544C x MOt19	1	1	4	13	14	0	0	0	0	33	
			544C x MOt23	2	11	0	16	10	1	0	0	0	40	
pole	2017	BC3F3	544C x MOt10	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0,56
			544C x MOt19	2	0	0	4	12	0	0	0	0	18	
			544C x MOt23	3	0	1	9	8	1	0	0	0	22	
szklarnia		BC3F2	544C x MOt19	1	0	4	5	0	0	0	0	0	10	0,61
			544C x MOt23	16	8	25	60	5	0	0	0	0	114	
pole	2018	BC3F3	544C x MOt19	4	3	2	10	7	5	1	0	0	32	0,66
			544C x MOt23	1	1	0	6	18	5	1	0	0	32	
		BC3F4	544C x MOt19	0	0	0	1	1	1	1	4	0	8	0,60
			544C x MOt23	3	3	0	5	15	4	1	1	0	32	

Tabela 11. Liczebności roślin populacji mieszańcowych [544C x MOt]BC3F4 i [544C x MOt]BC3F5 badanych w 2019 roku z uwzględnieniem wyników oceny fenotypowej męskiej płodności opartej o liczby ziaren w zaizolowanych kłosach

Miejsce siewu	Rok	Pokolenie	Populacja	Liczba ziaren w zaizolowanych kłosach						Ogółem
				0	1-9	10-19	20-29	30-39	≥40	
szklarnia	2019	BC3F4	544C x MOt19 roślina1	36	47	2	0	0	0	85
			544C x MOt19 roślina2	22	22	0	0	0	0	44
			544C x MOt19 roślina3	27	10	7	2	1	0	47
			544C x MOt23 roślina4	25	31	3	0	0	0	59
			544C x MOt23 roślina5	4	16	4	0	0	0	24
		BC3F5	544C x MOt19 roślina1	27	44	4	0	0	0	75
			544C x MOt23 roślina2	2	1	0	0	0	0	3
			544C x MOt23 roślina3	2	0	0	0	0	0	2
			544C x MOt23 roślina4	9	21	11	2	0	1	44
			544C x MOt23 roślina5	13	47	11	3	1	0	75

3.6. Identyfikacja pobocznych genów restorerowych z wykorzystaniem markerów molekularnych

W celu zlokalizowania restorerowego genu (lub większej liczby genów) w populacji mapującej [544C x MOt]BC1 przetestowano 274 markery molekularne. W przeważającej liczbie były to markery typu COS (ang. *conserved ortholog set*) zlokalizowane na wszystkich 7 chromosomach żyta (Tabela Z1). Większość użytych markerów została opracowana przez B. Hackaufa (34 markery pochodziły z pracy Hackauf i in. (2017), a kolejne 194 markery nie były wcześniej opublikowane i zostały grzecznościowo udostępnione do badań przez autora). Trzy markery molekularne SCAR (d508318F6R249, MtrA22, SCSz23L500) użyte w tych badaniach zostały opracowane w KGHIBR ZUT (Tabela Z1). Pozostałe 43 markery COS zostały zaprojektowane *de novo* w ramach niniejszej pracy doktorskiej. Nowe markery zostały zaprojektowane do sekwencji DNA charakterystycznych dla chromosomów 2R i 3R (Tabela 12), co wynikało z niezadowalającej liczby dostępnych markerów molekularnych dla tych dwóch chromosomów.

Tabela 12. Markery COS zaprojektowane w celu realizacji badań w obrębie populacji mapującej [544C x MOt]BC1.

Chromosom	Marker	Starter F	Starter R	Długość produktu [pz]
2R	c282	AGACGGCCTTGCAATGTTTT	GACATCGAACAGCCTCTTGG	566
2R	c614	GAGACCCCTGTGTTGACCA	GCTAAGCTATCAACCATCACAAG	946
2R	c442	CTATGAGGAGTATGCACGGC	GTAAGCGGTCCGTCCTTCT	466
2R	c431_1	GATGGCTGATATCACGGAACA	TTCTTTGGTTGGTTGCATGAAA	818
2R	c431_2	GCAAGATGGCTGATACACGG	GGTTGCCTCCGTTTGTATAGG	776
2R	c1332	GCTGAGAATGTCCGTGTCAAAT	AGTAACTGGAAGGATCAGGTAAC	848
2R	c2609	GCAGTTGGGAAGCTAAGAGG	TCAGCCAAACCTCCAACAGA	957
2R	c738	GGGACAGGAAGGCTTGAAT	GCTTTCGTCTCGCTGGATG	643
2R	c3339	CACTGCCACAAGTGCCATTA	TAACCCCAAAACGCCCAGAT	981
2R	c474	GGACTGAGCAAATCCAATGGT	TGACAGCACTAGAAGAAATCCAC	989
2R	c921	ATATCTCCCGCTGACAAGGC	CGAGCAAGGGAGAGCCTATT	688
2R	c127	CTAGCCAACAAGTTCCTCTACT	TGTGAAGCTCCAGATCTTG	850
2R	c983	TGCTCGACTCTGACAACATG	CCGGGAAATAGCTAGCAAGG	850
2R	c998	TAACGCAACTTACCGCCATG	GCAGAGGGAGTGGAACCAAT	392
2R	GRM	TCTAAAGGTGCAAGTCAGGGA	GGTTCTCCGTCAAGTATTGTTTC	597
2R	c870	CACCTGGCCTTGCGTTTG	CTCCCTCTTGTCACCCTTCA	471
2R	c800	TGGGGTCCAACGTCAAGTAC	TGCGAATGGTTGCTTGTAGT	905
2R	c1249	CAACCTTCCTTTCTCATTTGGAT	AGTAGCTGGGTTCTTCTTTCC	500
2R	c1560	TGCTAGATGAAAGAAACCTGCTG	CCTCAAAGCAGCTACTCGATTA	239
2R	c115	ATGCTGCTGGAGAATGGGTA	AGTCCTTGAGATGCGAGTTCT	211

2R	c892	GCAAGAGGACAACCTGCACAT	GTCCACACAAGCCGCATG	683
3R	c3934	TGGTTTCCATGATGCAGATCG	CTGACCTGCCAGTTTCTCCA	700
3R	c2193	TGAACCAACCTTTGAGCAGC	GTTTCTGAATTTCTCCGAGA	569
3R	c991	TGTGACATGCGGTGAAGATT	AGCTCTCAATCTTGTCTCCA	979
3R	c625	CAAACCTCCAAAAGCCCAGGT	TAGCACCTCTGGCTTCCTTC	490
3R	c308	AAGCTTGTTTTCTGGGAGTCT	AGAATTTGGCGTATGGTTCCAG	395
3R	c549	GAAGGTCTCCGTCGTGTCC	CTGCAGATCCGCGACCTT	266
3R	c825	ATGCAGCCTGGAATACGTTG	GTCCCAGATTGAGAGGAGCA	987
3R	c761	CTTGCGCCAGATGTCAAACCT	TCCCCATTCTCTCTGGCAC	919
3R	c578	GTCATAGTTATTTCTGGACCTGC	GGGATCTTGTCTTTGCTCAACA	989
3R	c1464	AGTTGATGCGGTTTCTTAGA	AGAACGTACCACCCCTTCAAT	443
3R	c1992	AAAGCACAAGTTCCGCCTG	GGGATGATTCGAGATAGTGGC	661
3R	c1361	TCTGATGATCTGGCCTTTGC	AGCTCTTCTCTTCGTCGTC	698
3R	c1473	TGAAGAAATCTGGAAAGTGGGA	TGAGACAAACAATGGACCGG	597
3R	c344	GCTACTGAGTGTTGGCATCG	CCACCTGCTTTCTCAACTGG	831
3R	c849	TCAAGGGTAGAAGCTGGAAGA	ACCTTTTGCCATCGATGCAA	700
3R	c1115	TTCAGGGAATAAACCAGGCG	AATGGGAGAGACAAGTGCTG	393
3R	c1710	CCTGACACAACTAAGCAAGC	TGAAGGATGACTCAGCTCGT	590
3R	c762	ATTTGTGGTGCCAGTTCTG	TTCTCCACCAAACCAAGAAAATC	781
3R	c651	TCTGCCAGAATGAAAGGAGAATA	ATTTGCATGTCCCGGTCTTC	554
3R	c298	GGACGAGGACCAACTTGAATC	TGACAACGGATGACACCTTC	496
3R	c1189	TGGCACCATCTACCCTATCAC	GCTCACAGGCATATGGTTCTC	359
3R	c1616	CTGTGGAGGATGGAGGACTC	GGAGGCGAGGACCTGAAG	545

3.6.1. Poszukiwanie polimorfizmu genetycznego w obrębie linii rodzicielskich przy pomocy markerów PCR

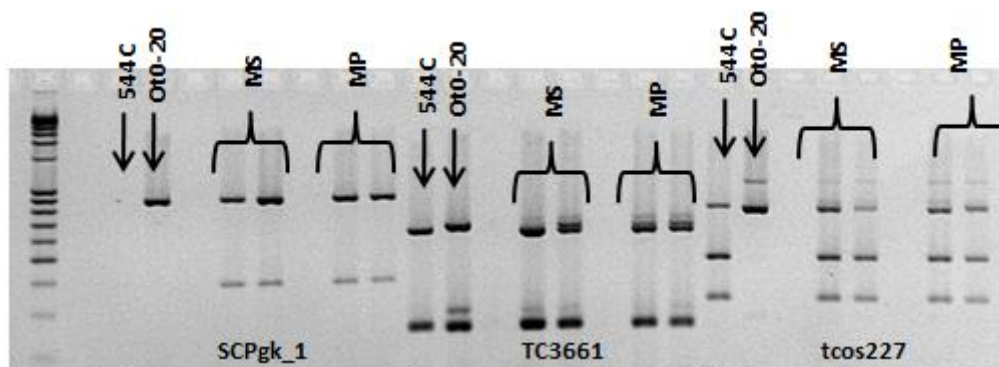
Poszukiwanie markerów ujawniających polimorfizm genetyczny między liniami 544C i Ot0-20, których mieszańiec dał początek populacji mapującej [544C x MOt]BC1, stanowiło pierwszy etap badań zmierzających do zmapowania pobocznego genu (lub genów) o charakterze restorerowym dla żyta z CMS-C. Użyto tutaj wszystkich dostępnych markerów opartych o metodę PCR: 271 markerów COS oraz 3 SCAR. Charakter monomorficzny wykazały 74 markery molekularne (13 z nich to markery COS zaprojektowane w czasie realizacji tej pracy). W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano 128 markerów molekularnych ujawniających polimorfizm (13 z nich stanowiły markery zaprojektowane specjalnie na cele niniejszej pracy). Wśród nich 86 wykazywało charakter kodominujący, a 42 dominujący (w tym markery SCAR). W przypadku użycia pozostałych 72 testowanych par starterów nie uzyskano produktów amplifikacji. Do tej grupy należało 17 markerów COS opracowanych *de novo* na potrzeby niniejszych badań. Spośród przetestowanych markerów najwięcej było dedykowanych do chromosomu 4R (77 markerów COS i 3 SCAR), a najmniej do chromosomu 7R (11 markerów COS) (Tabela 13).

Tabela 13. Liczebności przetestowanych markerów PCR według ich lokalizacji na 7 chromosomach żyta.

Markery	CHROMOSOMY							Chromosomy 1R-7R razem
	1	2	3	4	5	6	7	
Monomorficzne	19	9	16	8	14	4	4	74
Polimorficzne	19	6	16	66	10	9	2	128
Kodominujące	15	1	9	42	9	9	1	86
Dominujące	4	5	7	24	1	0	1	42
Nieamplifikujące	19	15	11	6	11	5	5	72
Ogółem	57	30	43	80	35	18	11	274

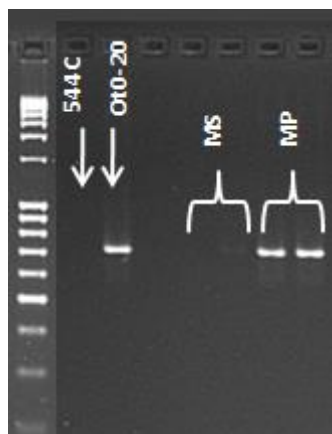
3.6.2. Analizy z wykorzystaniem prób zbiorczych

Drugim etapem badań było użycie 128 wspomnianych powyżej polimorficznych markerów (125 COS i 3 SCAR) do poszukiwania różnic genetycznych pomiędzy próbkami zbiorczymi. Jak zasygnalizowano w rozdziale ‘Materiały i metody’, do analiz wykorzystano 4 próbki zbiorcze (każda składała się z 10 osobników): 2 próbki składały się z osobników męskosterylnych, a 2 przeciwstawne z osobników męskopłodnych. W celu uniknięcia błędów technicznych analizy markerów przeprowadzane w obrębie próbek zbiorczych obejmowały również powtarzalne testy na liniach rodzicielskich 544C i Ot0-20 (Rys.13). Markery molekularne różnicujące linie rodzicielskie bardzo rzadko pozwalały na ujawnienie różnic genetycznych między próbkami zbiorczymi roślin męskosterylnych i męskopłodnych. Sporadycznie obserwowane różnice w obrębie próbek zbiorczych na ogół dotyczyły tylko jednej z dwóch badanych grup roślin męskosterylnych lub męskopłodnych.



Rys.13. Elektroforegram przedstawiający produkty amplifikacji 3 markerów COS w czasie badań linii rodzicielskich i próbek zbiorczych (MS-próbki zbiorcze roślin męskosterylnych, MP- próbki zbiorcze roślin męskopłodnych).

Spośród 125 przetestowanych markerów molekularnych typu COS tylko jeden (c892) ujawniał polimorfizm genetyczny pomiędzy liniami rodzicielskimi 544C i Ot0-20 jednocześnie wykazując związek z cechą płodności w próbkach zbiorczych – w obu grupach zbiorczych MS produkt amplifikacji był nieobecny, ale występował w obu próbkach zbiorczych MP (Rys.14). Marker c892 należał do grupy 21 markerów zaprojektowanych w ramach niniejszej pracy do mapowania chromosomu 2R (Tabela 12), a ujawniany przez niego polimorfizm miał charakter dominujący.

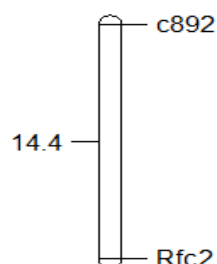


Rys.14. Elektroforegram przedstawiający wyniki amplifikacji markera c892 w obrębie linii rodzicielskich 544C i Ot0-20 oraz w próbach zbiorczych (MS-próby zbiorcze roślin męskosterylnych, MP- próby zbiorcze roślin męskopłodnych).

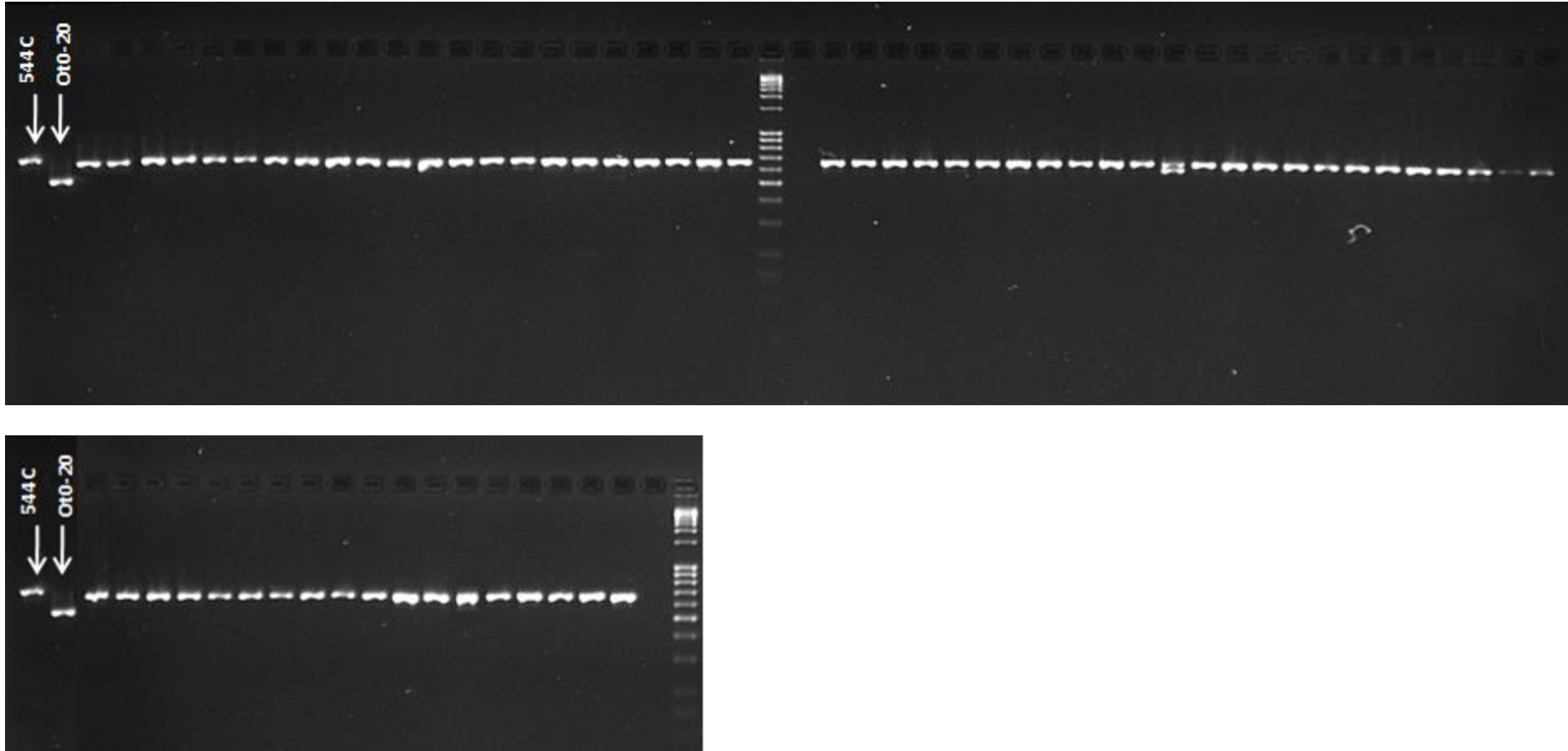
3.6.3. Mapowanie pobocznego genu przywracającego męską płodność w populacji [544C x MOt]BC1

Pierwszym etapem prowadzonych badań było wykonanie analizy z wykorzystaniem markera COS TC363404, która miała na celu zweryfikowanie poprawności wyników uzyskanych w czasie przygotowywania materiału źródłowego do utworzenia populacji mapującej [544C x MOt]BC1. Materiał ten ([544C x Ot0-20]F2 – udostępniony przez KGHIBR ZUT) został poddany ocenie fenotypowej oraz wstępnej analizie markerami SCAR (analizy wykonane w KGHIBR ZUT przed realizacją niniejszej rozprawy). Dzięki tym działaniom wybrano 4 osobniki, które były męskopłodne, ale nie wynikało to z aktywności głównego genu *Rfc1*. Zakładano, że w przypadku męskopłodnej rośliny z cytoplazmą C, przy nieobecności genu *Rfc1* zlokalizowanego na chromosomie 4R, inny gen (lub geny) jest odpowiedzialny za produkcję pyłku. Wyselekcjonowane 4 rośliny zostały skrzyżowane wstecznie z linią rodzicielską 544C, tworząc w ten sposób populację mapującą [544C x MOt]BC1.

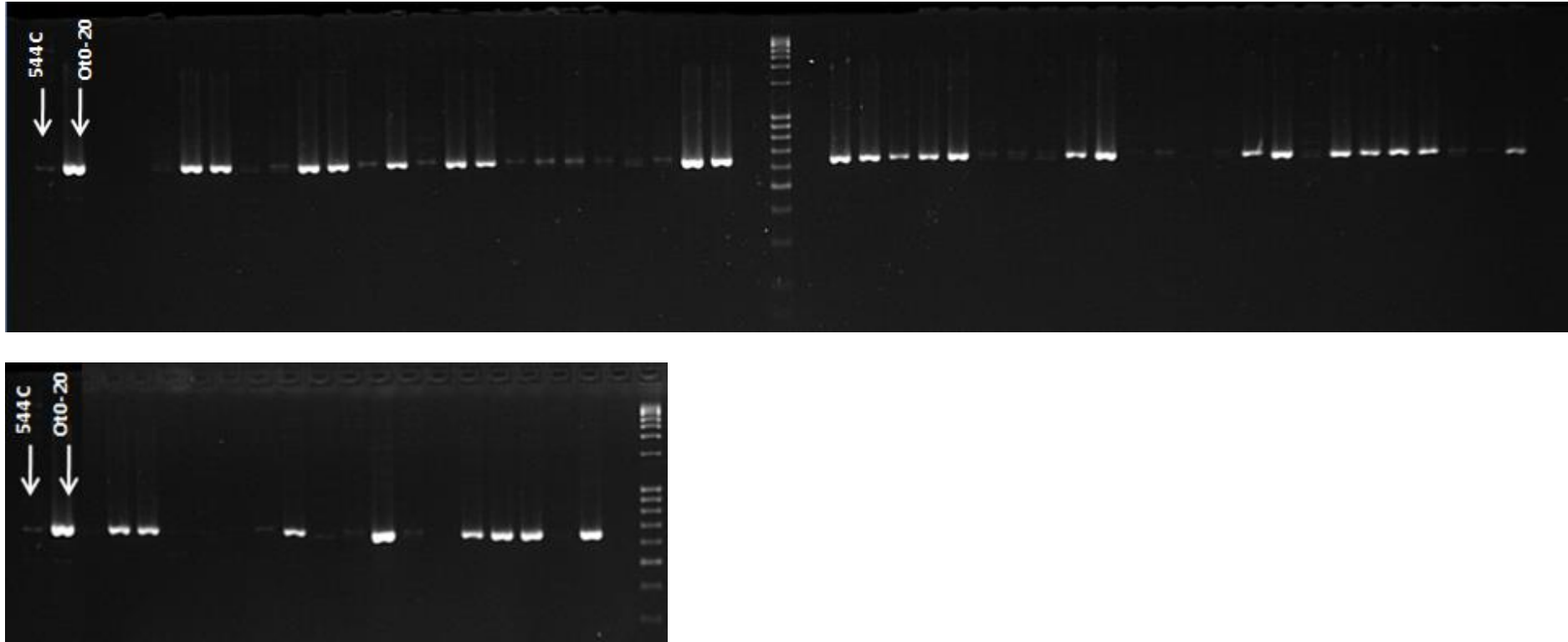
Analiza weryfikująca nieobecność genu *Rfc1* w populacji mapującej została przeprowadzona w obrębie mieszańca [544C x MOt]BC1 z wykorzystaniem dodatkowego markera molekularnego typu COS (TC363404) zlokalizowanego na chromosomie 4RL (Rys.16). Uzyskany wynik potwierdził brak głównego genu restorerowego *Rfc1* w populacji mapującej [544C x MOt]BC1 - zestawione w tabeli 14 dane wskazują na brak polimorfizmu w obrębie *locus* TC363404. Kolejnym etapem było przeprowadzenie w obrębie populacji mapującej analiz segregacji z zastosowaniem markera c892 (Rys. 17). Uzyskane wyniki dla badanej populacji mapującej [544C x MOt]BC1 zestawiono z oceną fenotypową. W danych zamieszczonych w tabeli 14 zauważalna jest korelacja pomiędzy segregacją męskiej sterylności/płodności a segregacją alleli c892. Wynik mapowania genetycznego z użyciem programu JoinMap5 wskazuje na sprzężenie genetyczne markera COS c892 z genem kontrolującym przywracanie męskiej płodności u żyta z cytoplazmą C. Niestety odległość genetyczna markera od badanego genu, który oznaczono symbolem *Rfc2* jest dość znacząca, gdyż wynosi 14,4 cM (Rys.15).



Rys.15. Przepuszczalna lokalizacja pobocznego genu restorerowego *Rfc2* względem markera c892.



Rys.16. Elektroforegram przedstawiający produkty amplifikacji markera COS TC363404 w obrębie linii rodzicielskich i populacji mapującej [544C x MOt]BC1.



Rys.17. Elektroforegram przedstawiający produkty amplifikacji markera COS c892 w obrębie linii rodzicielskich i populacji mapującej [544C x MOt]BC1.

Tabela 14. Zestawienie wyników z elektroforegramów uzyskanych w wyniku analiz z użyciem markerów c892 i TC363404 oraz oceny fenotypowej dla populacji mapującej [544C x MOt]BC1.

Nazwa rośliny	Liczba ziaren w izolowanych kłosach	Ocena wzrokowa	Rfc1	c892	TC363404
544C			A	A	A
Ot0-20			C	C	B
544CxMOt10-1	0	2	A	A	A
544CxMOt10-2	0	3	A	A	A
544CxMOt10-3	0	2	A	A	A
544CxMOt10-4	19	6	C	C	A
544CxMOt10-5	5	4	C	C	A
544CxMOt10-6	0	2	A	A	A
544CxMOt10-7	0	2	A	A	A
544CxMOt10-8	0	2	A	C	A
544CxMOt10-9	17	4	C	C	A
544CxMOt10-10	0	3	A	A	A
544CxMOt10-13	24	5	C	C	A
544CxMOt19-1	0	3	A	A	A
544CxMOt19-2	36	6	C	C	A
544CxMOt19-3	31	6	C	C	A
544CxMOt19-4	0	3	A	A	A
544CxMOt19-5	0	2	A	A	A
544CxMOt19-6	0	3	A	A	A
544CxMOt19-8	0	2	A	A	A
544CxMOt19-9	0	2	A	A	A
544CxMOt19-10	0	3	A	A	A
544CxMOt19-11	32	6	C	C	A
544CxMOt19-12	17	6	C	C	A
544CxMOt19-13	7	6	C	C	A
544CxMOt19-14	21	5	C	C	A
544CxMOt19-15	32	6	C	C	A
544CxMOt19-16	0	2	A	C	A
544CxMOt19-17	39	7	C	C	A
544CxMOt19-18	0	4	A	A	A
544CxMOt19-19	0	2	A	A	A
544CxMOt19-20	3	4	C	A	A
544CxMOt19-21	18	4	C	C	A
544CxMOt19-22	0	4	A	C	A
544CxMOt19-24	0	5	A	A	A
544CxMOt19-25	9	5	C	A	A
544CxMOt19-26	0	3	A	A	A
544CxMOt23-1	0	1	A	A	A

544CxMOt23-2	20	6	C	C	A
544CxMOt23-3	36	5	C	C	A
544CxMOt23-5	0	1	A	A	A
544CxMOt23-6	40	5	C	C	A
544CxMOt23-7	27	6	C	C	A
544CxMOt23-8	28	6	C	C	A
544CxMOt23-9	28	6	C	C	A
544CxMOt23-10	0	1	A	A	A
544CxMOt23-11	0	1	A	A	A
544CxMOt23-12	0	2	A	C	A
544CxMOt23-13	0	1	A	A	A
544CxMOt23-14	21	6	C	C	A
544CxMOt58-1	30	5	C	C	A
544CxMOt58-2	0	1	A	A	A
544CxMOt58-3	0	2	A	A	A
544CxMOt58-4	0	3	A	A	A
544CxMOt58-5	0	1	A	A	A
544CxMOt58-6	29	5	C	C	A
544CxMOt58-10	0	1	A	A	A
544CxMOt58-11	0	1	A	A	A
544CxMOt58-12	39	7	C	C	A
544CxMOt58-13	0	2	A	A	A
544CxMOt58-14	34	7	C	A	A
544CxMOt58-16	36	7	C	C	A
544CxMOt58-17	16	5	C	C	A
544CxMOt58-18	5	4	C	C	A
544CxMOt58-19	0	2	A	A	A
544CxMOt58-20	0	3	A	C	A

A – Homozygota taka jak męskosterylna linia rodzicielska 544C

B – Homozygota taka jak męskopłodna linia rodzicielska Ot0-20

C – genotyp nieodpowiadający homozygotie A (ze względu na dominujący charakter markera może to być genotyp homozygotyczny typu B lub heterozygota)

3.7. Analizy DArTseq

W wyniku przeprowadzonych analiz populacji mieszańcowych [544C x MOt]BC3F3 i [544C x MOt]BC3F4 metodą DArTseq otrzymano 114366 markerów SilicoDArT oraz 62986 markerów SNP. Kolejnym etapem było wyselekcjonowanie z otrzymanych danych tych markerów, które ujawniły polimorfizm między liniami rodzicielskimi. W rezultacie otrzymano 16755 polimorficznych markerów SilicoDArT i 8592 polimorficznych markerów SNP. W celu znalezienia markerów, których segregacje wykazują związek z wynikami oceny fenotypowej populacji mieszańcowych [544C x MOt]BC3F3 i [544C x MOt]BC3F4 użyto testu Kruskala-Walles'a. Łączna liczba markerów DArTseq, u których zaobserwowano statystycznie istotny związek z wynikami oceny fenotypowej w obrębie badanej populacji mieszańcowej wyniosła 2060.

Wyselekcjonowane markery SilicoDArT i SNP zostały zmapowane na sekwencji genomu żyta (Rabanus-Wallace i in. 2021) przy zastosowaniu programu QIAGEN CLC Genomics Workbench 11 (www.qiagenbioinformatics.com). Największą liczbę markerów zmapowano na chromosomach 2R (106 markerów) i 5R (131 markerów) (Tabela 15). Otrzymany wynik potwierdził wyniki uzyskane z zastosowaniem markerów typu COS, które wskazywały na lokalizację genu *Rfc2* na chromosomie 2R. Większość spośród 106 markerów DArTseq przypisanych do chromosomu 2R (w liczbie 97) zlokalizowano w bloku umiejscowionym w końcowej części chromosomu w przedziale od 885 988 192 do 896 338 354 par zasad.

Na chromosomie 5R 122 markery (spośród wszystkich 131 przypisanych do 5R) zmapowano, jako *loci* sprzężone w przedziale od 533 101 516 do 595 409 921 par zasad. Wszystkie te markery były istotnie statystycznie związane z przywracaniem męskiej płodności żyta z cytoplazmą C. Wynik ten pozwala przyjąć założenie, że długie ramię chromosomu 5R to lokalizacja kolejnego pobocznego genu przywracającego męską płodność u żyta z CMS-C. Markery wykazujące statystycznie istotny związek z przywracaniem męskiej płodności w systemie CMS-C, które zmapowano na chromosomach 1R, 3R, 4R, 6R i 7R były mało liczne – nie więcej niż 23 *loci* w obrębie chromosomu (Tabela 15). Dodatkowo markery te nie tworzyły zauważalnych bloków sprzężeń na mapie genomu żyta, więc można założyć, że ich związek z cechą męskiej płodności/sterylności roślin z CMS-C ma charakter przypadkowy lub wynika z działania genów, których efekt fenotypowy jest tak niewielki, że nie ma znaczenia dla praktyki hodowlanej.

Tabela 15. Liczba markerów SilicoDArT i SNP zmapowanych na sekwencji DNA genomu żyta.

Populacja	CHROMOSOMY							Ogółem
	1	2	3	4	5	6	7	
[544C x Mot]BC3F3/ [544C x Mot]BC3F4	14	106	12	10	131	23	17	313

W tabeli 16 zestawiono zmapowane na chromosomie 2R markery DArTseq, które wykazywały statystycznie istotny związek z wynikami fenotypowymi oceny męskiej płodności. Informacje zawarte w tabeli 16 pozwalają na wstępne oszacowanie, które z markerów mogą okazać się najprzydatniejsze w hodowli. Markery te mają charakter kodominujący (SNP) lub dominujący (SilicoDArT). W przypadku markerów dominujących nie ma możliwości odróżnienia heterozygoty od jednej z homozygot rodzicielskich. W kolumnach oznaczonych jako „Mean a, Mean h, Mean b” znajdują się wartości średnie fenotypów populacji mieszańcowych [544C x MOt]BC3F3 i [544C x MOt]BC3F4 po ich podzieleniu na trzy kategorie genotypów: homozygoty typu matcznego (a), heterozygoty (h) i homozygoty typu ojcowskiego (b). W przypadku markerów SilicoDArT, które mają charakter dominujący uzyskujemy dwie grupy genotypów: pierwsza zawiera homozygoty rodzica niosącego allel recesywny, druga zawiera heterozygoty oraz homozygoty takie jak rodzic charakteryzujący się allelem dominującym. Z tego względu w tabeli 16 są ujęte dwie wartości średnie cech fenotypowych posegregowanych w oparciu o markery SilicoDArT.

Analiza wartości średnich z kolumn „Mean a, Mean h, Mean b” pozwala wstępnie oszacować efektywność selekcji tymi markerami. W przypadku prac hodowlanych opartych o systemy CMS interesuje nas, aby skuteczność markerów pozwalała na oddzielenie roślin niezawierających genów restorerowych od tych, które mają zdolność do przywracania męskiej płodności. Z tego względu poszukiwane były w tabeli markery, które w grupie roślin z allelem a (allel typu matcznego pochodzący z męskosterylnej linii 544C) pozwalały osiągnąć średnią wartość fenotypu (Mean a) poniżej 3 (w skali Geigera i Morgensterna rośliny oceniane w przedziale 1-3 nie wytwarzają pyłku). Selekcja alternatywnych alleli b (pochodzących od linii ojcowskiej Ot0-20) powinna nam dawać możliwie wysokie wartości „Mean b”. Spośród 101 zmapowanych na chromosomie 2R markerów, 15 (zaznaczone w tabeli 16 pogrubioną czcionką) wykazuje największą przydatność do selekcji genotypów dopełniających męską sterylność (Mean a < 3,0) w systemie CMS-C. Dziewięć z tych piętnastu markerów to markery dominujące SilicoDArT, które ze względu na brak możliwości odróżnienia homozygot ojcowskich (b) od heterozygot (h) nie wykazują przydatności do selekcjonowania form przywracających męską płodność. Pozostałe 6

markerów SNP może być również przydatne do identyfikowania genotypów restorerowych, chociaż wartości w kolumnie „Mean b” ukazują, że wprowadzenie genu *Rfc2* z chromosomu 2R nie jest wystarczające do pełnego przywrócenia męskiej płodności - dobre linie ojcowskie będą musiały zawierać dodatkowo główny gen restorerowy *Rfc1* z chromosomu 4R.

Markery SilicoDArT i SNP o istotnym statystycznie związku ze sterility lub pyleniem roślin badanych populacji, które zmapowano na chromosomie 5R zestawiono w tabeli 17. Zawarte w tabeli dane są uporządkowane w sposób analogiczny, jak to opisano powyżej dla markerów z chromosomu 2R. Dla 126 markerów z chromosomu 5R średnia wartość fenotypu waha się między 4 a 7, niezależnie od rodzaju allelu (tab.17). W skali Geigera i Morgensterna wartości w zakresie 4-6 odpowiadają roślinom częściowo płodnym, wartość 7 to rośliny męskopłodne, ale o relatywnie małej intensywności pylenia. W związku z tym żaden z markerów z chromosomu 5R nie daje możliwości rozdzielenia grup roślin w pełni męskosterylnych od męskopłodnych. Przydatność tych markerów do prac selekcyjnych przy tworzeniu linii dopełniających i restorerowych w praktycznej hodowli wydaje się znikoma.

Tabela 16. Markery SilicoDArT i SNP wykazujące w teście Kruskala-Wallisa istotny związek z fenotypową oceną męskiej płodności zmapowane na chromosomie 2R.

Marker	K	Nr inf.	Mean-a	Mean-h	Mean-b	Istotność statystyczna
3346900	17.345	84	4.081		5.468	*****
3349816	14.639	82	4.225		5.452	*****
3353786	8.662	87	4.404		5.400	****
3355202	9.043	88	3.905	5.224		****
3355958	18.798	87	4.075		5.489	*****
3357943	25.335	78	3.286		5.421	*****
3358139	22.194	82	4.000		5.556	*****
3359827	16.044	85	3.706		5.118	*****
3363918	10.814	90	4.130		5.090	****
3576970	17.700	85	3.550	5.338		*****
3578290	9.258	88	4.388		5.436	****
3578291	11.754	80	3.818	5.328		*****
3578930	8.287	88	3.857	5.179		****
3580095	22.950	79	3.871		5.542	*****
3580235	18.569	79	4.000		5.479	*****
3581076	21.078	88	4.077		5.510	*****
3583540	11.049	69	3.556	5.133		*****
3585825	22.039	88	4.000		5.520	*****
3586142	11.652	90	3.000	5.012		*****
3587836	25.050	89	3.975		5.531	*****
3589611	23.540	91	2.769	5.205		*****
3589959	10.253	88	3.818	5.212		****
3597504	16.827	84	4.175		5.523	*****
3598881	9.253	89	3.818	5.149		****
3601190	25.362	72	2.273	5.295		*****
3731289	10.399	77	3.818	5.273		****
3733168	9.625	85	4.000		5.087	****
3733828	10.347	87	3.818	5.215		****
3736517	27.979	79	2.250	5.269		*****
3739496	17.043	80	3.938		5.479	*****
3743223	18.387	83	4.167		5.463	*****
3748515	27.744	78	3.690		5.510	*****
3749723	19.154	80	3.875		5.458	*****

3885364	11.546	73	4.176	5.410	*****
3887637	8.109	77	3.800	5.075	****
3890859	24.140	88	2.769	5.253	*****
3894515	26.007	91	2.714	5.208	*****
3902866	14.854	79	4.216	5.452	*****
3909290	15.927	85	4.135	5.479	*****
3909727	10.615	86	3.818	5.234	****
4094087	22.439	86	2.769	5.192	*****
4096498	4.491	93	4.741	5.417	**
5036574	12.941	77	4.147	5.442	*****
5042076	15.729	79	3.727	5.368	*****
5042097	25.674	86	2.938	5.229	*****
5042267	9.899	83	3.905	5.290	****
5045636	8.816	87	3.167	4.975	****
5045709	7.715	73	4.522	7.250	***
5139384	10.815	89	3.000	4.927	****
5210059	10.445	90	3.818	5.221	****
5212828	16.195	87	3.389	5.203	*****
5216329	13.490	81	4.231	5.452	*****
5219877	8.492	86	4.129	5.200	****
5224369	11.292	88	3.826	5.231	*****
5498443	15.855	80	3.692	5.278	*****
5501159	9.144	85	4.129	5.241	****
5757297	26.216	84	3.914	5.510	*****
5757974	16.233	85	3.550	5.246	*****
5803097	24.411	77	2.769	5.328	*****
7063959	10.397	89	4.404	5.432	****
7064938	25.003	87	2.364	5.184	*****
7097476	18.743	82	3.680	5.228	*****
7411992	17.382	80	3.000	5.091	*****
7463274	8.852	78	3.167	5.014	****
7467629	10.373	81	4.129	5.300	****
16404725	23.115	84	3.848	5.510	*****
38777476	20.609	82	3.222	5.266	*****
38786609	11.556	91	3.000	5.024	*****
38790027	10.291	88	4.000	5.283	****

41116950	14.819	76	3.864		5.389	*****
41118432	9.966	86	3.818	5.188		****
3345109_snp	14.893	94	4.129	4.600	5.442	*****
3346900_snp	20.086	94	3.905	4.360	5.479	*****
3355958a_snp	20.698	92	3.962	4.429	5.533	*****
3355958b_snp	20.086	94	3.905	4.360	5.479	*****
3363263_snp	34.394	94	2.615	4.640	5.429	*****
3363834_snp	33.175	92	2.714	4.679	5.460	*****
3577658_snp	10.885	94	4.286	4.600	5.436	****
3580874_snp	20.528	94	3.762	4.500	5.489	*****
3587836_snp	32.373	94	2.833	4.515	5.531	*****
3593613_snp	20.057	94	3.952	4.320	5.479	*****
3596626_snp	22.234	94	3.826	4.480	5.522	*****
3597504_snp	22.234	94	3.826	4.480	5.522	*****
3743250_snp	22.176	94	3.818	4.440	5.511	*****
3744983_snp	12.562	93	4.071	4.533	5.320	****
3748515_snp	32.512	91	3.364	4.750	5.511	*****
3749723_snp	18.586	94	3.818	4.520	5.468	*****
3885364_snp	14.843	94	4.129	4.619	5.452	*****
3890859_snp	33.993	94	2.769	4.581	5.520	*****
3902866_snp	14.843	94	4.129	4.619	5.452	*****
3905914_snp	9.256	94	4.091	4.733	5.286	***
3909290_snp	20.397	94	3.818	4.458	5.479	*****
3909891_snp	10.360	93	4.278	4.632	5.421	***
5046891_snp	11.357	89	3.500	4.615	4.970	****
5217698_snp	26.957	94	3.550	4.500	5.542	*****
5219476_snp	26.929	94	3.550	4.480	5.531	*****
5497387_snp	32.432	94	2.769	4.625	5.510	*****
5501295_snp	20.425	94	3.826	4.538	5.511	*****
5503353_snp	15.219	85	4.118	4.500	5.442	*****
7413331_snp	32.479	93	2.933	4.704	5.431	*****
7467785_snp	9.654	82	4.588	6.000	5.000	***

K – wartość statystyki (test K-W)

Nr inf. – liczba informatywnych danych

** wartości istotne statystycznie przy P=0,05; *** wartości istotne statystycznie przy P=0,01; **** wartości istotne statystycznie przy P=0,005; ***** wartości istotne statystycznie przy P=0,001; ***** wartości istotne statystycznie przy P=0,0005; ***** wartości istotne statystycznie przy P=0,0001

Tabela 17. Markery SilicoDArT i SNP wykazujące w teście Kruskala-Wallisa istotny związek z fenotypową oceną męskiej płodności zmapowane na chromosomie 5R.

Marker	K	Nr inf.	Mean-a	Mean-h	Mean-b	Istotność statystyczna
3342708	7.559	84	4.675		5.846	***
3342893	7.880	88	4.714		6.000	****
3342900	7.236	82	4.718		6.091	***
3343654	6.848	82	4.803		6.182	***
3344237	7.588	92	4.631		6.500	***
3345455	8.116	78	4.585		5.846	****
3346600	7.298	82	4.667		5.846	***
3347773	9.402	88	4.654	6.200		****
3348592	7.084	92	4.645	5.688		***
3352477	9.208	86	4.671		6.200	****
3352854	8.031	90	4.654		5.917	****
3354097	9.810	79	4.708		6.571	****
3355447	8.009	87	4.662		5.846	****
3355516	13.071	85	4.662		6.455	*****
3356671	9.361	88	4.667	6.200		****
3357475	7.271	92	4.702		6.500	***
3359932	7.759	78	4.662		5.846	***
3360213	7.153	79	4.671		7.333	***
3361104	6.946	92	4.662	5.733		***
3361256	6.980	94	4.654	5.688		***
3363410	9.629	88	4.654		6.200	****
3363657	7.518	84	4.634		5.846	***
3364439	8.785	85	4.703		6.182	****
3365093	7.602	81	4.686		6.182	***
3577034	8.593	92	4.654	5.786		****
3581675	6.661	93	4.667	5.667		***
3583417	7.831	84	4.671		6.182	***
3584436	9.629	88	4.654		6.200	****
3589422	7.850	92	4.700		5.917	***
3589426	7.538	91	4.649	5.786		***
3591962	7.299	75	4.661		5.846	***
3592036	7.542	92	4.643		6.500	***
3592169	8.471	79	4.638		6.300	****

3592632	7.274	91	4.688	6.091	***
3593963	8.613	88	4.671	6.083	****
3594511	7.779	87	4.595	6.500	***
3595038	8.444	94	4.658	5.733	****
3596163	10.176	92	4.671	6.077	****
3596903	7.424	76	4.761	6.400	***
3597885	7.004	57	5.167	2.667	***
3598067	7.498	83	4.676	5.917	***
3598499	7.742	90	4.649	5.846	***
3599732	8.799	93	4.655	6.444	****
3602621	8.898	88	4.667	5.923	****
3735675	6.870	91	4.646	5.917	***
3737584	8.448	86	4.645	6.300	****
3738580	6.757	85	4.736	5.846	***
3740153	8.561	92	4.654	6.000	****
3741602	10.209	91	4.679	6.400	****
3741670	8.460	87	4.600	5.917	****
3742416	9.998	89	4.600	5.929	****
3742442	7.421	82	4.714	5.917	***
3744208	7.598	83	4.623	5.786	***
3745007	9.918	85	4.600	6.200	****
3745679	9.393	89	4.696	6.200	****
3746519	7.310	83	4.622	6.000	***
3746599	9.635	91	4.675	6.000	****
3746676	9.002	89	4.722	6.200	****
3748048	8.475	92	4.625	5.917	****
3749822	8.159	76	4.667	6.300	****
3749824	7.070	89	4.579	5.769	***
3750576	7.045	79	4.059	5.000	***
3886476	7.119	93	4.654	5.733	***
3888694	7.571	89	4.658	5.846	***
3889170	6.764	92	4.658	5.688	***
3891716	4.249	86	4.829	7.000	**
3895265	7.794	91	4.671	5.917	***
3897672	7.839	92	4.675	5.917	***
3901010	8.449	86	4.658	6.300	****

3904617	8.425	80	4.571	6.300	****
3904955	9.220	90	4.688	6.200	****
3905469	8.209	88	4.662	6.000	****
4094227	9.362	87	4.685	5.929	****
4098193	6.665	87	4.613	5.833	***
4487644	7.480	91	4.667	5.846	***
4495535	7.359	85	4.556	5.769	***
4499422	8.031	90	4.654	5.917	****
5035530	8.505	86	4.688	6.444	****
5042035	12.544	87	4.671	6.455	*****
5200268	11.889	85	4.534	6.250	*****
5203782	8.519	87	4.608	5.846	****
5209804	9.146	85	4.569	5.846	****
5211783	7.857	88	4.684	5.917	***
5214074	9.936	83	4.560	6.625	****
5215476	7.627	86	4.667	6.182	***
5218727	7.378	90	4.645	5.786	***
5219492	6.990	89	4.662	5.733	***
5221470	7.218	91	4.645	5.733	***
5222286	7.084	92	4.645	5.688	***
5226362	7.059	91	4.640	5.688	***
5486865	8.620	92	4.655	6.375	****
5487265	8.615	90	4.716	6.444	****
5487509	9.426	91	4.598	6.444	****
5497916	7.269	89	4.671	5.846	***
5497917	6.979	88	4.689	5.786	***
5501709	7.154	92	4.663	5.750	***
5502036	7.816	87	4.662	5.846	***
5795995	6.946	92	4.662	5.733	***
5803945	6.764	92	4.658	5.688	***
7064795	9.004	92	4.625	6.083	****
7069066	8.441	82	4.629	5.917	****
7093663	7.500	77	4.582	6.200	***
7096386	8.065	82	4.681	6.300	****
7103751	8.572	89	4.667	5.857	****
7513512	6.736	90	4.679	5.917	***

16404755	6.661	93	4.667	5.667		***
16501653	8.367	82	4.603		5.786	****
28856650	9.289	86	4.639		5.857	****
37699611	8.045	82	4.614		5.917	****
37702881	8.046	90	4.662		5.846	****
37705988	7.644	90	4.622		6.500	***
41117585	6.733	91	4.692	6.000		***
41117838	8.714	87	4.688		6.200	****
41117845	6.791	88	4.587		5.769	***
41118368	8.493	83	4.681		6.091	****
3344631_snp	9.243	94	4.654	4.500	6.083	***
3354355_snp	9.753	94	4.740	4.000	6.182	***
3363846_snp	12.313	94	4.610	6.000	6.444	****
3364742_snp	10.120	94	4.638	5.167	6.500	***
3733106_snp	13.542	94	4.671	3.500	6.455	****
3733440_snp	10.120	94	4.638	5.167	6.500	***
3743514_snp	10.351	94	4.623	5.167	6.091	***
3745007_snp	9.946	94	4.654	4.833	6.200	***
38784909_snp	9.492	89	4.689	4.000	5.857	***
3908761_snp	9.775	93	4.658	4.750	6.200	***
7087088_snp	9.962	86	4.720	3.000	6.444	***

K – wartość statystyki (test K-W)

Nr inf. – liczba informatywnych danych

** wartości istotne statystycznie przy P=0,05; *** wartości istotne statystycznie przy P=0,01; **** wartości istotne statystycznie przy P=0,005; ***** wartości istotne statystycznie przy P=0,001; ***** wartości istotne statystycznie przy P=0,0005

DYSKUSJA

4.1. Identyfikacja typów cytoplazm obecnych w europejskich populacjach żyta

Występowanie cytoplazmy sterylizującej w populacjach żyta uprawnego jest zjawiskiem szeroko rozpowszechnionym (Łapiński i Stojałowski 2003; Stojałowski i in. 2006, 2008). Na przestrzeni lat zostało odkrytych u żyta szereg źródeł CMS, wśród których kilka było dokładniej badanych: CMS-P (Geiger i Schnell 1970), CMS-R (Kobyljanskij 1969), CMS-C (Łapiński 1972), CMS-S (Madej 1975) i CMS-G (Adolf i Winkel 1985). Dzięki eksperymentom genetycznym możliwe było zaobserwowanie różnic i podobieństw w systemach CMS, co zaskutkowało hipotezą o istnieniu genetycznego typu CMS Vavilovii (CMS-V), który jest reprezentowany przez liczne, niezależnie odkrywane źródła cytoplazmy sterylizującej, m.in. CMS-C, CMS-R, CMS-S i CMS-G (Geiger 1982; Łapiński i Stojałowski 1996, 2003; Warzecha i Salak-Warzecha 1996). Cytoplazmy zaliczane do typu Vavilovii mogą wykazywać pewne zróżnicowanie na poziomie genetycznym, ale mechanizm męskiej sterility determinowany przez geny mitochondrialne jest u nich najprawdopodobniej wspólny.

W wyniku badań nad charakterystyką CMS-G prowadzonych na poziomie molekularnym, Steinborn i in. (1993) wykazali z użyciem polimorficznych markerów RFLP hybrydujących z mitochondrialnym DNA odrębność badanego źródła CMS od cytoplazm N (normalna) i P (cytoplazma sterylizująca Pampa). Odnotowali oni jednocześnie podobieństwo pomiędzy CMS-G, a cytoplazmą występującą w odmianie populacyjnej Pluto, nie do końca interpretując ten zaskakujący w tym czasie wynik. Mniej więcej dekadę później obserwacje Steinborna i in. (1993) znalazły wyjaśnienie: w odmianie Pluto występuje z dużą częstotliwością cytoplazma sterylizująca należąca do postulowanego typu CMS-Vavilovii (Łapiński i Stojałowski 2003). Tym samym hipoteza o istnieniu typu CMS Vavilovii, do którego należy wiele źródeł CMS niezależnie odkrywanych przez różnych badaczy znalazła pewne potwierdzenie.

Markery RFLP stosowane w badaniach mitochondrialnego genomu żyta od drugiej połowy lat 80-tych XX wieku (Tudzynski i in. 1986; Steinborn i in. 1993; Dohmen i Tudzynski 1994; Dohmen i in. 1994) pozwoliły na udowodnienie, że cytoplazmatyczna męska sterility u żyta, podobnie jak u wielu innych gatunków, ma swoje źródło w mtDNA. Zastosowanie RFLP do badań prowadzonych na licznych obiektach używanych w praktycznej hodowli jest pracochłonne i tym samym bardzo kosztowne. Alternatywę stanowią

markery oparte na metodzie PCR, które charakteryzują się ogólną prostotą w zakresie procedur laboratoryjnych, wymagają mniejszej ilości DNA, a także wykazują większą tolerancję dla słabszych jakościowo matryc (izolatów DNA). U żyta tego typu system markerów PCR do identyfikacji cytoplazm został opracowany przez Stojałowskiego i in. (2006). Polega on na zastosowaniu 3 markerów SCAR: *cox1*, *nad2* i *nad6*, dzięki którym możemy rozróżnić trzy typy cytoplazm żyta: normalną, CMS-P i CMS-V. Marker ‘*nad6*’ ma w tym zestawie charakter weryfikujący, ze względu na amplifikację produktu tylko u roślin z cytoplazmą typu P (identyfikacja cytoplazmy Pampa jest możliwa bez ‘*nad6*’, bo wystarczy do tego użycie markera ‘*cox1*’, ale różnica w długości amplikonów jest na tyle niewielka, że wskazane jest potwierdzenie wyniku).

Opisane w tej pracy wyniki identyfikacji różnych cytoplazm obecnych w populacjach żyta, które uzyskano z wykorzystaniem markerów SCAR, stanowią kontynuację badań prowadzonych wcześniej w Katedrze Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin ZUT w Szczecinie (Łapiński i Stojałowski 2003; Stojałowski i in. 2006, 2008). Celem tej części wykonanych badań było poszerzenie wiedzy dotyczącej występowania różnych genetycznie cytoplazm w kilku europejskich populacjach żyta ozimego. Badaniami objęto 4 polskie odmiany populacyjne (Dańkowskie Diament, Bosmo, Amilo i Stanko) oraz 5 europejskich populacji o charakterze historycznym pozyskanych z banków genów (Svalofs St 52404, Landsorte K9538, Vjatka, Hungarian Giant, St. Wageningen). W badanych populacjach historycznych stwierdzono obecność tylko dwóch rodzajów cytoplazmy: normalnej (niesterylizującej) i sterylizującej zaliczanej do typu Vavilovii. Żadna z badanych roślin nie zawierała cytoplazmy CMS-Pampa. Ten typ cytoplazmy był natomiast obecny w polskich odmianach znajdujących się w aktualnym Krajowym Rejestrze. Odmiana populacyjna Dańkowskie Diament badana w ramach opisywanych tu badań, składała się niemal wyłącznie z roślin zawierających cytoplazmę P. Tylko u jednego badanego pojedynka zidentyfikowano cytoplazmę normalną. Uzyskany wynik stanowi potwierdzenie wyników opublikowanych w 2008 roku (Stojałowski i in. 2008), gdzie też zaobserwowano w tej odmianie dominujący udział cytoplazmy Pampa. Za pewną nowość można uznać zidentyfikowanie CMS-Pampa w kolejnej odmianie populacyjnej zarejestrowanej w Polsce - w Stanko udział roślin z tą cytoplazmą przekraczał 40%. O ile występowanie CMS-V było od lat powszechne w europejskich populacjach żyta (Łapiński i Stojałowski 2003; Stojałowski i in. 2008), to doniesienia o obecności CMS-P w populacjach europejskich były dotąd incydentalne i dotyczyły pojedynczych roślin (Kobyljanskij i in. 1994; Warzecha i Salak-Warzecha 1996). Wśród czterech badanych w niniejszej pracy odmian populacyjnych, te zarejestrowane

wcześniej (Amilo 1989; Bosmo 2001) nie zawierały cytoplazmy Pampa, ale pojawiła się ze znaczącą częstotliwością w odmianach zarejestrowanych stosunkowo niedawno (Dańkowskie Diament 2005; Stanko 2007). Oczywiście, na podstawie danych dotyczących zaledwie czterech odmian nie można wysnuwać szerszych wniosków, ale uzasadniona wydaje się hipoteza, że powszechniejsza obecność cytoplazmy Pampa w europejskich odmianach populacyjnych jest rezultatem wykorzystania tego źródła CMS w licznych programach hodowli odmian mieszańcowych. Programy hodowli odmian populacyjnych i mieszańcowych są teoretycznie realizowane niezależnie od siebie, ale przeniesienie wartościowych genotypów pomiędzy tymi programami może sporadycznie mieć miejsce. Inaczej trudno byłoby wyjaśnić rosnący udział cytoplazmy Pampa w odmianach populacyjnych w Polsce.

Miedaner i in. (2022) na podstawie analiz molekularnych genu restorerowego (*Rf*) zaproponowali potencjalne drogi rozprzestrzeniania się żyta po świecie. Założono, że jedna z dróg miała początek na terenie obecnego Iranu i stamtąd przez tereny wschodnioeuropejskie wiodła do Europy. Tą drogą przywędrowały rośliny żyta z cytoplazmą normalną oraz z CMS-V, które były identyfikowane od wielu lat w obrębie populacji europejskich. Druga droga także rozpoczęta w obecnym Iranie, miała prowadzić przez współczesną Turcję, Hiszpanię, Portugalię aż do Ameryki Południowej, skąd pochodziły materiały, w których odkryto cytoplazmę Pampa (Geiger i Schnell 1970). Oba typy CMS (Pampa i Vavilovii) były wykrywane w obszarze pochodzenia żyta na Bliskim Wschodzie (Stojałowski i in. 2006, 2008), ale z małą częstotliwością. Cytoplazma Vavilovii po dotarciu do środkowej i wschodniej Europy stała się powszechnie obecna w odmianach uprawnych. Podobny proces miał miejsce w Ameryce Południowej w odniesieniu do cytoplazmy Pampa. Ze względu na rozwój hodowli heterozyjnej w Europie coraz więcej roślin żyta rosnących na polach ma cytoplazmę P, a jednocześnie wzrasta jej udział w nowych odmianach populacyjnych. Ten trend wskazuje, że sterylizujące działanie cytoplazmy może mieć jakiś ewolucyjny pozytywny wpływ na liczebność i żywotność potomstwa. Według jednej z tez: rośliny męskosterylne nie muszą inwestować zasobów w energochłonną produkcję pyłku, a zatem mogą osiągać wyższe plony ziarna, jak wykazano wcześniej w przypadku kukurydzy (Chinwuba i in. 1961).

4.2. Przywracanie męskiej płodności w odmianach populacyjnych żyta z cytoplazmą sterylizującą C i P

Przy tworzeniu odmian mieszańcowych żyta niezbędne są linie ojcowskie skutecznie przywracające męską płodność. Przy tworzeniu takich linii zalecane jest wykorzystywanie cytoplazmy sterylizującej (Geiger 1985). W teorii takie podejście miało zapewnić występowanie alleli płodności, ponieważ linia nieposiadająca tych alleli nie może produkować pyłku, co oznacza, że w prowadzonym chowie wsobnym nie zawiązuje ziaren. Niestety czynnik selekcyjny w postaci cytoplazmy sterylizującej okazał się nie do końca skuteczny w przypadku prowadzenia hodowli mieszańców żyta ozimego z CMS-P. Okazało się, że nie wszystkie homozygotyczne linie (dobrze pylące) są wystarczająco skuteczne w przywracaniu męskiej płodności u mieszańców (w których allele płodności są w stanie heterozygotycznym). Mechanizm dziedziczenia przywracania męskiej płodności jest u roślin z tą cytoplazmą na tyle skomplikowany, że w praktyce poziom męskiej płodności w mieszańcach heterozyjnych jest niezadowalający. Dlatego też tak istotne jest prowadzenie selekcji komponentów restorerowych charakteryzujących się wysoką zdolnością przywracania płodności, już od pierwszych etapów hodowli (Geiger i Miedaner 1996). Linia mateczna (donor alleli sterility) odpowiada za to, czy sterility roślin będzie głęboka czy też łatwa do pokonania przez allel płodności, co w rezultacie wpływa na stopień przywracania płodności u roślin mieszańcowych z cytoplazmą sterylizującą (Kolasińska 2001). U mieszańca heterozyjnego najczęściej występują dwa allele w każdym *locus* odpowiadającym za produkcję pyłku, są to: allel recesywny *rf* (odpowiada za sterility) i allel dominujący *Rf* (odpowiada za płodność). Żyto z CMS-P posiada kilka *loci* związanych z cechą płodności, a u części z nich może wystąpić niepełna dominacja alleli *Rf*. Dodatkowo panujące w czasie kwitnienia warunki atmosferyczne również mogą negatywnie wpłynąć na przywracanie płodności u form potomnych nawet, jeśli linia odpowiedzialna za przywracanie płodności wykazuje wysoki stopień pylenia (Geiger i Miedaner 1996).

Jak już wspomniano powyżej, cytoplazmy CMS-C, CMS-R, CMS-G i CMS-S, zaliczane do typu Vavilovii, występują powszechnie w europejskich populacjach żyta uprawnego (Łapiński i Stojalowski 1996, 2003; Stojalowski i in. 2006, 2008). U żyta z cytoplazmą C (podobnie jak u innych źródeł zaliczanych do CMS-Vavilovii) problemem nie jest znalezienie źródeł genów przywracających płodność, jest nim za to odszukanie form skutecznie dopełniających męską sterility (Łapiński i Stojalowski 1996). W hodowli mieszańcowej wykorzystującej cytoplazmy sterylizujące zaliczane do CMS-V, ważne jest

wyselekcjonowanie homozygotycznych linii utrzymujących męską sterylność niezależnie od warunków środowiska, czyli posiadających komplet alleli „non-restorer” we wszystkich istotnych *loci* (Kobyljanskij 1971, 1982; Madej 1976). Z kolei dla roślin z cytoplazmą typu Pampa, która ma silne działanie sterylizujące dla większości genotypów, kluczowe jest znalezienie linii przywracających męską płodność, czyli posiadających skuteczne allele „restorer” (Geiger 1972, 1982; Madej 1976; Geiger i Miedaner 1996).

Doświadczenia polowe wykonane na potrzeby niniejszej pracy miały na celu ocenę frekwencji jądrowych alleli sterylności/płodności w wybranych europejskich populacjach żyta ozimego. Przywracanie płodności przez polskie populacje żyta ozimego (Dańkowskie Amber, Armand, Dańkowskie Diament i Horyzo) było znacznie efektywniejsze, gdy otrzymane mieszańce zawierały cytoplazmę CMS-C (w porównaniu do CMS-Pampa). Rośliny męskopłodne stanowiły od 50% do 80% w każdej z badanych populacji, oprócz jednej. Dla mieszańców utworzonych z krzyżowania odmiany Dańkowskie Diament z linią 541C, udział genotypów określonych, jako męskopłodne wynosił niespełna 38%. W mieszańcach z cytoplazmą CMS-P dominowały formy męskosterylne: stanowiły one od 40 do 100% genotypów. Przywracanie płodności przez europejskie populacje historyczne żyta ozimego (Vjatka, Hungarian Giant i Landsorte K9538) u mieszańców z cytoplazmą C było bardzo efektywne: rośliny męskopłodne stanowiły od 72% do 92%. Dla mieszańców utworzonych z krzyżowania linii 541C z jugosłowiańską populacją Landsorte K9538 udział genotypów męskopłodnych wyniósł około 40%. Udział roślin męskosterylnych w mieszańcach z cytoplazmą Pampa mieścił się w granicach od około 85% do 100%. Frekwencja roślin męskopłodnych u mieszańców z cytoplazmą Pampa była na bardzo niskim poziomie – od 0 do 3,64%.

Otrzymane wyniki potwierdzają dotychczasową wiedzę na temat rozpowszechnienia alleli typu „non-restorer” i „restorer” dla systemów CMS-C i CMS-P w europejskich populacjach żyta. Zarówno populacje polskie jak i europejskie historyczne wykazały wyższy potencjał restoracji w systemie CMS-C (Łapiński i Stojalowski 1996) oraz wysoką frekwencję alleli sterylności w systemie CMS-P (Geiger 1972, 1982; Madej 1976; Geiger i Miedaner 1996). Można jednak zauważyć, że w objętych badaniami odmianach populacyjnych zarejestrowanych w Polsce w XXI wieku, częstotliwość genotypów zdolnych do przywracania męskiej płodności w mieszańcach z cytoplazmą Pampa była wyraźnie większa (niejednokrotnie przekraczała 20%) niż to odnotowano dla odmian o charakterze historycznym (wartości poniżej 5%). Zakres wykonanych badań nie pozwala na sformułowanie ostatecznych wniosków, ale dość oczywiste wydaje się postawienie hipotezy,

że większa frekwencja alleli skutecznie przywracających męską płodność w systemie CMS-P przez odmiany takie, jak Dańkowskie Diament i Dańkowskie Amber jest rezultatem zasygnalizowanego powyżej, rosnącego rozpowszechnienia cytoplazmy Pampa w polskich odmianach populacyjnych (np. Dańkowskie Diament, Stanko).

4.3. Identyfikacja genów restorerowych w populacji mapującej [544C x Mot]BC1

W hodowli mieszańcowej żyta stosowana jest głównie cytoplazma sterylizująca typu Pampa odkryta przez Geigera i Schnellera (1970). Badania genetyczne nad zjawiskiem cytoplazmatycznej męskiej sterility typu Pampa wskazały na istnienie kilku genów odpowiedzialnych za przywracanie płodności (Madej 1976; Scoles i Evans 1979; Ruebenbauer i in. 1984). Geny te zostały zmapowane na chromosomach 1RS, 3RL, 4RL, 5R i 6RL (Miedaner i in. 2000; Falke i in. 2009). Na długim ramieniu chromosomu 4R zlokalizowano również geny przywracające płodność żyta z cytoplazmą G (Börner i in. 1998) oraz cytoplazmą C (Stojałowski i in. 2004b, 2011; Milczarski i in. 2016). Uwzględniając założenie, że cytoplazmy sterylizujące C oraz G u żyta mają prawdopodobnie takie samo podłoże genetyczne (Warzecha i Salak-Warzecha 1996) i należą do typu Vavilovii (Geiger 1982; Łapiński i Stojałowski 1996, 2003), można uznać, iż główne geny przywracające płodność znajdujące się na długim ramieniu chromosomu 4R opisywane, jako *Rfg1* i *Rfc1*, są tożsame. Obecny stan wiedzy dotyczący CMS nie pozwala jednoznacznie stwierdzić czy geny zlokalizowane na długim ramieniu chromosomu 4R: *Rfg1* i *Rfc1* (Börner i in. 1998; Stojałowski i in. 2004b, 2011; Milczarski i in. 2016) współdziałające odpowiednio z cytoplazmą G i C oraz geny *Rfp1*, *Rfp2* i *Rfp3* (Miedaner i in. 2000; Hackauf i in. 2017) przywracające męską płodność u żyta z cytoplazmą Pampa, należą do sprzężonych *loci* czy też są formami allelicznymi tego samego *locus*. Biorąc pod uwagę fakt bezsprzecznej odrębności genetycznej CMS-Pampa od CMS-Vavilovii bardziej prawdopodobna wydaje się teza wskazująca na istnienie oddzielnych genów położonych w sprzężonych ze sobą *loci*.

Jak wspomniano powyżej, główny gen restorerowy (*Rfc1*) dla żyta z CMS-C został zlokalizowany na chromosomie 4RL (Stojałowski i in. 2004b), jednakże jego istnienie nie wyjaśnia w pełni mechanizmu przywracania męskiej płodności u żyta z tą cytoplazmą. Według opracowania Łapińskiego (1990) w dziedziczeniu męskiej płodności biorą udział minimum 3 pary niezależnych genów. W publikacji z 2004 roku, w której opisano lokalizację genu *Rfc1* na chromosomie 4RL, zasugerowano możliwość obecności dodatkowego, pobocznego genu na chromosomie 6R, ale autorzy sygnalizowali, że to wskazanie jest mało precyzyjne i wymaga głębokiej weryfikacji (Stojałowski i in. 2004b). Potencjalna lokalizacja pobocznego genu restorerowego u żyta z CMS-C na 6R wydaje się o tyle prawdopodobna, ponieważ Melz i Adolf (1991) wskazali ten sam chromosom jako źródło jednego z pobocznych genów współdziałających z CMS-G. W tej samej pracy Melz i Adolf (1991)

opisali obecność kolejnego genu pobocznego istotnego dla przywracania męskiej płodności w cytoplazmie G na chromosomie 3R. To wskazanie zostało niedawno potwierdzone przez Vendelbo i in. (2021), którzy zmapowali gen o nazwie *RfNOS1* na długim ramieniu chromosomu 3R. Interesujące w świetle wyników opisanych w niniejszej rozprawie może być to, iż Melz i Adolf (1991) zauważyli nietypową segregację fenotypową w mieszańcach trisomicznych względem chromosomu 2R, ale zaobserwowane odstępstwa od oczekiwań były ich zdaniem niewystarczające do postawienia hipotezy o obecności kolejnego genu restorerowego w tej lokalizacji.

Geny przywracające męską płodność w różnych systemach CMS u gatunków spokrewnionych mogą mieć wspólne ewolucyjnie pochodzenie lub też, z uwagi na ich częsty związek z kodowaniem białek typu PPR (ang. *pentatricopeptide repeat*), mogą tworzyć bloki sprzężonych *loci*. Z tego powodu porównanie danych o lokalizacji tego rodzaju genów u spokrewnionych z żytem zbóż może pomóc w zrozumieniu mechanizmu dziedzicznej kontroli tworzenia funkcjonalnego pyłku przy obecności cytoplazmatycznych czynników warunkujących męską sterylność. Geny przywracające płodność o nazwach *Rf6* (Ma i in. 1995) oraz *Rfm1* (Matsui i in. 2001) zostały zmapowane na krótkich ramionach chromosomów 6D i 6H u pszenicy i jęczmienia, odpowiednio. Regiony 6DS oraz 6HS, tak jak i segment, na którym znajduje się gen *Rfp1* na długim ramieniu chromosomu żyta 4R, są względem siebie ortologiczne (Devos i in. 1993; Hackauf i in. 2012). Z jednej strony ten fakt pomógł przy opracowywaniu markerów COS do mapowania chromosomu 4RL (Hackauf i in. 2017), ale też otworzył możliwość wykorzystania tych markerów do mapowania genów przywracających płodność w obrębie innych gatunków plemienia *Triticeae*.

Materiał badawczy użyty w niniejszej rozprawie do otrzymania populacji mapującej wytworzono stosując metodę typową dla tworzenia linii blisko-izogenicznych (ang. *Near Isogenic Lines* - NIL). Populacja mapująca [544C x MOt]BC1 oraz jej dwie kolejne generacje (BC2 i BC3) były tworzone na drodze krzyżowań wstecznych wypierających połączonych z selekcją opartą o dwie metody oceny męskiej płodności roślin. Przed rozpoczęciem krzyżowań wstecznych przeprowadzono w obrębie populacji F2 analizy z wykorzystaniem markerów molekularnych w celu wyselekcjonowania do dalszych prac genotypów męskopłodnych, ale pozbawionych głównego genu przywracającego płodność z chromosomu 4R (gen *Rfc1*). Poprawność analiz wykonanych przed rozpoczęciem krzyżowań zweryfikowano w otrzymanej populacji mapującej BC1 przy zastosowaniu nowego markera typu COS (TC363404). Pierwszy etap selekcji wykonany został przed rozpoczęciem prac opisanych w niniejszej rozprawie (materiał wyjściowy do badań został udostępniony przez

pracowników macierzystej jednostki), natomiast weryfikacja skuteczności selekcji w pokoleniu BC1 została wykonana w ramach realizacji tej pracy doktorskiej. Ze względu na to, że obie analizy (na dwóch różnych etapach tworzenia materiału badawczego) były w pełni zgodne, dalsze krzyżowania wsteczne (BC2 i BC3) wykonywano wyłącznie w oparciu o oceny fenotypowe zakładając, że pozwolą one na otrzymanie populacji mapujących, w których efekty przywracania płodności będą zawężone do działania genów pobocznych (alternatywnych wobec genu głównego *Rfc1*). Krzyżowania wsteczne zakończono w pokoleniu [544C x MOt]BC3, a dalsze rozmnożenia populacji mapującej realizowano na drodze chowu wsobnego roślin męskopłodnych (aż do pokolenia BC3F5). Wybrane populacje mieszańcowe zostały następnie użyte w analizach technologią DArTseq.

Poszukiwania markerów sprzężonych z pobocznymi genami restorerowymi dla systemu CMS-C rozpoczęto od selekcji markerów opartych na PCR, polimorficznych w obrębie linii rodzicielskich 544C i Ot0-20 populacji mapującej. Dalsze analizy prowadzone były z zastosowaniem prób zbiorczych (składających się z osobników populacji mapującej), które zostały utworzone na podstawie wyników oceny fenotypowej. Opracowana przez Michelmora i in. (1991) metoda prób zbiorczych, czyli BSA (ang. *Bulk Segregant Analysis*) polega na utworzeniu dwóch skrajnie różniących się grup, z których każda zawiera zmieszane izolaty DNA z 10-20 osobników o podobnych wartościach badanej cechy fenotypowej. Tym samym tworzone są dwie próby zbiorcze reprezentujące skrajnie odmienne fenotypy, które następnie wykorzystywane są w prowadzonych analizach laboratoryjnych zamiast licznych pojedynczych genotypów. Utworzenie prób zbiorczych w dużym stopniu ogranicza koszty analiz. Metodę BSA wykorzystano wcześniej, między innymi w badaniach dotyczących genów przywracających płodność występujących u roślin charakteryzujących się cytoplazmą sterylizującą G (Börner i in. 1998) oraz cytoplazmą sterylizującą C (Stojałowski i in. 2004b). Populacja mapująca [544C x MOt]BC1 użyta w badaniach, pomimo braku obecności głównego genu przywracającego płodność zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 4R (Stojałowski i in. 2004a, 2004b, 2011; Stojałowski i Milczarski 2005; Stojałowski 2010; Milczarski i in. 2016), składała się z roślin męskosterylnych i z pojedynków tworzących pyłek. Na próbach zbiorczych zostały przeprowadzone analizy z wykorzystaniem wcześniej wyselekcjonowanych 128 polimorficznych markerów molekularnych (125 COS i 3 SCAR). Po zastosowaniu metody BSA z przetestowanych markerów COS wybrano te, które wykazały korelację z cechą męskiej płodności u żyta. Ostatnim etapem była analiza wybranych markerów molekularnych typu COS przeprowadzona na populacji mapującej [544C x MOt]BC1. Z wszystkich 274 markerów (271 typu COS i 3 typu SCAR) tylko jeden marker

polimorficzny (c892) typu COS zlokalizowany na chromosomie 2R wykazywał związek z cechą męskiej płodności.

Ze względu na zidentyfikowanie zaledwie jednego markera COS wykazującego korelację z męską płodnością w badanej populacji mapującej, w kolejnym etapie badań wykorzystano bardziej wydajną metodę generowania markerów. Wybór padł na wysokoprzepustową technologię DArTseq, która pozwala na otrzymanie dużej liczby markerów molekularnych o dwojakim charakterze. Pierwszy rodzaj pozyskiwanych danych markerowych (SilicoSArT) jest bardziej liczny, natomiast drugi (SNP) jest bardziej informatywny. Ze względu na stosunkowo wysoki koszt przeprowadzenia analiz DArTseq, badania zostały ograniczone do 104 pojedynków populacji mapujących [544C x MOt]BC3F3 oraz [544C x MOt]BC3F4 ocenionych fenotypowo w jednym sezonie wegetacyjnym. Wyniki segregacji markerów molekularnych zestawiono z wynikami oceny fenotypowej przy zastosowaniu nieparametrycznego testu rangowego Kruskala-Wallisa (test K-W). Pozwoliło to na wyselekcjonowanie markerów DArTseq, które wykazywały znaczącą korelację z wynikami oceny pylenia. Test Kruskala-Wallisa umożliwia identyfikację *loci* genów odpowiedzialnych za dane cechy użytkowe bez względu na rodzaj rozkładu fenotypowego (Kruglyak i Lander 1995). Markery DArTseq, które wykazywały w teście Kruskala-Wallisa istotny statystycznie związek z przywracaniem męskiej płodności w badanej populacji mapującej zmapowano na sekwencji genomu żyta opublikowanej przez Rabanus-Wallace'a i in. (2021). Dwa bloki licznych, sprzężonych markerów wykazujących statystycznie istotny związek z męską płodnością zostały zidentyfikowane na chromosomach 2R oraz 5R. Zmapowanie tych bloków uznano za podstawę do wskazania lokalizacji genów przywracających męską płodność w cytoplazmie C.

Wydaje się, że lokalizację *locus* genu odpowiedzialnego za przywracanie męskiej płodności u żyta ozimego z cytoplazmą sterylizującą C na chromosomie 2R można uznać za wysoce wiarygodną. Lokalizacja ta została najpierw wskazana w analizach markerami molekularnymi typu COS na populacji mapującej [544C x MOt]BC1, a następnie potwierdzona przez wyniki uzyskane dzięki zastosowaniu technologii DArTseq z wykorzystaniem nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa przeprowadzonego na populacjach mapujących reprezentujących kolejne generacje tego samego mieszańca: [544C x MOt]BC3F3 i [544C x MOt]BC3F4. Jak wspomniano powyżej, możliwość występowania pobocznego genu restorerowego na chromosomie 2R była zasygnalizowana (choć niepotwierdzona) w badaniach Melza i Adolfa (1991) prowadzonych na życie z cytoplazmą G. O obecności na chromosomach 2A i 2B genów przywracających męską płodność u pszenic

z cytoplazmami *T. timopheevi* oraz *Ae. kotschy* donosili Ahmed i in. (2001). Według badań Devos i in. (1993) można założyć, że chromosomy 2A i 2B wykazują znaczne podobieństwo do chromosomu 2R. Zgodnie z wcześniej zasygnalizowaną teorią, możemy przyjąć, iż geny restorerowe dla różnych systemów CMS są często odpowiedzialne za kodowanie białek z rodziny PPR, a te mogą występować w genomie w postaci sprzężonych ze sobą bloków genów (Linke i Börner 2005; Saha i in. 2007). Nie można więc wykluczyć, że na chromosomach z grupy homeologicznej 2 u pszenicy i żyta występują geny warunkujące przywracanie płodności roślin z różnymi cytoplazmami sterylizującymi (CMS).

Poza grupą markerów związanych z przywracaniem męskiej płodności, które zmapowano na chromosomie 2R, zidentyfikowano też za pomocą testu Kruskala-Wallisa dość liczną grupę sekwencji DArTseq przypisanych do chromosomu 5R. Lokalizacja ta nie była wcześniej sygnalizowana w literaturze naukowej opisującej poszukiwania genów przywracających męską płodność w cytoplazmach zaliczanych do typu CMS-Vavilovii. Wykonane w ramach tej rozprawy analizy z użyciem markerów opartych o PCR (głównie markery COS) też nie zakończyły się wskazaniem chromosomu 5R, jako nośnika genów zaangażowanych w kontrolę męskiej płodności żyta z cytoplazmą C. Wydaje się, że gen na tym chromosomie ma bardzo niewielki efekt fenotypowy, a co za tym idzie ma prawdopodobnie niewielkie znaczenie hodowlane (choć istnienie tego genu nie powinno być pomijane przy próbach pełnego wyjaśnienia badanego zjawiska). Według Miedanera i in. (2000) na chromosomie 5R jest zlokalizowany gen uczestniczący w przywracaniu męskiej płodności u żyta z cytoplazmą Pampa, ale jego efekt fenotypowy też był bardzo znikomy.

Zaprezentowane w niniejszej pracy wyniki analiz dotyczące zaledwie jednej populacji mapującej nie mogą zostać uznane za uniwersalne dla wyjaśnienia genetycznego podłoża męskiej płodności/sterylności w systemie cytoplazmatycznej męskiej sterylności C (CMS-C). Stanowią one jednak kolejny krok w kierunku lepszego poznania tego zjawiska. W ramach przyszłych badań należałoby przede wszystkim zwiększyć liczbę populacji mapujących oraz liczbę pojedynków w obrębie każdej populacji mapującej. U żyta uzyskanie licznej populacji mapującej jest często trudne do osiągnięcia ze względu na silną depresję wsobną. Zastosowanie w niniejszej pracy krzyżowań wstecznych z linią wsobną w połączeniu z następującym po nich ścisłym chowem wsobnym zastosowanym przy tworzeniu kolejnych pokoleń populacji mapującej zaowocowały bardzo wysokim odsetkiem strat (Tabela Z12). W wyniku tych strat liczebności kolejnych pokoleń populacji mapującej nie były większe niż kilkadziesiąt roślin. Dla porównania, do precyzyjnego zlokalizowania genów odpowiedzialnych za przywracanie płodności u petunii, roślin kapustnych, ryżu i sorgo

wykorzystano populacje mapujące których liczba sięgała od około 1000 do ponad 6000 pojedynków (Bentolila i Hanson 2001; Brown i in. 2003; Akagi i in. 2004; Klein i in. 2005). Oczywiście w ślad za zwiększeniem liczebności populacji mapujących, niezbędne byłoby także zwiększenie liczby markerów molekularnych o charakterze polimorficznym wśród których kluczowe byłyby te wykazujące bliską korelację z *locus* genu odpowiadającego za przywracanie płodności u żyta.

PODSUMOWANIA I WNIOSKI

1. W badanych pięciu europejskich odmianach żyta o charakterze historycznym nie stwierdzono występowania cytoplazmy sterylizującej typu Pampa (rośliny badanych odmian zawierały wyłącznie cytoplazmy Normalną i CMS-Vavilovii). W czterech polskich odmianach żyta uprawianych współcześnie zostały zidentyfikowane wszystkie trzy znane typy cytoplazm (Normalna, CMS-Pampa i CMS-Vavilovii). Odmiana Dańkowskie Diament składała się prawie wyłącznie z roślin z cytoplazmą CMS-Pampa.
2. Rośliny pochodzące z polskich odmian populacyjnych żyta ozimego (Armand, Dańkowskie Amber, Dańkowskie Diament i Horyzo) oraz historycznych populacji europejskich (Vjatka, Hungarian Giant i Landsorte K9538) znacznie skuteczniej przywracały męską płodność w mieszańcach zawierających cytoplazmę sterylizującą C (CMS-C zaliczana jest do grupy cytoplazm typu CMS-Vavilovii) w porównaniu do podobnych genetycznie mieszańców z cytoplazmą CMS-Pampa.
3. Efektywność przywracania męskiej płodności w systemie CMS-Pampa była w przypadku odmian historycznych (uprawianych w przeszłości) zauważalnie mniejsza niż u trzech odmian wpisanych do krajowego rejestru w ostatnim dwudziestolecu (wyniki dla czwartej odmiany z polskiej hodowli – Horyzo, były zbliżone do tych otrzymanych przy analizowaniu odmian dawno wycofanych z uprawy).
4. Populacja mieszańcowa [544C x MOt]BC1 oraz jej dalsze generacje otrzymane na drodze krzyżowań wstecznych i następnie chowu wsobnego (aż do pokolenia BC3F5) nie zawierały głównego genu restorerowego *Rfc1* (został wyeliminowany w wyniku preselekcji komponentów rodzicielskich z użyciem markerów SCAR). W efekcie segregacji fenotypowe na rośliny męskosterylne i męskopłodne w kolejnych pokoleniach wynikały z działania pobocznych genów restorerowych, a wytworzony materiał roślinny mógł pełnić rolę populacji mapującej do ich lokalizowania.
5. W wyniku analiz molekularnych w obrębie populacji mapującej, w których wykorzystano 274 markery oparte o PCR (271 markerów COS i 3 SCAR), zidentyfikowano jeden marker COS (c892) zlokalizowany na chromosomie 2R, który wykazywał korelację z cechą męskiej płodności.
6. Wyniki analiz populacji mapującej z użyciem technologii DArTseq pozwoliły na wskazanie lokalizacji dwóch nieznanych wcześniej genów aktywnych w procesie przywracania męskiej płodności żyta z cytoplazmą C. Geny te miały charakter genów pobocznych (ich efekty fenotypowe były stosunkowo niewielkie). Zmapowano je na chromosomach 2R oraz 5R.

ABSTRACT

Winter rye, despite the fact that it is of relatively small importance on a global scale, is one of the basic cereals in Polish agricultural production. The economic importance of rye in Poland is strongly related to its frost resistance and low soil requirements. It is primarily a fodder grain, but it also finds many other applications, e.g. in the grain milling industry, in the production of green mass or as a source of renewable energy. From the mid-80s of the 20th century, rye hybrid varieties began to be registered, which are characterized by better uniformity and significantly higher yield potential. Seed production of hybrid varieties of rye applies the phenomenon of cytoplasmic male sterility (CMS), which makes it possible to obtain sterile plants without manual castration. In winter rye, we distinguish two types of sterilizing cytoplasm: Pampa (CMS-P) i Vavilov (CMS-V). The cytoplasm of Vavilov includes sources of cytoplasmic male sterility such as: CMS-C, CMS-R, CMS-S and CMS-G, which are generally considered genetically identical. Almost all registered hybrid varieties of cultivated rye (*Secale cereale* L.) are based on CMS-P. The Pampa cytoplasm reveals a strong sterilizing effect, and thus it is difficult for breeders to effectively restore male fertility in hybrid varieties. Therefore, it would be worth introducing more varieties with an alternative type of sterilizing cytoplasm into cultivation - CMS-V. Wider use of the Vavilov cytoplasm would result in an increase in genetic diversity within hybrid varieties of rye, and at the same time, in the obtained hybrids, restoring male fertility should not be a problem. The intensification of breeding work on hybrid varieties based on the CMS-V system will be supported by a more accurate understanding of the genetic mechanisms responsible for fertility/sterility control.

In this paper, research was undertaken with the aim of: extending the knowledge on the occurrence of sterilizing cytoplasm in European populations of winter rye, assessing the frequency of nuclear sterility/fertility alleles in European populations of winter rye, and determining the chromosomal location of minor nuclear genes controlling the restoration of male fertility in the C cytoplasm.

As part of expanding knowledge about the occurrence of different types of cytoplasm in rye populations, four Polish population varieties and five European historical populations were tested using SCAR molecular markers (seeds of varieties not cultivated for several decades were obtained from gene banks). The results showed the absence of Pampa-type sterilizing cytoplasm in European historical winter rye varieties - only plants with Normal and CMS-Vavilov cytoplasm appeared in them. In Polish population varieties, the same two

types of cytoplasm occurred, but in two varieties (Dańkowskie Diament and Stanko) the presence of Pampa cytoplasm was additionally found. In the Dańkowskie Diament cultivar, plants with CMS-P constituted the dominant part of the population (only one of the tested plants had cytoplasm other than Pampa).

In order to estimate the frequency of nuclear sterility/fertility alleles in European populations of winter rye, test crosses were carried out with male sterile lines 541C (with C cytoplasm) and 541P (with Pampa cytoplasm), followed by visual phenotypic evaluation of the resulting hybrids. In total 2419 hybrid plants with Polish populations and European historical populations of winter rye as pollinators were assessed. Hybrids with sterilizing C cytoplasm generally showed more effective fertility restoration than hybrids with CMS-P. The individual rye populations studied differed more or less significantly in terms of their ability to restore male fertility. This was particularly noticeable in hybrids with the Pampa cytoplasm: the cultivars Dańkowskie Amber and Dańkowskie Diament, and to a slightly lesser extent Armand, were more effective in restoring male fertility than the Horyzo cultivar and the historical populations.

The mapping of minor genes involved in the restoration of male fertility in rye hybrids with cytoplasm C, was performed using the mapping population [544C x MOt]BC1 and its subsequent generations obtained by backcrossing, and then (from the BC3 generation) also inbreeding (F2-F5 generations). Pre-selection of paternal components used for hybridization, which was performed with the use of SCAR molecular markers, resulted in the fact that the examined generations of the mapping population did not contain the main restorer gene *Rfc1* located on the long arm of the 4R chromosome. Thanks to this, the pollination in some of plants observed in each subsequent segregating generation resulted from the presence of secondary restorer genes, allowing the use of produced plant material as a mapping population to determine the location of these genes. In the first stage of the study, molecular analyzes of the [544C x MOt]BC1 mapping population were carried out using 274 PCR-based markers (271 COS markers and 3 SCAR). As a result of these analyzes, one polymorphic marker (c892) was identified on chromosome 2R, showing a correlation with the fertility restoration. Next, analyzes of the [544C x MOt]BC3F3 and [544C x MOt]BC3F4 hybrid populations were performed using the DArTseq technology and the non-parametric Kruskal-Wallis test, and the results indicated chromosome 2R and 5R as the locations of minor restorer genes. The phenotypic effect of a gene located on chromosome 2R appears to be significantly greater than that of a gene located on chromosome 5R.

Keywords: rye, cytoplasmic male sterility, CMS-C, minor restorer genes, COS markers, DArTseq

STRESZCZENIE

Żyto ozime, mimo iż w skali światowej ma stosunkowo niewielkie znaczenie, to stanowi jedno z podstawowych zbóż w polskiej produkcji rolniczej. Znaczenie gospodarcze żyta w Polsce silnie wiąże się z jego mrozoodpornością i niewielkimi wymaganiami glebowymi. Jest ono przede wszystkim zbożem paszowym, ale znajduje również wiele innych zastosowań m.in. w przemyśle zbożowo-młynarskim, w produkcji zielonej masy czy też, jako źródło odnawialnej energii. Od połowy lat 80-tych XX wieku zaczęto rejestrować odmiany mieszańcowe żyta, które charakteryzują się lepszym wyrównaniem i wyraźnie większym potencjałem plonotwórczym. Produkcja nasienna odmian mieszańcowych żyta wykorzystuje zjawisko cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS), dzięki któremu możliwe jest otrzymanie roślin sterylnych bez ręcznego kastrowania. U żyta ozimego wyróżniamy dwa typy cytoplazm sterylizujących: Pampa (CMS-P) i Vavilovii (CMS-V). Do cytoplazmy Vavilovii zaliczamy źródła cytoplazmatycznej męskiej sterility takie jak: CMS-C, CMS-R, CMS-S i CMS-G, które powszechnie uznaje się za genetycznie tożsame. Prawie wszystkie zarejestrowane odmiany mieszańcowe żyta uprawnego (*Secale cereale* L.) oparte są na CMS-P. Cytoplazma Pampa wykazuje silne działanie sterylizujące, a co za tym idzie następcza hodowcom trudności przy skutecznym przywracaniu męskiej płodności w odmianach mieszańcowych. Dlatego też warto byłoby wprowadzić do uprawy większą liczbę odmian z alternatywnym typem cytoplazmy sterylizującej - CMS-V. Szersze wykorzystanie cytoplazmy Vavilovii spowodowałoby zwiększenie zróżnicowania genetycznego w obrębie odmian mieszańcowych żyta, a jednocześnie w uzyskiwanych mieszańcach przywrócenie męskiej płodności nie powinno stanowić trudności. Intensyfikacji prac hodowlanych nad odmianami mieszańcowymi opartymi o system CMS-V sprzyjać będzie dokładniejsze poznanie genetycznych mechanizmów odpowiedzialnych za kontrolę płodności/sterility.

W niniejszej pracy podjęto badania zmierzające do: poszerzenia wiedzy na temat występowania cytoplazm sterylizujących w europejskich populacjach żyta ozimego, oceny frekwencji jądrowych alleli sterility/płodności w europejskich populacjach żyta ozimego oraz określenia chromosomowej lokalizacji pobocznych genów jądrowych kontrolujących przywracanie męskiej płodności w cytoplazmie C.

W ramach poszerzenia wiedzy o występowaniu różnych typów cytoplazm w populacjach żyta, za pomocą markerów molekularnych SCAR przebadano cztery polskie odmiany populacyjne i pięć europejskich populacji historycznych (nasiona nieuprawianych od kilkudziesięciu lat odmian otrzymano z banków genów). Wyniki wykazały brak obecności

cytoplazmy sterylizującej typu Pampa w europejskich odmianach historycznych żyta ozimego – pojawiały się w nich wyłącznie rośliny z cytoplazmami Normalną i CMS-Vavilovii. W polskich odmianach populacyjnych występowały te same dwa rodzaje cytoplazm, ale w dwóch odmianach (Dańkowskie Diament i Stanko) stwierdzono dodatkowo obecność cytoplazmy Pampa. W odmianie Dańkowskie Diament rośliny z CMS-P stanowiły dominującą część populacji (tylko jedna z badanych roślin miała cytoplazmę inną niż Pampa).

W celu oszacowania frekwencji jądrowych alleli sterylności/płodności w europejskich populacjach żyta ozimego przeprowadzono krzyżowania testowe z udziałem męskosterylnych linii 541C (z cytoplazmą C) i 541P (z cytoplazmą Pampa), a następnie wzrokową ocenę fenotypową uzyskanych mieszańców. Ocenie poddano 2419 roślin mieszańcowych z polskimi odmianami oraz z europejskimi populacjami historycznymi żyta ozimego w roli zapylaczy. U mieszańców z cytoplazmą sterylizującą C generalnie obserwowano efektywniejsze przywracanie płodności niż u mieszańców z CMS-P. Poszczególne badane populacje żyta różniły się mniej lub bardziej znacznie pod względem zdolności do przywracania męskiej płodności. Szczególnie wyraźnie dawało się to zauważyć w przypadku mieszańców z cytoplazmą Pampa: odmiany Dańkowskie Amber i Dańkowskie Diament oraz w nieco mniejszym stopniu Armand były efektywniejsze w przywracaniu męskiej płodności niż odmiana Horyzo oraz populacje historyczne.

Mapowanie pobocznych genów zaangażowanych w przywracanie męskiej płodności w mieszańcach żyta z cytoplazmą C wykonano wykorzystując populację mapującą [544C x MOt]BC1 oraz jej kolejne generacje otrzymywane na drodze krzyżowania wstecznego, a następnie (od pokolenia BC3) również chowu wsobnego (pokolenia F2-F5). Preselekcja komponentów ojcowskich użytych do krzyżowania, którą wykonano z użyciem markerów molekularnych SCAR spowodowała, że badane pokolenia populacji mapującej nie posiadały głównego genu restorerowego *Rfc1* zlokalizowanego na długim ramieniu chromosomu 4R. Dzięki temu pylenie części roślin obserwowane w każdym kolejnym segregującym pokoleniu wynikało z obecności pobocznych genów restorerowych pozwalając na użycie wytworzonego materiału roślinnego, jako populacji mapującej do określenia lokalizacji tych genów. W pierwszym etapie badań przeprowadzono analizy molekularne populacji mapującej [544C x MOt]BC1 z wykorzystaniem 274 markerów opartych o metodę PCR (271 markerów typu COS i 3 SCAR). W wyniku tych analiz na chromosomie 2R zidentyfikowano jeden polimorficzny marker (c892) wykazujący korelację z cechą płodności. Następnie przeprowadzono analizy populacji mieszańcowych [544C x MOt]BC3F3 i [544C x MOt]BC3F4 wykorzystując technologię DArTseq oraz nieparametryczny test Kruskala-

Wallisa i uzyskano wyniki wskazujące na chromosomy 2R oraz 5R, jako lokalizacje pobocznych genów restorerowych. Efekt fenotypowy działania genu zlokalizowanego na chromosomie 2R wydaje się być znacząco większy niż genu z chromosomu 5R.

Słowa kluczowe: żyto, cytoplazmatyczna męska sterility, CMS- C, poboczne geny restorerowe, markery COS, DArTseq

ZAŁĄCZNIKI

Protokół Z1. Zmodyfikowany protokół ekstrakcji DNA roślinnego z zastosowaniem CTAB dla dwóch płytek (192 próbek):

1. Do rozdrobnionej wcześniej tkanki (około 70 mg) dodać 500 μ l buforu CTAB (wcześniej podgrzanego do 65°C).
2. Próbkę umieścić na 1 godzinę w łaźni wodnej w 65°C, a następnie dobrze schładzać przez około 30 minut.
3. Dodać 400 μ l roztworu Chloroform/Alkohol izoamylowy 24:1, a następnie próbkę wytrząsać wertykalnie przez 15 minut w 4°C.
4. Wirować próbkę przez 30 minut w wirówce nastawionej na 4°C przy prędkości 3850rpm.
5. Do czystych płytek MTP dodać po 6,25 μ l roztworu RNAzy (10mg/ml = 400U/ml) do każdej studzienki.
6. Za pomocą tipsów ze ściętymi końcówkami przenieść 400 μ l (2 x 200 μ l) supernatantu na wcześniej przygotowane płytki MTP (punkt 5). Płytki dokładnie przykryć matą i wymieszać zawartość poprzez odwracanie, następnie należy je umieścić w cieplarni w 37°C na 15 minut.
7. Dodać 280 μ l zmrożonego alkoholu izoamylowego i inkubować próby w -20°C przez około 15 minut.
8. Wirować płytki przez 20 minut w 4°C przy prędkości 3850rpm.
9. Kolejnym etapem jest zlanie supernatantu i dodanie 350 μ l Buforu płuczającego 1 (76% etanol/200mM octan sodowy).
10. Wirować przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy prędkości 3850rpm, następnie zlać zawartość płytek i dodać 350 μ l Buforu płuczającego 2 (76% etanol/10mM octan amonowy).
11. Wirować przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy prędkości 3850rpm, ponownie zlać zawartość płytek i dodać 350 μ l zmrożonego etanolu 80%.
12. Wirować przez 10 minut w temperaturze pokojowej przy prędkości 3850rpm, a następnie zlać zawartość płytek i umieścić je w cieplarni w 37°C przez 10 minut (nie przykrywać płytki MTP matą).

Tak otrzymane DNA rozpuścić w 100 μ l buforu TE (10mM Tris/1mM EDTA).

Tabela Z1. Lista markerów molekularnych przetestowanych na liniach rodzicielskich 544C i Ot0-20.

Chromosom	Marker	Temperatura annealingu [°C]	MgCl [μl]	Typ markera	Źródło
1R	CA498871	50	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	FJ374562 1	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	HAS175	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	IA-215	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	IA-294	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	IAG95	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	KUR1001	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	ORA14	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	ORA17	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	OSEC	50	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
1R	PUR1R	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	SCPgk_1	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	TC140079	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	TC3185g	55	4	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	TC333053g 1	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	TC3661	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	TC370686g	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
1R	TC72745	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	TC76051	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos1005	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos103	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos109	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos114	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos121	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos1339	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos134	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos137	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos138	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos143	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos144	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos152	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos159	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos162	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos164	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos1946	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos202	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos206	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos2138	55	4	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos214	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos220	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane

1R	tcos227	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos233	60	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos26	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos29	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos33	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos3564	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos38	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos43	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos44	60	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
1R	tcos53	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos65	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos67	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
1R	tcos91	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	tcos93	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	TOP1088	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	TOP1094	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
1R	Xucr5	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
2R	c115	55	1.5	Dominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c1249	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c127	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c1332	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c1560	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c2609	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c282	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c3339	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c431_1	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c431_2	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c442	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c474	55	1.5	Dominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c614	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c738	55	1.5	Dominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c800	55	1.5	Kodominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c870	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c892	55	1.5	Dominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c921	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c983	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	c998	55	1.5	Dominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	GRM	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
2R	TC101821	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
2R	TC35485	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
2R	TC371388g	65	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
2R	TC395749g	55	2.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
2R	tcos2351	50	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
2R	tcos2584	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
2R	tcos2643	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane

2R	tcos329	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
2R	tcos5085	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
3R	c1115	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c1189	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c1361	55	1.5	Dominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c1464	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c1473	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c1616	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c1710	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c1992	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c2193	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c298	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c308	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c344	55	1.5	Kodominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c3934	55	1.5	Kodominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c549	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c578	55	1.5	Dominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c625	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c651	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c761	55	1.5	brak amplifikacji	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c762	55	1.5	Dominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c825	55	1.5	Dominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c849	55	1.5	Monomorficzny	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	c991	55	1.5	Kodominujący	Sobczyk Tab.12, 2023
3R	EU931290 5	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
3R	FJ374551 1	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	FJ374567 2	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
3R	FJ374595 10	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	FJ374607 1	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
3R	FJ374614 2	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
3R	HAS79	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
3R	ORA002	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	ScIce2-1	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	TC187783g 1	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
3R	TC2479g	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
3R	TC312604g 3	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	TC318429g 5	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
3R	TC368630g	65	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	tcos1693	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	tcos2235	60	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	tcos2970	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	tcos575	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
3R	tcos658	60	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
3R	tcos679	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
3R	TNAC1280	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane

4R	AK248154	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	AK249191	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	AK250201_1	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	AK250201_2	55	1.5	Dominujący	Hackauf i in.2017
4R	AK250201_4	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
4R	AK250897a	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf i in.2017
4R	AK250908	55	2.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	AK252386	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	AK355929	55	1.5	Dominujący	Hackauf i in.2017
4R	AK358008_2	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf i in.2017
4R	AK358008_4	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	AK358008_5	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	AK361559	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	AK364730	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf i in.2017
4R	AK366579	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf i in.2017
4R	AK367861	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	AK372235	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	AK372685	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	AK373477	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	AK375163_2	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	AK376710	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c110579	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
4R	c11822	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	c1659	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c17695	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c18169a	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c20846	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
4R	c22526	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c22574	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c2624	65	2.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	c27559	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	c28385	55	1.5	Dominujący	Hackauf i in.2017
4R	c29331	55	1.5	Dominujący	Hackauf i in.2017
4R	c3116a_2	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c3116a_3	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	c3116a_4	60	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c35973	50	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c3765_2	65	2.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	c51687	55	1.5	Dominujący	Hackauf i in.2017
4R	c5542_1	60	1.5	Dominujący	Hackauf i in.2017
4R	c5542_2	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf i in.2017
4R	c5560	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf i in.2017
4R	c5623_1	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	c74941	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	c84230	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane

4R	c84394	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
4R	d508318F6R249	55	1.5	Dominujący	Milczarski i in. 2016
4R	MtrA22	55	1.5	Dominujący	niepublikowane ZUT
4R	MWG2218	55	2.5	Dominujący	Hackauf i in.2017
4R	SCSz23L500	55	1.5	Dominujący	Stożalowski, Rozp.habil
4R	TC110922	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf i in.2017
4R	TC112013	65	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	TC120635	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	TC122582	55	2.5	Dominujący	Hackauf i in.2017
4R	TC176835	60	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	TC281179	55	1.5	Dominujący	Hackauf i in.2017
4R	TC33335g	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	TC363404	55	2.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	TC368844g	50	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	TC408265g	60	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	TC80147	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	tcos1032	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos1520	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos1521	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos1547	65	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos1555	55	1.5	Kodominujący	Hackauf i in.2017
4R	tcos1787	55	2	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos1790	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos2610	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
4R	tcos2629	60	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
4R	tcos4207	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos946	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos959	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos968	60	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	tcos970	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	TNAC1287	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	TNAC1394	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
4R	TNAC1594	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	cp29006	60	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	cp36011	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	HvBMY1g	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
5R	ScCbf12_1	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	ScDhn1	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	TaAGP-L2	50	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	TC372539g	60	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	TC372974g	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1010	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1090	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1125	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1137	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane

5R	tcos1166	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1171	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1172	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1173	55	3	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1174	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1305	60	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1308	60	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1358	60	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1475	50	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	tcos1511	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	tcos2279	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	tcos2964	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	tcos3066	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	tcos3096	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	tcos3539	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	tcos4324	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	tcos4496	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	tcos751	50	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	TNAC1388	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
5R	TNAC1390	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	TNAC1391	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
5R	TNAC1392	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
5R	TNAC1531	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
6R	AK250897	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf i in.2017
6R	c16555	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
6R	c1800	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
6R	c28623	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
6R	c3885	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
6R	c8433	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
6R	FJ374530 10	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
6R	ScDhn3	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
6R	TC36852g	55	2.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
6R	TC376848g	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
6R	tcos1435	60	2.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
6R	tcos1553	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
6R	tcos1594	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
6R	tcos1617	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
6R	tcos1647	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
6R	tcos2685	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
6R	TNAC1727	60	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
6R	TNAC1840	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
7R	TC264149b	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
7R	TC372071g	55	1.5	Dominujący	Hackauf niepublikowane
7R	TC383145g-5	60	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
7R	tcos1009	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane

7R	tcos1052	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
7R	tcos1279	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
7R	tcos167	60	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane
7R	tcos2154	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
7R	tcos3399	55	1.5	brak amplifikacji	Hackauf niepublikowane
7R	tcos872	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
7R	TNAC1622	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
	TC412294g	55	1.5	Monomorficzny	Hackauf niepublikowane
	TC414209g	55	1.5	Kodominujący	Hackauf niepublikowane

Tabela Z2. Skład mieszanin reakcyjnych enzymów restrykcyjnych stosowany dla produktów PCR-COS.

Komponenty	1 próba dla mieszaniny 10 μ L
Produkt PCR	5 μ l
10x Bufor CutSmart	1 μ L
H ₂ O	3,925 μ L
Hinf I (10U/ μ L)	0,05 μ L
HindIII (20U/ μ L)	0,025 μ L
Ogółem	10 μ L
Inkubacja w 37°C przez około 4h	

Komponenty	1 próba dla mieszaniny 10 μ L
Produkt PCR	5 μ l
10x Bufor CutSmart	1 μ L
H ₂ O	3,925 μ L
HaeIII (10U/ μ L)	0,05 μ L
Dra I (20U/ μ L)	0,025 μ L
Ogółem	10 μ L
Inkubacja w 37°C przez około 4h	

Komponenty	1 próba dla mieszaniny 10 μ L
Produkt PCR	5 μ l
10x Bufor CutSmart	1 μ L
H ₂ O	3,925 μ L
HinP1 I (10U/ μ L)	0,05 μ L
EcoR I (20U/ μ L)	0,025 μ L
Ogółem	10 μ L
Inkubacja w 37°C przez około 4h	

Komponenty	1 próba dla mieszaniny 10 μ L
Produkt PCR	5 μ l
10x Bufor CutSmart	1 μ L
H ₂ O	3,925 μ L
Rsa I (10U/ μ L)	0,05 μ L
XbaI (20U/ μ L)	0,025 μ L
Ogółem	10 μ L
Inkubacja w 37°C przez około 4h	

Komponenty	1 próba dla mieszaniny 10 μ L
Produkt PCR	5 μ l
10x Bufor CutSmart	1 μ L
BSA (100 μ g/mL)	0,1 μ L
H ₂ O	3,85 μ L
TaqI (20U/ μ L)	0,05 μ L
Ogółem	10 μ L
Inkubacja w 65°C przez około 6h	

Tabela Z3. Identyfikacja typu cytoplazm w odmianie populacyjnej Dańkowskie Diament z wykorzystaniem markerów mitochondrialnych typu SCAR.

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cyto plaz ma
	P	V/N	P	V	
1	+	-	+	-	P
2	+	-	+	-	P
3	+	-	+	-	P
4	+	-	+	-	P
5	+	-	+	-	P
6	+	-	+	-	P
7	+	-	+	-	P
8	+	-	+	-	P
9	+	-	+	-	P
10	+	-	+	-	P
11	+	-	+	-	P
12	+	-	+	-	P
13	+	-	+	-	P
14	+	-	-	-	P
15	+	-	+	-	P
16	+	-	+	-	P
17	+	-	+	-	P
18	+	-	+	-	P
19	+	-	+	-	P
20	+	-	+	-	P
21	+	-	+	-	P
22	+	-	+	-	P
23	+	-	+	-	P
24	+	-	+	-	P
25	+	-	+	-	P
26	+	-	+	-	P
27	-	+	-	-	N
28	+	-	+	-	P
29	+	-	+	-	P
30	+	-	+	-	P
31	+	-	+	-	P
32	+	-	+	-	P
33	+	-	+	-	P
34	+	-	+	-	P
35	+	-	+	-	P
36	+	-	+	-	P
37	+	-	+	-	P
38	+	-	+	-	P

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cyto plaz ma
	P	V/N	P	V	
39	+	-	+	-	P
41	+	-	+	-	P
42	+	-	+	-	P
43	+	-	+	-	P
44	+	-	+	-	P
45	+	-	+	-	P
46	+	-	+	-	P
47	+	-	+	-	P
48	+	-	+	-	P
49	+	-	+	-	P
50	+	-	+	-	P
51	+	-	+	-	P
52	+	-	+	-	P
53	+	-	+	-	P
54	+	-	+	-	P
55	+	-	+	-	P
56	+	-	+	-	P
57	+	-	+	-	P
58	+	-	+	-	P
59	+	-	+	-	P
60	+	-	+	-	P
61	+	-	+	-	P
62	+	-	+	-	P
63	+	-	+	-	P
64	+	-	+	-	P
65	+	-	+	-	P
66	+	-	+	-	P
67	+	-	+	-	P
68	+	-	+	-	P
69	+	-	+	-	P
70	+	-	+	-	P
71	+	-	+	-	P
72	+	-	+	-	P
73	+	-	+	-	P
74	+	-	+	-	P
75	+	-	+	-	P
76	+	-	+	-	P
77	+	-	+	-	P

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cyto plaz ma
	P	V/N	P	V	
78	+	-	+	-	P
80	+	-	+	-	P
81	+	-	+	-	P
82	+	-	+	-	P
83	+	-	+	-	P
84	+	-	+	-	P
85	+	-	+	-	P
86	+	-	+	-	P
87	+	-	+	-	P
88	+	-	+	-	P
89	+	-	+	-	P
90	+	-	+	-	P
91	+	-	+	-	P
92	+	-	+	-	P
93	+	-	+	-	P
94	+	-	+	-	P
95	+	-	+	-	P
96	+	-	+	-	P

+	Produkt
-	Brak produktu
P	cytoplazma Pampa
V	cytoplazma Vavilovi
N	cytoplazma Normalna
V/N	cytoplazma Vavilovi lub Normalna

Tabela Z4. Identyfikacja typu cytoplazm w odmianie populacyjnej Bosmo z wykorzystaniem markerów mitochondrialnych typu SCAR.

Nr roś	cox1		nad6		nad2		Cytoplazma
	P	V/N	P	V	P	V	
1	-	+	-	-	-	-	N
2	-	+	-	-	-	-	N
3	-	+	-	+	-	-	V
4	-	+	-	-	-	-	N
5	-	+	-	-	-	-	N
6	-	+	-	-	-	-	N
7	-	+	-	+	-	-	V
8	-	+	-	+	-	-	V
9	-	+	-	-	-	-	N
10	-	+	-	+	-	-	V
11	-	+	-	-	-	-	N
12	-	+	-	-	-	-	N
13	-	+	-	+	-	-	V
14	-	+	-	+	-	-	V
15	-	+	-	-	-	-	N
16	-	+	-	+	-	-	V
17	-	+	-	+	-	-	V
18	-	+	-	-	-	-	N
19	-	+	-	-	-	-	N
20	-	+	-	-	-	-	N
21	-	+	-	+	-	-	V
22	-	+	-	+	-	-	V
23	-	+	-	+	-	-	V
24	-	+	-	-	-	-	N
25	-	+	-	+	-	-	V
26	-	+	-	-	-	-	N
27	-	+	-	-	-	-	N
28	-	+	-	+	-	-	V
29	-	+	-	+	-	-	V
30	-	+	-	-	-	-	N
31	-	+	-	+	-	-	V
32	-	+	-	+	-	-	V
33	-	+	-	-	-	-	N
34	-	+	-	+	-	-	V
35	-	+	-	-	-	-	N
36	-	+	-	-	-	-	N
37	-	+	-	-	-	-	N
38	-	+	-	-	-	-	N
39	-	+	-	-	-	-	N

Nr roś	cox1		nad6		nad2		Cytoplazma
	P	V/N	P	V	P	V	
40	-	+	-	+	-	+	V
41	-	+	-	-	-	+	V
42	-	+	-	-	-	-	N
43	-	+	-	-	-	+	V
44	-	+	-	-	-	+	V
45	-	+	-	-	-	+	V
46	-	+	-	-	-	-	N
47	-	+	-	-	-	+	V
48	-	+	-	-	-	+	V
49	-	+	-	-	-	+	V
50	-	+	-	-	-	+	V
51	-	+	-	-	-	+	V
52	-	+	-	-	-	+	V
53	-	+	-	-	-	+	V
54	-	+	-	-	-	-	N
55	-	+	-	-	-	+	V
56	-	+	-	-	-	-	N
57	-	+	-	-	-	+	V
58	-	+	-	-	-	-	N
59	-	+	-	-	-	+	V
60	-	+	-	-	-	+	V
61	-	+	-	-	-	-	N
62	-	+	-	-	-	+	V
63	-	+	-	-	-	-	N
64	-	+	-	-	-	+	V
65	-	+	-	-	-	+	V
66	-	+	-	-	-	-	N
67	-	+	-	-	-	+	V
68	-	+	-	-	-	+	V
69	-	+	-	-	-	-	N
70	-	+	-	-	-	+	V
71	-	+	-	-	-	+	V
72	-	+	-	-	-	-	N
73	-	+	-	-	-	+	V
74	-	+	-	-	-	-	N
75	-	+	-	-	-	-	N
76	-	+	-	-	-	-	N
77	-	+	-	-	-	-	N
78	-	+	-	-	-	-	N

Nr roś	cox1		nad6		nad2		Cytoplazma
	P	V/N	P	V	P	V	
79	-	+	-	-	-	+	V
80	-	+	-	-	-	-	N
81	-	+	-	-	-	+	V
82	-	+	-	-	-	+	V
83	-	+	-	-	-	+	V
84	-	+	-	-	-	-	N
85	-	+	-	-	-	+	V
86	-	+	-	-	-	+	V
87	-	+	-	-	-	-	N
88	-	+	-	-	-	+	V
89	-	+	-	-	-	+	V
90	-	+	-	-	-	+	V
91	-	+	-	-	-	-	N
92	-	+	-	-	-	+	V
93	-	+	-	-	-	+	V
94	-	+	-	-	-	+	V
95	-	+	-	-	-	+	V

+	Produkt
-	Brak produktu
P	cytoplazma Pampa
V	cytoplazma Vavilovi
N	cytoplazma Normalna
V/N	cytoplazma Vavilovi lub Normalna

Tabela Z5. Identyfikacja typu cytoplazm w odmianie populacyjnej Amilo, z wykorzystaniem markerów mitochondrialnych typu SCAR.

Nr roś	cox1		nad6		nad2		Cytoplazma
	P	V/N	P	V	P	V	
1	-	+	-	+			V
2	-	+	-	+			V
3	-	+	-	-			N
4	-	+	-	-			N
5	-	+	-	-			N
6	-	+	-	-			N
7	-	+	-	-			N
8	-	+	-	-			N
9	-	+	-	-			N
10	-	+	-	+			V
11	-	+	-	-			N
12	-	+	-	+			V
13	-	+	-	-			N
14	-	+	-	+			V
15	-	+	-	-			N
16	-	+	-	+			V
17	-	+	-	+			V
18	-	+	-	+			V
19	-	+	-	+			V
20	-	+	-	+			V
21	-	+	-	-			N
22	-	+	-	-			N
23	-	+	-	+			V
24	-	+	-	+			V
25	-	+	-	+			V
26	-	+	-	+			V
27	-	+	-	-			N
28	-	+	-	-			N
29	-	+	-	-			N
30	-	+	-	-			N
31	-	+	-	+			V
32	-	+	-	-			N
33	-	+	-	+			V
34	-	+	-	+			V
35	-	+	-	+			V
36	-	+	-	+			V
37	-	+	-	-			N
38	-	+	-	-			N
39	-	+	-	+			V

Nr roś	cox1		nad6		nad2		Cytoplazma
	P	V/N	P	V	P	V	
40	-	+	-	-			N
41	-	+	-	+			V
42	-	+	-	+			V
43	-	+	-	-			N
44	-	+	-	-			N
45	-	+	-	-			N
46	-	+	-	-			N
47	-	+	-	+			V
48	-	+	-	-			N
49	-	+	-	-			N
50	-	+	-	+			V
51	-	+	-	+			V
52	-	+	-	+			V
53	-	+	-	+			V
54	-	+	-	-			N
55	-	+	-	+			V
56	-	+	-	+			V
57	-	+	-	-			N
58	-	+	-	-			N
59	-	+	-	-			N
60	-	+	-	+			V
61	-	+	-	+			V
62	-	+	-	+			V
63	-	+	-	+			V
64	-	+	-	+			V
65	-	+	-	+			V
66	-	+	-	+			V
67	-	+	-	+			V
68	-	+	-	+			V
69	-	+	-	+			V
70	-	+	-	+			V
71	-	+	-	+			V
72	-	+	-	+			V
73	-	+	-	+			V
74	-	+	-	+			V
75	-	+	-	+			V
76	-	+	-	+			V
77	-	+	-	+			V
78	-	+	-	+			V

Nr roś	cox1		nad6		nad2		Cytoplazma
	P	V/N	P	V	P	V	
79	-	+	-	+			V
80	-	+	-	+			V
81	-	+	-	+			V
82	-	+	-	-			N
83	-	+	-	+			V
84	-	+	-	-			N
85	-	+	-	+			V
86	-	+	-	+			V
87	-	+	-	+			V
88	-	+	-	-			N
89	-	+	-	+			V
90	-	+	-	+			V
91	-	+	-	+			V
92	-	+	-	+			V
93	-	+	-	+			V
94	-	+	-	+			V
95	-	+	-	+			V
96	-	+	-	+			V

+	Produkt
-	Brak produktu
P	cytoplazma Pampa
V	cytoplazma Vavilovi
N	cytoplazma Normalna
V/N	cytoplazma Vavilovi lub Normalna

Tabela Z6. Identyfikacja typu cytoplazm w odmianie populacyjnej Stanko z wykorzystaniem markerów mitochondrialnych typu SCAR.

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
1	-	+	-	-	N
11	-	+	-	+	V
12	+	+	+	-	P
13	+	+	+	-	P
15	+	+	+	-	P
19	-	+	-	-	N
20	+	+	+	-	P
21	-	+	-	-	N
22	-	+	-	-	N
26	-	+	-	-	N
27	+	-	+	-	P
28	-	+	-	+	V
29	-	+	-	+	V
30	+	+	+	-	P
31	-	+	-	-	N
32	-	+	-	-	N
34	-	+	-	-	N
35	+	-	+	-	P
36	+	+	+	-	P
37	+	+	+	-	P
38	-	+	-	-	N
40	-	+	-	+	V
43	+	+	+	-	P
44	+	+	+	-	P
45	-	+	-	+	V
46	-	+	-	+	V
47	+	+	+	-	P
49	-	+	-	-	N
50	+	-	+	-	P
52	+	+	+	-	P
53	-	+	-	-	N
54	+	-	+	-	P
55	-	+	-	+	V
56	+	-	+	-	P
58	-	+	-	-	N
59	-	+	-	-	N
60	-	+	-	-	N
62	+	-	+	-	P
63	-	+	-	-	N

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
64	-	+	-	-	N
65	-	+	-	-	N
67	+	-	+	-	P
68	+	+	+	-	P
69	+	+	+	-	P
70	-	+	-	+	V
71	-	+	-	-	N
73	-	+	-	+	V
75	+	-	+	-	P
76	+	+	+	-	P
77	+	+	+	-	P
78	+	+	+	-	P
81	-	+	-	-	N
82	-	+	-	-	N
85	-	+	-	+	V
88	+	+	+	-	P
89	-	+	-	-	N
90	-	+	-	-	N
96	+	-	+	-	P

+	Produkt
-	Brak produktu
P	cytoplazma Pampa
V	cytoplazma Vavilovi
N	cytoplazma Normalna
V/N	cytoplazma Vavilovi lub Normalna

Tabela Z7. Identyfikacja typu cytoplazm w odmianie populacyjnej Svalofs St 52404 z wykorzystaniem markerów mitochondrialnych typu SCAR.

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
1	-	+	-	-	N
2	-	+	-	-	N
3	-	+	-	-	N
4	-	+	-	-	N
5	-	+	-	-	N
6	-	+	-	-	N
7	-	+	-	-	N
8	-	+	-	-	N
9	-	+	-	-	N
10	-	+	-	-	N
11	-	+	-	-	N
12	-	+	-	-	N
13	-	+	-	-	N
14	-	+	-	-	N
15	-	+	-	-	N
16	-	+	-	-	N
17	-	+	-	-	N
18	-	+	-	-	N
19	-	+	-	-	N
20	-	+	-	-	N
21	-	+	-	-	N
22	-	+	-	-	N
23	-	+	-	-	N
24	-	+	-	-	N
25	-	+	-	-	N
26	-	+	-	-	N
27	-	+	-	-	N
28	-	+	-	-	N
29	-	+	-	-	N
30	-	+	-	-	N
31	-	+	-	-	N
32	-	+	-	-	N
33	-	+	-	-	N
34	-	+	-	-	N
35	-	+	-	-	N
36	-	+	-	-	N
37	-	+	-	-	N
39	-	+	-	-	N
40	-	+	-	-	N

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
41	-	+	-	-	N
42	-	+	-	-	N
43	-	+	-	-	N
44	-	+	-	-	N
45	-	+	-	-	N
46	-	+	-	-	N
47	-	+	-	-	N
48	-	+	-	-	N
49	-	+	-	-	N
50	-	+	-	-	N
51	-	+	-	-	N
52	-	+	-	-	N
53	-	+	-	-	N
54	-	+	-	-	N
55	-	+	-	-	N
56	-	+	-	-	N
57	-	+	-	-	N
58	-	+	-	-	N
59	-	+	-	-	N
60	-	+	-	-	N
61	-	+	-	-	N
62	-	+	-	-	N
63	-	+	-	-	N
64	-	+	-	-	N
65	-	+	-	-	N
66	-	+	-	-	N
67	-	+	-	-	N
68	-	+	-	-	N
69	-	+	-	-	N
70	-	+	-	-	N
71	-	+	-	-	N
72	-	+	-	-	N
73	-	+	-	-	N
74	-	+	-	-	N
75	-	+	-	-	N
76	-	+	-	-	N
77	-	+	-	-	N
78	-	+	-	-	N
79	-	+	-	-	N

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
80	-	+	-	-	N
81	-	+	-	-	N
82	-	+	-	-	N
83	-	+	-	-	N
84	-	+	-	-	N
85	-	+	-	-	N
86	-	+	-	-	N
87	-	+	-	-	N
88	-	+	-	-	N
89	-	+	-	-	N
90	-	+	-	-	N
91	-	+	-	-	N
92	-	+	-	-	N
93	-	+	-	-	N
94	-	+	-	-	N
96	-	+	-	-	N

+	Produkt
-	Brak produktu
P	cytoplazma Pampa
V	cytoplazma Vavilovi
N	cytoplazma Normalna
V/N	cytoplazma Vavilovi lub Normalna

Tabela Z8. Identyfikacja typu cytoplazm w odmianie populacyjnej Landsorte K9538 z wykorzystaniem markerów mitochondrialnych typu SCAR.

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
1	-	+	-	-	N
2	-	+	-	-	N
3	-	+	-	-	N
4	-	+	-	-	N
5	-	+	-	-	N
6	-	+	-	-	N
7	-	+	-	-	N
8	-	+	-	-	N
9	-	+	-	-	N
10	-	+	-	-	N
11	-	+	-	-	N
12	-	+	-	-	N
13	-	+	-	-	N
14	-	+	-	-	N
15	-	+	-	-	N
16	-	+	-	-	N
17	-	+	-	-	N
18	-	+	-	-	N
19	-	+	-	-	N
20	-	+	-	-	N
21	-	+	-	-	N
22	-	+	-	-	N
23	-	+	-	-	N
24	-	+	-	-	N
25	-	+	-	-	N
26	-	+	-	-	N
27	-	+	-	-	N
28	-	+	-	-	N
29	-	+	-	-	N
30	-	+	-	-	N
31	-	+	-	-	N
32	-	+	-	-	N
33	-	+	-	-	N
34	-	+	-	-	N
35	-	+	-	-	N
36	-	+	-	-	N
37	-	+	-	-	N
38	-	+	-	-	N
39	-	+	-	-	N

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
40	-	+	-	-	N
41	-	+	-	-	N
42	-	+	-	-	N
43	-	+	-	-	N
45	-	+	-	-	N
46	-	+	-	-	N
47	-	+	-	-	N
48	-	+	-	-	N
49	-	+	-	-	N
50	-	+	-	-	N
51	-	+	-	-	N
52	-	+	-	-	N
53	-	+	-	-	N
54	-	+	-	-	N
55	-	+	-	-	N
56	-	+	-	-	N
57	-	+	-	-	N
58	-	+	-	-	N
59	-	+	-	-	N
60	-	+	-	-	N
61	-	+	-	-	N
62	-	+	-	-	N
63	-	+	-	-	N
64	-	+	-	-	N
65	-	+	-	-	N
66	-	+	-	-	N
67	-	+	-	-	N
68	-	+	-	-	N
69	-	+	-	-	N
70	-	+	-	-	N
71	-	+	-	-	N
72	-	+	-	-	N
73	-	+	-	-	N
74	-	+	-	-	N
75	-	+	-	-	N
76	-	+	-	-	N
77	-	+	-	-	N
78	-	+	-	-	N
79	-	+	-	-	N

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
80	-	+	-	-	N
81	-	+	-	-	N
82	-	+	-	-	N
83	-	+	-	-	N
84	-	+	-	-	N
85	-	+	-	-	N
86	-	+	-	-	N
87	-	+	-	-	N
88	-	+	-	-	N
89	-	+	-	-	N
90	-	+	-	-	N
91	-	+	-	-	N
92	-	+	-	-	N
93	-	+	-	-	N
94	-	+	-	-	N
95	-	+	-	-	N
96	-	+	-	-	N

+	Produkt
-	Brak produktu
P	cytoplazma Pampa
V	cytoplazma Vavilovi
N	cytoplazma Normalna
V/N	cytoplazma Vavilovi lub Normalna

Tabela Z9. Identyfikacja typu cytoplazm w odmianie populacyjnej Vjatka, z wykorzystaniem markerów mitochondrialnych typu SCAR.

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
2	-	+	-	-	N
12	-	+	-	-	N
13	-	+	-	-	N
15	-	+	-	-	N
18	-	+	-	-	N
19	-	+	-	-	N
22	-	+	-	-	N
25	-	+	-	-	N
26	-	+	-	-	N
27	-	+	-	-	N
28	-	+	-	-	N
30	-	+	-	-	N
37	-	+	-	-	N
38	-	+	-	-	N
40	-	+	-	-	N
41	-	+	-	-	N
42	-	+	-	-	N
44	-	+	-	-	N
45	-	+	-	-	N
46	-	+	-	-	N
47	-	+	-	-	N
48	-	+	-	-	N
49	-	+	-	-	N
50	-	+	-	-	N
51	-	+	-	-	N
52	-	+	-	-	N
53	-	+	-	-	N
54	-	+	-	-	N
55	-	+	-	-	N
57	-	+	-	-	N
58	-	+	-	-	N
59	-	+	-	-	N
60	-	+	-	-	N
62	-	+	-	+	V
63	-	+	-	+	V
64	-	+	-	+	V
65	-	+	-	+	V
66	-	+	-	+	V
67	-	+	-	+	V
68	-	+	-	+	V

Nr roś	cox1		nad6	nad2	Cytoplazma
	P	V/N	P	V	
69	-	+	-	+	V
72	-	+	-	+	V
74	-	+	-	+	V
75	-	+	-	+	V
76	-	+	-	+	V
78	-	+	-	-	N
79	-	+	-	+	V
80	-	+	-	+	V
81	-	+	-	-	N
82	-	+	-	-	N
83	-	+	-	-	N
84	-	+	-	-	N
85	-	+	-	-	N
86	-	+	-	-	N
87	-	+	-	-	N
88	-	+	-	-	N
89	-	+	-	-	N
90	-	+	-	+	V
91	-	+	-	+	V
92	-	+	-	+	V
96	-	+	-	-	N

+	Produkt
-	Brak produktu
P	cytoplazma Pampa
V	cytoplazma Vavilovi
N	cytoplazma Normalna
V/N	cytoplazma Vavilovi lub Normalna

Tabela Z10. Identyfikacja typu cytoplazm w odmianie populacyjnej St. Wageningen z wykorzystaniem markerów mitochondrialnych typu SCAR.

Nr roś	cox1		nad6		nad2		Cytoplazma
	P	V/N	P	V	P	V	
1	-	+	-	+			V
2	-	+	-	+			V
3	-	+	-	+			V
4	-	+	-	+			V
5	-	+	-	+			V
6	-	+	-	+			V
7	-	+	-	+			V
8	-	+	-	-			N
9	-	+	-	-			N
10	-	+	-	+			V
11	-	+	-	+			V
12	-	+	-	-			N
13	-	+	-	+			V
14	-	+	-	+			V
15	-	+	-	-			N
16	-	+	-	+			V
17	-	+	-	+			V
18	-	+	-	+			V
19	-	+	-	+			V
20	-	+	-	-			N
21	-	+	-	+			V
22	-	+	-	+			V
23	-	+	-	+			V
24	-	+	-	+			V
25	-	+	-	+			V
26	-	+	-	+			V
27	-	+	-	+			V
28	-	+	-	+			V
29	-	+	-	+			V
30	-	+	-	-			N
31	-	+	-	+			V
32	-	+	-	+			V
33	-	+	-	+			V
34	-	+	-	-			N
35	-	+	-	+			V
36	-	+	-	+			V
37	-	+	-	+			V
38	-	+	-	+			V
39	-	+	-	+			V
40	-	+	-	-			N
41	-	+	-	+			V
42	-	+	-	-			N
43	-	+	-	+			V
44	-	+	-	+			V
45	-	+	-	+			V
46	-	+	-	+			V
47	-	+	-	+			V
48	-	+	-	+			V
49	-	+	-	+			V
50	-	+	-	+			V
51	-	+	-	+			V
52	-	+	-	+			V
53	-	+	-	+			V
54	-	+	-	+			V
55	-	+	-	-			N
56	-	+	-	+			V
57	-	+	-	+			V
58	-	+	-	+			V
59	-	+	-	+			V
60	-	+	-	+			V
61	-	+	-	+			V
62	-	+	-	+			V
63	-	+	-	+			V
64	-	+	-	+			V
65	-	+	-	+			V
66	-	+	-	+			V
67	-	+	-	+			V
68	-	+	-	+			V
69	-	+	-	+			V
70	-	+	-	+			V
71	-	+	-	+			V
72	-	+	-	+			V
73	-	+	-	+			V
74	-	+	-	+			V
75	-	+	-	+			V
76	-	+	-	+			V
77	-	+	-	+			V
78	-	+	-	+			V
79	-	+	-	-			N
80	-	+	-	+			V
81	-	+	-	+			V
82	-	+	-	+			V
83	-	+	-	+			V
84	-	+	-	+			V
85	-	+	-	-			N
86	-	+	-	+			V
87	-	+	-	+			V
88	-	+	-	-			N
89	-	+	-	+			V
90	-	+	-	+			V
91	-	+	-	+			V
92	-	+	-	+			V
93	-	+	-	+			V
94	-	+	-	+			V
95	-	+	-	+			V
96	-	+	-	+			V

+	Produkt
-	Brak produktu
P	cytoplazma Pampa
V	cytoplazma Vavilovi
N	cytoplazma Normalna
V/N	cytoplazma Vavilovi lub Normalna

Tabela Z12. Liczebności wysianych ziaren i ocenionych roślin oraz odsetek strat badanych genotypów odnotowany w pokoleniach F2 do F5 populacji mapującej [544C x MOt]BC3

Miejsce siewu	Rok	Pokolenie	Populacja	Liczba wysianych ziaren	Liczba ocenionych roślin	Udział strat
pole	2016	BC3F2	544C x MOt10	39	29	26%
			544C x MOt19	65	33	49%
			544C x MOt23	74	40	46%
pole	2017	BC3F3	544C x MOt10	14	1	93%
			544C x MOt19	85	18	79%
			544C x MOt23	83	22	73%
szklarnia	2017	BC3F2	544C x MOt19	22	10	55%
			544C x MOt23	179	114	36%
pole	2018	BC3F3	544C x MOt19	97	32	67%
			544C x MOt23	89	32	64%
		BC3F4	544C x MOt19	84	8	90%
			544C x MOt23	79	32	59%
szklarnia	2019	BC3F4	544C x MOt19 roślina1	116	85	27%
			544C x MOt19 roślina2	76	44	42%
			544C x MOt19 roślina3	104	47	55%
			544C x MOt23 roślina4	109	59	46%
			544C x MOt23 roślina5	30	24	20%
		BC3F5	544C x MOt19 roślina1	95	75	21%
			544C x MOt23 roślina2	64	3	95%
			544C x MOt23 roślina3	81	2	98%
			544C x MOt23 roślina4	77	44	43%
			544C x MOt23 roślina5	103	75	27%

SPIS TABEL

Tabela 1. Skład mieszaniny reakcyjnej, w której zachodziła amplifikacja produktów przy zastosowaniu markerów <i>cox1</i> , <i>nad6</i> oraz <i>nad2</i> dla polskich oraz historycznych europejskich odmian żyta ozimego.....	32
Tabela 2. Profil temperaturowy, według którego prowadzone były analizy PCR-SCAR w termocyklerze (BIO RAD T100 Thermal Cycler) dla polskich oraz historycznych europejskich odmian żyta ozimego.....	33
Tabela 3. Skład mieszaniny reakcyjnej, w której zachodziła amplifikacja produktów przy zastosowaniu 271 markerów molekularnych typu COS na liniach rodzicielskich 544C oraz Ot0-20.....	34
Tabela 4. Profil temperaturowy, według którego prowadzone były analizy PCR-COS w termocyklerze (BIO RAD T100 Thermal Cycler) na liniach rodzicielskich 544C oraz Ot0-20.....	35
Tabela 5. Liczba roślin z różnymi cytoplazmami w badanych odmianach żyta ozimego.....	40
Tabela 6. Płodność mieszańców między męskosterylnymi źródłami cytoplazm CMS-C i CMS-P, a polskimi populacjami żyta ozimego.....	41
Tabela 7. Liczebność roślin mieszańcowych powstałych w wyniku krzyżowań polskich populacji żyta ozimego z źródłami cytoplazmy sterylizującej C oraz P w latach 2015-2016.....	42
Tabela 8. Płodność mieszańców między męskosterylnymi źródłami cytoplazm CMS-C i CMS-P, a historycznymi europejskimi populacjami żyta ozimego.....	44
Tabela 9. Liczebność roślin mieszańcowych powstałych w wyniku krzyżowań historycznych europejskich populacji żyta ozimego z źródłami cytoplazmy sterylizującej C oraz P w latach 2017-2018.....	45
Tabela 10. Płodność roślin w kolejnych pokoleniach (od F2 do F4) populacji mapującej [544C x MOt]BC3.....	51
Tabela 11. Liczebności roślin populacji mieszańcowych [544C x MOt]BC3F4 i [544C x MOt]BC3F5 badanych w 2019 roku z uwzględnieniem wyników oceny fenotypowej męskiej płodności opartej o liczby ziaren w zaizolowanych kłosach.....	52
Tabela 12. Markery COS zaprojektowane w celu realizacji badań w obrębie populacji mapującej [544C x MOt]BC1.....	53
Tabela 13. Liczebności przetestowanych markerów według ich lokalizacji na 7 chromosomach żyta.....	55
Tabela 14. Zestawienie wyników z elektroforegramów uzyskanych w wyniku analiz z użyciem markerów <i>c892</i> i <i>TC363404</i> oraz oceny fenotypowej dla populacji mapującej [544C x MOt]BC1.....	61
Tabela 15. Liczba markerów SilicoDArT i SNP zmapowanych na sekwencji DNA genomu żyta.....	64
Tabela 16. Markery SilicoDArT i SNP wykazujące w teście Kruskala-Wallisa istotny związek z fenotypową oceną męskiej płodności zmapowane na chromosomie 2R.....	66
Tabela 17. Markery SilicoDArT i SNP wykazujące w teście Kruskala-Wallisa istotny związek z fenotypową oceną męskiej płodności zmapowane na chromosomie 5R.....	69

SPIS RYSUNKÓW

Rys.1. Światowa produkcja żyta w latach 1994-2020 (FAOSTAT 2022).....	9
Rys.2. Procentowy udział w produkcji żyta według regionu - dane z 2020 roku (FAOSTAT 2022).....	10
Rys.3. Dziesięć największych światowych producentów żyta - dane z 2020 roku (FAOSTAT 2022).....	10
Rys.4. System cytoplazmatycznej męskiej sterility.....	11
Rys.5. Rozmieszczenie obiektów na poletku rozmnożeniowym, które przed kwitnieniem izolowano namiotem foliowym w celu utworzenia mieszańców testowych.....	28
Rys.6. Schemat powstawania populacji mapującej BC1.....	29
Rys.7. Rozkład oczekiwanych produktów dla żyta z poszczególnymi cytoplazmami (Normalna, Pampa i trzy cytoplazmy Vavilovii: R, S, C), jakim charakteryzują się markery <i>cox1</i> , <i>nad6</i> i <i>nad2</i> (Stojałowski i in. 2006).....	32
Rys.8. Tworzenie prób zbiorczych na populacji mapującej [544C x MOt]BC1.....	36
Rys.9. Identyfikacja cytoplazm w odmianie populacyjnej D. Diamant, za pomocą markerów mitochondrialnych typu SCAR (<i>cox1</i> i <i>nad6</i>).....	40
Rys.10. Procentowy udział roślin zakwalifikowanych do trzech kategorii fenotypowych (MS – męskosterylne; CP – częściowo męskopłodne; MP – męskopłodne) w mieszańcach pochodzących z zapylenia dwóch wersji cytoplazmatycznych linii 541 (z CMS-C i CMS-P) pyłkiem pochodzącym z czterech polskich odmian populacyjnych żyta ozimego w latach 2015 i 2016.....	43
Rys.11. Procentowy udział roślin zakwalifikowanych do trzech kategorii fenotypowych (MS – męskosterylne; CP – częściowo męskopłodne; MP – męskopłodne) w mieszańcach pochodzących z zapylenia dwóch wersji cytoplazmatycznych linii 541 (z CMS-C i CMS-P) pyłkiem pochodzącym z trzech europejskich historycznych odmian populacyjnych żyta ozimego w latach 2017 i 2018.....	47
Rys.12. Liczba roślin zakwalifikowanych do 9 klas wg Geigera i Morgensterna w populacji mapującej [544C x MOt]BC1 w 2013 roku.....	48
Rys.13. Elektroforegram przedstawiający produkty amplifikacji 3 markerów COS w czasie badań linii rodzicielskich i prób zbiorczych (MS-próby zbiorcze roślin męskosterylnych, MP- próby zbiorcze roślin męskopłodnych).....	56
Rys.14. Elektroforegram przedstawiający wyniki amplifikacji markera <i>c892</i> w obrębie linii rodzicielskich 544C i Ot0-20 oraz w próbach zbiorczych (MS-próby zbiorcze roślin męskosterylnych, MP- próby zbiorcze roślin męskopłodnych).....	57
Rys.15. Przypuszczalna lokalizacja pobocznego genu restorerowego <i>Rfc2</i> względem markera <i>c892</i>	58
Rys.16. Elektroforegram przedstawiający produkty amplifikacji markera COS TC363404 w obrębie linii rodzicielskich i populacji mapującej [544C x MOt]BC1.....	59
Rys.17. Elektroforegram przedstawiający produkty amplifikacji markera COS <i>c892</i> w obrębie linii rodzicielskich i populacji mapującej [544C x MOt]BC1.....	60

SPIS LITERATURY

1. Adolf K., Winkel A. 1985. A new source of spontaneous sterility in winter rye - preliminary results. Proc Eucarpia Meet Cereal Sect on Rye. Svalöv. Sweden: 293-306.
2. Ahmed T.A., Tsujimoto H., Sasakuma T. 2001. QTL analysis of fertility-restoration against cytoplasmic male sterility in wheat. Genes Genet. Syst. 76: 33-38.
3. Ahokas H. 1980. Evidence for cytoplasmic male sterility in two Finnish rye cultivars. Hereditas 92: 373-380.
4. Akagi H., Nakamura A., Yokozeki-Misono Y., Inagaki A., Takahashi H., Mori K., Fujimura T. 2004. Positional cloning of the rice *Rf-1* gene, a restorer of BT-type cytoplasmic male sterility that encodes a mitochondria-targeting PPR protein. Theor. Appl. Genet. 108: 1449-1457.
5. Allan V., Vetriventhan M., Senthil R., Geetha S., Deshpande S., Rathore A., Kumar V., Singh P., Reddymalla S., Azevedo V.C.R. 2020. Genome-Wide DArTSeq Genotyping and Phenotypic Based Assessment of Within and Among Accessions Diversity and Effective Sample Size in the Diverse Sorghum, Pearl Millet, and Pigeonpea Landraces. Frontiers in Plant Science. Vol. 11.
6. Altpeter F., Korzun V. 2007. Rye. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Transgenic Crops IV. Praca zbiorowa pod redakcją Pua E. C i Davey M. R. vol 59: 107-115.
7. Anioł A., Gustafson J.P. 1984. Chromosome location of genes controlling aluminium tolerance in wheat, rye, and triticale. Can J Genet Cytol 26: 701-705.
8. Arseniuk E., Oleksiak T. 2013. Stosowanie kwalifikowanego materiału siewnego a efekty produkcji zbóż. W: Zboża wysokiej jakości. Poradnik dla producentów. Warszawa 1-5.
9. Bartosiewicz J., Grynia J., Pluta M. 2013. Androgeneza – otrzymywanie linii homozygotycznych na przykładzie żyta (*Secale cereale* L.). Episteme 21/1:19-26.
10. Bednarek P., Lewandowska R., Kubicka H., Masojć P. 2002. Linkage groups and the indirect chromosome location of cms-P linked AFLPs. Cell. Mol. Biol. Lett. 7: 721-736.
11. Bentolila S., Hanson M.R. 2001. Identification of BIBAC clone that co-segregates with the petunia restorer of fertility (*Rf*) gene. Mol. Genet. Genomics 266. 223-230.
12. Bojanowski J. 1955. O metodach hodowli kukurydzy. Postępy Nauk Rolniczych. Tom 02(2): 57-64.
13. Börner A., Korzun V., Polley A., Malyshev S., Melz G. 1998. Genetics and molecular mapping of male fertility restoration locus (*Rfg1*) in rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 97: 99-102.
14. Broda Z., Mikołajczyk S. 2002. Indukowanie haploidów żyta (*Secale cereale* L.). Biul. Inst. Hod. Akilm. Rośl. 221: 83-92.
15. Brown G.G., Formanova N., Jin H., Wargachuk R., Dendy C., Patil P., Laforest M., Zhang J., Cheung W.Y., Landry B.S. 2003. The radish *Rfo* restorer gene of Ogura

- cytoplasmic male sterility encodes a protein with multiple pentatricopeptide repeats. *Plant J.* 35(2): 262-272.
16. Chase C.D. 2007. Cytoplasmic male sterility: a window to the world of plant mitochondrial – nuclear interactions. *Trends Genet.* 23. 81–90.
 17. Chinwuba P.M., Grogan C.O., Zuber M.S. 1961. Interaction of detasseling, sterility, and spacing on yields of maize hybrids. *Crop Sci.* 1. 279–280.
 18. COBORU. 2023. <https://www.coboru.gov.pl/pl/wydarzenia/2023/20230221>.
 19. Collins N.C., Shirley N.J., Saeed M., Pallotta M., Gustafson J.P. 2008. An *ALMT1* gene cluster controlling aluminum tolerance at the *Alt4 locus* of rye (*Secale cereale* L.). *Genetics* 179:669–682.
 20. Devos K.M., Atkinson M.D., Chinoy C.N., Francis H. A., Harcourt R.L., Koebner R.M., Liu C.J., Masojć P., Xie D.X., Gale M.D. 1993. Chromosomal rearrangements in the rye genome relative to that of wheat. *Theor. Appl. Genet.* 85: 673-680.
 21. Diversity Arrays Technology Pty Ltd. 2022. <http://www.diversityarrays.com>.
 22. Dohmen G., Hessberg H., Geiger H.H., Tudzynski P. 1994. CMS in rye: comparative RFLP and transcript analyses of mitochondria from fertile and male-sterile plants. *Theor. Appl. Genet.* 89: 1014-1018.
 23. Dohmen G., Tudzynski P. 1994. A DNA-polymerase-related reading frame (pol-r) in the mtDNA of *Secale cereale*. *Curr. Genet.* 25: 59-65.
 24. Duczmal W.K., Tucholska H. 2000. Nasiennictwo. Tom I. PWRiL. Poznań.
 25. European Union. Commission Regulation (EU) 2021/1399 of 24 August 2021 amending Regulation (EC) No 1881/2006 as regards maximum levels of ergot sclerotia and ergot alkaloids in certain foodstuffs. *Off. J. Eur. Union L* 2021, 301, 1–5. Available online: <https://eur-lex.europa.eu/eli/reg/2021/1399/oj> (accessed on 10 March 2022).
 26. Falke K.C., Wilde P., Miedaner T. 2009. Rye introgression lines as source of alleles for pollen-fertility restoration in Pampa CMS. *Plant Breed* 128: 528–531.
 27. FAO. 2022. <http://www.fao.org>.
 28. Fluch S., Kopecky D., Burg K., Simkova H., Taudien S., Petzold A., Kubalaková M., Platzer M., Berebyi M., Krainer S., Dolezel J., Lelley T. 2012. Sequence composition and gene content of the short arm of rye (*Secale cereale*) chromosome 1. *PloS one* 7(2): e30784. doi:10.1371/journal.pone.0030784.
 29. Fulton T., van der Hoeven R., Eannetta N., Tanksley S. 2002. Identification, analysis and utilization of a conserved ortholog set (COS) markers for comparative genomics in higher plants. *Plant Cell* 14:1457–1467.
 30. GABI. 2022. <https://www.gabipd.org/>.
 31. Gallego F.J., Benito C. 1997. Genetic control of aluminium tolerance in rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 95:393-399.

32. Gallego F.J., Calles B., Beniot C. 1998. Molecular markers linked to the aluminium tolerance gene *Alt1* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 97: 1104-1109.
33. Garlicka W., Madej L. 1975. Microsporogenesis and anther development in male-sterile and male-fertile forms of rye. *Hod. Rośl. Aklim. i Nasien.* 19(5/6): 423-428.
34. Gąsiorowski H. 1994. Żyto – chemia i technologia. *Przyrodniczo - rolnicze podstawy uprawy żyta.* PWRiL. Poznań: 24-40.
35. Geiger H.H. 1972. Wiederherstellung der Pollensterilität in cytoplasmatisch männlich sterilem Roggen. *Theor. Appl. Genet.* 42: 32-33.
36. Geiger H.H. 1982. Breeding methods in diploid rye (*Secale cereale* L.). *Tag.-Ber. Akad. Landwirtsch-Wiss. DDR.* Berlin 198: 305-332.
37. Geiger H.H. 1985. Hybrid breeding in rye. *Proceeding of the Eucarpia Meeting of the Cereal Section on Rye.* Svalöv. Sweden. 11-13 June 1985: 237-265.
38. Geiger H.H. 2007. Strategies of hybrid rye breeding. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 71: 1-5.
39. Geiger H.H., Miedaner T. 1996. Genetic basis and phenotypic stability of male fertility restoration in rye. *Votr. Pflanzenzüchtg.* 35: 27-38.
40. Geiger H.H., Morgenstern K. 1975. Angewandt-genetische Studien zur cytoplasmatischen Pollensterilität bei Winterroggen. *Theor. Appl. Genet.* 46: 269-276.
41. Geiger H.H., Schnell F.W. 1970. Cytoplasmatic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Crop Science.* 10: 590–593.
42. Gobron N., Waszczak C., Simon M., Hiard S., Boivin S., Charif D., Ducamp A., Wenes E., Budar F. 2013. A cryptic cytoplasmic male sterility unveils a possible gynodioecious past for *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 8(4). 62450.
43. Grzebelus D. 2009. Wykorzystanie diagnostyki molekularnej. W: *Hodowla roślin - praca pod redakcją Michalik B.* PWRiL. Poznań: 312-339.
44. Hackauf B., Bauer E., Korzun V., Miedaner T. 2017. Fine mapping of the restorer gene *Rfp3* from an Iranian primitive rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 130: 1179–1189.
45. Hackauf B., Korzun V., Wortmann H., Wilde P., Wehling P. 2012. Development of conserved ortholog set markers linked to the restorer gene *Rfp1* in rye. *Mol. Breeding* 30:1507–1518.
46. Hackauf B., Rudd S., van der Voort J.R., Miedaner T., Wehling P. 2009. Comparative mapping of DNA sequences in rye (*Secale cereale* L.) in relation to the rice genome. *Theor Appl Genet* 118:371–384.
47. Hackauf B., Wehling P. 2005. Approaching the self-incompatibility *locus Z* in rye (*Secale cereale* L.) via comparative genetics. *Theor Appl Genet* 110:832–845.
48. Hartung F., Schiemann J. 2014. Precise plant breeding using new genome editing techniques: opportunities, safety and regulation in the EU. *The Plant Journal.* 78 (5): 742–752.

49. Hayes P.M., Castro A., Marquez-Cedillo L., Corey A., Henson C., Jones B. L., Kling J., Mather D., Matus I., Rossi C., Sato K. 2003. Genetic diversity for quantitatively inherited agronomic and malting quality traits. In Roland von Bothmer, Theo van Hintum, Helmut Knüpfner, Kazuhiro Sato (eds.). Diversity in Barley (*Hordeum vulgare*). Amsterdam Boston: Elsevier. pp. 201–226.
50. Ivanov M.K., Dymshits G.M. 2007. Cytoplasmic male sterility and restoration of pollen fertility in higher plants. *Russ. J. Genet.* 43(4): 354–368.
51. Kantarek Z., Masojć P., Bienias A., Milczarski P. 2018. Identification of a novel, dominant dwarfing gene (*Ddw4*) and its effect on morphological traits of rye. *PLoS One.* 13(6):e0199335 10.1371/journal.pone.0199335.
52. Kapusta F. 2016. Zboża jako składnik rolnictwa i gospodarki polski. *EKONOMIA XXI WIEKU.* 2(10): 121-137.
53. Kaul M.L.H. 1988. Male Sterility in Higher Plants. Springer – Verlag, Heidelberg.
54. Kilian B., Graner A. 2012. NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks. *Briefings in functional genomics.* Vol.11. No 1: 38 — 50.
55. Kiran U., Khan S., Mirza K.J., Ram M., Abidin M.Z. 2010. SCAR markers: A potential tool for authentication of herbal drugs. *Fitoterapia.* Vol. 81. Issue 8. Pages 969-976.
56. Klein R.R., Klein P.E., Mullet J.E., Minx P., Rooney W.L., Schertz K.F. 2005. Fertility restorer *locus Rf1* of sorghum (*Sorghum bicolor* L.) encodes a pentatricopeptide repeat protein not present in the colinear region of rice chromosome 12. *Theor. Appl. Genet.* 111: 994-1012.
57. Ključko P.F., Belousov A.A. 1972. Rezul'taty genetičeskogo izučenija citoplazmatična steril'nosti u oimoi rži. *Gen. Moskva* 8. 7: 9-15.
58. Kobyljanskij V.D. 1969. About genetics of cytoplasmic male sterility in winter rye. (K genetike citoplazmatičeskoj mužskoj steril'nosti u ozimoi rži). *Genetika Moskva.* 5.9: 43-47 (in Russian).
59. Kobyljanskij V.D. 1971. Sozdanie steryl'nych analogov sortov ozimoi rži, zakrepitelej steril'nosti, vosstanovitelej fertil'nosti. *Trudy Prikl. Bot. Genet. Sel. Leningrad* 44. 1: 76-85.
60. Kobyljanskij V.D. 1982. Rož, Genetičeskie osnovy selekcii. Kolos, Moskva.
61. Kobyljanskij V.D., Katerova A.G., Lapikov N.S. 1994. Sozdanie ischodnogo materiala dlja selekcii gibridnoj rži. *Genetika, Moskva,* 30,10: 1403-1412.
62. Kolasińska I. 2001. Przywracanie płodności pyłku u mieszańców żyta CMS-Pampa x restorer. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.* 218/219: 341-349.
63. Krajowy Rejestr. 2022. <http://www.coboru.pl>.
64. Kruglyak L., Lander E.S., 1995. A nonparametric approach for mapping quantitative trait *loci*. *Genetics* 139: 1421-1428.

65. Kubicka H., Lewandowska R. 2003. Zastosowanie techniki AFLP w połączeniu z BSA do identyfikowania markerów sprzężonych z cechą karłowatości u żyta. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.* 226/227/1: 71-80.
66. Lee B.T.K., Tan T.W., Ranganathan S. 2003. MGAlignIt: a web service for the alignment of mRNA/EST and genomic sequences. *Nucleic Acids Research* 2003. Vol. 31. No. 13: 3533–3536.
67. Li G., Wang L., Yang J., He H., Jin H., Li X., Ren T., Ren Z., Li F., Han X., Zhao X., Dong L., Li Y., Song Z., Yan Z., Zheng N., Shi C., Wang Z., Yang S., Xiong Z., Zhang M., Sun G., Zheng X., Gou M., Ji C., Du J., Zheng H., Doležel J., Deng X.W., Stein N., Yang Q., Zhang K., Wang D. 2021. A high-quality genome assembly highlights rye genomic characteristics and agronomically important genes. *Nat Genet.* Apr;53(4):574-584. doi: 10.1038/s41588-021-00808-z.
68. Li H., Vikram P., Sigh R.P., Kilian A., Carling J., Song J., Burgueno-Ferreira J.A., Bhavani S., Huerta-Espino J., Payne T., Sehgal D., Wenzel P., Singh S. 2015. A high density GBS map of bread wheat and its application for dissecting complex disease resistance traits. *BMC Genomics.* 16: 216.
69. Linke B., Börner T., 2005. Mitochondrial effect on flower and pollen development. *Mitochondrion* 5: 389-402.
70. Lista Opisowa Odmian Roślin Rolniczych 2022. COBORU. COBO 74/2022. ISSN 1641-7003.
71. Łapiński M. 1972. Cytoplasmic-genic type of male sterility in *Secale montanum* Guss. *Wheat Inform. Serv.* 35: 25-28.
72. Łapiński M. 1977. Genowa i cytoplazmatyczna męska niepłodność u żyta (*Secale* sp.). Praca habil. Rozprawy 49. Wyd. Akademii Rolniczej w Szczecinie. Szczecin.
73. Łapiński M. 1990. Dziedziczenie jałowości pyłku u międzyliniowych mieszańców żyta z cytoplazmą źródła cms-C. *Hod. Rośl. Aklim. Nasien.* 34.1/2: 47-52.
74. Łapiński M., Stojalowski S. 1996. The C-source of sterility-inducing cytoplasm in rye: Origin, identity and occurrence. International Symposium on Rye Breeding & Genetics. University of Hohenheim. Stuttgart. Germany. 27-29.06.1996, Vort. Pflanzenzüchtung. 35: 51-60.
75. Łapiński M., Stojalowski S. 1997. Struktura genetyczna, zalety i wady odmian mieszańcowych żyta. W: *Wkład Nauk Rolniczych w Rozwoju Pomorza Zachodniego.* Szczecin. 12.12.1997. Akademia Rolnicza w Szczecinie: 57-66.
76. Łapiński M., Stojalowski S. 2003. Occurrence and genetic identity of male sterility-inducing cytoplasm in rye (*Secale* spp.). *Plant. Breed. Seed. Sci.* 48: 7–23.
77. Łoś T., Ruebenbauer E. 1982. Genetic studies on the Pampa type cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Gen. Pol.* 23: 17-29.
78. Ma Z.Q., Zhao Y.H., Sorrells M.E. 1995. Inheritance and chromosomal locations of male fertility restoring gene transferred from *Aegilops umbellulata* Zhuk. to *Triticum aestivum* L. *Mol Gen Genet.* 1995 May 10;247(3):351-7.

79. Madej L. 1975. Research on male sterility in rye. *Plant Breed and Seed Sci.* 19: 421-422.
80. Madej L. 1976. Charakterystyka genetyczna trzech źródeł męskiej jałowości żyta (*Secale cereale* L.). *Hod. Rośl. Aklim. Nasien.* 20. 2: 157-174.
81. Mago R., Miah H., Lawrence G.J., Wellings C.R., Spielmeier W., Bariana H.S., McIntosh R.A., Pryor A.J., Ellis J.G. 2005. High resolution mapping and mutation analysis separate the rust resistance genes *Sr31*, *Lr26* and *Yr9* on the short arm of rye chromosome 1. *Theor. Appl. Genet.* 112: 41–50.
82. Mago R., Spielmeier W., Lawrence G.J., Lagudah E.S., Ellis J.G., Pryor A. 2002. Identification and mapping of molecular markers linked to rust resistance genes located on chromosome 1RS of rye using wheat-rye translocation lines. *Theor. Appl. Genet.* 104: 1317–1324.
83. Malinowski E. 1978. *Genetyka*. PWN. Warszawa.
84. Martis M.M., Zhou R., Haseneyer G., Schmutzer T., Vrána J., Kubaláková M., König S., Kugler K.G., Scholz U., Hackauf B., Korzun V., Schön Ch.C., Doležel J., Bauer E., Mayer K.F.X., Stein N. 2013. Reticulate evolution of the rye genome. *Plant Cell* 25: 3685–3698.
85. Masojć P. 2009. Metody detekcji polimorfizmu sekwencji DNA i ich zastosowania. W: *Biotechnologia roślin – praca zbiorowa pod redakcją Malepszego S.* Wydaw. Nauk. PWN Warszawa: 273-306.
86. Masojć P., Banek-Tabor A., Milczarski P., Twardowska M. 2007. QTLs for resistance to preharvest sprouting in rye (*Secale cereale* L.). *J. Appl. Genet.* 48(3): 211–217.
87. Masojć P., Milczarski P. 2005. Mapping QTLs for α -amylase activity in rye grain. *J. Appl. Genet.* 46(2): 115-123.
88. Masojć P., Milczarski P. 2009. Relationship between QTLs for preharvest sprouting and alpha-amylase activity in rye grain. *Mol. Breed.* 23: 75-84.
89. Matsui K., Mano Y., Taketa S., Kawada N., Komatsuda T. 2001. Molecular mapping of a fertility restoration locus (*Rfm1*) for cytoplasmic male sterility in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theor. Appl. Genet.* 102: 477-482.
90. Melz G., Adolf K. 1991. Genetic analysis of rye (*Secale cereale* L.). Genetics of male sterility of the G-type. *Theor. Appl. Genet.* 82: 761-764.
91. Michelmore R.W., Paran I., Kesseli R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 88, 9828–9832.
92. Miedaner T., Glass C., Dreyer F., Wilde P., Wortmann H., Geiger H.H. 2000. Mapping of genes for male-fertility restoration in ‘Pampa’ CMS winter rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet* 101: 1226-1233.
93. Miedaner T., Koch S., Seggl A., Schmiedchen B., Wilde P. 2012. Quantitative genetic parameters for selection of biomass yield in hybrid rye. *Plant Breeding* 131: 100—103.

94. Miedaner T., Korzun V., Wilde P. 2022. Effective Pollen-Fertility Restoration Is the Basis of Hybrid Rye Production and Ergot Mitigation. *Plants* 2022. 11. 1115.
95. Miedaner T., Mirdita V., Rodemann B., Drobeck T., Rentel D. 2010. Genetic variation of winter rye cultivars for their ergot (*Claviceps purpurea*) reaction tested in a field design with minimized interplot interference. *Plant Breed* 129: 58–62.
96. Miedaner T., Wilde P., Wortmann H. 2005. Combining ability of non-adapted sources for male-fertility restoration in Pampa CMS of hybrid rye. *Plant Breed*. 124: 39–43.
97. Miftahudin, Scoles G.J., Gustafson J.P. 2002. AFLP markers tightly linked to the aluminum-tolerance gene *Alt3* in rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 104: 626–631.
98. Miftahudin, Scoles G.J., Gustafson J.P. 2004. Development of PCR-based codominant markers flanking the *Alt3* gene in rye. *Genome* 47:231–238.
99. Milczarski P., Hanek M., Tyrka M., Stojalowski S. 2016. The application of GBS markers for extending the dense genetic map of rye (*Secale cereale* L.) and the localization of the *Rfc1* gene restoring male fertility in plants with the C source of sterility-inducing cytoplasm. *J. Appl. Genet.* 57(4): 439–451.
100. Myśków B., Stojalowski S., Łań A., Bolibok-Bragoszewska H., Rakoczy-Trojanowska M., Kilian A. 2012. Detection of the quantitative trait *loci* for α -amylase activity on a high-density genetic map of rye and comparison of their localization to *loci* controlling preharvest sprouting and earliness. *Mol. Breed.* 30: 367-376.
101. Myśków B., Stojalowski S., Milczarski P., Masojć P. 2010. Mapping of sequence-specific markers and *loci* controlling preharvest sprouting and alpha-amylase activity in rye (*Secale cereale* L.) on the genetics map of an F2 (S120xS76) population. *J. Appl. Genet.* 51: 283-287.
102. NCBI. 2022. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>.
103. Niemirowicz-Szczytt K. 2004. Kultury pylników i mikrospor. W: *Biotechnologia roślin - praca pod red. Malepszego S.* PWN. Warszawa: 42-54.
104. Pachota K., Niedziela A., Orłowska R., Bednarek P. 2016. Nowoczesne metody genotypowania DArT i GBS w hodowli gatunków roślin użytkowych. *Biul. IHAR* 279: 3–18.
105. Paran I., Michelmore R.W. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theoretical and Applied Genetics.* 85: 985-993.
106. Parida S.K., Anand Raj Kumar K., Dalal V., Singh N.K., Mohapatra T. 2006. Unigene derived microsatellite markers for the cereal genomes. *TheorAppl Genet.* 112(5): 808–817.
107. PIORIN. 2023. <http://piorin.gov.pl>.
108. Primer3. 2023. <http://www.primer3.ut.ee>.

109. Putt E.D. 1954. Cytogenetic studies of sterility in rye. *Can. Journ. Agric. Sci.* 34: 81-119.
110. QIAGEN CLC Genomic. 2022. <http://www.qiagenbioinformatics.com>.
111. Rabanus-Wallace M.T., Hackauf B., Mascher M., Lux T., Wicker T., Gundlach H., Baez M., Houben A., Mayer K.F.X, Guo L., Poland J., Pozniak C.J., Walkowiak S., Melonek J., Praz C.R., Schreiber M., Budak H., Heuberger M., Steuernagel B., Wulff B., Börner A., Byrns B., Čížková J., Fowler D.B., Fritz A., Himmelbach A., Kaithakottil G., Keilwagen J., Keller B., Konkin D., Larsen J., Li Q., Myśków B., Padmarasu S., Rawat N., Sesiz U., Biyiklioglu-Kaya S., Sharpe A., Šimková H., Small I., Swarbreck D., Toegelová H., Tsvetkova N., Voylokov A.V., Vrána J., Bauer E., Bolibok-Bragoszewska H., Doležel J., Hall A., Jia J., Korzun V., Laroche A., Ma X-F., Ordon F., Özkan H., Rakoczy-Trojanowska M., Scholz U., Schulman A.H., Siekmann D., Stojałowski S., Tiwari V.K., Spannagl M., Stein N. 2021. Chromosome-scale genome assembly provides insights into rye biology, evolution and agronomic potential. *Nature Genetics*. VOL 53. 564. 564–573.
112. Roux S.R., Hackauf B., Linz A., Ruge B., Klocke B., Wehling P. 2004. Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 2. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr3*, *Pr4* and *Pr5*. *Theor. Appl. Genet.* 110: 192–201.
113. Ruebenbauer T., Kubara-Szpunar Ł., Pająk K. 1984. Testing of a hypothesis concerning interaction of genes with mutated cytoplasm controlling male sterility of the Pampa type in rye (*Secale cereale* L.). *Gennet. Pol.* 25: 1-16.
114. Saha D., Prasad A.M., Srinivasan R. 2007. Pentatricopeptide repeat proteins and their emerging roles in plants. *Plant Physiology and Biochemistry* 45: 521-534.
115. Schlegel R. 2006. Rye (*Secale cereale* L.) - a younger crop plant with bright future. W: *Praca zbiorowa pod redakcją R. J. Sing i P. Jauhar. Genetic Resources, Chromosome Engineering and Crop Improvement: Vol. II Cereals.* CRC Press. Boca Raton: 365–394.
116. Schlegel R. 2014. Rye. Genetics, Breeding and Cultivation. CRC Press Taylor & Francis Group. LLC. Boca Raton.
117. Schlegel R., Korzun V. 2022: Genes, markers and linkage data of rye (*Secale cereale* L.). 12th updated inventory. V. 01.22. pp. 1-115. <http://www.rye-gene-map.de>.
118. Scoles G.J., Evans L.E. 1979. The genetics of fertility restoration in cytoplasmic male sterile rye. *Can. J. Genet. Cytol.* 21: 417-422.
119. Sleper D., Poehlman J. 1995. *Breeding Field Crops*. Page 3.
120. Sofi P.A., Rather A.G., Wani S.A. 2007. Genetic and molecular basis of cytoplasmic male sterility in maize. *Commun. Biometry Crop Sci.* 2(1): 49–60.
121. Spiss L., Michalik B. 2009. *Hodowla heterozyjna*. W: *Hodowla roślin - praca pod redakcją Michalik B. PWRiL. Poznań: 199-259.*
122. Stein N., Herren G., Keller B. 2001. A new DNA extraction method for high-throughput marker analysis in a large-genome such as *Triticum aestivum*. *Plant Breed.* 120. 354-356.

123. Steinborn R., Schwabe W., Weihe A., Adolf K., Melz G., Boerner T. 1993 A new type of cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.): analysis of mitochondrial DNA. *Theor Appl Genet* 85:822–824.
124. Stojalowski S. 2010. Wykorzystanie markerów molekularnych w badaniach genetycznych i w hodowli mieszańców żyta z cytoplazmą sterylizującą CMS-C. Wydawnictwo Uczelniane ZUT. Szczecin.
125. Stojalowski S., Jaciubek M., Łapiński M. 2004a. Analiza sprzężeń markerów RAPD z genami męskiej sterility w populacji BC1 mieszańca międzyliniowego żyta z cytoplazmą cms- C. *Folia Univ. Agric. Stetin. Agricultura* 234 (93): 383-388.
126. Stojalowski S., Jaciubek M., Masojć P. 2005. Rye SCAR markers for male fertility restoration in the P cytoplasm are also applicable to marker-assisted selection in the C cytoplasm. *Journal of Applied Genetics*. 44(5): 371–373.
127. Stojalowski S., Kociuba M., Stochmal B., Kondziola M., Jaciubek M. 2008. Determining the plasmotypic structure of rye populations by SCAR markers. *J. Appl. Genet.* 49(3): 229-232.
128. Stojalowski S., Łapiński M., 1997. Jądrowa determinacja cechy jałowości pyłku u międzyliniowych mieszańców żyta z cytoplazmą cms-C. "Hodowla Roślin" - materiały z I Krajowej Konferencji. Poznań. 19-20 listopada 1997: 315-319.
129. Stojalowski S., Łapiński M., Masojć P. 2004b. RAPD markers linked with restorer genes for the C-source of cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breeding*. 123: 428-433.
130. Stojalowski S., Łapiński M., Szklarczyk M. 2006. Identification of sterility-inducing cytoplasm in rye using the plasmotype–genotype interaction test and newly developed SCAR markers. *Theor. Appl. Genet.* 112: 627–633.
131. Stojalowski S., Milczarski P. 2005. Markery molekularne sprzężone z *locus* genu przywracającego płodność u mieszańców żyta z cytoplazmą CMS-C. *Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.* 235: 219-226.
132. Stojalowski S., Milczarski P., Hanek M., Bolibok-Bragoszewska H., Myśków B., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. 2011. DArT markers tightly linked with the *Rfc1* gene controlling restoration of male fertility in the CMS-C system in cultivated rye (*Secale cereale* L.). *J. Appl. Genet.* 52: 313-318.
133. Stojalowski S., Myśków B., Hanek M. 2015. Phenotypic effect and chromosomal localization of *Ddw3*, the dominant dwarfing gene in rye (*Secale cereale* L.) *Euphytica*. 201 (1): 43-52.
134. Stracke S., Schilling A.G., Förster J., Weiss C., Glass C., Miedaner T., Geiger H.H. 2003. Development of PCR-based markers linked to dominant genes for male-fertility restoration in Pampa CMS of rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 106: 1184-1190.
135. Suzuki Y., Esumi Y., Yamaguchi I. 1999. Structures of 5-alkylresorcinol-related analogues in rye. *Phytochemistry*. 52 (2): 281–289.

136. Szechyńska-Hebda M., Hordyńska N., Wędzony M., Dyda M., Troczyńska J., Banaszak Z., Sobczak M., Różańska E., Wąsek I., Pilarska M., Ślesak I. 2021. Alternatywne czynniki redukujące zjawisko albinizmu roślin regenerowanych z androgenicznych kultur pszenicy i pszenżyta. Biuletyn IHAR Nr 295 / 2021: 75–77 E-ISSN: 2657–8913.
137. Sztuba-Solińska J. 2005. Systemy markerów molekularnych i ich zastosowanie w hodowli roślin. Kosmos 54(2-3): 227-239.
138. Tarkowski Cz. 1984. Genetyka, hodowla roślin, nasiennictwo. PWN. Warszawa.
139. Tarkowski Cz. i Miazga D. 1983. Cytogenetyka żyta. W: Biologia żyta - praca zbiorowa pod red. Tarkowskiego Cz. PWN. Warszawa: 100-139.
140. Tenhola-Roininen T., Kalendar R., Schulman A. H., Tanhuanpää P. 2011. A doubled haploid rye linkage map with a QTL affecting α -amylase activity. J. Appl. Genet. 52: 299-304.
141. Tomar R.S., Parakhia M., Golakiya B.A., Patel S. 2010. Molecular Markers and Plant Biotechnology. New India Publishing Agency New Delhi.
142. Tsa-ftaris S.A. 1995. Molecular aspects of heterosis in plants. Physiol. Plant. 94(2). 362–370.
143. Tudzynski P., Rogmann P., Geiger H.H. 1986. Molecular analysis of mitochondrial DNA from rye (*Secale cereale* L.). Theor. Appl. Genet. 72: 695-699.
144. Wang C.M., Li L.H., Zhang X.T., Gao Q., Wang R.F., Au D.G. 2009. Development and Application of EST-STS Markers Specific to Chromosome 1RS of *Secale cereale*. Cereal Research Communication 37: 13-21.
145. Warzecha R., Salak-Warzecha K. 1996. Comparative studies on CMS sources in rye. Votr. Pflanzenzuechtung. 35. 39-49.
146. Wehling P., Linz A., Hackauf B., Roux S.R., Ruge B., Klocke B. 2003. Leaf-rust resistance in rye (*Secale cereale* L.). 1. Genetic analysis and mapping of resistance genes *Pr1* and *Pr2*. Theor. Appl. Genet. 107: 432–438.
147. Wehling P., Roux S. 2007. International Symposium on Rye Breeding & Genetics. Federal Centre for Breeding Research on Cultivated Plants, 28-30.06.2006, Groß Lüsewitz, German. 71: 232-244.
148. Wiśniewska I., Rafalski A. 2003. Chromosomowa lokalizacja markerów tolerancyjności na glin u żyta. Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl. 230: 265-274.
149. Wolski T. 1983. Metody hodowli żyta. W: Biologia żyta - praca zbiorowa pod red. Tarkowskiego Cz. PWN. Warszawa: 186-247.
150. Van Ooijen J.W. 2004. MapQTL75. Software for the mapping of quantitative trait *loci* in experimental populations. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.
151. Van Ooijen J.W. 2018. JoinMap75. Software for the calculation of genetic linkage maps in experimental populations of diploid species. Kyazma B.V., Wageningen, Netherlands.

152. Vendelbo N.M., Mahmood K., Sarup P., Kristensen P.S., Orabi J., Jahoor A. 2021. Genomic Scan of Male Fertility Restoration Genes in a 'Gülzow' Type Hybrid Breeding System of Rye (*Secale cereale* L.). *Int. J. Mol. Sci.* 2021. 22. 9277.
153. Verheye W.H. 2010. *Plant Breeding and Genetics. Soils, Plant Growth and Crop Production Volume I.* Eolss Publishers. p. 185.
154. Zou C., Wang P., Xu Y. 2016. Bulk sample analysis in genetics, genomics and crop improvement. *Plant Biotechnol J* 2016. 14:1941–1955.
155. Żur I., Adamus A., Cegielska-Taras T., Cichorz S., Dubas E., Gajecka M., Juzoń-Sikora K., Kielkowska A., Malicka M., Oleszczuk S., Skrzypek E., Szała L., Szarejko I., Zimny J. 2022. Doubled Haploids: Contributions of Poland's Academies in Recognizing the Mechanism of Gametophyte Cell Reprogramming and Their Utilization in Breeding of Agricultural and Vegetable Species. *Polish Botanical Society. Acta Societatis Botanicorum Poloniae.* 2022. Vol. 91. Article 9128.