

**Genetyczne podłoże efektu heterozji oraz przywracania męskiej płodności u
mieszkańców żyta z cytoplazmą Pampa
(Okres realizacji: 2021-2026)**

Zespół wykonawców:

prof. dr hab. Stefan Stojalowski (ZUT Szczecin) – kierownik (*e-mail: sstojalowski.@zut.edu.pl*)

dr inż. Anna Bienias (ZUT Szczecin)

dr inż. Martyna Sobczyk (ZUT Szczecin)

mgr inż. Sylwia Czarnecka (ZUT Szczecin)

dr hab. Beata Myśków (ZUT Szczecin)

mgr inż. Marcin Berdzik (ZUT Szczecin)

dr hab. Marek Szklarczyk (UR Kraków)

dr Wojciech Wesolowski (UR Kraków)

mgr inż. Beata Domnicz (UR Kraków)

prof. dr hab. Paweł Krajewski (IGR PAN Poznań)

dr Monika Mokrzycka (IGR PAN Poznań)

dr hab. Magdalena Simlat (UR Kraków)

Cele projektu w 2024r.:

1. Genotypowanie zestawu linii intorgresyjnych przy użyciu metody GBSt oraz ocena zmienności fenotypowej mieszańców F1 między hodowlanymi liniami CMS-P a liniami introgresyjnymi (cel osiągnięty)
2. Ocena polimorfizmu genetycznego w populacji RPD1273 F2 oraz identyfikacja markerów molekularnych wykazujących związek z pyleniem roślin (cel osiągnięty/[w realizacji analizy DArTseq – termin do 15.12.2024.](#))
3. Identyfikacja genów o zróżnicowanej ekspresji w oparciu o wyniki sekwencjonowania mRNA (cel osiągnięty)
4. Wstępna ocena zróżnicowania genetycznego w obrębie linii używanych w aktualnych programach hodowlanych (cel osiągnięty/[w realizacji analizy DArTseq – termin do 15.12.2024.](#))

Materiał:

- Populacja F2 otrzymane w wyniku samozapylenia pojedynczych roślin z odmiany RPD1273
- Linia wsobna 541 w 3 różnych wersjach cytoplazmatycznych (z cytoplazmą normalną, Pampa i C)
- Linie blisko-izogeniczne względem linii 541 z cytoplazmami sterylizującymi – 4 linie S9
- Linie męskosterylne S82P/09 i NS1P
- Mieszańce F1 linii męskosterylnych z liniami i subliniami serii InA i InB powstałymi po krzyżowaniach między liniami 541 i WM18R (132 mieszańce F1)

Metody:

- Doświadczenia mikropoletkowe w 3 powtórzeniach ze wzorcem (układ bloków losowanych)
- Doświadczenie wazonowe (w warunkach kontrolowanego nawadniania w szklarni)
- Krzyżowania (w tym krzyżowania wsteczne)
- Analizy PCR (markery SCAR o znanej lokalizacji chromosomowej)
- Analizy GBS (DArTseq – analizy polimorfizmu DNA oraz GBS-t – analizy polimorfizmu RNA)
- Sekwencjonowanie transkryptomu w technologii Illumina (RNAseq)
- Analiza bioinformatyczna i statystyczna wyników (analiza bioinformatyczna danych DArTseq i RNAseq, statystyki charakteryzujące zmienność cech fenotypowych, podobieństwo genetyczne itp.)

Temat 1 – wyniki

Ocena zmienności fenotypowej mieszańców F1 między hodowlanymi liniami CMS-P a liniami introgresyjnymi – uśrednione wyniki dla komponentów rodzicielskich oraz zakresy zmienności badanych cech

Termin kłoszenia (liczba dni od 1 maja)

Linie ojcowskie (seria)	Linie mateczne					
	NS1P			S82P/05		
	Średnia	Min	Max	Średnia	Min	Max
InA	14,51	12,00	17,00	14,13	12,00	17,00
InB	14,33	13,00	17,00	13,33	11,00	17,00
Ogółem	14,48	12,00	17,00	13,93	11,00	17,00

Długość kłosa (cm)

Linie ojcowskie (seria)	Linie mateczne					
	NS1P			S82P/05		
	Średnia	Min	Max	Średnia	Min	Max
InA	12,87	9,50	16,20	12,08	6,70	15,80
InB	13,13	9,80	16,40	12,71	9,50	15,30
Ogółem	12,94	9,50	16,40	12,24	6,70	15,80

Termin kwitnienia (liczba dni od 1 maja)

Linie ojcowskie (seria)	Linie mateczne					
	NS1P			S82P/05		
	Średnia	Min	Max	Średnia	Min	Max
InA	20,30	17,00	23,00	20,06	18,00	25,00
InB	19,03	17,00	21,00	19,12	17,00	21,00
Ogółem	19,99	17,00	23,00	19,82	17,00	25,00

Liczba kłosek w kłosie

Linie ojcowskie (seria)	Linie mateczne					
	NS1P			S82P/05		
	Średnia	Min	Max	Średnia	Min	Max
InA	41,12	28,00	50,00	42,89	26,00	52,00
InB	39,74	26,00	50,00	42,72	30,00	54,00
Ogółem	40,77	26,00	50,00	42,85	26,00	54,00

Wysokość roślin (cm)

Linie ojcowskie (seria)	Linie mateczne					
	NS1P			S82P/05		
	Średnia	Min	Max	Średnia	Min	Max
InA	125,87	96,00	149,00	132,99	80,00	157,00
InB	137,83	94,00	168,00	147,14	113,00	169,00
Ogółem	128,93	94,00	168,00	136,64	80,00	169,00

Zbitość kłosa

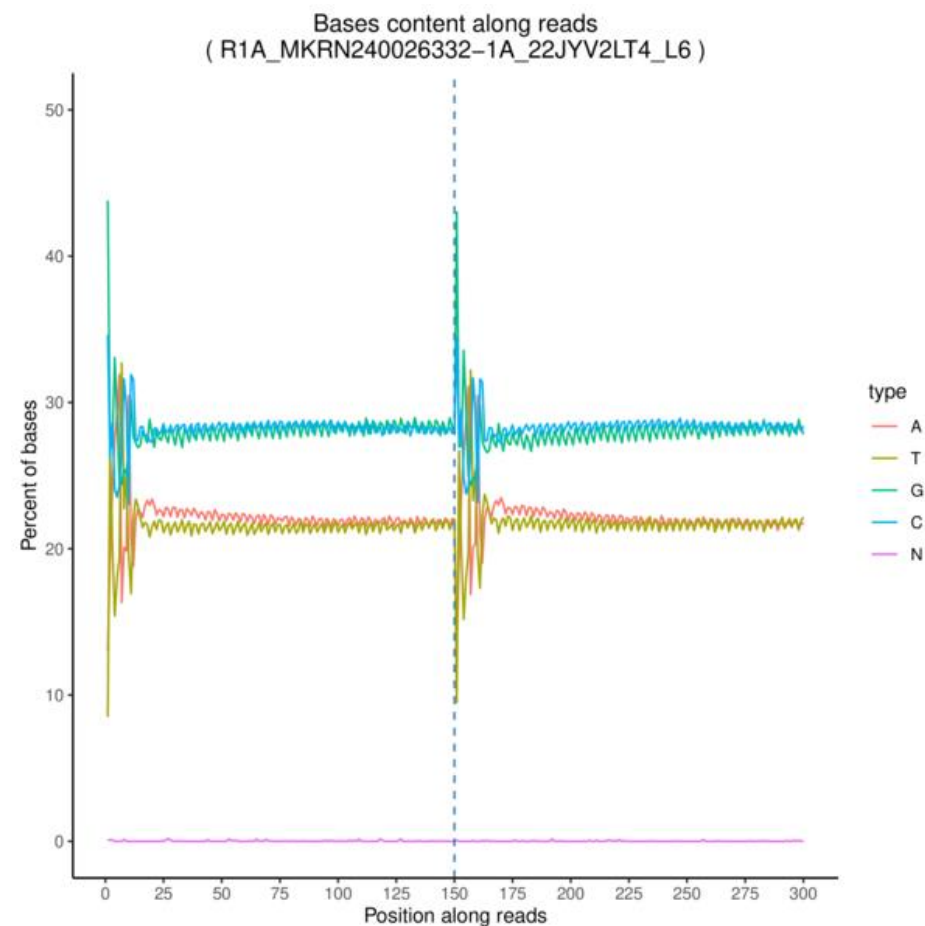
Linie ojcowskie (seria)	Linie mateczne					
	NS1P			S82P/05		
	Średnia	Min	Max	Średnia	Min	Max
InA	31,99	26,67	38,02	35,58	26,67	46,75
InB	30,35	25,00	36,52	33,65	27,69	40,35
Ogółem	31,57	25,00	38,02	35,08	26,67	46,75

Temat 1 – wyniki

Genotypowanie zestawu linii intorgresyjnych przy użyciu metody GBSt – charakterystyka danych sekwencyjnych

Parametry statystyczne uzyskanych odczytów sekwencyjnych

Parametr		Wartość
Liczba nukleotydów (w obrębie surowych odczytów)	Suma*	91 420 910 700
	Średnia	1 252 341 242,47
	Min.	797 023 800
	Maks.	2 086 627 200
Liczba surowych odczytów (tzw. raw reads)	Suma*	609 472 738
	Średnia	8 348 941,62
	Min.	5 313 492
	Maks.	13 910 848
% GC	Średnia	56,29
	Min.	55,195
	Maks.	57,29
% Q20	Średnia	97,69
	Min.	97,09
	Maks.	98,59
% Q30	Średnia	93,72
	Min.	92,08
	Maks.	96,03
Zawartość czystych odczytów (clean reads**) [%]	Średnia	96,68
	Min.	94,26
	Maks.	97,94
Poziom błędów [%]	Średnia	0,01
	Min.	0,01
	Maks.	0,01

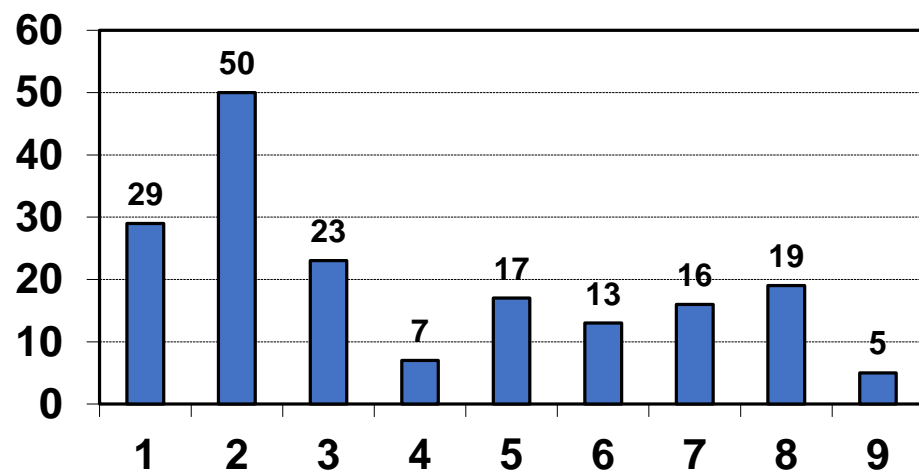


Przykładowa dystrybucja nukleotydów w obrębie odczytów jednej próbki (obiekt InA_002a)

Temat 2 – wyniki

Ocena polimorfizmu genetycznego w populacji RPD1273 F2 oraz identyfikacja markerów molekularnych wykazujących związek z pyleniem roślin

Z liści 94 roślin pochodzących z populacji RPD1273 F2 (populacja otrzymana po samozapyleniu pojedynczej rośliny F1 wyizolowano DNA i wysłano do genotypowania metodą DArTseq



Pylenie roślin populacji RPD1273 F2 w 2023 roku (skala 9-st) – DNA tej populacji zostało objęte genotypowaniem DArTseq

W celu zidentyfikowania źródeł efektywnego przywracania męskiej płodności u żyta z cytoplazmą Pampa wykonano oceny fenotypowe 70 mieszańców F1.

Liczebność mieszańców F1 zakwalifikowanych po ocenie fenotypowej do trzech głównych kategorii

Kategoria fenotypowa	Liczba mieszańców F1
Męskosterylne	67
Męskopłodne	2
Segregujące	1
Ogółem	70

Jeden z dwóch mieszańców męskopłodnych wymienionych w tabeli powyżej został wybrany jako źródło populacji mapującej F2 (120 nasion mieszańca F2 NS1P x NIL541P-4 wysiano do kontynuowania badań w 2025 roku)

Temat 3 – wyniki

Identyfikacja genów o zróżnicowanej ekspresji w oparciu o wyniki sekwencjonowania mRNA

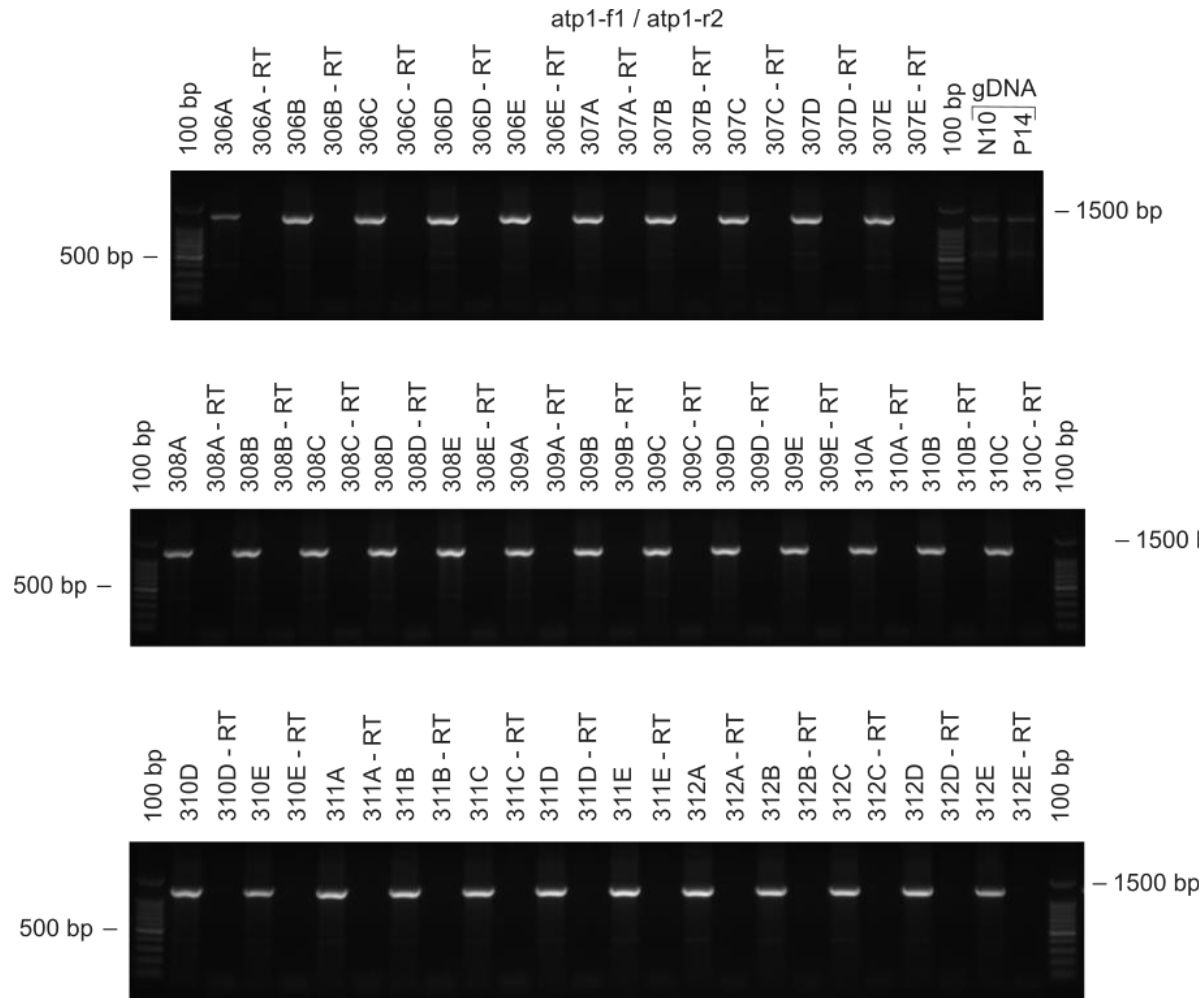
W zależności od porównywanych linii liczba genów o różnicowej ekspresji wahała się od 18 do 3 801. Najmniej różnic w ekspresji znaleziono pomiędzy liniami 541N i 541C, najwięcej – pomiędzy linią 541P i jedną P-plazmatyczną linią o przywróconej płodności (NIL541P-5). Wśród genów różnicujących linię 541P i P-plazmatyczne linie o przywróconej płodności (NIL541P-4 i NIL541P-5) wyraźnie dominowały geny o zwiększonej lub wyłącznej akumulacji u linii męskopłodnej.

Porównywana para linii	Fenotyp linii	Liczba genów różnicujących	Sposób różnicowania
541C / 541N	MS / MF	18	MS, MS>MF, MS<MF, MF
		5	MS
		6	MS>MF
		5	MS<MF
		2	MF
541P / 541N	MS / MF	566	MS, MS>MF, MS<MF, MF
		10	MS
		6	MS>MF
		530	MS<MF
		20	MF
541C / NIL541C-20	MS / R	505	MS, MS>MF, MS<MF, MF
		116	MS
		145	MS>R
		144	MS<R
		100	R
541C / NIL541C-22	MS / R	533	MS, MS>MF, MS<MF, MF
		76	MS
		209	MS>R
		116	MS<R
		132	R
541P / NIL541P-4	MS / R	469	MS, MS>MF, MS<MF, MF
		77	MS
		57	MS>R
		236	MS<R
		99	R
541P / NIL541P-5	MS / R	3801	MS, MS>MF, MS<MF, MF
		131	MS
		1289	MS>R
		2234	MS<R
		147	R

Tab. Liczba genów, dla których zaobserwowano istotną statystycznie ($\alpha=0,05^*$) różnicę w ekspresji i relacje ich ekspresji dla badanych par obiektów (MS – linia męskosterylna; MF – linia męskopłodna; R – linia z przywróconą płodnością).

Temat 3 – wyniki

Identyfikacja genów o zróżnicowanej ekspresji w oparciu o wyniki sekwencjonowania mRNA



Uzyskanie oczekiwanych produktów amplifikacji świadczy o tym, iż uzyskane preparaty cDNA stanowią wartościową matrycę dla eksperymentów RT-PCR. Brak produktów amplifikacji w kontrolach negatywnych (bez odwrotnej transkryptazy) jest dowodem, iż uzyskane preparaty cDNA nie są zanieczyszczone genomowym DNA.

Ryc. Produkty RT-PCR uzyskane na bazie RNA z kłosów żyta dla roślin 306A – 312E przy użyciu starterów atp1-f1 / atp1-r2. -RT – kontrola bez odwrotnej transkryptazy. N10 i P14 – kontrola genomowa DNA żyta. 100 bp – wzorzec wielkości fragmentów DNA (100 bp ladder, Dongsheng Biotech).

Temat 4 – wyniki

Wstępna ocena zróżnicowania genetycznego w obrębie linii używanych w aktualnych programach hodowlanych

Wśród 12 markerów PCR zlokalizowanych na chromosomie 4RL, które użyto do genotypowania linii hodowlanych dwa markery nie ujawniały produktów amplifikacji. W grupie markerów generujących fragmenty DNA w analizach PCR dwa (d508318 i SCSz23L500) nie różnicowały badanych linii.

Osiem markerów ujawniało polimorfizm genetyczny w obrębie badanej grupy genotypów.

Dane z analiz PCR zostaną uzupełnione wynikami otrzymanymi metodą DArTseq

Tab. Zestawienie markerów PCR użytych do analiz linii hodowlanych

Nazwa markera	Produkty amplifikacji	Polimorfizm
d505904	+	+
d508318	+	-
SCP12M56	+	+
SCP14M55	+	+
SCP15M55	-	-
SCP16M58	+	+
SCSz23L500	+	-
SCSz2L450	+	+
SCSz319L550F3R4	-	-
SCSz670L900	+	+
SCY09cd	+	+
SCY09d	+	+

Publikowanie wyników projektu w 2024 roku:

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja	liczba prezentacji podana w opisie zadania	liczba prezentacji zrealizowana
1	<p>„9th Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2024”, Kraków, 27-28 czerwca 2024 – poster P.3.7. pt “An attempt to use the GBS-t markers for mapping minor genes that restore male fertility in rye (<i>Secale cereale</i> L.) with the Pampa sterility-inducing cytoplasm” z <i>wynikami analiz GBSt</i> otrzymanymi w 2023 roku, dotyczącymi tematu <i>badawczego nr 2 (str. 17-20 sprawozdania za 2023 rok)</i></p> <p>Abstrakt P3.7 (str. 48): https://eurobiotech.krakow.pl/previous-eurobiotech/book-of-abstracts-2024</p>	Poster	1	1
2				