

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

**Zespół wykonawców:**

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

dr inż. Anna Bienias (ZUT Szczecin)

mgr inż. Martyna Sobczyk (ZUT Szczecin)

mgr inż. Sylwia Czarnecka (ZUT Szczecin)

mgr inż. Katarzyna Molik (ZUT Szczecin)

dr hab. Beata Myśków (ZUT Szczecin)

mgr inż. Marta Orłowska (ZUT Szczecin)

dr hab. Marek Szklarczyk (UR Kraków)

dr Wojciech Wesołowski (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 2022r.:

1. Zmapowanie heterozygotycznych alleli SNP w sekwencji genomu żyta (*cel osiągnięty*)
2. Reprodukacja 90 linii intorgresyjnych i wytworzenie mieszańców z męskosterylnymi testerami (*cel osiągnięty*)
3. Ocena męskiej płodności roślin pochodzących z 4 odmian mieszańcowych żyta oraz ocena polimorfizmu genetycznego w 3 odmianach (*cel osiągnięty*)
4. Rozmnożenie linii do analiz ekspresji genów (*cel osiągnięty*)

## **Materiał:**

- Odmiany mieszańcowe zarejestrowane i niezarejestrowane (Bono F1, DC2424/Gulden F1, Dolaro F1, Gonello F1, Konto F1, Palazzo F1, RPD1273, Skaltio F1, SMH604, Stakatto F1, Tur F1, Visello F1)
- Odmiany populacyjne (Amilo, Armand, Bosmo, D. Diament, D. Granat, Horyzo, Stanko, Vjatka)
- 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 S8
- Linie i sublinie S5 wytworzone z mieszańców między liniami 541 i WM18R z introgresjami w obu kierunkach (90 genotypów)
- Linie męskosterylne S82P/09 i NS1P

## **Metody:**

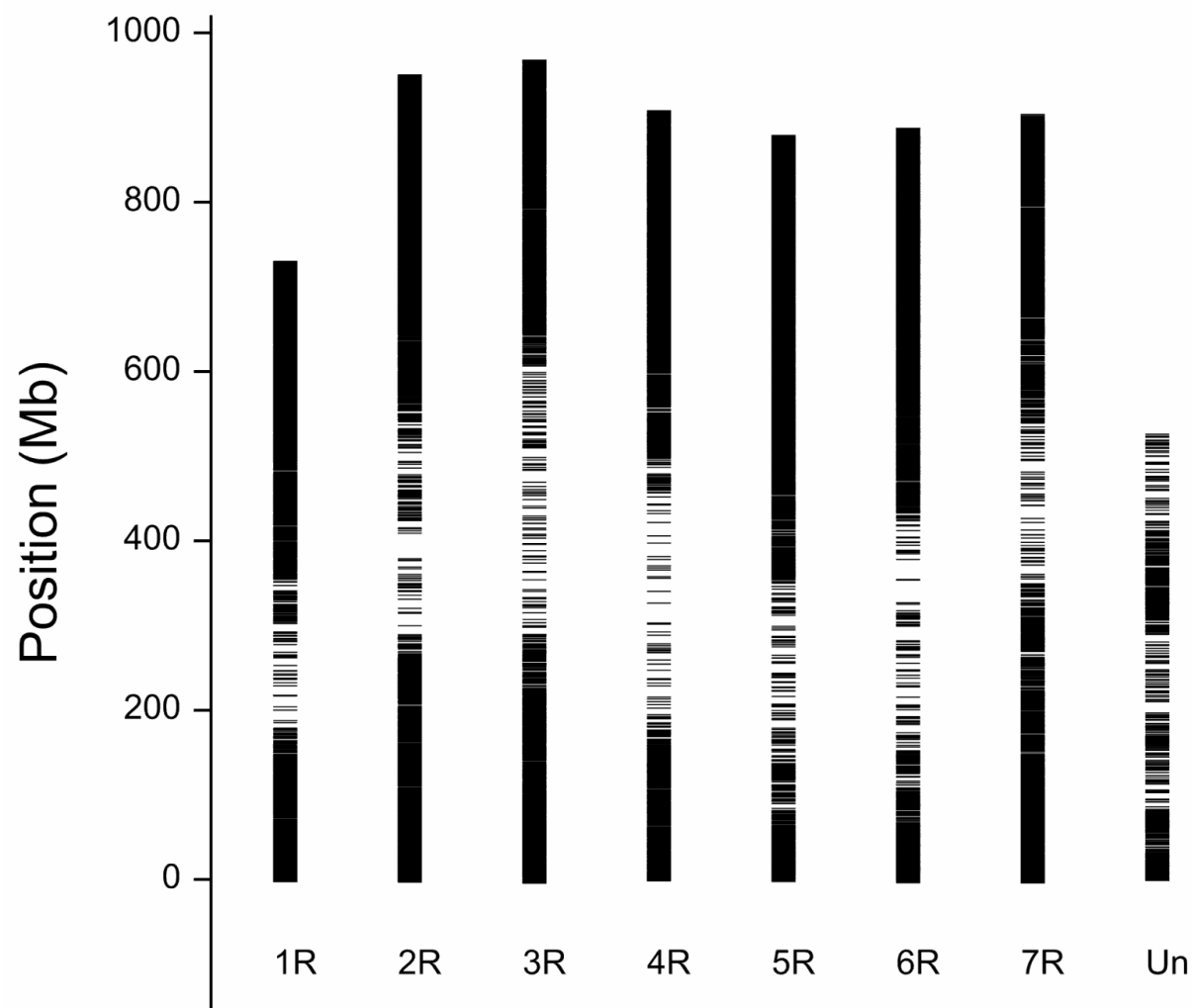
- Doświadczenia polowe bez powtórzeń – ocena fenotypowa pylenia i rozmnożenia materiałów
- Rozmnożenia wazonowe (w warunkach kontrolowanego nawadniania w szklarni)
- Krzyżowania (w tym krzyżowania wsteczne)
- Analizy PCR (markery SCAR o znanej lokalizacji chromosomowej – 4RL)
- Analizy GBS (DArTseq – analizy polimorfizmu DNA oraz GBS-t – analizy polimorfizmu RNA)
- Analiza bioinformatyczna i statystyczna wyników (analiza bioinformatyczna danych DArTseq, statystyki charakteryzujące zmienność cech fenotypowych, podobieństwo genetyczne itp.)

## Temat 1 – wyniki

### Mapowanie wysoce heterozygotycznych markerów SNP

Liczba markerów SNP użyta w czasie analiz to 70574. Część markerów charakteryzowała się stosunkowo dużą liczbą brakujących wyników (powyżej 40%) – z tego powodu 24121 markerów zostało pominiętych przy mapowaniu.

Poszukiwaniami sekwencji zgodnych w bazie genomowej żyta objęto 46453 sekwencje markerów SNP. Dla 7920 markerów nie znaleziono w sekwencji linii Lo7 wystarczająco zgodnej sekwencji nukleotydów DNA. **Pozostałe 38533 markery SNP zmapowano do sekwencji referencyjnej**, ale około 10% z nich (3874 markery) zostało zmapowane w sposób niejednoznaczny: podobne sekwencje DNA znaleziono w dwóch lub w większej liczbie miejsc w genomie. Ostatecznie 34659 markerów SNP zmapowano do referencyjnej sekwencji genomowego DNA żyta (ryc.1)

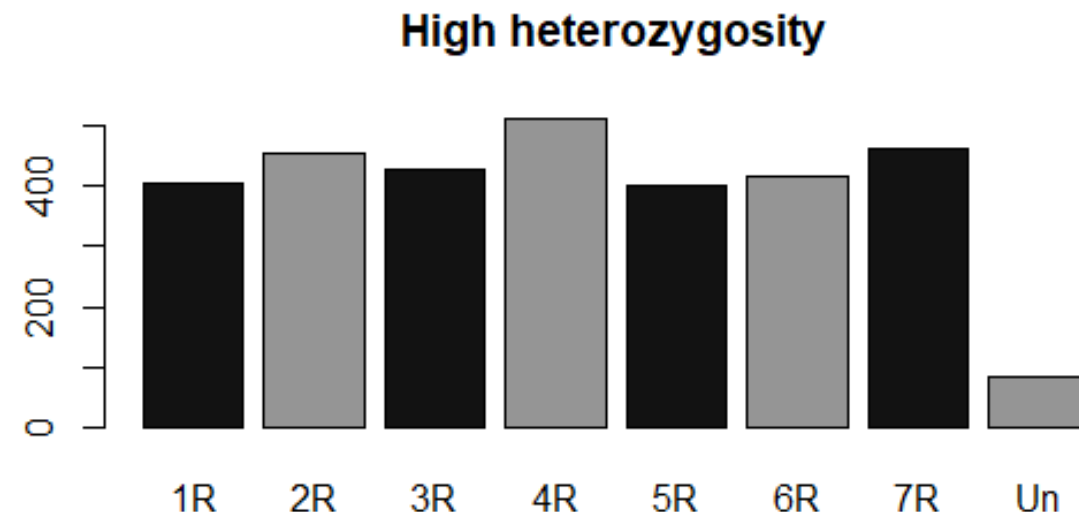


**Ryc.1** Mapa chromosomów żyta z 34421 markerami SNP

## Temat 1 – wyniki

### Mapowanie wysoce heterozygotycznych markerów SNP

Spośród zmapowanych markerów wyselekcjonowano te o najwyższym poziomie heterozygotyczności (powyżej 90%). Było ich 3156. Wykonana analiza uwidoczniła, że są względnie równomiernie rozmieszczone na wszystkich chromosomach (ryc.2). **Na każdym chromosomie zidentyfikowano od 400 do 500 markerów SNP o wysokim poziomie heterozygotyczności.** W grupie Un (sekwencje nieprzypisane do żadnego z siedmiu chromosomów żyta) markerów takich było względnie niewiele – poniżej 100



**Ryc.2** Lokalizacja wysoko-heterozygotycznych markerów SNP zmapowanych do genomu referencyjnego żyta Lo7 (Rabanus-Wallace i in. 2021). *Na osi OY liczby markerów o heterozygotyczności powyżej 90%*

## **Temat 2 – wyniki**

### **Reprodukcja 90 linii intorgresyjnych i wytworzenie mieszańców z męskosterylnymi testerami**

Wytworzono na drodze chowu wsobnego nasiona 90 linii intorgresyjnych (pokolenie B4S6).

Wykonano serię krzyżowań testowych: dwie męskosterylne linie hodowlane (S82P/09 i NS1P) pełniące rolę testerów zapylano pyłkiem 90 linii z kolekcji linii intorgresyjnych (z uwzględnieniem linii rodzicielskich 541 i WM18R).

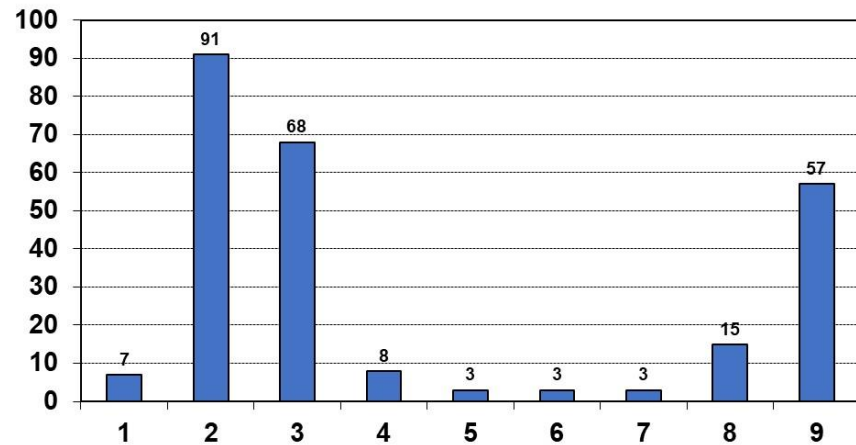
W krzyżowaniach z linią S82P/09 uzyskano nasiona z 83 kombinacji (w 7 kombinacjach nie otrzymano nasion). Liczba uzyskanych nasion mieszańcowych w poszczególnych kombinacjach była bardzo zróżnicowana: od 2 do 376.

W krzyżowaniach z linią NS1P otrzymano nasiona mieszańcowe z 75 kombinacji krzyżowania (część krzyżowań nie dała żadnych ziaren, a kilka trzeba było zdyskwalifikować ze względu na niepełną sterylność niektórych roślin linii NS1P). Uzyskane liczebności nasion w obrębie kombinacji mieszczą się w szerokim zakresie od 1 do 678)

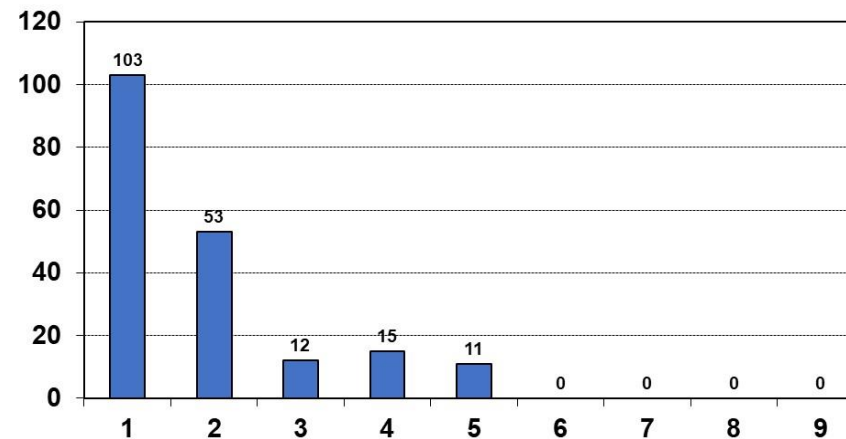
Z uwagi na niewystarczającą ilość uzyskanych nasion, linie intorgresyjne wraz z testerami hodowanymi wysiano ponownie w Hali Wegetacyjnej ZUT w Szczecinie w celu wykonania kolejnej serii krzyżowań w roku 2023.

## Temat 3 – wyniki

### Ocena męskiej płodności roślin pochodzących z 4 odmian mieszańcowych żyta oraz ocena polimorfizmu genetycznego w 3 odmianach



Pylenie roślin odmiany Dolaro (skala 9-st)



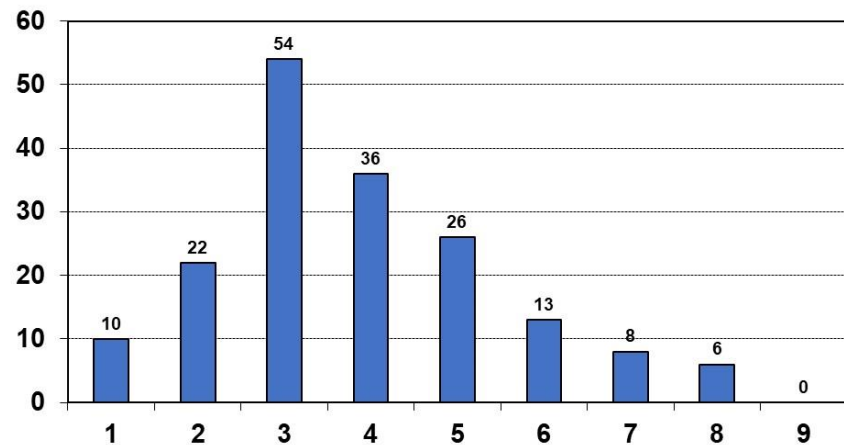
Pylenie roślin odmiany Gulden (skala 9-st)

Obserwacje pylenia roślin w odmianie Dolaro ujawniły wiele roślin męskosterylnych (ok. 65% pojedynków w odmianie nie tworzyło pyłku). Rośliny częściowo płodne w Dolaro prawie nie występowały. Prawie 30% roślin wykazywało silne pylenie.

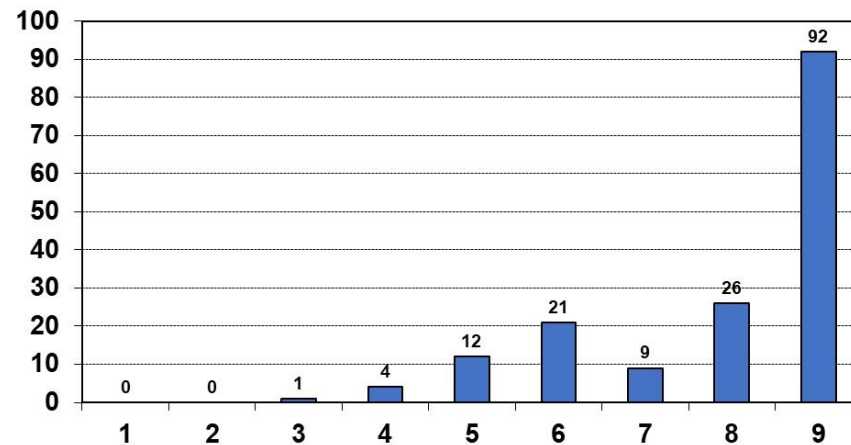
W odmianie Gulden (d. DC2424) dominowały rośliny męskosterylne. Udział roślin częściowo płodnych był stosunkowo niewielki, a roślin w pełni męskopłodnych nie zaobserwowano.

## Temat 3 – wyniki

### Ocena męskiej płodności roślin pochodzących z 4 odmian mieszańcowych żyta oraz ocena polimorfizmu genetycznego w 3 odmianach



Pylenie roślin odmiany RPD1273 (skala 9-st)



Pylenie roślin odmiany SMH604 (skala 9-st)

Dwie niezarejestrowane odmiany z krajowej hodowli różniły się wyraźnie pod względem pylenia roślin. W odmianie RPD1273 przeważały formy częściowo płodne i męskosterylne o względnie niewielkim poziomie degeneracji męskich organów w kwiatach. Formy w pełni męskopłodne występowały sporadycznie w odmianie RPD1273, ale stanowiły kategorię dominującą w obrębie SMH604 (ponad połowa roślin otrzymała maksymalną ocenę intensywności pylenia, czyli 9). W odmianie SMH604 rośliny męskosterylne praktycznie nie występowały (znaleziono tylko 1 taką roślinę na 165 ocenionych)



## Temat 4 – wyniki

### Rozmnożenie linii do analiz ekspresji genów

W roku 2022 wykonano rozmnożenia **trzech wersji cytoplazmatycznych linii wsobnej 541**: forma męskopłodna 541N posiada cytoplazmę normalną, męskosterylna wersja 541P ma cytoplazmę Pampa, a męskosterylna 541C – CMS-C. Pełną sterylność linii 541P i 541C potwierdzono w czasie obserwacji wzrokowych pylenia (zastosowano skalę bonitacyjną Geigera i Morgensterna) oraz w oparciu o brak zawiązanych nasion w zaizolowanych kłosach kontrolnych.

Dodatkowo wykonano reprodukcję dwóch par linii blisko-izogenicznych (jedna para z cytoplazmą Pampa, druga z CMS-C)

Materiał roślinny do planowanych analiz ekspresji wysiano we wrześniu br. do plastikowych multidonic ogrodniczych (ze względu na silną depresję wsobną rozmnażane linie słabo kiełkują w warunkach polowych). Po wschodach rośliny wysadzono punktowo na polu Hali Wegetacyjnej ZUT (każda linia była reprezentowana przez 37-45 roślin).

Publikacje: -

Doniesienia konferencyjne:

- Stojalowski S., Bienias A., Sobczyk M., Hanek M., 2022. Genotyping and phenotyping of near-isogenic lines with two types of male sterility-inducing cytoplasm in rye. 6th Polish Congress of Genetics, Kraków 27-30. 06. 2022. PR-4-15 (*wyniki prezentowano w czasie kongresu na posterze*)