

WYNIKI

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2024 roku

Genetyczne podłoże efektu heterozji oraz przywracania męskiej płodności u mieszańców żyta z cytoplazmą Pampa

Temat badawczy 1

Mapowanie genów odpowiedzialnych za wybrane cechy użytkowe.

Cel tematu badawczego: Genotypowanie zestawu linii intorgresyjnych przy użyciu metody GBSt oraz ocena zmienności fenotypowej mieszańców F1 między hodowlanymi liniami CMS-P a liniami intorgresyjnymi

Wyniki

Wyniki oceny faz fenologicznych wskazują, że w roku 2024 wegetacja nie była opóźniona przez warunki pogodowe. Uśredniony termin kłoszenia w doświadczeniu polowym to 14 maja. Poletko, na którym najwcześniej pojawiło się 50% w pełni wykłoszonych roślin było jednym z powtórzeń mieszańca S82P/05 x InB037 – było to 11 maja. Najpóźniejszy termin kłoszenia to 17 maja i w tym przypadku rośliny pochodziły z licznych poletek obsianych różnorodnymi kombinacjami mieszańców. Ogólnie rzecz biorąc poszczególne genotypy kłosiły się w badanych blokach doświadczalnych dość równomiernie – najczęściej różnica między najwcześniejszym i najpóźniejszym poletkiem nie była większa niż 1-2 dni, ale sporadycznie odnotowano obiekty o większym zróżnicowaniu (3 dni różnicy), a dla jednego z mieszańców (NS1P x InB032) różnica sięgała 4 dni. Odmiana wzrocowa Gulden F1 należała do najwcześniejszych kłoszących się, ale z uwagi na rozmieszczenie w każdym z bloków w licznych powtórzeniach też wykazywała zróżnicowanie, które było porównywalne z badanymi mieszańcami. Przejście roślin od fazy kłoszenia do kwitnienia następowało dość dynamicznie ze względu na względnie wysokie temperatury i brak opadów. Początek kwitnienia na licznych poletkach odnotowano już 17 maja, czyli wtedy, gdy część poletek jeszcze była w fazie wysuwania kłosów z pochew liściowych. Uśredniony termin początku kwitnienia w obrębie wszystkich poletek doświadczenia to 20 maja. Wszystkie mieszańce, w których komponentami ojcowskimi były linie z serii InB zakwitły najpóźniej do 21 maja. Niektóre mieszańce z udziałem linii serii InA rozpoczynały kwitnienie 2-4 dni później (NS1P x InA015, NS1P x InA064, NS1P x InA105 i S82P/05 x InA080), ale były to przypadki mało liczne i dotyczyły pojedynczych poletek w doświadczeniu. Podsumowując, ocena wczesności (dynamiki kłoszenia i kwitnienia) w roku 2024 wskazuje, że zróżnicowanie obiektów doświadczenia w tych, dość typowych dla Polski, warunkach pogodowych, nie było znaczące i nie pozwala na wskazanie genotypów szczególnie wyróżniających się pod względem dynamiki faz rozwojowych.

Ocena wysokości roślin mieszańców, które badano w doświadczeniu, ujawniła zróżnicowanie wyraźnie większe niż to miało miejsce w przypadku oceny wczesności faz rozwojowych. Co prawda średnia wysokość badanych mieszańców (132,85cm) była bardzo podobna do wysokości roślin na poletkach z odmianą wzorcową Gulden F1 (132,64cm), ale zaobserwowano różnice wśród mieszańców wynikające zarówno z udziału komponentu matecznego, jak i ojcowskiego. Mieszańce, w których formą mateczną była linia S82P/05 miały zauważalnie większą wysokość (średnio 136,64cm) od tych z udziałem NS1P (średnia

na poziomie 128,93cm). Komponent ojcowski wydaje się przy ocenie tej cechy równie istotny. Mieszzańce otrzymane w wyniku zapylenia linii matecznych pyłkiem pochodzącym z linii introgressyjnych z serii InA miały uśrednioną wysokość na poziomie 129,43cm, podczas gdy genotypem ojcowskim były linie InB ta średnia osiągnęła wartość 142,22cm. Z drugiej strony trzeba zauważyć, że cecha wysokości roślin podlegała znaczącej zmienności środowiskowej, czego dowodem są wyniki pomiarów na poletkach wzorca (Gulden F1), gdzie odnotowane wartości mieszczą się w bardzo szerokim zakresie od 112 do 162cm.

Średnia długość kłosa u prawie wszystkich mieszańców eksperymentalnych była większa niż w odmianie wzorcowej Gulden F1. Przypadkowa zmienność tej cechy w obrębie powtórzeń doświadczenia była względnie duża: np. dla odmiany wzorcowej rozmieszczonej co 7 poletek doświadczenia, średnia długość kłosa mieściła się w granicach od 8,2 cm do 14,8 cm. Podobnie, jak w przypadku oceny wysokości roślin zauważalny jest wpływ komponentów rodzicielskich na wartości badanej cechy. Nieco większe wartości średnie długości kłosów odnotowano, gdy komponentem matecznym była linia NS1P w porównaniu do S82P/05 – różnica ta wynosiła ok. 0,5-0,7 cm. W podobny sposób różniły się średnie dla mieszańców, w których komponentami ojcowskimi były linie z serii InB względem tych z liniami InA.

Różnice w długości kłosów nie miały bezpośredniego przełożenia na liczebność kłosków w kłosie. Cecha ta należy do ważnych parametrów plonotwórczych. Większość badanych mieszańców charakteryzowała się średnimi liczebnościami kłosków w kłosie mniejszymi niż odmiana Gulden F1. Dotyczyło to w szczególności mieszańców z udziałem linii NS1P jako matki – pomimo stosunkowo długich kłosów, liczebności kłosków w kłosie były na przeciętnym poziomie (średnio 40,77), wyraźnie niższym niż średnia dla wzorca (43,87). Mieszzańce, w których komponentem matecznym była linia S82P/05 miały średnio 42,85 kłosów w kłosie, a wśród nich aż 12 charakteryzowało się średnią przewyższającą odmianę Gulden F1 (wśród mieszańców z udziałem NS1P nie było ani jednego takiego przypadku).

Ze względu na zaobserwowane różnice w obrębie obiektów doświadczenia dotyczące długości kłosów i liczby kłosków w kłosie, obliczono parametr określany jako zbitość kłosa (odpowiadający średniej liczbie kłosków na 10cm osadki kłosowej). Odmiana wzorcowa Gulden F1 miała stosunkowo krótkie kłosa, ale o najwyższym poziomie zbitości. Wśród badanych obiektów doświadczenia tylko jeden mieszańiec (S82P/05 x InA080) dorównał poziomem zbitości wzorcowi, ale nie było to wskaźnikiem wysokiego potencjału plonotwórczego, a raczej efektem słabej żywotności roślin na niektórych poletkach doświadczenia objawiającej się wykształceniem stosunkowo krótkich kłosów (średnia długość kłosa między replikacjami doświadczenia mieściła się w bardzo szerokim zakresie od 6,7cm do 13,0cm). W świetle opisanych powyżej wyników oceny długości kłosów i liczby kłosków w kłosie dość oczywista jest wyraźna różnica w poziomie zbitości wynikająca z wpływu genotypu matecznego: średnia zbitość kłosa dla mieszańców z udziałem NS1P (31,57) jest wyraźnie mniejsza niż wtedy, gdy linią mateczną była S82P/05 (35,08). Mieszzańce, w których formą ojcowską były linie z serii InA miały kłosa o nieco większej zbitości niż te z udziałem linii InB (średnia różnica w wartościach zbitości na poziomie 1,5-2,0 była zauważalna w mieszańcach z obiema liniami matecznymi).

Średnia masa ziaren w kłosach odmiany wzorcowej Gulden F1 podlegała dość dużemu zróżnicowaniu w zależności od lokalizacji poletek w doświadczeniu. Uśrednione wartości z powtórzeń wskazują, że większość badanych mieszańców eksperymentalnych (109 spośród 132 badanych w doświadczeniu) charakteryzowała się mniejszym od wzorca plonem

ziarna z pojedynczego kłosa. Niektóre mieszańce tworzyły ziarno o masie większej niż wzorzec – takich mieszańców zidentyfikowano 23. Wśród nich tylko jeden z mieszańców został otrzymany w oparciu o męskosterylną linię NS1P (zapyłaczem była linia InB_022), a uzyskany wynik średniej masy ziarna z kłosa bardzo nieznacznie przewyższał wartość dla odmiany wzorcowej (2,95 vs. 2,94) nie przekraczając granicy błędu statystycznego. Średnia masa ziaren z kłosa w żadnym przypadku nie była większa niż wartość maksymalna dla pojedynczego poletka wzorcowej odmiany Gulden F1, ale pięć mieszańców charakteryzowało się zauważalnie wyższymi wartościami badanej cechy: S82P/05 x InA_059, S82P/05 x InA_093, S82P/05 x InA_097, S82P/05 x InB_022 i S82P/05 x InB_037 (tab.1.6). Mieszańce te otrzymano po zapyleniu męskosterylnej linii S82P/05 pyłkiem linii z obu analizowanych serii (InA i InB).

Podsumowując wyniki analizy fenotypowej w obrębie doświadczenia polowego: oceniono 5 cech bezpośrednio w materiale badawczym (oraz dodatkowo wykonano obliczenia w celu scharakteryzowania zbitości kłosa, jako cechy pochodnej). Fenologię mieszańców oceniono w oparciu o terminy kłoszenia i kwitnienia – zaobserwowana zmienność była niewielka w warunkach pogodowych sprzyjających dość dynamicznemu przebiegowi tych etapów życiowych roślin. Pozostałe cechy, które analizowano charakteryzowały się względnie dużą zmiennością.

Genotypowaniem metodą GBSt objęto w 2024 roku linie rodzicielskie mieszańców badanych w opisanym powyżej doświadczeniu polowym. Były wśród nich wszystkie linie ojcowskie w liczbie 65 (w tym: 48 linii serii InA i 17 linii serii InB) oraz dwie linie mateczne (NS1P i S82P/05). Analizy linii matecznych, z których każda była rodzicem aż 65 mieszańców, wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych (RNA izolowano z dwóch niezależnie pobranych próbek liści). Dodatkowymi obiektami, które objęto genotypowaniem były linie rodzicielskie dla linii introgresyjnych: 541 i WM18R, które też genotypowano w dwóch replikacjach. W sumie analizami sekwencyjnymi objęto 67 genotypów uczestniczących w doświadczeniu polowym, które były (po uwzględnieniu powtórzeń biologicznych oznaczanych jako -A i -B) reprezentowane przez 73 próbki wyizolowanego z młodych liści RNA.

Średnio liczba surowych odczytów wygenerowana dla pojedynczej próby (forward i reverse) wynosiła ponad 8 mln. Odpowiadało to zakresowi od 797 023 800 do 2 086 627 200 odczytanych nukleotydów. W całym eksperymencie uzyskano ponad 90 mld zsekwencjonowanych nukleotydów. W uzyskanych odczytach procent nukleotydów G i C mieścił się w zakresie 55,2 – 57,3, a średnia wartość wynosiła 56,3%. Średni udział nukleotydów ze współczynnikami jakości Q20 i Q30 wyniósł odpowiednio 97,69 oraz 93,72%. Udział tzw. „czystych” odczytów zawierał się w przedziale 94,26% – 97,94% ze średnią 96,68% dla całości. Parametr error rate (poziom błąd na zsekwencjonowaną zasadę) dla wszystkich prób wynosił 0,01%, co odpowiada najlepszym osiągom sekwencjonowania Illuminy. Dystrybucja poziomu błędów wzdłuż odczytów była typowa dla tej technologii – poziom ten stopniowo rósł ku końcowi odczytu.

Temat badawczy 2

Mapowanie genów przywracających męską płodność u żyta z cytoplazmą P

Cel tematu badawczego: Ocena polimorfizmu genetycznego w populacji RPD1273 F2 oraz identyfikacja markerów molekularnych wykazujących związek z pyleniem roślin.

Wyniki

Genotypowanie populacji mapującej mieszańca RPD1273 F2 przy użyciu metody DArTseq było źródłem 122679 dominujących markerów Silico-DArT oraz 63306 markerów kodominujących typu SNP. Z uwagi na większą informatywność w populacji F2 markerów kodominujących, do mapowania genów warunkujących przywracanie męskiej płodności mieszańca RPD1273 użyto markerów SNP. Po sprawdzeniu zgodności segregacji markerów z modelem jednogenowym (użyto klasycznego testu Chi-kwadrat), okazało się że tylko 8,5% z nich spełnia to kryterium: do dalszych analiz wytypowano 5410 markerów.

Związek markerów z męską płodnością oceniano przy użyciu testu Kruskala-Wallisa wykorzystując dane fenotypowe otrzymane dwiema metodami: na podstawie obserwacji wzrokowych (przy zastosowaniu 9-stopniowej skali bonitacyjnej wg Geigera i Morgensterna) oraz w oparciu o osadzanie ziaren w zaizolowanych kłosach. Za markery istotnie związane z cechą uznawano te, które wykazywały statystyczną istotność przy analizowaniu danych otrzymanych zarówno jedną, jak i drugą metodą. Zidentyfikowano 281 takich markerów. Mapowanie sekwencji tych markerów do sekwencji genomu żyta (Rabanus-Walles i in. 2021) pozwoliło na określenie lokalizacji chromosomowych dla większości z nich. Prawie połowa z markerów istotnie związanych z męską płodnością zmapowana została na chromosomie 6R. Kolejne 30% markerów pochodziło z chromosomu 1R. Można założyć, że dwa geny restorerowe aktywne w mieszańcu RPD1273 zlokalizowane są na tych dwóch chromosomach. Obecność 1-2 wykazujących istotność statystyczną markerów na chromosomach 2R, 3R, 4R i 7R to najprawdopodobniej błąd mapowania. Również mało wiarygodnym wskazaniem lokalizacji genu restorerowego jest fakt wykrycia 4 markerów na chromosomie 5R. Nieco więcej, bo 12 markerów zostało przypisanych do grupy 0R. Grupa 0R została przez Rabanus-Wallisa i in. (2021) utworzona z kontigów DNA, których nie udało się zinegrować z żadnym z siedmiu chromosomów żyta. Ostatnie 32 markery (11,4% markerów wykazujących istotność) nie zostały w ogóle zmapowane do sekwencji genomowego DNA żyta.

Wśród badanych w 2024 roku mieszańców F1 powstałych na drodze zapylenia męskosterylnej linii NS1P pyłkiem siedemdziesięciu linii wsobnych, prawie wszystkie genotypy były całkowicie męskoniepłodne. W 9-stopniowej skali bonitacyjnej wg Geigera i Morgensterna (1975) aż 67 mieszańcom przyznano ocenę od 2 do 3, co przekłada się na kategorię roślin męskosterylnych (MS). Weryfikacja ocen wzrokowych oparta o liczebności ziaren w izolowanych kłosach potwierdziła poprawność obserwacji wykonanych w czasie kwitnienia. Co prawda w przypadku pięciu mieszańców zakwalifikowanych do kategorii MS (NS1P x InA086; NS1P x InA092; NS1P x InA107, NS1P x InB014 i NS1P x InB019) w pojedynczych kłosach pojawiły się nieliczne ziarna (najczęściej maksymalnie 1 w kłosie) powstałe na drodze samozapylenia, ale średnia liczba ziaren nie przekraczała 0,5 ziarna na kłos.

Trzy badane mieszańce wyróżniały się z grupy mieszańców męskosterylnych. Pierwszym z nich był mieszaniec NS1P x InB021, który był niewyrównany pod względem fenotypowym. W czasie oceny wzrokowej wśród roślin w pełni męskosterylnych (ocena 2- w skali bonitacyjnej) zaobserwowano obecność kłosów uwalniających niewielkie ilości płodnego pyłku (zakwalifikowano te kłosy do kategorii częściowo-płodnych – w skali bonitacyjnej ocena równa 4). Ocena wzrokowa została potwierdzona obecnością dość licznych ziaren w jednym z kilku badanych kłosów (pozostałe były w pełni męskosterylne). Uśredniona wartość liczby ziaren w kłosie dla tego mieszańca to 4,59. Mieszańca z linią InB021 zakwalifikowano do kategorii segregujących (niewyrównanych). Dwa ostatnie

mieszańce mieszańce oceniane fenotypowo to formy męskopłodne: NS1P x NIL541P-4 i NS1P x NIL541C-20. W ocenie wzrokowej przyznano im wartości 7-8 w skali Geigera-Morgensterna (1975), a średnie liczebności ziaren w zaizolowanych kłosach wynosiły dla tych mieszańców, odpowiednio: 32,0 i 41,8. Wszystkie badane kłosy z izolatorami zawierały związane ziarna, chociaż cecha ta była dość zmienna. Około 120 ziaren pokolenia F2 mieszańca NS1P x NIL541P-4 wysiano jesienią 2024 roku na polu doświadczalnym Hali Wegetacyjnej ZUT w celu uzyskania populacji mapującej do lokalizowania markerów sprzężonych z genem/genami restorerowymi.

Temat badawczy 3

Analiza porównawcza transkryptomów roślin zróżnicowanych pod względem męskiej płodności

Cel tematu badawczego: Identyfikacja genów o zróżnicowanej ekspresji w oparciu o wyniki sekwencjonowania mRNA

Wyniki

Porównanie ekspresji genów u linii 541C i 541N wykazało istotne różnice dla 18 genów. Wśród nich było 5 genów ulegających wyłącznej ekspresji w linii sterylnej (541C), 2 ulegające wyłącznie ekspresji w linii męskopłodnej (541N) oraz 11 genów ulegających ekspresji u obu linii, ale w różnym nasileniu. Bioinformatyczna analiza funkcjonalna nie wykazała homologii żadnego z genów różnicujących do genów kodujących białka PPR.

Z kolei porównanie ekspresji genów u linii 541P i 541N wykazało istotne różnice dla 566 genów. Wśród nich było 10 genów ulegających wyłącznej ekspresji w linii męskosterylnej (541P) i 20 ulegających ekspresji wyłącznie w linii męskopłodnej (541N). Wśród genów ulegających ekspresji u obu linii w różnym nasileniu dominowały te, które wykazywały silniejszą ekspresję u linii męskopłodnej. Genów takich było aż 530. Bioinformatyczna analiza funkcjonalna wykazała, że wśród nich 2 kodują białka PPR.

Porównanie ekspresji genów linii 541C oraz NIL541C-20 wykazało 505 genów różnicujących. Spośród nich 116 ulegało ekspresji wyłącznie w linii MS, natomiast 100 – wyłącznie w linii z przywróconą płodnością. Z kolei 145 genów charakteryzowało się zwiększoną ekspresją u linii 541C, a 144 u linii NIL541C-20. Wśród genów różnicujących znalazły się cztery geny kodujące białka PPR. Cechowała je podwyższona bądź wyłączna ekspresja u linii z przywróconą płodnością.

Analiza porównawcza linii męskosterylnej 541C oraz linii z przywróconą płodnością NIL541C-22 wykazała istotnie zróżnicowaną ekspresję dla 533 genów. 76 z nich ulegało ekspresji wyłącznie u linii 541C, a 132 wyłącznie u linii NIL541C-22. Zdecydowanie największa liczba – 209 – genów wykazywała silniejszą ekspresję u linii męskosterylnej, a tylko 116 u linii z przywróconą płodnością. Pięć spośród genów różnicujących koduje białka PPR. Wśród nich były dwa ulegające ekspresji wyłącznie u linii NIL541C-22, dwa o silniejszej ekspresji u tej linii oraz jeden ulegający ekspresji wyłącznie w linii 541C.

Analiza porównawcza linii męskosterylnej 541P oraz linii z przywróconą płodnością NIL541P-4 ujawniła zróżnicowaną istotnie ekspresję dla 469 genów. Spośród nich około połowa ulegała silniejszej ekspresji u linii NIL541P-4, ale tylko jeden z tych genów koduje białko PPR. Wśród pozostałych genów 57 ulegało silniejszej ekspresji u linii męskosterylnej, 77 wyłącznie u linii męskosterylnej, a 97 wyłącznie u linii z przywróconą płodnością.

Zdecydowanie najwięcej genów o istotnie zróżnicowanej ekspresji zidentyfikowano dla linii 541P oraz NIL541P-5. Było ich 3801, przy czym ponad połowa – bo aż 2234 – wykazywała silniejszą ekspresję u linii z przywróconą płodnością. Wśród pozostałych genów 147 ulegało ekspresji tylko u linii NIL541P-5, a 131 wyłącznie u linii 541P. Pozostałe to geny o silniejszej ekspresji u linii 541P.

Ocena fenotypowa siedmiu linii wsobnych używanych do analiz transkryptomycznych została wykonana, aby mieć pewność że ani warunki pogodowe, ani błędy techniczne nie wpłynęły na poprawność wyboru materiału biologicznego do analiz na poziomie molekularnym. Wyniki potwierdziły, że fenotypy badanych obiektów są w pełni zgodne z założeniami (linie 541C i 541P są w pełni męskosterylne, a pozostałe obiekty męskopłodne). Intensywność produkcji pyłku przez formy płodne nie była na najwyższym poziomie, co znalazło potwierdzenie w niezbyt dużych liczebnościach ziaren zawiązanych w izolowanych kłosach. Zauważalne są pewne rozbieżności w wynikach oceny fenotypowej otrzymanych dwiema metodami (ocena wzrokowa i ocena zawiązywania ziaren), co może wynikać z małej liczebności analizowanych kłosów. Generalnie jednak obie metody potwierdziły zakładaną wcześniej pełną sterylność dwóch obiektów i zdolność do tworzenia funkcjonalnego pyłku u pozostałych. Większość badanych linii była oceniana w warunkach szklarniowych (kłosy do izolacji mRNA pobierano w 2024 roku z doświadczenia wazonowego). Wyjątkiem była linia NIL541P-4 rosnąca w wazonie nr 309 – po pobraniu kłosów do analiz molekularnych pozostały w wazonie wyłącznie słabe i zdeformowane źdźbła, na których oceny fenotypowe byłyby niemiernodajne. Nasiona z tej samej partii (nr 22 0359 S) były też wysiane na poletkach doświadczalnych Hali Wegetacyjnej ZUT (poletko nr 1388), zdecydowano więc, że ocena fenotypowa tego genotypu będzie wykonana w warunkach polowych.

Analiza ekspresji dla transkryptu 3-013, przeprowadzona przy użyciu dwóch par starterów (f1r2 i f2r2), wykazała zarówno dla pary linii z cytoplazmą C jak i z cytoplazmą P wyraźnie wyższy poziom ekspresji u linii z przywróconą płodnością w porównaniu do linii CMS. Przy zastosowaniu starterów f1r2, dla pary linii z cytoplazmą C różnica była ok. 25-krotna, a w przypadku pary linii z cytoplazmą P ta różnica była nieco wyższa – ok. 35-krotna. Podobne ilości tego transkryptu wykazano w przypadku pary starterów f2r2.

Także dla transkryptu 4-308, który badano przy użyciu jednej pary starterów (f1r1), poziom ekspresji był istotnie różny. W tym przypadku u linii z przywróconą płodnością z cytoplazmą C poziom ekspresji był ok. 2570 razy wyższy w porównaniu do linii CMS. Z kolei w przypadku cytoplazmy P linia z przywróconą płodnością odznaczała się ok. 760 razy wyższym poziomem ekspresji w porównaniu do swojego męskosterylnego odpowiednika.

Podobny charakter różnic obserwowano także dla transkryptu 4-575. W przypadku materiałów z cytoplazmą C, różnica pomiędzy linią z przywróconą płodnością i linią CMS była ok. 166-krotna. Z kolei u linii CMS z cytoplazmą P nie odnotowano syntezy pożądanego produktu reakcji – stąd nie było możliwe ilościowe określenie różnic w ekspresji dla materiałów z tą cytoplazmą. Jednak charakter krzywych amplifikacji wskazuje, iż w linii NIL541P-5 akumulacja transkryptu 4-575 jest porównywalna z obserwowaną w linii NIL541C-20.

Analiza ekspresji dla transkryptu 1-636 wykazała różnicę pomiędzy liniami z cytoplazmą C. U linii z przywróconą płodnością poziom akumulacji tego transkryptu był około 2-krotnie wyższy niż u linii CMS. Z kolei dla materiałów z cytoplazmą P obserwowane różnice nie były istotne statystycznie.

W przypadku transkryptu 3-648 określenie różnic w ekspresji nie było możliwe, gdyż u linii CMS (zarówno z cytoplazmą C jak i P) nie odnotowano syntezy docelowego produktu.

Przebieg krzywych amplifikacji wskazuje, iż u obydwu linii z przywróconą płodnością produkt ten jest wydajnie amplifikowany (dane niepokazane).

W przypadku transkryptu Sc-ADP ekspresja w obrębie linii CMS i linii z przywróconą płodnością o tej samej cytoplazmie była na zbliżonym poziomie – obserwowane różnice nie były istotne statystycznie.

Temat badawczy 4

Genotypowanie mieszańców i ich komponentów nakierowane na efekt heterozji i geny płodności

Cel tematu badawczego: Wstępna ocena zróżnicowania genetycznego w obrębie linii używanych w aktualnych programach hodowlanych

Wyniki

Wśród dwunastu markerów PCR użytych do analiz linii hodowlanych cztery markery nie ujawniały polimorfizmu genetycznego. Zastosowanie par starterów dla markerów SCP15M55 oraz SCSz319F3R4 nie uzyskano w ogóle produktów amplifikacji. Marker SCSz23L500 generował u wszystkich badanych obiektów pojedynczy produkt o wielkości około 500 par zasad (pz). W przypadku czwartego monomorficznego markera obraz elektroforetyczny allelu obecnego u wszystkich badanych linii składał się z 3 produktów amplifikacji o zakresie od 250-380 pz.

Pierwszy z markerów polimorficznych to d505904, który występował w dwóch wariantach allelicznych: allel a był widoczny jako pojedynczy produkt o wielkości ok. 650pz, allel b to wariant dwu-prążkowy (produkty o długości 650pz i dodatkowy ok 600pz). Allel a występował z wyraźnie większą częstotliwością: 71 badanych linii z allelem a vs. 17 z allelem b – dla 7 linii nie uzyskano produktów amplifikacji.

Cztery z testowanych markerów (SCP14M55, SCP16M58, SCY09cd i SCSz2L450) dawały obrazy elektroforetyczne typowe dla markerów SCAR o charakterze dominującym: allel a to brak produktu amplifikacji (tzw. allel „null”), allel b – pojedynczy produkt o zadeklarowanej wielkości: 180pz dla SCP16M58, 230pz dla SCP14M55, 450pz dla SCSz2L450 i 500pz dla markera SCY09cd. W przypadku markera SCSz2L450 nieznacznie przeważały linie z allelem b (54 obiekty z allelem b vs. 40 z allelem a). W przypadku pozostałych trzech markerów liczniejsze były linie z allelami a: dla markera SCP16M58 było ich 56, SCP14M55 – 63, a SCY09cd aż 76.

Marker SCP12M56 charakteryzował się dwoma podstawowymi wariantami allelicznymi: allel a typu „null” oraz b – w postaci pojedynczego produktu amplifikacji o długości ok. 300pz. Wśród badanych linii 64 genotypy reprezentowały allel a, kolejne 27 allel b. W odróżnieniu od markerów opisanych w poprzednim akapicie, u niektórych linii identyfikowano dodatkowy wyraźny produkt amplifikacji o wielkości ok. 500pz. Produkt ten nie był opisany w źródłowej pracy Stracke i in. (2003), więc nie jest jasne, czy pochodzi on z chromosomu 4RL.

Kolejnym markerem, u którego polimorfizm był związany z amplifikacją produktów o różnych długościach był SCY09d. Otrzymywane po PCR fragmenty DNA różniły się długością w bardzo niewielkim stopniu (oszacowano ich wielkość na ok. 500 i 520pz), ale dłuższemu produktowi towarzyszyło kilka dodatkowych prążków, co ułatwiało rozróżnienie alleli a (500pz) od b (520pz). W grupie badanych linii 65 zawierało allel a, a 29 allel b.

Niewielka, ale łatwiejsza do oceny była różnica w długości fragmentów DNA otrzymywanych po zastosowaniu markera SCSz670L900: produkty o długości 900pz oznaczono jako allel a, 950pz – jako b. Większość testowanych linii charakteryzowała się obecnością allelu a (74 linie). Allel b zidentyfikowano w 10 liniach, a w 5 przypadkach zaobserwowano obecność obu produktów amplifikacji.

Genotypowanie metodą DArTseq zaowocowało danymi obejmującymi 122679 dominujących markerów Silico DArT oraz 63306 kodominujących markerów SNP. Pozyskanie tak dużej liczby danych okupione było względnie dużym udziałem niezdefiniowanych (brakujących) wyników. Z drugiej strony, skala genotypowania była tak znacząca (ponad 185 tysięcy markerów), że pomimo brakujących wyników, dane finalne dobrze charakteryzowały badane linie hodowlane. Wykonana analiza współczynników podobieństwa genetycznego wykazała, że mieściły się one w granicach od około 0,70 do prawie 1,00. Para linii wykazujących największy poziom zróżnicowania to linie d11 i d56a pochodzące z Hodowli Roślin DANKO. Najmniejsze zróżnicowanie genetyczne (współczynnik podobieństwa równy 0,99552) odnotowano dla linii pEK93 i pEK95, które zostały wyhodowane przez Poznańską Hodowlę Roślin. Średnia wartość współczynników podobieństwa genetycznego dla wszystkich badanych linii do niespełna 0,75, co wskazuje, że większość badanych genotypów wykazywała względnie duże zróżnicowanie genetyczne (wartość średnia jest zbliżona do wartości minimalnej dla konkretnej pary linii).

W oparciu o wartości współczynników podobieństwa genetycznego wykreślono za pomocą metody UPGMA dendrogram ilustrujący relacje między badanymi genotypami. Na dendrogramie wyraźnie widać, że linie wyhodowane w dwóch odrębnych spółkach grupują się oddzielnie (wyjątek stanowi linia pBM87 z Poznańskiej Hodowli Roślin, która na dendrogramie została ulokowana wśród linii pochodzących z Hodowli Roślin DANKO. Na dendrogramie widoczne są dwa główne klastry. W obrębie każdego z nich są zgrupowane w oddzielnych podgrupach linie pochodzące z obu spółek. Licniejszy klaster główny zawiera linie z Hodowli Roślin DANKO o numerach od d1 do d54 (w tym wspomnianą linię pBM87), a dodatkowo są tu widoczne w oddzielnej podgrupie linie z Poznańskiej Hodowli Roślin o nazwach rozpoczynających się od wspólnego prefixu pBM. Druga, mniej liczna grupa główna zawiera głównie linie wyhodowane w Poznańskiej Hodowli Roślin, których nazwy mają na początku oznaczenia pEK. Do tej grupy głównej dołączone zostały jako odrębna mała podgrupa dwie linie z Hodowli Roślin DANKO: d56a i d56b.

Prezentacja wyników badań na konferencjach:

„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 (*Secale cereale* L.) with the Pampa sterility-inducing cytoplasm”

An attempt to use the GBS-t markers for mapping minor genes that restore male fertility in rye (*Secale cereale* L.) with the Pampa sterility-inducing cytoplasm.

Wesołowski Wojciech¹, Bienias Anna², Domnicz Beata¹, Szklarczyk Marek¹, Stojatowski Stefan²

¹Department of Plant Biology and Biotechnology, University of Agriculture Kraków, Poland

²Department of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology, West Pomeranian University of Technology Szczecin, Poland

INTRODUCTION

Seed production of hybrid cultivars of numerous crops is based on cytoplasmic male sterility (CMS) phenomenon, and in rye (*Secale cereale* L.) the cytoplasm Pampa is mostly applied in practice. Pampa cytoplasm is very efficient regarding maintenance of sterility but there are difficulties during restoring male fertility in final hybrids, that is necessary for commercial production of this crop. Restoration of male fertility of plants with CMS-Pampa stays under control of several genes. Major gene (or genes) has been mapped on the 4RL chromosome (Miedaner et al. 2000; Stracke et al. 2003; Hackauf et al. 2017) and the existence of some undefined number of minor restorers has been reported (Miedaner et al. 2000). The aim of our study was to apply the GBS-t method for mapping of minor restorer genes in hybrid rye with Pampa cytoplasm.

MATERIAL AND METHODS

The plant material consisted of 165 individuals of the unregistered three-way F1 cultivar 5MH604 (provided by I. Kolasieńska) revealing high efficiency in pollen production. Among tested population we identified only one fully sterile plant. The remaining individuals revealed phenotypic variation: some plants were fully fertile (releasing of pollen was very efficient), but other ones were only partially male fertile. From 100 randomly chosen individuals (this group contained the only one sterile plant) there were collected leaves (shortly before flowering time) and mRNA was isolated. Then, cDNA sequencing libraries were obtained and paired-end (PE150) sequenced at low coverage (app. 1Gb per sample) using the Illumina platform (service made by NovoGene company).

RESULTS

For identification of markers correlating with pollen production two groups containing 10 extremely fertile and 10 almost sterile plants were selected. The bioinformatic analysis of these combined two datasets was performed using the QTL-seq method. Our mapping population has been far from standards, so some novel methodological solutions had to be implemented. As an equivalent of the maternal parent in mapping population (which was not available for us), the only one male sterile plant was used. The procedure of informatic analysis was elaborated exclusively for this project (Wesołowski – unpublished). As a genomic reference the Gene Bank sequence coded GCA_016097815.1 was used and (due to hardware and software limitations) for mapping purposes the sequences of chromosomes were divided into parts that did not exceed 500Mb. Statistically significant GBS-t markers were mapped on 6 chromosomes of rye. Only one chromosome did not contain minor restorer genes and it was 4R, where the major restorer (or restorers) is localized. The results are based on one mapping population which was phenotyped in only one environment, so suggested localizations of restorer genes should be considered only as indications for further study. Nevertheless, it shows that the GBS-t method combined with appropriate bioinformatics may be a valuable tool for genomic analyses in crop breeding.

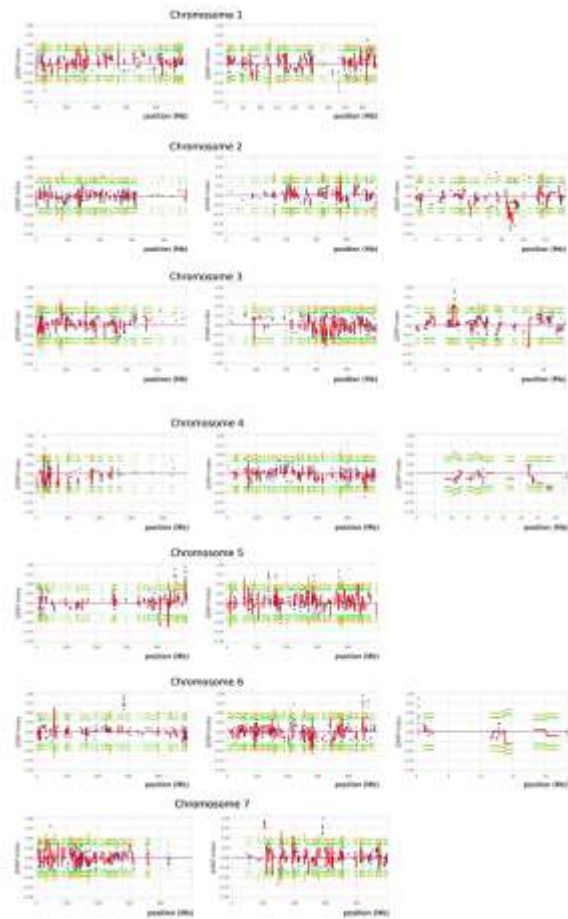


Fig. 1. Plots of Δ SNP-index values for chromosomes 1-7 with marked significance intervals with the null hypothesis of no QTL (orange: $P < 0.01$, green: $P < 0.05$).

References

- Hackauf S., Beier E., Kozan V., Wiedler T. 2017. Fine mapping of the restorer gene Rf5 from an inbred pre-hybrid (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet*, 130:1179-1189.
- Miedaner T., Glas C., Dinger F., Wilda F., Wörzmann M., Gengen R.R. 2006. Mapping of genes for male-fertility restoration in 'Pampa' CMS wheat-rye (*Secale cereale* L.). *Theor Appl Genet*, 116: 1226-1232.
- Stracke S., Schilling A.G., Fordan J., Wenz C., Glas C., Miedaner T., Dinger H.R. 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: 1104-1130.

Acknowledgments

This research was supported financially by Polish Ministry of Agriculture and Rural Development under the Programme of Basic Research for Biological Program in Plant Protection (task 10).