

**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)

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 2023r.:

1. Reprodukacja 90 linii intorgresyjnych, wytworzenie mieszańców z męskosterylnymi testerami i wstępna ocena zmienności fenotypowej mieszańców F1 (*cel osiągnięty*)
2. Ocena męskiej płodności roślin pokolenia F2 pochodzących z 4 odmian mieszańcowych żyta oraz ocena polimorfizmu genetycznego w 1 z badanych populacji F2 (*cel osiągnięty/w realizacji*)
3. Izolacja i sekwencjonowanie mRNA z niedojrzałych kłosów siedmiu linii żyta (*cel osiągnięty/w realizacji*)

Materiał:

- Populacje F2 otrzymane w wyniku samozapylenia pojedynczych roślin z 4 odmian: Dolaro F1, Gulden F1, RPD1273 i SMH604
- 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 i sublinie S6 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
- 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 GBSt, statystyki charakteryzujące zmienność cech fenotypowych, podobieństwo genetyczne itp.)

Temat 1 – wyniki

Reprodukcja 90 linii intorgresyjnych, wytworzenie mieszańców z męskosterylnymi testerami i wstępna ocena zmienności fenotypowej mieszańców F1

Wytworzono na drodze chowu wsobnego nasiona 90 linii introgresyjnych (pokolenie B4S7).

Powtórzono zapoczątkowane w 2022 roku krzyżowania testowe: dwie męskosterylne linie hodowlane (S82P/09 i NS1P) pełniące rolę testerów zapyłano pyłkiem 90 linii z kolekcji linii introgresyjnych (z uwzględnieniem linii rodzicielskich 541 i WM18R).

Efektywność zawiązywania ziaren mieszańcowych była zróżnicowana i zależała od kombinacji genotypów rodzicielskich

Uzyskane nasiona mieszańcowe pozwoliły na założenie doświadczenia mikropoletkowego w 3 powtórzeniach, w którym badane będą 132 mieszańce (efekt krzyżowań między 2 liniami matecznymi i 66 liniami ojcowskimi)

Do oceny polimorfizmu genetycznego w obrębie krzyżowanych linii wsobnych wykorzystano metodę DArTseq

Temat 1 – wyniki

Reprodukcja 90 linii intorgresyjnych, wytworzenie mieszańców z męskosterylnymi testerami i wstępna ocena zmienności fenotypowej mieszańców F1

Wstępna ocena zmienności fenotypowej między tworzonymi mieszańcami – doświadczenie wazonowe, ocena fenotypowa 100 mieszańców- każdy reprezentowany przez 5 roślin

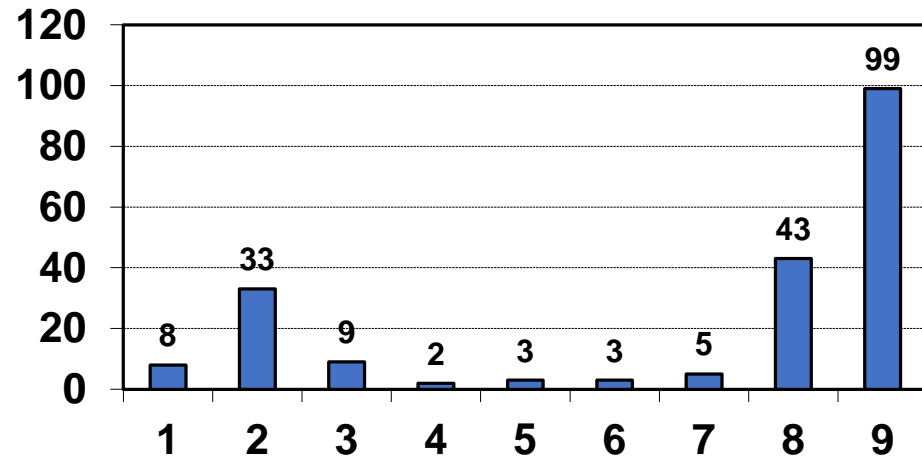
Wstępna ocena w obrębie badanych mieszańców wskazuje na występowanie zmienności niezbędnej do prowadzenia dalszych badań

Główne parametry statystyczne dla doświadczenia wazonowego z mieszańcami żyta

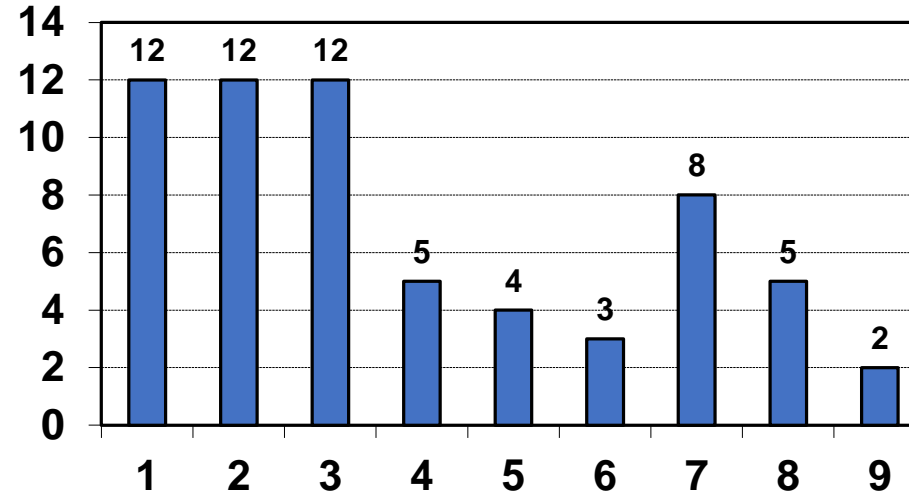
Kategoria	Genotyp	Parametr	Cecha					
			Początek kwitnienia (l. dni od 1.06.)	Wysokość roślin (cm)	Długość kłosa (cm)	Liczba kłosków w kłosie	Liczba ziaren w kłosie	Zbitość kłosa
Linia mateczna	S82P/05	Średnia	6,36	138,01	9,92	40,98	0,01	41,36
		Odch. Stand.	1,04	6,96	0,43	1,51	0,04	1,26
	NS1P	Średnia	6,76	130,67	10,39	38,97	0,95	37,55
		Odch. Stand.	0,84	6,02	0,44	1,73	7,01	1,44
Linie ojcowskie	Seria InA	Średnia	6,95	132,84	10,10	39,95	0,60	39,66
		Odch. Stand.	0,50	6,84	0,48	1,80	5,57	2,13
	Seria InB	Średnia	5,09	140,01	10,38	40,05	0,01	38,68
		Odch. Stand.	0,85	7,07	0,50	2,32	0,04	2,93
Ogółem	Średnia	6,56	134,34	10,16	39,97	0,48	39,45	
	Min	4,00	111,00	8,76	34,40	0,00	33,74	
	Max	9,00	152,00	11,38	44,40	52,00	44,21	
	Odch. Stand.	0,96	7,45	0,49	1,91	4,96	2,34	
	Wsp. zmienności %	14,67	5,55	4,86	4,77	1040,7	5,92	

Temat 2 – wyniki

Ocena męskiej płodności roślin pokolenia F2 pochodzących z 4 odmian mieszańcowych żyta



Pylenie roślin populacji Dolaro F2 (skala 9-st)



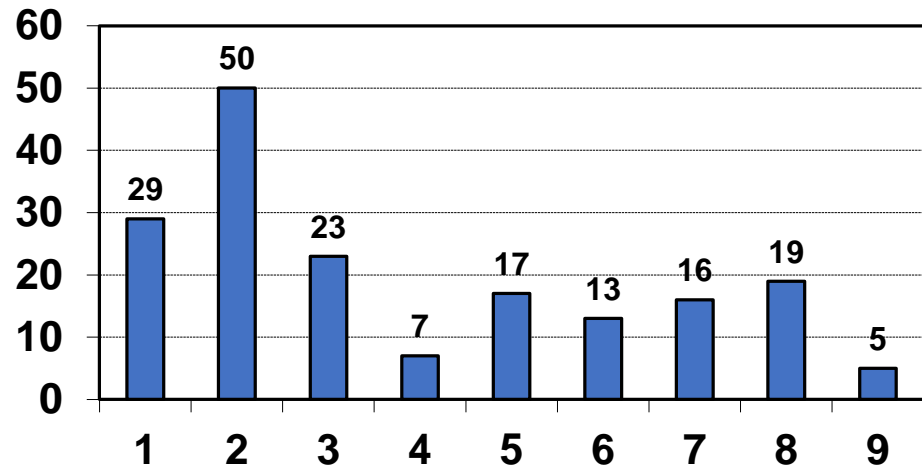
Pylenie roślin populacji Gulden F2 (skala 9-st)

Obserwacje pylenia roślin w populacji Dolaro F2 ujawniły przewagę roślin męskopłodnych (ok. 75% pojedynków wytwarzało duże ilości pyłku). Rośliny częściowo płodne prawie nie występowały. Około 25% roślin wykazywało silne objawy sterylności. Wyniki osadzania ziaren – w pełni zgodne z obserwacjami wzrokowymi (wsp. korelacji = 0,967)

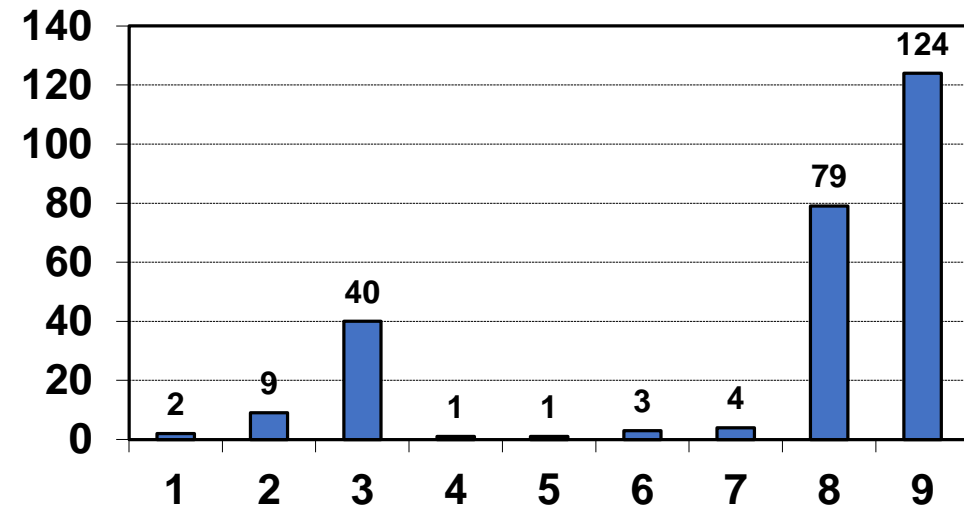
W populacji Gulden F2 (d. DC2424) przeważały rośliny męskosterylne (ok. 57%). Udział roślin w kategoriach od 4 do 9 (częściowo płodne i w pełni płodne) był stosunkowo równomierny. Korelacja między wynikami oceny wzrokowej i osadzaniem ziaren równa 0,879.

Temat 2 – wyniki

Ocena męskiej płodności roślin pokolenia F2 pochodzących z 4 odmian mieszańcowych żyta



Pylenie roślin populacji RPD1273 F2 (skala 9-st)



Pylenie roślin populacji SMH604 F2 (skala 9-st)

Dwie populacje F2 pochodzące z niezarejestrowanych odmian z krajowej hodowli różniły się wyraźnie pod względem rozkładu fenotypowego. W populacji RPD1273 F2 przeważały formy męskosterylne (ok. 57% populacji). Liczebności w klasach fenotypowych od 4 do 9 były na dość wyrównanym poziomie – od kilku do kilkunastu roślin w klasie. Formy silnie pylące stanowiły kategorię dominującą w obrębie SMH604 F2 (ok. 78%). W populacji SMH604 F2 rośliny częściowo płodne prawie nie występowały, a formy męskosterylne stanowiły ok. 19%. Współczynniki korelacji ocen wzrokowych z osadzaniem ziaren były bardzo wysokie (dla RPD1273: 0,903, a dla SMH604: 0,938)

Temat 2 – wyniki

Ocena męskiej płodności roślin pokolenia F2 pochodzących z 4 odmian mieszańcowych żyta

Testowanie modeli genetycznych tłumaczących dziedziczenie płodności/sterylności roślin w populacjach F2 z cytoplazmą Pampa (MS – męskosterylne; MP – męskopłodne)

Populacja	Liczba osobników			Model genetyczny	Rozszczepienie teoretyczne	Chi ²	P
	MS	MP	Ogółem				
Dolaro F2	50	155	205	1-genowy	1:3	0,041	0,5-0,75
Gulden F2	36	27	63	3-genowy	37:27	0,012	0,9-0,95
RPD1273 F2	102	77	179	3-genowy	37:27	0,050	0,75-0,9
SMH604 F2	51	212	263	1-genowy	1:3	4,412	0,025-0,05

Dwie testowane populacje F2 charakteryzowały się rozkładem fenotypowym zgodnym z modelem dziedziczenia opartym o hipotetyczne 3 niezależne geny (Gulden F2 i RPD1273 F2).

Rozkład fenotypowy w populacji Dolaro F2 jest w pełni zgodny z modelem 1-genowym, w populacji SMH604 F2 ten sam model jest najbardziej prawdopodobny, ale zgodność wyników nie jest pełna (obserwowano nadmiar roślin męskopłodnych).

Prace związane z genotypowaniem i poszukiwaniem markerów ujawniających polimorfizm genetyczny w obrębie potomstw F2 są kontynuowane.

Temat 3 – wyniki

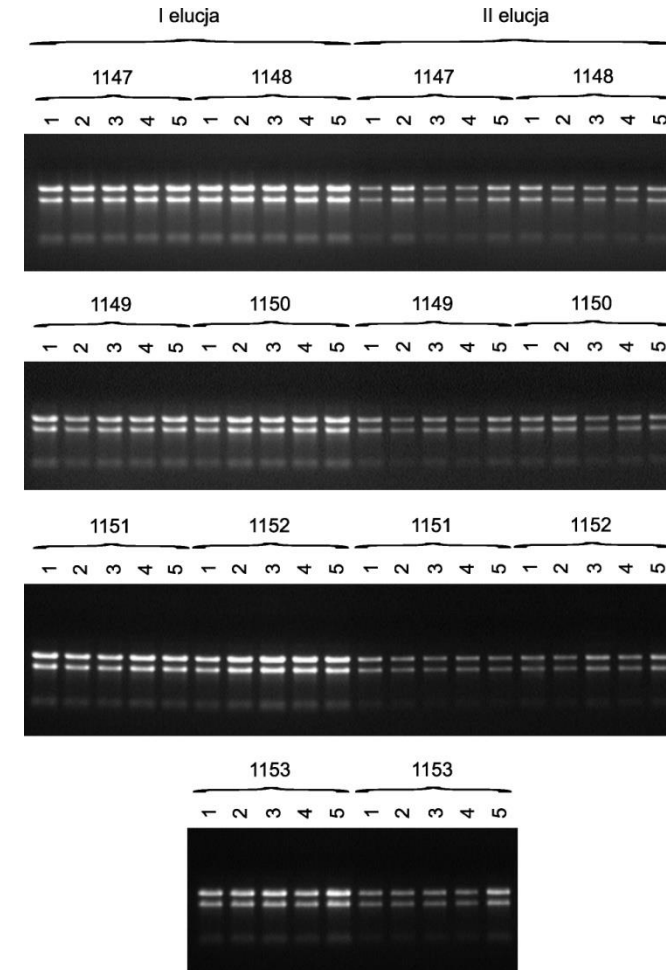
Izolacja i sekwencjonowanie mRNA z niedojrzałych kłosów siedmiu linii żyta

Wykonano ocenę męskiej płodności w obrębie siedmiu badanych linii blisko-izogenicznych. Wyniki oceny były zgodne z oczekiwaniami dla każdego genotypu, linie charakteryzowały się pełnym wyrównaniem.

Wyzolowano RNA z niedojrzałych kłosów każdej z siedmiu linii (po 5 powtórzeń). RNA wysłano do firmy zewnętrznej w celu wykonania analiz sekwencyjnych (aktualnie próby są sekwencjonowane)

Wyniki oceny męskiej płodności siedmiu linii blisko-izogenicznych

Nr polowy	Genotyp	Pylenie (w skali 9-stopniowej)
1147	541N	7 – 8
1148	541C	2 – 3
1149	541P	2
1150	NIL541P-4 (B7S9)	7 – 8
1151	NIL541P-5 (B7S9)	7
1152	NIL541C-20 (B7S9)	6 – 7
1153	NIL541C-22 (B7S9)	7



Wyniki elektroforezy wyizolowanych prób RNA (żel agarozowy)

Publikowanie wyników projektu w 2023 roku:

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja	liczba prezentacji podana w opisie zadania	liczba prezentacji zrealizowana
1	7th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding/18th EWAC, 6–10 November 2023, Wernigerode, Niemcy – prezentacja posteru „Genetic homogeneity and heterozygosity of three new Polish hybrid varieties of rye” z wynikami otrzymanymi w 2022 roku w ramach tematu 3 (str. 15-23 sprawozdania za 2022 rok) Abstract: https://static.akcongress.com/downloads/cbb/cbb7-ewac18-boa.pdf	Poster	1	1
2	Dni Młodego Naukowca, Konferencja w IHAR-PIB w Radzikowie, 9-10 listopada 2023 – prezentacja posteru „Identyfikacja loci sprzężonych z genami warunkującymi efektywne przywracanie płodności u mieszańców żyta tworzonych z wykorzystaniem sytemu opartego o cytoplazmę „Pampa” (wyniki nieujęte w sprawozdaniach – stanowią autorską analizę surowych danych wykonaną przez dr B. Wójkiewiczą we współpracy z innymi pracownikami Poznańskiej Hodowli Roślin na potrzeby spółki)	Poster	0	1