

## 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 analyses, 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

28.05 2023  
N. Sobczak

## 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 nastęrcza 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 różnicowania 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

29.05.2023 r.

W. Szwajki