

WYNIKI

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2022 roku

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

Temat badawczy 1: Mapowanie wysoce heterozygotycznych obszarów genomu.

Analizy miały bio-informatyczny charakter. Materiałem badawczym były dane pochodzące z analiz DArTseq, które zostały w 2021 roku zre kalkulowane i ujednolicone dla wszystkich badanych w temacie nr 1 odmian. Technologia DArTseq stanowi wariant metody GBS (ang. Genotyping by sequencing) opartej o techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Markery GBS generowane w technologii DArTseq należą do dwóch kategorii: markery Silico-DArT mają charakter dominujący (były nieprzydatne przy realizacji celu), a markery SNP wykazują kodominację (pozwały identyfikować heterozygoty). Każdy z markerów DArTseq jest charakteryzowany przez krótką (64nt) sekwencję nukleotydową. Dane użyte w czasie badań dotyczyły 16 odmian żyta: 8 mieszańcowych (Bono, Gonello, Konto, Palazzo, Skaltio, Stakkato, Tur, Visello) oraz 8 populacyjnych (Amilo, Armand, Bosmo, Dańkowskie Diament, Dańkowskie Granat, Horyzo, Stanko, Vjatka). Każda z odmian była reprezentowana przez minimum 93 pojedyncze rośliny. Markery SNP monomorficzne oraz markery zawierające dużą liczbę brakujących oznaczeń zostały pominięte przy mapowaniu.

Sekwencje DNA polimorficznych markerów SNP wyszukiwano w bazie sekwencyjnej genomu żyta (Rabanus-Wallace i in. 2021) i na podstawie zgodności mapowano do konkretnych supermolekuł genomu referencyjnego. Użyta w charakterze referencji baza genomu żyta obejmuje siedem supermolekuł stanowiących sekwencje DNA wszystkich chromosomów europejskiej linii wsobnej żyta o nazwie Lo7. Dodatkowo dostępny jest zbiór sekwencji DNA nieprzypisanych do żadnego z chromosomów (grupa Un). Po zmapowaniu markerów do konkretnych chromosomów żyta oceniano, czy u poszczególnych odmian możliwe jest wskazanie obszarów genomu charakteryzujących się wysokim poziomem heterozygotyczności.

Ogólna liczba roślin objętych analizami wynosiła 1771, ale dla 11 roślin zbiór danych dotyczących markerów SNP zawierał stosunkowo dużo (powyżej 40%) brakujących danych. Dlatego rośliny te, pochodzące z odmian Skaltio (3 rośliny), Stakkato (4), Stanko (2) i Vjatka (2) usunięto z matrycy danych. Ostatecznie mapowanie markerów do sekwencji genomowej żyta wykonano dla zestawu 1760 pojedynczych roślin.

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

Przeważająca część markerów SNP została przypisana do konkretnych chromosomów żyta. Markery zmapowane do sekwencji Un stanowiły mniej niż 10% zbioru. W obrębie każdego z chromosomów widoczne jest zwiększenie zagęszczenia mapy w odcinkach dystalnych (przy końcach ramion) chromosomów.

Zmapowane markery (z uwzględnieniem tych przypisanych do grupy Un) zostały użyte do określenia poziomu heterozygotyczności odmian (heterozygotyczność obliczano jako proporcję alleli heterozygotycznych do ogółu alleli zdefiniowanych w analizie DArTseq). Średnia wartość heterozygotyczności dla prawie wszystkich odmian mieściła się w granicach od 0,16 do 0,20. Odmiany mieszańcowe i populacyjne nie różniły się znacząco pod względem poziomu heterozygotyczności (zarówno przy uwzględnieniu wartości średniej, jak i minimalnych i maksymalnych poziomów heterozygotyczności odnotowanych dla pojedynczych roślin). Jedynie odmiana Dańkowskie Diament wyraźnie odróżniała się od reszty odmian, głównie ze względu na bardzo wysokie wartości maksymalnej heterozygotyczności, które wpływały na zawyżenie wartości średniej.

Markery o najwyższym poziomie heterozygotyczności (powyżej 90%) zostały wyselekcjonowane ze zbioru danych: było ich 3156. Zostały one zidentyfikowane w obrębie poszczególnych chromosomów. Wykonana analiza uwidoczniała, że są względnie równomiernie rozproszone po chromosomach. Na każdym chromosomie zidentyfikowano od 400 do 500 markerów SNP o wysokim poziomie heterozygotyczności. W grupie Un markerów takich było względnie niewiele – poniżej 100.

Temat badawczy 2: Mapowanie genów odpowiedzialnych za wybrane cechy użytkowe.

Na przeważającej liczbie poletek w 2022 roku (każde poletko składało się z 3 rzędów, na których wysiane były na brzegach dwie linie męskosterylne i w środku jeden zapyłacz) uzyskano nasiona mieszańców. Liczebności uzyskanych nasion były bardzo zróżnicowane, ale w przeważającej części zbyt małe do założenia planowanego doświadczenia polowego. W krzyżowaniach linii S82P/09 z dziewięćdziesięcioma liniami introgressyjnymi zaledwie w pięciu kombinacjach uzyskano powyżej 250 ziaren, a w aż siedemnastu przypadkach liczba ziaren mieszańców nie przekraczała 10 (dla siedmiu kombinacji w ogóle nie otrzymano nasion mieszańcowych). Kontrola męskosterylności linii S82P/09 potwierdziła, że linia ta nie wytwarza pyłku. W kilku przypadkach odnotowano zawiązanie pojedynczych ziaren w izolowanym kłosie, ale były to wartości marginalne (1-4 ziaren w kłosie) nie podważające w istotny sposób mieszańcowego charakteru większości nasion otrzymanych w trakcie wykonanych prac badawczych.

Nasiona mieszańcowe z udziałem linii NS1P jako formy matecznej z liniami tworzącymi zestaw form introgressyjnych otrzymano dla 75 kombinacji z planowanych 90.

Liczebności uzyskanych ziaren mieszańców z udziałem linii NS1P były mocno zróżnicowane – od 1 do 678 (tab.1).

Spośród 15 kombinacji krzyżowań, dla których nie udało się uzyskać nasion mieszańcowych, w kilku przypadkach obserwacje wzrokowe pylenia roślin zadecydowały o wykluczeniu pojedynczych roślin linii NS1P z programu krzyżowań. Rośliny te ewidentnie tworzyły pyłek widoczny w czasie obserwacji wzrokowych, co potwierdziły później wykonane oceny zawiązywania ziaren w kłosach kontrolnych. Dyskwalifikacja roślin linii NS1P dotyczyła stosunkowo niewielkiej liczby roślin, ale była dodatkowym czynnikiem, który zadecydował o niezadowalającym rezultacie tworzenia nasion mieszańcowych.

W przypadku jednej kombinacji z udziałem linii InA102 otrzymano 220 ziaren (tab.1), które przypuszczalnie miały charakter mieszańcowy, ale dwa kłosa kontrolne roślin linii NS1P nie były w pełni męskosterylne (ocena wzrokowa nie pozwoliła na wykrycie męskopłodności tych roślin, ale uzyskano z nich odpowiednio 28 i 25 ziaren zawiązanych na drodze samozapylenia). Podobna sytuacja miała miejsce przy krzyżowaniu z udziałem linii InA041 – 29 ziaren zaobserwowanych w izolowanym kłosie kontrolnym linii NS1P zadecydowało o zdyskwalifikowaniu tej partii nasion (ich mieszańcowy charakter nie był w 100% pewny).

Temat badawczy 3: Mapowanie genów przywracających męską płodność u żyta z cytoplazmą P

Uzyskane w 2022 roku wyniki oceny męskiej płodności w obrębie czterech odmian mieszańcowych (Dolaro, DC2424-Gulden, SMH604 i RPD1273) ujawniły znaczące różnice między nimi. W obrębie odmiany Dolaro przebadano 255 roślin. Rozkład fenotypowy cechy ma wyraźnie bi-modalny charakter z dwoma maksimumami w obrębie grup skrajnych (roślin w pełni męskosterylnych i w pełni męskopłodnych). Najliczniejsze klasy fenotypowe w 9-stopniowej skali bonitacyjnej to 2 (91 roślin) i 3 (68 roślin), do których zaliczane są formy męskosterylne oraz 9 (57 roślin). Ogółem rośliny męskoniepłodne (klasy fenotypowe od 1 do 3) stanowiły 65% ogółu populacji. Stosunkowo nieliczne były rośliny częściowo płodne (klasy fenotypowe od 4 do 6) – w sumie było ich 14, co stanowi ok. 5,5% ocenionych osobników. Stosunkowo liczną grupę stanowiły rośliny dobrze pylące. Aż 57 roślin zostało sklasyfikowanych jako 9, czyli osiągnęło najwyższą możliwą ocenę. W sumie roślin męskopłodnych (klasy fenotypowe od 7 do 9) było 75, co stanowiło niespełna 30% przebadanej populacji.

Osadzanie ziaren w izolowalnych kłosach odmiany Dolaro było bardzo zróżnicowane (od 0 do 95%) i silnie skorelowane z wynikami oceny wzrokowej (współczynnik korelacji równy 0,96). Średnia wartość procentowego osadzania ziaren w izolowanych kłosach dla całej badanej grupy roślin wynosiła 25,8%. Zbiorcze wyniki analizy dla czterech odmian zestawiono w tabeli 2. Potwierdzają one, że w odmianie Dolaro przeważały rośliny w pełni męskosterylne, a w dalszej kolejności dużą część badanej populacji stanowiły formy bardzo dobrze pylące (fenotypy pośrednie były mało liczne).

W odmianie Gulden (DC2424) przebadano 194 rośliny, wśród których nie zaobserwowano żadnej w pełni męskopłodnej. Przeważająca część roślin (ponad 86%) została zaliczona do klas męskosterylnych (od 1 do 3), a tylko niespełna 14% do kategorii częściowo płodnych (klasy 4 i 5).

Ocena zawiązywania ziaren w izolowanych kłosach zasadniczo potwierdziła wysoki udział roślin męskosterylnych w badanej odmianie. Co prawda współczynnik korelacji między wynikami obserwacji wzrokowych, a danymi o osadzaniu ziaren w kłosach nie był wysoki (0,56), ale jednak statystycznie istotny. Średnia wartość osadzania ziaren w izolowanych kłosach dla odmiany Gulden to zaledwie 2,1%, a najwyższa wartość zaobserwowana u pojedynczej rośliny, to 45%.

Wyniki oceny wzrokowej pylenia roślin w obrębie odmiany RPD1273 zaowocowały rozkładem fenotypowym o kształcie zbliżonym do normalnego z niewielką asymetrią w kierunku roślin o obniżonej płodności. Najliczniej były reprezentowane klasy fenotypowe od 3 do 5 (męskosterylne o niezbyt głębokich objawach niepłodności oraz formy częściowo płodne). Roślin bardzo dobrze pylących było stosunkowo niewiele – w sumie 14 osobników, z których żadnemu nie przypisano wartości maksymalnej (9).

Ocena zawiązywania ziaren w izolowanych kłosach odmiany RPD1273 była wysoce istotnie skorelowana z wynikami obserwacji wzrokowych (wsp. korelacji 0,74). Spośród 175 ocenionych roślin około 40% (72 osobniki) nie zawiązało ziaren w wyniku samozapylenia. Maksymalny poziom osadzenia ziarna osiągnął wartość 97%, ale rośliny o wartościach przekraczających 90% były bardzo nieliczne. Średnia wartość zawiązywania ziaren w izolowanych kłosach odmiany RPD1273 wyniosła prawie 25%.

Odmiana SMH604 była reprezentowana w badaniach przez 165 roślin. W odmianie tej zauważalny jest przeważający udział roślin bardzo dobrze pylących: aż 92 osobniki (ponad 55% populacji) zostało ocenionych na wartość maksymalną równą 9. Ponad 75% odmiany stanowiły rośliny z kategorii od 7 do 9, czyli w pełni męskopłodne. Pozostała część odmiany (z wyjątkiem jednej rośliny) to formy częściowo płodne.

Wyniki oceny zawiązywania ziaren w izolowanych kłosach były statystycznie istotnie skorelowane z rezultatami obserwacji wzrokowych, chociaż wartość współczynnika korelacji równa 0,58 nie była bardzo wysoka. Duży udział roślin o w pełni przywróconej płodności wpłynął na bardzo wysoką, przekraczającą 80%, wartość średnią dla osadzania ziarna w wyniku samozapylenia.

Wyniki genotypowania w technologii DArTseq obejmują 55414 kodominujących markerów SNP oraz 104257 dominujących markerów Silico-DArT, które zostały oznaczone w obrębie trzech odmian mieszańcowych: Dolaro, RPD1273 i SMH604 (odmiana Gulden/DC2424 była objęta genotypowaniem w 2021 roku). Markery Silico-DArT zostały wykorzystane do oceny podobieństwa genetycznego roślin wewnątrz odmian.

W odmianie Dolaro najniższy wskaźnik podobieństwa genetycznego pomiędzy roślinami zanotowano dla obiektów Dolaro148 i Dolaro179 – obliczona wartość podobieństwa wynosiła 0,75. Największe podobieństwo genetyczne na poziomie 0,92 stwierdzono między roślinami Dolaro129 i Dolaro186. Średnia wartość podobieństwa między

roślinami wszystkich 94 genotypowanych roślin odmiany Dolaro to 0,86. Większość roślin grupuje się w obrębie gałęzi dendrogramu przy podobieństwie bliskim wartości średniej. Jedynie trzy genotypy znalazły się na zupełnie odrębnej gałęzi (rozgałęzienie poniżej poziomu 0,8).

Odmiana RPD1273 była trochę mniej wyrównana genetycznie w porównaniu do Dolaro. Wskazuje na to zarówno średnia wartość współczynników podobieństwa, jak i wartości minimalne i maksymalne. Dla 93 roślin, dla których otrzymano wyniki (jedna próba DNA okazała się wadliwa) średni współczynnik podobieństwa oszacowano na 0,81. Najmniejsze podobieństwo (0,71) odnotowano dla roślin RPD1273-221 i RPD1273-273, a największe (0,88) dla pojedynczych o numerach RPD1273-225 i RPD1273-289 (ryc.9).

Wyniki analizy podobieństwa genetycznego między roślinami wchodzącymi w skład odmiany SMH604 były bardzo zbliżone do tych uzyskanych dla Dolaro. Średnia wartość wskaźnika podobieństwa genetycznego była nieznacznie niższa (0,84 vs. 0,86 dla Dolaro), ale wartości skrajne były praktycznie identyczne. Najmniejsze podobieństwo genetyczne (na poziomie 0,75) odnotowano dla genotypów SMH604-138 oraz SMH604-182, a najmniej różnic wykazano dla pary SMH604-127 i SMH604-137. Roślina SMH604-182 była w ogóle najbardziej odrębna od wszystkich innych badanych w obrębie tej odmiany (na dendrogramie tworzy samodzielnie odrębną gałąź).

W odmianie Dolaro markery SCSz23L500 oraz d508318 prawie nie ujawniały polimorfizmu genetycznego. Marker SCSz23L500 był wśród dotychczas przebadanych roślin obecny u wszystkich genotypów z wyjątkiem jednego: Dolaro-108. W przypadku markera d508318 większość roślin charakteryzowało się obecnością trójprążkowego allelu „a” z wyłączeniem ośmiu genotypów, u których nie zaobserwowano żadnych produktów amplifikacji (allel „null”) oraz jednego (Dolara-206) z allelem 1-prążkowym „b”. Marker d505904 był reprezentowany w odmianie Dolaro przez trzy warianty: brak produktów amplifikacji zaobserwowano u 3 roślin, kolejnych 11 genotypów charakteryzowało się obecnością dwóch prążków (allele „a” i „b”), ale przeważająca część roślin była charakteryzowana przez pojedynczy produkt amplifikacji o długości ok. 700bp (allel „a”). Polimorfizm żadnego z trzech markerów z chromosomu 4RL nie wykazywał korelacji z objawami fenotypowymi męskiej płodności.

W obrębie odmiany Gulden (dawniej DC2424) markery SCSz23L500 oraz d508318 nie wykazywały żadnego zróżnicowania. Pierwszy z markerów charakteryzował się obecnością pojedynczego produktu amplifikacji o długości ok. 500 par nukleotydów (bp), który był obecny u wszystkich roślin odmiany DC2424. Marker d508318 generował trzy produkty amplifikacji, które w identycznej konfiguracji występowały w całej badanej grupie roślin (allel typu „a”). Marker d505904 ujawniał polimorfizm genetyczny wewnątrz odmiany DC2424. Najczęściej występującym allelem był ten, który charakteryzował się obecnością produktu amplifikacji o długości ok. 700 bp. (allel „a”). Wszystkie rośliny odmiany DC2424 testowane w 2022 roku posiadały allel typu „a”. Alternatywny produkt amplifikacji o długości ok. 550 bp (allel „b”) został wykryty tylko w jednej roślinie (DC2424-131) w układzie heterozygotycznym (wraz z allelem „a”). Trzeci z obecnych w odmianie Gulden wariantów markera d505904 to allel „null” (brak produktów amplifikacji - 0), który był obecny u 48 roślin. Niestety różnice genetyczne ujawniane po zastosowaniu markera d505904 w odmianie Gulden nie miały związku z intensywnością pylenia roślin.

W odmianie RPD1273 wszystkie trzy testowane markery pozwalały na wykrycie polimorfizmu genetycznego. W przypadku SCSz23L500 u wszystkich nowo przebadanych w 2022 roku roślin pojawił się produkt amplifikacji 500bp. Marker d508318 występował w wariantach trójprążkowym „a” (takim jak w opisanych powyżej odmianach) w 92 roślinach. U kolejnych 79 roślin nie obserwowano produktów amplifikacji (allel „0”), a tylko 3 rośliny charakteryzowały się obecnością allelu „b”. W przypadku markera d505904 nie zaobserwowano żadnej rośliny z allelem „b” (550bp). W 138 roślinach obecny był allel „a” (700bp), pozostałe 36 genotypów charakteryzowało się allelem „null”. Podobnie jak w poprzednich odmianach, obserwowany polimorfizm genetyczny nie był skorelowany z objawami męskiej płodności.

W odmianie SMH604 markery SCSz23L500 i d508318 nie ujawniały w ogóle polimorfizmu – wszystkie przebadane rośliny miały ten sam allel. Dla SCSz23L500 był on widoczny jako pojedynczy prążek zawierający produkt amplifikacji o długości 500 par zasad, dla markera d508318 był to obraz trzech blisko położonych prążków. Marker d505904 generował produkty amplifikacji u większości badanych genotypów odmiany SMH604. Tylko cztery rośliny charakteryzowały się brakiem prążków markerowych. Najwięcej genotypów odmiany charakteryzowało się obecnością allelu „a” (prążek o wielkości ok. 700bp) – było ich 136. U pozostałych 30 roślin zaobserwowano obecność dwóch prążków markerowych: „a” (700bp) i „b” (550bp). Polimorfizm w obrębie locus markera d505904 nie był związany z różnicami w intensywności pylenia roślin odmiany SMH604.

Wyniki sekwencjonowania mRNA z odmiany SMH604 (w technologii NGS Illumina) otrzymano z firmy NovoGene. Od usługodawcy uzyskano ponad 2 mld niesparowanych (pojedynczych) odczytów, co odpowiadało ponad 300 mld zsekwencjonowanych nukleotydów (nt). Wartości te są zgodne z założoną długością niesparowanych (pojedynczych) odczytów wynoszącą 150 nt (użyty wariant sekwencjonowania to PE150). Dla pojedynczej rośliny w danym kierunku (*forward* lub *reverse*) wygenerowano średnio ponad 10 mln odczytów. Odpowiada to 1,5 mld zsekwencjonowanych nukleotydów. Zarówno parametr N50 jak i N95 były równe długości odczytu (150 nt) – co znaczy, że odpowiednio 50 i 95% całkowitej długości (wszystkich) odczytów osiągała długość równą 150 nt (zgodnie z definicją N50 i N95 mogłyby to być też odczyty dłuższe, ale w tym eksperymencie takich nie generowano – było to sekwencjonowanie typu PE150). W uzyskanych odczytach procent nukleotydów G i C wyniósł nieco ponad 56 %. Udział nukleotydów ze współczynnikami jakości Q20 i Q30 wyniósł odpowiednio 95,5 oraz 89 %. Inny współczynnik jakości – Phred – zawierał się w przedziale od 35 do 70 ze średnią 68.

Dalsze etapy analizy bioinformatycznej polegały na mapowaniu uzyskanych odczytów sekwencyjnych do poszczególnych chromosomów żyta. W rezultacie tego mapowania wśród roślin badanej populacji wykryto niemal 6 mln (5 943 967) polimorfizmów sekwencyjnych spośród których:

- 3 745 684 to polimorfizmy pojedynczego nukleotydu (SNP),
- 1 516 677 to polimorfizmy wielonukleotydowe (MNP),
- 681 606 było indelami.

Najwięcej polimorfizmów zidentyfikowano w chromosomie 2, najmniej – w chromosomie 1. Dla wszystkich siedmiu chromosomów proporcje pomiędzy różnymi typami polimorfizmów były zbliżone.

Temat badawczy 4: Analiza porównawcza transkryptomów roślin zróżnicowanych pod względem męskiej płodności

W 2022 roku kontynuowano rozmnażanie materiałów badawczych przeznaczonych do analiz transkryptomicznych. Pylenie linii 541N, jak również linii blisko-izogenicznych z serii NIL541P i NIL541C było relatywnie słabe. Oceny wykonywano zbiorczo dla wszystkich kłosów z każdego wazonu (z uwagi na splątanie bardzo wiotkich źdźbeł ocena każdej rośliny oddzielnie nie była możliwa). W przypadku linii 541N, która nie zawiera cytoplazmy sterylizującej, obniżona efektywność w wytwarzaniu pyłku to efekt depresji wsobnej (reprodukowany materiał to pokolenie S28). Linie z serii NIL541P i NIL541C reprezentowały mniejszy poziom wsobności (pokolenie S8), ale produkcja pyłku była dodatkowo upośledzana przez czynniki cytoplazmatyczne. Pomimo, że optycznie linie NIL541P i NIL541C wytwarzały pyłek mniej intensywnie, to większy wigor tych linii w porównaniu do 541N pozwolił na uzyskiwanie większej liczby ziaren w kłosie (tab.9).

Linie męskosterylne 541C i 541P nie produkowały płodnego pyłku. Wyniki obserwacji wzrokowych zostały potwierdzone przez brak nasion w pięciu kłosach kontrolnych (niezapyłanych ręcznie). Ręczne zapylenie męskosterylnych kłosów okazało się w warunkach szklarniowych bardzo efektywne – uzyskane liczby ziaren z wazonów o numerach od 204 do 209 były największe, pomimo że zaizolowanych i zapyłonych zostało tylko po 8 kłosów w wazonie.

Po 50 ziaren z każdej linii wysiano we wrześniu br. do plastikowych multidoniczek i po wschodach rośliny, które wyrosły wysadzono punktowo w rozstawie 20x20cm na polu stacji doświadczalnej Hala Wegetacyjna ZUT w Szczecinie. Późną jesienią liczebności żywych roślin w obrębie każdej linii mieściły się w granicach od 37 do 45. Rośliny, które przetrwają zimę zostaną w kolejnym roku użyte do analiz transkryptomicznych.

Prezentacja wyników badań na konferencjach:

VI Polski Kongres Genetyki, 27-30.06.2022, Kraków – (poster): *Stojałowski 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*

Genotyping and phenotyping of near-isogenic lines with two types of male sterility-inducing cytoplasm in rye

Stefan Stojalowski^{1*}, Anna Bienias¹, Martyna Sobczyk¹, Monika Hanek²

¹Department of Plant Genetics, Breeding and Biotechnology, West-Pomeranian University of Technology in Szczecin, Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, Poland

²DANKO Plant Breeding Ltd. Choryń 27, Poland

The heterosis phenomenon increases resistance of numerous plant species to the unfavourable environmental conditions. The hybrid cultivars of open-pollinated plants efficiently express the heterosis and guarantee high yields stable through different weather conditions. The seed production of hybrid cultivars in majority of crops is based on exploitation of cytoplasmic male sterility (CMS) mechanism.

In rye (*Secale cereale* L.) two genetically distinct types of CMS are available. The most common in plant breeding is the Pampa cytoplasm discovered by Geiger and Schnell [1]. The alternative type of CMS is named Vavilovii and was reported by several authors, e.g. M. Lapiński [2]. The source of CMS found by Lapiński [2] designated as CMS-C has been used in our research.

The universal non-restorer inbred line 541 was introduced through several (over 16) back-crosses into cytoplasm Pampa and CMS-C. Both cytoplasmic versions of the line was then pollinated by a single plant originating from population of primitive rye IRAN IX. Male fertile plants of the hybrids were used for recurrent back-crossing the 541. Single plants of BC7 generation were selfed and continuously reproduced till BC7S7. In 2021 the set of 22 lines of BC7S7 was assessed with regards to their male fertility and genotyped using DArTseq technology with comparison to the recurrent parent (541 line). NILs revealed moderate male fertility in both studied cytoplasm (tab.1). In one object containing the Pampa cytoplasm and another one with CMS-C singular male sterile spikes were recorded indicating not full homozygosity of two lines. DArTseq analyses showed that the mentioned above object with Pampa cytoplasm was significantly different when compared to the 541 line indicating the possible technical error during reproduction of plant material (fig.1). The line with CMS-C (fig.2) containing male sterile plants, as well as remaining twenty NILs, were genetically highly similar to the 541 genotype.

Tab.1. Flowering time and male fertility of studied near isogenic lines

Line	Flowering (since 1 June)	Fitness score (Geiger and Morgenstern scale [3])	Seed setting (%)
NIL541P/IRAN IX-01	7	5	78,11
NIL541P/IRAN IX-02	5	3-4-5	54,79
NIL541P/IRAN IX-03	5	3	86,78
NIL541P/IRAN IX-04	7	5	75,46
NIL541P/IRAN IX-05	11	3	65,70
NIL541P/IRAN IX-06	10	6	82,95
NIL541P/IRAN IX-07	10	3	39,54
NIL541P/IRAN IX-08	6	5-6	75,40
NIL541P/IRAN IX-09	7	5-6	63,88
NIL541P/IRAN IX-10	7	4-5	74,00
NIL541P/IRAN IX-11	7	3	81,39
NIL541P/IRAN IX-12	7	5	82,61
NIL541P/IRAN IX-13	7	3	89,80
NIL541P/IRAN IX-14	7	6	94,14
NIL541C/IRAN IX-01	11	3	3,91
NIL541C/IRAN IX-02	15	3	19,83
NIL541C/IRAN IX-03	3	5-6	49,32
NIL541C/IRAN IX-04	10	7	21,42
NIL541C/IRAN IX-05	10	3	43,22
NIL541C/IRAN IX-06	13	6	17,72
NIL541C/IRAN IX-07	12	7	45,33
NIL541C/IRAN IX-08	3	5-7	60,72

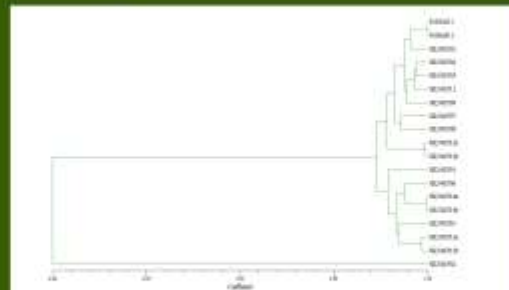


Fig.1. Genetic similarity of studied near isogenic lines with Pampa cytoplasm

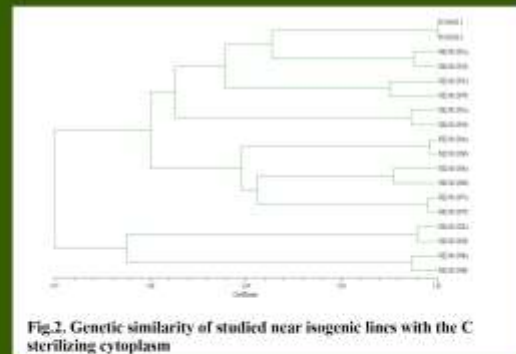


Fig.2. Genetic similarity of studied near isogenic lines with the C sterilizing cytoplasm

References

- [1] Geiger H. H., Schnell F. W., 1970. Cytoplasmic Male Sterility in Rye (*Secale cereale* L.). *Crop. Sci.* 10: 590-593.
- [2] Lapiński M., 1972. Cytoplasmic-genic type of male sterility in *Secale montanum* Guss.. *Wheat Inf. Serv.* 35: 25-28
- [3] Geiger H.H., Morgenstern K. 1975. Angewandt-genetische Studien zur cytoplasmatischen Pollensterilität bei Winterroggen. *Theor Appl Genet* 46: 269-276

*Corresponding author: e-mail: stojalowski@zut.edu.pl

Acknowledgment: This work was financially supported by Polish Ministry of Agriculture and Rural Development (dec. DFR/hn - 802-15/22)

