

WYNIKI

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2021 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 zgromadzone przez wykonawców w czasie wcześniej zrealizowanych badań. Dane dotyczyły szesnastu odmian żyta (osiem populacyjnych i osiem mieszańcowych), z których każda była reprezentowana przez pojedyncze rośliny w liczbie od 80 do 94 (łącznie 1484 genotypy).

Technologia DArTseq użyta do genotypowania stanowi wariant metody GBS (ang. *Genotyping by Sequencing*) opartej o techniki sekwencjonowania nowej generacji (NGS). Dane pochodziły z różnych lat badań i z kilku odrębnych projektów badawczych, więc ich syntetyczna analiza wymagała wystandaryzowania pozwalającego na porównywanie danych.

Zbiorcza analiza danych o markerach DArTseq gromadzonych przez kilka lat w ramach różnych projektów pozwoliła na otrzymanie ujednoczonej matrycy danych dla wszystkich szesnastu badanych odmian. Nowy zestaw danych zawierał 98564 markery Silico-DArT oraz 70574 markery SNP.

Najniższą wartość współczynnika podobieństwa genetycznego między roślinami wchodzącymi w skład jednej odmiany odnotowano w starej rosyjskiej populacji Vjatka (podobieństwo równe 0,64). W pozostałych badanych odmianach minimalne podobieństwo między różnymi roślinami było nie mniejsze niż 0,70, a w przypadku trzech odmian mieszańcowych było na poziomie 0,80. Maksymalne wartości współczynników podobieństwa dla odmian populacyjnych sporadycznie przekraczały poziom 0,90. W przypadku odmian mieszańcowych wartości te były zauważalnie wyższe i mieściły się w granicach od 0,91 do 1,00. Średnia wartość współczynników podobieństwa wyliczona dla każdej z odmian była zauważalnie niższa w obrębie odmian populacyjnych (wartości od 0,74 do 0,81) niż w odmianach mieszańcowych (od 0,84 do 0,87).

Dane obejmujące ponad 70 tysięcy markerów SNP wykorzystano do określenia w każdej z odmian frekwencji loci w stanie heterozygotycznym. Średni poziom heterozygotyczności obserwowany w odmianach populacyjnych (od 14,38 do 21,86) był wyższy niż w odmianach mieszańcowych (od 12,94 do 14,91).

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

W 2021 roku wykonano rozmnożenie zestawu 90 linii intogresyjnych i męskosterylnych testerów niezbędnych do dalszych badań. Zestaw linii intogresyjnych wytworzono w ubiegłej dekadzie z mieszańców wstecznych między genotypami WM18R (linia wartościowa z punktu widzenia hodowli, pochodząca z Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o.), a linią 541 (genotyp o cechach żyta prymitywnego, nieprzystosowany do potrzeb współczesnego rolnictwa, wyhodowany w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie).

Jesienią 2020 dwieście siedemdziesiąt linii i sublinii pokolenia B3S4 zostało wysianych na jednorządkowych poletkach na polu doświadczalnym ZUT w Szczecinie. W maju 2021, przed kwitnieniem, w obrębie każdej linii zostało zaizolowanych co najmniej 5 dobrze wykształconych kłosów (z wyjątkiem kilku linii wykazujących małą żywotność). Użyte zostały izolatory z tomofanu (transparentna folia paro-przepuszczalna). Po uzyskaniu dojrzałości kłosa zbierano ręcznie i młócono indywidualnie. W okresie wegetacji wykonano obserwacje fenotypowe cech istotnych dla efektywności przyszłych krzyżowań: termin kwitnienia (data początku kwitnienia), pylenie (ocena wzrokowa wg skali Geigera i Morgensterna), wysokość roślin (po 5 losowo wybranych roślin z każdego poletka). Po zbiorach dodatkowo oceniono długość kłosa, liczbę kłosków w kłosie oraz liczbę ziaren w kłosie (wykorzystano do tego zebrane zaizolowane kłosa).

Zebrane dane wykorzystano do wybrania 90 linii intogresyjnych pokolenia B3S5 przeznaczonych do krzyżowań testowych w kolejnym roku badań.

Męskosterylne testery do planowanych krzyżowań zostały wytypowane przez przedstawicieli hodowców. Na izolowanych poletkach zlokalizowanych w spółkach hodowlanych wykonano rozmnożenia dwóch linii: linia NS1P pochodzi z Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o., a linia S82P/09 z Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o.

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

Na rok 2021 zaplanowano uzyskanie DNA z czterech odmian żyta i wstępną ocenę polimorfizmu genetycznego w obszarze chromosomu 4RL

Materiałem do badań były 4 odmiany mieszańcowe wybrane w trakcie konsultacji z hodowcami żyta, z których jedna była odmianą zarejestrowaną (Dolaro), a trzy kolejne były odmianami niezarejestrowanymi. Badane odmiany niezarejestrowane to: DC2424, RPD1273 oraz SMH604.

Nasiona 4 wybranych odmian wysiano we wrześniu 2021 do plastikowych multidonic i umieszczono w szklarni ZUT w Szczecinie. Każda z odmian była reprezentowana przez minimum 200 nasion, które kiełkowały z różną efektywnością. Po wschodach i osiągnięciu przez rośliny stadium trzech liści z każdej rośliny pobrano fragment tkanki liściowej i zamrożono w minus 70 st. C w celu wykonania izolacji DNA. Izolację DNA wykonano dla 96 roślin z każdej odmiany (co odpowiada liczbie studzienek na 1 płytce PCR). Przy izolowaniu DNA wykorzystano standardowe metody. W pierwszym etapie izolację wykonywano metodą CTAB. Uzyskane prepraty DNA oceniano spektrofotometrycznie i poprzez elektroforezę w 1% żelu agarozowym. Próby o niskiej jakości (niepełniające kryteriów dla techniki DArTseq) izolowano ponownie sięgając po komercyjny zestaw do izolacji DNA roślinnego (Gene Elute Plant Mini Kit, Sigma-Aldrich). Uzyskane izolaty DNA ponownie poddawano kontroli jakościowej pod kątem planowanych analiz DArTseq i w razie potrzeby procedurę izolacji powtarzano.

Jedną z odmian (DC2424) poddano genotypowaniu metodą DArTseq (ze względów ekonomicznych analizy DArTseq wykonano tylko dla tej jednej odmiany) Analizy zlecono firmie Diversity Arrays Technology (Bruce, Australia).

DNA wszystkich czterech odmian wykorzystano do analiz PCR przy użyciu 5 markerów zmapowanych na długim ramieniu chromosomu 4R (w rejonie, gdzie lokalizowane były geny restorerowe Rfp1, Rfp3 i Rfc1). Użyto markerów: SCSz23L500 (Stojałowski 2010), d508318 i d505904 (Milczarski i in. 2016) oraz 7468190c i 5500712c (Niedziela i in. 2021). Reakcje amplifikacji wykonywano przy zastosowaniu mieszanin reakcyjnych oraz profili temperaturowych zalecanych przez autorów. Rozdziały elektroforetyczne wykonywano w 1,5% żelach agarozowych i wizualizowano w obecności bromku etydyny.

Markery SCSz23L500 oraz d508318 nie wykazywały w odmianie DC2424 różnic między badanymi roślinami. Pierwszy z markerów charakteryzował się obecnością pojedynczego produktu amplifikacji o długości ok. 500 par nukleotydów (bp), który był obecny u wszystkich badanych roślin odmiany DC2424. Marker d508318 generował trzy produkty amplifikacji, które w identycznej konfiguracji występowały w całej badanej grupie roślin. Marker d505904 ujawniał polimorfizm genetyczny wewnątrz odmiany DC2424. Różne allele tego markera były widoczne w postaci produktu amplifikacji o długości ok. 700 bp, produktu amplifikacji o długości ok. 550 bp lub braku produktów amplifikacji (allel „null” – 0). Allel 550bp wykryty został tylko w jednej roślinie (SC2424-131) w układzie heterozygotycznym (wraz z allelem 700bp). Pozostałe rośliny charakteryzowały się obecnością alleli 700bp oraz 0.

Markery 7468190c i 5500712c miały charakter dominujący i charakteryzowane były przez dwa allele: allel dominujący widoczny był w postaci prążka będącego efektem amplifikacji fragmentu DNA o długości ok. 600 bp (wielkość produktu amplifikacji była podobna dla obu markerów), a allel recesywny w postaci braku prążka (allel „null”). Oba markery ujawniły występowanie polimorfizmu genetycznego w obrębie odmiany DC2424. Rozkład alleli obu markerów w badanej grupie roślin był zupełnie niezależny, a proporcje alleli dominujących do alleli „null” były jak: 66:30 dla markera 7468190c oraz 33:63 dla 5500712c.

W odmianie RPD1273 wszystkie pięć testowanych markerów pozwalało na wykrycie polimorfizmu genetycznego. W przypadku SCSz23L500 u 46 roślin pojawił się produkt amplifikacji 500bp, u pozostałych pięćdziesięciu nie było prążków markerowych. Marker d508318 występował w

wariancie trójprążkowym (takim jak w odmianie DC2424) u 47 roślin, u pozostałych nie obserwowano produktów amplifikacji. W przypadku markera d505904 nie zaobserwowano żadnej rośliny z allelem 550bp. U 60 roślin obecny był allel 700bp, pozostałe 36 genotypów charakteryzowało się allelem „null”. Marker 7468190c u większości roślin odmiany RPD1273 generował produkt amplifikacji o długości ok. 600bp – na 96 badanych genotypów prążek markerowy został wykryty u 78. Tylko 18 roślin z odmiany charakteryzowało się brakiem prążka markerowego. W przypadku markera 5500712c sytuacja była odmienna: prawie wszystkie rośliny odmiany miały allel „null” z wyjątkiem genotypu RPD1273-277, gdzie pojawił się prążek markerowy.

W odmianie SMH604, podobnie jak w DC2424, markery SCSz23L500 i d508318 nie ujawniały 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. Monomorficzny charakter w odmianie SMH604 miał również marker 5500712c, z tym że w przypadku tego markera wszystkie badane rośliny zawierały allel „null” (brak produktu amplifikacji). Marker d505904 generował produkty amplifikacji u większości badanych genotypów odmiany SMH604. Tylko cztery rośliny charakteryzowały się brakiem prążków markerowych. Najwięcej genotypów odmiany opisano obecnością allelu 700bp – było ich 49. U pozostałych 30 roślin zaobserwowano obecność dwóch prążków markerowych: 700bp i 550bp. Ostatni z testowanych markerów (7468190c) w 34 roślinach odmiany SMH604 generował produkt amplifikacji o długości ok. 600bp, a pozostałe badane rośliny charakteryzowały się brakiem prążka markerowego.

W odmianie Dolaro marker SCSz23L500 był niemal monomorficzny – wszystkie badane rośliny charakteryzowały się obecnością prążka markerowego z wyjątkiem jednego genotypu: Dolaro-108. W przypadku markera d508318 większość roślin charakteryzowało się obecnością trójprążkowego allelu, z wyjątkiem ośmiu genotypów, u których nie zaobserwowano żadnych produktów amplifikacji (allel „null”). 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 700bp i 550bp), a najwięcej roślin generowało pojedynczy produkt amplifikacji o długości ok. 700bp. Analizy z użyciem markera 7468190c ujawniły polimorfizm wewnątrzodmianowy, w wyniku którego ponad połowa badanych roślin charakteryzowana była przez obecność allelu „null” (49 obiektów), pozostałe generowały obecność prążka markerowego 600bp. Marker 5500712c również ujawniał różnicowanie genetyczne wewnątrz odmiany Dolaro, z tym że nieco więcej roślin z badanej próby charakteryzowało się obecnością prążka markerowego (50 genotypów ujętych w analizach), a reszta jego brakiem.

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

Na rok 2021 zaplanowano dokonanie wyboru linii do badań i ich rozmnożenie.

Rozmnażanym w 2021 roku materiałem były w pierwszej kolejności trzy warianty linii wsobnej 541 (3 linie izogeniczne) o wysokim poziomie homozygotyczności i wynikającej z tego słabej żywotności:

- linia 541N (z cytoplazmą normalną) – linia płodna dopełniająca męską sterylność w systemie CMS-Pampa i CMS-C, poziom wsobności powyżej S28

- linia 541P (z cytoplazmą CMS-Pampa) – linia męskosterylna po min. 16 cyklach krzyżowań wstecznych (>B16),

- linia 541C (z cytoplazmą C) – linia męskosterylna po min. 21 cyklach krzyżowań wstecznych (>B21)

Poza liniami izogenicznymi badano zestaw 22 linii blisko-izogenicznych względem linii 541N. Wszystkie linie blisko-izogeniczne reprezentowane były przez pokolenie B7S7 i zawierały introgresję pochodzące z prymitywnego żyta IRAN IX, które jest źródłem efektywnych genów restorerowych dla cytoplazmy Pampa. Czternaście linii oznaczanych jako NIL541P(IRAN IX) posiadało cytoplazmę CMS-Pampa, pozostałe osiem linii z serii NIL541C(IRAN IX) zawierało cytoplazmę CMS-C.

Spśród badanych 22 linii zaplanowano dla każdej z cytoplazm wyselekcjonowanie dwóch genotypów przeznaczonych do planowanych analiz ekspresji. Wybór linii został oparty o dane fenotypowe (ocena płodności) oraz genotypowe (podobieństwo genetyczne).

Ocenę męskiej płodności w warunkach polowych wykonano na podstawie wzrokowych obserwacji przy zastosowaniu 9-stopniowej skali Geigera i Morgensterna (1975). Po zbiorach zaizolowanych kłosów obliczano liczbę kłosków w kłosie i liczbę zawiązanych ziaren w celu określenia procentowego osadzenia ziaren (drugie z kryteriów oceny męskiej płodności).

Izolację DNA wykonano przy użyciu zestawu Gene Elute Plant Mini Kit, Sigma-Aldrich. Uzyskane izolaty oceniano pod kątem jakościowym przy pomocy spektrofotometru oraz poprzez elektroforezę w 1% żelu agarozowym. W razie konieczności izolację DNA powtarzano aż do uzyskania preparatów spełniających wymagania jakościowe analiz DArTseq.

Genotypowanie wykonano metodą DArTseq, która stanowi wariant metody genotypowania poprzez sekwencjonowanie (GBS – *Genotyping by Sequencing*). Analizy zlecono firmie Diversity Arrays Technology (Bruce, Australia).

Ocena wzrokowa pylenia wskazywała na przeważającą obecność form częściowo płodnych, co jest dość charakterystyczne dla linii o wysokim poziomie wsobności (badano linie w pokoleniu S7). Pomimo wysokiego poziomu zaawansowania linii hodowlanych, w niektórych z nich obserwowano wewnętrzne zróżnicowanie pod względem męskiej płodności. Obecność niepełnego wyrównania linii potwierdziły zarówno obserwacje wzrokowe, jak i oceny zawiązywania ziaren pod izolatorami. W obrębie kilku linii (także takich, w których problem nie został zauważony w czasie ocen wzrokowych) część roślin była całkowicie męskoniepłodna.

Na podstawie ocen płodności linii oraz ich wyrównania, przy jednoczesnym uwzględnieniu ogólnej liczby uzyskanych nasion, wybrano 10 linii z cytoplazmą Pampa oraz 3 linie z cytoplazmą C, jako potencjalnie przydatne do planowanych analiz ekspresji.

Do oceny podobieństwa genetycznego w obrębie badanych obu serii linii blisko-izogenicznych wykorzystano 104257 markerów Silico-DArT. Zgodnie z założeniami projektu, z grupy linii wymienionych powyżej wybrano po 2 linie z cytoplazmą Pampa i z cytoplazmą C do dalszych badań.

Prezentacja wyników badań na konferencjach:

Wystąpienie ustne: *Stojalowski S., Orłowska M., Sobczyk M., 2021. Wykorzystanie Markerów*

DArTseq do Analizy Struktury Genetycznej Wybranych Odmian Populacyjnych i Mieszanych

Żyta. Konferencja Naukowa „Genetyka aplikacyjna roślin – wyzwania XXI wieku” Streszczenia,

Warszawa 22-24.09.2021: 43



GENETYKA APLIKACYJNA ROŚLIN

wyzwania XXI wieku

22-24.09.2021 Warszawa

KONFERENCJA NAUKOWA „GENETYKA APLIKACYJNA ROŚLIN - WYZWANIA XXI WIEKU”

STRESZCZENIA



**SZKOŁA GŁÓWNA
GOSPODARSTWA
WIEJSKIEGO**



**Katedra Genetyki,
Hodowli i Biotechnologii
Roślin**

WYKORZYSTANIE MARKERÓW DArTseq DO ANALIZY STRUKTURY GENETYCZNEJ WYBRANYCH ODMIAN POPULACYJNYCH I MIESZAŃCOWYCH ŻYTA

Sławek Stojakowski, Małga Orłowska, Martyna Sobczyk

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

W Polskim rejestrze odmian występują aktualnie dwie kategorie odmian żyta: odmiany populacyjne i odmiany mieszańcowe. Odmiany populacyjne to odmiany tradycyjne, które w wyniku obcopleynego charakteru żyta składają się z roślin o zróżnicowanym składzie genetycznym. Z drugiej strony, kryterium odrębności, wyrównania i trwałości (OWT) oceniane w procesie rejestracji prowadzi do wyeliminowania z uprawy populacji charakteryzujących się niezbyt wysokim poziomem zróżnicowania wewnętrznego. Nasiona odmian mieszańcowych są tworzone na drodze odpowiednio zaplanowanych krzyżowań. Ze względu na złożony charakter tych krzyżowań, rośliny mieszańcowe wchodzące w skład odmiany wykazują pewną różnorodność genetyczną. Tym samym odmiany mieszańcowe żyta również są z genetycznego punktu widzenia populacjami. Można jednak oczekiwać, że zmienność genetyczna w obrębie odmiany mieszańcowej powinna być zawężona w porównaniu do tradycyjnej odmiany populacyjnej. Celem badań była analiza genetyczna wybranych dwóch odmian populacyjnych i dwóch mieszańcowych przy zastosowaniu markerów DArTseq oraz porównanie zmienności genetycznej zaobserwowanej w obrębie badanych populacji żyta. W badaniach wykorzystano odmiany z polskiej hodowli populacyjne „Dańkowskie Diament” i „Dańkowskie Granat” oraz mieszańcowe „Konto F1” i „Tur F1”. Rośliny wchodzące w skład wszystkich odmian były zróżnicowane genetycznie. Wartości współczynników podobieństwa genetycznego między roślinami odmian populacyjnych mieściły się w granicach od 0,72 do 0,94, a dla odmian mieszańcowych od 0,76 do 0,99. Wyniki potwierdzają teoretyczne założenia sugerujące, że w porównaniu do odmian populacyjnych, odmiany mieszańcowe żyta składają się z roślin mniej zróżnicowanych genetycznie, ale nie są to odmiany homogeniczne.

Słowa kluczowe: odmiany populacyjne, odmiany mieszańcowe, zmienność genetyczna, żyto

Badania sfinansowane przez MPRW w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej – zadanie nr 10, Dotyczy KS: zbl 802-14-2021