

BIULETYN Nr 295 / 2021

ISSN 0373-7837

E-ISSN 2657-8913

DOI: 10.37317/biul-2021-00PB

INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN

**BULLETIN
OF PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE**



**WYDANIE SPECJALNE
POSTĘP BIOLOGICZNY 2014 – 2020**

Pola IHAR 2014 r.

RADZIKÓW 2021
INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

**BIULETYN
INSTYTUTU HODOWLI
I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
NR 295/2021**



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Redaktor wydania: Magdalena Szechyńska-Hebda p. o. dyrektora Instytutu

Komitety Redakcyjne

NAUKA

Redaktor Naczelny: Danuta Boros

Maja Boczkowska, Renata Lebecka, Wiesław Mądry, Katarzyna Mikołajczyk, Sławomir Podlaski,
Barbara Zagdańska

WDROŻENIA

Redaktor Tematyczny: Wojciech Nowacki

Józef Adamczyk, Karol Bujoczek, Andrzej Chodkowski, Wiesław Dzwonkowski, Edward Gacek, Piotr
Kamiński, Karol Marciniak, Przemysław Matysik, Juliusz Młodecki, Jarosław Mostowski, Adam Sę-
pień, Roman Warzecha, Sławomir Wróbel

KONFERENCJE

Redaktor Tematyczny: Magdalena Szechyńska-Hebda

Katarzyna Gacek, Wiesław Podyma

Czasopismo ukazuje się od 1951 roku

Redaktor techniczny i skład komputerowy: Aleksandra Pindor



MINISTERSTWO
**ROLNICTWA
I ROZWOJU WSI**



Postęp biologiczny w produkcji roślinnej 2014 - 2020

Szanowni Państwo,

przekazujemy w Państwa ręce pierwszą publikację zawierającą podsumowanie wyników badań prowadzonych w latach 2014-2020 w ramach wsparcia finansowego, udzielanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi dla badań na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej.

Jednym z najważniejszych zadań, przed którymi stoi hodowla roślin, jest zapewnienie wysokiego i stabilnego plonowania roślin uprawnych w zmieniających się warunkach środowiskowych. Zmiana systemów produkcji rolnej, przetwarzania i dystrybucji produktów rolnych oraz oczekiwań rynku wymusza poszukiwanie odmian o specyficznych cechach, które umożliwiają łatwiejszy zbiór i lepsze przechowywanie, odmian charakteryzujących się wyższą zawartością pożądaných składników, lepszym wyglądem, trwałością, odpornością, plonowaniem itp.

Obserwowane obecnie zmiany klimatu w Polsce, skutkujące m. in. trudnym do przewidzenia przebiegiem zimy, czy pojawiającymi się w trakcie wegetacji roślin okresami suszy lub wysokich temperatur, powodują konieczność zwrócenia większej uwagi w programach hodowli roślin na poszukiwanie odporności na stresy abiotyczne.

W związku ze zmianami klimatu oraz intensyfikacją handlu międzynarodowego wzrasta również presja agrofagów roślin, także tych do tej pory nie występujących w Polsce. Wymaga to rozszerzenia zakresu hodowli odpornościowej i przyspieszenia prac w tym zakresie.

Możliwość prowadzenia skutecznych programów hodowlanych w odpowiedzi na pojawiające się wyzwania jest ściśle związana z dostępnością dla polskich hodowców nowoczesnych narzędzi (metod, technik) hodowli roślin, umożliwiających sprawną selekcję materiałów hodowlanych oraz skrócenie cyklu hodowli. Narzędzia takie powinny zostać opracowane przez podmioty prowadzące badania na rzecz rolnictwa, a następnie wdrożone do praktyki hodowlanej przy uwzględnieniu specyfiki polskich spółek hodowli roślin, w szczególności ich możliwości technicznych.

Niniejsza publikacja zawiera wyniki 106 tematów badawczych, wybranych do finansowania przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi we współpracy z Polską Izbą Nasienną. Mogą Państwo znaleźć wśród nich dużo przydatnych informacji, które - mam nadzieję - ułatwią i usprawnią prowadzenie hodowli roślin uprawnych, dostosowanych do warunków klimatycznych Polski i uwzględniających oczekiwania polskich konsumentów.

Anna Gembicka

Sekretarz Stanu

Badania nad efektywnością markerów funkcjonalnych w powiązaniu z analizą reologiczną w mikroskali dla oceny cech jakościowych pszenicy zwyczajnej

Analyses of functional markers effectivity in connection with rheological microscale analysis for quality trait estimation of common wheat

Bolesław Salmanowicz✉, Monika Langner, Sławomir Franaszek

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60–479 Poznań

Słowa kluczowe: białka zapasowe, cechy jakościowe ziarna, podjednostki gluteninowe, pszenica, zawartość białka

Celem prac realizowanych w ramach tematu 1. było oszacowanie efektywności rozdzielu LMW podjednostek gluteninowych pszenicy uzyskiwanych przy zastosowaniu nowoczesnych metod tj. wysokosprawnej chromatografii cieczowej oraz wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej. **W zakresie równoległe realizowanego tematu 2.** została przeprowadzona wstępna ocena wpływu obecności funkcjonalnego allelu *Gpc-B1* kontrolującego zawartość białka w ziarnie na cechy jakościowe ziarna pszenicy zwyczajnej. **W ramach tematu 3.** zweryfikowano poprawność identyfikacji alleli locus *Glu-D3* kodujących LMW podjednostki gluteninowe w ziarniakach pszenicy w oparciu o odmiany wzorcowe przy zastosowaniu markerów molekularnych oraz przeprowadzono analizy molekularne badanego materiału roślinnego celem określenia składu LMW-GS kodowanych przez allele tego locus w 60 krajowych odmianach pszenicy zwyczajnej. **Celem badawczym tematu 4.** było przeprowadzenie oceny wpływu składu LMW białek gluteninowych na cechy jakościowe pszenicy o zidentyfikowanych wariantach allelicznych genów loci *Glu-1* i *Glu-3* kodujących poszczególne białka gluteninowe w ziarnie pozyskanym z doświadczeń polowych z kolejnego roku hodowli.

1. Opracowanie metodyki rozdzielu i identyfikacji LMW podjednostek gluteninowych oraz przeprowadzenie oceny tej klasy białek w ziarnie odmian krajowych pszenicy przy zastosowaniu techniki wysokosprawnej chromatografii

cieczowej z odwróconymi fazami

Wysokocząsteczkowe podjednostki gluteninowe wraz z LMW-GS w znacznym stopniu wpływają (do 70%) na jakość technologiczną pszenicy. Ze względu na występowanie dużego polimorfizmu w obrębie LMW-GS (dotychczas wyróżniono ponad 45 alleli w loci *Glu-A3*, *Glu-B3* i *Glu-D3*) oraz częste powinowactwo do białek gliadynowych, LMW podjednostki gluteninowe są słabo poznane, a dokładna charakterystyka poszczególnych podjednostek białkowych i wpływ na jakość końcową pszenicy jest wciąż obiektem wielu badań. Metoda RP-HPLC jest powszechnie stosowana do rozdzielu i charakterystyki m.in. białek zapasowych zbóż.

Material i Metody

Obiektem badań było 21 odmian wzorcowych pszenicy zawierających dotychczas opisane w literaturze allele trzech loci (*Glu-A3*, *Glu-B3* i *Glu-D3*) genów kodujących LMW podjednostki gluteninowe. W dalszym etapie badań zidentyfikowano LMW podjednostki gluteninowe występujące w ziarnie 32 krajowych odmian pszenicy zwyczajnej. Frakcję LMW-GS pozyskiwano z mąki w/w prób na drodze ekstrakcji kolejno: wydzielenia albumin i globulin buforem fosforanowym (0,4M NaCl + 0,067 M HKNaPO₄), białek gliadynowych 70% alkoholem etylowym, a następnie białek gluteninowych (HMW i LMW-GS) buforem 0,05 M Tris-HCl (pH 7,5) zawierającym 50% 1-propanol, 2M mocznik oraz 1% DTT. Analizy RP-HPLC przeprowadzono na aparacie Beckman-Coulter (USA) wyposażonym w zestaw pomp H126, detektor diodowy



i oprogramowanie Karate wersja 8.1. Do rozdzielania białek stosowano wysokosprawne kolumny chromatograficzne typu Jupiter C18 oraz Phenomenex 250 C18, 300Å o wymiarach 250x4,1 mm oraz 150x2,0 mm. Podczas optymalizacji rozdzielania LMW-GS techniką RP-HPLC stosowano gradient rozpuszczalników rozdzielających [woda z TFA (A) – acetonitryl z TFA (B)] w zakresie 15–85% acetonitrylu. Rozdzielały białek przeprowadzano w zakresie temperatur 40–600 C, przy pomiarze absorpcji światła w 210, 214 i 280 nm.

Wyniki

Na podstawie znajomości składu jakościowego LMW-GS odmian wzorcowych na chromatogramach zidentyfikowano poszczególne piki białkowe (2–5 izoform dla każdej z podjednostek) przypisując im wyznaczone czasy retencji. Na chromatogramach obserwowano 1–2 dodatkowe izoformy LMW-GS kodowane przez locus *Glu-B3* w porównaniu z liczbą izoform występujących na profilach CZE. Zestawy pików białkowych LMW-GS kodowanych przez allele locus *Glu-D3* składały się w trzech pików. Na RP-HPLC chromatogramach piki odpowiadające poszczególnym LMW-GS miały czasy retencji w zakresie od 39,53 min do 50,46 min. Przeprowadzona analiza porównawcza czasów retencji pików białkowych uzyskanych dla analizowanych 32 odmian pszenicy z czasami uzyskanymi dla odmian wzorcowych wykazała zgodność identyfikacyjną z danymi uzyskanymi przy zastosowaniu wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej w przypadku 31 badanych odmian. Różnicę stwierdzono jedynie w identyfikacji alleli locus *Glu-B3* odmiany Mulan, gdzie w miejsce wcześniej zidentyfikowanego allelu b stwierdzono obecność allelu d. Podobnie jak w przypadku elektroforezy kapilarnej w badanym materiale zidentyfikowano występowanie 11 wariantów allelicznych loci *Glu-3*.

2. Charakterystyka wstępna genotypów pszenicy zawierających allel funkcjonalny genu *Gpc-B1* kontrolujący zawartość białka w ziarnie pszenicy w powiązaniu z analizą reologiczną w mikroskali

Zawartość białka w ziarnie (GPC) pszenicy jest cechą krytyczną, która określa żywieniową wartość, przetwórcze własności i w wielu krajach również cenę rynkową ziarna. Prowadzona w ostatnich dziesięcioleciach na szeroką skalę selekcja ukierunkowana na poprawę plonu pszenicy spowodowała częściową utratę tej własności, co jest wynikiem dobrze udokumentowanej

ujemnej korelacji między plonem a GPC. Badania porównawcze odmian pszenicy z różnych okresów uprawy wykazują, że nowoczesne odmiany mają zredukowane GPC w porównaniu do odmian starszych. Genowa introgresja funkcjonalnych alleli genów *Gpc-B1* i *Gpc-B2* z dzikiej pszenicy płaskurki (*Triticum turgidum* ssp. *dicoccoides*) rozszerzyły genetyczną różnorodność tej cechy dostarczając nowych możliwości dla wzrostu GPC w ziarnie pszenicy.

Material i Metody

Ustabilizowane genetycznie linie pszenicy, pochodzące z cyklu krzyżowań ze źródłem genu *Gpc-B1*, wysiano wiosną 2015 roku na mikropoletkach w celu rozmnożenia materiału oraz przeprowadzenia charakterystyki najważniejszych cech rolniczych (wysokość roślin, wczesność, porażenie przez podstawowe choroby zbóż, stopień wylegania). Do badań zebrano materiał roślinny w postaci ziarna obejmujący 58 linii pszenicy. Obecność translokacji zawierającej gen *Gpc-B1* w wyhodowanych liniach pszenicy potwierdzono za pomocą reakcji PCR przy użyciu trzech markerów molekularnych. Podstawowe parametry jakościowe mąki (ogólna zawartość białka, wilgotność, zawartość glutenu, wodochłonność) oznaczono na spektrofotometrze DA7200 f-my Perten techniką NIR w zakresie fal 950–1700 nm. Mąkę do badań reologicznych pozyskano mieląc ziarno w czterowalcowym młynie laboratoryjnych Quadromat Junior firmy Bradenber. Pomiar reologiczny mąki pszennej przeprowadzono w mikroskali z zastosowaniem mikrosografu oraz analizatora tekstury z przystawką Kieffera.

Wyniki

Po dopracowaniu warunków reakcji PCR dla odmian wzorcowych uzyskano produkty amplifikacji zgodne z danymi literaturowymi dla zastosowanych markerów. Obecność genu *Gpc-B1* stwierdzono w 23 próbach. W celu określenia wpływu obecności genu *Gpc-B1* na wartość wypiekową badanych genotypów na wstępie oznaczono podstawowe parametry jakościowe mąki (ogólna zawartość białka, wilgotność, zawartość glutenu, wodochłonność), następnie przeprowadzono analizy reologiczne ciasta w mikroskali. Średnia wartość białka ogólnego w badanej mące wahała się od 11,24% do 16,28%. Zawartość glutenu kształtowała się w szerokim zakresie od 18,65% do 33,92%. Podwyższoną zawartość białka powyżej 14,5% stwierdzono w 23 badanych próbach, z których 16 zawierało gen *Gpc-B1*. Badania reologiczne ciasta

pozyskanego z 58 genotypów przeprowadzono w mikroskali przy zastosowaniu 10-g miksografu oraz analizatora tekstury z przystawką Kieffera. Wyróżniono 24 linie o wysokim miksograficznym indeksie jakości (powyżej 19 jednostek), z których 22 zawierało gen *Gpc-B1*. Analizy wykonane na analizatorze tekstury wykazały, że linie zawierające gen *Gpc-B1* charakteryzowały się wyższą siłą ciasta, rozciągliwością oraz pracą włożoną w rozciąganie.

3. Weryfikacja AS-PCR i STS markerów molekularnych identyfikujących geny loci *Glu-D3* kodujących LMW podjednostki gluteninowe w ziarniakach pszenicy w oparciu o 15 odmian wzorcowych i 60 odmianach krajowych

Material i Metody

Dla 15 odmian wzorcowych pszenicy oraz 60 badanych krajowych odmian wyizolowano genomowi DNA metodą Dorokhova. Identyfikacje alleli loci *Glu-D3* przeprowadzono za pomocą reakcji PCR przy użyciu 4 zestawów starterów allelospecyficznych.

Wyniki

Użyte zestawy starterów po dopracowaniu warunków amplifikacji w przypadku odmian wzorcowych dawały produkty o wielkości bp zgodnie z danymi literaturowymi. Podczas analiz 42 odmian pszenicy otrzymano produkty amplifikacji wielkości 773 pz lub 388 pz potwierdzające obecność allelu *Glu-D3c*, który identyfikowano za pomocą dwóch par starterów *gluD3c* i *gluD3ceki*. Jednocześnie zastosowanie markera *gluD3ceki* umożliwiło identyfikację allelu *Glu-D3e*, który stwierdzono w 11 odmianach. Analizy PCR przeprowadzone z markerem *gluD3abdgj* dodatkowo potwierdziły obecność alleli *Glu-D3a* w 7 odmianach. Zastosowane markery molekularne w pełni potwierdziły poprawność identyfikacji wariantów allelicznych genów loci *Glu-D3* zidentyfikowanych wcześniej przy pomocy wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej.

4. Określenia wpływu składu LMW białek gluteninowych na cechy jakościowe odmian pszenicy z kolejnego roku doświadczeń polowych za pomocą metod biochemicznych i reologicznych (teksturometr i miksograf)

Na cechy jakościowe pszenicy w znacznym stopniu wpływa zawartość białka występująca w ziarnie, a w szczególności skład jakościowo-ilościowy

białek zapasowych tj. wysoko- i niskocząsteczkowych glutenin (HMW- i LMW-GS) oraz gliadyn. Wiedza na temat wpływu poszczególnych HMW-GS na cechy technologiczne jest dobrze poznana, natomiast w przypadku wpływu LMW-GS brak dotychczas jednoznacznych danych.

Material i Metody

Obiektem badań było 61 odmian pszenicy o oznaczonym wcześniej składzie HMW-GS w ziarnie. Analizy biochemiczne mąki przeprowadzono po 14 dniach leżakowania mąki na aparacie Spektrofotometr NIR 7200 firmy Perten techniką NIR w zakresie światła: 950–1700 nm celem określenia podstawowych własności fizykochemicznych badanych mąk (wilgotność, ogólną zawartość białka, zawartość glutenu, wodochłonność). Uzyskaną mąkę poddano badaniom reologicznym w mikroskali na 10g-miksografie (oznaczenie pięciu charakterystycznych parametrów reologicznych ściśle skorelowanych z określonymi cechami jakościowymi pszenicy) oraz analizatorze tekstury TA.XT z przystawką Kieffera (oznaczenie siły, wydłużenia ciasta, oraz elastyczności).

Wyniki

W wyniku przeprowadzonej analizy wydzielonej frakcji LMW podjednostek gluteninowych metodą wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej w badanym materiale potwierdzono występowanie 11 wariantów allelicznych loci *Glu-3*. Stwierdzono występowanie po 3 alleli w genomach A i D oraz 6 w genomie B. W badanych odmianach występowały najczęściej warianty alleliczne *Glu-A3e/Glu-B3b/Glu-D3c* (11 odmian) oraz *Glu-A3f/Glu-B3e/Glu-D3c* (10 odmian). Przeprowadzona analiza porównawcza uzyskanych danych przy zastosowaniu 10g- miksografu umożliwiła stwierdzenie istotnych różnic we właściwościach reologicznych uzyskanych w zależności od występowania w próbie wariantu allelicznego loci *Glu-3*. Wykazano, że w obrębie loci *Glu-3* na maksymalny czas rozwoju korzystnie wpływała obecność alleli *Glu-A3f*, *Glu-A3d*, *Glu-D3b*, *Glu-D3a*, na maksymalną szerokość krzywej obecność alleli *Glu-A3e*, *Glu-A3f*, *Glu-D3a*, *Glu-D3c*, a na maksymalną wysokość krzywej allele *Glu-A3b*, *Glu-A3e*, *Glu-D3c*, *Glu-D3a*. Na wszystkie parametry fazy rozwoju ciasta pozytywnie wpływają LMW-GS kodowane przez allele *Glu-B3h* oraz *Glu-B3i*, natomiast negatywnie kodowane przez allele *Glu-B3b* oraz *Glu-B3c*. Najwyższy średni miksograficzny indeks jakości wykazywały odmiany posiadające warianty alleliczne *GluA3f/Glu-B3d/Glu-D3c*,

Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3a oraz *Glu-A3b/Glu-B3h/Glu-D3c*. Najniższym średnim indeksem charakteryzowały się natomiast odmiany, w których występował wariant *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3e*. Na podstawie danych uzyskanych przy zastosowaniu analizatora tekstury metodą Kieffera stwierdzono wzrost siły ciasta w ziarnie zawierającym LMW-GS kodowanych przez allel *Glu-A3d*, *Glu-A3f*, *Glu-B3b*, *Glu-B3h*, *Glu-D3a* i *Glu-D3c* oraz osłabienie siły w przypadku występowania allelu *Glu-A3e*. Najkorzystniejsze parametry reologiczne, świadczące o dobrej jakości wypiekowej pszenicy, posiadały odmiany zawierające warianty allelicznych *Glu-A3f/Glu-B3d/Glu-D3c*, *Glu-A3b/Glu-B3h/Glu-D3c* oraz *Glu-A3f/Glu-B3e/Glu-D3c*. Podobnie jak w przypadku analiz miksograficznych w obrębie wyróżnionych grup pszenic o określonym składzie jakościowym LMW-GS obserwowano znaczne różnice w wartościach parametrów reologicznych dla poszczególnych odmian.

Wnioski

1. Zastosowanie nowoczesnych metod analitycznych wolnostrefowej elektroforezy kapilarnej oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami umożliwia pełną identyfikację LMW-GS kodowanych przez allele loci *Glu-3*.
2. Zastosowane markery PCR potwierdziły poprawność identyfikacji alleli w obrębie loci *Glu-A3*, *Glu-B3* oraz *Glu-D3*.
3. Uzyskane dane wskazują, że w ujęciu jednostkowym genotypy pszenicy posiadające LMW-GS kodowanych przez allele *Glu-A3b*, *Glu-B3d*, *Glu-D3a*, charakteryzują się najkorzystniejszymi parametrami reologicznymi (wysoki miksograficzny indeks jakości oraz wysoka siła/wytrzymałość ciasta przy odpowiedniej rozciągliwości).
4. Wykazano znaczny wpływ poszczególnych wariantów allelicznych LMW-GS na jakość technologiczną pszenicy; szczególnie pozytywny wpływ stwierdzono w przypadku występowania w ziarniakach pszenicy zwyczajnej wariantów allelicznych *Glu-A3f/Glu-B3d/Glu-D3c*, *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3a* oraz *Glu-A3b/Glu-B3h/Glu-D3c*.

Osiągnięcia projektu

1. Wykazano, że wysokosprawna chromatografia cieczowa z odwróconymi fazami jest alternatywną metodą identyfikacji LMW-GS występujących w pszenicy zwyczajnej. Opracowana

metodyka umożliwia pełen rozdział i identyfikację LMW podjednostek gluteninowych. Analiza porównawcza RP-HPLC chromatogramów z pikami odpowiadającymi poszczególnym LMW-GS wykazała pełną zgodność materiału badawczego względem odmian wzorcowych.

2. Zawartość białka w ziarnie jest jedną z bardziej istotnych cech określającą potencjalne użycie zbóż na cele przemysłowe lub jako źródło pokarmu dla zwierząt hodowlanych. Przeprowadzone analizy umożliwiają stwierdzenie, że obecność genu *Gpc-B1* w znacznym stopniu wpływa na zwiększenie poziomu zawartości białka w ziarnie, a tym samym polepszenie jakości technologicznej zbóż.
3. Przypisanie pszenicy do określonej klasy jakościowej oraz finalnego użycia w przemyśle spożywczym jest determinowana głównie przez siłę glutenu obecnego w bielmie ziarniaków. Wysokocząsteczkowe podjednostki gluteninowe wraz z niskocząsteczkowymi podjednostkami glutenowymi w znacznym stopniu wpływają na jakość pszenicy, nawet do 70%. Ze względu na duże zróżnicowanie składu i polimorfizmu w obrębie LMW-GS tak istotne jest poznanie finalnego składu niskocząsteczkowych podjednostek gluteninowych determinujących w znacznym stopniu wykorzystanie przemysłowe pszenicy. Wykorzystanie materiału wzorcowego umożliwiło potwierdzenie poprawności identyfikacji alleli w obrębie loci *Glu-A3*, *Glu-B3* oraz *Glu-D3* przy zastosowaniu markerów PCR. Na podstawie badanego materiału roślinnego, poprzez przeprowadzenie badań reologicznych odnotowano korzystny wpływ na parametry techniczne wariantów allelicznych *Glu-A3f/Glu-B3d/Glu-D3c*, *Glu-A3f/Glu-B3b/Glu-D3a* oraz *Glu-A3b/Glu-B3h/Glu-D3c*.

Upowszechnianie wyników

Effect of *Gpc-B1* gene on grain protein concentration and bread-making quality in common wheat. (Wpływ genu *Gpc-B1* na zawartość białek w ziarniakach i na jakość wypiekową u pszenicy zwyczajnej.) Salmanowicz B., Langner M. Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznan, Poland. Presenting author: bsal@igr.poznan.pl XVIII European FoodChem Symposium, 13-16 października 2015, Madryt, Hiszpania.

Detection of LMW glutenin genes of the *Glu-3* locus in some polish wheat cultivars by capillary electrophoresis and RP-HPLC. (Wykrywanie genów LMW glutenin w locus *Glu-3* w niektórych odmianach polskich pszenic za pomo-

cą elektroforezy kapilarnej oraz RP-HPLC.) Langner M.,
Franaszek S., Salmanowicz B. Institute of Plant Genetics,
Polish Academy of Sciences, Poznań, Poland. Presenting

author: mlan@igr.poznan.pl. 10th Symposium on High
-Performance Separation Methods, 2-4 września 2015,
Siofok, Węgry.

Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis*

The use of molecular and phenotypic markers to identify genes of wheat resistance to eyespot caused by *Oculimacula yallunda* and *Oculimacula aciformis*

Halina Wiśniewska¹✉, Maciej Majka¹, Magdalena Gawłowska¹, Marek Korbas², Adriana Twardawska¹, Michał Kwiatek¹, Jolanta Belter¹

¹ Instytut Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk, Poznań

² Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Poznań

✉ e-mail: hwis@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: geny *Pch1* i *Pch2*, łamliwość źdźbła, markery molekularne, *Oculimacula*, pszenica

Łamliwość podstawy źdźbła – choroba pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.), powodowana przez grzyby z rodzaju *Oculimacula*. Występuje podczas łagodnych zim i chłodnych wiosen. Podstawa źdźbła próchnieje i powoduje jego łamliwość, co może prowadzić do ubytku plonu nawet do 50% (Fitt i in. 1988).

Zidentyfikowano dwa geny warunkujące odporność. Gen *Pch1* – najbardziej efektywny, zidentyfikowany w *Aegilops ventricosa* i translokowany do długiego ramienia chromosomu 7D heksaploidalnej pszenicy, który znacząco redukuje skalę porażenia (Maia i in. 1967). Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła jest *Pch2* zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany „Capelle-Desprez” (Chapman i in. 2008) i może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności na łamliwość źdźbła (Burt i in. 2014).

Cele badań w latach 2014–2020

Hipoteza badawcza prezentowanego projektu zakłada, że kombinacja metod zweryfikowanych w badaniach wstępnych oraz stosowanych w projekcie do identyfikacji genów odporności (*Pch1* i *Pch2*) posłuży do wyboru odpornych na patogeny grzybowe z rodzaju *Oculimacula* genotypów heksaploidalnej pszenicy ozimej powstałych w wyniku krzyżowań z odpornymi odmianami pszenicy oraz innymi źródłami genów odporności (formy nieuprawne). W ten

sposób zgromadzone genotypy będą stanowiły materiał do badań genetycznych i fizjologicznych w obszarze interakcji patogen-roślina.

Identyfikacja genów odporności *Pch1* i *Pch2* w genotypach pszenicy z wykorzystaniem markera izoenzymatycznego i markerów molekularnych.

1. Weryfikacja obecności genów *Pch1* i *Pch2* w testach inokulacyjnych w warunkach kontrolowanych (fitotronowych) i polowych w celu określenia efektywności wybranych markerów w procesie określania obecności genów warunkujących odporność i analiza elementów struktury plonu badanych form – określenie wpływu genów *Pch1* i *Pch2* na cechy agronomiczne.
2. Piramidyżacja genów *Pch1* i *Pch2* w genotypach uprawnych pszenicy ozimej (krzyżowania oddalone i wewnątrzgatunkowe) w celu wprowadzenia genów związanych z odpornością na patogeny z rodzaju *Oculimacula*.
3. Zgromadzenie w kolekcji IGR PAN genotypów pszenicy ozimej odpornych na patogeny z rodzaju *Oculimacula* jako źródła odporności.

Założone w projekcie cele zostały osiągnięte.

Material badawczy

1. Dziko występujące genotypy gatunku *Aegilops ventricosa* posiadające gen *Pch1* na długim ramieniu chromosomu 7D i nieuprawne formy gatunku *Triticum*



monococcum posiadające gen *Pch2* na długim ramieniu chromosomu 7A.

2. Odmiana pszenicy „Rendezvous” – wzorzec odporności na łamliwość źdźbła.
3. Genotypy pszenicy ozimej o zróżnicowanym podłożu genetycznym i wysokoplonujące formy wzorcowe.
4. Wyselekcjonowane genotypy pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.) na podstawie badań pilotażowych z poprzedzających lat o hetero- lub homozygotycznym składzie alleli genu *Pchl*.
5. Genotypy pszenicy ze zidentyfikowanymi genami *Pchl* i *Pch2* jako komponenty krzyżówkowe do piramidyzacji genów.
6. Nowe genotypy pszenicy ozimej otrzymane z przekrzyżowania form odpornych.

Metody badawcze

1. Krzyżowanie międzyrodzajowe i wewnątrzgatunkowe form z genami *Pchl* i *Pch2*.
2. Identyfikacja markera izoenzymatycznego (endopeptydazy *Ep-D1b*), pozwalającego stwierdzić obecność genu *Pchl* – bliskie położenie tych dwóch sekwencji na dłuższym ramieniu chromosomu 7DL, określenie stopnia sprzężenia genu z badanym markerem.
3. Identyfikacja genów *Pchl* i *Pch2* mających wpływ na porażenie przez grzyby z rodzaju *Oculimacula* z wykorzystaniem markerów molekularnych:
 - gen *Pchl* – 3 markery molekularne (*Xust 2001*, *Xorw 1*, *Xorw 5*);
 - gen *Pch2* – 2 markery molekularne (*Xcfa 2040*, *Xwmc 525*).
4. Analiza ekspresji genu *Pchl* i *Pch2* w genotypach pszenicy *in vivo* – test inokulacyjny (BBCH 12–13) siewkowy i polowy (BBCH 30–32) zawieszają grzybnie i zarodnikami *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis* w odpowiednich fazach rozwojowych.
5. Piramidyzacja genów *Pchl* i *Pch2* w genotypach/liniach pszenicy.
6. Analiza korelacji elementów struktury plonu: wielkość plonu z poletka, masa 1000 ziarniaków (MTZ), współczynnik porażenia źdźbeł – K, średnie porażenie źdźbeł.

Wyniki

Cel 1. Identyfikacja genów odporności *Pchl* i *Pch2* w genotypach pszenicy z wykorzystaniem markera izoenzymatycznego i markerów molekularnych.

1. W latach 2014–2020 prowadzono identyfikację

genów *Pchl* i *Pch2* (przy użyciu markera izoenzymatycznego i markerów molekularnych) u 991 genotypów pszenicy ozimej.

2. Zidentyfikowano 106 genotypów pszenicy z genem *Pchl*, 36 genotypów z dwoma genami *Pchl* i *Pch2*.
3. U największej liczby genotypów (343) zidentyfikowano gen *Pch2*.
4. Około 50% badanych genotypów pszenicy ozimej nie posiadało genów *Pchl* i *Pch2*.

Cel 2. Weryfikacja obecności genów *Pchl* i *Pch2* w testach inokulacyjnych w warunkach kontrolowanych (fitotronowych) i polowych w celu określenia efektywności wybranych markerów w procesie określania obecności genów warunkujących odporność i analiza elementów struktury plonu badanych form – określenie wpływu genów *Pchl* i *Pch2* na cechy agronomiczne.

1. Najmniejsze porażenie siewek (test fitotronowy) w skali (0–4) zaobserwowano u genotypów z genami *Pchl* i *Pch2*.
2. Największe porażenie siewek (test fitotronowy) zaobserwowano u genotypów z brakiem genów *Pchl* i *Pch2*.
3. Najmniejsze porażenie źdźbeł genotypów pszenicy ozimej (test polowy) stwierdzono u genotypów z genem *Pchl* i *Pch2* oraz genem *Pchl*.
4. Największe porażenie źdźbeł (test polowy) zaobserwowano u genotypów bez genów *Pchl* i *Pch2* oraz tylko z genem *Pch2*.
5. Obecność genów *Pchl* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna i masę tysiąca ziarniaków.

Cel 3. Piramidyzacja genów *Pchl* i *Pch2* w genotypach uprawnych pszenicy ozimej (krzyżowania oddalone i wewnątrzgatunkowe) w celu wprowadzenia genów związanych z odpornością na patogeny z rodzaju *Oculimacula*.

1. Wykonano krzyżowania oddalone pomiędzy odmianą Patras (stwierdzona obecność genu *Pch2*), a formą mieszańcową (*Ae. ventricosa* × *T. persicum*) – (gen *Pchl*). Krzyżowania oddalone były mało efektywne i uzyskano tylko 3 ziarniaki, które nie kiełkowały.
2. Analizy cytogenetyczne GISH (wybranych mieszańców wczesnych pokoleń pszenicy × *Aegilops ventricosa* – źródło genu *Pchl*) wykazały introgresję chromatyny *Aegilops ventricosa* w wielu chromosomach, a nie tylko do długiego ramienia chromosomu 7D.

Taka sama introgresja występuje u odmiany Rendezvous, co może tłumaczyć przeniesienie do tej odmiany i innych odmian z genem *Pchl* różnych innych genów warunkujących m.in. niekorzystne cechy agronomiczne np. odpowiadających za obniżkę plonu.

3. Spośród 283 form powstałych w wyniku krzyżowania wewnątrzgatunkowego, otrzymano 128 genotypów ze spiramidyzowanymi genami *Pchl* i *Pch2* – które mogą stanowić źródła odporności na patogeny z rodzaju *Oculimacula* i można je wykorzystywać do poszerzenia zmienności genetycznej pszenicy, a tym samym zwiększenia odporności na grzyby z rodzaju *Oculimacula*.

Cel 4. Zgromadzenie w kolekcji IGR PAN genotypów pszenicy ozimej odpornych na patogeny z rodzaju *Oculimacula* jako źródło odporności.

1. Z 991 badanych w latach 2014–2020 genotypów pszenicy ozimej wyselekcjonowano 36 form z genami *Pchl* i *Pch2* oraz 106 genotypów z genem *Pchl*, które zgromadzono w kolekcji.
2. Zgromadzono także w kolekcji 128 genotypów pszenicy ozimej z genami *Pchl* + *Pch2* uzyskanymi w wyniku prowadzonej piramidyzaacji genów *Pchl* i *Pch2*.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Badania wykazały, iż może dochodzić do przełamania sprzężenia między locus genu *Pchl*, a locus markera *Xust2001*, który leży w większej odległości od genu (4,1 cM).
2. Wyniki testów inokulacyjnych w stadium siewki i rośliny dojrzałej potwierdziły ekspresję genów odporności zidentyfikowanych w badanych genotypach.
3. Największą korelację uzyskano pomiędzy współczynnikiem porażenia źdźbeł, a średnim procentem porażanych źdźbeł.
4. Stwierdzono, że obecność w genotypie pszenicy tylko genu *Pch2* nie wpływa na zwiększenie odporności rośliny dojrzałej.
5. Obecność genów *Pchl* lub *Pchl* i *Pch2* u badanych (2016–2018 r.) genotypów pszenicy nie wpływała istotnie na masę tysiąca ziarniaków i plon z poletka. Nie było różnicy między genotypami z genem *Pchl*, brakiem genów i genami *Pchl*+*Pch2* – ta sama grupa A. Różnica wystąpiła między *Pch2* (grupa B), a brakiem genów i *Pchl* (grupa A).
6. Zgromadzone w kolekcji IGR PAN genotypy mogą stanowić źródła odporności pszenicy na patogeny z rodzaju *Oculimacula*.

Osiągnięcia projektu

1. Dla identyfikacji genu *Pchl* mającego wpływ na odporność źdźbeł rośliny dojrzałej najkorzystniej użyć markera izoenzymatycznego *EpD1b* oraz markera molekularnego *Xorw1*.
2. Krzyżowania wewnątrzgatunkowe z wykorzystaniem form z obecnym pożądanym genem/genami i charakteryzujące się korzystnymi cechami technologicznymi są bardzo korzystne. Zapewniają uzyskanie mieszańców o dobrych wartościach technologicznych, szybciej i bez konieczności wypierania niekorzystnych cech z jakimi mamy do czynienia prowadząc krzyżowania międzyrodzajowe (oddalone).
3. Najkorzystniejsza dla odporności pszenicy na grzyby z rodzaju *Oculimacula* jest obecność w genotypie genów *Pchl* i *Pch2*.
4. W wyniku prowadzonej piramidyzaacji genów odporności na grzyby z rodzaju *Oculimacula* uzyskano 128 genotypów ze spiramidyzowanymi genami *Pchl* i *Pch2* – mogą stanowić źródło odporności na patogeny z rodzaju *Oculimacula* i można je wykorzystywać do poszerzenia zmienności genetycznej pszenicy, a tym samym zwiększenia odporności na grzyby z rodzaju *Oculimacula*.

Wykaz publikacji

Publikacje

- Kwiatek M., Wiśniewska H., Kaczmarek Z., Korbas M., Gawłowska M., Majka M., Pankiewicz K., Danielewicz J., Belter J. (2015). Using markers and field evaluation to identify the source of eyespot resistance gene *Pchl* in the collection of wheat breeding lines, *Cereal Research Communications*: 43:638–648.; IF=0,607; MNiSW=15 pkt.
- Wiśniewska H., Majka M., Gawłowska M., Korbas M., Belter J. (2019). Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis*, *BIULETYN Nr 286/2019* ISSN 0373–7837, E-ISSN 2657–8913, INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN, str. 41–43; MNiSW=20 pkt.
- Majka M., Kwiatek M., Korbas M., Danielewicz J., Gawłowska M., Belter J., Góral T., Wiśniewska H. (2018). Eyespot resistance of winter wheat breeding lines evaluated with the marker-assisted selection and inoculation tests at the seedling and adult plant stage, *Journal of Plant Protection Research* 58 (4), DOI: 10.24425/jppr.2018.124647; MNiSW=15 pkt.
- Wiśniewska H., Majka M., Gawłowska M., Korbas M., Belter J. (2019). Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacu-*

la yallundae i *Oculimacula acuformis*, Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 286:41–44, MNISW – 20 pkt.

Majka M., Gawłowska M., Twardawska A., Korbas M., Danielewicz J., Góral T., Ługowska B., Witkowski E., Matysik P., Woźna-Pawlak U., Wiśniewska H. (2020). Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula acuformis*, Biuletyn IHAR, nr 288: 3–14; MNiSW=20 pkt.

Konferencje

poster: IV Ogólnopolska Konferencja: Genetyka i Genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany, 05–07.11.2019, Poznań, Twardawska A., Majka M., Gawłowska M., Korbas M., Danielewicz J., Belter J., Wiśniewska H. (2019). Identyfikacja genów odporności na łamliwość źdźbła przez wykorzystanie markerów molekularnych. Książka Abstraktów str.58

poster: 7th EWAC Eucarpia International Conference, The European Cereals Genetics Co-operative EUCARPIA Cereals Section International Conference, From June 3rd – 8th, 2018, Bucharest, Romania. Wiśniewska, H., Majka, M., Gawłowska, M., Korbas, M. Kwiatek M., Danielewicz, J., Belter J. (2018). Identification of eyespot resistance genes in breeding lines of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.).

poster: 4th Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, 6–9.11.2017, Budapeszt, Węgry. Wiśniewska H., Kwiatek M., Majka M., Gawłowska, M., Korbas, M., Danielewicz J., Belter J. (2017). Diagnostic value of markers linked to the eyespot resistance genes in breeding lines of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), BOOOK of ABSTRACT str. 100

poster: XXth EUCARPIA General Congress "Plant breeding: the art of bringing science to life" 29 sierpnia – 1 września 2016, Zurich, Szwajcaria. Wiśniewska H., Kwiatek M., Majka M., Gawłowska M., Korbas M., Danielewicz, J., Belter J. (2016). Identification of eyespot resistance genes in breeding lines of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.), Book of Abstracts p.196.

wykład: XXI Konferencja Krajowa pt.: „Grzyby mikroskopowe i ich metabolity”14- 16 kwiecień 2015, IGR PAN w Poznaniu. Majka M., Kwiatek M., Gawłowska M.,

Belter J., Korbas M., Danielewicz J., Wiśniewska H. (2015). Poszukiwanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula acuformis*, Książka Abstraktów str. 17–18.

poster: 3rd Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, 2–4 listopada 2015, Berlin, Niemcy. str. Book of abstracts: 21. Prezentowane wyniki opisano na stronach 19–30 niniejszego sprawozdania za 2015r. Kwiatek M., Wiśniewska H., Kaczmarek Z., Korbas M., Gawłowska M., Danielewicz J., Belter J., Majka M. (2015) „*Pch1* and *Pch2* eyespot resistance genes in the collection of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding lines”. str. Book of abstracts: 21.

wykład: XX Konferencja Krajowa pt.: „Grzyby mikroskopowe i ich metabolity”, 21–22.05.2014, Poznań: 22. Majka M., Kwiatek M., Gawłowska M., Korbas M., Danielewicz J., Wiśniewska H., (2014). Tytuł: Identyfikacja obecności genu *Pch1* warunkującego odporność na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Pseudocercospora herpotrichoides* (*Oculimacula yallundae* i *O. acuformis*) w wybranych liniach pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.),

poster: BIOENG'14, Bioengineering Conference, Istanbul, Turkey, 27–29 listopada 2014. Kwiatek M., Wiśniewska H., Majka M., Gawłowska M., Belter J., Korbas M., Danielewicz J. (2014). Characterization of alien introgression from *Aegilops ventricosa* with *Pch1* eyespot resistance gene in wheat (*Triticum aestivum* L.).

Literatura

Burt C., Hollins T.W., Nicholas P. (2014). Identification of a QTL conferring seedling and adult plant resistance to eyespot on chromosome 5A of Cappelle Desprez. Theor Appl Genet 122:119–128.

Chapman N., Burt C., Dong H., Nicholson P. (2008). The development of PCR-based markers for the selection of eyespot resistance genes *Pch1* and *Pch2*. Theor Appl Genet 117:425–433

Fitt B.D.L., Goulds A., Polley R.W. (1988). Eyespot (*Pseudocercospora herpotrichoides*) Epidemiology in relation to prediction of disease severity and yield loss in winter wheat – a Review. Plant Pathology 37:311–328.

Maia N. (1967). Obtention de blés tendres résistants au piétin-verse (*Cercospora herpotrichoides*) par croisements interspécifiques blés x *Aegilops*. Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France 53:149–155.

Badania nad wpływem translokacji 1B/1R na efektywność uzyskiwania linii DH pszenicy oraz ich wartość technologiczną

Studies on the effect of 1B/1R translocations on the efficiency of obtaining wheat DH lines and their technological value

Tadeusz Adamski✉, Maria Surma, Zygmunt Kaczmarek, Anetta Kuczyńska, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogrodowicz, Elżbieta Adamska, Karolina Krystkowiak, Renata Trzeciak, Alina Anioła, Renata Holewińska

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60–479 Poznań
✉ e-mail: Tada@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: interakcja genotypowo-środowiskowa, linie homozygotyczne, pszenica ozima, translokacje 1B/1R

W większości firm hodowlanych wykorzystywane są metody otrzymywania form haploidalnych pszenicy, pozwalające na skrócenie cyklu hodowlanego. Jedną ze stosowanych technik polega na krzyżowaniu pszenicy z kukurydzą. W literaturze brak jest doniesień o wpływie translokacji na efektywność otrzymywania linii DH z wykorzystaniem tej techniki. Nie został również w pełni wyjaśniony wpływ translokacji pszenno-żytnich na segregację alleli w populacjach linii DH. Celem projektu było (1) stwierdzenie czy obecne w niektórych materiałach hodowlanych pszenicy ozimej translokacje 1B/1R mogą wywierać wpływ na efektywność uzyskiwania form haploidalnych pszenicy na drodze krzyżowania z kukurydzą (2) zbadanie poprawności zachodzenia segregacji cech (alleli) w populacjach linii DH i SSD pszenicy wyprowadzanych z mieszańców F1 zróżnicowanych pod względem obecności translokacji, (3) określenie wpływu translokacji 1B/1R na zmienność i stabilność cech agronomicznych i technologicznych linii DH i SSD pszenicy ozimej. W pracy przedstawiono wyniki z badań prowadzonych w latach 2014–2020.

Wszystkie Tematy w zadaniu nr 3 zostały zrealizowane.

Material i Metody

Materiał do badań stanowiły mieszańce pokolenia F1 pszenicy uzyskane ze skrzyżowania form rodzicielskich w układzie: (1) forma translokowana

× forma translokowana (Palma* x KV 40017*, Brilliant* x Palma*), (2) forma translokowana × forma bez translokacji (STH007A × Brilliant*, Brilliant* × STH007A, Brilliant* × Fidelius, Fidelius × Brilliant*, Palma* x Fidelius, Fidelius x Palma*, Palma* x STH007A, STH007A x Palma*), (3) forma bez translokacji × forma bez translokacji (STH007A x Fidelius, Fidelius x Astoria). Formy rodzicielskie zawierające translokacje oznaczono gwiazdką. Zdolność do krzyżowania pszenicy z kukurydzą, mierzono liczbą rozrośniętych złażni, częstością wykształcania zarodków i ich zdolnością do rozwoju w kulturze *in vitro*. Zapylenie pszenicy pyłkiem kukurydzy oraz kulturę *in vitro* zarodków prowadzono zgodnie z instrukcją „Metody biotechnologiczne w hodowli pszenicy” IGR PAN, 2016. Weryfikację uzyskanych wyników przeprowadzono na mieszańcach F1 pochodzących z firm hodowlanych.

Prawidłowość segregacji alleli w badanych loci określono poprzez porównanie oczekiwanych i obserwowanych liczebności linii z poszczególnymi allelami za pomocą testu chi-kwadrat.

Doświadczenia polowe założono w 2018 i 2019 roku. W skład każdej z sześciu badanych populacji wchodziła ta sama liczba linii DH i SSD (120) zawierających translokacje 1B/1R jak i bez translokacji. Doświadczenia założono w czterech lokalizacjach. Linie oceniono pod względem plonu, wysokości roślin oraz masy 1000 ziaren. Parametry technologiczne ziarna



pszenicy: zawartość białka (%) s.m., glutenu (%), wskaźnik sedymentacji Zeleny'ego (cm³) oznaczono za pomocą spektrofotometru. Dla 60 linii DH lub SSD przeprowadzono szczegółowe analizy reologiczne. W celu określenia siły oraz wytrzymałości ciasta na rozciąganie próby poddawano analizom na analizatorze tekstury z przystawką Kieffer'a (TA.XT, plus Texture Analyser Dough & Gluten Extensibility Rig). Do przeprowadzenia symulacji zachowania się ciasta w czasie miesienia zastosowano 10-g miksograf. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie. Analizy molekularne linii DH i SSD wykonano z wykorzystaniem znanych z literatury markerów mikrosatelitarnych

Wyniki

Wpływ translokacji pszenno-żytnich na efektywność uzyskiwania form haploidalnych na drodze krzyżowania z kukurydzą

Porównano zdolność do krzyżowania pszenicy kukurydzą między subpopulacjami linii DH zawierających translokacje z subpopulacjami z liniami DH nietranslokowanymi, wyprowadzonymi z tej samej kombinacji krzyżówkowej (a więc o zbliżonym tle genetycznym). Linie DH wyprowadzono z mieszańców F1 pięciu kombinacji krzyżówkowych pszenicy. Po zapyleniu pszenicy kukurydzą otrzymano od 9,68 do 15,13 zarodków/100 kwiatków. Procent uzyskanych załąźni w stosunku do zapylnych kwiatków wynosił od 75,89 do 86,3%, natomiast zarodków/100 załąźni od 11,83 do 17,47%. Dwie subpopulacje z liniami translokowanymi odznaczały się wyższą zdolnością do uzyskiwania rozrośniętych załąźni i zarodków w porównaniu do subpopulacji nietranslokowanych. Wartości kontrastów dla liczby zarodków/100 rozrośniętych załąźni i liczby zarodków/100 zapylnych kwiatków wynosiły odpowiednio -1,85 i -1,95 oraz -1,29 i -1,20 na korzyść form translokowanych. Wykazano, że w wybranych kombinacjach krzyżówkowych translokacje 1B/1R mogą wpływać dodatnio na zwiększenie efektywności uzyskiwania form haploidalnych pszenicy. Badano wpływ efektów matecznych na efektywność otrzymywania form haploidalnych pszenicy. Analizowano mieszańce pokolenia F1 uzyskane w wyniku skrzyżowania form różnicowanych pod względem obecności translokacji. Dokonano podziału mieszańców na grupy jednorodne pod względem liczby rozrośniętych załąźni oraz zarodków ze 100 zapylnych kukurydzą kwiatków. W grupie o najwyższych wartościach badanych cech znalazły się wszystkie populacje z translokacją 1B/1R. Nie stwierdzono istotnego wpływu efektów matecznych

na efektywność uzyskiwania haploidów pszenicy.

Segregacja alleli w populacjach linii DH i SSD pszenicy wyprowadzanych z mieszańców F1 różnicowanych pod względem obecności translokacji

Wykazano poprawność zachodzenia segregacji markerów molekularnych i białkowych w populacjach linii DH i SSD pszenicy wyprowadzonych z mieszańców F1 różnicowanych pod względem obecności translokacji 1B/1R. Częstość segregujących alleli w loci Glu-A1, Glu-B1 i Glu-D1 oraz większości markerów molekularnych odpowiadała we wszystkich populacjach oczekiwanemu stosunkowi 1:1, na co wskazywały nieistotne wartości statystyki chi-kwadrat zastosowanej dla testowania różnic między oczekiwaną a obserwowaną liczbą linii zawierających odpowiedni allel.

W populacjach DH otrzymanych z mieszańców F1 stosunek liczby linii z translokacją do liczby linii bez translokacji był zgodny z oczekiwanym stosunkiem 1:1, natomiast w populacji RIL liczba linii bez translokacji okazała się istotnie większa od linii z translokacją – wartość testu chi-kwadrat była wysoce istotna ($P < 0,01$). Można przypuszczać, że formy translokowane w liniach RIL są w kolejnych pokoleniach eliminowane. Badane linie RIL reprezentują zmienność wynikającą z 6 rund rekombinacji, natomiast zmienność linii DH wyprowadzonych z mieszańców F1 wynika tylko z jednej rundy rekombinacji zachodzącej podczas gametogenezy w roślinach F1. Większa liczba rund zwiększa prawdopodobieństwo przerwania sprzężeń genów w wyniku zachodzącego kilkakrotnie crossing-over. Nie można więc wykluczyć, że w kolejnych pokoleniach dochodzi do rekombinacji we fragmencie chromosomu zawierającego translokację skutkującą brakiem sekalin w ziarnie, jak również brakiem możliwości identyfikacji obecności translokacji markerem Scm9.

Kierunek krzyżowania form translokowanych z nietranslokowanymi przy otrzymywaniu pokolenia F1 nie wpływał na segregację wybranych markerów molekularnych i białkowych w populacjach linii DH wyprowadzonych z tych mieszańców.

Określenie wpływu translokacji 1B/1R na zmienność i stabilność cech agronomicznych i technologicznych linii DH i SSD pszenicy ozimej

Badania prowadzono w latach 2018/2019 i 2019/2020. Porównano pod względem średnich wartości cech translokowane linie DH z ich nietranslokowanymi odpowiednikami. W obu latach badań wystąpiły populacje, w których linie

DH nietranslokowane pod względem średnich dla plonu z rośliny istotnie przewyższały odpowiadające im grupy form translokowanych (np. TB2 i TB3 w doświadczeniu 2019/2020). W pozostałych przypadkach różnice te były nieistotne. Linie DH pod względem średnich wartości cech nie odbiegały istotnie pod względem wysokości roślin jak i masy 1000 ziaren od form translokowanych. Istotny wpływ translokacji na wartości tych cech odnotowano w przypadku linii SSD. W populacjach TB2 i TB3 translokowane linie SSD w porównaniu do nietranslokowanych odznaczały się niższą masą 1000 ziaren. Wpływ translokacji w liniach SSD na wysokość roślin odnotowano we wszystkich trzech badanych populacjach. Podobne zależności miały miejsce między badanymi grupami form w doświadczeniu założonym w 2018 roku. Nie stwierdzono wpływu translokacji na stabilność linii DH pod względem cech agronomicznych.

Nie stwierdzono wpływu translokacji na stabilność badanych form pod względem cech technologicznych. Obecność translokacji żytniej u większości badanych linii DH i SSD wpływała na osłabienie całego procesu miesienia ciasta oraz pogarszała proces absorpcji wody, rozwoju oraz wyrobienia końcowego ciasta. Wykonano analizę tekstury ciasta, określając opór jakie stawia ciasto na rozciąganie, rozciągliwość ciasta, a także wytrzymałość ciasta na zrywanie. Uzyskane wyniki wskazują, że nie zawsze translokacja żytnia wpływa negatywnie na właściwości ciasta. Dla przykładu, formy posiadające translokację żytnią w kombinacji SMTB1 charakteryzowały się większą wytrzymałością ciasta na zrywanie i niewiele większym oporem w porównaniu do form bez translokacji żytniej. Obecność translokacji żytniej w wybranych genotypach może wpływać korzystnie na wytworzenie wystarczająco silnej struktury ciasta do zapewnienia korzystnego miesienia równomiernego i stabilnego rozkładu pęcherzy powietrza podczas fermentacji i relaksacji ciasta.

Osiągnięcia projektu

Osiągnięcia projektu przedstawiono w formie wniosków wypływających z realizacji badań w latach 2014–2020.

Wykazano, że obecność translokacji pszenno-żytnich w materiałach przeznaczonych do wyprowadzenia form haploidalnych na drodze krzyżowania z kukurydzą nie wpływa na obniżenie efektywności tej techniki.

Segregacja markerów molekularnych i białkowych w populacjach linii DH i SSD pszenicy wyprowadzonych z mieszańców F1 zróżnicowanych pod

względem obecności translokacji pszenno-żytniej przebiega prawidłowo i odpowiada oczekiwanemu stosunkowi 1:1.

Nie odnotowano wpływu kierunku krzyżowania form translokowanych z nietranslokowanymi przy otrzymywaniu pokolenia F1 (efektów macecznych) na segregację wybranych markerów molekularnych i białkowych w populacjach linii DH wyprowadzonych z tych mieszańców.

W części populacji rekombinacyjnych linii wsobnych pszenicy wytworzonych poprzez samozapylenie z mieszańców heterozygotycznych pod względem translokacji, przeważały linie zawierające translokację 1B/1R. Liczba linii bez translokacji okazała się istotnie większa od linii z translokacją. Nie można więc wykluczyć, że formy translokowane są w kolejnych pokoleniach eliminowane.

Wykazano, że stabilność translokowanych i nietranslokowanych linii DH i SSD pszenicy jest zbliżona.

Wybrane linie DH i SSD z translokacją żytnią mogą cechować się dobrą wytrzymałością ciasta na zrywanie i niewiele większym oporem ciasta w porównaniu do form bez translokacji żytniej.

Translokacje 1B/1R w określonych populacjach linii DH pszenicy pozwalają na wytworzenie wystarczająco silnej struktury ciasta do zapewnienia równomiernego miesienia i stabilnego rozkładu pęcherzy powietrza podczas fermentacji i relaksacji ciasta.

Wyprowadzono 1807 linii DH i 1849 linii SSD pszenicy. Formy te przekazano zainteresowanym firmom hodowlanym.

Uzyskane wyniki z badań mogą być pomocne w opracowywaniu strategii hodowli pszenicy w firmach hodowlanych.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Adamski T, Surma M, Krystkowiak K, Kuczyńska A, Mikołajczak K, Ogrodowicz P, Kaczmarek Z, Adamska E, Trzeciak R (2015) „Efektywność uzyskiwania form haploidalnych pszenicy z mieszańców F1 zróżnicowanych pod względem występowania translokacji 1B/1R” XII Ogólnopolska Konferencja „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych” Zakopane, 2–5 lutego 2015. Streszczenia referatów str. 16.

Adamski T, Surma M, Krystkowiak K, Kuczyńska A, Mikołajczak K, Ogrodowicz P, Kaczmarek Z, Adamska E, Trzeciak R (2016) „1BL/1RS translocation effects on efficiency of wheats DH lines production” 20th Eucarpia General Congress, Plant Breeding: the Art of Breeding Science to Life, Zurych, Szwajcaria, 29 sierpnia – 1 wrze-

- śnia 2016. Book of abstracts 179.
- Adamski T, Surma M, Krystkowiak K, Kuczyńska A, Mikołajczak K, Ogrodowicz P, Kaczmarek Z, Adamska E, Trzeciak R. (2017) Wpływ translokacji pszenno-żytnich na efektywność otrzymywania haploidów pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.) poprzez krzyżowanie z kukurydzą” XI Międzynarodowe Sympozjum „Genetyka Ilościowa Roślin Uprawnych”, Świeradów Zdrój, 7–9 czerwca 2017, Streszczenia referatów.
- Kaczmarek Z, Adamski T, Surma M, Mejza S, Kuczyńska A, Ogrodowicz P, Mikołajczak K (2018). Comparison of the efficiency of obtaining double haploid lines of wheat with and without rice translocation” 15th Applied Statistics International Conference, 23–26 September 2018, Ribno, Slovenia, Abstracts and program, p. 53.
- Kaczmarek Z, Adamski T, Surma M, Mejza S, Kuczyńska A, Ogrodowicz P, Mikołajczak K. (2019). Evaluation of the impact of wheat/rye translocation on the stability of wheat doubled haploids in different environments” The European Conference on Crop Diversification, 18–21 September 2019, Budapest, Abstracts.
- Sprawozdania z realizacji zadań projektu – Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 2018, 2019.

Mapowanie asocjacyjne genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*) i septoriozę paskowaną liści (*Septoria tritici*) w pszenicy

Association mapping of resistance genes for leaf rust (*Puccinia triticina*) and septoria tritici blotch (*Septoria tritici*) in wheat

Paweł Czembor^{✉1}, Urszula Piechota¹, Dominika Piaskowska¹,
Magdalena Radecka-Janusik¹, Piotr Słowacki¹, Grzegorz Czajowski¹,
Dariusz Mańkowski²

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

¹Zakład Genetyki i Hodowli Roślin

²Zakład Nasiennictwa i Nasionoznawstwa

✉ e-mail: p.czembor@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: markery molekularne, odporność, pszenica, rdza brunatna, septorioza paskowana

Hodowla odpornościowa jest szeroko propagowaną metodą w ograniczaniu strat plonu w pszenicy powodowanych przez rdzę brunatną, której sprawcą jest *Puccinia triticina* (*Pt*) i septoriozę paskowaną liści (ang. *Septoria tritici* blotch, STB) powodowaną przez grzyba *Septoria tritici* (syn. *Zymoseptoria tritici*, *St*). W celu lepszego wykorzystania genów odporności w programach hodowlanych, konieczna jest znajomość ich występowania w obecnie uprawianych odmianach europejskich. Celem badań była próba określenia występowania genów odporności na septoriozę paskowaną i rdzę brunatną w europejskich odmianach pszenicy. Typowanie genów odporności było wsparte przez wykorzystanie markerów molekularnych zarówno blisko sprzężonych ze znanymi genami odporności, jak i umożliwiających profilowanie całego genomu na potrzeby mapowania asocjacyjnego.

Materiały i metody. W badaniach wykorzystano zestawy odmian i linii pszenicy: 38 linii blisko-izogenicznych odm. Thatcher o znanych genach odporności *Lr* na rdzę brunatną (*TcNILs*) (Mesterhazy i in., 2000), 25 odmian i linii zawierających opisane w literaturze geny odporności *Stb* na septoriozę paskowaną (Brown i in., 2015), 150 odmian pszenicy ozimej do badań nad odpornością na rdzę brunatną i 192 odmiany pszenicy ozimej do badań nad odpornością na septoriozę paskowaną. Odmiany pszenicy ozimej pochodziły głównie z Polski, Niemiec i Francji. W badaniach nad obydwojoma patogenami zestawy odmian

pszenicy ozimej częściowo się pokrywały.

Odporność odmian i linii na rdzę brunatną badano w stadium siewki w warunkach kontrolowanych (światła i temperatury) komory klimatycznej analizując reakcję roślin na zakażenie 18-toma pojedynczymi izolatami *P. triticina* z własnej kolekcji, które reprezentowały różne rasy. Siewki oceniano wg skali 0–4, gdzie typ infekcji 0–2 wskazywał na odporność, a typ infekcji 3–4 wrażliwość (Roelfs i in., 1992). Natomiast odporność odmian i linii na septoriozę paskowaną badano w stadium rośliny dorosłej (dwa powtórzenia losowanych bloków) w pięcioletnich doświadczeniach tunelowych (wspomaganych systemem zraszania wodą), w których każdego roku testowano jeden z izolatów *St* reprezentujących zróżnicowane spektrum zdolności chorobotwórczych (Czembor i in., 2011). Rośliny z rozwiniętym w pełni liściem flagowym zakażano zawiesiną zarodników danego izolatu (IPO323, IPO86036, IPO92006, St1_03 i IPO88004), które po okresie inkubacji oceniano pod względem procentu powierzchni liścia pokrytego nekrozą (NEC) oraz piknidiami (PYC). Precyzyjne określenie parametrów chorobowych wykonane zostało przy użyciu komputerowej analizy obrazu porażonych liści (WinCam 2010, Regent Instruments Inc., Kanada; Radecka-Janusik i Czembor, 2014).

Na potrzeby analiz molekularnych wyizolowano DNA z roślin każdego badanego obiektu w doświadczeniach fitopatologicznych, które



zostało wykorzystane do wysokoprzepustowego genotypowania (głównie markerów typu SNP, ang. Single Nucleotide Polymorphism) metodą sekwencjonowania następnej generacji (ang. Next Generation Sequencing, NGS) na platformie DArTseq (Diversity Arrays Technologies, Australia). Dodatkowo analizowano występowanie specyficznych markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności: *Lr1*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr21*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr34*, *Lr35*, *Lr26*, *Lr37*, *Lr39*, *Lr47*, *Lr51* i *Lr52*.

Dane genotypowe dla odmian i linii pszenicy wygenerowane na platformie DArTseq oraz dane fenotypowe (ocena odporności na choroby) posłużyły do identyfikowania sprzężenia marker-cecha (ang. marker-trait association, MTA) metodą mapowania asocjacyjnego (MA), w którym miarą związku między fenotypem i genotypem jest odchylenie od równowagi sprzężeń (ang. Linkage Disequilibrium, LD), tzn. występowanie nielosowego związku (asocjacji) między allelami w różnych loci na tym samym chromosomie (Mackay i Powell, 2007). Analizę związku między wartością opisującą nierównowagę sprzężeń (LD) i gęstości markerów na mapie genetycznej wykonano przy użyciu uogólnionego modelu liniowego i wyrażono współczynnikiem r^2 (oprogramowanie GenStat wer. 18, VSN International, W. Brytania). Wartość istotną dla r^2 , powyżej której uznawano dwa markery jako losowo zasocjowane, przyjęto 0,2 (Soto-Cerda i Cloutier, 2012). W poszukiwaniu istotnych statystycznie MTA uwzględniono pokrewieństwo genetyczne obiektów poprzez podzielenie badanej grupy genotypów na podgrupy (oprogramowanie STRUCTURE wer. 2.3.4) (Pritchard i in., 2000a, b). Zmiany wiarygodności liczby grup oceniano z wykorzystaniem współczynnika Δk (oprogramowanie Structure Harvester) (Evanno i in., 2005; Earl i VonHoldt, 2012). Mapowanie asocjacyjne (oprogramowanie GenStat wer. 18) wykonano w oparciu o model mieszany analizy wariancji, a estymacje komponentów wariancyjnych dla czynników losowych identyfikujących markery i genotypy oparto o metodę mieszane-go modelu liniowego (ang. Mixed Linear Model, MLM) z uwzględnieniem informacji o strukturze populacji, przyjmując następujące parametry analizy: poziom istotności badania asocjacji na skalę genomu (ang. Genome-Wide Association Studies, GWAS) $-\log_{10}(p) \geq 3$; szybka metoda dopasowania modeli asocjacji marker-cecha; częstość występowania rzadkich alleli $< 0,05$.

Wyniki i wnioski. Analiza reakcji na zakażenie 18 izolatami *Pt* odmian i linii pszenicy

pozwoiliła na zidentyfikowanie obiektów odpornych na wszystkie badane izolaty: Capone, Carroll, Desamo, Lear, Lithium, Memory, Tentation, Waxy i Xantippe oraz linie blisko-izogeniczne odm. Thatcher z genami *Lr9* i *Lr19*.

W wyniku przeprowadzonej analizy GWAS wykryto 354 istotne asocjacje między markerem i cechą odporności zestawu 179 odmian/linii pszenicy testowanych przez 18 izolatów *P. triticina*. Przy pomocy specyficznych markerów zidentyfikowano 9 genów odporności w odmianach pszenicy ozimej. Łącznie, przeprowadzone analizy umożliwiły wykrycie (postulowanie) wśród badanych odmian następujących genów odporności (liczba odmian z danym genem *Lr*): *Lr3bg* (20), *Lr20* (1), *Lr24* (10), *Lr26* (22), *Lr28* (21), *Lr34* (1), *Lr37* (56), *Lr39* (13) i *Lr51* (1). Natomiast, mimo potwierdzonej specyficzności markerów molekularnych, w żadnej z badanych odmian nie wykryto genów *Lr19*, *Lr35* i *Lr47*.

W pojedynczych odmianach zidentyfikowano geny *Lr20*, *Lr51* i *Lr34*, które nie mają obecnie większego znaczenia w odmianach europejskich. Spośród nich, poza Europą bardziej rozpowszechniony jest gen *Lr34*, który jest genem warunkującym odporność pleiotropową rośliny dorosłej (ang. Pleiotropic Adult Plant Resistance, PAPR) na kilka patogenów jednocześnie: rdzę brunatną, rdzę żółtą, rdzę żdźbłową i mącznika (*Lr34-Yr18-Pm38-Sr57*). Jednocześnie należy do grupy genów odporności dla roślin dorosłych (ang. Adult Plant Resistance, APR), które wymagają wysokiej temperatury środowiska dla pełnej ekspresji (ang. High Temperature Adult Plant Resistance, HTAP) (Chen, 2013). Wśród badanych odmian tylko Baletka wykazywała obecność wspomnianego genu. Być może trudność w selekcji odporności częściowej i konieczność wyższej temperatury środowiska dla jego efektywnego funkcjonowania spowodowały, że w warunkach naszego klimatu gen ten w europejskich programach hodowlanych został wyeliminowany.

Kolejnym genem o charakterze pleiotropowym jest *Sr31-Yr9-Lr26-Pm17* pochodzący z szeroko rozpowszechnionej translokacji 1BL.1RS, która została wyprowadzona z odmiany żyta Petkus (Friebe i in., 1996). Translokacja ta jest dość powszechna w odmianach pszenicy (w tym w Europie) dzięki efektywnej odporności na patogeny oraz zwiększaniu plonu ziarna. Do jej szerokiego wykorzystania na świecie przyczyniły się odmiany Kavkaz i Aurora (Rabinovich, 1998; Graybosch, 2001). Podobnie, często występującym genem odporności w odmianach europejskich jest *Lr3bg* (Chełkowski i Stępień,

2001; Wiśniewska i in., 2003).

Gen *Lr37* był najczęściej identyfikowanym genem warunkowania odporności wśród badanych odmian pszenicy ozimej, a swoją popularność zawdzięcza głównie z powodu odporności na rdzę żółtą, która niestety uległa przełamaniu w połowie lat 90-tych XX wieku (Bayles i in., 2000). Należy on do kompleksu genów *Lr37-Yr17-Sr38*, znajdującego się w translokacji 2NS-2AS pochodzącej z *Triticum ventricosum* przeniesionej do linii pszenicy VPM1 (McIntosh i in., 1995).

Gen odporności *Lr24* pochodzi z *Thinopyrum ponticum* (McIntosh i in. 1976) i pozostaje umiarkowanym źródłem odporności na rdzę brunatną. W kombinacji z innymi genami odporności wciąż jest wykorzystywany w programach hodowlanych pszenicy (Schachermayr i in., 1995; Kolmer i in., 2007). Gen odporności *Lr28* pochodzi z *Aegilops speltoides* i został wprowadzony do pszenicy do chromosomu 4A z translokacją T4AS.4AL-7S#2S (Friebe i in., 1996). Nadal występuje w wielu odmianach australijskich, południowo-amerykańskich i europejskich (McIntosh i in., 1995). Gen odporności *Lr39* został przeniesiony do pszenicy z *Ae. tauschii* (Cox i in., 1994) i bardziej rozpowszechniony wśród materiałów pochodzących z Ameryki Północnej (Liu i in., 2015).

W przypadku analizy łącznej oceny reakcji na zakażenie izolatami *St* nie stwierdzono występowania genotypów które nie byłyby porażone przez STB (parametry chorobowe NEC i PYC). Wytypowano 10 najbardziej odpornych obiektów: TE9111, Intro, Lear, Tabasco, Capone, Julius, Desamo, Solitar, Mandub i M3 synthetic (W-7976).

W wyniku zastosowania metody LMM przy uwzględnieniu struktury populacji wykryto 690 istotnych ($-\log_{10}(p) \geq 7,3$) asocjacji marker-cecha (MTA), odnoszących się do parametrów chorobowych (NEC i PYC) ocenianych na odmianach i liniach pszenicy po zakażeniu pojedynczymi izolatami *S. tritici*. Wśród wykrytych MTA tylko 20 wyjaśniało zmienność związaną z badanymi parametrami chorobowymi (NEC i PYC) od 3% do 8,8% i było skupionych w sześciu lokalizacjach na chromosomach 2B, 2D, 6A, 7A i 7D (tab. 1). Poligeniczny charakter odporności na STB również został wykryty w innych pracach wykorzystujących mapowanie asocjacyjne do identyfikacji loci odporności (Kollers i in., 2013; Vagndorf i in., 2017; Muqaddasi i in., 2019; Yates i in., 2019). Wśród sześciu zidentyfikowanych QTL-i, jedynie *QStb.ihar-2B.2*, zlokalizowany na chromosomie 2B, może być tożsamy z genem głównym *Stb9* (Chartrain i in., 2009). Dla pozostałych pięciu QTL-i nie

stwierdzono zbieżności lokalizacji z opisanymi w literaturze genami głównymi *Stb* (Brown i in., 2015).

Znamienne dla badań nad odpornością na STB, co również stwierdzono w badaniach własnych, jest wykrywanie MTA, w których marker molekularny wyjaśnia na odporność (efekt) w zakresie nie przekraczającym kilkanaście procent: 0,28%–15,72% (Muqaddasi i in., 2019), 1,9%–10,6% (Yates i in., 2019), 7%–9% (Vagndorf i in., 2017). Co więcej, wyróżnione w badaniach własnych sześć QTL-i, przy założeniu o ich addytywnym współdziałaniu, nie kontrolują więcej niż 20,6% i 28,8%, odpowiednio, dla parametru chorobowego NEC i PYC. Podobnie w pracy Vagndorf i in. (2017), najefektywniejsza kombinacja trzech QTL-i wyjaśniała zmienność związaną z odpornością łącznie na poziomie 18%. Natomiast precyzja (zakres wyjaśnianej zmienności) modelu przewidującego poziom infekcji STB osiągnęła wartość ok. 43% (Muqaddasi i in., 2019).

W celu podniesienia poziomu odporności na STB w pszenicy, zaleca się jednocześnie wprowadzanie do genotypu alleli markerów molekularnych sprzężonych z obniżoną wartością NEC i PYC, niż wprowadzanie ich osobno (Yates i in. 2019). Zidentyfikowane w temacie badawczym loci odporności na STB mogą być wykorzystywane do budowania trwałej odporności przez kumulację w jednym genotypie pozytywnych alleli, przy jednoczesnej eliminacji alleli sprzyjających występowaniu objawów chorobowych.

Do osiągnięć realizacji tematu badawczego można zaliczyć:

- identyfikację efektywnych genów odporności pszenicy na rdzę brunatną, które można wykorzystać w programach hodowli odpornościowej;
- określenie występowania wybranych genów odporności na rdzę brunatną wśród odmian europejskich;
- określenie uwarunkowania odporności na septoriozę paskowaną liści (STB) w europejskich odmianach pszenicy;
- wskazanie strategii dla podniesienia poziomu odporności na STB przy zastosowaniu zidentyfikowanych loci odporności.

Wykaz publikacji wyników Doniesienia konferencyjne i inne nierecenzowane

Paweł Czembor, Piotr Słowacki, Magdalena Radeczka-Janusik. 2015. Występowanie wybranych genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*) w euro-

- pejskich odmianach pszenicy ozimej. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, pt. „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roslin Uprawnych”, streszczenia referatów i plakatów, Zakopane, 2–6 lutego 2015, str. 299–300.
- Paweł Czembor, Piotr Słowacki, Grzegorz Czajowski. 2015. Reakcja europejskich odmian pszenicy ozimej na zakażenie izolatami *Puccinia triticina* – sprawcy rdzy brunatnej pszenicy. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, pt. „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roslin Uprawnych”, streszczenia referatów i plakatów, Zakopane, 2–6 lutego 2015, str. 297–298.
- Czembor P. Cz., Radecka-Janusik M., Słowacki P. 2016. Detection of leaf rust resistance genes *Lr24*, *Lr25*, *Lr28*, *Lr34* and *Lr35* in winter wheat cultivars. The 20th EUCARPIA General Congress, 29.08–01.09. 2016, Zurich, Switzerland. Book of abstracts p.163.
- Radecka-Janusik M., Czembor P. Cz., Słowacki P. 2016. Reaction of European winter wheat cultivars to six isolates of *Puccinia triticina*. The 20th EUCARPIA General Congress, 29.08–01.09. 2016, Zurich, Switzerland. Book of abstracts. p.184.
- Radecka-Janusik Magdalena, Piotr Słowacki, Paweł Czembor. Cz. 2017. Występowanie genów odporności na rdzę brunatną *Lr26*, *Lr37*, *Lr39*, *Lr47*, *Lr51* i *Lr52* w europejskich odmianach pszenicy ozimej (*Triticum aestivum* L.). XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, pt. „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roslin Uprawnych”, streszczenia referatów i plakatów, Zakopane, 30.01–03.02.2017, str. 136.
- Czembor Paweł Cz., Magdalena Radecka-Janusik. 2017. Reakcja europejskich odmian pszenicy ozimej na zakażenie sześcioma izolatami *Puccinia triticina*. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, pt. „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roslin Uprawnych”, streszczenia referatów i plakatów, Zakopane, 30.01–03.02.2017, str. 192.
- Czembor P. Cz., Radecka-Janusik M. 2017. Resistance of European winter wheat cultivars to *Zymoseptoria tritici* isolate IPO88004. Proceedings of the 13th International Wheat Genetics Symposium, Tulln, Austria, 23.04–28.04.2017, p. 281.
- Czembor P. Cz., Radecka-Janusik M., Mańkowski D. 2018. Genome wide association study of seedling leaf rust resistance in European winter wheat cultivars. EUCARPIA cereal section: Breeding cereals for sustainable agriculture. Francja, Clermont-Ferrand 18.03 – 22.03.2018. Book of Abstracts, poster 43, p. 96.
- Czembor P. Cz., Radecka-Janusik M., Słowacki P. 2018. Resistance of European winter wheat cultivars to *Zymoseptoria tritici* isolate IPO92006. EUCARPIA cereal section: Breeding cereals for sustainable agriculture. Francja, Clermont-Ferrand 18.03 – 22.03.2018. Book of Abstracts, poster 44, p. 97.
- Czembor P. Cz., Radecka-Janusik M., Czajowski G. 2019. Postulowanie genów odporności na rdzę liściową (*Puccinia triticina*) wśród europejskich odmian pszenicy ozimej. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane 5–8 luty 2019. Biuletyn IHAR, 285: 291–292.
- Czembor P. Cz., Radecka-Janusik M. 2019. Pokrewieństwo genetyczne europejskich odmian pszenicy ozimej. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane 5–8 luty 2019. Biuletyn IHAR, 285: 291–292.
- Czembor P., Piaskowska D. 2019. Resistance of European winter wheat cultivars to *Zymoseptoria tritici* isolate IPO86036. Abstract, “5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding”, Węgry, Budapeszt, 4–7.11.2019.
- Czembor P. Cz., Mańkowski D., Słowacki P., Piaskowska D. 2019. Mapowanie asocjacyjne genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*) i septoriozę paskowaną liści (*Septoria tritici*) w pszenicy. Biuletyn IHAR 286: 3–7.

Literatura

- Bayles R. A., Flath, K., Hovmöller M. S., de Vallavieille-Pope C. (2000). Breakdown of the *Yr17* resistance to yellow rust of wheat in northern Europe. *Agronomie*, 20: 805–811
- Brown J. K. M., Chartrain L., Lasserre-Zuber P., Sainenac C. (2015). Genetics of resistance to *Zymoseptoria tritici* and applications to wheat breeding. *Fungal Genetics and Biology*, 79:33–41.
- Chartrain L., Sourdille P., Bernard M., Brown J. K. M. (2009). Identification and location of *Stb9*, a gene for resistance to septoria tritici blotch in wheat cultivars Courtot and Tonic. *Plant Pathology*, 58: 547–555.
- Chelkowski J., Stępień Ł. (2001). Molecular markers for leaf rust resistance genes in wheat. *Journal of Applied Genetics*, 42: 117–126.
- Chen X. (2013). Review article: High-Temperature Adult-Plant Resistance, Key for sustainable control of stripe rust. *American Journal of Plant Sciences*, 4: 608–627.
- Cox T. S., Raupp W. J., Gill B. S. (1994). Leaf rust-resistance genes *Lr41*, *Lr42* and *Lr43* transferred from *Triticum tauschii* to common wheat. *Crop Science*, 28: 339–343.
- Czembor P. Cz., Radecka-Janusik M., Mańkowski D. (2011). Virulence spectrum of *Mycosphaerella graminicola* isolates on wheat genotypes carrying known resistance genes to septoria tritici blotch. *Journal of Phytopathology*, 159: 146–154.
- Diversity Arrays Technologies. Strona internetowa: <http://www.diversityarrays.com>.
- Earl D. A., VonHoldt B, M. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conserv. Genet. Resour.*, 4: 359–361.
- Evanno G., Regnaut S., Goudet J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: a simulation study. *Mol. Ecol.*, 14: 2611–2620.
- Friebe B., Jiang J., Raupp W. J., McIntosh R. A., Gill B. S. (1996). Characterization of wheat-alien translocations

- conferring resistance to diseases and pests: current status. *Euphytica*, 91: 59–87.
- Genstat wetsja 18. VSN International, 2 Amberside, Wood Lane, Hemel Hempstead, Hertfordshire HP2 4TP, UK, <http://www.genstat.co.uk>.
- Graybosch R. A. (2001). Uneasy unions: quality effects of rye chromatin transfers to wheat. *Journal of Cereal Science*, 33: 3–16.
- Kollers S., Rodemann B., Ling J., Korzun V., Ebmeyer E., i in. (2013). Genetic architecture of resistance to Septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in European winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 32: 411–423.
- Kolmer J. A., Jin Y., Long D. L. (2007). Wheat leaf and stem rust in the United States. *Australian Journal of Agricultural Research*, 58: 631–638.
- Kolmer J. A., Liu J. Q. (2000). Virulence and molecular polymorphism in international collections of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina*. *Phytopathology*, 90: 427–436.
- Liu S., Rudd J. C., Bai G., Haley S. D., Ibrahim A. M. H., Xue Q., Hays D. B., Graybosch R. A., Devkota R. N., Amand P. S. (2015). Molecular markers linked to important genes in hard winter wheat. *Crop Science*, 54: 1304–1321.
- Mackay I., Powell W. (2007). Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends in Plant Science*. 12: 57–63.
- McIntosh R. A., Wellings C. R., Park R. F. (1995). Wheat rusts: An atlas of resistance genes, Melbourne, CSIRO, (1995), s. 208.
- McIntosh R. A., Dyck P. L., Green G. J. (1976). Inheritance of leaf rust and stem rust resistance in wheat cultivars Agent and Agatha. *Australian Journal of Agricultural Research*, 28: 37–45.
- Mesterhazy A., Bartos P., Goyeau H., Niks E.R., Csosz M., Andersen O., Casulli F., Ittu M., Jones E., Ministerski J., Manninger K., Pasquini M., Rubiales D., Schachermayr G., Strzembicka A., Szunics I., Todorova M., Unger O., Vanco B., Vida G., Walther U. (2000). European virulence survey for leaf rust in wheat. *Agronomie*, 20: 793–804.
- Muqaddasi Q.H., Zhao Y., Rodemann B., Plieske J., Ganal M.W., Roder M.S. (2019). Genome-wide association mapping and prediction of adult stage *Septoria tritici* blotch infection in European winter wheat via high-density marker arrays. *Plant Genome*, 12: 180029.
- Pritchard J. K., Stephens M., Donnelly P. (2000a). Inference of population structuring using multilocus genotype data. *Genetics*, 155: 945–959.
- Pritchard J. K., Stephens M., Rosenberg N. A., Donnelly P. (2000b). Association mapping in population structure. *American Journal of Human Genetics*, 67: 170–181.
- Rabinovich S. V. (1998). Importance of wheat-rye translocations for breeding modern cultivar of *Triticum aestivum* L. *Euphytica*, 100: 323–340.
- Radecka-Janusik M., Czembor P. Cz. (2014). Genetic mapping of quantitative trait loci (QTL) for resistance to septoria tritici blotch in a winter wheat cultivar Liwilla. *Euphytica*, 200: 109–125.
- Roelfs A. P., Singh R. O., Saari E. E. (1992). Rust Disease of wheat. Concepts and methods of disease management. CIMMYT Mexico, s. 1–81.
- Schachermayr G. Messmer M. M., Feuillet C., Winzeler H. Winzeler M., Keller B. (1995). Identification of molecular markers linked to the *Agropyron elongatum*-derived leaf rust resistance gene *Lr24* in wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 90: 982–990.
- Soto-Cerda B. J., Cloutier S. (2012). Association Mapping in Plant Genomes. W: Caliskan, M. (red.), Genetic Diversity in Plants. InTech, s. 29–54.
- Vagndorf N., Nielsen N.H., Edriss V., Andersen J.R., Orabi J., Jørgensen L.N., Jahoor A. (2017). Genomewide association study reveals novel quantitative trait loci associated with resistance towards Septoria tritici blotch in North European winter wheat. *Plant Breeding*, 136 (4): 474–482.
- Wiśniewska H., Stepień Ł., Kowalczyk K. (2003). Resistance of spring wheat cultivars and lines to leaf rust. *Journal of Applied Genetics*, 44: 361–368.
- Yates S., Mikaberidze A., Krattinger S.G., Abrouk M., Hund A., i in. (2019). Precision phenotyping reveals novel loci for quantitative resistance to Septoria tritici blotch. *Plant Phenomics*, 2019: Article ID 3285904.

Tabela 1

Loci cech ilościowych (QTL) zidentyfikowanych w mapowaniu asocjacyjnym odporności odmian i linii pszenicy na septoriozę paskowaną, które wyjaśniają zmienność fenotypową na poziomie $R^2 \geq 3\%$.

Locus	QTL	Chr ¹	Mpz ²	R ³
1	<i>QStb.ihar-2B.1</i>	2B	40,89–41,41	3,60%–6,60%
2	<i>QStb.ihar-2B.2</i>	2B	669,34–712,36	3,10%–3,70%
3	<i>QStb.ihar-2D</i>	2D	574,64–587,3	3,70%–7,10%
4	<i>QStb.ihar-6A</i>	6A	538,55	3,30%–5,30%
5	<i>QStb.ihar-7A</i>	7A	48,06	8,80%
6	<i>QStb.ihar-7D</i>	7D	632,76	3,20%–4,50%

¹- chromosom;

²- lokalizacja fizyczna na mapie referencyjnej pszenicy (miliony par zasad);

³- procent wyjaśnienia cechy odporności

Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy korelującej z potencjałem plonotwórczym i wybranymi cechami systemu korzeniowego

Identification of genetic variation of wheat correlating with grain yield and development of root system

Anna Nadolska-Orczyk, Karolina Szala, Hanna Ogonowska, Izabela Rajchel, Renata Wyszyńska, Maja Boczkowska, Sebastian Gasparis, Maciej Kała

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie
✉ e-mail: a.orczyk@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: ekspresja genów *TaCKX*, masa korzenia, produktywność, pszenica

Celem głównym badań była weryfikacja, czy profil ekspresji wskazanej grupy genów jest związany z parametrami określającymi produktywność oraz identyfikacja i wykorzystanie znaczników molekularno-fizjologicznych do poszerzenia puli genetycznej pszenicy o formy, których podłoże genetyczne wskazuje na podwyższony potencjał plonowania i silniejszy system korzeniowy.

Wszystkie cele główne i szczegółowe w projekcie zostały osiągnięte.

Materiały i Metody

Materiały:

Rok 2015 – 50 genotypów z 4 źródeł: dwóch populacji mapujących (Quarrie i in. 2005, Cuthbert i in. 2008) oraz linie hodowlane z dwóch polskich hodowli (Hodowla Roślin Strzelce, Sp. z o.o. Grupa IHAR i Hodowla Roślin Danko, Sp. z o.o.); rok 2016 – dalsze 50 genotypów; 2017 – 30 genotypów hodowlanych i otrzymane 3 mieszańce F_1 ; 2018 – 10 genotypów hodowlanych i 6 otrzymanych mieszańców F_1 ; 2019 – 10 genotypów hodowlanych, 4 mieszańce F_1 i 6 F_2 ; 2020 – 3 genotypy i 4 mieszańce pokolenia F_1 , segregujące roślin F_2 z 4 mieszańców F_1 , 10 linii F_3 wybranych z 10 pojedynków F_2 .

Metody:

- izolacja DNA, projektowanie starterów, PCR, klonowanie i sekwencjonowanie,
- izolacja RNA z korzeni i kłosów,
- synteza cDNA,
- ilościowa analiza ekspresji genów

z rodziny *TaCKX* oraz *TaNAC2-5A* (RT-qPCR) w korzeniach siewek i w dojrzewających kłosach,

- pomiary aktywności enzymu dehydrogenazy cytokininy (CKX), pomiary białka,
- wytypowanie genotypów do krzyżowań, uzyskanie mieszańców F_1 , segregujących roślin F_2 oraz pokolenia F_3 ,
- fenotypowanie – pomiary morfometryczne cech związanych z produktywnością i masą korzeni siewek,
- analiza statystyczna w programie STATISTICA.

Opis wyników

Celem zadania w 2014 roku było przygotowanie technik i materiału badawczego, które umożliwią zespołowi w kolejnych latach weryfikację założonej na podstawie wcześniejszych badań hipotezy badawczej. Zakłada ona, że ekspresja genów z rodziny *CKX* występująca w rozwijających się kłosach i/lub systemie korzeniowym pszenicy wskazuje na potencjał plonotwórczy i/lub masę systemu korzeniowego.

W drugim roku badań (2015) przetestowano korelację pomiędzy poziomem ekspresji genów *TaCKX1* i *TaCKX2* w rozwijających się kłosach i korzeniu a produktywnością i masą korzenia. Testy wykonano w 50 genotypach pochodzących z 4 źródeł: z dwóch populacji mapujących (Quarrie i in. 2005, Cuthbert i in. 2008) oraz linii hodowlanych z dwóch polskich hodowli (Hodowla Roślin Strzelce, Sp. z o.o. Grupa IHAR



i Hodowla Roślin Danko, Sp. z o.o.). W podsumowaniu wyników stwierdzono, że poziom ekspresji genu *TaCKX1* w rozwijających się ziarniakach oraz wyniki korelacji z cechami plonotwórczymi wskazują, że gen ten jest właściwie dobrany do realizacji określonego celu. Te same dane dla genu *TaCKX2* nie dają jednoznacznej odpowiedzi. Dlatego wybór tego genu jako kandydata do dalszych badań powinien być ponownie zweryfikowany (z pozostałymi, znanymi genami z rodziny *TaCKX*).

W trzecim roku badań (2016) kontynuowano analizę korelacji pomiędzy poziomem ekspresji wybranych genów *TaCKX* oraz aktywnością enzymu CKX w badanych tkankach i produktywnością w wybranych genotypach pszenicy zwyczajnej (następnie 50 genotypów).

W czwartym roku badań (2017) wykonano ocenę za pomocą wyznaczonych znaczników genetyczno (poziomu ekspresji)/biochemiczno (aktywności enzymu)/morfologicznych (cechy fenotypowe) produktywności i masy korzenia w przekazanych przez hodowców genotypach/materiałach hodowlanych oraz wykonano krzyżowania (ocena dla 30 genotypów; wykonanie 3 krzyżowań dla 6 genotypów).

W piątym roku badań (2018) przeprowadzono ocenę dziedziczenia znaczników genetyczno/biochemiczno/morfologicznych produktywności i masy korzenia w przekazanych przez hodowców genotypach/materiałach hodowlanych i poszerzono pulę charakteryzowanych genotypów (ocena 10 genotypów hodowlanych oraz 6 mieszańców pokolenia F₁).

W szóstym roku badań (2019) wykonano dalsze 4 krzyżowania w celu poszerzenia puli mieszańców do kontynuacji oceny dziedziczenia znaczników genetyczno/biochemiczno/fizjologicznych produktywności i masy korzenia. Oceniono poziom ekspresji względnej genów *TaCKX1*, *TaCKX6* i *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek i genów *TaCKX1*, *TaCKX2.1/2.2* oraz *TaNAC2-5A* w dojrzewających kłosach wytypowanych 10 genotypów oraz 36 pojedynków pochodzących z 6 F₂.

W ostatnim roku realizacja tematu obejmowała: ocenę poziomu ekspresji względnej genów *TaCKX1*, *TaCKX5* i *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek i genów *TaCKX1*, *TaCKX2.1/2.2* oraz *TaNAC2-5A* w dojrzewających kłosach (7 dni po pyleniu = 7 DAP) wybranych 3 genotypów, 4 mieszańców pokolenia F₁ oraz 24 segregujących pojedynków F₂ z otrzymanych wcześniej 4 mieszańców pokolenia F₁, a także 10 linii F₃ wybranych z 10 pojedynków F₂. Dane te były korelowane z oceną najważniejszych cech fenotypowych, masą korzenia siewek,

produktywnością i innymi ważnymi cechami.

Wnioski z prowadzonych badań:

1. Zgodnie z założoną hipotezą wyznaczony wzór ekspresji wybranych genów z rodziny *TaCKX* w różnych organach i tkankach rozwijających się roślin pszenicy może wskazywać na ich rolę w produktywności.
2. Bardzo duże różnice w poziomie ekspresji genów *TaCKX1*, *TaCKX2* i *TaCKX5* w rozwijających się ziarniakach wśród testowanych materiałów hodowlanych mogą wpływać na istotność zmian związanych z produktywnością.
3. Negatywna korelacja pomiędzy ekspresją genów *TaCKX1* i *TaCKX5* w kłosach badanych materiałów hodowlanych a plonem weryfikuje pozytywnie założoną hipotezę badawczą.
4. Materiały z HR Strzelce wykazują znacznie większe zróżnicowanie pod względem badanych mierników (ekspresja w korzeniach, aktywność CKX w kłosach), niż materiały z HR Danko co wpływa na wyniki oczekiwanych korelacji i możliwość użycia badanych parametrów do selekcji.
5. Silna (zwłaszcza w materiałach z HR Strzelce) korelacja pomiędzy masą korzenia i aktywnością enzymu w tym organie wskazuje, że aktywność enzymu CKX może być użyta jako marker I fazy rozwoju korzenia.
6. Negatywna korelacja pomiędzy aktywnością enzymu CKX w kłosach a plonem wskazuje, że ten czynnik może być pomocny przy ocenie potencjału plonotwórczego genotypów pszenicy.
7. Brak istotnej korelacji pomiędzy ekspresją genu *TaCKX1* w kłosach zebranych z pola i w kłosach pochodzących z fitotronu świadczy o wpływie środowiska na ekspresję tego genu.
8. Istotna statystycznie, silna korelacja pomiędzy ekspresją genów *TaCKX1*, *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek wskazuje na silną koregulację tych genów.
9. Korelacje ekspresji genów *TaCKX1* i *TaCKX6* w korzeniu z niektórymi cechami plonotwórczymi wskazują, że mogą one być przydatne jako znaczniki masy korzenia (ekspresja *TaCKX1*) czy też produktywności (ekspresja *TaCKX6*).
10. Silna, istotna statystycznie korelacja między ekspresją genów *TaCKX2.1* a *TaCKX2.2* w kłosach 7 DAP 12 rodów i odmian z HR Strzelce pochodzących z pola oraz brak

istotnej korelacji między tymi genami w badanych genotypach z fitotronu świadczy o silnej współpracy tych genów w środowisku.

11. Poziom ekspresji badanych genów z rodziny *TaCKX* jest dziedziczony do trzeciego pokolenia generatywnego (T_3).

Osiągnięcia projektu

Opracowano precyzyjną metodę ilościowej analizy ekspresji genów pszenicy.

Wykazano za pomocą korelacji, że poziom ekspresji określonych genów *TaCKX* oraz aktywność enzymu CKX w rozwijających się kłosach i/lub korzeniach siewek w materiałach hodowlanych mogą być znacznikami produktywności.

Udokumentowano występowanie bardzo dużego zróżnicowania w poziomie ekspresji określonych genów *TaCKX* w materiałach hodowlanych, co umożliwia wybór określonych genotypów do hodowli (Rys. 2, Szala i in. 2020).

Wykazano, że inne grupy genów *TaCKX* regulują cechy plonotwórcze na polu a inne w fitotronie (Rys. 4, Szala i in. 2020).

Znaczniki produktywności są dziedziczone (potwierdzone w F_3) i można ich użyć do selekcji określonego fenotypu.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- Nadolska-Orczyk A., Gasparis S., Zalewski W., Yanushevska Y., Orczyk W. 2014. RNAi in practice – PTGS silencing in functional studies of agronomically important cereal genes. Konferencja „Post-transcriptional gene regulation in plants”; 30.06 – 02.07.2014, Poznań; Biotechnologia Vol. 95, str. 108–109.
- Boczkowska M., Rajchel I., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A.. Tissue-specific expression analysis of cytokinin dehydrogenase genes in common wheat. Streszczenia III Ogólnopolskiej Konferencji „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany”; 05 – 07.11.2014, Poznań; str. 83.
- Nadolska-Orczyk A., Boczkowska M., Rajchel I. K., Orczyk W. 2015. Łączenie wiedzy z praktyką w poszukiwaniu znaczników produktywności zbóż. Streszczenia Konferencyjne „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, 02–06.02.2015, str. 73–77.
- Boczkowska M., Rajchel I., Onyśk A., Orczyk W., Zmijewska B., Nadolska-Orczyk A.. Cytokinin dehydrogenase activity and wheat yield. 3rd Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, Berlin, 2 – 4.11.2015, str. 15 – 16
- Onyśk A., Boczkowska M., Rajchel I. K., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. Looking for *TaCKX* genes associated with grain yield. 20th General Congress of Eucarpia (poster), Zurich, Switzerland, 29.08 – 1.09.2016, str. 180.

Nadolska-Orczyk A., Rajchel I. K., Onyśk A. 2016. Badania funkcji ważnych genów użytkowych zbóż i ich wykorzystanie w praktyce hodowlanej. Konferencja naukowa „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin” (wykład) Międzyzdroje, 8 – 10.06.2016, str. 48.

Wyszyńska R., Rajchel I. K., Onyśk A., Nadolska-Orczyk A. 2017. Geny z rodziny *TaCKX* wpływające na produktywność pszenicy. Streszczenia XIII Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, 30.01 – 03.02.2017, str. 143–144.

Barchacka K., Boczkowska M., Ogonowska H., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. 2018. How *TaCKX* family genes cooperate in regulation of growth and productivity of common wheat? Abstract In vitro Cellular and Developmental Biology, 14th Congress of the IAPB, Dublin, Ireland, 19 – 24.08.2018, Vol. 54, pp. S32 (wykład).

Barchacka K., Ogonowska H., Jabłoński B., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. 2019. Cooperation of *TaCKX* genes in regulation of growth and productivity of wheat (*Triticum aestivum* L.). 7th Global Summit on Plant Science, Madrid, Spain, 7 – 8.10.2019, Volume 07 ISSN: 2329–955X, str. 28–29, (wykład).

Szala K., Nadolska-Orczyk A. 2019. Jak dziedziczony jest poziom ekspresji genów *TaCKX* korelujący z zawartością cytokininy i produktywnością roślin pszenicy? II Konferencja Dni Młodego Naukowca, Radzików IHAR-PIB, 7 – 8.11.2019 (wykład).

Publikacje

- Zalewski W., Gasparis S., Boczkowska M., Rajchel I. K., Kała M., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. 2014. Expression patterns of *HvCKX* genes indicate their role in growth and reproductive development of barley. PloS ONE 9 (12)1–20: e115729. (MEiN = 100 p., $IF_5 = 3,227$).
- Nadolska-Orczyk A., Rajchel I. K., Orczyk W., Gasparis S. 2017. Major genes determining yield-related traits in wheat and barley. Theor. Appl. Genet., 130:1081–1098, DOI: 10.1007/s00122–017–2880-x. (MEiN = 140 p., $IF_5 = 4,603$).
- Ogonowska H., Barchacka K., Gasparis S., Jablonski B., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. 2019. Specificity of Expression of *TaCKX* Family Genes in Developing Plants of Wheat and Their Co-Operation Within and Among Organs, Plos One 14 (4): e0214239 doi: 10.1371/journal.pone.0214239. (MEiN = 100 p., $IF_5 = 3,227$).
- Szala K., Ogonowska H., Lugowska B., Zmijewska B., Wyszyńska R., Dmochowska-Boguta M., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. 2020. Different sets of *TaCKX* genes affect yield-related traits in wheat plants grown in a controlled environment and in field conditions. BMC Plant Biol 20:496, 1–13, <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02713> (MEiN = 140 p., $IF_5 = 4,494$).

Poszukiwanie oraz wykorzystanie markerów fenotypowych, metabolicznych i molekularnych do badania typów odporności na fuzariozę kłosów u form pszenicy o zróżnicowanej podatności

Identification and application of phenotypic, metabolic and molecular markers in studies of types of resistance to *Fusarium* head blight in winter wheat accessions differing in resistance

Tomasz Góral^{1*}, Halina Wiśniewska², Paweł Czembor¹, Piotr Ochodzki¹, Magdalena Radecka-Janusik¹, Adriana Twardawska², Maciej Mańka², Jolanta Belter²

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

²Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań

✉ e-mail: t.goral@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe *Fhb1*, *Fusarium*, fuzarioza kłosów, markery molekularne, mykotoksyny, odporność, pszenica

Cele prowadzonych badań

- Uzyskanie genotypów pszenicy ozimej (*Triticum aestivum*) o zwiększonej odporności na fuzariozę kłosów powodowaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. i niskiej akumulacji mykotoksyn fuzaryjnych w ziarnie.
- Fenotypowanie porażenia kłosów wybranych genotypów pszenicy w doświadczeniach infekcyjnych w różnych środowiskach, w wieloletnim cyklu badawczym celem uzyskania istotnej poprawy odporności pszenicy ozimej z uwzględnieniem najważniejszych typów odporności: typ 1 – odporność na infekcję, typ 2 – odporność na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie, typ 3 – odporność na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium*, typ 4 – tolerancja wobec fuzariozy kłosów i obecności mykotoksyn (trichotecenów), typ 5 – odporność na akumulację mykotoksyn (trichotecenów) (tematy badawcze 1, 2 i 3).
- Przeprowadzenie analizy wielocechowej – uwzględniającej wszystkie badane cechy zidentyfikowane każdego roku u badanych genotypów łączących różne typy odporności na fuzariozę kłosów (tematy badawcze 1, 2 i 3).
- Zachowanie kolekcji ziarna genotypów wykazujących podwyższoną odporność

w Zakładzie Fitopatologii IHAR-PIB (tematy badawcze 1, 2 i 3).

- Wprowadzanie genu odporności na fuzariozę kłosów *Fhb1* do materiałów hodowlanych pszenicy ozimej na drodze selekcji wspomagananej markerami molekularnymi (temat badawczy 4).

Założone w projekcie cele zostały zrealizowane

Materiały i Metody

Tematy badawcze 1, 2 i 3

- Doświadczenia infekcyjne w Poznaniu i Radzikowie oraz doświadczenia infekcyjne w 5–6 lokalizacjach (spółki hodowlane – materiały z doświadczeń wstępnych)
- Produkcja inokulum *F. culmorum*, inokulacja kłosów zawiesiną zarodników oraz ocena indeksu fuzariozy kłosów (IFK) (typ odporności 1+2).
- Zbiór kłosów wybranych genotypów (Poznań, Radzików) oraz ocena uszkodzenia ziarniaków przez *Fusarium* (FDK) (typ 3) i redukcji komponentów plonu (typ 4)
- Analizy zawartości metabolitów *Fusarium* w ziarnie: ergosterol (ERG) (typ 3) oraz zearalenon (ZEN), trichoteceny z grupy B (deoksyniwalenol=DON i pochodne, niwaleol=NIV) (typ 5). Metody immunoenzymatyczne i chromatograficzne (HPLC, GC).
- Badanie odporności typu 1 (infekcja



pierwotna) i 2 (rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie): inokulacja punktowa i ocena po 21 dniach (typ 2), opryskiwanie kłosów i ocena po 7 dniach (typ 1).

- Analizy statystyczne wielocechowe – identyfikacja genotypów pszenicy łączących różne typy odporności na fuzariozę kłosów.

Temat badawczy 4

- Dawca odporności (gen *Fhbl*) linia AIII62 (FUS9), rodzice (linie) wypierający: SMH8527 (FUS12), DL414/10 (FUS24), STH1178 (FUS27), MIB11262 (FUS34) i NAD10041 (FUS40).
- Po każdym krzyżowaniu wstecznym prowadzono selekcję roślin wybierając tylko osobniki z allelem rodzica dawcy w locus markera centralnego (UMN10) oraz z allelami rodziców wypierających w loci markerów flankujących
- Wyprowadzone rodziny F_3BC_2 i F_4BC_2 badano w doświadczeniach połowych pod względem odporności typu 1 (na zakażenie patogenem) i typu 2 (na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie)

Wyniki

Tematy badawcze 1, 2 i 3

Typ 1 i 2 odporności

W latach 2014 – 2020 przebadano odporność na fuzariozę kłosów (IFK) 1118 genotypów pszenicy ozimej oraz 5 odmian wzorcowych (Artist, KWS Ozon, Patras, RGT Kilimanjaro, Tonacja). Doświadczenia infekcyjne przeprowadzono w 5 – 8 lokalizacjach (zależnie od roku i warunków pogodowych – susza, wymarżanie). Stwierdzono duże zróżnicowanie odporności genotypów. Zidentyfikowano genotypy odporne oraz wysoko podatne we wszystkich środowiskach. Obserwowano bardzo silny wpływ warunków środowiska (rok, lokalizacja) na nasilenie fuzariozy kłosów.

W latach 2014 – 2020 w doświadczeniach w Poznaniu i Radzikowie przebadano odporność na fuzariozę kłosów (IFK) 192 genotypów pszenicy oraz 25 form wzorcowych. Genotypy wybierane były na podstawie niskiego IFK w roku poprzednim w doświadczeniach prowadzonych w kilku lokalizacjach (powyżej). Najniższe indeksy FK zanotowano w latach 2015 i 2018, najwyższy w roku 2016 (zbliżony do wartości IFK w latach 2014, 2017 i 2020). W roku 2020 IFK dla wybranych genotypów o podwyższonej odporności wynosił 13,2% (4,5 – 18,7%), natomiast IFK dla nowych genotypów pszenicy badanych w ramach Doświadczenia

Wstępnego wynosił 24,9% (9,6 – 45,0%).

Typ 3 odporności

W latach 2014 – 2019 przebadano odporność na uszkodzenie ziarniaków (FDK) 163 genotypów o podwyższonej od odporności oraz 29 form wzorcowych. Badano również FDK dla 131 genotypów wybranych z doświadczeń wstępnych. Najniższe FDK zanotowano w roku 2019 (5,3%), najwyższe w latach 2014 (42,7%), 2015 (14,9%) i 2016 (14,3%). W kolejnych latach badań uszkodzenie ziarniaków (FDK) korelowało z porażeniem kłosa (IFK) w obu lokalizacjach doświadczalnych. Na podstawie oceny IFK oraz FDK wybierano corocznie genotypy wykazujące podwyższoną odporność do przeprowadzania analiz zawartości ERG oraz toksyn fuzaryjnych.

Typ 5 odporności

W latach 2014 – 2020 przeanalizowano zawartość toksyn fuzaryjnych w ziarnie genotypów wybranych z doświadczeń w Poznaniu i Radzikowie. Analizowano 151 genotypów pszenicy, 6 odmian oraz 24 form wzorcowych (odpornych i podatnych). Najniższe zawartości trichotecenów z grupy B (TCT B = suma DON i NIV) zanotowano w latach 2019 (2,304 mg/kg) i 2018 (4,338 mg/kg), najwyższe w latach 2014 (20,256 mg/kg) i 2017 (11,205 mg/kg). Zearalenon (ZEN) występował w dużych ilościach w latach 2017 (0,600 mg/kg), 2014 (0,464 mg/kg) i w 2016 (0,262 mg/kg). W pozostałych 3 latach jego zawartość był średnio poniżej 0,100 mg/kg.

Niskie zawartości toksyn w latach 2018 i 2019 wynikały z warunków pogodowych niekorzystnych dla rozwoju fuzariozy kłosów i/lub tworzenia się mykotoksyn (wysoka temperatura powietrza, niskie opady). W większości lat IFK korelowało z uszkodzeniem ziarniaków FDK (0,445 – 0,842), zawartością trichotecenów z grupy B (0,500 – 0,857) i ZEN (0,392 – 0,834). Wyjątkiem był rok 2015, kiedy nie zanotowano korelacji z FDK i ZEN i słabą z TCT B. We wszystkich latach badań stopień uszkodzenia ziarniaków (FDK) korelowało istotnie z zawartością trichotecenów B (0,554 – 0,850) i ZEN (0,396 – 0,719). Zawartość ergosterolu (ERG) (wskaźnik ilości grzybni; typ 3 odporności) korelowała istotnie z zawartością trichotecenów B (0,630 – 0,946) i ZEN (0,341 – 0,810). Zawartość ERG korelowała również z uszkodzeniem ziarniaków przez *Fusarium* (0,373 – 0,878).

Korelacje dla wyników ze wszystkich lata badań wskazują, że najlepszym wskaźnikiem zawartości trichotecenów B jest uszkodzenie ziarniaków

FDK oraz zawartość ERG (Tabela). Nieco słabiej z toksynami korelowało porażenie kłosa IFK. W przypadku ZEN najlepszym wskaźnikiem ilości była zawartość ERG oraz stopień porażenia kłosów.

W latach 2014–2020 przebadano typy odporności 1 i 2 dla 206 genotypów pszenicy wybranych na podstawie niskiego IFK w doświadczeniach polowych oraz 38 wzorców. Pod względem typu 1 genotypy odporne nie różniły się od wzorców podanych, były natomiast istotnie bardziej odporne pod względem typu 2. Genotypy te (nieposiadające znanych genów odporności) były bardziej podatne od wzorców odpornych z genem *Fhb1*. Odporność typu 2 korelowała ze średnim IFK z doświadczeń w Poznaniu i Radzikowie ($r = 0,524$), dla typu 1 współczynnik był dwukrotnie niższy ($r = 0,238$).

Genotypy wykazujące podwyższoną odporność na fuzariozę kłosów różnego typu (odporność na porażenie kłosa, na uszkodzenie ziarniaków, na akumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie) w ciągu kilku lat badań zostały włączone do kolekcji IHAR-PIB. Przykład na rys. 1 (wyniki z lat 2017–2019, ma zielono oznaczone wzorce odporne). Kolekcja obejmuje 50 genotypów pszenicy ozimej nieposiadających genów odporności na fuzariozę kłosów o dużym efekcie (np. *Fhb1*, *Fhb2*, *Fhb5*) co wynika z braku źródeł tych genów w ich rodowodach. W kolekcji znajdują się również 23 linie/odmiany o wysokiej odporności na fuzariozę kłosów, w tym większość z genem *Fhb1*.

Temat badawczy 4

Stwierdzono istotne różnice w odporności typu 2 (rys. 2). Linie z wprowadzonym genem *Fhb1* wykazywały istotnie wyższą odporność na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie w porównaniu do linii kontrolnych, odmian pszenicy i wzorców podatnych oraz istotnie mniejszą odporność w porównaniu do wzorców odpornych (genotypy posiadające geny odporności na fuzariozę kłosów, w tym *Fhb1*).

Wnioski

- Reakcja genotypów pszenicy na infekcję kłosa przez *Fusarium* podlega bardzo silnym wpływom środowiska (rok, lokalizacja), w którym przeprowadzane są doświadczenia infekcyjne.
- Największą zmienność obserwuje się w przypadku ilości toksyn fuzaryjnych akumulowanych w ziarnie pszenicy w poszczególnych środowiskach.
- W przypadku pszenicy stwierdzono istotne zależności (korelacje) pomiędzy porażeniem

kłosa, uszkodzeniem ziarniaków i zawartością toksyn fuzaryjnych (trichotecenów grupy B) w ziarnie. Zależności te są słabsze dla zearalenonu.

- Najlepszym wskaźnikiem zawartości trichotecenów grupy B w ziarnie był stopień uszkodzenia ziarniaków.
- Wprowadzanie genu *Fhb1* metodą krzyżowań wstecznych wspomaganych markerami molekularnymi jest skuteczną metodą na uzyskanie genotypów o podwyższonym poziomie odporności (typu 2) na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie.

Osiągnięcia projektu

- Przebadano odporność na fuzariozę kłosów (porażenie kłosa) ponad 1000 genotypów pszenicy ozimej w doświadczeniach infekcyjnych w zróżnicowanych środowiskach i zidentyfikowano formy odporne.
- Zidentyfikowano genotypy pszenicy ozimej (nieposiadające genów odporności o dużym efekcie) wykazujące podwyższoną odporność na fuzariozę kłosów i łączące różne typy odporności w tym na akumulację mykotoksyn.
- Genotypy te, których odporność została potwierdzona w ciągu kilku lat badań (około 50) zostały włączone do kolekcji Zakładu Fitoopatologii IHAR-PIB
- Wprowadzono gen *Fhb1* odporności na fuzariozę kłosów do materiałów hodowlanych polskich Spółek Hodowli Roślin wzbogacając w ten sposób pulę materiałów źródłowych do hodowli odpornościowej zaadaptowanych do warunków glebowo-klimatycznych Polski.
- Udowodniono skuteczność wykorzystanej w temacie badawczym metody hodowli molekularnej, która może być wykorzystana w Spółkach Hodowli Roślin.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

- Perlikowski D., Wiśniewska H., Góral T., Kwiatek M., Majka M., Kosmala A. 2014. Identification of kernel proteins associated with the resistance to *Fusarium* head blight in winter wheat (*Triticum aestivum* L.). PLoS ONE 9 (10) e110822. IF = 3,534; MNiSW = 40 pkt/2017
- Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral, D., Belter J., Majka M., Kwiatek M., Wiśniewska H., Bogacki J., Drzazga T., Ługowska B., Matysik P., Witkowski E., Rubrycki K., Woźna-Pawlak U. 2015. Odporność genotypów pszenicy ozimej na fuzariozę kłosów i akumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie scharakteryzowana za pomocą różnych typów odporności. Biul. IHAR 276: 19–37. MNiSW =

- 6 pkt/2015
- Góral T., Walentyn-Góral D., Wiśniewska H. 2015. Odporność pszenicy i pszenżyta na fuzariozę kłosów – odporność typu I oraz typu II. Biul. IHAR 277: 33–46. MNiSW = 4 pkt/2015
- Góral T., Wiśniewska H., Walentyn-Góral D., Radecka-Janusik M., Czembor P. 2016. Resistance to *Fusarium* head blight [*Fusarium culmorum* (W.G. Sm.) Sacc.] of winter wheat lines generated from crosses between winter type cultivars and resistant spring wheat Sumai 3. *Progress in Plant Protection* 56: 285–295. MNiSW = 12 pkt/2016
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Walentyn-Góral D. 2016. Higher *Fusarium* toxins accumulation in grain of winter triticale lines inoculated with *Fusarium culmorum* as compared with wheat. *Toxins* 8 (10): 301. IF = 3,571; MNiSW = 30 pkt/2016
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Grzeszczak I., Belter J., Majka M., Bogacki J., Drzazga T., Ługowska B., Matysik P., Witkowski E., Rubrycki K., Woźna-Pawlak U. 2017. Fuzarioza kłosów oraz akumulacja toksyn fuzaryjnych w ziarnie rodów hodowlanych pszenicy ozimej. *Biuletyn IHAR* 282: 17–40. MNiSW = 6 pkt/2017
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Nielsen L. K., Walentyn-Góral D., Stępień Ł. 2019. Relationship between *Fusarium* head blight, kernel damage, concentration of *Fusarium* biomass, and *Fusarium* toxins in grain of winter wheat inoculated with *Fusarium culmorum*. *Toxins* 11:2. IF=3,895; MNiSW = 100 pkt/2019.
- Doniesienia konferencyjne**
- Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral, D., Belter J., Majka M., Kwiatek M., Wiśniewska H. 2015. Odporność genotypów pszenicy ozimej na fuzariozę kłosów i akumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie. *Streszczenia XII Konferencji Naukowej „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”*, Zakopane 2 -6 lutego 2015, str. 313–314.
- Czembor P., Słowacki P. 2015. Polimorfizm DNA w loci markerów molekularnych sprzężonych z genem *Fhb1* odporności na fuzariozę kłosa w materiałach hodowlanych i źródłach odporności na chorobę. *XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa*, pt. „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, streszczenia referatów i plakatów, Zakopane, 2–6 lutego 2015, str. 301–302.
- Walentyn-Góral D., Góral T., Majka M., Belter J., Wiśniewska H. 2015. Odporność typu I i II na fuzariozę kłosów u pszenicy i pszenżyta. *Streszczenia Konferencji Naukowej „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”*, Zakopane 2 -6 lutego 2015, str. 368–370.
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Belter J., Kwiatek M., Majka M., Bogacki J., Drzazga T., Ługowska B., Matysik P., Witkowski E., Rubrycki K., Woźna-Pawlak U. 2015. Screening of winter wheat breeding lines for resistance to *Fusarium* head blight and accumulation of *Fusarium* metabolites in grain. *Book of Abstracts. 13th European Fusarium Seminar*, 10–14 May 2015, Martina Franca (ITA), Apulia, Italy, p. 166.
- Perlikowski D., Wiśniewska H., Góral T., Kwiatek M., Majka M., Kosmala A. 2015. Proteomic research on the resistance to *Fusarium* head blight in *Triticum aestivum*. *Book of Abstracts. The 9th Central and Eastern European Proteomic Conference*. 15 -18 June 2015, Poznań, Poland, p. 67.
- Góral T., Walentyn-Góral D., Radecka-Janusik M., Czembor P C, Wisniewska H. 2016. Resistance to *Fusarium* head blight of winter wheat lines derived from crosses between winter type cultivars and resistant spring wheat ‘Sumai 3’. *Abstracts of the 20th EUCARPIA General Congress*, 29 Aug – 1 Sep 2016, Zurich, Switzerland, p. 157.
- Słowacki Piotr, Magdalena Radecka-Janusik and Paweł Cz. Czembor. 2016. Molecular selection in three winter wheat populations for *Fhb1* resistance gene to *Fusarium* head blight. *Abstracts of the 20th EUCARPIA General Congress*, 29 Aug – 1 Sep 2016, Zurich, Switzerland, p. 188.
- Ochodzki Piotr, Tomasz Góral, Halina Wiśniewska, Iga Grzeszczak, Michał Kwiatek. 2016. Variability in accumulation of *Fusarium* mycotoxins in grain of winter wheat breeding lines artificially inoculated with *F. culmorum* in 2015. *Conference Abstracts: 38th Mycotoxin Workshop*, Berlin, Germany, 2–4.05.2016, p.115
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Grzeszczak I., Walentyn-Góral D. 2017. Odporność pszenicy ozimej na fuzariozę kłosów i akumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie. *Streszczenia Konferencji Naukowej „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”*, Zakopane 30 stycznia – 3 lutego 2017, str. 165–166.
- Słowacki Piotr, Magdalena Radecka-Janusik and Paweł Cz. Czembor. 2017. Efektywność selekcji molekularnej genu *Fhb1* w dwóch populacjach pochodzących ze skrzyżowania z odmianą Sumai 3. *Streszczenia Konferencji Naukowej „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”*, Zakopane 30 stycznia – 3 lutego 2017, str. 138.
- Radecka-Janusik Magdalena, Paweł Cz. Czembor. 2017. Molecular selection in one winter wheat populations for *Fhb1* resistance gene to *Fusarium* head blight. *8th International Triticeae Symposium*. Niemcy, Wernigerode, 12.06–16.06.2017, Programme – Book of Abstracts, p. 84.
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Kwiatek M. Majka M., Belter J. 2017. Stability of resistance to *Fusarium* head blight and *Fusarium* toxin accumulation in winter wheat lines over different environments. *Global Conference on Plant Science and Molecular Biology (GPMB 2017)*, Walencja, Hiszpania, 11 – 13 września 2017, p. 67.
- Góral Tomasz, Halina Wiśniewska, Piotr Ochodzki, Dorota

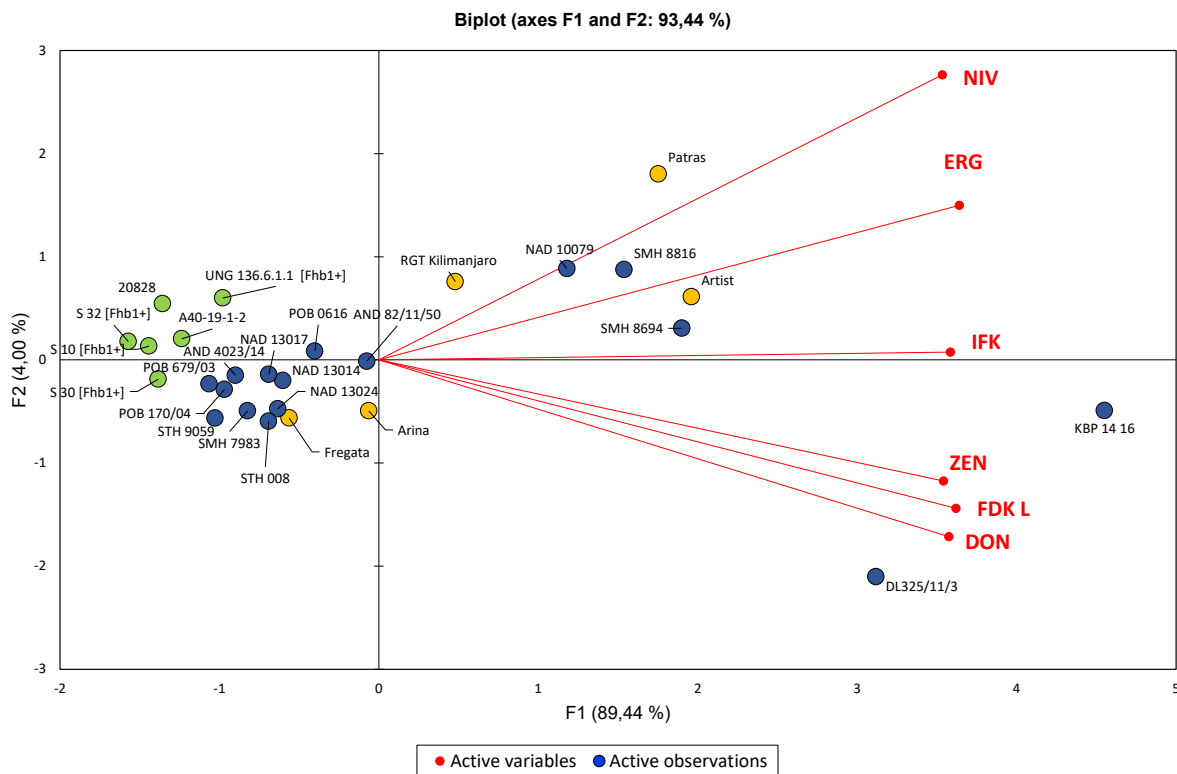
- Walentyń-Góral, Maciej Majka, Iga Grzeszczak. 2018. Fusarium head blight and *Fusarium* toxins accumulation in grain of winter wheat breeding lines inoculated with *Fusarium culmorum*. Book of Abstracts: EUCARPIA cereal section meeting: "Breeding cereals for sustainable agriculture", Clermont-Ferrand, Francja, 19–21.03.2018; str. 108.
- Czembor Paweł Cz., Magdalena Radecka-Janusik, Piotr Słowacki and Dominika Piaskowska. 2018. Marker assisted backcrossing in two winter wheat populations for *Fhb1* resistance gene to Fusarium head blight. Programme and Abstracts: Vienna International Science Conference and Events Association. Plant Genetics and Breeding Technologies III. Wiedeń, Austria, 12–13 lipca, 2018; str. 34.
- Góral Tomasz, Halina Wiśniewska, Piotr Ochodzki, Dorota Walentyń-Góral, Maciej Majka. 2018. Stability of resistance to Fusarium head blight and *Fusarium* toxin accumulation in winter wheat lines evaluated in the years 2015–2017 in two environments. Book of Abstracts: 2nd Global Conference on Plant Science and Molecular Biology, Rzym, Włochy, 18.09–22.09.2018; str. 78.
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Przetakiewicz J., Walentyń-Góral D., Majka M. 2019. *Fusarium* toxins and *Fusarium* DNA in grain of winter wheat inoculated with mixture of *F. culmorum* isolates of 3ADON and NIV chemotypes. Conference Abstracts. 41st Mycotoxin Workshop, Lisbon, Portugal, 6–8 May 2019, p. 134.
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Walentyń-Góral D., Majka, M. 2019. Resistance of winter wheat breeding lines to Fusarium head blight and mycotoxin accumulation in grain. Book of Abstracts. CBB5 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding, Budapest, Hungary, 4–7 November 2019, pp. 75–76.
- Góral T., Wiśniewska H., Walentyń-Góral D., Majka M. 2019. Ocena podatności rodów hodowlanych pszenicy ozimej na fuzariozę kłosów w doświadczeniach infekcyjnych prowadzonych latach 2014–2018. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, 5–8.02.2019. Biuletyn IHAR. 285:299–300.
- Piaskowska D., Czembor P., Radecka-Janusik M. 2019. Selekcja molekularna genu *Fhb1* odporności na fuzariozę kłosa w trzech populacjach mieszańcowych pszenicy ozimej. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, Zakopane, 5–8.02.2019. Biuletyn IHAR 285: 267–268.
- quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology*, 89 (4): 343–348.
- Bechtel D. B., Kaleikau L. A., Gaines R. L., and Seitz L. M. (1985). The effects of *Fusarium graminearum* infection on wheat kernels. *Cereal Chem.* 62:191–197.
- Bottalico A, Perrone G, (2002). Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 998–1003.
- Buerstmayr H., Ban T., Anderson J. A. (2009). QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: A review. *Plant Breeding*, 128 (1): 1–26.
- Buerstmayr H., Lemmens M., Fedak G. and Ruckenbauer P. (1999). Back-cross reciprocal monosomic analysis of Fusarium head blight resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98: 76–85.
- Buerstmayr H., Lemmens M., Hartl L., Doldi L., Steiner B., Stierschneider M. and Ruckenbauer P. (2002). Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. I. Resistance to fungal spread (Type II resistance). *Theor. Appl. Genet.* 104: 84–91.
- Buerstmayr H., Steiner B., Hartl L., Griesser M., Angerer N., Lengauer D., Miedaner T., Schneider B., Lemmens M. (2003). Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor. Appl. Genet.* 107: 503–508.
- Buerstmayr M., Steiner B., Buerstmayr H. (2019). Breeding for Fusarium head blight resistance in wheat — progress and challenges. *Plant Breeding*, 139 (3): 429–454.
- Buerstmayr H., Steiner B., Lemmens M., Ruckenbauer P., (2000). Resistance to Fusarium head blight in winter wheat: heritability and trait associations. *Crop Sci.* 40, 1012–1018.
- Burlakoti R. R., Mergoum M., Kianian S. F., Adhikari T. B., (2010). Combining different resistance components enhances resistance to Fusarium head blight in spring wheat. *Euphytica* 172, 197–205.
- Bushnell W. R. (2001). What is known about infection pathways in Fusarium head blight? In S. Canty et al. (ed.) *Proceedings of the 2001 National Fusarium Head Blight Forum*. Kinko's, Okemos, MI.
- Chrpova J., Sip V., Sedlacek T., Stockova L., Veskrna O., Horcicka P. (2011). Effectiveness of Marker-based selection for Fusarium head blight resistance in spring wheat. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 47: S123–S129.
- Cowger C., Arellano C., (2013). *Fusarium graminearum* infection and deoxynivalenol concentrations during development of wheat spikes. *Phytopathology* 103, 460–471.
- Del Blanco I. A., Froberg R. C., Stack R. W., Berzonsky W. A., Kianian S. F. (2003). Detection of QTL linked to Fusarium head blight resistance in Sumai 3-derived North Dakota bread wheat lines. *Theoretical and Applied*

Literatura

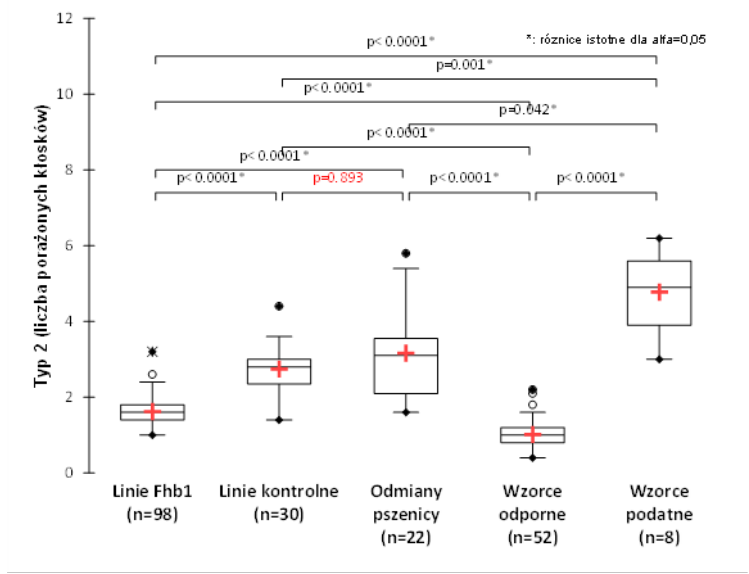
- Argyris J., Van Sanford D., TeKrony D. (2003). *Fusarium graminearum* infection during wheat seed development and its effect on seed quality. *Crop Sci* 43:1782–1788.
- Bai G., Kolb F. L., Shaner G., Domier L. L. (1999). Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major

- Genetics 106: 1027–1031.
- Foroud N. A., Eudes F. (2009). Trichothecenes in cereal grains. *Int. J. Mol. Sci.* 10:147–173.
- Gunnaiah R., Kushalappa A. C., Duggavathi R., Fox S., Somers D. J. (2012). Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (*Fhb1*) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. *PLoS ONE* 7 (7): e40695. doi: 10.1371/journal.pone.0040695.
- Kollers S., Rodemann B., Ling J., Korzun V., Ebmeyer E., Argillier O., Hinze M., Plieske J., Kulosa D., Ganai M. W., Röder M. S. (2013). Whole genome association mapping of Fusarium head blight resistance in European winter wheat (*Triticum aestivum* L.). *PLoS ONE* 8, e57500. doi: 10.1371/journal.pone.0057500
- Kubo K., Kawada N., Fujita M. (2013b). Evaluation of Fusarium head blight resistance in wheat and the development of a new variety by integrating type I and II resistance. *Jircas. Affrc. Go. Jp.* 47: 9–19.
- Lemmens M., Buerstmayr H., Krska R., Schuhmacher R., Grausgruber H., Ruckebauer P. (2004). The effect of inoculation treatment and long-term application of moisture on Fusarium head blight symptoms and deoxynivalenol contamination in wheat grains. *European Journal of Plant Pathology* 110, 299–308.
- Lemmens M., Koutnik A., Steiner B., Buerstmayr H., Berthiller F., Schumacher R., Maier F., Schafer W. (2008). Investigations on the ability of *Fhb1* to protect wheat against nivalenol and deoxynivalenol. *Cereal Research Communications* 36 (B), 429–436.
- Li G., Zhou J., Jia H., Gao Z., Fan M., Luo Y., i in. (2019). Mutation of a histidine-rich calcium-binding-protein gene in wheat confers resistance to Fusarium head blight. *Nature Genetics*, 51 (7): 1106–1112.
- Liu S., Pumphrey M. O., Gill B. S., Trick H. N., Zhang J. X., i in. (2008). Toward positional cloning of FHB1, a major QTL for fusarium head blight resistance in wheat. *Cereal Res Commun (Suppl B)*, 36: 195–201.
- McCartney C. A., Somers D. J., Fedak G., DePauw R. M., Thomas J., i in. (2007). The evaluation of FHB resistance QTLs introgressed into elite Canadian spring wheat germplasm. *Molecular Breeding*, 20 (3): 209–221.
- McMullen M., Bergstrom G., De Wolf E., Dill-Mackey R., Hershman D., Shaner G., Van Sanford D. (2012). A Unified effort to fight an enemy of wheat and barley: Fusarium head blight. *Plant Disease*, 96 (12): 1712–1728.
- Mesterhazy A., Bartok T., Mirocha C.G., Komoroczy R. (1999). Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding* 118: 97–110
- Mesterhazy A. (1995). Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. *Plant Breeding* 114, 377–386.
- Mesterhazy A. (2002). Theory and practice of the breeding for Fusarium head blight resistance in wheat. *Journal of Applied Genetics* 43A, 289–302.
- Mesterházy A., Tóth B., Bartók T., Varga M. (2008). Breeding strategies against FHB in winter wheat and their relation to type I resistance. *Cereal Research Communications* 36, 37–43.
- Mesterhazy A., Toth B., Kaszonyi G. (2006). Sources of “environmental interactions” in phenotyping and resistance evaluation; Ways to neutralize them. In: Ban T., Lewis J.M., Phipps E.E. (Eds.), *The global Fusarium initiative for international collaboration – strategic planning workshop held at CIMMYT: El Batan, Mexico, 14–17 March 2006*. pp 84–92.
- Miedaner T., Moldovan M., Ittu M. (2003). Comparison of spray and point inoculation to assess resistance to Fusarium head blight in multi-environment wheat trial. *Phytopathology* 93: 1068–1072.
- Miedaner T., Wilde F., Korzun V., Ebmeyer E., Schmolke M., Hartl L., Schon C. C. (2009). Marker selection for Fusarium head blight resistance based on quantitative trait loci (QTL) from two European sources compared to phenotypic selection in winter wheat. *Euphytica*, 166 (2): 219–227.
- Miedaner T., Wilde F., Steiner B., Buerstmayr H., Korzun V., Ebmeyer E. (2006). Stacking quantitative trait loci (QTL) for Fusarium head blight resistance from non-adapted sources in an European elite spring wheat background and assessing their effects on deoxynivalenol (DON) content and disease severity. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 562–569.
- Miedaner T., Voss H. H. (2008). Effect of dwarfing genes on Fusarium head blight resistance in two sets of near-isogenic lines of wheat and check cultivars. *Crop Science* 48, 2115–2122.
- Minervini F., Dell’Aquila M. E. (2008). Zearalenone and reproductive function in farm animals. *International Journal of Molecular Sciences*, 9 (12), 2570–84.
- Murray A. A., Thompson W. F. (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res.*, 8:4321–4325
- Musa T., Hecker, A., Vogelgsang S., Forrer H. R. (2007). Forecasting of Fusarium head blight and deoxynivalenol content in winter wheat with FusaProg. *EPPO Bulletin* 37: 283–289.
- Neuhof T., Koch M., Rasenko T., Nehls I., (2008). Distribution of trichothecenes, zearalenone, and ergosterol in a fractionated wheat harvest lot. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56, 7566–7571.
- Paux E., Sourdille P., Salse J., Saintenac C. i in. (2008). A physical map of 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. *Science*, 322: 101–104.
- Perkowski J., Buško M., Stuper K., Kostecki M., Matysiak A., Szwajkowska-Michalek L. (2008). Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia* 63:542–547

- Perkowski J., Wiwart M., Buśko M., Laskowska M., Berthiller A., Kandler S., Krska R. (2007). *Fusarium* toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from northeastern Poland in 2003. *Food Additiv Contam.* 24 (11), 1292–1298.
- Pumphrey M. O., Bernardo R., Anderson J. A. (2007). Validating the *Fhb1* QTL for fusarium head blight resistance in near-isogenic wheat lines developed from breeding populations. *Crop Science*, 47: 200–206.
- Rawat N., Pumphrey M. O., Liu S., Zhang X., Tiwari V. K., Ando K., i in. (2016). Wheat *Fhb1* encodes a chimeric lectin with agglutinin domains and a pore-forming toxin-like domain conferring resistance to *Fusarium* head blight. *Nature Genetics*, 48 (12): 1576–1580.
- Salameh A., Buerstmayr M., Steiner B., Neumayer A., Lemmens M., Buerstmayr H. (2011). Effects of introgression of two QTL for *Fusarium* head blight resistance from Asian spring wheat by marker-assisted backcrossing into European winter wheat on *Fusarium* head blight resistance, yield and quality traits. *Molecular Breeding*, 28 (4): 485–494.
- Snijders C. H. A. (1990). Diallel analysis of resistance to head blight caused by *Fusarium culmorum* in winter wheat. *Euphytica*, 50 (1), 1–9
- Su Z., Bernardo A., Tian B., Chen H., Wang S., Ma H., i in. (2019). A deletion mutation in TaHRC confers *Fhb1* resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Nature Genetics*, 51 (7): 1099–1105.
- Tamburic-Ilincic L., Falk D. E., Schaafsma A. (2011). *Fusarium* ratings in Ontario Winter Wheat Performance Trial (OWWPT) using an index that combines *Fusarium* head blight symptoms and deoxynivalenol levels. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding* 47, 115–122.
- van der Fels-Klerx H. J., Olesen J. E., Madsen M. S., Goedhart P. W. (2012). Climate change increases deoxynivalenol contamination of wheat in north-western Europe. *Food additives & contaminants. Part A, Chemistry, analysis, control, exposure & risk assessment*, 29, 1593–604.
- Von der Ohe C., Ebmeyer E., Korzun V., Miedaner T. (2010). Agronomic and quality performance of winter wheat backcross populations carrying non-adapted *Fusarium* head blight resistance QTL. *Crop Science*, 50 (6): 2283–2290.
- Waldron B. L., Moreno-Sevilla B., Anderson J. A., Stack R. W., Froberg R. C. (1999). RFLP mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop Science*, 39 (3): 805–811.
- Wilde F., Korzun V., Ebmeyer E., Geiger H. H., Miedaner T. (2007). Comparison of phenotypic and marker-based selection for *Fusarium* head blight resistance and DON content in spring wheat. *Molecular Breeding*, 19: 357–370.
- Xu X.-M., Monger W., Ritieni A., Nicholson P. (2007). Effect of temperature and duration of wetness during initial infection periods on disease development, fungal biomass and mycotoxin concentrations on wheat inoculated with single, or combinations of, *Fusarium* species. *Plant Pathol.* 56, 943–956
- Yan W., Li H. B., Cai S. B., Ma H. X., Rebetzke G. J., Liu C. J. (2011). Effects of plant height on type I and type II resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Plant Pathology* 60, 506–512.
- Yoshida M., Nakajima T. (2010). Deoxynivalenol and nivalenol accumulation in wheat infected with *Fusarium graminearum* during grain development. *Phytopathology* 100:763–773.
- Zhou W. C., Kolb F. L., Bai G. H., Domier L. L., Boze L. K., Smith N. J. (2003). Validation of a major QTL for scab resistance with SSR markers and use of marker-assisted selection in wheat. *Plant Breeding*, 122: 40–46.
- Zwart R. S., Muylle H., Van Bockstaele E., Roldán-Ruiz I. (2008). Evaluation of genetic diversity of *Fusarium* head blight resistance in European winter wheat. *Theor. Appl. Genet.* 117: 813–28.



Rys. 1. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 27 genotypów pszenicy ozimej. Składowe wyjaśniają 93,44 zmienności odporności na fusariozę kłosów mierzoną IFK, FDK L oraz akumulacją ergosterolu (ERG), zearlenonu (ZEN) i trichotecenów z grupy B (DON, NIV) w ziarnie z doświadczeń w Poznaniu i Radzikowie w latach 2017 – 2019. Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych.



Rys. 2. Średnia odporność na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie (typ 2 odporności) dla grup genotypów pszenicy. Średnie z doświadczeń w latach 2019 i 2020. Istotność różnic średnich określona za pomocą testu Kruskala-Wallis.

Identyfikacja efektywnych genów odporności na wybrane choroby wirusowe i grzybowe pszenicy zwyczajnej

Identification of effective resistance genes for selected viral and fungal diseases in common wheat

Mirosław Tyrka¹✉, Tadeusz Drzazga², Przemysław Matysik³, Krzysztof Rubrycki⁴, Bogusława Ługowska⁵, Edward Witkowski⁶, Justyna Buczkowicz¹, Semik Małgorzata¹, Dorota Tyrka¹

¹ Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza

² Małopolska Hodowla Roślin

³ Hodowla Roślin Strzelce, Strzelce

⁴ Poznańska Hodowla Roślin, Tulce

⁵ DANKO Hodowla Roślin, Modzurów

⁶ Hodowla Roślin Smolice, Smolice

✉ e-mail: mtyrka@prz.edu.pl

Słowa kluczowe: choroby grzybowe, choroby wirusowe, identyfikacja wirusów, pszenica zwyczajna, selekcja wspomagana markerami

Celem badań była identyfikacja efektywnych genów odporności na wybrane patogeny pszenicy zwyczajnej. Temat był realizowany w następujących etapach: (1) charakterystyka genetyczna zaawansowanych materiałów hodowlanych i odmian pszenicy zwyczajnej wybranymi markerami PCR i DArTseq, (2) charakterystyka fenotypowa stopnia porażenia przez choroby grzybowe, (3) konwersja wybranych markerów DArTseq na system PCR i (4) identyfikacja wirusów.

Celem pierwszego etapu badań była charakterystyka genetyczna pszenicy zwyczajnej w oparciu o wybrane (od 14 do 20) markery genów odpowiedzialnych za istotne rolniczo cechy m.in. wrażliwość na fotoperiod, wymogi wernalizacyjne, tolerancję na choroby grzybowe (*Pm3*, *Yr36*, *Yr17*, *Lr19*, *Lr47* i *Lr51*) i geny kodujące sekaliny. Uzyskane informacje z jednej strony mogły być wykorzystane do planowania krzyżowań i kumulacji korzystnych alleli a z drugiej strony miały służyć do analizy podobieństwa genetycznego i charakterystyki struktury populacji do analiz asocjacyjnych. W celu identyfikacji dodatkowych markerów tolerancji na patogeny w procedurze mapowania asocjacyjnego, odmiany pszenicy i materiały

hodowlane były charakteryzowane również markerami DArTseq. W kolejnym etapie pracy (2), corocznie zakładano doświadczenia porównawcze w celu uzyskania danych fenotypowych dotyczących odporności patogeny grzybowe a w szczególności na rdzę brunatną. W wyniku przeprowadzonych badań nie stwierdzono występowania wirusów odlegowych pszenicy w badanych regionach hodowli, dlatego w tym zakresie nie uzyskano charakterystyki fenotypowej niezbędnej do opracowania markerów tolerancji. Celem trzeciego etapu była konwersja wybranych markerów DArTseq na system PCR. Markery PCR pozwalają na wstępną, taną preselekcję dużej liczby genotypów i odrzucenie próbek o niepożądanym genotypie przed decyzją o skanowaniu całego genomu. Ostatni etap (4) obejmował identyfikację krajowych izolatów wirusów pszenicy (m.in. odlegowych) w roślinach pochodzących z kilku rejonów hodowli pszenicy. Właściwa identyfikacja przyczyn chorób wirusowych jest pierwszym krokiem pozwalającym na podjęcie efektywnych prac hodowlanych. W celu identyfikacji wirusów, amplifikowano metodą PCR fragmenty genomu wirusa kodujące białka otoczki a następnie sekwencjonowano uzyskane produkty.



Materiały i Metody

W latach 2014–2016 podobieństwo genetyczne w określano w grupach 246, 200 i 200 genotypów pszenicy zwyczajnej pochodzących z firm lub instytucji zajmujących się kompleksową oceną fenotypową genotypów pszenicy. DNA izolowano z 2-tygodniowych siewek metodą Milligana (1992). W kolejnych latach genotypy charakteryzowano z wykorzystaniem 14–20 markerów genów odpowiedzialnych za różne cechy rolnicze (Liu i in. 2012). Uzyskiwane produkty rozdzielano na żelu agarozowym lub poliakrylamidowym i wybarwiano odpowiednio roztworem bromku etydyny lub metodą srebrzenia. Podobieństwa pomiędzy genotypami (Dice) określono w programie PAST. Genotypowanie markerami DArTseq przeprowadzono usługowo (Diversity Array Technology, Bruce, Australia) w początkowym etapie projektu na 94 liniach z Kobierzyc a następnie na 188 liniach wybranych spośród genotypów scharakteryzowanych fenotypowo w 2-letnim polowym doświadczeniu 5-stacijnym.

Doświadczenia jednopowtórzeniowe z wzorcem wrażliwym założono w 5 lokalizacjach (Choryń, Antoniny, Kobierzyc, Mikulice i Smolice) dla 200 genotypów pszenicy. Objawy chorób grzybowych, w tym rdzy żółtej i brunatnej, septoriozy liści i mączniaka prawdziwego prowadzono w skali 9-cio stopniowej w warunkach naturalnej infekcji.

Do konwersji na system PCR wykorzystano sekwencje DNA markerów DArTseq, wyselekcjonowanych w latach 2013–2014 na podstawie związku z reakcją na *Puccinia recondita* i innymi chorobami liściowymi (zestaw 94 linii z Kobierzyc) oraz dane z lat 2015–2016 (zestaw 200 linii z 5 lokalizacji).

Do ustalenia asocjacji pomiędzy segregacją markerów a zmiennością fenotypową wykorzystano program Tassel 3.0. W pierwszych latach badań warianty alleliczne różniące się mutacjami punktowymi wykrywano techniką HRM (high resolution melt) na aparacie ECO real-time PCR w obecności barwnika Evagreen. Analiza HRM polegała na wyznaczeniu temperatury topnienia (T_m) produktów reakcji PCR z dokładnością do 0.1°C poprzez pomiar zmian fluorescencji indukowanej zmianami temperatury w zakresie od 55°C do 95°C . W ostatnim roku badań projektowano pary starterów ukierunkowane na zmiany typu insercja-delecja. W pierwszym etapie konwersji zidentyfikowano rejony na mapie genetycznej. Następnie zidentyfikowano odpowiednie rejony na mapie fizycznej IWGSC1 i uzyskiwano fragmenty DNA o wielkości 0.1–5.4 Mbp, które wykorzystano do projektowania starterów w programie Primer-BLAST.

Startery testowano dwustopniowo. Optymalizację reakcji prowadzono na 8 wybranych genotypach a w drugim etapie wybrane oznaczenia kosegregujące z odpowiednimi markerami DArTseq testowano na zestawie 94 linii.

W celu identyfikacji wirusów WSSMV (*Wheat Spindle Streak Mosaic Virus*), SBCMV (*Soil-Borne Cereal Mosaic Virus*), SBWMV (*Soil-Borne Wheat Mosaic Virus*), BYDV (*Barley Yellow Dwarf Virus*) i WDV (*Wheat Dwarf Virus*) wykorzystano metody bazujące na PCR (Robertson i in. 1991, Wyatt i Brown 1996, Fomitchewa i in. 2008). Oznaczenia wirusów wykonywano corocznie na 50 próbach pszenicy zwyczajnej z DANKO, Antonin, Kobierzyc i Smolic. Izolację RNA wykonano z wykorzystaniem zestawów do izolacji całkowitego RNA (GeneMATRIX RNA, Eurx). Odwrotną transkrypcję wykonano ze starterami specyficznymi do fragmentów genów kodujących białka płaszcza wirusów WSSMV, SBCMV, SBWMV i BYDV. Obecność wirusów WSSMV, SBCMV i SBWMV testowano w odniesieniu do próbek referencyjnych otrzymanych od Dr D.Perovica z Instytutu BAZ z Quedlinburga. Wirusy WDV amplifikowano bezpośrednio z DNA wyizolowanego z karłowatych roślin pszenicy. Wybrane fragmenty sekwencjonowano metodą Sangera.

Omówienie wyników

Charakterystyka genetyczna

W latach 2014–2016 określano podobieństwo genetyczne w grupach 246, 200 i 200 genotypów pszenicy zwyczajnej. Wybrane markery funkcjonalne bazowały na sekwencjach genów warunkujących określone cechy fenotypowe. Wśród analizowanych materiałów stwierdzono różnice w loci Ppd-D1 i Vrn-D1. Allele dominujące *Ppd-A1a*, *Ppd-B1a* i *Ppd-D1a*, zlokalizowane na krótkich ramionach chromosomów 2A, 2B i 2D warunkują niewrażliwość na fotoperiod. Zmienność w genach wernalizacji jest związana z datą kłoszenia. Pozostałe markery funkcjonalne bazowały na genach odporności na rdzę brunatną (*Lr19*, *Lr47*, *Lr51*), mączniaka prawdziwego (*Pm3d*) i rdzę żółtą (*Yr17*, *Yr36*).

W wyniku analizy DArTseq dwóch zestawów 94 genotypów w latach 2015 i 2016 uzyskano odpowiednio 23152 i 20468 markerów SNP oraz 52255 i 33037 SilicoDArT. Uzyskane dane genotypowe połączono uzyskując segregacje dla markerów wspólnych dla obu matryc. Adnotacje odnośnie lokalizacji genetycznej markerów w obu panelach danych różniły się i do celów analizy stworzono mapy konsensusowe.

Charakterystyka fenotypowa

Materiały scharakteryzowane genotypowo były przedmiotem dwóch doświadczeń porównawczych. Pierwsze doświadczenie na zestawie 94 linii z Kobierzyc było zainicjowane w ramach przedniego zadania badawczego w latach 2012–2013 i zakończone w roku 2014. Drugie, 2-letnie doświadczenie jednopowtórzeniowe z wzorcem wrażliwym realizowano łącznie na 200 genotypach pochodzących z 5 ośrodków hodowlanych. W obu doświadczeniach, we wszystkich lokalizacjach stwierdzono wysokie różnicowanie pod względem reakcji na *Puccinia triticina*. Przy braku sztucznej inokulacji odziedziczalność stopnia porażenia przez *P. triticina* wyniosła 25% (tab. 1).

Konwersja wybranych markerów

Dane o segregacji 15635 markerów DArTseq o znanej lokalizacji na mapie genetycznej pszenicy i charakterystykę fenotypową 188 genotypów wykorzystano do analizy asocjacji GLM (General Linear Model). Do konwersji wybrano 267 sekwencji (zlokalizowanych w 9 rejonach) o istotnym związku z nasileniem rdzy brunatnej. Metodę HRM wykorzystano do wstępnej weryfikacji związku zmienności obserwowanej w sekwencji z oczekiwaną segregacją markerów DArTseq. W latach 2014–2015 na 48 zaprojektowane oznaczenia jedynie trzy kosegregowały w zestawie 94 linii całkowicie z odpowiednimi markerami DArTseq wykorzystanym do zaprojektowania starterów (tab. 2). W roku 2016 zmieniono strategię projektowania starterów stosując metodę analogiczną do chodzenia po chromosomie (chromosome walking) *in silico*, która polega na wyszukiwaniu zachodzących na siebie sekwencji z uwzględnieniem homeologii chromosomów tak, aby dotrzeć do rejonów zawierających zmienność typu insercja-delecja. Dzięki zmienionemu podejściu udało się przekonwertować 4 markery DArTseq na łatwy do wykorzystania system PCR (tab. 2). Występowanie wybranych markerów było istotnie skorelowane ze spadkiem oceny stopnia porażenia przez rdzę brunatną i żółtą w badanych kombinacjach środowisk i lat, a zatem markery mogą służyć do wczesnej eliminacji roślin o niekorzystnym genotypie.

Identyfikacja wirusów

Identyfikację wirusów wykonywano corocznie w 50 próbkach z objawami mozaiki lub karłowatości. W latach 2014–2016 nie wykryto w badanych materiałach wirusów WSSMV, SBCMV i SBWMV, przez co nie można było założyć doświadczeń w celu oceny tolerancji badanych genotypów

na te wirusy. Poprawność stosowanej metodyki potwierdzono na próbkach referencyjnych. Przyczyną karłowatości we wszystkich badanych roślinach był wirus WDV. Ponadto, stwierdzono niską częstość występowania próbek z wirusem BYDV (typ PAV), który wykryto wraz z wirusem WDV w 4 próbkach. Do sekwencjonowania wybrano materiał roślinny zainfekowany wirusami BYDV lub WDV. Uzyskano sekwencje fragmentów wirusów WDV z 25 roślin pochodzących z 8 lokalizacji. W ramach kontynuacji badań, genom wirusa WDV amplifikowano metodą toczącego się koła i zsekwencjonowano w całości.

Wnioski

1. Charakterystyka materiałów markerami funkcjonalnymi może być przydatna do obliczenia matrycy podobieństw i selekcji genotypów o pożądanej charakterystyce.
2. Konwersja markerów z systemu DArTseq na system PCR jest trudnym zadaniem głównie ze względu na ograniczenia co do długości sekwencji DArTseq, położenie SNP w obrębie tej sekwencji, poliploidalność pszenicy oraz wysoką zmienność w sekwencjach DNA kodujących domeny białkowe charakterystyczne dla genów odporności. Zaproponowana strategia chodzenia po chromosomie *in silico* w celu identyfikacji rejonów z insercjami-delecjami była bardziej skuteczna niż wykorzystanie mutacji pojedynczych nukleotydów do opracowania markerów HRM.
3. W wyniku 3 letnich badań, można stwierdzić, że główną przyczyną wypadania roślin w szkółkach był wirus WDV przenoszony przez skoczki. W badanych próbkach nie zidentyfikowano wirusów odglebowych. Polskie populacje wirusa WDV cechują się dużą zmiennością genetyczną.

Osiągnięcia projektu

1. W efekcie konwersji markerów opracowano 3 markery typu HRM i 4 markery typu STS-PCR, które mogą być wykorzystane do selekcji (głównie negatywnej) genotypów o obniżonej odporności na rdzę brunatną i żółtą w stadium rośliny dojrzałej. Opracowane markery SNP mogą być adaptowane do nowszych wydanych systemów selekcyjnych bazujących na amplifikacji współwodniczącej
2. Uzyskano wartościowe dane fenotypowe przydatne do obliczeń asocjacji i identyfikacji efektywnych markerów odporności na rdzę

brunatną. Badane materiały cechowały się wysoką zmiennością pod względem reakcji na *Puccinia triticina*.

Wykaz publikacji wyników

Publikacja: Tyrka M., Drzazga T., Kud J., Miechurska V., Broda M., Kopala M. 2017. Association mapping of effective leaf rust resistance genes in collection of winter wheat. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech.* 332(41)1, 93–106.

Literatura

Fomitcheva V, Kastir U, Habekuss A, Kühne T. (2008) Diagnostic multiplex RT-PCR analysis for the detection of soil-borne mosaic viruses and their natural vector *Polymyxa graminis*. Proc. the Seventh Symposium

Of The International Working Group On Plant Viruses With Fungal Vectors. Quedlinburg, Germany September 1–4, 2008.

Liu Y, He Z, Appels R, Xia X (2012) Functional markers in wheat: current status and future prospects. *Theor Appl Genet* 125:1–10.

Milligan BG. (1992) Plant DNA isolation. In *Molecular analysis of populations: a practical approach*. Edited by AR Hoelzel. IRL Press, Oxford. pp. 59 – 88.

Robertson NL, French R, Gray SM. (1991) Use of group-specific primers and the polymerase chain reaction for the detection and identification of luteoviruses. *J Gen. Virol.*, 72: 1473–1477.

Wyatt SD, Brown JK. (1996) Detection of subgroup III geminivirus isolates in leaf extracts by degenerate primers and polymerase chain reaction. *Phytopathol* 86: 1288–1293.

Tabela 1

Statystyki podstawowe ocenianych cech fenotypowych: Yr – rdza żółta, Lr – rdza brunatna, WYS – wysokość roślin, KLO – liczba dni do kłoszenia, SL – septorioza liści, Pm – mączniak.

Cecha	Rok	Lokalizacja	średnia	min	max	SD	h ²			
Yr	2015*	KOB***	8.2	4	9	1.22	0.0			
		MIK	8.7	2	9	0.84				
		ANT	8.5	5	9	0.99				
		SMO	7.5	0	9	1.92				
		DAN	8.4	2	9	1.52				
	2016	KOB	8.2	3	9	1.26				
		MIK	8.8	3	9	0.79				
		DAN	8.5	5	9	1.12				
		Lr***	2015*	KOB	7.7	5		9	1.06	25.1
				MIK	7.5	2		9	1.64	
ANT	8.1			3	9	1.49				
SMO	8.4			1	9	1.64				
DAN	6.4			3	9	1.67				
2016	KOB		6.4	4	9	1.08				
	MIK		6.9	2	9	1.61				
	ANT		7.7	4	9	0.99				
	DAN		7.6	1	9	1.47				
	SL***		2015	MIK***	6.2	1	8	0.94	5.5	
2016		MIK	6.2	1	9	1.13				
		ANT	7.1	4	9	1.02				
Pm	2015	ANT*	7.9	3	9	1.45	21.7			
	2016	ANT	8.1	4	9	1.09				
		DAN	8.5	5	9	1.18				
WYS***	2015	KOB***	88.6	70	110	8.57	8.4			
		MIK	86.3	65	108	7.64				
		ANT	98.2	75	123	10.46				
	2016	KOB	90.9	67	120	11.40				
		ANT	98.7	75	125	9.57				
		DAN	98.7	75	125	9.57				
KLO***	2015	KOB***	147.0	138	152	2.24	24.6			
		DAN	147.8	142	153	2.03				
	2016	KOB	149.3	142	153	1.50				
		ANT	147.8	142	152	1.93				
		DAN	146.3	138	151	1.90				
		DAN	146.3	138	151	1.90				

Istotność czynników genotyp, rok i lokalizacja * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$.

Tabela 2

Markery DArTseq przekonwertowane na system HRM i STS-PCR.

Nr DArTseq	marker PCR	Typ	Startery	Zgodność segregacji	Korelacja z DArTseq
1407802	1407802-2AL	HRM	GCAGCTGCGTCACGGT CGATCAACCCGTACTIONCGCGC	91/94	1.000
100007699	100007699-4AL	HRM	CAGGTAATCAAGTTCTCCACCT CAGGCGTGGGTATTGACTG	91/94	1.000
1387990	TaLr1387990	HRM	GGAGGGCCGACGGA AGCAAGACGCCTATGCTTGA	93/94	0.965
1211390	2A-R5-4-1F	STS	CAATGGGACACGAAAGTGCC AGCTACAACCTATGAGGCCAACC	88/94	0.831
1107688	2A-R2-1F	STS	CAAGTTATGCAAGTTGGACCC TTCTTTGGGTTTCGGCCAGT	89/94	0.889
1067107	2A-R3-2-2F	STS	GTGCCTGAACACCGAATAATGT ATTGCGTGTGCCTGTGACGA	88/94	-0.843
1211390	2S-R3-3-2F	STS	ACGAGTGATCAATGGAATGACTTT ATTTGCGCTGGGATCATCA	90/94	0.869

Tolerancja na stresy abiotyczne – genotypowanie pszenicy w oparciu o strategię genów kandydujących

Abiotic stress tolerance – genotyping of wheat based on candidate gene strategy

Yuliya Kloc, Marta Dmochowska-Boguta, Przemysław Werecki,
Wacław Orczyk✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: w.orczyk@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: analiza funkcjonalna, markery mikrosatelitarne SSR, mikrosporogeneza, plonowanie, stres suszy

Susza w krytycznej fazie kłoszenia (np. krótka susza wiosenna) powoduje zaburzenia mikrosporogenezy, czego efektem są martwe ziarna pyłku, złe wypełnienie kłosów i znacznie obniżony plon. Nadrzędnym celem projektu była identyfikacja zmienności genetycznej potencjalnie sprzężonej z tolerancją pszenicy na suszę, ocenianą na podstawie żywotności pyłku i stopnia zawiązywania ziarniaków w kłosie.

Cele etapowe projektu

1. Analiza cytologiczna mikrosporogenezy oraz ocena fenotypowa stopnia zawiązywania ziarniaków różnych genotypów pszenicy w warunkach stresu. Cel osiągnięto. Zgromadzono 112 genotypów pszenicy, z których do badań wybrano 36 pochodzących z różnych regionów klimatyczno-glebowych na świecie. Wskazano stadia rozwoju kłosów i skoordynowano z nimi kolejne fazy mikrosporogenezy w warunkach normalnych i stresie suszy w zróżnicowanej populacji genotypów.
2. Identyfikacja genów kandydujących biorących udział w regulacji procesów rozwojowych kłosa i warunkujących odpowiedź na stresy środowiskowe. Cel osiągnięto. Wytypowano ponad 26 genów potencjalnie zaangażowanych w reakcję mikrosporogenezy na suszę. Zidentyfikowano homeologi tych genów w subgenomach A, B i D pszenicy, poznano ich strukturę, sekwencje kodujące oraz warianty splicingowe.
3. Analiza wybranych genów i weryfikacja ich udziału w mikrosporogenezie w zbadanych genotypach pszenicy. Cel osiągnięto. Analiza

- ekspresji genów kandydujących w pylnikach roślin kontrolnych i po stresie suszy w genotypach o skrajnej (najsilniejszej i najsłabszej) tolerancji potwierdziły udział praktycznie wszystkich wytypowanych genów w odpowiedzi pylników na stres. Do dalszych etapów wybrano gen inwertazy *TaInvl*.
4. Identyfikacja zmienności genów kandydujących oraz weryfikacja związku tej zmienności z wybranymi cechami fenotypowymi. Cel osiągnięto. Zidentyfikowano skafoldy genomu pszenicy zawierające homeologi genu *TaInvl*. Analiza tych skafoldów wykazała obecność kilkudziesięciu sekwencji repetytywnych. Dwie sekwencje SSR *Reg 23–404* i *Reg 35–404* wykazały polimorfizm długości w 30 badanych genotypach. Najkrótsze formy SSR *Reg 23–404* (GA)₁₂ i (GA)₁₇ obecne w odmianach o najwyższej tolerancji mikrosporogenezy na krótkotrwały stres suszy mogą być markerem molekularnym cechy podwyższonej tolerancji na suszę wynikającej ze zwiększonej żywotności pyłku i wyższego współczynnika wypełnienia kłosów w roślinach poddanych stresowi.

Materiał i Metody

Materiał biologiczny

Zebrano 112 genotypów pszenicy: 24 linie i odmiany z Maize Research Institute, Belgrade, Serbia; 2 odmiany Chinese Spring i SQ1 oraz 4 linie rekombinacyjne tych odmian, 82 genotypy z Krajowego Centrum Zasobów Genowych, IHAR-PIB, Radzików. Genotypy te pochodziły z różnych regionów klimatyczno-glebowych na świecie. Do doświadczeń wybrano 36



genotypów pochodzących z różnych regionów i reprezentujących potencjalnie szeroki zakres reakcji badanej cechy tj. zaburzeń mikrosporogenezy i niepłodności pyłku na krótkotrwały stres suszy.

Metody badawcze

1. Fenotypowanie stresu suszy: fenotypowa identyfikacja faz rozwojowych kłosa i stopnia wypełnienia kłosów oraz metody cytologiczne badań mikrosporogenezy i żywotności pyłku.
2. Identyfikacja genów kandydujących: bioinformatyczna analiza genomowych baz pszenicy NCBI, EnsemblePlants, analizy bioinformatyczne do składania i analizy sekwencji nukleotydowych w tym m.in.: pakiet LaserGene (DNASar), BLAST, programy do projektowania starterów, programy do całogenomowej identyfikacji i analizy sekwencji repetytywnych: GAMATA (Genome-wide Microsatellite Analyzing Toward Application), <http://tandem.bu.edu/trf.html>; ISFD (Imperfect SSR Finder Documentation) <https://ssr.nwisrl.ars.usda.gov/>; SSRIT (Simple Sequence Repeat Identification Tool) <http://www.gramene.org/db/searches/ssrtool>; TRF (Tandem Repeat Finder) <http://tandem.bu.edu/trf.html>.
3. Metody biologii molekularnej roślin w tym m.in.: izolacja DNA i RNA, synteza cDNA, reakcje PCR i RT-PCR z pomiarem w czasie rzeczywistym, elektroforeza w żelach agarowych i PAGE.

Opis wyników

Wyniki analiza cytologicznej mikrosporogenezy wykazały, że stadium Auricle Distance (AD) 5–8 cm rozwoju rośliny i kłosów odpowiada mejozie mikrosporogenezy i jest odpowiednie do badań oddziaływania suszy na mikrosporogenezę. Obserwowane duże zróżnicowanie żywotności pyłku w roślinach tych samych genotypów poddanych stresowi suszy wskazywała na negatywny efekt stresu na przebieg mikrosporogenezy oraz zróżnicowanie tej reakcji zależne od genotypu. Współczynnik wypełnienia kłosa (WKS/WKk) był pozytywnie skorelowany z żywotnością pyłku. Wytypowano 26 genów potencjalnie ważnych w reakcji mikrosporogenezy na suszę. Geny *TaInv* kodujące inwertazy apoplastyczną i wakuolarną wykazały przeciwstawny wzór ekspresji w pylnikach, co wskazywało na ich różny udział w odpowiedzi na suszę. Podobnie wzór ekspresji czterech klonów *TaTPS* potwierdził ich rolę reakcji mikrosporogenezy suszę. Obserwowana represja *TaDIS1* w odmianie o najwyższej tolerancji

na suszę wskazała rolę tego genu, jako negatywnego regulatora reakcji na suszę. W genomie pszenicy (z bazy Ensemble Plants) zidentyfikowano skafoldy (o długości od 40 000 do 400 0000 pz) z genami *TaInv1*. Analiza *in silico* wykazała obecność licznych regionów z powtórzeniami 2- i 3-nukleotydowymi. W 3 skafoldach pszenicy zawierających wybrany gen kandydujący *TaInv1* sekwencjonowano 9 regionów SSR. Były to Reg29–404 zawierający motyw (CT)₂-AC- (CT)₆ i zlokalizowany w skafoldzie 4041295BL, Reg32–404 zlokalizowany w skafoldzie 4041295BL zawierający motyw (CAGC)₃- (AAGA)₅, Reg35–404 w skafoldzie 4041295BL zawierający SSR z motywem (AG), Reg41–404 w skafoldzie 4041295BL zawierający motyw (GGC)₅- (GCG)₅ oraz Reg3–435 w skafoldzie 4356405DL z motywem (GAT)₁₀- (GAA)₉. Najwięcej SSR było na najdłuższym skafoldzie 4041295BL, zagęszczenie SSR wyniosło 1 SSR na około 10 tpz. Zagęszczenie na 2 pozostałych było ponad 2x mniejsze. Wytypowano SSR leżące w pobliżu genu *TaInv1* i eksperymentalnie zbadano ich polimorfizm we wcześniej testowanych genotypach pszenic. Z wytypowanych 28 SSR, amplikony uzyskano w 14 a w 3 potwierdzono polimorfizm długości w wybranych genotypach pszenic. Dwa regiony 23–404 oraz 35–404 analizowano w 30 genotypach pochodzących z różnych regionów klimatyczno-glebowych i zróżnicowanej tolerancji mikrosporogenezy na stres suszy. W tych genotypach regiony 23–404 i 35–404 wykazały polimorfizm długości motywów (AG) i (GA). Liczba powtórzeń motywu (AG) w 35–404 wynosiła od 17 do 21 natomiast liczba powtórzeń (GA) w 23–404 była bardziej zróżnicowana i wynosiła od 12 do 59. Tak znaczne różnice zmienności wskazuje na dużą dynamikę zmian molekularnych i zróżnicowanie ewolucyjne. Z tego względu polimorfizm tego regionu może być markerem molekularnym cech kodowanych przez sprzężone z nim geny.

Analiza wyników sekwencjonowania potwierdziła (i) obecność regionów SSR oraz (ii) polimorfizm długości tych SSR w badanych genotypach pszenic. Bardzo duża zgodność sekwencji nukleotydowych uzyskana dla praktycznie wszystkich amplikonów i badanych genotypów pszenic wskazuje, że wybrana strategia eksperymentalna pozwala uzyskać wiarygodne i wewnętrznie spójne wyniki analizy sekwencji mikrosatelitarnych w bardzo dużym i złożonym (tj. alloheksaploidalnym) genomie pszenicy. Współczynniki wypełnienia kłosów w warunkach stresu suszy są zbieżne z charakterystyką polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnej (AG) w regionie 35–404 zlokalizowanym

w odległości około 13 tpb od genu *TaInv1*, co może wskazywać na pełne genetyczne sprzężenia obydwu regionów. Dwa najkrótsze SSR 23–404 tj. (GA)₁₂ i (GA)₁₇ zidentyfikowano w odmianach Rusalka i Albena charakteryzujące się wysoką lub bardzo wysoką tolerancją mikrosporogenezy na suszę. Biorąc pod uwagę rolę *TaInv1* w przebiegu mikrosporogenezy oraz wyniki ekspresji w odmianach o skrajnej reakcji na stres suszy można przypuszczać, że polimorfizm 35–404, regionu sprzężonego z *TaInv1* może być markerem wyższej tolerancji na suszę wynikającej z dużej żywotności pyłku i wysokiego współczynnika wypełnienia kłosów w roślinach poddanych stresowi suszy.

Wnioski

1. Stadium rozwoju (AD) 5–8cm było odpowiednie do badania oddziaływania stresu suszy na mikrosporogenezę.
2. Współczynnik wypełnienia kłosa (WKs/WKk) był pozytywnie skorelowany z żywotnością pyłku.
3. Żywotność pyłu i współczynnik wypełnienia kłosa (WKs/WKk) w warunkach krótkotrwałego stresu suszy są zależne od genotypu.
4. Geny metabolizmu węglowodanów (*TaInv*, *TaTPS*) są ważne w reakcji mikrosporogenezy na stres suszy.
5. Duże zróżnicowanie polimorfizmu różnych SSR w jednym skafoldzie pszenicy wskazuje na dynamikę zmian molekularnych i duże zróżnicowanie ewolucyjne tych SSR.
6. Dwa najkrótsze SSR 23–404 (GA)₁₂ i (GA)₁₇ położone w skafoldzie 4041295BL w sąsiedztwie genu *TaInv1* mogą być markerem dużej żywotności pyłku i wysokiego współczynnika wypełnienia kłosów w roślinach poddanych stresowi suszy.

Osiągnięcia projektu

1. Zebranie kolekcji 112 genotypów pszenicy oraz zbadanie tolerancji mikrosporogenezy na stres suszy w 36 genotypach pszenic pochodzących

z różnych regionów klimatyczno-glebowych na ziemi.

2. Wskazanie optymalnej fazy rozwoju rośliny pszenicy do badania oddziaływania krótkotrwałej suszy na przebieg mikrosporogenezy, żywotność pyłku i stopień wypełnienia kłosów.
3. Wytypowanie genów pszenicy kodujących enzymy metabolizmu węglowodanów, których wzór ekspresji potwierdził udział w reakcji pylników/mikrosporogenezy na krótkotrwały stres suszy.
4. Identyfikacja skafoldów genomu pszenicy z ww. genami i identyfikacja sekwencji repetytywnych w tych regionach.
5. Wskazanie, że jedna z sekwencji SSR może być markerem dużej żywotności pyłku i wysokiego współczynnika wypełnienia kłosów w roślinach poddanych stresowi suszy.
6. Opracowanie warsztatu eksperymentalnego wyżej opisanego cyklu badan: analiz cytologicznych mikrosporogenezy, fenotypowania krótkotrwałego stresu suszy, całogenomowych analiz genomu pszenicy, identyfikacji sekwencji SSR i ich polimorfizmu oraz korelowania tego polimorfizmu z cechami fenotypowymi.

Wykaz publikacji wyników

- Yanushevskaya Y., Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. 2015. Fenotypowa i cytologiczna reakcja roślin pszenicy na krótkotrwały stres suszy w trakcie kłoszenia. Streszczenia Konferencyjne „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, 2015, 02–06 luty, str. 373–375.
- Orczyk W., Yanushevskaya Y., Nadolska-Orczyk A. 2015. Zaburzenia mikrosporogenezy wywołane stresem abiotycznym istotnie ograniczają produktywność zbóż. Streszczenia Konferencyjne „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, 2015, 02–06 luty, str. 109–111.
- Yuliya Yanushevskaya Y., Groszyk J., Nadolska-Orczyk A., Orczyk W. Microsporogenesis and drought tolerance of wheat. Eucarpia General Congress, 29Aug – 1 Sep 2016. ETH Zurich, Szwajcaria. Abstract book str.197.

Efektywność piramidowania genów odporności na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) i rdzę brunatną (*Puccinia triticina*) w pszenicy ozimej

Pyramiding efficiency of the genes of resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) and leaf rust (*Puccinia triticina*) in winter wheat

Aleksandra Pietrusińska✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, 05–870 Błonie
✉ e-mail: a.pietrusinska@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: geny odporności, hodowla odpornościowa, gen *Lr55*, markery molekularne, mączniak prawdziwy zbóż i traw, piramidowanie genów, pszenica ozima, rdza brunatna zbóż i traw

W ramach zadania w latach 2014–2020 realizowane były 3 tematy badawcze:

- **Temat badawczy 1.** Piramidowanie efektywnych genów odporności
- **Temat badawczy 2.** Poszukiwanie nowych źródeł odporności
- **Temat badawczy 3.** Ocena linii w różnych warunkach środowiskowych

Ad. 1. Temat badawczy 1. Piramidowanie efektywnych genów odporności

Cel

- Przeprowadzenie krzyżowań zbieżnych oraz wstecznych.
- Wykonanie selekcji fenotypowej oraz molekularnej materiału roślinnego pod kątem obecności wprowadzonych genów odporności.
- Wyznaczenie polimorficznych markerów do selekcji materiału roślinnego pod kątem obecności genu *Lr55*.

Wszystkie cele zostały osiągnięte w 100%.

Materiały i Metody

1. Źródła odporności na rdzę brunatną zbóż i traw:
 - linia KS90WGRC10, *Triticum tauschii* (syn. *Aegilops tauschii*, *Aegilops squarrosa*), gen odporności *Lr39* (= *Lr41*).
 - linia HRS Yecora Rojo – UC996610010, *Triticum speltoides*, gen odporności *Lr47*.
 - linia KS04WGRC45, *Elymus trachycaulis*, gen odporności *Lr55*.

2. Źródła odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw:

- linia 6VS/6AL Yangmai 5, *Haynaldia villosa* (syn. *Dasyphyrum villosum*), gen odporności *Pm21*.
- linia NC97BGTD7, *Triticum tauschii* (syn. *Aegilops tauschii*, *Aegilops squarrosa* L.), gen odporności *Pm34*.
- linia NC99BGTA11, *Triticum timophevii* subsp. *Armeniacum*, gen odporności *Pm37*.

3. Odmiany:

- Bogatka, Nadobna, Lexus, Meteor oraz linia RAH979, o wysokiej wartości gospodarczej, wysokoplonujące, ale podatne na populacje *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* oraz *Puccinia triticina* f.sp. *tritici*
- Hondia, Formacja, RGT Bilanz, Euforia (rodzic wsteczny), odmiany wpisane do krajowego rejestru odmian COBORU, grupa pszenic jakościowych, odpowiednio: A, A, B, A.

4. Dwie populacje mapujące: F₂ (Bogatka×*Lr55*), (Nadobna×*Lr55*).

5. Izolacja DNA: metoda CTAB oraz w obecności buforu TPS.

6. Reakcja amplifikacji:

- Gen *Lr41*: Gdm35 (170 pz), Barc124 (250 pz), Gwm210 (182 pz), Gwm296 (135 pz), Gwm261 (160–200pz)
- Gen *Lr47*: (PCAPSR+PS10L+PS10L2) (280 pz), Gwm60 (180–220 pz)
- Gen *Lr55*: 172 SSR, 60 DaT
- Gen *Pm21*: NAU/xibao (902 pz)



- Gen *Pm34*: Barc177 (130 pz), Barc144 (235 pz)
- Gen *Pm37*: Gwm332 (192 pz), Wmc790 (149 pz), STSBE406627 (550 pz) STSBE445653 (750 pz)

Opis wyników

Selekcja fenotypowa i molekularna populacji mieszańcowych BIO pozwoliła na wytypowanie linii o określonych piramidach genowych (Tab. 1). W zależności od etapu prowadzonych badań, przeprowadzano krzyżowania zbieżne oraz wsteczne. Jako donor odporności wykorzystywano efektywne źródła odporności na rdzę brunatną zbóż i traw oraz mączniaka prawdziwego zbóż i traw. Po każdym z krzyżowań w stadium drugiego liścia przeprowadzono inokulację roślin wykorzystując dwa różnicujące izolaty *B. graminis* oraz *P. tritricina*. Na podstawie oceny fitopatologicznej do badań molekularnych wyselekcjonowano łącznie 300 linii, jednocześnie odpornych na oba patogeny. Selekcja fenotypowa i molekularna populacji mieszańcowych BIO pozwoliła na wytypowanie linii jednocześnie odpornych na oba patogeny. Wyselekcjonowane linie stanowiły obiekty wytypowane do dalszych badań. Końcowe wyniki pozwoliły na uzyskanie 12 kombinacji piramid genowych, łącznie to 94 linie (Tab. 1). Wyselekcjonowane linie będą systematycznie rozmnażane i przekazane do Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w IHAR-PIB w Radzikowie.

W realizowanym projekcie podjęto się próby zmapowania genu *Lr55* w dwóch populacjach mapujących. Przeprowadzone analizy potwierdziły, że gen *Lr55* jest zlokalizowany na chromosomie 1BS w rejonie 14.3 a 30.7cM na mapie genetycznej, który to fragment jest prawdopodobnie związany z rejonem syntenicznym do *Elymus trachycaulis*. Analizy segregacji dla populacji F (Bogatka×*Lr55*) oraz (Nadobna×*Lr55*) były niejednoznaczne. Dlatego też, w oparciu o wspólne wyniki sporządzono jedną mapę genetyczną [(Bogatka×*Lr55*)² (Nadobna×*Lr55*)], na podstawie której markerami flankującymi gen odporności *Lr55* (141.2cM) są dwa markery mikrosatelitarne *Gwm374* (132.9cM) oraz *Wmc406* (156.0cM). Uzyskane wyniki są w trakcie publikacji.

Dyskusja

Pszenica odgrywa bardzo ważną rolę na całym świecie. Prognozy wskazują, że zmiany klimatyczne mają już negatywny wpływ na produkcję pszenicy. Szacuje się że do 2050 r. produkcja tego zboża zmniejszy się o 29–34%. Zbiegnie się to w czasie ze znacznym wzrostem popytu na te

zboże (Savary i in. 2011). W obliczu prognozowanego wzrostu ludzkości, wrażliwość światowej produkcji roślinnej na zmiany klimatu może stanowić dodatkowe zagrożenie dla światowego bezpieczeństwa żywnościowego. Dlatego też rozwój badań nad odmianami pszenicy dostosowanymi do zmieniającego się klimatu ma obecnie największe znaczenie dla zapewnienia globalnego i lokalnego bezpieczeństwa żywnościowego. Zmiany klimatyczne zagrażają plonom, zarówno bezpośrednio poprzez zmiany w plonowaniu, jak i pośrednio poprzez wpływ chorób roślin. Odmiany o zwiększonej tolerancji na stres termiczny i suszę, jak również odporne na szkodniki i choroby, są kluczowym czynnikiem w radzeniu sobie z obecną zmiennością klimatu i dostosowywaniu się do trwających zmian klimatycznych. Według Newbery et al. (2016) choroby upraw powodują na całym świecie straty w uprawach niechronionych szacowane na 16%. Dlatego też zwalczanie chorób roślin ma do odegrania kluczową rolę w zapewnieniu wysokich plonów i bezpieczeństwa żywnościowego w przyszłości. Zapobieganie niekorzystnemu wpływowi zmian klimatycznych na produkcję roślinną opiera się na uprawie roślin mającej na celu odporność na stres abiotyczny i biotyczny. Dlatego też, ogromne wyzwania stawiane są hodowli odpornościowej, która łączy w sobie elementy genetyki klasycznej oraz molekularnej dając w ten sposób szeroki wachlarz rozwiązań, które z powodzeniem wykorzystywane są w programach hodowlanych. Głównym kierunkiem prowadzonych programów hodowlanych jest uzyskanie zdrowego ziarna wraz z jak najwyższym plonem przy jednoczesnym ograniczeniu stosowania środków ochrony roślin. Należy pamiętać, że uprawa odmian o korzystnych cechach gospodarczych, ściśle związana jest z odpornością uprawianych odmian na choroby grzybowe oraz wirusowe. Uzyskane linii/odmian, które łączą w sobie wszystkie te cechy jest niezmiernie trudnym do zrealizowania celem. Głównym celem w zadaniu badawczym 1 było przede wszystkim stworzenie różnych kombinacji efektywnych piramid genów odporności na rdzę brunatną zbóż i traw oraz mączniaka prawdziwego zbóż i traw. Większość zaplanowanych segmentów odpornościowych na drodze krzyżowań zbieżnych oraz wstecznych udało się uzyskać. Jednak na podstawie uzyskanych wyników w 2020 roku nie udało się uzyskać kombinacji piramid genowych składających się z 4 genów i więcej. Prawdopodobnie może być to związane zbyt małą liczbą selekcjonowanych prób roślinnych oraz rozszczepianiem się

genów w kolejnym pokoleniu. Natomiast w literaturze można znaleźć wiele przykładów piramid genowych uzyskanych w odmianach pszenic tj.: (*Pm1+Pm2+Pm9+Pm4b*), (*Pm1+Pm3d+Pm4b*), (*Lr27+Lr31*), (*Lr34+Lr48*), (*Lr34+Lr49*), (*Lr13+Lr34+Yr18*), (*Lr3+Lr17+Lr23+Lr* nieokreślony), (*Lr3+Lr10+Lr17+Lr* nieokreślony), (*Lr13+Lr26+Lr* nieokreślony) (Kowalczyk i in., 1998; Singh i in., 1984; Kolmer, 1996; Huerta-Espino i in., 2009; Saini, 2002; Hysing i in., 2006). Przykładów piramidyzacji o profilu (*Lr+Pm*) do tej pory jest mało. Dlatego też, uzyskane w projekcie genotypy o różnych segmentach odpornościowych stanowią cenny materiał roślinny.

Wnioski

1. W wyniku krzyżowań tradycyjnych możliwe jest wprowadzenie do odmian pszenic uprawnych efektywnych genów odporności pojedynczo oraz w różnych segmentach odpornościowych.
2. Piramidowanie kilku genów odporności w jednym genotypie jest w możliwe, ale w tym celu trzeba poddać selekcji bardzo dużą liczbę roślin.
3. Selekcja molekularna przy wykorzystaniu markerów DNA skutecznie identyfikuje w materiale roślinnym wprowadzane geny odporności.
4. W oparciu o wspólną mapę genetyczną wyznaczono dwa markery molekularne flankujące gen *Lr55*: *Gwm374* oraz *Wmc406*.
5. Dodatkowe markerowanie z wykorzystaniem technologii sekwencjonowania nowej generacji pozwoli na dokładniejszą analizę lokalizacji genu *Lr55* i identyfikację genów kandydujących.
6. Wyselekcjonowane markery molekularne mogą być punktem wyjścia do selekcji materiału roślinnego na obecność genu *Lr55*.

Ad.2. Temat badawczy 2. Poszukiwanie nowych źródeł odporności

Cel

We wszystkich latach realizacji tematu głównym celem tematu badawczego 2 było poszukiwanie nowych, potencjalnie efektywnych źródeł odporności na choroby grzybowe, czyli mączniaka prawdziwego zbóż i traw oraz rdzę brunatną zbóż i traw. Celem prowadzonych badań było również rozmnożenie materiału roślinnego, niezbędnego do przeprowadzenia doświadczeń fitopatologicznych przy wykorzystaniu specyficznych izolatów różnicujących.

Wszystkie cele zostały osiągnięte w 100%.

Materiały i Metody

Materiał roślinny w temacie badawczym 2 we wszystkich latach realizacji tematu stanowił zestaw odmian różnicujących na rdzę brunatną zbóż i traw oraz na mączniaka prawdziwego zbóż i traw. Zestawy stanowiły wzorce reakcji wykorzystywane do oceny relacji w odniesieniu do nowych źródeł odporności, które były systematycznie pozyskiwane z banków genów w każdym roku realizacji projektu. Ponadto materiał roślinny w 2019 oraz 2020 roku stanowiły dawne odmiany pszenic, które pochodziły z Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych IHAR-PIB. Szczegółowe pochodzenie wszystkich badanych źródeł opisano w końcowych sprawozdaniach. Ponadto wszystkie doświadczenia fitopatologiczne przeprowadzone były w warunkach kontrolowanych w szklarni oraz fitotronie.

Wyniki

Na podstawie przeprowadzonych testów fenotypowych określono reakcją badanego materiału roślinnego na zestaw izolatów *P. tritricina* oraz *B. graminis*. Doświadczenia fitopatologiczne obejmujące ocenę źródeł odporności pod kątem reakcji na populację *P. tritricina* potwierdziły, że za efektywne źródła odporności można zaliczyć linie z genami: *Lr9*, *Lr34*, *Lr19*, *Lr41* (= *Lr39*), *Lr55*, *Lr62* oraz *KS11WGRC53-J*. Natomiast linia z genem odporności na rdzę brunatną *Lr47* charakteryzuje odporność częściową. Doświadczenia fitopatologiczne obejmujące ocenę źródeł odporności pod kątem reakcji na populację *B. graminis* potwierdziły, że za efektywne źródła odporności można zaliczyć linie z genami: *Pm21*, *Pm37*, *Pm1+2+4b+9*. Natomiast linia z genem *Pm34* daje reakcję częściowej odporności na *B. graminis*. Wśród odmian dawnych oraz gatunków pokrewnych nie znaleziono żadnych potencjalnie efektywnych źródeł odporności na rdzę brunatną zbóż i traw oraz mączniaka prawdziwego zbóż i traw. Otrzymane wyniki we wszystkich latach realizacji tematu pozwoliły na wyodrębnienie 4 klasy genotypów: odpornych, częściowo odpornych, podatnych oraz skrajnie podatnych.

Dyskusja

W ostatnich latach obserwuje się wzrost zainteresowania rolnictwem ekologicznym wraz z wykorzystaniem w uprawach zbóż dawnych oraz lokalnych odmian. Szeroki wachlarz cennych oraz unikatowych cech, przy jednoczesnej

zdolności adaptacyjnej dawnych odmian do środowisk marginalnych decyduje o ich potencjalnym wykorzystaniu w programach hodowlanych oraz ekologicznych. Ponadto dawne odmiany wymagają dużo mniejszych nakładów środków ochrony roślin oraz zawierają znacznie więcej błonnika, białka czy witamin. Dlatego też, celem tematu badawczego 2 w 2020 roku było poszukiwanie efektywnych źródeł odporności na populację *P. triticina* oraz *B. graminis* wśród odmian dawnych oraz miejscowych. Na podstawie uzyskanych wyników nie wyodrębniono żadnych odmian jednocześnie odpornych na oba patogeny. Jednak uzyskane wyniki nie eliminują poszukiwania wśród starych odmian efektywnych genotypów. Należy jednak pamiętać, że formy dawne, dzikie oraz inne pokrewne są odległe ewolucyjnie. Reprezentują różny poziom ploidalności, a brak homologii chromosomów skutkuje małą efektywnością krzyżowań zbieżnych (Pietrusińska i in., 2018). Dlatego też, w programach hodowlanych najlepszym materiałem roślinnym stanowią genotypy należące do pierwszorzędowej puli genowej tj. gatunki odmian miejscowych i dawnych generujące płodne mieszańce (Tanksley i McCouch 1997; Jiang i Gill 1994). Nowoczesna proekologiczna produkcja roślinna ukierunkowana jest na uprawę odmian odpornych oraz wysokoplonujących. Dużym zagrożeniem dla dzisiejszych upraw stanowi zmieniający się klimat i migracja chorób grzybowych. Dlatego też, poszukiwanie efektywnych źródeł odporności stanowi niezmiernie ważny element programów hodowlanych prowadzonych zarówno w skali mikro jak i makro.

Wnioski

1. Efektywne geny odporności zarówno o odporności całkowitej jak i częściowej stanowić mogą ciekawy komponent wykorzystywany w programach hodowlanych.
2. Poszukiwanie nowych oraz efektywnych źródeł odporności stanowi bardzo ważny element każdego programu hodowlanego.
3. Za efektywne źródła odporności na rdzę brunatną zbóż i traw można uznać linie z genami: *Lr9*, *Lr34*, *Lr19*, *Lr41* (= *Lr39*), *Lr55*, *Lr62* oraz *KS11WGRC53-J*, a także o odporności częściowej z genem *Lr47*.
4. Za efektywne źródła odporności na rdzę brunatną zbóż i traw można uznać linie z genami: *Pm21*, *Pm37*, *Pm1+2+4b+9*.
5. Populacje *Blumeria graminis* oraz *Puccinia triticina* występujące na pszenicy w Polsce charakteryzują się szerokim spektrum patogenności.

6. Większość izolatów było wirulentne w stosunku do testowanego materiału roślinnego.
7. Ważnym źródłem cennych cech abiotycznych i biotycznych stanowią zasoby genowe, czyli dawne i lokalne odmiany oraz dzikie gatunki pokrewne zbóż. Mimo ich unikatowego tła genetycznego nie wyodrębniono żadnych form odpornych na oba patogeny.

Ad.3. Temat badawczy 3. Ocena linii w różnych warunkach środowiskowych

Cel

Celem tematu badawczego 3 w latach 2014–2020 była ocena materiału roślinnego przeprowadzona w trzech lokalizacjach: HR Strzelce, HR Smolice IHAR-PIB Radzików, pod kątem odporności/podatności na choroby grzybowe, a także pod kątem korzystnych cech gospodarczych. W ocenie materiału roślinnego uwzględniono łącznie 7 cech w tym: (1) przezimowanie, (2) kłoszenie, (3) wysokość, odporność na choroby: (4) rdza brunatna oraz (5) żółta, (6) mączniak prawdziwy, (7) septoriozy. Ocena materiału roślinnego dokonywana była w cotygodniowych odstępach czasu. Obiekty o wysokiej odporności na choroby oraz o korzystnych cechach gospodarczych stanowiły materiał wyjściowy do dalszych badań oraz doświadczeń polowych (zakładowych i in.) w takcie jak i po zakończeniu projektu.

Cele zostały osiągnięte w 100%.

Materiał i Metody

W latach 2014–2020 na poletkach doświadczalnych w trzech miejscowościach: HR Strzelce, HR Smolice (Kobylin) oraz IHAR-PIB Radzików zakładano jednopowtórzeniowe doświadczenia selekcyjne. Materiał roślinny przekazywany był stacją hodowli jesienią każdego roku.

Wyniki

Na podstawie przeprowadzonych obserwacji polowych wytypowano genotypy, które stanowiły materiał badawczy w doświadczeniach zakładowych. Ze względu jednak na niskie plonowanie (do 70%) oraz wyleganie część materiału roślinnego nie została zakwalifikowana do dalszych doświadczeń zakładowych. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że zmieniający się klimat miał wpływ na ocenę linii w różnych warunkach środowiskowych. Długie i ciepłe lato oraz brak opadów atmosferycznych w okresie wegetacji roślin przyczynił się do ograniczenia występowania niektórych chorób grzybowych zbóż. Wszystkie materiały cechowały się wczesnym lub bardzo

wczesnym terminem kłoszenia, część ocenianych linii odznaczała się dużą podatnością na wyleganie. Na podstawie uzyskanych wyników w latach 2014–2020 wyselekcjonowano linie, które stanowią mogą cenny komponent wykorzystywany w programach hodowlanych.

Dyskusja

Uprawa pszenicy wraz z kukurydzą odgrywają znaczącą rolę w zachowaniu bezpieczeństwa żywnościowego na świecie. Jednak dużym wyzwaniem dla dzisiejszej hodowli zbóż jest globalne ocieplenie, ponieważ uprawy roślin rolniczych wrażliwa jest na wzrost temperatury, zmiany w opadach, susza w okresie wegetacji oraz podwyższone stężenie CO₂. Dlatego też, ocena materiału roślinnego w warunkach naturalnego środowiska ma kluczowe znaczenia dla wytwarzania nowych odmian zbóż. Zmiana klimatu zagraża plonom, zarówno bezpośrednio poprzez zmiany w plonowaniu, jak i pośrednio poprzez wpływ chorób upraw. Odmiany o zwiększonej tolerancji na stres termiczny i suszę, a także o odporności na szkodniki i choroby, są kluczowym czynnikiem w radzeniu sobie z obecną zmianą klimatu (Newbery i in. 2016). Patogeny grzybowe odgrywają negatywny wpływ na wielkość oraz jakość plonu. Na podstawie przeprowadzonych badań przedstawiono potencjalny wpływ zmian klimatu dla 5 głównych upraw na świecie. Wyniki przedstawiają straty w plonach od 17 do 23%, z czego na pszenicę przypadło odpowiednio 21,5% (Savary i in. 2019) oraz 21% (Oerke i in., 2006). W przypadku pszenicy największe straty w plonach szacuje się dla rdzy brunatnej oraz rdzy żółtej (Savary i in. 2019). Dowodem mogą być badania przeprowadzone przez Wojtowicza i zespół (2017). Celem badań było określenie wpływu oczekiwanych zmian warunków termicznych na okres inkubacji rdzy brunatnej pszenicy w zachodniej Polsce. Na podstawie przeprowadzonych badań wykazano dużą zależność między symulacjami a obserwowanymi długościami okresu inkubacji rdzy brunatnej zbóż i traw. Wyniki wskazują na zmianę dynamiki choroby, i tym samym występowanie choroby około miesiąc wcześniej w porównaniu do poprzednich dekad (Wojtowicz i in., 2017). Uzyskane wyniki pokrywają się z obserwacjami polowymi przeprowadzonym w zadaniu badawczym 3, ponieważ długie i ciepłe lato, przy jednoczesnym braku opadów atmosferycznych przyczynił się do występowania tej choroby w dużym nasileniu, a ograniczeniu w występowaniu mączniaka prawdziwego zbóż i traw. Do podobnych wniosków doszedł zespół Giorgi'a (2008) oraz Matić'a (2018), którzy

jednoznacznie stwierdzili, że globalne ocieplenie i przedłużające się susze w okresie wegetacji roślin w Europie ma wpływ na zmniejszenie zagrożenia ze strony mączniaka prawdziwego zbóż i traw w uprawach pszenic (Giorgi i Lionello 2008; Matić i in. 2018). Hodowla odpornościowa umożliwia uzyskiwanie odmian odpornych/tolerancyjnych na stesy abiotyczne oraz biotyczne. Szczęólnego znaczenia genetyka odpornościowa nabiera w dobie globalnego ocieplenia. Dzięki wykorzystaniu ogromnych możliwości jakimi dysponuje hodowla odpornościowa, możliwe jest ograniczenie niekorzystnego wpływu zmian klimatu na produkcję roślinną. Poprzez doświadczenia polowe, terenowe możliwa jest adaptacja odmian/linii do danego środowiska, optymalnego dla danego gatunku, odmiany, linii.

Wnioski

1. Warunki atmosferyczne panujące w 3 lokalizacjach w latach 2016–2020 były zazwyczaj niesprzyjające dla rozwoju mączniaka prawdziwego zbóż i traw.
2. W warunkach polskiego klimatu mączniak prawdziwy zbóż i traw występuje w niewielkim nasileniu i nie stanowi już takiego zagrożenia w uprawach pszenicy jak w latach poprzednich.
3. Sucha i upalna pogoda w okresie wegetacji roślin w znacznym stopniu wpłynęła na rozwój obserwowanych cech.
4. Zmieniający się klimat może przyczynić się do ograniczenia występowania chorób grzybowych zbóż, a tym samym migracji w kierunku klimatu bardziej wilgotnego (kierunek północ) (mączniak prawdziwy zbóż i traw).
5. Suche i ciepłe lata mogą sprzyjać zwiększeniu intensywności występowania rdzy brunatnej we wszystkich regionach uprawy pszenicy w Polsce.

Osiągnięcia projektu

1. Na drodze krzyżowań zbieżnych oraz wstecznych uzyskano efektywne połączenia piramid genów odporności w różnych ich kombinacjach.
2. Wyznaczono markery molekularne do selekcji efektywnego genu *Lr55* (dane w trakcie publikowania). Markery te mogą stanowić punkt wyjścia do selekcji materiału roślinnego pod kątem genu *Lr55*.
3. Systematycznie przekazywany materiał roślinny spółką hodowlaną stanowi cenny materiał wyjściowy wykorzystywany

- w doświadczeniach zakładowych przeprowadzanych w celu wyprowadzenia linii oraz nowych odmian pszenic ozimych.
4. Uzyskane wyniki w projekcie będą systematycznie publikowane w czasopismach naukowych z IF.
 5. Wyniki projektu będą stanowiły punkt wyjścia do złożenia w 2021 roku projektu w ramach MINIATURA 5. Uważamy, że dodatkowe markerowanie w oparciu o technologię sekwencjonowania następnej generacji – DArTseq wyselekcjonuje nowoczesne markery diagnostyczne oraz bliżej sprzężone z genem *Lr55*.

Wykaz publikacji wyników

- Publikacja: Pietrusińska A., Czembor J.H. 2014. Struktura wirulencji populacji *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* występującej na terenie Polski w latach 2012–2013. [Virulence structure of the *Blumeria graminis* f. sp. *tritici* population occurring in Poland across 2012–2013]. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 274: 15–25. MEiN: 4
- Plakat na konferencji: Pietrusińska A., Czembor J.H. 2014. XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions: „Molecular markers for the detection of the wheat leaf rust and powdery mildew resistance genes in MAS”
- Publikacja: Pietrusińska A., Czembor J.H. 2015. Piramidyzacja genów – powszechne narzędzie używane w programach hodowlanych. [Gene pyramiding – a tool commonly used in breeding programs breeding programs]. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 278: 3–16. MEiN: 6
- Plakat na konferencji: Pietrusińska A., Czembor J.H. 2015. 14th International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference: „Leaf rust and powdery mildew in polish winter wheat”
- Plakat na konferencji: Pietrusińska A., Czembor J.H. 2016. 13th European Conference on Fungal Genetics: „Applied biotechnology to combat the leaf rust caused by *Puccinia triticina* and powdery mildew caused by *Blumeria graminis* in polish wheat cultivars”.
- Publikacja: Pietrusińska A., Czembor J.H. 2017. Piramidowanie genów odporności (*Pm21 + Pm34*) pszenicy ozimej na mączniaka prawdziwego zbóż i traw (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*). [Pyramiding winter wheat resistance genes (*Pm21 + Pm34*) of powdery mildew of cereals and grasses (*Blumeria graminis* f. sp. *tritici*)]. Progress in Plant Protection 57 (1): 41–46. DOI: 10.14199/ppp-2017-006. MEiN: 12
- Wykład: Pietrusińska A., Czembor J.H. 2017. Postęp w hodowli odpornościowej zbóż. Materiały z XI Sympozjum „Genetyka Ilościowa Roślin Uprawnych”. Świeradów Zdrój. 06.–09.06.2017. Książka streszczeń (elektroniczna) str. 36.
- Plakat na konferencji: Pietrusińska A., Czembor J.H. 2017. 12th EFPP (European Foundation for Plant Pathology): “Traditional and modern plant breeding methods with examples in wheat”, nr posteru 110, sesja 5, książka sterszczeń str. 178.
- Publikacja: Pietrusińska A., Żurek M., Piechota U., Słowacki P., Smolińska K. 2018. Poszukiwanie źródeł odporności na choroby w odmianach dawnych i miejscowych oraz dzikich gatunkach pokrewnych zbóż. Praca przeglądowa. Agronomy Science, 73 (4), 45–60. <https://doi.org/10.24326/asx.2018.4.5>
- Plakat na konferencji: Pietrusińska A., Smolińska K., Tyrka M., Czembor J.H. 2018. International plant molecular biology: „Molecular mapping of leaf rust resistance gene *Lr55* and pyramiding genes for leaf rust and powdery mildew resistance in common wheat”. Poster G146. Książka streszczeń w wersji elektronicznej.
- Wykład: Pietrusińska A., Smolińska K., Czembor J.H., Tyrka M. 2018. Charakterystyka zasobów genowych dla hodowli roślin: „Wykorzystywanie zasobów genowych w tworzeniu nowych odmian pszenic uprawnych”.
- Publikacja: Pietrusińska A., Żurek M., Mańkowski D. 2019. Poszukiwanie źródeł odporności na stesy biotyczne w dawnych odmianach i populacjach miejscowych pszenic i pszenżyta. [The search for sources of biotic stress resistance in old varieties and landraces of wheat and triticale]. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 287: 25–28. MEiN: 20. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0101>
- Publikacja: Pietrusińska A. 2019. Efektywność piramidowania genów odporności na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f.sp. *tritici*) i rdzę brunatną (*Puccinia triticina*) w pszenicy ozimej. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 286: 35–40. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0007>
- Plakat na konferencji/Materiały konferencyjne Pietrusińska A., Tyrka M. 2019. Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych: „Mapowanie genu odporności na rdzę brunatną *Lr55* w pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Nr 285 str. 321. MEiN: 20. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0000>
- Plakat na konferencji: Pietrusińska A., Tyrka M. 2019. 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding: „Mapping oh the *Lr55* brown rust resistance in common wheat (*Triticum aestivum* L.). <https://static.akcongress.com/downloads/cbb/cbb5-boa.pdf>
- Publikacja: Pietrusińska A., Tratwal A. 2020. Characteristics of powdery mildew and its importance for wheat grown in Poland. Plant Protection Science 56: 141–153. MEiN: 40, IF 1,13.
- Publikacja: Pietrusińska A., Tyrka M. 2020/2021. Linkage of *Lr55* wheat leaf rust resistance gene with microsatellite

and DArT-based markers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* MEiN: 70, IF 1,646 (w trakcie recenzji).

Podziękowania

Z związku zakończeniem projektu Kierownik tematu chciałby serdecznie podziękować wszystkim osobom zaangażowanym w jego realizację.

W szczególności podziękowania skierowane są do prof. dra hab. Mirosława Tyrki za udzielenie wsparcia merytorycznego w mapowaniu genu *Lr55* oraz za pomoc w realizacji tematu badawczego 3: do dr Krystyny Witkowskiej, dra Edwarda Witkowskiego oraz dra Przemysława Matysika. Kierownik tematu kieruje wyrazy wdzięczności do wszystkich wykonawców projektu w latach 2014–2020 za udzielone wsparcie techniczne. Słowa podziękowania należą się również dr Wiesławowi Podymie za wsparcie i wyrozumiałość oraz prof. dr hab. Jerzemu H. Czemborowi.

Literatura

- Czembor H.J., Czembor J.H. (2001). Resistance to powdery mildew in barley cultivars and breeding lines included in 1998–2000 Polish registration trials. *Plant Breeding and Seed Science* 45 (1): 21–41.
- Giorgi F., Lionello, P. (2008). Climate change projections for the Mediterranean region. *Glob. Planet. Change* 63: 90–104.
<https://maswheat.ucdavis.edu/protocols/Lr47>
- Huerta-Espino J., Singh R.P., Pérez-López J.B. (2009). Phenotypic Variation Among Leaf Rust Isolates From Durum Wheat In Northwestern Mexico. 12th International Cereal Rust and Powdery Mildews Conference, October 13–16, Antalya – Turcja. Abstract Book, str. 29.
- Hysing S.H., Singh R.P., Huerta-Espino J., Merker A., Liljeroth E., Diaz O. (2006). Leaf rust (*Puccinia triticina*) resistance in wheat (*Triticum aestivum*) cultivars grown in Northern Europe 1992–2002. *Hereditas* 143: 1–14.
- Jiang J., Gill B.S. (1994). Different species-specific chromosome translocations in *Triticum timopheevii* and *T. turgidum* diphyletic origin of polyploid wheats. *Chromosome Res.* 2: 59–64.
- Kolmer J. A. (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34: 435–455.
- Kowalczyk K., Hsam S.L.K., Zeller, F.J. (1998). Identification of powdery mildew resistance genes in common wheat (*Triticum aestivum* L. em. Thell.). XI. Cultivars grown in Poland. *J. Appl. Genet.* 39 (3): 225–236.
- Mains E.B., Dietz S.M. (1930). Physiologic forms of barley mildew, *Erysiphe graminis hordei* Marchal. *Phytopathol.* 20: 229–239.
- Mains E.B., Dietz S.M. (1930). Physiologic forms of barley mildew, *Erysiphe graminis hordei* Marchal. *Phytopathol.* 20: 229–239.
- Matić S., Cucu M.A., Garibaldi A., Gullino M.L. (2018). Combined effect of CO₂ and temperature on wheat powdery mildew. *Plant Pathol. J.* 34 (4): 316–326. <https://doi.org/10.5423/PPJ.OA.11.2017.0226>
- Miranda L.M., Murphy J.P., Marshall D., Leath S. (2006). *Pm34*: a new powdery mildew resistance gene transferred from *Aegilops tauschii* Coss. to common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 113: 1497–1504.
- Murray M.G., Thompson W.F., 1980. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 8 (19): 4321–4325.
- Newbery F., Aiming Qi., Fitt D.B. (2016): Modelling impacts of climate change and arable crops diseases: progress, challenges and applications. *Curr. Opin. Plant Biol.* 32: 101–109. <https://doi:10.1016/j.pbi.2016.07.002>
- Oerke E.C. (2006): Crop losses to pests. *J. Agr. Sci.* 144: 31–43. <https://doi:10.1017/S0021859605005708>
- Pietrusińska A., Żurek M., Piechota U., Słowacki P., Smolińska K. (2018). Poszukiwanie źródeł odporności na choroby w odmianach dawnych i miejscowych oraz dzikich gatunkach pokrewnych zbóż. *Praca przeglądowa. Agronomy Science*, 73 (4): 45–60.
- Saini R.G., Kaur M., Singh B., Sharma S., Nanda G.S., Nayar S.K. (2002). *Lr48* and *Lr49*, noval hypersensitive adult plant leaf rust resistance genes in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 124: 365–370.
- Savary S., Willocquet L., Pethybridge S.J., Esker P.D., McRoberts N., Nelson A.D. (2019): The global burden of pathogens and pests on major food crops. *Nat. Ecol. Evol.* 3: 430–439. <https://doi:10.1038/s41559-018-0793-y>
- Savary S.; Nelson A.; Sparks A.H.; Willocquet L.; Duveiller E.; Mahuku G.; Forbes G.; Garrett, K.A.; Hodson, D.; Padgham, J.; Pande, S.; Sharma, M.; Yuen, J.; Djurle, A. (2011). International agricultural research tackling the effects of global and climate changes on plant diseases in the developing world. *Plant Dis.* 95: 1204–1216.
- Singh R.P., McIntosh R.A. (1984). Complementary genes for resistance to *Puccinia recondita tritici* in *Triticum aestivum* II. Cytogenetic studies. *Can. J. Genet. Cytol.* 26: 736–742.
- Tanksley S.D., McCouch S.R. (1997). Seed banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. *Science* 277: 1063–1066.
- Thomson D., Henry R. (1995). Single-step protocol for preparation of plant tissue for analysis by PCR. *BioTechniques* 19: 394–400.
- Wójtowicz A, Wójtowicz M., Ratajkiewicz H., Pasternak M. (2017): Prognoza zmian czasu inkubacji sprawcy rdzy brunatnej pszenicy w reakcji na przewidywane ocieplenie klimatu. *Fragm. Agron.* 34: 197–207.

Tabela 1

Piramidy genów odporności uzyskane w temacie badawczym 1.

Populacja mieszańcowa	Uzyskana piramida genów odporności	Odmiana pszenicy ozimej – rodzic wypierający
BIO_1	(<i>Lr41+Pm21+Lr47</i>) (1)	×Hondia
	(<i>Lr41+Pm21+Lr47</i>) (2)	×Formacja
	(<i>Lr41+Pm21+Lr47</i>) (3)	×RGT Bilanz
	(<i>Lr41+Pm21+Lr47</i>) (4)	×Euforia
BIO_2	(<i>Lr41+Pm21</i>) (5)	×Hondia
	(<i>Pm21+Lr47+Pm34</i>) (6)	×Formacja
	(<i>Pm21+Lr47+Lr41</i>) (7)	×RGT Bilanz
BIO_3	(<i>Pm21+Lr47</i>) (8)	×Hondia
	(<i>Pm21+Lr47+Pm37</i>) (9)	×Formacja
BIO_4	(<i>Lr47+Lr41+Pm34</i>) (10)	×Hondia
	(<i>Lr41+Pm34+Pm37</i>) (11)	×Formacja
	(<i>Lr47+Lr41+Pm37</i>) (12)	×RGT Bilanz

Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum* i ich związek z patogenicznością oraz odpornością pszenżyta i pszenicy na septoriozę liści i plew (SNB)

Parastagonospora nodorum proteinaceous toxins and their relationship with wheat and triticale susceptibility and resistance to stagonospora nodorum blotch (SNB)

Edward Arseniuk✉

Zakład Fitopatologii. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie
✉ e-mail: e.arseniuk@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: Toksyny białkowe, niewrażliwość, odporność, efekторы, nekroza, SNB

Septorioza liści i plew (SNB) jest chorobą zbóż wywołaną przez grzyb *Parastagonospora nodorum*. W Polsce choroba ta najczęściej występuje na pszenicy i pszenicy. Z doniesień w literaturze przedmiotu wynika, że patogen wywołujący tę chorobę jest obecny niemal we wszystkich rejonach świata na zbożach i trawach. W latach 2014–2020 wykonano badania, których cele były następujące:

1. Opracowanie procedury testowania materiałów roślinnych na obecność genów warunkujących odporność na białkowe efekторы *P. nodorum*.
2. Zbadanie zdolności poszczególnych efektorów do indukcji nekrozy na próbie krajowych odmian z KRO i linii pszenżyta i pszenicy.
3. Zbadanie związku korelacyjnego między obecnością genów niewrażliwości na efekторы, a odpornością na *P. nodorum* w warunkach fitotronowych (siewki) oraz polowych (rośliny dorosłe).
4. Opracowanie procedury testowania izolatów *P. nodorum* pod względem zdolności do produkcji efektorów.
5. Identyfikacja źródeł odporności na *P. nodorum* niezwiązanych z odpornością na toksyny.

Materiały i Metody

Izolacja DNA: Odsączona grzybnia pochodząca z hodowli płynnej na pożywce Frie, była dwukrotnie przemywana sterylną wodą, następnie rozcierana w ciekłym azocie przy pomocy móżdziejca. 20mg utartej grzybni wykorzystano

do izolacji DNA według González-Mendoza i inni 2010.

Analiza PCR efektorów: Startery: ToxAF CGTCCGGCTACCTAGCAATA, ToxAR TTGTGCTCCTCCTTCTCGA, Tox3F CTCGA-ACCACGTGGACCCGGA, Tox3R CTCCCC-TCGTGGGATTGCCCATATG, Tox1F ATGAAGCTTACTATGGTCTTGT, Tox1R TGTGGCAGCTAACTAGCACA. Skład 10μl mieszaniny reakcyjnej: 1μl – 50ng/μl matrycy, 1μl – 5mM mieszaniny starterów, 0,2μl – 10mM mieszaniny dNTP, 0,05μl – DreamTaq DNA Polymerase, 1μl – DreamTaq Green Buffer, 6,75μl – H₂O. Program PCR. Wstępna denaturacja: 95°C 5 min. 35 cykli: 95°C 45s denaturacja, 63 °C 45s przyłączanie, 72 °C 1min elongacja. Końcowa elongacja 72°C 10min.

Produkcja efektorów Tox1, Tox3, ToxA: Szczep *Pichia pastoris* zawierający plazmid pGAPZA ze sklonowanymi genami *Tox3*, *Tox1*, lub *ToxA*, zaszczerpiono na standardową pożywkę płynną YPD. Hodowano 3 dni, wytrząsanie 200rpm, temperatura 30°C. Kulturę zwirowano oraz przefiltrowano przez filtr o średnicy porów 0,44μm. Preparat zawierający efektor wykorzystano do infiltracji roślin.

Oczyszczanie Tox5: Izolat 76–40 hodowano przez około 21 dni na standardowej płynnej pożywce Frie. Przez pierwsze 3 dni na wytrząsarce utrzymywano temperaturę 27 °C na wytrząsarce, później utrzymywano temperaturę pokojową bez wytrząsania. Następnie filtrat z hodowli izolatu pochodzącego z kolekcji roboczej Zakładu Fitopatologii, poddano 2 krotnej dializie w 10 objętościach roztworu zawierającego 20mM octanu sodu



i 20mM NaCl o pH 5, z wykorzystaniem membrany zatrzymującej cząsteczki o wymiarach 6–8 kDa. Dializat naniesiono na kolumnę chromatograficzną zawierającą złożę SP-Sepharose i wymywano gradientem NaCl od 0 do 200 mM. Frakcje zawierające Tox5 określono poprzez infiltrację wrażliwego obiektu LP749–29, oraz zagęszczono poprzez ultrafiltrację i wykonano sączenie żelowe z wykorzystaniem złoża Superdex 75 w 20mM octanu sodu 100mM NaCl pH 6. Przy pomocy wrażliwego obiektu określono frakcje aktywne, które wykorzystywano w badaniach.

Infiltracja roślin: Przy pomocy strzykawki 1ml przyłożonej delikatnie do górnej powierzchni w pełni rozwiniętego drugiego liścia siewki, powoli wtłaczano przez aparaty szparkowe preparat efektor. Pisakiem zaznaczono obszar infiltracji. Po ok 5 dniach wykonano ocenę, uznając za podatne obiekty, które w zaznaczonym obszarze wykazują całkowitą nekrozę (N), bądź lżejsze zmiany o charakterze zaawansowanej chlorozy (LN). Obiekty niewrażliwe nie wykazują żadnych zmian w granicach infiltrowanego obszaru (B). Dla każdego obiektu roślinnego doświadczenie było prowadzone w 3 powtórzeniach, gdzie jedno powtórzenie stanowiła siewka.

Infiltracja zestawu obiektów różnicujących efekторы: W celu określenia profilu produkcji efektorów przez izolaty, dokonywano infiltracji nieoczyszczonym infiltratem zawierającym efektor: Tox1 – W7984, Tox2/6 – BG223, Tox3 – BG220, Tox4 – AF89, Tox5 – LP749.

Produkcja inokulum: Izolaty *P. nodorum* zostały zaszczipione do szczelnie zamkniętych kapslem z pergaminu, szklanych kolb wypełnionych w 20% dwukrotnie autoklawowanym pęczakiem jęczmiennym. Następnie izolaty były inkubowane przez około 14 dni w temperaturze pokojowej w fotoperiodzie 12h. Następnie zostały zsypane do bawełnianych worków i suszone. W skład inokulum wchodziły izolaty dobrane tak aby odpowiadały lokalnej populacji patogena: 9074, 9282, 9079, 13–6–5, 9281, 2–7/11, 13–6–12, 7–1–11, 37–1, 5–5/11. Dla każdego izolatu została wyliczona liczba zarodników uzyskiwana z suchej masy ziarniaków. Następnie zmieszano odpowiednie ilości suchych mas tak by po namoczeniu w inokulum znajdowały się takie same stężenia zarodników każdego z izolatów. Szczelnie zapakowany suchy mix przechowywano w 4°C przez maksymalnie 6 miesięcy. Przed użyciem mix był namaczany przez około 3h, okazjonalnie mieszając, następnie stężenie inokulum doprowadzane było do 6mln zarodników/ml oraz dodawany był Superam 10AL

w stężeniu zalecanym przez producenta.

Materiał roślinny: Materiałem roślinnym był zbiór linii hodowlanych i odmian pszenicy i pszenżyta, pochodzących z polskich programów hodowlanych.

Ocena fenotypowa w stadium siewki: Doświadczenia fitotronowe były prowadzone w latach 2014–2020. Każdy obiekt był testowany w dwóch kolejnych latach. Doświadczenie wykonywane było w warunkach kontrolowanego środowiska w fitotronie w temperaturze wzrostu roślin ok. 20°C w dzień oraz 16°C w nocy i fotoperiodzie 12/12 godzin. W multiplacie, w dwóch powtórzeniach zakażanych było po 8 siewek dla każdego obiektu. Siewki inokulowane były wodną zawiesiną zarodników *P. nodorum* do wysycenia, po pełnym rozwinięciu drugiego liścia siewki. Do czasu wystąpienia objawów rośliny były inkubowane w warunkach 100% wilgotności. Ocena doświadczenia wyrażona, jako średni% powierzchni porażonej tkanki liści z dwóch serii, obliczona została programem do analizy obrazu WinCam. Przetestowano w sumie 611 obiektów pszenicy oraz 525 obiektów pszenżyta.

Ocena fenotypowa w stadium dorosłym w warunkach polowych: Doświadczenia polowe były prowadzone w latach 2014–2020. Każdy obiekt był testowany w dwóch kolejnych latach. Dla każdego testowanego obiektu wysiewano cztery poletka o powierzchni 1m². Jedno poletko kontrolne, oraz trzy zakażane. Inokulację wodną zawiesiną zarodników *P. nodorum* wykonywano trzykrotnie w ciągu sezonu: w stadium wczesnej butonizacji, w fazie kłoszenia, oraz w fazie kwitnienia. Przed inokulacją poletka kontrolne opryskiwano fungicydem Tilt wg zaleceń producenta. Ocenę porażenia liści przeprowadzono po pojawieniu się pierwszych objawów w tygodniowych odstępach do czasu naturalnego zamierania roślin. Skala oceny: 1 – roślina krańcowo podatna, 9 – roślina całkowicie odporna. Ocenę stanowiła średnia z pomiarów poletek zakażanych. Przetestowano w sumie 639 obiektów pszenicy oraz 544 obiekty pszenżyta.

Analiza statystyczna: Dla odporności na SNB oraz wrażliwości na efektor zostały przeprowadzone analizy związków korelacyjnych, oraz analizy wariancji. Dla obliczania współczynników korelacji przyjęto następujące wartości wrażliwości na efektor: reakcja podatna N = 1, reakcja pośrednia LN = 0,5, niewrażliwość B = 0. Braki danych usuwano parami. W analizie wariancji przyjęto, że reakcja pośrednia LN, podobnie jak wystąpienie nekrozy N jest równoznaczne z wystąpieniem

czynnika = 1, natomiast brak reakcji jest brakiem wystąpienia czynnika = 0. Parametr cząstkowego eta-kwadrat był miarą zmienności porażenia wyjaśnianej przez obecność czynnika. Analizę danych fenotypowych z wielu lat, poprzedzono normalizacją min-max, sprowadzając dane do jednej skali od 0 dla obiektów skrajnie odpornych, do 1 dla obiektów skrajnie podatnych. Następnie pochodzące z kolejnych lat oceny odporności poszczególnych obiektów zostały uśrednione. Obliczenia wykonywano korzystając z pakietu Statistica v13. We wszystkich analizach za poziom istotności przyjmowano $p < 0,05$

Wyniki

Analiza populacji *P. nodorum*

Przy pomocy analizy PCR oraz testów biologicznych przetestowano 199 i 50 izolatów *P. nodorum*. Dane uzyskane w wyniku analiz pozwoliły określić obraz lokalnej populacji patogena, wywierającego presję na polskie uprawy pszenicy i pszenżyta. Znajomość zdolności populacji do produkcji efektorów pozwoliła na odpowiednie dobieranie izolatów wchodzących w skład inokulum do doświadczeń fenotypowych, w taki sposób by odpowiadało ono warunkom lokalnego środowiska.

Spośród badanych efektorów najczęściej w polskich izolatach *P. nodorum* stwierdzano obecność genów kodujących Tox5, Tox3, Tox1. Znacznie mniej rozpowszechniony był efektor ToxA, natomiast występowanie efektora Tox2/6 było jedynie symboliczne. Nie udało się w polskiej populacji *P. nodorum*, zidentyfikować izolatów zdolnych do produkcji pozostałych znanych z literatury efektorów białkowych: Tox4 i Tox7.

Geny kodujące Tox1, Tox3 i ToxA zostały zsekwencjonowane w związku z czym ich detekcja była prowadzona przy pomocy bardziej wiarygodnej i wydajnej metody PCR. Większa ilość przeprowadzonych dla tych efektorów analiz pozwoliła zbadać izolaty pod kątem klas w jakie grupuje je obecność genów efektorów.

Najczęściej występującą klasą (53%) były izolaty posiadające jednocześnie geny Tox1 oraz Tox3. Izolaty wśród których nie zidentyfikowano żadnej z trzech zsekwencjonowanych efektorów stanowiły 18% przebadanych. Po 11% przebadanych izolatów posiadało: wszystkie trzy geny, lub samotny gen kodujący Tox1. Pozostałe zidentyfikowane klasy stanowiły izolaty posiadające tylko gen kodujący Tox3 (4%), oraz izolaty zawierające gen ToxA oraz Tox3 (3%).

Analiza puli genowych pszenicy i pszenżyta

Przy pomocy preparatów zawierających odseparowane od siebie efekторы Tox1, Tox3, ToxA oraz Tox5 wykonano analizę obiektów pszenicy i pszenżyta. Na efektor Tox1 przetestowano 590 obiektów pszenicy i 502 obiekty pszenżyta, na Tox3 przetestowano 587 obiektów pszenicy i 512 obiektów pszenżyta, na Tox5 przetestowano 667 obiektów pszenicy i 511 obiektów pszenżyta, na ToxA przetestowano 590 obiektów pszenicy i 549 obiektów pszenżyta.

Przebadane obiekty pochodzą ze zróżnicowanych pól genowych należących do polskich programów hodowlanych pszenicy i pszenżyta. Zebrane dane stanowią składową część analiz wpływu wrażliwości na efekторы na odporność na SNB.

U pszenicy najczęściej występująca wrażliwość na efektor Tox3 charakteryzowała 33% badanych obiektów. Wrażliwości na efekторы Tox5, Tox1 i ToxA występowały rzadziej i stanowiły kolejno: 13%, 10% i 7% przebadanej próby.

W przypadku pszenżyta wrażliwość na Tox3 była najczęściej spotykaną wrażliwością i wynosiła 58%. Wysoki był również poziom wrażliwości przebadanej próby na efektor Tox5 (38%). Odwrotnie niż u pszenicy u pszenżyta większą procentowo grupę stanowiły obiekty wrażliwe na ToxA (14% zamiast 7%), natomiast mniejszą wrażliwe na Tox1 (4% zamiast 10%).

U obu gatunków zróżnicowana była również ogólna wrażliwość na efekторы, aż 44% obiektów pszenicy nie jest wrażliwa na żaden z badanych efektorów, dla pszenżyta udział obiektów niewrażliwych na testowane efekторы stanowił tylko 16%.

Frekwencje niewrażliwości na poszczególne efekторы były zróżnicowane między podzbiorami u pszenicy, stanowiących pule genowe należące do osobnych programów hodowlanych. Pule genowe w obu programach hodowlanych pszenżyta nie różnią się istotnie pod względem frekwencji występowania poszczególnych wrażliwości na efekторы.

Analiza związków między wrażliwością na efekторы białkowe a odpornością fenotypową na SNB

Dane o odporności na SNB z poszczególnych lat prowadzenia eksperymentów zostały skorelowane z wrażliwością obiektów na efekторы Tox1, Tox3, Tox5, oraz ToxA. Za istotne statystycznie zostały przyjęte wartości $p < 0,05$. W badaniach w stadium siewki zarówno dla pszenicy jak i pszenżyta wykryto wysoką istotną statystycznie i powtarzającą się w kolejnych doświadczeniach korelację odporności i niewrażliwości na efektor Tox3. W przypadku pszenżyta w większości doświadczeń poziom

statystycznej istotności korelacji między niewrażliwością, a odpornością, przekroczone zostały również dla efektorów Tox3 i Tox5. W jednym doświadczeniu dla pszenżyta wykryto istotną statystycznie odwrotną korelację między odpornością fenotypową, a niewrażliwością na efektor ToxA.

W badaniach odporności w stadium roślin dorosłych, w warunkach polowych, w większości eksperymentów korelacja odporności na SNB i niewrażliwości na efektor przekroczyła próg istotności dla Tox3 u obu gatunków. Dla pszenicy w jednym roku wykryto istotną statystycznie dodatnią korelację dla efektorów Tox1. W jednym roku z siedmiu, dla obiektów pszenżyta wykryto również odwrotną korelację między odpornością, a niewrażliwością na efektor ToxA. U obydwu gatunków w dwóch latach prowadzenia eksperymentów wykazano istotną korelację między odpornością fenotypową, a niewrażliwością na efektor Tox5.

W celu dokładniejszego określenia wpływu efektorów na odporność fenotypową, przeprowadzono analizy wariancji, których wynikiem w postaci cząstkowego eta-kwadrat, określała% zmienności porażenia wyjaśniany niewrażliwością na efektor.

W kolejnych latach prowadzenia eksperymentów w stadium siewki, u obydwu gatunków wykryto wysoki poziom wyjaśnianej zmienności porażenia przez wrażliwość na efektor Tox3, osiągający maksymalnie 55% dla pszenicy oraz 42% dla pszenżyta. W pojedynczych eksperymentach dla każdego z gatunków poziom porażenia wyjaśnianego wrażliwością na Tox1 przekroczył istotność statystyczną. Dla pszenżyta w jednym doświadczeniu poziom wyjaśnianej zmienności porażenia, przekroczył próg istotności dla efektorów ToxA, w tym przypadku po zestawieniu ze współczynnikiem korelacji okazało się, że niewrażliwość na ten efektor wyjaśniała wzrost porażenia, co stało w sprzeczności z zależnościami dla innych efektorów. Największą różnicą w wykrytych zależnościach dla eksperymentów w stadium siewki między badanymi gatunkami był fakt wykrycia u pszenżyta, powtarzającego się w kolejnych eksperymentach, wysokiego i istotnego statystycznie wpływu wrażliwości na efektor Tox5 na stopień porażenia, wynoszącego maksymalnie 12,7%.

Analiza wariancji porażenia *P. nodorum* w warunkach polowych w poszczególnych latach wykazała, że jedynymi wrażliwościami na efektor, które w sposób istotny statystycznie wyjaśniają zmienność porażenia są wrażliwości na efektor Tox3, oraz Tox5. U pszenicy istotny

wpływ na stopień porażenia odnotowano dla efektorów Tox3 w trzech doświadczeniach z siedmiu, natomiast dla efektorów Tox5 w dwóch doświadczeniach z siedmiu. U pszenżyta efektor Tox3 w sposób istotny statystycznie wyjaśniał zmienność porażenia w czterech doświadczeniach z siedmiu, a Tox5 w tylko jednym.

Dane zebrane z wszystkich przeprowadzonych eksperymentów badających odporność fenotypową na *P. nodorum*, zostały ustandaryzowane w celu umożliwienia badania wpływu wrażliwości na poszczególne efektor w całościowych grupach obejmujących wszystkie przebadane obiekty pszenicy i pszenżyta.

Analiza korelacji porażenia w stadium siewki oraz wrażliwości na efektor ujawniła wysoką korelację dla efektorów Tox3 u obu gatunków, oraz istotne statystycznie korelacje dla efektorów Tox1 u pszenicy, oraz Tox5 u pszenżyta.

Analiza korelacji między porażeniem w warunkach polowych, a wrażliwością na efektor wykazała istotne statystycznie wartości dla efektorów Tox3 oraz Tox5 u obu gatunków.

Analiza wariancji porażenia w stadium siewki dla obiektów pszenicy i pszenżyta ujawniła, że wrażliwość na Tox3 ma największe znaczenie dla rozwoju choroby u obu gatunków wyjaśniając odpowiednio 27% i 11% zmienności porażenia u pszenicy i pszenżyta. Dodatkowo poziom istotności statystycznej przekroczone zostały przez wpływ Tox1 u pszenicy oraz Tox5 u pszenżyta.

Analiza wariancji porażenia w doświadczeniach polowych dla obu gatunków wykazała istotny statystyczny wpływ wrażliwości na efektor Tox3 u obu gatunków. Na porażenie obiektów pszenżyta istotny wpływ miała również wrażliwość na efektor Tox5.

Przebadane na efektor obiekty podzielono na dwie grupy: niewrażliwe na wszystkie efektor, oraz wrażliwe na co najmniej jeden efektor. Dla obu grup wyliczono średnie porażenie *P. nodorum* w stadium siewki, oraz dorosłym. Przy pomocy testu T dla grup niezależnych wykazano, że w obu stadiach rozwojowych średnie porażenie dla grupy wrażliwych i niewrażliwych są od siebie istotnie różne.

U pszenicy średnie porażenie w stadium siewki u obiektów z grupy wrażliwej na efektor było o 79% większe niż u grupy niewrażliwej. W przypadku porażenia w stadium rośliny dorosłej, średnie porażenie w grupie wrażliwej na efektor było o 16% większe.

W przypadku pszenżyta odnotowano podobne zależności. Średnie porażenie w stadium siewki

było o 42% większe w grupie wrażliwej na efektor, podobnie średnie porażenie w stadium rośliny dorosłej w grupie wrażliwej było o 10% wyższe niż u roślin niewrażliwych.

Dyskusja

W wyniku realizacji projektu zebrano i kompleksowo przeanalizowano dane pozwalające wyciągnąć wnioski na temat zasadności eliminacji obiektów wrażliwych na efektor, z programów hodowlanych pszenicy i pszenżyta.

Światowa populacja *P. nodorum* jest bardzo różnicowana pod względem produkcji białkowych efektorów, dlatego w prowadzeniu hodowli odpornościowej istotne jest żeby do bonitacji odporności wykorzystywać izolaty dobrane w taki sposób by przy zachowaniu warunków prowokacyjnych sztucznej inokulacji, odpowiadała ona lokalnym strukturom populacji patogena. Pozwala to zagwarantować, że przyszłe odmiany będą przygotowane do użytkowania w konkretnym środowisku. Pozyskane w wyniku projektu informacje o populacji *P. nodorum* w Polsce ustaliły, że produkcja inokulum powinna się opierać na izolatach produkujących efektor Tox1, Tox3 i Tox5 z niewielkim udziałem izolatów produkujących ToxA. Przebadana kolekcja stworzyła wygodne źródło izolatów do komponowania inokulum do badań.

W wyniku projektu opracowano i wprowadzono procedurę przygotowywania preparatów czterech efektorów białkowych, umożliwiających testowanie roślin. Przebadano również grupy obiektów pszenżyta i pszenicy mogące stanowić odbicie obecnego stanu wrażliwości na efektor w programach hodowlanych tych gatunków. Badania wykazały, że niewrażliwość na efektor u obu gatunków jest na tyle powszechna, że dostępność form niewrażliwych nie jest problemem. Pszenica charakteryzuje się mniejszym poziomem wrażliwości na efektor niż pszenżyto, co może być spowodowane dłuższą historią hodowli, a być powodem mniejszego poziomu średniego porażenia tego gatunku. U obu gatunków najczęściej występującą wrażliwością jest wrażliwość na efektor Tox3, oraz Tox5, która jest z kolei znacznie częściej spotykana u pszenżyta niż u pszenicy.

Stan wrażliwości obu gatunków zbóż odpowiada populacji patogena. Najczęściej występującymi efektorami są Tox3 i Tox5, jest to spowodowane korzyścią dla patogena z ich produkcji, polegającej na szybszym generowaniu zmian nekrotycznych co poszerza obszar dla jego życia i rozwoju. Wysoka częstość występowania efektora Tox1 jest wyjaśniana dodatkowo jego unikalnymi cechami.

Efektor Tox1 jest białkiem dwufunkcyjnym, które poza indukowaniem zmian nekrotycznych u wrażliwych genotypów, zabezpiecza grzybnię od uszkodzeń przez chitynazy produkowane w odpowiedzi na infekcję. Stosunkowo niska frekwencja występowania genu ToxA u *P. nodorum* jest zgodna z wysoką odpornością obu gatunków zbóż na ten efektor.

W celu zbadania jaki jest dokładny wpływ efektorów na porażenie na SNB w lokalnych warunkach, oraz który z nich ma największy wpływ, a tym samym korzyści usunięcia którego będą największe, zostały zebrane dane o odporności fenotypowej odmian i obiektów hodowlanych. Dane te zostały zestawione z ich poziomem wrażliwości na efektor, co pozwoliło na analizę związków korelacyjnych, stopnia wyjaśnianej zmienności porażenia, oraz porównania średniego porażenia obiektów wrażliwych i niewrażliwych.

Dla większości obiektów dane fenotypowe zbierano w dwóch doświadczeniach prowadzonych w odrębnych latach. Mimo, że w sąsiadujących ze sobą latach około połowa obiektów się powtarzała, a warunki prowadzenia doświadczeń były zbliżone, każde doświadczenie trzeba uznać za osobny eksperyment, a nie kolejne powtórzenie.

Dane analizowano dwiema metodami: wyznaczeniem współczynników korelacji Pearsona, oraz przeprowadzając analizę wariancji. Wartość współczynnika korelacji informuje nas o jej sile, a znak pozwala określić czy wrażliwość na efektor podnosi czy obniża odporność. Analiza wariancji pozwala wyznaczyć procentowy udział danej wrażliwości na efektor na zmienność porażenia fenotypowego.

Przeprowadzając analizy konieczne było odmienne przygotowanie danych wejściowych. Analiza współczynników korelacji pozwalała na uwzględnienie zróżnicowanego poziomu wrażliwości na efektor, w przypadku gdy dany obiekt wykazywał wyraźne zmiany chlorotyczne lub lekkie nekrotyczne przyjmowano wartość wrażliwości jako 0,5; w przypadku wyraźnych zmian nekrotycznych było to 1, a w przypadku braku reakcji było to 0. Reakcje pośrednie na efektor zostały opisane w literaturze, dotyczą one mniejszości wrażliwych obiektów. Są one powtarzalne i powodowane przez efektor. Dla toksyny Tox3 powiązано fakt zróżnicowanej wrażliwości z występowaniem kilku wariantów genów oddziałujących z efektozem. Analiza wariancji mierzy wpływ obecności czynnika (wrażliwość) na wartość cechy (porażenie SNB). Z tego powodu konieczne było włączenie grupy o reakcji pośredniej do obiektów wrażliwych i traktowanie poziomu reakcji jako 1. Różnice w przygotowaniu danych wejściowych

miały niewielki wpływ na wnioski płynące z analiz, jednak w kilku przypadkach doprowadziły do zmian w poziomach istotności wyników.

Analizując współczynniki korelacji ze wszystkich eksperymentów, pierwszym wnioskiem jest, że praktycznie wszystkie istotne statystycznie wartości są dodatnie, co świadczy o tym, że niewrażliwość badanych obiektów pszenicy i pszenżyta na efekторы białkowe jest skorelowana ze wzrostem odporności fenotypowej zarówno w stadium siewki jak i stadium rośliny dorosłej. Jedynym wyjątkiem były doświadczenia prowadzone w 2020 roku dla pszenżyta gdzie odwrotna korelacja wrażliwości na ToxA i porażenia fenotypowego przekroczyła próg istotności statystycznej. Zaburzenie to mogło być spowodowane relatywnie małą ilością wrażliwych na ten efektor obiektów w porównaniu do efektorów Tox5 i Tox3, oraz niską presją tego efektora w inokulum, w wyniku czego inne efekторы zamaskowały jego działanie.

Zarówno analiza wariancji jak i analiza współczynników korelacji prowadzi do podobnych wniosków. Największy wpływ genotypów na poziom porażenia przez *P. nodorum* obu gatunków zbóż w obu stadiach rozwojowych miał efektor Tox3. Znacznie rzadszą lecz nadal często występującą na statystycznie istotnym poziomie była zależność dla efektora Tox5, która obserwowana była częściej u pszenżyta. Pozostałe dwa efekторы na przestrzeni siedmiu eksperymentów w dwóch stadiach rozwojowych wykazywały istotny statystycznie związek z porażeniem tylko epizodycznie, co najprawdopodobniej ma związek z niską frekwencją wrażliwości na te wśród testowanych obiektów.

Na poziomy istotności związków korelacyjnych, oraz wyjaśnianych zmienności duży wpływ miała wielkość próby poddanej badaniu. W celu przeprowadzenia badania związków wrażliwości i porażenia fenotypowego wśród wszystkich obiektów zbóż testowanych w ramach trwania projektu, dokonano standaryzacji wyników porażenia fenotypowego, oraz uśrednienia wyników dla poszczególnych obiektów testowanych w oddzielnych eksperymentach. Standaryzację przeprowadzono metodą Min-Max, polegającą na przeskalowaniu wartości porażenia do przedziału od 0 do 100%, gdzie wartość 0% przyjmował obiekt o najmniejszym, a wartość 100% obiekt o największym porażeniu w eksperymencie.

Analizując związki między porażeniem, a wrażliwością na efekторы, w próbie obejmującej wszystkie zebrane w ramach projektu wystandaryzowane dane, potwierdzają się zależności wykryte podczas analizy poszczególnych doświadczeń osobno.

Dla obydwu gatunków wrażliwość na efektor Tox3 ma istotny statystycznie wpływ na porażenie w obydwu stadiach rozwojowych. W analizie danych skumulowanych wykryto również istotny statystycznie wpływ wrażliwości na efektor Tox5 na porażenie obydwu stadiów rozwojowych pszenżyta, oraz wrażliwości na efektor Tox1 w stadium siewki dla pszenicy.

Mimo, że dziedziczenie odporności na poszczególne efekторы ma prosty charakter recesywny, to wzajemne interakcje poszczególnych efektorów indukujących powstawanie zmian nekrotycznych, może mieć postać skomplikowanej siatki zależności. Interakcje te mogą mieć charakter: addytywny, nieaddytywny, oraz epistatyczny. Dodatkowo w razie braku odpowiedniego genu wrażliwości w gospodarzu, izolat może skompensować brak kompatybilności jednego efektora zwiększając poziom produkcji innych, lub w razie braku możliwości porażenia, porazić gospodarza może inny, wyposażony w kompatybilne efekторы. Z uwagi na te oddziaływania i wielopoziomowe redundancje, w celu wykazania całościowego efektu niewrażliwości na efekторы na odporność fenotypową, dokonano analizy średnich wartości porażenia obiektów obu gatunków grupowanych pod względem wrażliwości na efekторы.

Średnie porażenie obiektów niewrażliwych na efekторы Tox1, Tox3, Tox5 i ToxA, było znacznie mniejsze niż obiektów wrażliwych na co najmniej jeden efektor, zarówno w stadium siewki w warunkach kontrolowanego środowiska, jak i w stadium roślin dorosłych w warunkach polowych. Co jest w zgodzie z modelem w którym nekrotroficzne efekторы są ważnym elementem patogeniczności.

Badania porażenia roślin w warunkach polowych z zasady obciążone są utrudnieniami wpływającymi na jakość uzyskanych danych. Czynniki takie jak: nierównomierne zasychanie roślin, fałszywe objawy powodowane przez spokrewnione patogeny nekrotroficzne, maskowanie objawów przez masowe wystąpienie niespokrewnionych patogenów, fałszywe objawy wynikające z nadwrażliwości na patogeny biotroficzne, okresy suszy zmniejszające skuteczność sztucznego zakażania, sprawiają, że mimo świadomości i uwagi oceniającego, ocena polowa oprócz informacji o wartości porażenia na *P. nodorum*, niesie też trudną do określenia część składową pochodzącą od innych czynników. Z uwagi na te utrudnienia istotność, oraz wartość wykrytych związków między wrażliwością na efekторы, a poziomem porażenia w stadium dorosłym jest raczej niedoszacowana niż przeszacowana.

Analizowane doświadczenia wykazują większy wpływ efektorów na odporność w stadium siewki w warunkach kontrolowanych, niż u dorosłych roślin w warunkach polowych. Jednakże przyjęty model testowania obiektów w polu z uwagi na zastosowanie sztucznych inokulacji w stadium dorosłym, nie odpowiada w pełni warunkom naturalnym. W warunkach normalnych inokulum porażające rośliny w stadium dorosłym pochodzi od patogenu przechodzącego kolejne cykle infekcyjne na rozwijających się siewkach. Powoduje to, że w przypadku wyższego poziomu odporności w stadium siewki, na rośliny dorosłe działa niższa presja patogena i w efekcie ich porażenie jest mniejsze.

W praktyce hodowlanej do selekcji można użyć łatwiejszych w uzyskaniu, nieoczyszczanych filtratów z hodowli wybranych izolatów *P. nodorum*. Efekторы o największym znaczeniu (Tox3 i Tox5) są produkowane przez większość izolatów w dużych ilościach. Efekторы Tox1 i ToxA są kłopotliwe do uzyskania, lecz wraz z Tox3 mogą być łatwo uzyskane poprzez ekspresję w *Pichia pastoris*. W przypadku homogenicznego materiału roślinnego do określenia wrażliwości na ekstrakt (zawierający pojedynczy efektor) wystarczy infiltracja pojedynczej siewki. Infiltracja około 300 siewek zajmuje wyszkolonemu pracownikowi około dwóch godzin, po około 5 dniach analiza wyników zajmie około godziny. Infiltracja liścia siewki nie niesie zagrożenia utraty materiału hodowlanego, więc testowanie wrażliwości może być sprzęgnięte z innymi procesami hodowlanymi.

Wzrost odporności przyszłych odmian pszenicy i pszenżyta na *P. nodorum* wynikający z eliminacji genów wrażliwości na toksyny białkowe z programów hodowlanych wydaje się możliwy do osiągnięcia relatywnie małymi środkami.

Osiągnięcia projektu

1. Opracowano procedury testowania materiałów roślinnych pod względem wrażliwości na efekторы białkowe *P. nodorum*: Tox1, Tox3, Tox5, ToxA.
2. Określono stopień rozprzestrzenienia genów warunkujących wrażliwość na efekторы w programach hodowlanych pszenicy i pszenżyta.
3. Wdrożono procedurę badania izolatów *P. nodorum* pod względem produkcji nekrotroficznych efektorów, oraz zbadano stan populacji patogenu.
4. Zbadano związek między niewrażliwością na efekторы, a odpornością fenotypową

na *P. nodorum* w stadium siewki, oraz w stadium rośliny dorosłej.

5. Wśród przebadanych wrażliwych na efekторы obiektów zidentyfikowano, obiekty charakteryzujące się wysoką odpornością.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- Walczewski J., E. Arseniuk 2015. Produkcja białkowych toksyn przez izolaty z krajowej populacji *S. nodorum*. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych" Zakopane 2–6.02.2015 r.
- Walczewski J., E. Arseniuk 2015. Effect of proteinaceous toxins produced by *Stagonospora nodorum* on necrosis induction in triticale. XVIII. International Plant Protection Congress (IPPC) Berlin 23-27.08.2015 r.
- Ochodzki P, J. Walczewski, E. Arseniuk 2015. Characteristics of selected strains of *Stagonospora nodorum* detected in Poland in terms of necrotrophic activity and production of proteinaceous toxins. 37th Mycotoxin Workshop, Bratysława 1-3.06.2015 r.
- Walczewski J., E. Arseniuk, P. Ochodzki 2016. Effect of proteinaceous toxins on *Parastagonospora nodorum* blotch development in triticale. The 9th International Triticale Symposium, May 23-27, 2016 in Szeged, Hungary.
- Walczewski J., Arseniuk E., Ochodzki P. 2016. Effect of proteinaceous toxins on *Parastagonospora nodorum* blotch development in wheat. [In:] 9th International Symposium on Septoria Diseases of Cereals, Paris, France, April 7-9, Abstracts: 138.
- Walczewski J. E, Arseniuk 2017. Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum*. XIII Ogólnopolska Konferencja naukowa "Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych" 30.01.2017, Zakopane, Polska.
- Walczewski J., P. Ochodzki, I. Grzeszczak, E. Lisicka 2017. Production, isolation and necrotrophic activity of *Parastagonospora nodorum* proteinaceous toxin Tox5. 39th Mycotoxin Workshop 19-21.06.2017, Bydgoszcz, Polska.
- Walczewski J., Ochodzki P., Arseniuk E., Tan Kar-Chun, 2017. *P. nodorum* effectors resistance among Polish wheat and triticale germplasm. 3rd Global Summit on Plant Science August 07–09, 2017 Rome, Italy,
- Ochodzki P., J. Walczewski, E. Arseniuk 2018. Production, isolation and necrotrophic activity of selected *Parastagonospora nodorum* proteinaceous toxins. 40th Mycotoxin Workshop, Monachium, czerwiec 11 - 13, 2018.
- J. Walczewski I, P. Ochodzki and E. Arseniuk Tox5 and its effect on SNB development in Polish wheat and triticale germplasm. In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant (2018) 54 (Suppl 1): S95.
- Walczewski J. 2019. Contribution of proteinaceous effectors in *Parastagonospora nodorum* blotch development in wheat and triticale. International Symposium on Cereal

Leaf Blights, Dublin, Irlandia. 22–24.05. 2019.

Literatura

Arseniuk E., Walczewski J., Ochodzki, P. (2019). Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum* i ich związek z patogenicznością oraz odpornością pszenżyta i pszenicy na septoriozę liści i plew. Biuletyn IHAR 286:71-73.

Friesen TL, Faris JD (2010) Characterization of the wheat-*Stagonospora nodorum* disease system: what is the molecular basis of this quantitative necrotrophic disease interaction? Can J Plant Pathol-Rev Can Phytopathol 32: 20–28.

Liu Z, Faris JD, Oliver RP, Tan KC, Solomon PS, McDonald

MC, McDonald BA, Nunez A, Lu S, Rasmussen JB, Friesen TL (2009). SnTox3 acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the Snn3 gene. PLoS Pathog 5:e1000581.

Friesen TL, Chu CG, Liu ZH, Xu SS, Halley S, Faris JD (2009). Host-selective toxins produced by *Stagonospora nodorum* confer disease susceptibility in adult wheat plants under field conditions. Theor. Appl. Genet. 118:1489–1497.

Walczewski J. (2020). Prosta metoda selekcji materiałów hodowlanych pszenicy i pszenżyta z wykorzystaniem nieoczyszczonego filtratu zawierającego efektor Tox3. Biuletyn IHAR 290: 37-41.

Określenie czynników decydujących o zimowaniu pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego w warunkach polskich

Identification of factors determining winter wheat and winter triticale overwintering under Polish winter conditions

Marcin Rapacz✉, Barbara Jurczyk, Monika Sasal

Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
✉ e-mail: rrapacz@cyf-kr.edu.pl

Słowa kluczowe: fluorescencja chlorofilu, mrozoodporność, rozhartowywanie, zimotrwałość, zmiany klimatyczne

Celem projektu było określenie czynników wpływających na zimotrwałość pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego w warunkach polskich oraz czynników najbardziej różnicujących zimotrwałość badanych rodów. Cel realizowany był poprzez wieloletnie i wielopunktowe doświadczenia polowe z pomocą metod umożliwiających modelowanie wpływu różnych parametrów pogodowych/klimatycznych na badane cechy (zimotrwałość i mrozoodporność roślin). Cele te zostały osiągnięte.

Równolegle przez cały okres realizacji projektu realizowane były dwa tematy badawcze:

Temat badawczy 1. Ocena zimotrwałości oraz mrozoodporności roślin Materiały i Metody

Celem tematu było określenie zimotrwałości, mrozoodporności całych roślin oraz mrozoodporności na poziomie komórkowym pszenicy i pszenżyta. Badania prowadzono przez cały okres realizacji projektu. Materiał do badań stanowiły rody pszenicy i pszenżyta ozimego w ilościach od 67–75 rodów/odmian pszenicy ozimej oraz 28–35 rodów/odmian pszenżyta ozimego wybranych spośród rodów/odmian badanych w doświadczeniach wstępnych firm hodowlanych. Oceniana była: przeżywalność roślin w teście polowo-laboratoryjnym oraz mrozoodporność aparatu fotosyntetycznego (mrozoodporność na poziomie komórkowym) z pomocą pomiarów fluorescencji chlorofilu po mrożeniu odciętych liści. Badania mrozoodporności roślin testem polowo-laboratoryjnym oraz mrozoodporności liści testem fluorescencyjnym przeprowadzone zostały

w dwóch seriach doświadczalnych. W każdej z nich temperaturę obniżono od 0 °C do –15 °C z szybkością 2°C na godzinę. Po 2 godz. mrożenia w –15 °C temperatura była podnoszona do +2°C z podobną szybkością. Połowa ocena zimotrwałości roślin wykonywana była w 10 punktach doświadczalnych (z czego w 7 dla pszenicy, a w 6 dla pszenżyta) we współpracujących firmach hodowlano-nasiennych lub (ostatni rok badań) zgodnie z danymi GUS dla obszaru na którym zlokalizowany był punkt doświadczalny.

W latach 2018 i 2019 porównano dodatkowo dwie metody oceny mrozoodporności – klasyczne mrożenie, gdzie czynnikiem letalnym jest niska temperatura działająca przez krótki czas oraz mrożenie przedłużone (Waalén i wsp. 2011), gdzie czynnikiem letalnym jest umiarkowanie niska temperatura działająca przez kilka dni co symuluje warunki stopniowej dehydratacji bez obecności okrywy śniegowej, a więc warunki bardziej typowe w warunkach obecnych zim. W warunkach przedłużonego mrożenia temperatura została obniżona od 0 °C do –8 °C z szybkością 2°C na godzinę. Po 7 dniach temperatura została podniesiona do +2°C z podobną szybkością.

Opis wyników

W wyniku prowadzonych badań potwierdzono, że określanie stopnia mrozoodporności poprzez pomiary fluorescencji chlorofilu wykonywane po mrożeniu odciętych liści roślin nie zawsze daje zadowalające rezultaty co zależy od stopnia zahartowania roślin oraz ich wcześniejszych uszkodzeń w warunkach polowych.



Są to podobne zastrzeżenia jak w przypadku klasycznego testu polowo-laboratoryjnego. Potwierdzono jednak, że w przypadku metody fluorescencyjnej wiarygodność uzyskanych wyników można zweryfikować na podstawie wyników pomiarów (Rapacz i wsp. 2015). Ponadto wskazano, że wyniki oceny mrozoodporności roślin wykonywane testem polowo-laboratoryjnym przy mrożeniu przez 24 h w temperaturze -15°C były zgodne z wynikami uzyskanymi po mrożeniu przedłużonym (-8°C przez 7 dni).

Temat badawczy 2: Opracowanie danych pogodowych – wskazanie wskaźników przebiegu zimy decydujących o zimowaniu

Materiały i Metody

Celem tematu badawczego było pozyskanie danych o przebiegu pogody w okresie jesieni i zimy, który to przebieg pogody ma wpływ na zimowanie roślin i ewentualne różnice pomiędzy ich zimotrwałością a stopniem ich mrozoodporności ocenianym na poziomie komórkowym (parametry fluorescencji chlorofilu) i na poziomie całych roślin (test polowo-laboratoryjny). Dane te analizowane były pod kątem wytypowania parametrów przebiegu pogody, które mogły mieć decydujący wpływ na zimowanie pszenżyta i pszenicy w poszczególnych latach realizacji projektu.

Dane uzyskano dla wszystkich lokalizacjach w jakich prowadzone były doświadczenia polowe (liczba zmienna w latach). Obejmowały one m. in. przebieg temperatur (średnia, max., min.) w ciągu doby, ilość opadów, grubość okrywy śniegowej. Z pozyskanych danych wyliczane były wskaźniki przebiegu zimy (Waalén i wsp. 2013).

W początkowym okresie realizacji projektu opracowano termiczne wskaźniki rozhartowywania roślin wskazujące na stopień zahartowania roślin (Rapacz i wsp. 2017).

Opis wyników

Wyniki uzyskane w ciągu kolejnych sześciu zim pozwoliły na opracowanie modeli wpływu przebiegu pogody na zimowanie pszenicy i pszenżyta w warunkach polskich.

W przypadku pszenicy badany model w bardzo wiarygodny sposób wiąże dane o przebiegu pogody ze stopniem przezimowania roślin. Dane empiryczne korelują z wartościami przewidywanymi na poziomie 0,867. Dla pszenżyta wartość tego współczynnika jest niższa (0,406). Niższa predykcyjność modelu dla pszenżyta wynika zapewne ze słabszego zróżnicowania zimotrwałości tego zboża w punktach doświadczalnych i kolejnych

latach badań. W przypadku pszenicy największe znaczenie dla kształtowania zimotrwałości miały następujące parametry: negatywny – termiczny wskaźnik wegetacji (parametr wyliczany dla okresu XII-III), parametry opisujące proces rozhartowywania roślin, intensywność zimy oraz temperatury minimalne w lutym natomiast wpływ pozytywny odnotowano dla liczba dni z temperaturą minimalną $<5^{\circ}\text{C}$ (temperatur hartujących) w październiku oraz liczba dni z okrywą śniegową w styczniu. W przypadku pszenżyta największe pozytywne znaczenie miały: ilość cykli zamrażania/rozmarzania w miesiącach XII, I i III i grubość okrywy śniegowej w lutym, natomiast negatywny liczba dni z oblodzeniem roślin (II, III), oraz temperatury minimalne i grubość okrywy śniegowej w lutym. Indeksy rozhartowywania miały mniejsze znaczenie dla kształtowania zimotrwałości, niż w przypadku pszenicy.

Wnioski z prowadzonych badań

- Otrzymane modele zimotrwałości pozwoliły na wytypowanie wskaźników przebiegu zimy mających największy wpływ na kształtowanie tej cechy. Model otrzymany dla pszenicy charakteryzował się lepszymi wynikami predykcji, niż model otrzymany dla pszenżyta co wynikało najprawdopodobniej z niższego zróżnicowania stopnia przezimowania pszenżyta.
- Na stopień przezimowania mają w największym stopniu wpływ nie tylko temperatury minimalne w okresie zimy i obecność okrywy śniegowej w okresie ich występowania, ale też występowanie warunków sprzyjających hartowaniu i rozhartowywaniu roślin. Przy czym z racji obserwowanej tendencji zaniku okrywy śniegowej i podwyższania się temperatur minimalnych znaczenie tych pierwszych czynników maleje.
- Test przedłużonego mrożenia zdaje się być rozsądną alternatywą dla testu klasycznego ze względu na dużo niższe ryzyko całkowitego zniszczenia słabo zahartowanych roślin.
- W przypadku obydwu sposobów testowania mrozoodporności alternatywnie do oceny przeżywalności roślin można stosować pomiary fluorescencji chlorofilu wykonywane na odciętych liściach.

Osiągnięcia projektu

Najważniejszymi osiągnięciami projektu jest wprowadzenie wskaźników rozhartowywania określających zależność pomiędzy warunkami

pogodowymi przed wystąpieniem mrozów a stopniem mrozoodporności roślin oraz stworzenie empirycznych modeli wiążących zimotrwałość pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego ze wskaźnikami przebiegu zimy. Modele te można wykorzystać do prognozowania zimowania np. w oparciu o modele zmian klimatu.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Rapacz M., Wójcik-Jagła M., Fiust A., Sasal M., Jurczyk B. 2015. Cold de-acclimation tolerance among Polish accessions of common wheat and triticale. Agriculture and Climate Change - Adapting Crops to Increased Uncertainty, 15-17 February 2015, Amsterdam, The Netherlands, poster. *Procedia Environmental Sciences*, Volume 29, 2015, Pages 24-25, ISSN 1878-0296, <http://dx.doi.org/10.1016/j.proenv.2015.07.136>.)

Publikacje

Rapacz M., Sasal M., Kalaji H.M., Kościelniak J., 2015. Is the OJIP test a reliable indicator of winter hardiness and freezing tolerance of common wheat and triticale under variable winter environments? *PLoS ONE* 10(7):

e0134820.

Rapacz, M., Jurczyk, B., and Sasal, M., 2017. Deacclimation may be crucial for winter survival of cereals under warming climate. *Plant Sci.* 256, 5–15. doi:10.1016/j.plantsci.2016.11.007.

Rapacz M., Macko-Podgórni A., Kuchar L., Jurczyk B. Modelling of wheat and triticale winterhardiness under current and predicted winter scenarios for Central Europe. A focus on de-acclimation. Publikacja w trakcie przygotowywania do złożenia wykorzystująca modele empiryczne opracowane w ramach projektu oraz późniejsze modelowanie predykcyjne.

Literatura

Waalén, W. M., Tanino, K. K., Olsen, J. E., Eltun, R., Roggli, O. A., and Gusta, L. V (2011). Freezing Tolerance of Winter Canola Cultivars is Best Revealed by a Prolonged Freeze Test. *Crop Sci.* 51, 1988–1996. doi:10.2135/cropsci2011.02.0098.

Waalén, W., Øvergaard, S. I., Åssvein, M., Eltun, R., and Gusta, L. V (2013). Winter survival of winter rapeseed and winter turnip rapeseed in field trials, as explained by {PPLS} regression. *Eur. J. Agron.* 51, 81–90. doi:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2013.06.004>.

Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych skracających cykl hodowlany i zwiększających efektywność selekcji genotypów ozimej pszenicy i ozimego pszenżyta o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew [czynnik sprawczy: *Parastagonospora nodorum* (Berk.), (Quaedvlieg, Verkley & Crous.)]

Development and use of biotechnological methods for shortening the breeding cycle and improving the effectiveness of genotypes selection of winter wheat and winter triticale with increased resistance to septoria leaf and glume (agent: *Parastagonospora nodorum* (Berk.), (Quaedvlieg, Verkley & Crous.))

Edward Arseniuk✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
✉ e-mail: e.arseniuk@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: androgeniza, kultury *in vitro*, nekrozy, odporność, pszenica ozima, pszenżyto ozime, somatyczna embriogeneza.

Celem głównym realizowanego projektu było porównanie efektywności i wykorzystanie biotechnologicznych technik somatycznej embriogenezy i androgenyzy poszerzających zmienność genetyczną i skracających cykl hodowlany pszenicy i pszenżyta pod względem odporności i tolerancji pszenicy i pszenżyta na septoriozę liści i plew.

Cele szczegółowe realizacji zadania były następujące:

1. otrzymanie nasion z mieszańców pokolenia F1 z kombinacji krzyżówkowych w obie strony (pełny diallel) wybranych ozimych odmian pszenicy i pszenżyta o zróżnicowanej odporności na *S. nodorum*,
2. zwiększenie efektywności indukcji kalusa i regeneracji roślin w warunkach kultury poprzez optymalizację procedury *in vitro* dojrzałych zarodków,
3. wyprowadzenie roślin mieszańców pokolenia F1 z dialleli oraz rodzicielskich odmian pszenicy i pszenżyta do rozpoczęcia pobierania eksplantatów do produkcji somaklonów,
4. otrzymanie pylników z kwitnących roślin

pokolenia F1 z dialleli oraz z rodzicielskich odmian pszenicy i pszenżyta do rozpoczęcia wyprowadzania linii dihaploidalnych z dotychczas otrzymanych ziarniaków mieszańców.

5. ocena fenotypowa reakcji odmian pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego oraz ich somaklonów i dihaploidów na toksynę białkową Tox3.

Materiały i Metody

Material patogena:

Izolaty patogena o wysokiej patogeniczności do produkcji inokulum zbożowego *P. nodorum* do atestacji odporności odmian rodzicielskich, somaklonów i dihaploidów pszenicy i pszenżyta.

Material roślinny

Na bazie oceny odporności fenotypowej na nekrotroficzny grzyb *Parastagonospora nodorum* wykonywanej regularnie w latach poprzednich do realizacji obecnego projektu wybrano sześć odmian pszenicy ozimej oraz siedem odmian pszenżyta ozimego o zróżnicowanej odporności na badanego patogena. Celem



uzyskania nasion pokolenia F1 odmiany te były krzyżowane obustronnie w latach 2014 – 2016 wewnątrz gatunku każda z każdą (pełny diallel). Krzyżowania zostały wykonane w ramach umów zleceń przez spółki prawa handlowego: HR Smolice, HR Strzelce, HR Danko, Poznańska HR, MHR – HBP Kraków.

Metody

Wytworzenie somaklonów

Dla potrzeb projektu do wytworzenia somaklonów wykorzystano kultury kalusa uzyskiwane z niedojrzałych zarodków obiektów pokolenia F1 uzyskanego w latach 2014 – 2016. W celu inicjacji tworzenia kalusa niedojrzałe zarodki w późnym stadium kulistym w warunkach aseptycznych wycinano z ziarniaków i umieszczano na pożywce Murashige-Skoog'a z dodatkiem 30 μ M fitohormonu Dicamba. Po inkubacji w temperaturze 25°C i przy 16/8-godzinnym cyklu światło/ciemność siewki wytwarzające korzenie przesadzono do doniczek z ziemią. Celem pełnego ukorzenia się przez 2 tygodnie przetrzymywano je w warunkach wysokiej wilgotności oraz temperaturze i długości dnia jak poprzednio. Następnie rośliny były jarowizowane przez 6 tygodni w temperaturze 3°C. Zjarowizowane rośliny po przesadzeniu do szklarni prowadzono do momentu zbioru ziarna pokolenia R0. Jeśli liczba ziarniaków pokolenia R0 była zbyt mała do przetestowania odporności na septoriozę w polowym doświadczeniu infekcyjnym, rozmnażano ją do pokolenia R1. W sumie wyprowadzono po 30 somaklonów do atestacji polowej dla każdej z odmian rodzicielskich i pokolenia F1 każdej kombinacji krzyżówkowej, co daje w sumie 1170 somaklonów, tj. 720 somaklonów pszenicy i 450 somaklonów pszenżyta.

Wytworzenie dihaploidów

W celu otrzymania linii DH ziarniaki mieszańców F1 wysiewano do wazonów w komorach fitotronowych. Kłosa zebrano w środkowej fazie jednojądrowego stadium ziaren pyłku i przechowywano przez 7 do 10 dni w chłodni. Pylniki wykładano na pożywkę CLM i wstawiono do inkubatora do temp. 26°C. Po około 6 tygodniach sukcesywnie przekładano wytworzony na pylnikach kalus na pożywkę R1. Następnie, po około 10 dniach wytworzone z kalusa rośliny przekładano do kolbek na pożywkę ukorzeniającą R4. Zregenerowane rośliny po ukorzeniu poddawano procesowi jarowizacji trwającemu 6 tygodni w temp. 4°C. Po zakończeniu jarowizacji rośliny wysadzano do pojemników z ziemią i ustawiano

w komorze fitotronowej do czasu wytworzenia ziarniaków. Wyprowadzono po 30 dihaploidów do atestacji polowej dla każdej z odmian rodzicielskich i pokolenia F1 każdej kombinacji krzyżówkowej, co daje w sumie 1170 dihaploidów, tj. 720 dihaploidów pszenicy i 450 dihaploidów pszenżyta.

Polowe doświadczenia infekcyjne

Ocena fenotypowa porażenia roślin przez *P. nodorum* była prowadzona dwiema metodami. Pierwszą ocenę wykonano wizualnie w momencie pojawienia się pierwszych objawów choroby. Taką ocenę powtarzano w odstępach tygodniowych do naturalnego obumarcia roślin na poletku. Wielkość porażenia, oddzielnie dla liści i plew kłosów określana była wizualnie w 9-stopniowej skali, w której 1 – oznaczała wysoką podatność, silne porażenie grzybem; 9 – odporność ze śladami porażenia). Rośliny obiektów na poletkach ocenione, odpowiednio, w stopniach 9 – 7 w skali oceny uznawano za typ odporny, w stopniach 6 – 4 za typ pośredni oraz w stopniach 3 – 1 za typ podatny na septoriozę liści i plew. Ponadto wykonano pomiary wysokości roślin oraz daty kłoszenia.

Druga metoda była oparta o zdjęcia losowo zebranych liści flagowych z poletek po ok 14 dniach od ostatniej inokulacji. Przy pomocy programu ImageJ została przeprowadzona ocena porażenia liści w skali, gdzie porażenie ponad 90% powierzchni liścia oznaczało wysoką podatność (silne porażenie grzybem), porażenie poniżej 10% liścia oznaczało odporność (ślady porażenia).

Wszystkie somaklony i linie dihaploidalne wyprodukowane z pokolenia F1, które wytworzyły liczbę ziarniaków w pokoleniach R0-R1 były sukcesywnie włączane do polowych doświadczeń infekcyjnych celem scharakteryzowania odporności liści i plew kłosów na *P. nodorum*.

Podstawowymi jednostkami doświadczalnymi do dokonywania pojedynczych ocen były w zależności od zapasu nasion 2–4-rzędkowe poletka o długości 1m, rozstawie 15 cm i 10 roślinach/rzędek. Doświadczenia zakładano w układzie losowanych bloków z 2 powtórzeniami. Pod jednym powtórzeniem rozumiane było lustrzane odbicie dwóch poletek obsianych ziarnem tego samego somaklonu/dihaploidu. Pary poletek uszeregowano w dwóch równoległych rzędach ukierunkowanych północ-południe, a dla zachowania izolacji oddzielono je pasem ugoru o szerokości 2m. Jeden rząd poletek był inokulowany trzykrotnie w ciągu sezonu przez opryskiwanie wodną zawiesiną zarodników mieszaniny izolatów *Parastagonospora nodorum*.

Pierwsza inokulacja z zastosowaniem zawiesiny o stężeniu $5-6 \times 10^6$ zarodników/ml miała miejsce pod koniec stadium butonizacji (nabrzmiwania) kłosa (GS 45), druga, z zastosowaniem zawiesiny o podobnym stężeniu ok. 10 dni później. Trzecia inokulacja została wykonana zawiesiną konidiów o stężeniu $2-3 \times 10^6$ w 1ml, po wykłoszeniu (GS 59) z uwzględnieniem różnic w terminie kłoszenia testowanych linii. Rośliny pszenżyta na drugim, równoległym pasie opryskiwano Tiltiem 250 EC (0.1% s.a. – propikonazol, 500l/ha) przed rozpoczęciem inokulacji roślin na pierwszym pasie. Taki układ doświadczalny zapewniał, iż każde traktowane patogenem poletko zboża będzie miało własną kombinację kontrolną. Ocenę porażenia przez *P. nodorum* rozpoczęto w momencie pojawienia się pierwszych objawów choroby i powtarzano w odstępach tygodniowych do naturalnego obumarcia roślin na poletku.

Wyniki

Łącznie przetestowano po 52 genotypy pszenicy ozimej i 53 genotypy pszenżyta ozimego.

Analizę statystyczną wyników oparto na podaniu podstawowych statystyk, takich jak: wartości średnie dla poszczególnych grup obiektów pszenicy i pszenżyta (somaklony, dihaploidy, odmiany), odchylenie standardowe od średniej, $t_{0,05}$, d.f. Studenta, NIR, CV%, przedziały tolerancji, przedziały ufności dla średnich wartości, zakresy reakcji.

Charakterystyka odporności fenotypowej obiektów pszenicy ozimej na *P. nodorum*.

Wśród somaklonów z najodporniejszymi liśćmi charakteryzowały się linie S-11b, S-22b, S-24, S-25, S-1b, S-31 i S-35S-35, stopień porażenia liści 6,0 – 6,4. Pod względem porażenia liści ww. linie somaklonalne również cechowały się dość wysoką odpornością. Linia 11b pod względem porażenia plew charakteryzowała się również wysoką odpornością. Pozostałe linie miały plewy podatniejsze na *P. nodorum*. Porażenie plew wyniosło 5,9%. Również ocena porażenia liści była wysoka, wyniosła 6,0 oraz 3,3 dla plew kłosów. Najwięcej porażonej tkanki zaobserwowano na roślinach linii S-14 i S-13 (odpowiednio 3,5,0 i 35,1%). Linie te były również stosunkowo podatne pod względem porażenia plew. Po przeprowadzeniu analizy wariancji i testów post-hoc wykazano statystycznie istotne różnice dla obiektów pszenicy ozimej w warunkach polowych.

Na podstawie przeprowadzonych testów odporności na septoriozę liści i plew dla otrzymanych

genotypów pszenicy ozimej w warunkach polowych najniższe porażenie przez *P. nodorum* liści stwierdzono u dihaploidów (średnia porażenia wyniosła 19,4%, natomiast średnia ocena choroby w skali 1 – 9 dla liści wyniosła 6,0 oraz 4,2 dla plew kłosów). Najbardziej podatne były odmiany pszenicy. Porażenie ich liści wyniosło 27,7%, średnia ocena porażenia dla liści w skali 9 – stopniowej wyniosła 5,8 oraz 4,2 dla plew kłosów. W przypadku somaklonów pszenicy średni udział porażonej tkanki na liściu wyniósł 23,4%. Średnia ocena dla liści wg ww. skali dla tych obiektów wyniosła 5,5 oraz 4,2 dla plew na kłosach.

Wśród dihaploidów, najwyższą odporność odnotowano dla linii D-31 (stwierdzono 14,8% porażonej tkanki liścia, ocena porażenia dla liści w skali 9^o wyniosła 6,0 natomiast dla kłosów 5,3). Najbardziej podatną na porażenie liści i plew przez *P. nodorum* była linia D-19 (porażenie tkanki liścia wyniosło 47,1%, ocena w 9^o skali wyniosła 4,9 dla liści i 3,3 dla plew).

W przypadku odmian, Ostroga charakteryzowała się najwyższą odpornością na septoriozę liści i plew (udział porażonej tkanki liści wyniósł 11,1%, średnia ocena porażenia liści w skali 9^o to 6,7 dla liści i 6,0 dla plew kłosów). Najwyższe porażenie liści wśród odmian zaobserwowano dla odmian Bamberka i Muza (porażenie liści wynosiło odpowiednio 25,5% i 36,8%, ocena w skali 9^o dla liści to 4,7 oraz plew kłosów 3,6 i 3,8).

Charakterystyka odporności fenotypowej na *P. nodorum* obiektów pszenżyta ozimego.

Na podstawie przeprowadzonych polowych testów pod względem odporności na septoriozę liści i plew badanych obiektów pszenżyta ozimego (somaklony, dihaploidy, odmiany) najwyższą średnią odporność stwierdzono w grupie somaklonów. Średni udział porażonej tkanki liści przez *P. nodorum* wyniósł 28,6%, natomiast wartości średnie oceny porażenia liści i plew kłosów w skali 9. stopniowej wynosiły odpowiednio 4,7 i 4,4. Pod względem porażenia liści i plew kłosów najbardziej podatne były linie somaklonalne S-38, S-67 i S-40. Linie S45, S-55 i S-63 na porażenie badanym patogenem cechowała wysoka odporność liści i stosunkowo wysoka odporność plew.

Wśród dihaploidów pszenżyta najmniejsze porażenie liści stwierdzono u linii D-44. Porażenie wyniosło zaledwie 11,5%, a średnia ocena choroby dla liści w skali 9^o wyniosła 6,5 i dla kłosów 3,7. U linii D-45 udział porażonej tkanki wyniósł 16,3% oraz 5,9 dla liści i 4,7 odpowiednio: dla liści i kłosów). Najbardziej podatne były linie D-37,

D-40 i D-57, u których względny stopień porażenia wynosił odpowiednio 45,0%, 32,7% i 51,7%. Linia D-57 charakteryzowała się wysoką podatnością liści i najwyższą odpornością plew kłosów.

W przypadku odmian u Borwo stwierdzono najwyższą odporność liści (zaledwie 2,3% porażonej tkanki) i stosunkowo wysoką odporność plew. Najbardziej podatną okazała się odmiana Algoso. Po przeprowadzeniu analizy wariancji i testów post-hoc wykazano statystycznie istotne różnice dla obiektów pszenżyta ozimego w warunkach polowych.

Wnioski z polowej oceny odporności obiektów pszenicy i pszenżyta na *P. nodorum*.

1. Na podstawie wykonanych analiz statystycznych wykazano istotne różnice w odporności na *P. nodorum* dla wszystkich obiektów pszenicy i pszenżyta w warunkach polowych oraz genotypów pszenżyta w warunkach kontrolowanego środowiska.
2. Porażenie przez *P. nodorum* liści odmian i somaklonów pszenżyta było istotnie wyższe w porównaniu z somaklonami pszenicy.
3. Wśród somaklonów i dihaploidów obydwu gatunków zbóż zidentyfikowano genotypy o odporności liści i plew przewyższającej odporność odmian rodzicielskich.
4. Tak więc uzyskane wyniki wskazują, że możliwa jest poprawa odporności genotypów obydwu gatunków zbóż w procesie somatycznej embriogenezy, a także androgenezy.
5. Ujawniona zmienność genetyczna pod względem odporności na *P. nodorum* jest zalecana do wykorzystania w hodowli praktycznej jako dodatkowe źródło odporności na badanego patogena.
6. W porównaniu z obiektami pszenicy obiekty pszenżyta (odmiany, somaklony i dihaploidy) były istotnie podatniejsze na porażenie przez *Parastagonospora nodorum*.
7. Wyniki badań przeprowadzonych na genotypach pszenicy i pszenżyta o zróżnicowanej odporności wykazały poszerzenie zakresów reakcji na badaną cechę u obu gatunków zbóż. Należy podkreślić, że zakresy reakcji na badanego patogena obiektów pszenżyta były istotnie szersze od zakresów reakcji poszczególnych grup obiektów pszenicy uprawianej od tysiącleci.
8. Czynniki sprawczy choroby jest wprawdzie jeden, ale atakuje asymilacyjne organy roślin jednocześnie przemieszczając się od dołu ku górze rośliny. Założone cele zostały

osiągnięte.

Porównanie stopnia porażenia liści przez *P. nodorum* poszczególnych obiektów pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego w warunkach polowych, warunkach kontrolowanego środowiska i pod względem wrażliwości na toksynę białkową Tox3.

Materiałem do analizy odporności były dwutygodniowe siewki do czasu pełnego rozwinięcia drugiego liścia. Do doświadczenia wybrano po 8 siewek dla każdego genotypu, w dwóch powtórzeniach. W przypadku mniejszej ilości materiału nasiennego, do doświadczenia zostały wykorzystane ziarniaki mieszańców pokolenia F1 otrzymanych kombinacji krzyżówkowych 6 odmian pszenicy ozimej i 7 odmian pszenżyta ozimego. W ramach projektu zostało przygotowane inokulum, składające się z izolatów o wysokiej patogeniczności, pochodzących z różnych regionów Polski. Siewki były inokulowane wodną zawiesiną zarodników *P. nodorum* o stężeniu $4-4,5 \times 10^6$ /ml i umieszczone w całkowitej ciemności w warunkach kontrolowanego środowiska: temp. 22°C i 100% wilgotności przez 72 godziny. Po tym okresie siewki były prowadzone w warunkach fotoperiodu 16 godzin dzień, 8 godzin noc, temperaturze 20°C w nocy i 22°C w dzień oraz naturalnej wilgotności względnej powietrza. Przez cały okres realizacji doświadczenia ww. warunki były ściśle kontrolowane. Po 10–14 dniach inkubacji przeprowadzono ocenę stopnia porażenia liści siewek w skali; gdzie >90% = podatny, (silne porażenie grzybem); <10% = odporny (ślady porażenia).

Materiałem do przeprowadzenia atestacji roślin na toksynę Tox3 były dwutygodniowe siewki, po 3 dla każdego genotypu. W ramach projektu toksyna Tox3 została oczyszczona metodami chromatograficznymi. W blaszkę liściową siewek został wstrzyknięty preparat toksyny białkowej. Obszar infiltracji wynosi ok. 4 cm. Siewki zostały umieszczone w warunkach fotoperiodu 16 godzin dzień, 8 godzin noc, temperaturze 20°C w nocy i 22°C w dzień oraz naturalnej wilgotności względnej powietrza. Następnie, po 4–8 dniach została przeprowadzona ocena fenotypowa w 4-stopniowej skali, gdzie 0 = brak reakcji; 1 = niewielkie chlorozy; 2 = chlorozy; 3 = chlorozy z nekrozami; 4 = nekrozy.

Porównanie stopnia porażenia liści przez *P. nodorum* poszczególnych obiektów pszenicy ozimej w warunkach polowych, warunkach kontrolowanego środowiska i pod względem

wrażliwości na toksynę białkową Tox3.

Do przeprowadzenia testów odporności na septoriozę liści i plew w warunkach polowych i kontrolowanego środowiska dla pszenicy ozimej wykorzystano 25 linii somaklonalnych, 6 linii dihaploidalnych, 6 rodzicielskich odmian pszenicy, które posłużyły do otrzymania krzyżówek mieszańców pokolenia F1: Arkadia, Astoria, Bamberka, Muza, Ostroga, Wydma oraz 3 wzorce: Operetka, KWS Ozon, Patras.

Wśród somaklonów najbardziej odpornymi były linie S-22a, S-22b S-24 i S-35, względny stopień porażenia tkanki liściowej nie był oceniany. Ocena porażenia liści była wysoka i wynosiła odpowiednio 6,8, 6,7 i 6,0 oraz plew kłosów 6,7, 6,6, 8,3 i 7,1. Najwięcej porażonej tkanki zaobserwowano na roślinach linii S-17 (65,8%, ocena porażenia liści wyniosła 5,9 a plew kłosów 6,3).

Wśród dihaploidów, najwyższą odporność odnotowano dla linii D-33 (zaobserwowano 34,1% porażonej tkanki liścia, ocena porażenia dla liści w skali 9° wyniosła 5,7 natomiast dla kłosów 6,4). Najbardziej podatna na porażenie przez *P. nodorum* była linia D-18 (ocena w 9° skali wyniosła 4,3 dla liści i 7,3 dla plew).

W przypadku odmian stwierdzono dużą rozbieżność reakcji na patogena. Odmiany Ostroga i Operetka były najbardziej odporne na septoriozę liści i plew (udział porażonej tkanki wyniósł odpowiednio 21,4% i 27,1%. Średnia ocena porażenia liści w skali 9° dla odmiany Ostroga to 6,9, dla Operetki 6,5, a dla plew kłosów odpowiednio 6,0 i 5,4). Najwyższe porażenie liści wśród odmian zaobserwowano dla odmiany Wydma [ocena w skali 9° dla 4,6, (ale tylko 18,5% porażenia liści w skali względnej) i 6,4 dla plew kłosów]. Po przeprowadzeniu analizy wariancji i testów post-hoc wykazano statystycznie istotne różnice dla obiektów pszenicy ozimej w warunkach polowych.

Przeprowadzone testy odporności na septoriozę liści i plew dla genotypów pszenicy w warunkach kontrolowanego środowiska wykazały najwyższą odporność dla dihaploidów. Ich porażenie wyniosło 10,4%. Najwyższe porażenie tkanek liści przez *P. nodorum* stwierdzono dla liści siewek odmian pszenicy (14,4%) i pszenżyta (17,3%). W przypadku somaklonów porażenie w warunkach kontrolowanego środowiska wyniosło przeciętnie 14,2% dla testowanych obiektów pszenicy i 13,9% dla obiektów pszenżyta.

Do przeprowadzenia testów odporności na septoriozę liści i plew w warunkach polowych i w warunkach kontrolowanego środowiska dla pszenżyta ozimego włączono 20 linii

somaklonalnych, 23 linie dihaploidalne, 7 rodzicielskich odmian pszenżyta, które posłużyły do otrzymania krzyżówek mieszańców pokolenia F1: Algoso, Borwo, Borowik, Cyrkon, Tomko, Meloman i Panteon oraz 3 wzorce: Pigmej, Fredro, Borwo. Jedna linia dihaploidalna oraz trzy somaklonalne wykazały silne porażenie przez rdzę brunatną dlatego nie przeprowadzono dla nich oceny porażenia liści w programie ImageJ. Jedna linia dihaploidalna (D-41) i jedna somaklonalna (S-49) wykazały duże zróżnicowanie w warunkach polowych, dlatego przeprowadzono oddzielną ocenę dla każdego z tych obiektów.

Na podstawie przeprowadzonych polowych testów odporności na septoriozę liści i plew dla obiektów pszenżyta ozimego zaobserwowano najwyższą odporność dla linii somaklonalnych. Średnie porażenie liści obiektów pszenżyta przez *P. nodorum* w 2019 roku wyniosło 34,4% a w 2020 roku 40,1%, natomiast średnia ocena porażenia liści to odpowiednio dla lat 2019 i 2020 w skali 9 stopniowej to 5,6 i 4,7 oraz plew kłosów to 5,4 i 4,0. Najbardziej podatne były linie dihaploidalne pszenżyta. Porażenie liści dihaploidów wyniosło w 2019 i 2020 roku odpowiednio 36,3% oraz 51,7%. Średnia ocena w skali 9° dla liści wyniosła 5,2 i 5,6 a plew kłosów 6,7 i 4,2.

Wśród ocenianych w 2019 roku somaklonów stwierdzono, że linia S-40 pomimo dość niskiego, pewnie błędnie ocenionego, porażenia liści wynoszącego zaledwie 1,4% liści ocenionego w skali 9° na 3,5 oraz 7,1 dla plew kłosów okazała się linią najbardziej podatną pod względem porażenia liści i kłosów w 2020 roku. Innymi podatnymi liniami pod względem porażenia liści i średnio podatnymi pod względem porażenia plew w 2019 roku okazały się S-37, S-39, S-55 i S-49a. Reakcje tych ostatnich linii na *P. nodorum* w 2020 roku były podobne.

Wśród dihaploidów pszenżyta najmniejszy udział porażonej tkanki zaobserwowano u linii D-57 i D-39 (porażenie wyniosło zaledwie 8,4%, średnia ocena choroby dla liści w skali 9° wyniosła 5,5 i dla kłosów 5,2) oraz linii D-57 (udział porażonej tkanki wyniósł 14,1% oraz oceny odpowiednio: 4,0 dla liści i 6,7 dla plew kłosów). Najbardziej podatna była linia D-45 (stopień porażenia stanowił 63,3%, ocena porażenia przez *P. nodorum* dla liści w skali 9° to 6,3 i 4,9 dla plew kłosów).

W przypadku odmian, najwyższą podatnością liści charakteryzowała się odmiana Algoso (zaledwie 2,9% porażonej tkanki, co jest pewnie błędną oceną sprzeczną z oceną wykonaną w 2020 roku. W skali 9° ocena liści wynosiła 3,8. Z kolei ocena odporności plew kłosów była dość

wysoka i wynosiła 6,8 co jest zgodne z ocenami 2020 roku. Najbardziej odporną odmianą w latach realizacji projektu okazała się odmiana Borwo. Po przeprowadzeniu analizy wariancji i testów post-hoc wykazano statystycznie istotne różnice dla obiektów pszenżyta ozimego w warunkach polowych.

W wyniku przeprowadzonych fitotronowych testów odporności na septoriozę liści i plew siewki linii somaklonalnych pszenżyta ozimego okazały się odporniejsze na *P. nodorum* od siewek pszenicy. Średni udział porażonej tkanki tych linii wyniósł 12,7%. Najwyższe porażenie liści zaobserwowano u odmian, których porażenie wyniosło 17,3%. Dla dihaploidów porażenie tkanki liści przez grzyb *P. nodorum* wyniosło 13,9%.

Podsumowanie

Badania wykonywane w ramach projektu poza znaczeniem naukowym mają wartość dla hodowców pszenicy i pszenżyta. Projekt ten konsekwentnie poszerza badania nad technikami alternatywnymi umożliwiającymi przyspieszenie procesu hodowlanego pszenicy i pszenżyta. Zastosowanie najnowszych osiągnięć nauki, w tym ciągle modyfikowanych i doskonalonych technik poszerzania i ujawniania nowej zmienności genetycznej, wydaje się konieczne dla przezwyciężenia trudności w klasycznej hodowli roślin zbożowych odpornych nie tylko na septoriozę liści i plew, ale też na inne ważne choroby, które w przypadku rozwoju do rozmiarów epidemii mogą stanowić faktyczne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności i bezpieczeństwa żywnościowego kraju.

Osiągnięcia projektu

1. Wyniki wykonanych badań w ramach projektu poza znaczeniem naukowym stanowią praktyczną wartość dla hodowców pszenicy i pszenżyta.
2. Wykonany projekt konsekwentnie poszerza badania nad technikami alternatywnymi umożliwiającymi przyspieszenie procesu hodowlanego pszenicy i pszenżyta.
3. Wśród somaklonów i dihaploidów obydwu gatunków zbóż zidentyfikowano genotypy o odporności liści i plew przewyższającej odporność odmian rodzicielskich.
4. Zastosowanie najnowszych osiągnięć nauki, w tym ciągle modyfikowanych i doskonalonych technik poszerzania i ujawniania nowej zmienności genetycznej jest kluczem dla przezwyciężenia trudności w klasycznej hodowli roślin zbożowych odpornych nie

tylko na septoriozę liści i plew, ale też na inne ważne stresowe czynniki biotyczne i abiotyczne, które w przypadku rozwoju do rozmiarów epidemii mogą stanowić faktyczne zagrożenie dla bezpieczeństwa żywności i bezpieczeństwa żywnościowego kraju.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- Kowalska L., Arseniuk E., Walczewski J. 2015. Optimization of callus induction from mature embryos of wheat and triticale cultivars with various resistance to *P. nodorum*. C-IPMConference, Rome (11–13.11.2015).
- Kowalska L., Arseniuk E. 2016. The influence of medium composition on embryogenic callus induction and plant regeneration from mature embryos of wheat cultivars with various resistance to *P. nodorum*. XXth EUCARPIA General Congress, Zurich, Switzerland, (29.08. – 1.09. 2016).
- Kowalska L., Arseniuk E. 2016. The effect of medium composition on somatic embryogenesis from mature embryos of triticale cultivars with various resistance to *Parastagonospora nodorum*. 9. Międzynarodowe Sympozjum Pszenżyta, Szeged, Węgry, (23–27 maja, 2016).
- Kowalska L., Arseniuk E., 2017. Comparison of winter wheat and triticale genotypes for high callus induction and plant regeneration from mature embryo cultures. Międzynarodowa Konferencja Nauk o Roślinach i Biologii Molekularnej, Walencja, Hiszpania (11–13. 09. 2017r.).
- Kowalska L., Arseniuk E., 2017. Badanie reakcji linii somaklonalnych ozimych odmian pszenicy i pszenżyta na septoriozęTM liści i plew wywoływaną... przez *P. nodorum*. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, Zakopane, (30.01 – 3.02.2017r.),
- Kowalska L., Arseniuk E., 2017. Comparison of androgenesis efficiency of winter wheat and winter triticale genotypes studied by use of anther culture technique. 8. Międzyn. Sympozjum Triticeae, Wernigerode, Niemcy, (12–16. 06.2017r.),
- Kowalska L., Arseniuk E., Walczewski J.; 2018. Improvement of *Parastagonospora nodorum* blotch resistance in winter triticale by using the in vitro somaclonal and androgenic approaches. EUCARPIA Cereal Section/IWIW2 meetings, Clermont Ferrand, Francja (18–22.03. 2018)
- Kowalska L., Arseniuk E. 2019. Improvement of resistance of winter triticale to *P. nodorum* International Symposium on Cereal Leaf Blights, University College Dublin, Ireland (22–24.05.2019). Book of abstracts, p. 91.
- Kowalska L., Arseniuk E. 2019. Screening for resistance of triticale dihaploid and somaclonal lines to *P. nodorum*. 5th Conference of Cereal Biotechnology & Breeding, Budapest, Hungary, (4–7.11.2019).
- Walczewski J., Arseniuk E., Ochodzki P.; 2017. Toksyny biał-

kowe *Parastagonospora nodorum*. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka Dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych, Zakopane.

Publikacje

Kowalska L., Arseniuk E., 2016. Effect of medium composition on callus induction in wheat. *Indian Res. J. Genet. & Biotech*, 8 (3): 183–189.

Arseniuk E., Kowalska L., 2019. Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych skracających cykl hodowlany i zwiększających efektywność selekcji genotypów ozimej pszenicy i ozimego pszenżyta o podwyższonej odporności i tolerancji na septoriozę liści i plew [czynnik sprawczy: *Parastagonospora nodorum* (Berk.), (Quaedvlieg, Verkley & Crous.)]. *Biuletyn IHAR* 286: 67–69.

Literatura

Arseniuk E., Czembor H. J., Zimny J., Scharen A. L., Ludański Z. (1998). Somaclonal variation as a tool for improvement of triticale resistance to *Stagonospora nodorum*. *Proc. 4th International Triticale Symp.*, July 26–31, 1998, Red Deer, Canada: 124 – 147.

Arseniuk E., Fried P.M., Winzeler H., Czembor H.J. (1991). Comparison of resistance of triticale, wheat and spelt to septoria nodorum blotch at the seedling and adult plant

stages. *Euphytica* 55: 43–48.

Arseniuk E., Sodkiewicz W. (2002). Study of phenotypic traits of partial resistance to *Stagonospora nodorum* in winter triticale introgressive lines, commercial cultivars and dihaploid lines. *Proceedings of the 5th International Triticale Symposium, IHAR Radzików, Poland, June 30 –July 5, 2002. Vol. 1, p. 163–177.*

Arseniuk E., Kowalska L. (2019). Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych skracających cykl hodowlany i zwiększających efektywność selekcji genotypów ozimej pszenicy i ozimego pszenżyta o podwyższonej odporności i tolerancji na septoriozę liści i plew [czynnik sprawczy: *Parastagonospora nodorum* (Berk.), (Quaedvlieg, Verkley & Crous.)]. *Biuletyn IHAR*. Nr 286, pp 67–69.

Cook, R. J. (1999). Management by chemicals. w: Lucas J. A., Bowyer P., Anderson H. M., *Septoria on Cereals: a Study of Pathosystems*, 286–298. CAB Int., New York.

Tan K.-C., Waters O.D.C., Rybak K., Antoni E., Furuki E., Oliver R.P. (2014). Sensitivity to three *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effectors in current Australian wheat cultivars and the presence of further fungal effectors. *Crop Pasture Sci.* 65:150–158.

Kowalska L., Arseniuk E., (2016). Effect of medium composition on callus induction in wheat. *Indian Res. J. Genet. & Biotech*, 8 (3): 183–189.

Alternatywne czynniki redukujące zjawisko albinizmu roślin regenerowanych z androgenicznych kultur pszenicy i pszenżyta

Alternative factors reducing albinism of plants regenerated from androgenic cultures of wheat and triticale

Magdalena Szechyńska-Hebda✉, Natalia Hordyńska, Maria Wędzony, Mateusz Dyda, Joanna Troczyńska, Zofia Banaszak, Mirosław Sobczak, Elżbieta Różańska, Iwona Wąsek, Maria Pilarska, Ireneusz Ślesak

Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk
✉ e-mail: m.szechyńska@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: albinizm, androgeneza, *in vitro*, pszenica, pszenżyto

Zjawisko albinizmu roślin regenerowanych z androgenicznych kultur pylnikowych stanowi problem ograniczający wykorzystanie androgenezy w hodowli zbóż. Doniesienia naukowe wskazują, że poziom albinizmu zależy od genotypu oraz rodzaju i natężenia stresu stosowanego w celu indukcji androgenezy. Cel badawczy projektu ukierunkowany został na poznanie mechanizmów blokady biogenezy chloroplastów oraz ich regulacji przez stosowane alternatywne czynniki stresowe. Celem była weryfikacja hipotez badawczych: (H1) rozwój plastydów może być modyfikowany na najwcześniejszych etapach androgenezy przez aplikację odpowiednich czynników abiotycznych; krótkie okresy wysokiej temperatury i wysokiego natężenia światła mogą być stosowane alternatywnie do indukcji chłodowej oraz ograniczać zjawisko albinizmu; (H2) zjawisko albinizmu jest rezultatem niezbalansowanego zapotrzebowania energetycznego komórek lub braku odpowiednich sygnałów rozwojowych, a w konsekwencji zaburzeń rozwoju i eliminacji plastydów podczas przeprogramowania rozwoju gametofitowego w kierunku sporofitycznym; (H3) zjawisko albinizmu jest rezultatem niezbalansowania ROS i indukcji programowanej śmierci komórki, która prowadzi do autoeliminacji komórek gametofitycznych zdolnych do przeprogramowania rozwoju w kierunku sporofitycznym.

Badania prowadzone były dla genotypów scharakteryzowanych wcześniej jako podatne

na zjawisko albinizmu vs genotypy regenerujące wysoki procent roślin zielonych. Zastosowano pszenżyto ozime Rotondo, Torino, Twingo, DC07064–16 oraz pszenicę ozimą C1612/13, C1622/13, C3494/8, C3494/17. Androgenezę indukowano stosując stres 4°C, 32°C, lub 1500 μmol fotonów $\text{m}^{-2}\text{s}^{-1}$. Analizy prowadzono na poziomie kłosów/pylników przed i po aplikacji stresu, kalusa, oraz zregenerowanych pędów. Dla weryfikacji H1–H2 zastosowano analizę: cytologiczną (mikroskopia konfokalna); organizacji membran tylakoidów (transmisyjna mikroskopia elektronowa); efektywności funkcjonowania chloroplastów (fluorescencja chlorofilu *a*); składu barwników fotosyntetycznych i cukrów (wysokosprawna chromatografia cieczowa), białek markerowych rozwoju chloroplastów (Western Blot), ekspresji genów (RT-PCR); intensywności oddychania i emisji ciepła (kalorymetria izotermiczna). Dla weryfikacji H3 określono: rozwój mikrospor po zastosowaniu stresów, indukcję programowanej śmierci komórki (mikroskopia fluorescencyjna: TUNEL, DAPI, TB, FDA), rolę ROS (mikroskopia fluorescencyjna i świetlna: NBT, H_2O_2 , DCFH-DA), poziomu antyoksydantów (mikroskopia fluorescencyjna: monobromobimane).

W ramach tematu 1 określono efektywność chłodu, wysokiej temperatury, wysokiego natężenia światła o określonej kompozycji świetlnej w indukcji androgenezy i ograniczeniu zjawiska albinizmu. Stwierdzono, że zależność



genotypowa podatności na proces androgenyzy i regeneracja roślin zielonych vs albinotyczne jest czynnikiem krytycznym; modyfikującym czynnikiem jest termin zbioru kłosów, determinowany środowiskowo (temp. wzrostu roślin donorowych) i genotypowo (wczesność faz rozwojowych). Proces tworzenia struktur androgenicznych w kalusie jest zależny od czynników determinujących przełączenie programu rozwoju mikrospor z gametofitycznego do sporofitycznego; jednak mechanizmy regeneracji muszą być odpowiednio ukierunkowane przez odpowiednie warunki hodowli, w tym zastosowanie alternatywnych stresów.

W ramach tematu 2 przeprowadzono cytologiczną charakterystykę rozwoju plastydów i efektywności ich funkcjonowania. Żaden z zastosowanych rodzajów stresu nie powoduje krytycznego obniżenia żywotności mikrospor. Zróżnicowanie wieku mikrospor w obrębie jednego kłosa jest czynnikiem, który decyduje o efektywności androgenyzy; względnie większa obecność młodszych lub późniejszych faz rozwojowych mikrospor charakteryzuje genotypy słabiej indukujące struktury androgeniczne; mikrospory genotypów podatnych zawierają drobne ziarnistości będące proplastydami lub amyloplastami. Indukcja struktur androgenicznych i regeneracja są w niewielkim stopniu skorelowane, podobnie procentowy udział zregenerowanych roślin albinotycznych względem całkowitej liczby zregenerowanych roślin. U roślin albinotycznych obecne są plastydy, nie namnażające się w komórkach miększa liścia w sposób typowy, upośledzona jest synteza chlorofilu i formowanie aparatu fotosyntetycznego.

W ramach tematu 4 prowadzono analizę syntezy składników chloroplastów: barwników fotosyntetycznych i białek markerowych oraz analizę ekspresji genów kodujących te białka. Podatność na proces androgenyzy związana jest z zwiększoną syntezą barwników fotosyntetycznych w pylnikach, kłosach, kalusie i roślinach zregenerowanych; jednakże zbalansowanie syntezy poszczególnych barwników stanowi warunek prawidłowego wbudowania w membrany fotosyntetyczne. Zregenerowane rośliny albinotyczne zawierają 100 razy mniej barwników fotosyntetycznych, jednak to specyficzne barwniki oraz białkowe składniki membran chloroplastowych determinują brak możliwości powstania funkcjonalnych membran. Spośród enzymów antyoksydacyjnych stanowiących ochronę w stanie niezbalansowania fotosyntetycznego, peroksydazy są najbardziej specyficzne na poziomie aktywności białka w pylnikach; zmiany aktywności dysmutazy ponadtlenkowej są w sposób

szczególny zależne od warunków środowiskowych; a zmiany aktywności katalazy są gatunkowo zależne. Również podwyższenie ekspresji genów odpowiedzialnych za syntezę skrobi dla genotypów podatnych jest istotne na każdym etapie androgenyzy.

W ramach tematu 5 określono stan energetyczny komórek. Stwierdzono, że stres niezbędny jest do regeneracji roślin zielonych w procesie androgenyzy, jako czynnik zmieniający status energetyczny komórek na poziomie fotosyntezy i syntezy cukrów, oddychania, wydzielania ciepła. Niezbalansowanie dopływu i zużycia produktów fotosyntezy koreluje z ograniczeniem rozwoju plastydów.

W ramach tematu 6 analizowano rozwój komórek mikrospor z uwzględnieniem indukcji programowanej śmierci komórki (PCD), roli reaktywnych form tlenu (ROS) i antyoksydantów. Zjawisko albinizmu genotypów opornych jest rezultatem niezbalansowania ROS i ich wpływu na indukcję PCD mikrospor, która ostatecznie prowadzi do autoeliminacji komórek gametycznych zdolnych do przeprogramowania rozwoju w kierunku sporofitycznym. Indukcja PCD jest charakterystyczna dla większości genotypów, czynnikiem determinującym efektywność androgenyzy jest bezwzględna liczba obumarłych komórek; w przypadku zielonych liści, wczesne wskaźniki indukcji PCD są oznaczane w jądrach komórek szparkowych i komórek mezofilu, a także w chloroplastach. Każdy typ stresu, którego podstawą jest niezbalansowanie nadmiaru energii wzbudzenia oraz regulacji ROS, w indukcji procesu androgenyzy pszenicy i pszenżyta może stanowić: (1) dla genotypów podatnych na proces androgenyzy sygnał dla indukcji biogenezy chloroplastów na etapie syntezy ich składników i formowania membran tylakoidowych, w tym może stanowić induktor retrosygnalów zaangażowanych w balansowanie ROS i indukcję PCD; brak odpowiednich sygnałów na poziomie plastydów/chloroplastów prowadzi do autoeliminacji mikrospor zdolnych do przeprogramowania rozwoju w kierunku sporofitycznym (indukcja PCD), a rola ROS jest priorytetowa w tych procesach; (2) dla genotypów opornych na proces androgenyzy czynnik determinujący uruchamianie blokady podziałów komórkowych i indukcję nadmiernej PCD.

Osiągnięcia projektu obejmują: (1) wytypowanie genotypów podatnych na proces androgenyzy i opornych na indukcję androgenyzy; (2) wskazanie, że stres chłodu jest pozytywnym regulatorem przeprogramowania rozwoju mikrospor; dodatkowo zastosowany stres wysokiego natężenia

światła podwyższa parametry regeneracji genotypów podatnych; stres wysokiej temperatury indukuje androgenezę, ale jest czynnikiem negatywnym regeneracji roślin zielonych; (3) wskazanie markerów i mechanizmów odpowiedzialnych za blokadę procesu androgenozy.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Szechyńska-Hebda M., Sobczak M., Różańska E., Troczyńska J., Banaszak Z., Dyda M., Wędzony M. Ultrastructural and transcriptomic studies of the androgenesis. 4th International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources Giessen, Germany 3–7 wrzesień, 2017.

Dyda M., Troczyńska J., Banaszak Z., Wędzony M., Szechyńska-Hebda M. Androgenesis of wheat and triticale. 4th International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources Giessen, Germany 3–7 wrzesień, 2017.

Szechyńska-Hebda M., Sobczak M., Różańska E., Troczyńska J., Banaszak Z., Hordyńska N., Dyda M., Wędzony M. Improving the efficiency of wheat and triticale androgenesis: ultrastructural and transcriptomic. 20th International Conference on Plant Physiology and Pathology, Zurich, Switzerland, 13 – 14 wrzesień 2018.

Hordyńska N., Szechyńska-Hebda M., Sobczak M., Różańska E., Troczyńska J., Banaszak Z., Wędzony M. Metabolic Changes during Reprogramming of Wheat and Triticale Microspores. 20th International Conference on Plant Physiology and Pathology, Zurich, Switzerland, 13 – 14 wrzesień 2018.

Szechyńska-Hebda M., Hordyńska N., Pilarska M., Ślesak I., Banaszak Z., Troczyńska J. Factors determining the albinism of plants regenerated from androgenic cultures of wheat and triticale. International Plant Science Conference University of Rostock, Germany, 15–19 wrzesień 2019.

Fizjologiczne i genetyczne markery odporności pszenicy jarej na suszę w aspekcie interakcji zachodzących w ryzosferze

Physiological and genetic markers of resistance of spring wheat to drought in the aspect of interactions occurring in the rhizosphere

Magdalena Szechyńska-Hebda¹✉, Natalia Hordyńska¹, Lidia Sas-Paszt², Stanisław Grzesiak¹, Maciej Grzesiak¹, Anna Maksymowicz¹, Anna Lisek², Beata Sumorok², Edyta Derkowska², Krzysztof Weszczak², Mateusz Frąc², Michał Przybył², Paweł Trzciński², Sławomir Głuszek²

¹Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* Polskiej Akademii Nauk

²Instytut Ogrodnictwa

✉ e-mail: m.szechynska@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: mikroorganizmy pożyteczne, pszenica, ryzosfera, susza

Zmiany klimatu w Polsce i na świecie powodują m. in. przedłużające się okresy suszy. Zjawisko to stanowi coraz większy problem w uprawie zbóż, szczególnie pszenicy jarej. Celem projektu było określenie specyficznych genotypowo interakcji roślina-mikroorganizmy glebowe, które mogą determinować odporność roślin na stres suszy na poziomie systemu korzeniowego. W ramach projektu zweryfikowano hipotezy: (H1) istnieją specyficzne genotypowo interakcje roślina-mikroorganizmy glebowe, determinujące odporność roślin na stres suszy; w strefie korzeniowej roślin odpornych i nieodpornych rozwija się jakościowo i ilościowo odmienna kompozycja mikroorganizmów glebowych; specyficzna kompozycja mikroorganizmów ryzosfery determinuje fizyczne i biochemiczne warunki glebowe, jak również indukuje ścieżki sygnałowe, mechanizmy, reakcje fizjologiczne, umożliwiające roślinie aklimatyzację i przetrwanie stresu suszy; następuje indukcja/supresja specyficznych genów/grup genów w wyniku interakcji rośliny odpornej z mikroorganizmami ryzosfery w warunkach suszy; geny te stanowią mogą markery molekularne tolerancji roślin na stres suszy; (H2) wzrost korzeni oraz transpiracja roślin w warunkach suszy w obecności zmiennej kompozycji mikroorganizmów może być modulowana; rozwój systemu korzeniowego będzie różny po inokulacji krzyżowej mikroorganizmów

do ryzosfery roślin odpornych i ryzosfery roślin nieodpornych.

Materiał do badań stanowiły genotypy pszenicy ozimej: Telimena, Arabella, Mandaryna, Sirocco, Sharki, Cornetto, Tybalt, Goplana, Harenda, Kandela, Struna, Jarlanka, SMJ 2115, SMJ 3016, SMJ 1314, Ostka smolicka, Tdzo1384, Tdoz1403, Tdoz1508, Tonika. Rośliny rosły w warunkach tunelu hodowlanego. Wprowadzono suszę glebową (trzy typy suszy, dobrane eksperymentalnie, aby ok. 75%, 50% i 25% roślin przeżyło stres) oraz warunki optymalnego dostępu wody. Stosowano standardowe konsorcja mikroorganizmów przygotowane w oparciu o szczepy dostępne w SYMBIO-BANKu (Instytut Ogrodnictwa) oraz konsorcja mikroorganizmów przygotowane w oparciu o mikroorganizmy wyizolowane z ryzosfery roślin odpornych i nieodpornych. Analizowano tempo wzrostu korzeni, ich liczebność, suchą i świeżą masę systemu korzeniowego vs zieloną biomasa liści; potencjał osmotyczny gleby vs korzeni vs liści; fluorescencję chlorofilu *a*, gęstość aparatów szparkowych; liczebność izolowanych mikroorganizmów, bioróżnorodność i aktywność mikroorganizmów zasiedlających ryzosferę; transkryptom korzeni metodą RNAseq. PCA i WCA zostały zastosowane jako metody statystyczne do badania złożonych mechanizmów odporności i zwiększenia wydajności plonów w programach hodowlanych.



W ramach tematu 1 zweryfikowano 20 genotypów pszenicy dla wytypowania modelowych genotypów odpornych i nieodpornych na stres suszy (Grzesiak et al. 2019a). Genotypy, spełniające kryteria eksperymentalnego systemu modelowego obejmowały: Telimenę, Sirocco, Goplanę, jako genotypy wrażliwe na stres suszy oraz Strunę, SMJ 2115, Sharki jako genotypy odporne na stres suszy. Na podstawie wskaźników tolerancji i cech fizjologicznych określono podstawowe odpowiedzi pszenicy jarej na suszę. Wskaźnik podatności na suszę (DSI), wskaźnik tolerancji stresu (STI), indeks naprężenia (SI), średnia geometryczna produktywność (GMP) były najbardziej użyteczne w selekcji genotypów z skrajnymi w odpowiedziach odpornościowymi na suszę. Analizy potwierdziły silną korelację pomiędzy DSI, oraz produkcją różnych składników plonu. Zaproponowano autorskie rozwiązania dla selekcji roślin względem architektury systemu korzeniowego (Grzesiak et al. 2019b).

W ramach tematu 2 przygotowano standardowe konsorcja mikroorganizmów w oparciu o szczepy dostępne w SYMBIO-BANKu dla oceny ograniczenia negatywnych skutków stresu suszy u roślin pszenicy poprzez stymulację ich wzrostu. Natomiast w ramach tematu 3 zweryfikowano efektywność działania standardowych konsorcjów mikroorganizmów. Największe oddziaływanie pożytecznych mikroorganizmów glebowych na fizjologię i wzrost roślin w warunkach kontrolnych stwierdzono dla genotypów Sharki, Struna, SMJ 2115 (odporne na warunki suszy); mniejsze różnice stwierdzono dla genotypów Telimena, Sirocco, Goplana (wrażliwe na warunki suszy). Efektywność mikroorganizmów była zależna od przebiegu pogody i stanowiska. Aplikacja konsorcjów mikroorganizmów wpływała korzystnie na zwiększenie suchej masy roślin w warunkach optymalnego nawodnienia i warunkach suszy, chociaż efekt był mniejszy po zastosowaniu warunków suszy. Efektywność działania pożytecznych mikroorganizmów glebowych było bezpośrednio skorelowane z sprawniejszym prowadzeniem procesu fotosyntezy roślin traktowanych niezależnie od warunków nawodnienia. W ryzosferze genotypów odpornych formowanie struktur mikroorganizmów grzybowych i bakteryjnych było efektywniejsze; warunki suszy intensyfikowały ten efekt.

W ramach tematu 4 skorelowano dynamikę wzrostu systemu korzeniowego z odpornością roślin na suszę w warunkach glebowych. Stwierdzono: zmniejszanie powierzchni części nadziemnej roślin (liczby liści, suchej masy, liczby aparatów szparkowych), przy jednoczesnym utrzymaniu wysokiej

efektywności procesu fotosyntezy (parametry fluorescencji chlorofilu *a*) oraz ograniczenie uwodnienia roślin i zwiększenie zawartości substancji osmotycznie czynnych. Specyficzną cechą roślin odpornych był mocno rozgałęziony i głęboki system korzeniowy, umożliwiający uniknięcie stresu suszy lub zmniejszenie skutków suszy. Jednakże stwierdzono, że architektura korzeni musi być rozbudowana równomiernie; wzrost korzeni również w górnej warstwie gleby jest niezbędny, aby zapewnić roślinom przewagę konkurencyjną w pobieraniu składników pokarmowych i ostatecznym plonie.

W ramach tematu 5 przeprowadzono izolację, charakterystykę i oczyszczenie mikroorganizmów ryzosfery roślin odpornych i nieodpornych na suszę ze stanowisk glebowych (tunel hodowlany) oraz opracowano konsorcja mikroorganizmów. Natomiast w kolejnym temacie określono efektywność działania opracowanych konsorcjów mikroorganizmów. W warunkach kontrolnych wszystkie konsorcja mikroorganizmów znacznie bardziej wspomagały wzrost korzeni roślin, aniżeli ich części nadziemnych (sucha masa pędów i korzeni). W warunkach suszy po zastosowaniu mikroorganizmów, zwiększony przyrost biomasy roślin stwierdzono zarówno w przypadku pędów, jak też korzeni. Pozytywny wpływ konsorcjów mikrobiologicznych obserwowany był jako wzrost wskaźnika witalności PSII (parametr fluorescencji chlorofilu *a*) dla wszystkich genotypów; jednak odmiany odporne wykazały generalnie wyższe wartości parametru. Aplikacja konsorcjów pożytecznych mikroorganizmów miała korzystny wpływ na zwiększenie bioróżnorodności i wielkości populacji pożytecznych grup mikroorganizmów w ryzosferze roślin w warunkach optymalnego nawadniania i w warunkach suszy.

W wyniku analizy transkryptomu korzeni w aspekcie aklimatyzacji roślin do stresu suszy indukowanej przez konsorcjum mikroorganizmów otrzymano 1106 mln nieprzetworzonych odczytów. Po demultipleksowaniu otrzymano 72,6 mln odczytów na próbkę (84% ścieżek); uzyskano wysoką zgodność w obrębie grup próbek. Wyniki stanowią podstawę do analizy, która posłuży do identyfikacji mechanizmów, stanowiących podstawę interakcji na poziomie ryzosfery roślin i mikroorganizmów glebowych.

Osiągnięcia projektu obejmują: (1) sklasyfikowanie genotypów wg tolerancji na warunki suszy w skali od genotypów, które produkują stabilnie wysoką wydajność biomasy i ziarna, zarówno w warunkach suszy i warunkach optymalnego nawodnienia, do wysoce wrażliwych genotypów

o najniższej wydajności biomasy i ziarna w warunkach suszy (Grzesiak et al. 2019a); (2) wytypowanie do celów eksperymentalnych 6 genotypów modelowych tj. Telimena, Sirocco, Goplana wybrane zostały jako genotypy wrażliwe na stres suszy; Struna, SMJ 2115, Sharki jako genotypy odporne na stres suszy; (3) zaproponowano, aby w programach hodowlanych, których celem jest poprawa pobierania wody z gleby i stabilizacja plonów w warunkach stresu wodnego, prowadzono selekcję roślin pod względem architektury systemu korzeniowego; należy brać pod uwagę rośliny o korzeniach głębokich, ale i rozgałęzionych w całym profilu glebowym; cechy korzenia, takie jak długość, głębokość i gęstość struktury powinny być rozpatrywane jednocześnie z cechami determinującymi wzrost korzenia pod szerokim kątem; (4) zaproponowano autorskie rozwiązania dla selekcji roślin względem architektury systemu korzeniowego (Grzesiak et al. 2019b); (5) wskazano możliwość zastosowania konsorcjów mikrobiologicznych w uprawie roślin pszenicy przy optymalnym zaopatrzeniu roślin w wodę, jak również w warunkach stresu suszy.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Natalia Hordyńska, Angelika Noga, Piotr Szczyrek, Maciej T. Grzesiak, Stanisław Grzesiak, Magdalena Szechyńska-Hebda. Selection of wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes with improved drought tolerance. 11th International Conference „Plant Functioning Under Environmental Stress”. September 12 -15, 2018, Cracow, Poland.

Natalia Hordyńska, Maciej T. Grzesiak, Stanisław Grzesiak,

Magdalena Szechyńska-Hebda. Morphological, physiological and molecular responses of wheat (*Triticum aestivum* L.) to drought stress under different temperature conditions. 11th International Conference „Plant Functioning Under Environmental Stress”. September 12 -15, 2018, Cracow, Poland.

Magdalena Szechyńska-Hebda, Stanisław Grzesiak, Maciej Grzesiak, Natalia Hordyńska, Lidia Sas-Paszt, Anna Lisek, Beata Sumorok, Edyta Derkowska, Krzysztof Weszczak, Mateusz Frąc, Michał Przybył, Paweł Trzciniński, Sławomir Głuszek. Specific rhizosphere bacteria improve wheat (*Triticum aestivum*L.) growth under drought. 49th Annual Meeting of the Ecological Society of Germany, Austria, and Switzerland „Science meets practice” Münster, Germany, September 9–13, 2019.

Natalia Hordyńska, Maciej T. Grzesiak, Stanisław Grzesiak, Magdalena Szechyńska-Hebda. Plant genotype can determine the interaction with soil microorganisms during drought. 49th Annual Meeting of the Ecological Society of Germany, Austria, and Switzerland „Science meets practice” Münster, Germany, September 9–13, 2019.

Publikacje

Stanisław Grzesiak, Natalia Hordyńska, Piotr Szczyrek, Maciej T. Grzesiak, Angelika Noga, Magdalena Szechyńska-Hebda. 2019a. Variation among wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes in response to the drought stress: I – selection approaches. *Journal of Plant Interactions*, 14:1, 30–44.

Maciej T. Grzesiak, Natalia Hordyńska, Anna Maksymowicz, Stanisław Grzesiak, Magdalena Szechyńska-Hebda. 2019b. Variation among spring wheat (*Triticum aestivum* L.) genotypes in response to the drought stress. II – Root system structure. *Plants (Basel)* 8 (12): 584.

Selekcja genomowa pszenicy ozimej

Genomic selection of winter wheat

Mirosław Tyrka¹✉, Paweł Krajewski², Paweł Milczarski³, Grzegorz Fic¹,
Magdalena Szeliga¹, Marcin Jaromin¹, Tadeusz Drzazga⁴, Przemysław
Matysik⁵, Róża Mazur⁶, Teresa Sikora⁷, Edward Witkowski⁸, Justyna
Buczkwicz¹, Dorota Tyrka¹

¹ Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza

² Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

³ Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

⁴ Małopolska Hodowla Roślin

⁵ Hodowla Roślin Strzelce, Strzelce

⁶ Poznańska Hodowla Roślin, Tulce

⁷ DANKO Hodowla Roślin, Modzurów

⁸ Hodowla Roślin Smolice, Smolice

✉ e-mail: mtyrka@prz.edu.pl

Słowa kluczowe: analiza asocjacyjna, genotypowanie przez sekwencjonowanie, plon, pszenica zwyczajna, zmienność epigenetyczna

Cel badań

Tradycyjne programy hodowli pszenicy wykorzystują głównie informacje fenotypowe uzyskane w kilku środowiskach, na podstawie których wykonywana jest selekcja. Wraz z rozwojem technik biologii molekularnej postępowała ewolucja systemów markerowych i możliwości ich zastosowania we wspomaganie selekcji. Początkowo, do wspomaganie selekcji stosowano wybrane markery sprzężone z cechami ilościowymi lub jakościowymi. Wraz z rozwojem technologii mikromacierzy i sekwencjonowania następnej generacji rozpoczęto stosowanie selekcji genomowej (SG). SG należy do najbardziej nowoczesnych metod selekcji stosowanej do poprawy cech ilościowych w dużych, zróżnicowanych populacjach. SG pszenicy bazuje na kilkuset markerach wyselekcjonowanych spośród dużej ilości markerów (około 20–90 tys) pokrywających cały genom. Identyfikacja efektów związanych z poszczególnymi markerami (mapowanie asocjacyjne) jest możliwa dzięki integracji danych markerowych z fenotypem i danymi o pochodzeniu.

Ogólnym celem badań było poszerzenie wiedzy na temat uwarunkowań genetycznych i epigenetycznych kształtujących zmiany w wysokości plonowania pszenicy zwyczajnej. Plon jest niezwykle złożoną cechą, a hipoteza badawcza

zakłada, że część tej zmienności jest kształtowana przez zmiany genetyczne i epigenetyczne. Realizacja przewidzianego cyklu badań powoli na określenie udziału i roli tych zmian w kształtowaniu plonu oraz przyczyni się do opracowania wydajnego narzędzia selekcji genotypów o wyższym plonie.

Do szczegółowych celów zadania należało: 1) wdrożenie metody genotypowania przez sekwencjonowanie (GBS) wrażliwej na metylację, 2) charakterystyka zmienności genetycznej 200 genotypów pszenicy zwyczajnej przy wykorzystaniu opracowanej metody GBS oraz markerami DArTseq, 3) ocena zmienności fenotypowej w doświadczeniu porównawczym w wybranych lokalizacjach, 4) wybór markerów istotnie zaszeregowanych z plonem pszenicy i 5) konwersja wybranych markerów GBS lub DArTseq.

Materiały i Metody

Wdrożenie i optymalizację metody GBS (1) realizowano w etapach: a) wybór endonukleaz do fragmentacji DNA, b) wybór dodatkowego enzymu wrażliwego na zmiany metylacyjne w celu redukcji złożoności bibliotek, c) projektowanie adaptorów do konstrukcji bibliotek, d) konstrukcja i ocena ilościowa bibliotek, e) sekwencjonowanie bibliotek w technologii Illuminy, f) obróbka bioinformatyczna uzyskiwanych



danych pozwalająca na ocenę pokrycia i powtarzalności wyników.

W celu wyboru optymalnej kombinacji enzymów do metody GBS, przeprowadzono symulację rozkładu fragmentów DNA uzyskiwanych po trawieniu genomu pszenicy zwyczajnej (Ensembl, release-41) przy zastosowaniu 43 enzymów restrykcyjnych. Określono liczbę fragmentów o wielkości 75–150 nukleotydów, przewidziano fragmentów unikalnych i ich rozkład w genomie podzielonym na partycje o wielkości 300 kpz. Następnie przewidziano ilości i rozkład fragmentów po dodatkowym trawieniu redukcyjnym 11 enzymami rozpoznającymi motywy 4pz.

Na podstawie symulacji komputerowej wybrano 5 kombinacji enzymów (M1: NarI-AciI, M2: NcoI-HinP1I, M3: NarI-MspI, M4: BssSI-AciI i M5: NcoI-AciI) i zaprojektowano 12 adaptorów z unikalnymi barkodami dla enzymów rzadko tnących. Dla wytypowanych kombinacji enzymów restrykcyjnych przygotowano biblioteki dla 12 odmian pszenicy w oparciu o metodykę Poland i wsp. (2012). DNA izolowano z 2-tygodniowych siewek metodą Milligan (1992). Fragmenty o docelowej wielkości insertu w zakresie 75–150 nukleotydów po uwzględnieniu ligowanych adaptorów wycinano z żelu, oczyszczano i charakteryzowano na fluorymetrze Qubit 2.0. Próbkę łączono w ilościach równomolowych i sekwencjonowano na aparacie Miseq. Uzyskiwane dane z sekwencjonowania przypisywano do poszczególnych próbek na podstawie adresów, następnie czyszczono z sekwencji o błędach przekraczających 1 nukleotyd na 1000. Oczyszczone dane posłużyły do wydzielenia dla każdej z bibliotek oddzielnie puli fragmentów unikalnych (unigenów). Następnie unikalne sekwencje dopasowano do genomu referencyjnego pszenicy i uzyskano pliki (SAM, Sequence Alignment Map) zawierające informacje o pozycji fizycznej markera na chromosomach pszenicy. W kolejnym etapie w sekwencjach uzyskanych z poszczególnych bibliotek i genotypów identyfikowano mutacje punktowe (SNP).

Do charakterystyki genetycznej 202 linii pszenicy w zestawach po 67–68 linii (2) wykorzystano metodykę dla kombinacji enzymów M1, M5 oraz wykonano analizę DArTseq (1.0) w ramach zlecenia w firmie Diversity Arrays Technology (Bruce, Australia). W celu oceny fenotypowej założono 2-letnie doświadczenia w 5 lokalizacjach (Strzelce, Modzurów, Nagradowice, Smolice, Kobierzyce) na poletkach o powierzchni 3–10 m². Określono wysokość plonu ziarna o wilgotności 15% dla 200 genotypów badanych w 4 seriach w odniesieniu

do wzorców (Kilimanjaro, Artist, Patras) w układzie bloków niekompletnych. Uzyskane dane genotypowe po połączeniu z danymi fenotypowymi wykorzystano do analizy asocjacji w programie Tassel 5.2.58. Do identyfikacji istotnych związków z wysokością plonu wykorzystano metody ogólnego modelu liniowego (GLM) i mieszanego modelu liniowego (MLM). Wybrano markery o istotnym związku z plonem liczonym jako procentowe odchylenie od wzorców. Poziom istotności markerów (LOD) ustalony na podstawie poprawki Bonferroniego bez uwzględnienia markerów w blokach sprzężeń wyniósł 5.11 ($-\log_{10}(P) = 0.1/12979$).

Do konwersji na system KASP wybrano 62 markery. Dla wybranych markerów oznaczono mutacje punktowe a następnie korzystając z bazy URGI zlokalizowano markery na mapie fizycznej i rozszerzono oryginalną sekwencję (maksymalnie 69 nukleotydów) o dodatkowe odcinki przed i za mutacją (dodatkowe 100 nukleotydów z każdej strony). Tak przygotowane sekwencje wykorzystano do projektowania starterów allelospecyficznych dostosowanych do technologii KASP z wykorzystaniem programu PRIMER3 oraz PolyMarker (Ramirez-Gonzalez i in. 2015). Markery KASP testowano w reakcjach o objętości 10 μL i składzie: 1X KASP Master mix, 160 nM każdego ze starterów allelospecyficznych, 410 nM startera locus-specyficznego i 25 ng gDNA w obecności standardu ROX. Cykl temperaturowy obejmował etapy: 15 minut w 94°C, 10x (94°C 20 s, 65°C-1°C/cykl 60 s), 35x (94°C 20 s, 55°C 60 s).

Wyniki

Metoda genotypowania przez sekwencjonowanie (GBS) dedykowana dla pszenicy

W efekcie przeprowadzonych symulacji komputerowych stwierdzono, że liczba fragmentów o pożądanym zakresie wielkości (75–150 pz) generowana przez poszczególne enzymy wynosi średnio 147 tysięcy i w zależności od zastosowanego enzymu restrykcyjnego waha się w szerokim zakresie od 13 tys do 358 tys. fragmentów. Udział fragmentów unikalnych dla analizowanych zestawów enzymów restrykcyjnych wynosił od 63.5% do 92.5%. Średnie pokrycie genomu przez uzyskiwane fragmenty wyniosło 73% i wahało się od 99.4% do 21.6%. Na podstawie danych o liczbie fragmentów unikalnych i pokryciu do wstępnych testów wybrano 3 enzymy: NarI, NcoI i BssSI. W celu uwzględnienia zmienności epigenetycznej w zastępstwie metody wodorosiarczynowej, po ligacji adaptorów przeprowadzono drugie trawienie enzymatyczne enzymami AciI (C[^]CGC),

HinP1I (G[^]CGC) lub MspI (C[^]CGG), które nie tną sekwencji zmetylowanych. Na podstawie symulacji komputerowej wybrano 5 kombinacji enzymów (M1: NarI-AciI, M2: NcoI-HinP1I, M3: NarI-MspI, M4: BssSI-AciI i M5: NcoI-AciI) i przetestowano na 12 wybranych losowo odmianach. Biblioteki M1 i M2 cechowały się najwyższą liczbą sekwencji unikalnych odpowiednio 3.6 i 1.8 mln. Sekwencje unikalne w bibliotekach M3-M5 stanowiły od 324 tysięcy do 575 tysięcy. Analizując rozkład pokrycia fragmentów w badanych odmianach do dalszych analiz na 202 genotypach wybrano kombinację M5 (NcoI-AciI).

Charakterystyka zmienności genetycznej pszenicy zwyczajnej

Sekwencjonowanie dla kombinacji enzymów M5 wykonano dla 202 genotypów podzielonych na 3 pule. Pomimo podobnej liczby początkowej uzyskanych sekwencji DNA, średnia liczba sekwencji w bibliotekach B1, B2 i B3 wyniosła odpowiednio 3486, 5776 i 7907. Dla 19 próbek uzyskano niską liczbę sekwencji (do 1000). Ze względu na niskie pokrycie i wysoki udział danych brakujących dane nie były przydatne do analizy zmienności genetycznej i przygotowano biblioteki dla innej kombinacji enzymów (M1). W wyniku sekwencjonowania 3 bibliotek uzyskanych dla enzymu NarI/MspI uzyskiwano od 20.9 do 24.4 mln sekwencji, które posłużyły do wydzielenia puli 906352 fragmentów unikalnych nielosowych występujących przynajmniej dwukrotnie. W ramach analizy wykonano dopasowanie unikalnych sekwencji do genomu referencyjnego, zidentyfikowano mutacje punktowe i uzyskano segregacje dla 3258 markerów. Uzyskane markery były równomiernie rozmieszczone w genomach A, B i D pszenicy (tab. 1). Dzięki uzupełnieniu planowanych analiz 202 genotypy pszenicy o analizy DArTseq uzyskano 12979 markerów SNP, które generowały polimorficzne segregacje >5% i <95% przy niskim (<15%) udziale danych brakujących.

Ocena zmienności fenotypowej

Wysokość plonu ziarna określono w 2-letnich badaniach w 5 lokalizacjach (Strzelce, Modzurów, Nagradowice, Smolice, Koberzyce). We wszystkich seriach stwierdzono istotne efekty związane z genotypem badanych linii. Odziedziczalność liczona na podstawie komponentów wariacyjnych w kolejnych seriach 1–4 wyniosła od 63.97% do 82.00%. Zatem we wszystkich seriach poziom odziedziczalności był wysoki co daje możliwość

opracowania skutecznych markerów do selekcji.

Wybór markerów istotnie zasocjowanych z plonem pszenicy

Liczba markerów zasocjowanych ze zmianami plonu przy $p < 0.01$ wyniosła 707, natomiast przy $p < 0.001$ wybrano 336 markerów. Uwzględniając poprawkę Bonferroniego wytypowano 31 markerów SNP (tab. 2). Wybrane najlepsze markery pochodziły w większości z 5 i 6 homeologicznej grupy chromosomów i wyjaśniały wysoki procent zmienności 9.8–16.7% w wybranych środowiskach (tab. 2).

Konwersja markerów

Technika KASP jest dostępna w wersji wysokoprzepustowej i może służyć do szybkiej charakterystyki dużej liczby genotypów, co pozwoliłoby na identyfikację najcenniejszych genotypów do dalszej dokładniejszej charakterystyki genetycznej. Do konwersji wykorzystano markery zasocjowane z plonem (GLM) przy $p < 0.01$. Do porównania segregacji markerów wykorzystano program PAST. Wybrano 62 markery reprezentujące 39 grup markerów o zbliżonej segregacji i lokalizacji. Markery te wykazywały istotne związki z plonem w równocześnie w 2–7 środowiskach (średnia 3.3). W ramach części doświadczalnej zbadano zgodność segregacji konwertowanych markerów z markerami DArTseq. Uzyskane markery DArTseq lub ich przekonwertowane odpowiedniki mogą być stosowane w celu zwiększenia przepustowości analiz i wstępnej eliminacji genotypów o niekorzystnym genotypie.

Wnioski

W efekcie przeprowadzonych badań wdrożono skalowalną metodykę skanowania całego genomu pszenicy wykrywającą również zmiany epigenetyczne. W zestawie badanych 202 genotypów opracowany system pozwolił na uzyskanie 3258 markerów SNP w 985 unigenach. Na podstawie charakterystyki genetycznej i fenotypowej pszenicy ozimej zidentyfikowano 326 markerów DArTseq istotnie związanych z plonowaniem, które mogą stanowić podstawę do opracowania wydajnego systemu selekcji pszenicy o poprawionym plonowaniu.

Osiągnięcia projektu

Opracowano program do optymalizacji wyboru enzymów i przewidywania zmienności na podstawie genomu referencyjnego. Oryginalność opracowanego programu polega na przewidywaniu

rozkładu markerów w odcinkach DNA o zadanej długości uzyskanych po równomiernej fragmentacji genomu oraz włączania dodatkowych enzymów restrykcyjnych do kolejnego upraszczania bibliotek.

Opracowano metodykę przygotowania bibliotek fragmentów DNA do GBS dla różnych kombinacji enzymów.

Wdrożono skalowalną metodykę skanowania całego genomu pszenicy uwzględniającą zmienność epigenetyczną wybraną na podstawie symulacji.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Międzynarodowa Konferencja Naukowa nt. „Nauka dla zrównoważonego rozwoju i biogospodarki”, Lublin 12–13

czerwca 2019

Sesje sprawozdawcze 12 grudnia 2018 i 11 grudnia 2019 w IHAR Radzików.

Literatura

Milligan BG. Plant DNA isolation. In: Hoelzel AR, editor. Molecular analysis of populations: a practical approach. Oxford: IRL Press; (1992). p. 59–88.

Poland JA, Brown PJ, Sorrells ME, Jannink JL (2012) Development of High-Density Genetic Maps for Barley and Wheat Using a Novel Two-Enzyme Genotyping-by-Sequencing Approach. PLOS ONE 7 (2): e32253.

Ramirez-Gonzalez RH, Uauy C, Caccamo M. PolyMarker: a fast polyploid primer design pipeline. Bioinformatics. (2015); 31 (12): 2038–9.

Tabela 1

Rozmieszczenie markerów NarI-Seq w genomie pszenicy.

Chromosom	Genomy		
	A	B	D
1	150	217	114
2	168	233	218
3	116	264	140
4	114	160	59
5	140	135	110
6	125	219	107
7	97	129	107
Razem	910	1357	855

Tabela 2.

Markery wybrane metodą GLM na podstawie poziomu istotności LOD >5.11.

Marker	Cecha	Chr.	Pozycja	p	MarkerR2 [%]
988391	KBP [%]	1D	359778599	8.29E-08	14.2
3938110	KBP [%]	2B	22018131	4.54E-06	11.0
1101436	Plon [%]	3B	498344378	7.36E-06	11.8
1026962	KBP [%]	5A	52596646	1.06E-06	12.1
1107174	KBP [%]	5B	586524432	2.46E-08	16.7
	Plon [%]	5B	586524432	3.68E-08	16.3
1132319	STH [%]	5D	465364017	7.94E-07	13.7
1108448	STH [%]	6A	14493318	1.79E-06	12.6
1079853	KBP [%]	6A	416649897	2.96E-06	9.8
1120705	KBP [%]	6B	474748647	1.35E-06	13.1
1054930	KBP [%]	6B	477699330	1.67E-06	11.7
4911204	KBP [%]	6B	489437050	1.12E-07	13.9
1236326	KBP [%]	6B	499577833	4.00E-08	14.7
1019982	KBP [%]	6B	501107267	4.94E-08	14.8
5324496	KBP [%]	6B	502319848	7.67E-09	16.0
1107139	KBP [%]	6B	504157152	4.52E-08	16.0
2275960	KBP [%]	6B	506126687	6.40E-08	14.6
1087873	KBP [%]	6B	506385690	8.88E-07	13.0
1138009	KBP [%]	6B	506726304	1.69E-06	12.4
5324392	KBP [%]	6B	507468647	3.53E-07	13.1
	KBP [%]	6B	507468647	1.07E-06	10.6
1203839	KBP [%]	6B	510724808	2.13E-07	13.5
1100306	KBP [%]	6D	300897486	2.66E-06	9.9
1107840	KBP [%]	6D	472359486	1.57E-06	11.9
1030418	KBP [%]	7B	68203172	5.08E-06	10.8
4404192	STH [%]	7B	702227567	5.08E-06	11.7
	STH [%]	7B	702227567	7.12E-06	12.0
9722438	STH [%]	7D	457830442	7.42E-06	11.5
1229099	KBP [%]	7D	610923745	5.67E-06	12.0
3956469	Plon [%]	UN	295887961	1.28E-06	13.7
5324724	KBP [%]	UN2	2110	1.99E-06	12.1
4396025	KBP [%]	UN2	4930	4.84E-06	10.8
5324139	KBP [%]	UN2	5920	8.95E-08	14.1
7491836	KBP [%]	UN2	11150	6.12E-07	12.6

Analiza zmienności somaklonalnej indukowanej w kulturach *in vitro* u roślin zbożowych

Analysis of somaclonal variation induced in cereals tissue cultures

Piotr T. Bednarek✉, Renata Orłowska, Katarzyna Pachota, Sławomir Bany

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB

✉ e-mail: p.bednarek@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: AgNO₃, androgeniza, CuSO₄, metoda Taguchiego, optymalizacja, somatyczna embriogeneza, zbożowe kultury tkankowe

Cel

1. Badanie przyczyn i natury zmienności somaklonalnej indukowanej w kulturach *in vitro* u roślin zbożowych.
 2. Opracowanie takich metod pozyskiwania roślin drogą kultur tkankowych, które w oparciu o techniki molekularne doprowadziłyby do niwelowania/regulacji zmian (epi) genetycznych, a także ograniczyłyby powstawanie roślin albinotycznych.
- Wszystkie cele zostały zrealizowane

Materiały i Metody

W badaniach wykorzystano rośliny zbożowe: jęczmień jary (genotyp 2dh/8), pszenica ozima (genotyp P2/9, Svilena) oraz pszenżyto ozime (genotyp 28/2).

Dla każdego gatunku wyprowadzono rośliny donorowe będące generatywnym potomstwem podwojonego haploida uzyskanego na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych (I etap uzyskiwania roślin w kulturach *in vitro*). Oszacowano poziom zmienności genetycznej w badanym materiale roślinnym (metAFLP).

Z roślin donorowych dla każdego gatunku wyprowadzono regeneranty na drodze somatycznej embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygocycznych oraz na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych (II etap uzyskiwania roślin w kulturach *in vitro*). W ramach niniejszego zadania modelowano różne stężenia AgNO₃ (0; 10; 60 μM) jak i CuSO₄ (0,1; 5; 10 μM) oraz czas utrzymania eksplantatów na pożywkach indukujących (21–49 dni) zarówno w przypadku regeneracji roślin na drodze embriogenezy somatycznej z niedojrzałych zarodków zygocycznych

jak i androgenyzy w kulturach pylnikowych. Warunki prowadzenia kultur tkankowych były dobrane do przeprowadzenia procesu optymalizacji skutkując wytypowaniem 9 różnych wariantów (M1-M9) prowadzenia doświadczenia dla każdego gatunku i każdej metody regeneracji. Z tych regenerantów uzyskano także rośliny potomne. Dla uzyskanych materiałów roślinnych oszacowano zróżnicowanie genetyczne wykonując analizy molekularne (metAFLP) a dla regenerantów określając poziom całkowitej zmienności indukowanej w kulturze *in vitro* (TTCIV – Total Tissue Culture Induced Variation) oraz jej składowe – zmienność sekwencyjną (SV), demetylację (DMN) oraz metylację *de novo* genomu (DNMV), jak też zmianę metylacji dMET.

Po wytypowaniu zoptymalizowanych warunków prowadzenia kultur (analiza regresyjna – metoda Taguchiego) ponownie wyprowadzono regeneranty w dwóch typach kultur tkankowych, w celu weryfikacji dobranych warunków (III etap uzyskiwania roślin w kulturach *in vitro*). W tej części doświadczenia regenerowano rośliny w zoptymalizowanych warunkach (M10-M13). Ponownie wykonano analizę zmienności genetycznej i metylacyjnej metodą metAFLP z określeniem TTCIV, SV, DMV, DNMV.

Opis wyników

Uzyskano 108 roślin donorowych dla wszystkich gatunków. Sumarycznie analizy molekularne wykonano na 348 fragmentach DNA dla jęczmienia, 543 dla pszenicy i 460 dla pszenżyta. Poziom zmienności wśród badanych materiałów wynosił: 0,57% dla jęczmienia, 0,37% dla pszenicy i 0,65% dla pszenżyta.



Ilościowe dane dotyczące uzyskiwania regenerantów w procesie optymalizacyjnym oraz weryfikacyjnym zawiera tabela 1. W sumie w całym doświadczeniu wyłożono 10 130 zarodków i 45 422 pylników.

W obydwu cyklach pozyskiwania roślin drogą kultur tkankowych uzyskano regeneranty, na których DNA wykonano analizy metAFLP. W tych pracach oparto się na 225 regenerantach uzyskanych w kulturach niedojrzałych zarodków zygocycznych i 230 regenerantach pozyskanych w kulturach pylnikowych.

W zadaniu wyprowadzono także generatywne potomstwo regenerantów uzyskanych w procesie optymalizacyjnym. Analizy molekularne dla potomstwa generatywnego regenerantów wykonano dla 84 roślin jęczmienia, 84 roślin pszenicy i 84 roślin pszenżyta oraz dla wybranych rośliny donorowych jęczmienia, pszenicy i pszenżyta, wraz z regenerantami, z których otrzymano potomstwo (18 roślin). Wynikiem tej analizy było uzyskanie w sumie 230 fragmentów DNA dla jęczmienia, 363 dla pszenicy oraz 461 dla pszenżyta. Poziom zmienności wśród badanych materiałów był bardzo zróżnicowany (6,78–62,11%) w zależności od gatunku i metody pozyskiwania regenerantów, z których otrzymywano generatywne potomstwo.

Optymalizacja w kierunku uzyskania maksymalnej liczby zielonych regenerantów.

Dla wszystkich badanych gatunków zbóż na etapie optymalizacji określono ilość zregenerowanych zielonych roślin przypadających na 100 wyłożonych pylników w zależności od rodzaju pożywki. Uzyskane ilości regenerantów różniły się między sobą w zależności od zastosowanych warunków (M1-M9). Zaobserwowano, że w przypadku jęczmienia najefektywniejszy wariant optymalizacyjny produkował 2,91 zielonych regenerantów na 100 wyłożonych pylników z dodatkiem 10 μM soli srebra i miedzi oraz przy 35 dniach utrzymania eksplantatów na pożywkach indukujących. Efektywność otrzymywania zielonych regenerantów na 100 wyłożonych pylników w najlepszym wariantcie optymalizacyjnym dla pszenicy wynosiła 14,62 w obecności podstawowej ilości CuSO_4 (0,1 μM – jak w kontroli) oraz przy 60 μM AgNO_3 . W przypadku pszenżyta najlepsza efektywność (6,06 zielonych regenerantów na 100 wyłożonych pylników) obserwowano przy 10 μM CuSO_4 bez dodatku AgNO_3 (tab. 2).

Na podstawie oszacowanych ilości zielonych regenerantów dla poszczególnych wariantów doświadczenia optymalizacyjnego wytypowano

warunki do uzyskania maksymalnej ilości zielonych regenerantów (M10, M11). Choć ilości regenerantów uzyskane w warunkach zoptymalizowanych nie były tak wysokie jak w doświadczeniu optymalizacyjnym (1,97 zielonych regenerantów na 100 wyłożonych pylników u jęczmienia, 7,99 u pszenicy i 1,61 u pszenżyta) to potwierdziły użyteczność zastosowanego podejścia metodyczno-statystycznego. U wszystkich badanych zbóż warunki zoptymalizowane skutkowały lepszą regeneracją, co się przekładało na wzrost ilości roślin zielonych w porównaniu z odpowiednimi warunkami kontrolnymi, a przyrost wahał się od półtora do trzech razy w zależności od gatunku. W wyniku optymalizacji w kierunku maksymalnej produkcji zielonych regenerantów liczba roślin albinotycznych zmniejszyła się w przypadku jęczmienia i pszenżyta, oraz pozostała niezmieniona u pszenicy.

Optymalizacja w kierunku uzyskania roślin o najwyższym lub najniższym poziomie całkowitej zmienności indukowanej in vitro (TTCIV).

W tej części zadania wykonano analizy molekularne dla regenerantów, które uzyskano z doświadczenia optymalizującego. Dla wszystkich regenerantów oszacowano poziom TTCIV oraz SV, DMV i DNMV. Obserwowano zróżnicowanie dotyczące poszczególnych typów zmienności. Na bazie uzyskanych danych ilościowych dotyczących TTCIV wytypowano warunki zoptymalizowane do uzyskania regenerantów, tak aby zregenerowane rośliny charakteryzowały się najwyższym lub najniższym poziomem TTCIV. Dla regenerantów uzyskanych w warunkach zoptymalizowanych wykonano analizy molekularne i określono ponownie poziom TTCIV i pozostałych typów zmienności. W eksperymencie weryfikującym wykazano, że warunki zoptymalizowane w kierunku najniższej (M12) i najwyższej wartości TTCIV (M13) różniły się w przypadku regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy. Wykazano istotne różnice między typami zmienności wchodzącymi w skład TTCIV poza regenerantami pszenicy uzyskanymi na drodze somatycznej embriogenezy. Dominującym typem zmienności była zmienność sekwencyjna, zaś wśród zmian dotyczących metylacji przeważała demetylacja poza regenerantami jęczmienia uzyskanymi na drodze androgenyzy, gdzie wyższa była metylacja *de novo*. Ponadto obserwowano zróżnicowanie między wariantami doświadczenia (M10, M12, M13). Zmiany związane z metylacją genomu różnicowały warianty doświadczenia u regenerantów jęczmienia wyprowadzonych w kulturach

zygotycznych zarodków. Dla regenerantów wyprawionych na drodze androgenyzy u pszenicy różnice między wariantami doświadczenia obserwowano dla zmienności sekwencyjnej, demetylacji oraz zmiany metylacji, a u regenerantów pszenżyta jedynie metylacja *de novo* różnicowała warunki kontrolne i testowane.

Wnioski z prowadzonych badań

- Wytypowane na podstawie danych metA-FLP rośliny donorowe będące generatywnym potomstwem regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy charakteryzowały się minimalnym poziomem zmienności (epi) genetycznej i stanowiły odpowiedni materiał do dalszych badań.
- Regeneracja roślin jęczmienia, pszenicy oraz pszenżyta na drodze kultur niedojrzałych zarodków zygotycznych oraz kultur pylnikowych pozwoliła na uzyskanie wymaganej liczby regenerantów niezbędnych do dalszych etapów tematu badawczego.
- Na podstawie zliczonych fragmentów DNA dla generatywnego potomstwa regenerantów określono polimorfizm badanych materiałów roślinnych obserwując większe zróżnicowanie wśród danych odnoszących się do układu enzymów *Acc65I/MseI* niż do układu *KpnI/MseI*.
- Zastosowanie soli srebra i miedzi w pożywkach indukujących w przypadku regeneracji roślin na drodze kultur pylnikowych w doświadczeniu optymalizacyjnym może przyczynić się do zwiększenia wydajności metody. Należy oczekiwać, że takie podejście może również korzystnie wpłynąć na zmniejszenie proporcji roślin albinotycznych.
- Ponieważ warunki zoptymalizowane różniły się jedynie czasem prowadzenia kultury na pożywkach indukujących od najlepszych warunków optymalizacyjnych, wobec tego wydaje się, że czas jest czynnikiem dyskryminującym warunki kontrolne i zoptymalizowane.
- Metoda metAFLP umożliwiła określenie ilościowych zjawisk odnoszących się do zmian w sekwencji DNA oraz jego metylacji u jęczmienia, pszenicy i pszenżyta zarówno na etapie doświadczenia optymalizacyjnego jak i weryfikującego zoptymalizowane warunki prowadzenia kultur *in vitro*.
- Analiza statystyczna wykonana dla regenerantów M10, M11 i M12 u jęczmienia uzyskane na drodze somatycznej embriogenezy oraz

pszenicy i pszenżyta uzyskanych na drodze androgenyzy wykazała, że różnice pomiędzy M10, M11 i M12 występują na poziomie typów zmienności, co potwierdza, że metoda Taguchiego umożliwia optymalizację warunków uzyskania regenerantów dla tych gatunków i sposobów regeneracji.

- Zmiany w sekwencji DNA przeważały nad zmianami dotyczącymi metylacji *de novo* lub demetylacji. Stwierdzono, że zarówno w przypadku somatycznej embriogenezy jak i androgenyzy u wszystkich gatunków wzrost zmian sekwencyjnych jest ujemnie skorelowany z demetylacją genomu.
- Uzyskane dane pokazują, że bazowanie na TTCIV jako wskaźniku zmienności bez analizy poszczególnych charakterystyk metA-FLP (SV, DMN, DNMN) może dawać nieadekwatne wyniki.

Osiągnięcia projektu

- Zastosowanie metody Taguchiego do procesu optymalizacji pozwala ograniczyć ilość powtórzeń (oszczędność czasu i środków) w przypadku testowania kilku czynników jednocześnie w trakcie pozyskiwania roślin zbożowych metodami kultur *in vitro*. Z praktycznego punktu widzenia proponowane rozwiązanie może mieć istotne znaczenie w przypadku konieczności optymalizacji warunków kultur *in vitro* gdy celem jest zbadanie wielu zmiennych jednocześnie.
- Metoda Taguchiego pozwoliła na wytypowanie warunków zoptymalizowanych w kierunku produkcji maksymalnej liczby zielonych regenerantów. W tych warunkach obserwowano obniżenie ilości roślin albinotycznych w stosunku do zielonych regenerantów jęczmienia i pszenżyta dając wymierne korzyści ilościowe/hodowlane. Uzyskane wyniki, oprócz aspektu poznawczego, pokazują, że nadal istnieje duża możliwość manipulowania metodyką kultur *in vitro* a zwiększenie liczby zielonych regenerantów (i zmniejszenie liczby regenerantów albinotycznych) jest jak najbardziej możliwe.
- Zaproponowana metoda pozwoliła na opracowanie takich warunków prowadzenia kultur *in vitro*, które umożliwiają uzyskanie regenerantów zarówno o najwyższym jak i najniższym poziomie zmienności indukowanej w kulturach, dając potencjalną możliwość manipulacji tym poziomem. Taki wynik wydaje się mieć znaczenie praktyczne, gdyż sugeruje,

że kultury mogą być źródłem zmienności. Zmienność ta może być użyteczna w hodowli i nie jest traktowana jako GMO. Możliwym jest również takie pokierowanie hodowlą tkankową, które doprowadzi do zminimalizowania zmienności, co w wielu przypadkach jest ważne gdy celem jest wyprowadzenie wyrównanego materiału roślinnego.

- Optymalizacja prowadzona w oparciu o dane molekularne dotyczące poziomu zmienności jest możliwa dla regenerantów jęczmienia uzyskanych w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych oraz dla pszenicy i pszenżyta uzyskanych na drodze androgenezy, potwierdzając użyteczność zastosowanego podejścia badawczo-statystycznego. Należy jednak podkreślić, że doświadczenie zostało wykonane w jednym powtórzeniu i wymaga weryfikacji.
- Wyniki uzyskane w prezentowanym zadaniu pozwoliły na aplikowanie do konkursu NCN Miniatura, uzyskano projekt MINIATURA 2 nr 2018/02/X/NZ9/02042

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

- Orłowska, R., Pachota, K.A., Machczyńska, J., Niedziela, A., Makowska, K., Zimny, J., and Bednarek, P.T. (2020) Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. *Electronic Journal of Biotechnology*. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.11.001>. (IF=2.040, 70 pkt.)
- Orłowska, R., Bednarek P.T. (2020) Precise evaluation

of tissue culture-induced variation during optimisation of *in vitro* regeneration regime in barley, *Plant Molecular Biology*. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00973-5>. (IF=3.928, 100 pkt.)

- Bednarek, P.T., Orłowska R. (2020) CG Demethylation Leads to Sequence Mutations in an Anther Culture of Barley Due to the Presence of Cu, Ag Ions in the Medium and Culture Time. *International Journal of Molecular Science*. <https://doi.org/10.3390/ijms21124401>. (IF=4.556, 140 pkt.)
- Bednarek, P.T., Orłowska, R. (2020) Time of *In Vitro* Anther Culture May Moderate Action of Copper and Silver Ions that Affect the Relationship between DNA Methylation Change and the Yield of Barley Green Regenerants. *Plants*. DOI: 10.3390/plants9091064. (IF=2.762, 70 pkt.)
- Bednarek, P.T., Zebrowski, J., Orłowska, R. (2020) Exploring the Biochemical Origin of DNA Sequence Variation in Barley Plants Regenerated via *in Vitro* Anther Culture. *International Journal of Molecular Science*. <https://doi.org/10.3390/ijms21165770>. (IF=4.556, 140 pkt.)

Konferencje

- 9th International Triticale Symposium Szeged, Węgry, 23.05.2016-27.05.2016. Poster przygotowany w oparciu o wyniki sprawozdania za rok 2015: strony 6–8. „Minimizing albinos among DH plants derived via *in vitro* anther cultures”.
- International Association for Plant Biotechnology Congress, 19-24.08. 2018 Dublin, Irlandia. Prezentowano wyniki ze sprawozdania z 2015 r. – str. 7–8 oraz ze sprawozdania z 2018 r. – str. 6. „Application of the Taguchi method in cereal tissue cultures process: maximization of green regenerants”.

Tabela 1

Liczba wyłożonych zarodków/pylników na pożywki indukujące w zadaniu 12.

Gatunek	Metoda kultur tkankowych/proces uzyskania regenerantów	Ilość wyłożonych eksplantatów			
		Proces optymalizacji		Proces weryfikacji	
		Zarodki	Pylniki	Zarodki	Pylniki
Jęczmień	Kultury zarodków zygotycznych/somatyczna embriogeneza (SE)	2150	-	786	-
	Kultury pylników/Androgeneza (A)	-	5590	-	5427
Pszenica	Kultury zarodków zygotycznych/somatyczna embriogeneza (SE)	1974	-	1470	-
	Kultury pylników/Androgeneza (A)	-	7900	-	2153
Pszenżyto	Kultury zarodków zygotycznych/somatyczna embriogeneza (SE)	2120	-	1639	-
	Kultury pylników/Androgeneza (A)	-	7200	-	17152
Suma		6244	20690	3895	24732

Tabela 2

Warunki zastosowane w doświadczeniu optymalizacyjnym oraz ilość zielonych regenerantów uzyskanych na 100 wyłożonych pylników dla najbardziej efektywnych warunków optymalizacyjnych dla badanych gatunków zbóż.

Gatunek	Warunki dla najlepszego wariantu doświadczenia optymalizacyjnego			Ilość zielonych regenerantów na 100 pylników		
	Wariant doświadczenia optymalizacyjnego	CuSO ₄ (μM)	AgNO ₃ (μM)	Czas (dni)	Kontrola (M1)	Wariant doświadczenia optymalizacyjnego
Jęczmień	M7	10	10	35	0,64	2,91
Pszenica	M3	0,1	60	35	5,52	14,62
Pszenżyto	M9	10	0	42	0,91	6,06

Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji — miejscowo-specyficzna mutageneza z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz

Development and application of methods for the shortening of triticale breeding cycle and for the effective selection — site-specific mutagenesis using programmable nucleases

Krzysztof Michalski¹, Sławomir Sowa¹, Anna M. Linkiewicz^{1,2}✉

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

²Zakład Biologii Molekularnej i Genetyki, Instytut Nauk Biologicznych, Wydział Biologii i Nauk o Środowisku, Uniwersytet Kardynała Stefana Wyszyńskiego w Warszawie

✉ e-mail: a.linkiewicz@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: Crispr/Cas9, TALEN, mutageneza, Triticale, porastanie, edycja genów, Crispr/Cas9, TALEN, mutagenesis, Triticale, preharvest sprouting, gene editing

Spoczynek nasion odgrywa podstawowe znaczenie w regulacji mechanizmów prowadzących do porastania przedźniwnego (PHS). Nie wiadomo jednak jaki jest udział poszczególnych czynników w tolerancji na PHS. Nie scharakteryzowano jeszcze dokładnie na poziomie molekularnym genów odpowiedzialnych za porastanie u pszenicy czy żyta, mimo że znane są geny zaangażowane w spoczynek nasion u modelowych gatunków, w tym u *Arabidopsis thaliana*. Spoczynek nasion jest jedną z cech o najbardziej skomplikowanym genetycznym podłożu, dodatkowo warunkowanym wpływem środowiska (Shu i in., 2015). Znane są mutanty *Arabidopsis*, których funkcja związana jest z odpowiedzią na ABA, gibereliny, regulacją dojrzewania, spoczynkiem nasion, itd. czyli procesami, które mogą mieć związek z regulacją PHS.

Temat zakładał wykorzystanie miejscowo-specyficznych nukleaz TALEN i CRISPR/Cas9 do indukowania kierunkowych mutacji w genomie pszenżyta dla poznania mechanizmów zaangażowanych w spoczynek nasion w celu uzyskania roślin o podwyższonej tolerancji na porastanie. Mutageneza była wykorzystana do wyciszenia dwóch genów PP2A i ABA8'OH, (homologów PDF1 i CYP707A u rzodkiewnika), potencjalnie zaangażowanych w spoczynek nasion pszenżyta.

Szczegółowe zadania w temacie obejmowały:

- Zaprojektowanie do wytypowanych w projekcie sekwencji genów, sekwencji nukleaz, w ten sposób, że zmiany edycyjne mają obejmować rejony sekwencji odpowiadające eksonowi 1 i 2 tych genów.
- Samodzielne wykonanie konstruktów genowych TALEN i CRISPR/Cas9 do edytowania genów PDF1 i CYP707A u rzodkiewnika i PP2A i ABA8'OH pszenżyta i żyta.
- Sprawdzenie poprawności zaprojektowania i wykonania oraz ocena funkcjonalności konstruktów nukleaz przy zastosowaniu zróżnicowanych systemów ekspresji przejściowej.
- Stabilną transformację rzodkiewnika, pszenżyta i żyta wykonanymi konstruktami oraz regenerację roślin T0 i T1 pszenżyta.
- Ocenę efektywności transgenezy i wprowadzonych zmian mutacyjnych na poziomie DNA, określenie rodzaju i liczby zmian w poszczególnych edytowanych *loci* poprzez analizy DNA.
- Określenie poziomu ekspresji nukleaz i sgRNA w komórkach.
- Rozmnożenie i uzyskanie pokoleń T0 i T1 oraz wykorzystanie materiału do analiz zmian w tych pokoleniach.



Material i Metody

Materiał roślinny do doświadczeń stanowiły: pszenżyto ozime (*X triticosecale* Wittmack), *Arabidopsis thaliana*, jęczmień (*Hordeum vulgare* L.) i żyto zwyczajne (*Secale cereale* L.).

Na różnych etapach projektu stosowano szereg metod molekularnych, w tym: izolację DNA, izolację RNA, odwrotną transkrypcję, ligację, klonowanie, analizę restrykcyjną i sekwencyjną konstruktów TALEN i od 2018 r CRISPR/Cas9, analizę PCR, analizę ekspresji konstruktów TALEN i CRISPR/Cas9 w komórkach; analizę ekspresji genów qPCR, konstrukcję wektorów ekspresyjnych metodami Gateway oraz GoldenGate, transfekcję protoplastów z liści pszenżyta z użyciem glikolu polietylenowego (PEG), transformację biolistyczną, transformację niedojrzałych zarodków z wykorzystaniem *Agrobacterium*, trawienie nukleazą T7E, sekwencjonowanie Sanger i analiza TIDE, sekwencjonowanie NGS. Wykorzystano też metody kultur *in vitro* jak kultury kalusowe, kultury niedojrzałych zarodków pszenżyta, regenerację *in vitro*, metody transformacji komórek roślinnych, kultury zawieszinowe żyta, selekcję na podłożach z dodatkiem antybiotyków lub herbicydów.

Stosowane były również metody mikrobiologiczne, w tym hodowla bakterii, transformacja bakterii, preparatyka plazmidu oraz analizy bioinformatyczne i analizy statystyczne.

Wyniki i Dyskusja

Prace obejmowały doświadczenia nad transformacją pszenżyta przy użyciu konstruktów TALEN jak również CRISPR/Cas9 z sgRNA skierowanymi wobec 2 genów potencjalnie związanych z porastaniem pszenżyta. Transformacja roślin rzodkiewnika czterema konstruktami TALEN oraz transformacja roślin pszenżyta sześcioma konstruktami CRISPR/Cas9 dla genów PP2A i ABA8'OH pozwoliła na otrzymanie roślin *in vitro* i uzyskanie pokolenia T0 oraz T1. W wyniku transformacji około 100 niedojrzałych zarodków pszenżyta na kombinację dla genów PP2A i ABA8'OH, uzyskano 77 roślin T0 odpornych na czynnik selekcyjny fosfinitrycynę (Michalski i Linkiewicz, 2019). Wyselekcjonowane rośliny o potwierdzonej integracji transgeny zostały rozmnożone i uzyskano pokolenie T1.

Sprawdzenie efektywności różnego typu konstruktów do wywoływania mutacji w komórkach pszenżyta z zastosowaniem transfekcji protoplastów z użyciem PEG oraz ocena aktywności konstruktów poprzez mikrowstrzelanie

do tkanek jęczmienia (Budhagatapalli, 2016), we współpracy z IPK Gatersleben, wykazały zmiany w przewidywanych regionach genów PP2A i ABA8'OH. Potwierdzono znaczące zwiększenie efektywności edycji genów dzięki zastosowaniu nukleaz CRISPR/Cas9 i dodatkowych sekwencji Trex2 w stosowanych do transformacji wektorach CRISPR/Cas9. Generowane zmiany obserwowane w komórkach protoplastów pszenżyta mają charakter delekcji, insercji lub SNP o różnym nasileniu, zależnie od zastosowanego sgRNA.

Zmiany mutacyjne w komórkach pszenżyta i żyta oceniono poprzez zastosowanie endonukleazy T7E1, sekwencjonowanie Sanger oraz sekwencjonowanie NGS w celu określenia typu i częstości zmian mutacyjnych.

Analizy stabilnych linii transgeniczných żyta przy wykorzystaniu sekwencjonowania Sanger w połączeniu z analizą TIDE rejonu CYP707A2 po mutageniezie z użyciem sgRNA2 i sekwencji PP2A po mutageniezie z użyciem sgRNA5 wykazały zmiany w sekwencjach docelowych genów. Typ i nasilenie zmian zależne było od zastosowanego sgRNA.

Analiza sekwencji pszenżyta oparta została o sekwencjonowanie NGS materiału uzyskanego poprzez przejściową nadekspresję badanych konstruktów w protoplastach. Charakter generowanych mutacji zależny był od zastosowanego sgRNA oraz obecności lub braku sekwencji Trex2 w konstrukcie.

Wnioski

1. Zaproponowane w projekcie sposoby konstrukcji i wykonania budowy sekwencji TALEN i sgRNA do edycji sekwencji w/w genów obarczone są niskim ryzykiem wystąpienia mutacji typu *off-target*.
2. Udoskonalone wektory CRISPR/Cas9 sprawdzane w systemie ekspresji przejściowej w komórkach protoplastów pszenżyta oraz w stabilnie stransformowanych zawieszinach żyta, potwierdziły znaczące zwiększenie efektywności edycji genów dzięki zastosowaniu dodatkowych sekwencji Trex2 w wektorach stosowanych do transformacji.
3. W wyniku zastosowania nukleaz typu CRISPR/Cas9 możliwe jest wprowadzenie zmian w sekwencji genów docelowych – PP2A i CYP707A2 w komórkach pszenżyta i żyta.
4. Zastosowana metoda transformacji niedojrzałych zarodków zbóż w połączeniu z użyciem zmodyfikowanej procedury regeneracji

umożliwia otrzymanie licznych linii T0 pszenżyta, które wykazują *in vitro* odporność na czynnik selekcyjny fosfotrycynę oraz obecność konstruktów metodą PCR.

5. Analizy Real Time PCR wybranych roślin pszenżyta pokolenia T1 wykazały stabilną ekspresję sgRNA jak i Cas9, co wskazuje na zastosowanie funkcjonalnych konstruktów oraz odpowiedniej metodyki transformacji. Brak zmian w sekwencjach docelowych roślin T1 może wynikać z analizy zbyt małej próby lub działania mechanizmu niwelującego mutacje u poliploidów.

Literatura

- Budhagatapalli N., Schedel S., Gurushidze M. *et al.* (2016). A simple test for the cleavage activity of customized endonucleases in plants. *Plant Methods* 12, 18 doi: 10.1186/s13007-016-0118-6.
- Michalski K., Linkiewicz A. M. (2019). Projektowanie, konstrukcja i ocena nukleaz CRISPR/Cas9 w celu edycji genów związanych z porastaniem przedźniwnym pszenżyta. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* nr 285, str 91.
- Shan Q., Wang Y., Li J. *et al.* (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc* 9, 2395–2410, doi: 10.1038/nprot.2014.157

Badanie typów odporności na fuzariozę kłosów u pszenżyta ozimego za pomocą markerów fenotypowych i metabolicznych

Evaluation of Fusarium head blight resistance types in winter triticale using phenotypic and metabolic markers

Halina Wiśniewska¹✉, Adriana Twardawska¹, Tomasz Góral², Piotr Ochodzki², Maciej Majka¹, Michał Kwiatek¹, Dorota Walentyn-Góral², Jolanta Belter¹

¹ Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

✉ e-mail: hwis@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: fuzarioza kłosów, gen *Fhb1*, pszenżyto, mykotoksyny

W ostatnich latach nowe odmiany pszenżyta wykazują podatność na fuzariozę kłosów, a także na kumulację toksyn fuzaryjnych, które stanowią duże zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz zwierząt (Dweba i in. 2017).

Odporność na grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium* warunkowana jest przez wiele locus cech ilościowych (QTL), przy czym główne źródło stanowi locus genu *Fhb1* zlokalizowany w krótkim ramieniu chromosomu 3B. Na podstawie chromosomu 3B odmiany Chinese Spring, opracowano marker SSR, *UMN_10*.

Cele badań w latach 2014–2020

1. Uzyskanie genotypów pszenżyta ozimego (x *Triticosecale*) o zwiększonej odporności na fuzariozę kłosów powodowaną przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. i niskiej akumulacji mykotoksyn fuzaryjnych w ziarnie. Prowadzenie badań z wykorzystaniem markerów fenotypowych, metabolicznych i molekularnych.
2. Fenotypowanie porażenia kłosów wybranych genotypów pszenżyta w doświadczeniach infekcyjnych w różnych środowiskach, w wieloletnim cyklu badawczym celem uzyskania istotnej poprawy odporności genotypów pszenżyta ozimego z uwzględnieniem najważniejszych typów odporności: typ I – odporność na infekcję pierwotną, typ II – odporność na rozprzestrzenianie się grzyba wzdłuż osadki kłosowej, typ III – odporność na porażenie ziarniaków, typ IV – tolerancja

wobec fuzariozy kłosów i obecności trichotecenów, typ V – odporność na akumulację trichotecenów.

3. Wprowadzanie do pszenżyta genów odporności z odpornych form pszenicy posiadających gen *Fhb1*, oraz zbadanie wpływu na odporność na *Fusarium* introgresji chromatyny z *T. monococcum* oraz substytucji chromosomu pszenicy 1D/1A w liniach pszenżyta.
4. Przeprowadzenie analizy wielocechowej – uwzględniającej wszystkie badane cechy zidentyfikowane każdego roku u badanych genotypów łączących różne typy odporności na fuzariozę kłosów; kolekcjonowanie ziarna tych genotypów w komorze nasion w Instytucie Genetyki Roślin PAN.

Założone w projekcie cele zostały zrealizowane.

Material badawczy

1. Genotypy pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym (639) i odmiany wzorcowe – wysoko plonujące odmiany pszenżyta.
2. Linie pszenżyta (40) z introgresją chromatyny *T. monococcum* oraz substytucjami chromosomu pszenicy 1D/1A.
3. Komponenty do krzyżowań:
 - linie pszenicy (gen *Fhb1*): TOF 6-oz 3_13_7_3 (=S 39), UNG 226, UNG 136.6.1.1, UNG 136.16.7.4.
 - linie pszenżyta (gen *Fhb1*): G8.06, K08_112, K09_49, K07_142, K07_75.



- odmiana pszenżyta Twingo, linia pszenżyta MAH 7314 (brak genu *Fhbl*).
- 4. Linie uzyskane z krzyżowań genotypów pszenżyta wykazujących odporność oraz z krzyżowań linii pszenżyta z genotypami odpornymi pszenicy z obecnym genem *Fhbl*.

Metody badawcze

1. Doświadczenia infekcyjne w IGR PAN Poznań i IHAR PIB Radzików oraz w 4 lokalizacjach (spółki hodowlane).
2. Wytworzenie inokulum *Fusarium culmorum*, inokulacja mieszaniną zarodników, mikrozraszanie.
3. Ocena % IFK (**typ I + II odporności**).
4. Ocena uszkodzenia ziarniaków przez *Fusarium* (%FDK) (**typ III odporności**).
5. Określenie obniżki parametrów struktury plonów po inokulacji (**typ IV odporności**).
6. Analiza zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie (deoksynivalenol=DON i pochodne, nivalenol=NIV, zearalenon=ZEN) (chromatografia HPLC i GC) (**typ V odporności**).
7. Badanie **odporności typu I** (infekcja pierwotna badana po 7 dniach) i **typu II** – rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie (inokulacja punktowa, ocena po 21 dniach).
8. Analizy statystyczne wielocechowe prowadzone każdego roku (analiza składowych głównych) – identyfikacja genotypów pszenżyta łączących różne typy odporności na fuzariozę kłosów.
9. Wprowadzenie genu *Fhbl* do pszenżyta: kastrowanie, zapyłanie pyłkiem pszenicydawcy odporności (gen *Fhbl*), krzyżowania wsteczne i selekcja molekularna form z genem *Fhbl*.

Wyniki

Typ I i II odporności kłosów u pszenżyta (% IFK)

1. W latach 2014–2020 badano odporność na fuzariozę kłosów 650 genotypów pszenżyta ozimego i form wzorcowych (Fredro, Borwo, Tomko, Meloman, Trefl, Kasyno i Porto).
2. Stwierdzono silny wpływ warunków środowiska na poziom infekcji (rok badań, lokalizacja).
3. Stwierdzono duże zróżnicowanie podatności na fuzariozę kłosów badanych genotypów pszenżyta. Pojawienie się na poletkach pszenżyta (2015) rdzy żółtej obniżało kondycję roślin i prawidłową ocenę porażenia przez *Fusarium*.
4. Najmniejsze porażenie kłosów pszenżyta ozimego (%IFK) stwierdzono w latach 2018 i 2019 w obu lokalizacjach (5,3–5,6%),

a najwyższe w 2016 (18,2%).

5. Każdego roku identyfikowano genotypy odporne oraz bardzo podatne we wszystkich lokalizacjach.

Typ III odporności (porażenie ziarna pszenżyta – %FDK)

1. W latach badań efektem porażenia kłosów przez *Fusarium* było uszkodzenie ziarniaków, które kształtowało się średnio dla dwóch lokalizacji od 3,8 (2019) do 33,2% (2017).
2. W większości lat badań średnia liczba i masa porażonego ziarna (%FDK) korelowała z porażeniem kłosa (%IFK) w obu lokalizacjach.
3. Na podstawie oceny IFK i FDK wybierano każdego roku genotypy o podwyższonej odporności i analizowano w ziarnie zawartość ergosterolu i toksyn fuzaryjnych.

Typ IV odporności – tolerancja wobec fuzariozy kłosów i obecności trichotecenów

W każdym roku badań (2014–2020) obserwowano u wszystkich badanych genotypów obniżkę parametrów struktury plonów po inokulacji w odniesieniu do kontroli.

Typ V odporności – odporność na akumulację mykotoksyn

1. W każdym roku badań identyfikowano w ziarnie pszenżyta inokulowanego *Fusarium* – deoksynivalenol (DON) (od 0,660 do 18,670 mg/kg) w zależności od lat.
2. Największą ilość DON-u stwierdzono w 2014 r. – 18,670 i 2017- 17,760 mg/kg, najmniejszą ilość DON – 0,660 mg/kg stwierdzono w 2019, kiedy porażenie kłosów i ziarna było niewielkie.
3. Zearalenon stwierdzony był w znacznych ilościach w latach 2014, 2016 i 2017 (do 2,100 mg/kg), w pozostałych latach średnio około 0,080 mg/kg.
4. Zawartość niwalenolu (NIV) kształtowała się od 0,270 do 10,450 mg/kg w zależności od lat badań. Najmniejszą ilość NIV stwierdzono w 2019 r. (0,270 mg/kg), co było związane z niskim porażeniem kłosów i ziarna.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Wieloletnie badania pokazały, że odporność pszenżyta (cecha ilościowa) jest silnie modyfikowana przez warunki pogodowe (wilgotność i temperaturę) – zalecane prowadzenie badań w różnych środowiskach dla wiarygodnej oceny

interakcji patogen – roślina.

- Zastosowane każdego roku metody statystyczne pozwoliły na identyfikację genotypów łączących różne typy odporności. Jest to istotne w przypadku pszenżyta ozimego, u którego nie zidentyfikowano genów odporności o dużym efekcie.

Osiągnięcia projektu

- Badano odporność na fuzariozę kłosów około 650 genotypów pszenżyta ozimego w doświadczeniach infekcyjnych w zróżnicowanych środowiskach.
- Zidentyfikowano 54 genotypy pszenżyta o podwyższonej odporności na porażenie kłosa i kumulację toksyn fuzaryjnych w ziarnie i zgromadzono w kolekcji IGR PAN w Poznaniu.
- Badając porażenie kłosów linii pszenżyta z introgresją chromatyny *T. monococcum* oraz substytucjami chromosomu pszenicy 1D/1A wyselekcjonowano 5 linii o podwyższonej odporności na fuzariozę kłosów.
- Wprowadzenie genów odporności *Fhbl* z pszenicy lub innych gatunków z rodzaju *Triticum* wymaga kilkuletnich badań i krzyżowań wypierających niekorzystne cechy przed wykorzystaniem w hodowli.
- Ze względu na bardzo małą odległość pomiędzy produktami reakcji PCR (3 pz) przy użyciu starterów *UMN_10*, na podstawie genomowych sekwencji DNA pszenicy zaprojektowano w IGR PAN nowe startery różniące się długością, co umożliwiła szybszą oraz bardziej precyzyjną analizę prążków na żelu. Produkt specyficzny dla obecnego genu *Fhbl* przy użyciu markera zmodyfikowanego *UMN_10* ma długość 536 par zasad, natomiast dla genotypów nie posiadających genu 439 par zasad.
- Zastosowanie zmodyfikowanego przez Zespół markera *UMN_10* pozwoliło na szybsze i bardziej precyzyjne zidentyfikowanie produktów reakcji PCR na żelu agarozowym oraz wyselekcjonowanie genotypów charakteryzujących się obecnością genu odporności na fuzariozę kłosa o układzie heterozygotycznym.
- Uzyskano 10 mieszańców BC₄ i 60 mieszańców BC₅ z genem *Fhbl*, wykorzystane będą przez doktoranta w jego pracach badawczych (rozprawa doktorska).

Wykaz publikacji

Publikacje

Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Walentyn-Góral

- D. (2016). Higher *Fusarium* toxin accumulation in grain of winter triticale lines inoculated with *Fusarium culmorum* as compared with wheat. *Toxins* 2016, 8 (10), 301; doi: 10.3390/toxins8100301. IF=3,0, MNiSW= 35pkt
- Perlikowski D., Wiśniewska H., Kaczmarek Z., Góral T., Ochodzki P., Kwiatek M., Majka M., Augustyniak A., Kosmala A., (2016). Alterations in kernel proteome after infection with *Fusarium culmorum* in two triticale cultivars with contrasting resistance to Fusarium head blight. *Frontiers in Plant Science*. 7: 1217: doi: 10.3389/fpls.2016.01217. IF=4,298, MNiSW= 40pkt
- Perlikowski D., Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Majka M., Pawłowicz I., Belter J., Kosmala A., (2019). Identification of proteomic components associated with resistance to Fusarium head blight in Rye (*Secale cereale* L.). *Plant Pathology Journal*. 1–8, Doi: 10.5423/PPJ.OA.11.2018.0278. IF=1,294, MNiSW= 70 pkt
- Góral T., Wiśniewska, H., Ochodzki P., Twardawska A., Walentyn-Góral D. (2020). Resistance to Fusarium head blight, kernel damage and concentration of *Fusarium* mycotoxins in grain of winter triticale (*x Triticosecale* Wittmack) lines. *Agronomy* 2020, publikacja po recenzjach, IF=2,603, MNiSW=100pkt
- Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Kwiatek M., Majka M., Grzeszczak I., Belter J., Banaszak Z., Pojmaj M., Kurlito D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Woś H., (2014). Odporność rodów hodowlanych pszenżyta ozimego na fuzariozę kłosów. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* 271:29–43. MNiSW=6pkt/2014
- Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn Góral D., Kwiatek M., Majka M., Belter, J., Banaszak Z., Pojmaj M., Kurlito D., Konieczny M. Budzianowski G., Cicha, A., Paizert K., Woś H., (2016). Odporność rodów hodowlanych pszenżyta ozimego na infekcje kłosa grzybem *Fusarium culmorum*. *Biul. IHAR* nr 276: 39–55. MNiSW =6 pkt./2016
- Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Kwiatek M., Majka M., Belter J., Banaszak B., Pojmaj M., Kurlito D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Matysik P., (2018). Badanie typów odporności na fuzariozę kłosów u pszenżyta ozimego za pomocą markerów fenotypowych i metabolicznych. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* nr 284, str.33–51. MNiSW = 6 pkt/2018
- Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Majka M., Walentyn Góral D., Belter, J., (2019). Badanie typów odporności na fuzariozę kłosów u pszenżyta ozimego za pomocą markerów fenotypowych i metabolicznych. *Biul. IHAR* nr 286: 75–79. MNiSW =20 pkt./2019

Doniesienia konferencyjne

41st Mycotoxin Workshop, Lisbon, Portugal, 6–8 May, 2019, Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn – Góral

- D., Majka M., Twardawska A., Belter J., Study of triticale winter breeding lines for resistance to *Fusarium* head blight, Book of Abstracts: 56
- 2nd Global Conference on Plant Science and Molecular Biology, 20–22 września, 2018, Rzym, Włochy, Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Majka M., Banaszak Z., Nita Z., Pojmaj M., Kurleto D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Screening of triticale winter breeding lines for resistance to *Fusarium* head blight, Book of Abstracts, str. 70.
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Majka M., Grzeszczak I. 2018. *Fusarium* head blight and *Fusarium* toxins accumulation in grain of winter wheat breeding lines inoculated with *Fusarium culmorum*. Book of Abstracts: EUCARPIA cereal section meeting: “Breeding cereals for sustainable agriculture”, Clermont-Ferrand, Francja, 19 – 21.03.2018; str. 108.
- Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Majka M. 2018. Stability of resistance to *Fusarium* head blight and *Fusarium* toxin accumulation in winter wheat lines evaluated in the years 2015–2017 in two environments. Book of Abstracts: 2nd Global Conference on Plant Science and Molecular Biology, Rzym, Włochy, 18.09 -22.09.2018; str. 78.
- Global Conference of Plant Science and Molecular Breeding, September 11–13, 2017, Valencia, Spain. Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Kwiatek M., Majka M., Belter J. Reaction of winter triticale breeding lines to *Fusarium* head blight and accumulation of *Fusarium* metabolites in grain in two environments.
- XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, Zakopane 30.01- 3.02.2017. Wiśniewska H., Kwiatek M., Góral T., Walentyn-Góral D., Majka M., Belter J. Badanie odporności typu I i II w liniach pszenżyta ozimego z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genu D pszenicy.
- 38th Mycotoxin Workshop, Niemcy, Berlin, 2–4.05. 2016r., Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Kwiatek M., Majka M., Belter J., Walentyn-Góral D., Banaszak Z., Pojmaj M., Kurleto D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Woś H., Woś J, Resistance of winter triticale breeding lines to accumulation of *Fusarium* metabolites in grain.
- XII Ogólnopolska Konferencja NAUKA DLA HODOWLI I NASIENICTWA ROŚLIN UPRAWNYCH, Zakopane, 02.02.2015 – 06.02.2015 r., Walentyn-Góral D., Góral T., Majka M., Kwiatek M., Wiśniewska H., 2015, Odporność typu I i II na fuzariozę kłosów pszenicy i pszenżyta. Streszczenia referatów i plakatów: 368–370.
- EFS13 13th European *Fusarium* Seminar “*Fusarium* – Pathogenicity, Mycotoxins, Taxonomy, Genomics, Biosynthesis, Metabolomics, Resistance, Disease control”, 10–14 maja 2015 – Martina Franca (TA) – Włochy, Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Grzeszczak I., Majka M., Kwiatek M., Belter J., Banaszak Z., Pojmaj M., Kurleto D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Woś H., „Resistance of winter triticale breeding lines to *Fusarium* head blight and accumulation of *Fusarium* metabolites in grain”, Book of abstracts: 176.
- 8th WORD Mycotoxin Forum, Wiedeń, Austria, 10 – 12 Listopada 2014, Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Grzeszczak I., Pojmaj M., Kurleto D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Woś H., 2014, Reaction of winter triticale breeding lines to *Fusarium* head blight and accumulation of *Fusarium* metabolites in grain in two environments, Abstracts of lectures and posters: P 160: 164–165.
- 9th International Triticale Symposium, 23–27 maja, 2016, Szeged, Węgry: Góral T., Wiśniewska H., Ochodzki P., Kwiatek M., Majka M., Belter J., Walentyn-Góral D., Banaszak Z., Pojmaj M., Kurleto D., Konieczny M., Budzianowski G., Cicha A., Paizert K., Woś J., Woś H., Comparison of *Fusarium* toxins accumulation in grain of winter triticale and winter wheat and winter wheat, Book of Abstract: s str. 61.
- Cereals for Food, Feed and Fuel – Challenge for Global Improvement; Joint EUCARPIA Cereal Section & ITMI Conference, 29.06 – 04.07.2014; Wernigerode, Niemcy, Wiśniewska H., Góral T., Ochodzki P., Walentyn-Góral D., Belter J., Kwiatek M., Bogacki J., Drzazga T., Ługowska B., Matysik P., Witkowski E., Rubrycki K., Woźna-Pawlak U., 2014, Screening of triticale winter breeding lines for resistance to *Fusarium* head blight and accumulation of *Fusarium* toxins in grain, Book of Abstracts str. 62.
- 9th International Triticale Symposium, Szeged, Hungary, May 23–27, Góral T., Wiśniewska H., Kwiatek M., Walentyn-Góral D., Majka M., Belter J. 2016. Type I and type II resistances to *Fusarium* head blight in winter triticale lines. Book of Abstracts: 62

Literatura

- Dweba C.C., Figlan S., Shimelis H.A., Motaung T.E., Sydenham S., Mwadzingeni L., Tsilo T.J., *Fusarium* head blight of wheat: Pathogenesis and control strategies, Crop Protection 91, (2017), doi: 10.1016/j.cropro.2016.10.002
- Zhu Z., Xu D., Cheng S., Gao C., Xia X., Hao Y., He Z., Characterization of *Fusarium* Head Blight Resistance Gene *Fhb1* and Its Putative Ancestor in Chinese Wheat Germplasm, (2018), China Academic Journals, doi: 10.3724/SP.J.1006.2018.00473

Poszukiwanie markerów molekularnych genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt*

Identification of molecular markers associated with maintenance of pollen sterility genes in triticale with CMS *Tt*

Piotr Tomasz Bednarek^{✉1}, Marzena Wasiak¹, Agnieszka Niedziela¹, Sławomir Bany¹, Mirosław Pojmaj², Henryk Woś³, Janina Woś³

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB, Radzików, 05–860 Błonie

²DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Choryń 27, 64–000 Kościan

³Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, ul. Główna 20, 99–307 Strzelce

✉ e-mail: p.bednarek@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: CMS *Triticum timopheevii*, pszenżyto, mapowanie genetyczne

Cele prowadzonych badań

1. Wyprowadzanie kolejnych pokoleń linii rekombinacyjnych (F5-F8) dla pięciu populacji mapujących – cel został osiągnięty
2. Wyprowadzenie linii BC1F1 na drodze krzyżowań wstecznych poszczególnych linii pokolenia F4 i F8 z linią mateczną celem określenia fenotypu – cel został osiągnięty
3. Opracowanie zagęszczonej mapy genetycznej pszenżyta w wykorzystaniem populacji mapujących RIL oraz markerów silicoDArT i SNP – cel został osiągnięty
4. Mapowanie QTLi (ang. Quantitative Trait Locus) utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Triticum timopheevii* (*Tt*) oraz identyfikacja markerów molekularnych DNA silnie sprzężonych oraz asocjowanych z cechą – cel został osiągnięty
5. Określenie wkładu genów identyfikowanych w rejonie QTLi do zmienności fenotypowej cechy – cel został osiągnięty
6. Testowanie markerów silicoDArT i SNP na szerszej populacji genotypów – cel został osiągnięty
7. Opracowanie zestawu markerów genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt* – cel został osiągnięty

1. DB1 x RB1
2. DB2 x RB2
3. MS114: [MS 114 (5)-2–1 dop. x Borwo]
4. MS112: [MS 112 (15)-2–1 dop. x Borwo]
5. HT352: [MS HT 352 dop. x Borwo]

Populacje były prowadzone przez Hodowców do poziomu pokolenia F8. Każda z nich w pierwszym roku badań składała się z 250 linii.

Metodyka badań obejmowała następujące etapy:

1. Analiza fenotypowa populacji RIL – krzyżowanie wsteczne poszczególnych linii z linią mateczną, ocena zawiązywania ziarniaków roślin BC1F1.
2. Izolacja DNA z liści poszczególnych linii rekombinacyjnych (DNeasy Plant Mini Kit 250, Qiagen).
3. Genotypowanie materiału roślinnego (Diversity Arrays Technology Pty Ltd., Canberra, Australia).
4. Konstrukcja map genetycznych dla populacji mapujących RIL (Multipoint v3.3 ULD).
5. Identyfikacja QTLi utrzymania sterylności pyłku (WinQTL Cartographer)
6. Identyfikacja markerów utrzymania sterylności pyłku oraz określenie wkładu genów identyfikowanych w rejonie QTLi do zmienności fenotypowej cechy (mapowanie kompozytowe – WinQTLCart2.5; mapowanie asocjacyjne – TASSEL 3.0)
7. Analiza bioinformatyczna sekwencji markerów sprzężonych i asocjowanych z cechą (The National Centre for Biotechnology Information (NCBI), algorytm BLASTn;

Materiały i Metody

Materiał badawczy stanowiło pięć populacji mapujących RILs (ang. Recombinant Inbred Lines) uzyskanych w DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Oddział Laski oraz Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Oddział Borowo:



- baza danych IPK Rye Blast Server, <https://webblast.ipk-gatersleben.de/ryeselect/>)
8. Konwersja markerów SNP (ang. Single Nucleotide Polymorphism) i SilicoDArT do warunków specyficznego PCR (ang. Polymerase Chain Reaction) – projektowanie starterów na podstawie sekwencji homologicznych do sekwencji markerów SNP i SilicoDArT (program CLC Workbench). Dobór temperatury powielania markerów w termocyklerze z gradientem temperatur oraz testowanie ich powielania na populacjach mapujących RIL.
 9. Testowanie konwertowanych markerów na szerszej populacji genotypów oraz selekcja genotypów o pożądanym kombinacjach genów utrzymania sterylności pyłku.

Wyniki

Fenotypowanie roślin BC1F1 uzyskanych w wyniku krzyżowania poszczególnych linii populacji mapujących z linią mateczną wykazało, że cecha (średnia liczba ziarniaków w kłosie) charakteryzowała się rozkładem wartości zgodnym z rozkładem normalnym lub zbliżonym do normalnego.

Zastosowanie technologii DArTseq do genotypowania roślin pozwoliło na wygenerowanie średnio 25 000 markerów SNP oraz 75 000 markerów SilicoDArT dla każdej populacji mapującej.

Na podstawie wyników segregacji markerów opracowano mapy genetyczne składające się z 21 grup sprzężeń odpowiadających poszczególnym chromosomom pszenżyta (1A-7A, 1B-7B, 1R-7R). Mapy te pokrywały od 1381.6 cM (DB1xRB1) do 2549.0 cM (HT 352), a ich zagęszczenie wynosiło od 1.69 markera/cM (HT359) do 2.91 markera/cM (HT114).

Mapowanie kompozytowe utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta wykazało silne rozdrobnienie cechy w populacjach MS114 i HT352. Dla pierwszej z nich identyfikowano osiem QTLi zlokalizowanych na chromosomach 2A (3 QTLi), 3B, 4A, 5A, 7A i 7R, które tłumaczyły od 4.9% do 19.2% wariacji cechy. Druga z populacji charakteryzowała się obecnością trzynastu QTLi tłumaczących od 4.2% do 16.3% wariacji cechy zlokalizowanych na chromosomach 1A, 1B, 2A, 2R, 3B, 3R, 4B, 5B, 5R (3 QTLi) i 6B (2 QTLi). Pojedyncze QTLi wyjaśniające stosunkowo dużą zmienność w obrębie opisywanej cechy (21% i 32%) identyfikowano w populacjach MS112 na chromosomie 4R oraz DB1xRB1 na chromosomie 4A. Z kolei w populacji DB2xRB2 zlokalizowano dwa QTLi na chromosomach 1B i 6A

wyjaśniające aż 28% i 41% zmienności wariacji cechy, lecz ich obecności nie potwierdzały wyniki mapowania asocjacyjnego. Podobnie nie odnotowano markerów asocjowanych z cechą dla populacji MS114. Mapowanie asocjacyjne potwierdziło natomiast obecność markerów SNP i silicoDArT powiązanych z cechą na chromosomach 4R (MS112), 1B (HT352) oraz 4A (DB1xRB1). Poziom asocjacji określany za pomocą współczynnika determinacji (R^2) dochodził dla tych markerów do 0.232 (MS112), 0.390 (HT352) i 0.512 (DB1xRB1).

Analiza bioinformatyczna sekwencji markerów DNA sprzężonych i/lub asocjowanych z genami utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt* wykazała, że przynajmniej część z sekwencji markerowych jest homologiczna do sekwencji genów. Najbardziej interesujące homologie odnotowano dla markerów sprzężonych z QTL zidentyfikowanym na chromosomie 4R w populacji MS112. Lokalizacja tego QTL oraz homologie sekwencji markerów zlokalizowanych w jego obrębie do sekwencji locus *Rfm1* (marker 8509657GC16) odpowiedzialnego za ekspresję cechy u jęczmienia oraz czynnika terminacji transkrypcji MTERF (3609466, 3611527, 4212596GC13, 4367303GA9, 10524573CT34, 4203434TC34) identyfikowanego u żyta i jęczmienia obok genów *Rf* (ang. Restoration of fertility) może świadczyć o obecności tożsamego locus w tej populacji pszenżyta. Liczne markery zlokalizowane w obrębie chromosomów 1B i 5R populacji HT352 (15996308_1B, 3608787_1B, 4356365_1B, 4368308_1B, 4217779_5R, 3606113_5R, 3613036_5R, 3608787_5R, 3614850CT23_5R) oraz 7A populacji MS114 (3607641, 3048200GC53, 3042068, 4218925) wykazywały homologie sekwencji z sekwencjami białek pełniących funkcje związane z sygnalingiem w ochronie roślin przed patogenami, jak również stresami abiotycznymi. Dodatkowo w obrębie QTL na chromosomie 5R identyfikowano cztery markery (4218144, 8521441, 10495679, 4217051) o sekwencjach homologicznych z sekwencją białka F-box biorącego udział w zamykaniu aparatów szparkowych. Rola tych genów w utrzymaniu sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt* nie jest znana.

Analiza wyników mapowania genetycznego oraz asocjacyjnego cechy utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt* pozwoliła na wybór markerów silnie sprzężonych lub asocjowanych z cechą, które po konwersji do warunków specyficznego PCR mogłyby być stosowane do wstępnej selekcji określonych QTLi. Wytypowano markery reprezentujące QTLi zlokalizowane na chromosomach 4R w populacji MS112;

2A, 5A, 7A i 3B w populacji MS114 oraz 1B i 5R w populacji HT352. We wstępnych badaniach mających na celu ustalenie temperatury przyłączenia starterów do macierowego DNA celem powielenia markera w warunkach reakcji PCR (zakres temperatur 48–62°C) opracowano 6 markerów, które różnicowały po dwie linie populacji MS112 nie zawiązujące ziarniaków (sterylne) oraz zawiązujące ponad 70 ziarniaków w kłosie (płodne). Podobna analiza dla wybranych linii populacji HT352 pozwoliła na wytypowanie 4 markerów polimorficznych zlokalizowanych w obrębie QTL na chromosomie 1B i taką samą ilość dla QTL zlokalizowanego na chromosomie 5R. Analiza segregacji markerów zlokalizowanych na 4R w obrębie wszystkich linii populacji MS112 wykazała, że 3 markery (4558515c, 8510873c, 4349378c) segregują identycznie jak ich odpowiedniki przed konwersją. Żaden z markerów sprzężonych z QTLami lokalizowanymi na chromosomach 1B i 5R populacji HT352 nie powtarzał segregacji swojego odpowiednika przed konwersją. Ocena segregacji markerów zlokalizowanych na chromosomach 4R, 1B i 5R uzyskanych w wyniku konwersji do warunków specyficznego PCR w pozostałych populacjach mapujących wykazała, że jedynie marker 4558515c (4R) segregował w obrębie populacji HT352. Nie wykazano jednak jego istotnej korelacji z cechą. Markery 8510873c (4R), 4349378c (4R) oraz 3606113 (5R) generowały szereg trudnych do odczytania na żelach agarozowych sygnałów. Pozostałe markery generowały monomorficzne sygnały.

Nie wykazano istotnych korelacji z cechą markerów 16330732c, 10509016TG13c, 4558515c oraz 4349378c generujących pojedyncze, polimorficzne sygnały w obrębie materiałów sterylnych i płodnych dostarczonych przez Hodowców. Taki wynik może być spowodowany brakiem odpowiednich alleli w obrębie materiałów roślinnych dostarczonych przez Hodowców.

*Ze względu na opóźnienia syntezy starterów zaprojektowanych dla markerów zlokalizowanych na chromosomach 2A, 5A, 7A i 3B w populacji MS114 odpowiednie analizy zostaną wykonane w styczniu 2021r.

Wnioski

1. Zastosowanie populacji RIL charakteryzujących się kumulacją aktów rekombinacji w połączeniu z wysoce wydajną technologią DArTseq umożliwiło opracowanie map genetycznych pszenżyta o wysokiej rozdzielczości wskazanej do identyfikacji loci odpowiedzialnych

za utrzymanie sterylności pyłku.

2. Duża liczba QTLi, które wyjaśniają od 4.2% do 19.2% zmienność cechy fenotypowej identyfikowanych w populacjach MS114 i HT352, wskazuje na silne rozdrobnienie cechy, co miało negatywny wpływ na dobór markerów do jej selekcji. Dodatkowym utrudnieniem była lokalizacja loci na różnych chromosomach w obrębie badanych populacji mapujących.
3. Najsilniejsze loci odpowiedzialne za utrzymanie sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt*, których obecność została potwierdzona wynikami mapowania asocjacyjnego występowały w dystalnej części długiego ramienia chromosomu 4R populacji MS112 oraz na chromosomie 4A populacji DB1xRB1.
4. Lokalizacja QTL na 4R u pszenżyta w obszarze dystalnym oraz podobna lokalizacja QTL na 4R u żyta, a także podobieństwo adnotacji sekwencji markerów znajdujących się w obszarze tych dwóch QTLi (locus *Rfm1* jęczmienia, czynnika terminacji transkrypcji MTERF) sugeruje, że w przypadku obu gatunków za pożądaną cechę może odpowiadać ten sam locus. Otwartym pozostaje pytanie czemu u żyta odpowiada on za przywracanie płodności pyłku a u pszenżyta za jego sterylność.
5. Markery 4558515, 8510873, 4349378 po ich uprzedniej konwersji do warunków specyficznego PCR mogą być stosowane do selekcji QTL zlokalizowanego na chromosomie 4R w obrębie linii populacji MS112.
6. Brak powtarzalności wzoru segregacji po konwersji w odniesieniu do odpowiedników silicoDArT lub SNP obserwowany w przypadku części markerów populacji MS112 oraz markerów populacji HT352 może wynikać z heksaploidalności genomu gatunku i wiązać się z występowaniem podobnych sekwencji w obrębie różnych genomów pszenżyta. Inną przyczyną może być problem z wytypowaniem obszarów polimorficznych pomiędzy sterylnymi i płodnymi genotypami.
7. Wśród materiałów pszenżyta dostarczonych przez Hodowców prawdopodobnie nie występują allele warunkujące fenotypy płodne i sterylne, do których selekcji opracowano markery PCR. Jest to zgodne z oczekiwaniami, gdyż cecha jest warunkowana wieloma QTLami o relatywnie słabych efektach.
8. Mimo, że w obrębie zróżnicowanej puli genotypów (różnych od linii populacji mapujących) nie stwierdzono silnych korelacji pomiędzy markerami cechy dla QTL na 4R a zdolnością

do utrzymania sterylności pyłku należy sądzić, że opracowane markery specyficzne względem tego QTL mogą być użyteczne w przypadku wzbogacania puli genowej gatunku o pożądany allel poprzez selekcje wsteczną.

Osiągnięcia projektu

1. Opracowano mapy genetyczne żyta, które mogą zostać wykorzystane do mapowania licznych cech użytkowych.
2. Zidentyfikowano liczne QTL utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt* lokalizujące się na różnych chromosomach gatunku. Występowanie poszczególnych QTLi było różne w obrębie badanych populacji mapujących. Najsilniejsze QTL lokalizowały się na chromosomach 4R (populacja MS112), 3B i 5A (populacja MS114), 5B i 5R (populacja HT352), 4A (populacja DB1xRB1) oraz 1B i 6A (populacja RB2xDB2). Mapowanie asocjacyjne potwierdziło obecność silnego QTLa cechy na chromosomach 4R w populacji MS112 oraz 4A w populacji DB1xRB1.
3. Konwersja markerów silicoDArT i SNP do warunków specyficznego PCR umożliwiła opracowanie trzech markerów (4558515c, 8510873c, 4349378c) segregujących identycznie jak ich niekonwertowane odpowiedniki w obrębie populacji MS112. Markery te są sprzężone z QTL na chromosomie 4R. Markery względem QTL na 4R mogą być wykorzystane w selekcji wstecznej.
4. W przypadku szerszej puli genowej konwertowane markery nie wykazywały korelacji z cechą. Może to sugerować, że zidentyfikowany w obrębie populacji MS112 allel występuje rzadko w puli genowej materiałów hodowlanych gatunku występujących w Polsce. Biorąc pod uwagę QTL na 4R, jego identyfikacja może mieć istotne znaczenie dla wyprowadzenia nowych form heterozyjnych gatunku.
5. Na podstawie homologii sekwencji markerów zlokalizowanych w obrębie QTL na 4R w populacji MS112 zasugerowano, że może on być tożsamy z QTL przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

Wasiaak M, Niedziela A, Woś H, Pojmaj M, Bednarek PT (2020) Genetic mapping of male sterility, pollen fertility QTLs in triticale with sterilizing *Triticum timopheevii* cytoplasm. *Journal of Applied Genetics* DOI: 10.1007/s13353-020-00595-z IF = 2.027 (2019); MEiN = 70 pkt

Doniesienia konferencyjne

Wasiaak, M., Niedziela, A., Bednarek, P.T. „Molecular mapping of the sterility QTLs regions for *Timopheevii* cytoplasmic male sterility in triticale.” *Global Conference on Plant Science and Microbial Ecology*, 17–19.06.2019, Walencja, Hiszpania. Materiały konferencyjne: str. 13.

Szeląg, M., Niedziela, A., Bednarek, P.T., Woś, H., Woś, J. „Genetic mapping and QTLs analysis of pollen sterility in triticale with *Triticum timopheevii* sterilizing cytoplasm.” *International Association for Plant Biotechnology Congress*, 19–24.08.2018, Dublin, Irlandia, *In Vitro Cellular and Developmental Biology* 54/1: S90/P89.

Szeląg, M., Grzesik, A., Woś, H., Mańkowski, D., Bednarek, P.T. „Genetic map of triticale based on DArTseq and silicoDArT markers and RIL6 mapping population.” *8th International Triticeae Symposium 2017*, 12.06.2017–16.06.2017, Wernigerode, Niemcy. Materiały konferencyjne: str. 144.

Szeląg, M., Grzesik, A., Siekiera, A., Woś, H., Bednarek, P.T. „Putative pollen sterility QTLs in triticale with CMS *Tt*.” *8th International Triticeae Symposium 2017*, 12.06.2017–16.06.2017, Wernigerode, Niemcy. Materiały konferencyjne: str. 146

Szeląg, M., Niedziela, A., Pojmaj, M., Bednarek, P.T. „Markers towards pollen sterility genes in triticale with CMS *Tt*.” *9th International Triticale Symposium*, 23–27.05.2016, Szeged, Węgry, Materiały konferencyjne: str. 28.

Jarska, W., Niedziela, A., Ogórek, K., Woś, H., Bednarek, P.T. „Mapowanie ilościowe genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt*.” *XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin.”*, 02–06.02.2015, Zakopane, Materiały konferencyjne: str. 182–183.

Bednarek, P.T., Niedziela, A., Jarska, W., Woś, H., Pojmaj, M. „Genetic mapping of triticale with SNP markers.” *International Conference EUCARPIA Cereals Section, “Cereals for Food, Feed and Fuel-Challenge for Global Improvement.”*, 29.06–04.07.2014 Wernigerode, Niemcy, Materiały konferencyjne: str. 307.

Badania nad optymalizacją metod indukowanego podwajania garnituru chromosomowego w haploidalnych regenerantach pszenżyta

Optimization of induced chromosome doubling methods in haploid regenerants of triticale

Sylwia Oleszczuk✉, Janusz Zimny, Katarzyna Makowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: s.oleszczuk@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: androgeneza, antymitotyczne związki, kultury pylników, podwojone haploidy, pszenżyto

Zaburzenie funkcjonowania mikrotubul, odpowiedzialnych m.in. za prawidłowe funkcjonowanie wrzeciona podziałowego, wywołane stosowaniem odpowiednich warunków i/lub związków biologicznych czynnych (antymitotyków), wydaje się być najistotniejszym etapem wymuszonego procesu prowadzącego do otrzymania na drodze androgenyzy płodnych regenerantów. Wiele związków charakteryzuje się antymitotycznymi właściwościami, głównie poprzez swój wpływ na zmianę dynamiki polimeryzacji mikrotubul, a tym samym zatrzymanie podziałów komórki (Dhooghe i in., 2011; Yemets, Blume, 2008). Szereg prac wskazuje, że proces indukowanej diploidyzy zależy zarówno od genotypu, typu eksplantatu jak i rodzaju inhibitora mitozy, czasu jego ekspozycji oraz stężenia (Dhooghe i in., 2011; Khosravi i in., 2008). U niektórych warunków zastosowanie dinitroanilin, fosforotioamidów oraz benzamidów używanych w małych dawkach stało się alternatywą w podwajaniu garnituru chromosomowego dla powszechnie stosowanej kolchicyny (Allum i in., 2007; Hansen, Aandersen 1998). Użycie herbicydów jako inhibitorów mitozy może przyczynić się do ograniczenia stosowania toksycznej kolchicyny oraz zwiększenia efektywności systemu wytwarzania linii DH u pszenżyta.

Cel

Temat zakładał zbadanie wpływu związków antymitotycznych na efektywność podwajania genomu i wytworzenie płodnych regenerantów heksaploidalnego pszenżyta na drodze androgenyzy.

Początkowym celem prac było uzyskanie materiału donorowego poprzez dobór wyselekcjonowanych do krzyżowania komponentów o pożądanym parametrach użytkowych, a następnie wykorzystanie otrzymanych mieszańców do założenia kultur pylnikowych (proces androgenyzy). Kolejny etap badań obejmował ocenę wpływu inhibitorów mitozy, ich stężenia, czasu ekspozycji na przeżywalność *in vitro* eksplantatów (androgenczne rośliny, zarodki zygotyczne) oraz wytypowanie wariantów o najmniej szkodliwym działaniu na tkanki roślinne, a w końcowym efekcie powodujących najwyższą efektywność indukowanej diploidyzy.

Materiały i Metody

Materiał doświadczalny uzyskany w wyniku krzyżowań genotypów o różnym pochodzeniu pochodził z programu hodowli pszenżyta ozimego realizowanego w firmach Danko i Strzelce.

Uzyskane mieszańce nr. 1–6 (tab.1) przeznaczone na androgenezę (kultury pylników) po jarowizacji uprawiano w fitotronie. Pędy z kłosami zawierającymi mikrospory w stadium wakuolizacji umieszczano w wodzie w 4°C/3 tyg. celem zmiany drogi rozwojowej z gametofitowej na sporofitową, po czym preparowano z nich pylniki. Procedurę indukcji androgenyzy i regeneracji przeprowadzono wg funkcjonującego w ZBiCR protokołu dla pszenżyta (Oleszczuk i in. 2004; Warzecha i in. 2005). Efektywność regeneracji oceniono jako liczbę roślin otrzymanych w przeliczeniu na reagujący kłos.

Dla 4 mieszańców (nr.1–4) procedurę podwajania genomu przeprowadzono w oparciu o uzyskane z androgenicznych struktur roślinki,



badając efekt wpływu na nie związków z grupy dinitroanilin (trifluralina- T) oraz fosforotioamidów (aminoprofos-metyl –APM) dodawanych do pożywki regeneracyjnej w stężeniach 5 μ M i 10 μ M przy 6 czasach ekspozycji (2–7 dni). Następnie eksplantaty umieszczano na standardowej pożywce regeneracyjnej. Kontrolę stanowiły regeneranty na pożywce bez związków antymitotycznych.

Poziom ploidalności osobników po traktowaniu inhibitorami mitozy oraz w kontroli określono przy pomocy cytometru przepływowego. Ostateczny efekt działania badanych herbicydów dotyczył oceny liczby roślin zdolnych do zawiązywania nasion, co zestawiono z wynikami cytometrycznymi.

W jednym z etapów doświadczenia zygocytne zarodki (faza dojrzałości mleczno-woskowej) mieszańców nr. 5 i 6 z tab.1, na pożywkach regeneracyjnych, wykorzystano do badań nad przyżywalnością (oceniającą po 2 tyg.) na skutek działania 7 inhibitorów mitozy (zoxamidu-ZOX isotopuron – IST, benfluraliu-BEN, isopropalinu-ISP, ethalfluralinu-ETH, T i APM), celem ustalenia odpowiedniej ich dawki i czasu ekspozycji (od 1 godz. do 7 dni – 50 kombinacji). Po czasie inkubacji w obecności antymitotyków eksplantaty ponownie przeniesiono na standardową pożywkę.

Wyniki i Dyskusja

Wytworzenie nowej puli genetycznej roślin mieszańcowych i regeneracja drogą androgenezy

Efektom krzyżowania było otrzymanie 6 mieszańców pszenżyta ozimego. W pracach użyto częściowo formy o podłożu homozygotycznym (wytłuszczone w tab.1), wyprowadzone dzięki zastosowaniu w procesie hodowli techniki DH. Uzyskanie takich krzyżówek umożliwiło ocenę, na ile udział jednej bądź dwóch form rodzicielskich, mających w swoim pochodzeniu podłoże homozygotyczne, przyczynia się do zwiększenia efektywności procesu androgenezy oraz wytworzenia roślin z samoistnie podwojonym genomem. Kilka częściowo niepłodnych osobników mieszańcowych, charakteryzujących się nietypową morfologią, w analizach cytologicznych wykazało niekompletną koniugację chromosomów i powstawanie univalentów.

Efektom androgenezy 6 mieszańców było otrzymanie prawie 7 tys. zielonych roślin (tab.1). Liczba zielonych roślin/kłosa wahała się od 2,1 do 24,5. Potomstwo mieszańca Bo 2544, uzyskanego w oparciu o system DH, odznaczało się najwyższą wartością wskaźnika regeneracji – maksymalna liczba

zielonych roślin z pynkinów pochodzących z jednego kłosa wynosiła 221. Również dla tego genotypu uzyskano najniższą częstość powstawania albinosów (37%).

Pomimo, że u pszenżyta, łatwiej indukuje się proces androgenezy, niż u pszenicy i żyta, z których powstał, to jest ono gatunkiem wykazującym niestabilność meiotyczną pomimo wielu lat selekcji, skutkującą wytworzeniem gamet ze składem chromosomów odbiegającym od standardowego (zjawisko obserwowane w naturalnym cyklu rozmnażania) (Lukaszewski i Gustafson, 1987). Niestabilność na poziomie cytogenetycznym jest znacznie wyższa w mieszańcach F1, niż w ustabilizowanych liniach rodzicielskich (Lelley, 2006).

Zasadniczym warunkiem zastosowania systemu DH w badaniach naukowych i pracach hodowlanych jest uzyskanie odpowiednio dużej populacji płodnych regenerantów. W warunkach polskiej hodowli populacja wystarczająca do wyselekcjonowania roślin o ściśle pożądanym cechach obejmuje od 50 do 200 osobników. Zakres ten może się wahać w zależności od kierunku prowadzonych badań, liczby segregujących cech jak również nakładów finansowych.

Analiza wpływu inhibitorów mitozy na przeżywalność, morfologię, ploidalność oraz zdolność do zawiązywania ziarniaków androgenicznych regenerantów

Trifluralina (T) hamowała wzrost i rozwój eksplantatów, w większym stopniu niż aminoprofos-metyl (APM) stosowany w tych samych dawkach, niezależnie od czasu działania. W obrębie 2–3 oraz 4–5 dniowego czasu ekspozycji przy obydwu stężeniach antymitotyków nie było różnicy w przeżywalności. Przy stężeniu T rzędu 10 μ M przy 7-dniowym traktowaniu odsetek śmiertelności roślin był najwyższy (do 100%). Przeżywalność oraz witalność eksplantatów były zależne od etapu rozwojowego, stężenia i czasu stosowania antymitotyków. Intensywność reakcji na badany związek zależna była od stadium rośliny – negatywny wpływ (żółknięcie tkanek, spowolnienie wzrostu i anomalie morfologiczne) zauważalny były szybciej na obiektach wielkości 0,5 – 1cm w porównaniu do 1–2 cm. Charakterystycznym efektem działania antymitotyków był zniekształcony pokrój blaszek liściowych, które wraz z pochwą liściową przyjmowały formę rozet. Część roślin ulegała witrifikacji. Ok. 5% regenerantów, które przeżyły traktowanie herbicydami miało problem z wytworzeniem systemu korzeniowego. Część eksplantatów wykazywała osobniczą

reakcję (liniowo specyficzną) na zastosowany związek (w obrębie regenerantów z jednego kłosa część roślin przeżywała). Regeneranty ze spontanicznie podwojoną liczbą chromosomów w próbach kontrolnych stanowiły od 28,6 do 63,8% badanych linii. W zależności od genotypu, udział DH uzyskanych w wyniku indukowanej diploidyzacji *in vitro* wahał się od 31,5% do 64%. Nie zaobserwowano wpływu badanych związków na zjawisko aneuploidalności oraz powstawania roślin o wyższej ploidalności. Występowanie aneuploidów, stanowiących ponad 5% wszystkich roślin wykazano zarówno u form tri- jak i heksaploidalnych. Ponadto otrzymano 1,2% hiperploidów oraz 0,8% osobników mikso-ploidalnych. Efektywność indukowanego podwojenia nie była wyraźnie zależna od badanych stężeń antymitotyków oraz nie wzrastała z wydłużeniem czasu inkubacji w ich obecności. Mieszaniec Bo 2544 charakteryzował się najwyższym wskaźnikiem diploidyzacji – zarówno w probie kontrolnej jak i po traktowaniu herbicydami antymitotycznymi ponad 60% regenerantów wykazało podwojenie genomu. Spośród 1331 płodnych linii czterech mieszańców średnio 18% zawiązało ziarniaki w zredukowanej liczbie.

Nie ustalono stężenia IST, przy którym dochodziłoby do zamierania zarodków zygocytowych (przy stężeniach powyżej 1,9 mM następowało wytrącanie się związku w pożywce). W przypadku ZOX i ISP przy stężeniach do 50 μM nie obserwowano jakiegokolwiek ujemnego wpływu – z zarodków rozwijały się normalne rośliny, natomiast przy użyciu wyższych dawek antymitotyki ulegały wytrącaniu. Charakterystycznym objawem działania ETH, BEN, TRI i APM przy stężeniach hamujących i ograniczających kiełkowanie było zniekształcenie pokroju morfologicznego – tworzenie się buławkowatych struktur, często zdolnych do dalszego rozwoju w rośliny po kilku dniach kultury na pożywkach standardowych. Po 2 tyg od ekspozycji eksplantatów na działanie BEN odnotowano intensywną ryzogenezę. Traktowanie zarodków przez 3 oraz 7 dni ETH, BEN, TRI i APM w stężeniach powyżej 5 μM było przyczyną najwyższego odsetka śmiertelności (do 100%). Kiełkowanie w obecności ETH, BEN i TRI miało miejsce przy znacznym zredukowaniu stężeń (do 2 i 5 μM) i czasu ekspozycji (6–12h). W przypadku APM skrócenie czasu działania do 6–8h umożliwiło kiełkowanie eksplantatów przy stężeniach 10 krotnie wyższych w stosunku do pozostałych związków z grupy dinitroanilin. Przeżywalność i witalność eksplantatów poddawanych działaniu inhibitorów mitozy były zależne od ich stadium rozwojowego

– kiełkujące zarodki miały większy potencjał regeneracyjny w porównaniu z zarodkami świeżo wyłożonymi.

Powodzenie wymuszonej duplikacji genomu warunkowane jest wieloma czynnikami, spośród których genotyp, rodzaj eksplantatu i dobór odpowiedniego związku zaburzającego procesy podziałowe odgrywają kluczową rolę. Ze względu na tkankową toksyczność inhibitorów mitotycznych istotną kwestią jest ustalenie ich właściwych stężeń oraz czasu ekspozycji. Z ekonomicznego punktu widzenia, korzystne wydaje się być podwojenie genomu na wczesnych etapach kultury, chociaż eksplantaty w kulturach *in vitro* odznaczają się większą wrażliwością niż rośliny krzewiące się.

Oprócz DH i H w wyniku indukowanej diploidyzacji mogą powstawać osobniki aneuploidalne, mikso-ploidalne oraz poliploidalne (Lukjanjuk i Ignatova 1986; Ryóppy, 1997). Nieskuteczność poliploidyzacji może być powodowana występowaniem dużej liczby aneuploidów wśród roślin haploidalnych, niezidentyfikowanych w badaniach cytometrycznych (Oleszczuk i in., 2011). Występowanie roślin nietypowych nie musi być bezpośrednio związane z zastosowaniem antymitotyków ze względu na skłonność pszenżyta do zaburzeń procesu mejozy, wpływu warunków *in vitro* na powstawanie nowej zmienności (somaklonalnej/gametoklonalnej) (Charmet i in. 1986; Machczyńska i in., 2014). Czynniki te mogą działać kompleksowo, stąd częstość i rodzaj zaburzeń mogą być wynikiem ich interakcji. Pomimo, że zdolność do zawiązywania ziarniaków wiąże się z duplikacją haploidalnego genomu, to nie zawsze płodność regenerantów można było powiązać z wynikami cytometrycznymi (Oleszczuk i in., 2011). Uzyskanie wysokiego odsetka linii zawiązujących nasiona może być spowodowane zaburzeniami procesu mejozy prowadzącymi do tworzenia mikrospor o somatycznej liczbie chromosomów (Oleszczuk i Lukaszewski, 2014).

Wnioski

1. Stabilność mejozy mieszańców F1 powinna być brana pod uwagę przy planowaniu zakresu produkcji linii DH.
2. Stężenie inhibitorów mitozy dodawanych do pożywki regeneracyjnej powoduje opóźnienie wzrostu i wystąpienie anomalii morfologicznych szczególnie u najmłodszych eksplantatów
3. Trifluralina ma bardziej toksyczny wpływ na wzrost i rozwój eksplantatów w porównaniu do aminoprofos-metylu stosowanego w tej

- samej dawce.
4. Powstanie aneuploidów i roślin o wyższym poziomie ploidalności nie było zależne od zastosowanego związku antymitotycznego
 5. Nie wykazano zależności pomiędzy efektywnością zawiązywania ziarniaków, a zastosowanym rodzajem antymitotyku.
 6. Użycie obu komponentów rodzicielskich o podłożu homozygotycznym do wytworzenia form mieszańcowych wpływa na zwiększenie efektywności androgenyzy i regeneracji roślin ze spontanicznie podwojonym genomem

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- III Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych— od rośliny modelowej do nowej odmiany”, IGR PAN Poznań, 5–7 listopada 2014- poster
- 3rd Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, 2–4 listopada 2015, Berlin- poster

Literatura

- Allum J.F., Bringloe D.H., Roberts A., (2007), Chromosome doubling in a *Rosa rugosa* Thunb. hybrid by exposure of *in vitro* nodes to oryzalin: the effects of node length, oryzalin concentration and exposure time. *Plant Cell Rep.* 26, 1977–1984.
- Charmet G.C., Bernard S., Bernard M. (1986). Origin of aneuploid plants obtained by anther culture in triticale. *Can. J. Genet. Cytol.* 28: 444–452.
- Dhooghe E., Van Laere K., Eeckhaut T., Leus L., Van Huylenbroeck J., (2011), Mitotic chromosome doubling of plant tissues *in vitro*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 104:359–373.
- Hansen N.J.P., Aandersen S.B., (1998). Efficient production of doubled haploid wheat plants by *in vitro* treatment of microspores with trifluralin or APM. *Plant Breeding.* 117: 401–405
- Khosravi P., Kermani M.J., Nematzadeh G.J., Bihanta M.R.,

- Yokoya K., (2008). Role of mitotic inhibitors and genotype on chromosome doubling of *Rosa*. *Euphytica.* 160: 267–275.
- Lelley T. (2006). Triticale: a low input cereal with untapped potential. In: Singh R.J., Jauhar P.R. (eds) *Genetic Resources, chromosome engineering, and crop improvement.* Taylor and Francis, Boca Raton, pp 395–430.
- Lukaszewski A.J., Gustafson J.P. (1987). Cytogenetics of triticale. In: Janick J (ed) *Plant Breeding Reviews*, vol 5. Wiley, New York, pp 41–93
- Lukjanjuk S., Ignatova S., (1986). Triticale: production of haploid and homozygous plants. *Biotechnol Agric For.* 2: 530–543.
- Machczyńska J., Orłowska R., Zimny J., Bednarek P.T. (2014). Extended metAFLP approach in studies of the tissue culture induced variation (TCIV) in case of triticale. *Mol Breed.* doi: 10.1007/s11032-014-0079-2
- Oleszczuk S., Rabiza-Swider J., Zimny J., Lukaszewski A.J. (2011). Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (\times Triticosecale Wittmack). *Plant Cell Rep.* 30 (4): 575–586. doi: 10.1007/s00299-010-0971
- Oleszczuk S., Lukaszewski A.J. (2014). The origin of unusual chromosome constitutions among newly formed allopolyploids. *Am. J. Bot.* 101 (2): 318–26.
- Oleszczuk S., Sowa S. Zimny J., (2004). Direct embryogenesis and green plants regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (\times Triticosecale Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep.* 22: 885–893.
- Ryóppy P.H. (1997) Haploidy in triticale. In: Jain SM, Sopyry SK, Veilleux RE (eds) *In vitro haploid production in higher plants*, vol 4. Kluwer, Dordrecht, pp 117–131
- Warzecha, R., Sowa S., Salak-Warzecha K., Oleszczuk S., Śliwińska E., Zimny J. (2005). Doubled haploids in production of male sterility maintaining triticale (*Triticosecale* Wittmack) lines. *Acta Physiol. Plant.* 27: 245–250.
- Yemets A.I., Blume Y.B., (2008). Progress in plant polyploidization based on antimicrotubular drug, *The Open Horticulture Journal*, 1, 15–20

Tabela 1

Efektywność regeneracji roślin drogą androgenyzy 6 mieszańców pszenżyta ozimego.

Nr	Symbol mieszańca	Pochodzenie	Efektywność regeneracji/kłos (zielone/kłos)	Liczba roślin		
				zielone	albinosy	suma
1	Bo 2544	Borowik x Twingo	66,4 (24,5)	3054	1790	4844
2	Mo 35733	MAH 3881–1/3 x Fredro	22,7 (9)	441	674	1115
3	DL 159/12	Palermo x CHD 03110/04	41,8 (19,6)	1314	1488	2802
4	DL 229/12	DC 04176–44 x Silverado	31 (11,4)	695	1200	1895
5	Bo 2455	Borowik x BOH1512	30,3 (14,4)	1298	1432	2730
6	DL 184/13	DL 643/09 x Rotondo	5,2 (2,1)	193	281	474

Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone

Development of new genetic sources of triticale by wide crossing

Justyna Leśniowska-Nowak✉, Magdalena Sozoniuk, Sylwia Okoń, Michał Nowak, Sylwia Sowa, Wojciech Marecki, Aneta Koroluk, Magdalena Kawęcka

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
✉ e-mail: justyna.lesniowska@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: pszenżyto, krzyżowania oddalone, analiza stresów, stres oksydacyjny, plonowanie, qPCR, mapowanie

Cele projektu

1. Otrzymywanie pierwotnych form pszenżyta w wyniku krzyżowania pszenicy zwyczajnej i żyta uprawnego w celu wstępnej analizy zmian zachodzących w strukturze genomów wchodzących w skład mieszańca – OSIĄGNIĘTY
2. Identyfikacja nowych źródeł odporności na czynniki biotyczne i abiotyczne w dzikich gatunkach roślin i ich introdukcja do pszenżyta – OSIĄGNIĘTY
3. Monitorowanie obecności nowych genów w kolejnych pokoleniach mieszańców na podstawie testów żywicieli-patogen, analiz molekularnych oraz charakterystyki fenotypowej w warunkach doświadczeń polowych – OSIĄGNIĘTY
4. Opracowanie techniki krzyżowania pszenżyta z mrozoodpornymi genotypami z rodzaju *Leymus* – OSIĄGNIĘTY CZĘŚCIOWO (wniosek – rośliny nie rosły w warunkach polowych, konieczne wsparcie warunkami fitotronu)
5. Zwiększenie wydajności uzyskiwania mieszańców oddalonych pszenżyta poprzez zastosowanie techniki ratowania zarodków w kulturach *in vitro* – OSIĄGNIĘTY
6. Analiza stabilności genomu mieszańców uzyskiwanych w wyniku krzyżowań oddalonych z wykorzystaniem metod molekularnych – OSIĄGNIĘTY

Materiał i Metody

Materiał do badań stanowiły rośliny należące

do rodzajów: *Triticum*, *Triticale*, *Secale*, *Aegilops*, *Agropyron*, *Agrotriticum*, *Leymus* oraz rośliny mieszańcowe pochodzące z krzyżowań tych gatunków.

1. Analiza stresów biotycznych (testy żywicieli – patogen – ocena porażenia z wykorzystaniem izolatów *Puccinia triticiniae*)
2. Embryo rescue – *in vitro* (wsparcie krzyżowań oddalonych w celu zwiększenia wydajności uzyskiwanych mieszańców)
3. Analiza stresów abiotycznych – *in vitro* (hodowla siewek na pożywce MS z dodatkiem viologenu metylu wywołującego stres oksydacyjny)
4. Izolacja RNA z wykorzystaniem zestawów kolumnkowych lub odczynnika TRIzol
5. Izolacja DNA (zestawy kolumnkowe różnych firm)
6. Analizy molekularne – PCR, qPCR (analiza ekspresji genów związanych z biosyntezą giberelin oraz genów związanych z odpowiedzią na stres na poziomie transkryptów z wykorzystaniem barwnika SYBR Green oraz sond molekularnych)
7. Genotypowanie (Diversity Arrays Technology Pty Ltd., Canberra, Australia)
8. Analiza bioinformatyczna sekwencji markerów sprzężonych i asocjowanych z cechą (The National Centre for Biotechnology Information (NCBI), algorytm BLASTn)
9. Mapowanie wykonano z wykorzystaniem oprogramowania TASSEL
10. Analizy statystyczne komponentów plonu mieszańców i roślin rodzicielskich – Statistica



Wyniki

Fenotypowanie dzikich genotypów z rodzaju *Aegilops* pod kątem odporności na rdzę brunatną pszenżyta

Spośród 74 analizowanych genotypów zidentyfikowano 20 diploidalnych oraz 20 tetraploidalnych form odpornych na rdzę brunatną, co stanowi po 57% w każdej powyższej grupie. Spośród genotypów heksaploidalnych zidentyfikowano 2 genotypy odporne należące do gatunków *Ae. neglecta* i *Ae. crassa*.

W obrębie 100 analizowanych w kolejnym roku heksaploidalnych genotypów z rodzaju *Aegilops* zidentyfikowano 28 form odpornych na rdzę brunatną. Wyselekcjonowane genotypy mogą zostać wykorzystane do krzyżowań oddalonych z roślinami pszenżyta lub pszenicy w celu introdukcji genów odporności na *Puccinia triticinia* do roślin zbożowych.

Analiza porażenia 15 badanych odmian pszenicy na rdzę brunatną wykazała, iż 7 z nich charakteryzowało się odpornością na tego patogena.

Uzyskiwanie mieszańców poprzez krzyżowanie (kastrowanie i zapylanie) roślin

Wykazano, że odmiany i linie hodowlane pszenicy i pszenżyta krzyżują się w różnym stopniu (zależnym od genotypu) z formami dzikimi z rodzaju *Aegilops*. Efektywność była wyższa dla krzyżowań z pszenicą.

Zidentyfikowano odmiany pszenicy charakteryzujące się zmienną zdolnością kombinacyjną w zależności od kierunku krzyżowania przy uzyskiwaniu pszenżyta pierwotnego.

Wykazano, że zdolność kombinacyjna dla krzyżowań pszenica x żyto wahała się od 0 do 37,5% i była zmienna w zależności od roku badań i genotypu.

Zdolność kombinacyjna kocińców w krzyżowaniach z pszenicą zawierała się w przedziale od 0% do 62,5%. Średnio wynosiła ona 21%. W przypadku krzyżowania z pszenżytem zawierała się w przedziale od 0% do 75% w zależności od formy. Średnio było to 31,13%. Zdolność kombinacyjna pszenicy wynosiła maksymalnie 50% a pszenżyta maksymalnie 70%. Średnia zdolność kombinacyjna dla tych gatunków wynosiła odpowiednio 28,02% (pszenica) i 29,44% (pszenżyto).

Gatunki z rodzaju *Aegilops*, ze względu na możliwość krzyżowania zarówno z pszenicą, jak i z pszenżytem, stanowią cenne źródło genetyczne karłowatości. Zdolność kombinacyjna w kolejnym roku badań w tych krzyżowaniach wahała się dla pszenżyta od 0% do 21,6%, natomiast dla

kozińców od 0% do 37,5%.

Zdolność kombinacyjna w krzyżowaniach wstecznych mieszańców oddalonych z pszenżytem wahała się od 0% do 20% dla mieszańców oddalonych. Zdolność kombinacyjna natomiast przy uzyskiwaniu pokolenia BC₂ wahała się od 0% do 64%.

Ocena zmienności cech w mieszańcach

Stwierdzono, że płodność kłosów mieszańców wstecznych przy samozapyleniu jest różna i zależy od kombinacji krzyżówkowej.

Zmiana genetycznego podłoża reakcji na fotoperiod nie wpływała niekorzystnie na elementy plonowania roślin mieszańcowych.

Wprowadzenie do badanych mieszańcowych form pszenżyta nowego genu karłowatości zidentyfikowanego w genomie rodu CZR 876/01 skutkuje skróceniem pędu głównego o ok. 16%, wynikającym głównie z redukcji długości I oraz III międzywęźla.

Krzyżowanie roślin pszenżyta z pszenicą powoduje obniżenie wysokości roślin mieszańcowych oraz obniżenie MTZ w roślinach pokolenia F₂ jak i BC₁.

Krzyżowanie wsteczne mieszańców oddalonych [(*Ae. column.* x Poszuk) x Top] z odmianą Tomko spowodowało zwiększenie wysokości oraz MTZ roślin mieszańcowych pokoleń BC₁ jak i BC₂ w stosunku do roślin F₁.

Formy mieszańcowe żyta o kombinacji krzyżówkowej 541x84A/1 wykazywały istotnie wyższą masę ziarniaków z kłosa w porównaniu do form rodzicielskich.

Formy mieszańcowe pokoleń F₁, BC₁, BC₂ uzyskane z krzyżowania Ae.87 z odmianą Lombardo wykazywały istotnie wyższą masę ziarniaków z kłosa w porównaniu do form rodzicielskich. Krzyżowanie nie powodowało redukcji ani wzrostu MTZ w pokoleniu F₂. Mieszańce charakteryzowały się natomiast istotnie wyższą liczbą ziarników z kłosa głównego.

Izolacja uzyskanych zarodków i prowadzenie kultur *in vitro*

Optymalnym terminem pobierania zarodków pszenżyta przeznaczonych do procedury embrio rescue jest czas pomiędzy 18 a 21 dniem po zapyleciu, natomiast w przypadku niedojrzałych ziarniaków jest to 21 dni po zapyleciu.

Sterylicacja zarodków z wykorzystaniem NaClO skutkuje obniżeniem ilości otrzymanych regenerantów w porównaniu do sterylizacji z wykorzystaniem etanolu, co wynika prawdopodobnie

z uszkodzenia zarodka przez czynnik sterylizujący.

Najskuteczniejszym sposobem uniknięcia zakażeń w przypadku wykładania na pożywkę niedojrzałych ziarniaków jest ich sterylizacja powierzchniowa za pomocą mieszaniny etanolu z podchlorynem sodu lub chlorkiem rtęci.

Zastosowanie opracowanej metodyki pozwoliło na uzyskanie wydajności na poziomie 40% w przypadku krzyżowań z pszenicą i 30% w przypadku krzyżowań z pszenżytem.

Analizy molekularne uzyskanych mieszańców

Analiza genów wrażliwości na fotoperiod w mieszańcach oddalonych pszenżyta wykazała obecność nowego allelu *Ppd-B1*.

Wykazano, że jednym z czynników warunkujących karłowaty fenotyp roślin pszenżyta [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* zawierających nowy gen karłowatości jest osłabienie ekspresji genów *GA20ox* oraz *GA3ox* na poziomie transkrypcji.

W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano 11 043 markery SilicoDArT specyficzne dla roślin wysokich, niskich oraz średnich. W obrębie tych markerów zidentyfikowano 4 624 markery SNP. Spośród tych markerów jedynie 5 były to markery specyficzne dla roślin niskich i zanikające wraz ze wzrostem długości pędu. Analiza bioinformatyczna mieszańców pochodzących z w/w kombinacji za pomocą platformy Phytozome 12 wykazała, że wszystkie te markery silicoDArT są specyficzne dla telomerów krótkich ramion dwóch chromosomów pszenicy 6A i 1B.

Markery pogrupowano w dwa regiony chromosomalne przypisane do chromosomu 5R. Pierwsza z nich zawierała się w przedziale od 38,45 cM do 24,62 cM, pokrywając 14,29 cM z najbardziej związanym znacznikiem przy 32,811 cM. Druga grupa składała się z mniej powiązanych markerów w zakresie od 56,984 do 59,501 cM. Pierwsza grupa składała się z 31 asocjowanych markerów i 70 markerów będących markerami redundantnymi na podstawie opublikowanych materiałów uzupełniających (Tyrka i wsp. 2015). Podobnie, zidentyfikowano 8 asocjowanych i 24 redundantne dla drugiego regionu. Markery pogrupowano w dwa obszary chromosomalne położone w odległości około 11 cM. Zidentyfikowany region najprawdopodobniej zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 5R.

Analiza populacji 541×84A/2 z wykorzystaniem technologii DAiT pozwoliła na uzyskanie 37 963 markerów SilicoDArT specyficznych dla roślin wczesnych, późnych oraz o pośredniej wczesności.

W obrębie tych markerów zidentyfikowano 25 269 markery SNP.

W ciągu całego okresu badań potwierdzano charakter mieszańcowy uzyskiwanych mieszańców m.in. z wykorzystaniem markerów SRAP i ISSR.

Uzyskane markery DAiT sprzężone z cechą znajdują się w obrębie sekwencji oznaczonej *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii* receptor-like protein 12 (LOC109767969), transcript variant X2.

Amplifikacja PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla sekwencji markerów sprzężonych z cechą karłowatości nie wykazała różnic w długości produktów.

Analizy molekularne otrzymanych mieszańców wykazały, iż wystąpienie stresu oksydacyjnego prowadziło do obniżenia ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (*CAT*, *APX*) u badanych form.

Wnioski

1. Gatunki z rodzaju *Aegilops* są potencjalnym źródłem nowych genów odporności na rdzę brunatną. Wybrane genotypy odporne mogą zostać wykorzystane do krzyżowania z liniami oraz odmianami pszenicy i pszenżyta w celu wprowadzenia form odpornych
2. Zidentyfikowane odporne na rdzę brunatną odmiany pszenicy mogą stanowić źródło genów odporności dla nowych genotypów pszenżyta
3. Gatunki z rodzaju *Aegilops*, ze względu na możliwość krzyżowania zarówno z pszenicą, jak i z pszenżytem, stanowią cenne źródło genetyczne możliwe do wykorzystania w pracach mających na celu poszerzenie zmienności genetycznej tych zbóż na drodze krzyżowań oddalonych.
4. Zdolność kombinacyjną badanych genotypów pszenicy, żyta i pszenżyta wykorzystanych w krzyżowaniach oddalonych cechuje duże zróżnicowanie i zależność od zastosowanej formuły krzyżowania.
5. Zdolność kombinacyjna mieszańców oddalonych w krzyżowaniach wstecznych jest globalnie wyższa niż przy uzyskiwaniu mieszańców F_1 .
6. Analizy elementów plonów mieszańców wykazały, że wartości danej cechy mogą zmieniać się w zależności od tła genetycznego analizowanych mieszańców nawet dla tego samego pokolenia roślin.
7. Warunki doświadczenia embryo rescue muszą być dobierane indywidualnie do gatunku

- i prowadzonych doświadczeń i umożliwiają zwiększenie wydajności uzyskiwanych mieszańców
8. Zidentyfikowany potencjalnie nowy allel genu *PpdB1* powinien zostać potwierdzony w kontrolowanych warunkach wzrostu i może stanowić materiał do innego projektu badawczego. Istnieje konieczność opracowania nowych sekwencyjnie specyficznych starterów dla poszczególnych alleli *Ppd* pozwalających na identyfikację genów *Ppd-A1* i ewentualnych translokacji *Ppd-D1*
 9. Przeprowadzone analizy oparte o markery SRAP potwierdziły mieszańcowy charakter genotypów uzyskanych w wyniku krzyżowań: *Aegilops columnaris* × *Demetra*, *Aegilops columaris* × *Poshuk* oraz *Aegilops peregrina* × *Alfold*.
 10. Jednym z czynników warunkujących karłowaty fenotyp roślin pszenżyta [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* zawierających nowy gen karłowatości jest osłabienie ekspresji genów GA20ox oraz GA3ox na poziomie transkrypcji.
 11. Położenie nowego genu karłowatości może wskazywać na to, że jest to inny gen od znanego i wykorzystywanego w pszenżycie genu *Dw1* ze względu na to, że zidentyfikowano go na przeciwległym ramieniu chromosomu 5R.
 12. Konwersja markerów uzyskanych technologią DArT nie umożliwiła identyfikacji genu warunkującego krótkosłomy charakter mieszańców ponieważ produkty nie różniły się długością.

Osiągnięcia projektu

1. Uzyskane kombinacje krzyżówkowe zawierające w swoim składzie chromatynę pochodzącą z dzikich gatunków kozięńców zostały przekazane do spółek hodowlanych i włączone w programy hodowlane
2. Zlokalizowano nowy gen karłowatości o potencjalnej przydatności w hodowli pszenżyta na chromosomie 5R
3. Zidentyfikowano potencjalne źródła karłowatości dla pszenżyta w życie oraz kozięńcach
4. Zidentyfikowano potencjalne źródła odporności na rdzę brunatną wśród kozięńców i wprowadzono je do pszenżyta

Wykaz publikacji

Doniesienia konferencyjne

Identyfikacja nowych źródeł odporności na rdzę brunatną pszenżyta w obrębie rodzaju *Aegilops*. Leśniowska-

Nowak J., Gogół A, Nowak M., Gruszecka D. Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Nauka dla gospodarki i środowiska” – 15–16.09.2014

Gogół A., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Gruszecka D. Ocena krzyżowalności w obrębie jarych heksaploidalnych form pszenżyta i pszenicy. Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Nauka dla gospodarki i środowiska” – 15–16.09.2014

Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Gogół A, Gruszecka D. Analysis of Ppd alleles structure in triticale hybrid plants with different flowering time. III Ogólnopolska Konferencja: „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych — od rośliny modelowej do nowej odmiany” 5–7 listopada 2014

Leśniowska-Nowak J., Gogół A., Nowak M., Gruszecka D. Characterisation of the level of crossability during wide crosses within Triticeae. III Ogólnopolska Konferencja: „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych — od rośliny modelowej do nowej odmiany” 5–7 listopada 2014

Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Gruszecka D., Gogół A., Róg S., Kowalczyk K. Analiza wpływu nowego genu karłowatości na długość i średnicę międzywęzła roślin pszenżyta. Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych. 2–6 lutego 2015 r

Gogół A., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Gruszecka D. 2015 Molekularna identyfikacja mieszańców oddalonych zbóż. Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych. 2–6 lutego 2015 r

Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Zapalska M., Dudziak K., Bednarek P. T. DArTseq analysis of F2 population obtained from crossing between dwarf and high triticale plants derived from [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* cross combination. 8th International Triticeae Symposium 12–16.06 2017. Wernigerode. Germany.

Zapalska M., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Dudziak K. 2017. Expression analysis of gibberellin biosynthesis pathway genes in triticale forms with *Dw1* gene and dwarf and high triticale plants derived from [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* cross combination. 8th International Triticeae Symposium 12–16.06 2017. Wernigerode. Germany.

Leśniowska-Nowak J, Nowak M, Zapalska M, Dudziak K, Bednarek P. T. Dwarfism association mapping in F2 triticale population derived from [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* cross combination Konferencja “Plant Biology Europe 18–21.06.2018”

Zapalska M., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Dudziak K. b. Gibberellin biosynthesis pathway – transcriptomic comparison between dwarf and high triticale plants derived from [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* cross combination and *Dw1*-containing triticale cultivars Konferencja “Plant Biology Europe 18–21.06.2018”

Leśniowska-Nowak J., Sozoniuk M., Nowak M., Bednarek

P.T., Kawecka M., Rozaniecka K. 2019. Development of DArT-based PCR markers for marker assisted selection of new dwarfing gene in triticale (x *Triticosecale* Wittmack). Konferencja "Plant Biotechnology: Green for Good V" 10–13.06.2019.

Sozoniuk M., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Kawecka M., Rozaniecka K. 2019. Plant height and yield components in backcross interspecific hybrids derivatives from

Aegilops columnaris x *Triticum aestivum* combination. Konferencja "Plant Biotechnology: Green for Good V" 10–13.06.2019.

Literatura

Tyrka M, Tyrka D, Wędzony M. (2015). Genetic map of triticales integrating microsatellite, DArT and SNP markers. *PLoS ONE* 10 (12): e0145714.

Badania nad zwiększeniem efektywności uzyskiwania haploidów w procesie androgenезы oraz optymalizacja parametrów otrzymywania podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego

Studies on increasing the efficiency of obtaining haploids in the androgenesis and optimization of parameters for production doubled haploids winter and spring triticales

Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina[✉], Aleksandra Ponitka, Hanna Pudelska, Jolanta Woźna

Instytut Genetyki Roślin PAN

Słowa kluczowe: haploid, kultury pylnikowe, podwojony haploid, triticales

Celem projektu była modyfikacja pożywek i warunków kultur *in vitro* dla opracowania efektywnego systemu uzyskiwania haploidów i spontanicznie podwojonych haploidów w procesie androgenезы oraz optymalizacja warunków podwojania liczby chromosomów haploidów pszenżyta ozimego i jarego.

Badano efektywność otrzymywania linii DH pszenżyta ozimego i jarego określając częstotliwość występowania podwojonych haploidów po zastosowaniu kolchicyny w pożywce C17 indukującej proces androgenезы oraz w pożywce regeneracyjnej 190–2, a także po podwojeniu liczby chromosomów haploidów w procesie kolchicynowania *in vivo*.

Material i Metody

Rośliny mieszańcowe pszenżyta do doświadczeń w kulturach *in vitro* wyhodowano na potrzeby projektu w placówkach: DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. Choryń oraz Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Oddział Małyszyn i Oddział Borowo.

Do indukcji androgenезы pszenżyta ozimego i jarego stosowano pożywkę C₁₇ (Wang i Chen 1983), zawierającą 0,5 mg/l KIN + 2 mg/l 2,4-D + 90 g/l maltozy. Androgeniczne struktury hodowano na pożywce regeneracyjnej: 190–2 (Zhuang i Xu, 1983). Pożywki wybrano na podstawie wcześniejszych badań autorów projektu oraz wyników z doświadczeń przeprowadzonych

w pierwszym roku realizacji projektu. Stosowano kolchicynę w stężeniu 1,0 mg/l zarówno w trakcie kultur pylnikowych w pożywce indukcyjnej, jak i w pożywce regeneracyjnej, a także w procesie podwojenia liczby chromosomów roślin haploidalnych w roztworze o stężeniu 1%. Oznaczano ploidalność androgenicznych roślin przy użyciu cytometru.

Wyniki

W ramach projektu, realizowanego w okresie 3 lat, wyłożono 83776 pylników z 40 form pszenżyta ozimego i otrzymano 69552 androgenicznych struktur (83,0/100 pylników) oraz 2762 zielonych roślin (3,3/100 pylników, 4,0/100 struktur). Wyłożono również 89941 pylników z 42 form pszenżyta jarego i otrzymano 77252 androgenicznych struktur (85,3/100 pylników) oraz 2646 zielonych roślin (2,9/100 pylników, 3,4/100 struktur) – tab. 1.

Na podstawie cytometrycznych analiz 2022 androgenicznych roślin pszenżyta ozimego (z 32 genotypów) stwierdzono 717 (35,5%) podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych, natomiast w pszenżycie jarym wśród 1283 analizowanych roślin (z 25 genotypów) roślin DH było 447 (34,8%). Zarówno w formach ozimych i jarych obserwowano około 4,5% roślin aneuploidalnych (tab. 2).

Całkowitą efektywność uzyskiwania linii DH oceniono w 2016 roku dla form ozimych i jarych, które były w doświadczeniach w 2015



roku, sumując podwojone haploidy z kultur pylnikowych z kolchicyną (wyodrębnione na podstawie badań cytometrycznych) oraz podwojone haploidy uzyskane po kolchicynowaniu haploidów. Ogółem z 1793 analizowanych roślin otrzymano 798 (44,5%) linii DH.

W dwóch latach 2015 i 2016 wyhodowano łącznie 1026 linii podwojonych haploidów (445 ozimych i 581 jarych). W 2015 roku z 14 genotypów pszenżyta ozimego na 20 badanych otrzymano 182 (24,8) linie DH, oraz 46 (7,6%) linii z 7 genotypów pszenżyta jarego na 15 przebadanych. W 2016 roku linie DH uzyskano ze wszystkich badanych form 10 ozimych i 17 jarych, tj. 263 (40,9%) roślin DH ozimych i, 535 (46,5%) jarych. Obserwacje efektywności indukcji androgenicznych struktur i regeneracji roślin w doświadczeniach przeprowadzonych w 2016 roku, dotyczących zastosowania kolchicyny w kulturach pylnikowych i w podwajaniu liczby chromosomów roślin haploidalnych wskazują, że poziom uzyskania linii DH będzie zbliżony lub wyższy do wyników z roku 2015.

Obserwacje efektywności indukcji androgenicznych struktur i regeneracji roślin w doświadczeniach przeprowadzonych w 2016 roku, dotyczących zastosowania kolchicyny w kulturach pylnikowych i w podwajaniu liczby chromosomów roślin haploidalnych wskazują, że poziom uzyskania linii DH będzie zbliżony do wyników z roku 2015. Można więc, stwierdzić, że opracowana w trakcie realizacji projektu technika otrzymywania roślin DH pszenżyta, zarówno dla form ozimych jak i jarych, została zoptymalizowana i może być stosowana w programach hodowlanych.

Wnioski z realizacji projektu

1. W kulturach pylnikowych form ozimych i jarych uzyskano podobną efektywność androgenicznych struktur (około 80%), zielonych roślin (około 3–4%) oraz linii DH (około 30–40%), co świadczy o zoptymalizowaniu metody dla pszenżyta.
2. Technika uzyskiwania haploidów i linii podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego może być z powodzeniem wdrażana w zainteresowanych spółkach hodowlanych.
3. Stwierdzono, że jedynie suma podwojonych haploidów, otrzymanych podczas stosowania kolchicyny na różnych etapach hodowli pylników (tj. w pożywce indukującej proces androgenyzy, w pożywce do regeneracji roślin oraz kolchicynowanie *in vivo* haploidalnych roślin) pozwoli wytworzyć wystarczającą ilość linii DH dla wykorzystania w programach

hodowlanych.

4. Analiza pochodzenia mieszańców wykazała, że ważny jest wybór komponentów do tworzenia mieszańców dających pozytywną odpowiedź w kulturach pylnikowych pszenżyta.

Wnioski ogólne dotyczące stosowania kolchicyny

1. Bez kolchicynowania = najtaniej, ale mniej roślin DH.
2. Kolchicyna dodawana do pożywki indukującej androgenezę = taniej, bo zużywa się mniej kolchicyny, ale większy jest nakład pracy przy dwukrotnym przekładaniu pylników. Roślin DH więcej o 20%.
3. Kolchicyna dodawana do pożywki regeneracyjnej = wynik zbliżony do kontroli (bez kolchicyny w pożywkach).
4. Kolchicynowanie haploidów *in vivo* = najdrożej, bo należy włączyć badania cytometryczne, a kolchicynę używa się w większym stężeniu. Poza tym około 30% roślin po kolchicynie nie przeżywa, szczególnie u form jarych.
5. Jedynie suma podwojonych haploidów otrzymanych podczas stosowania kolchicyny w kulturach pylnikowych (tj. w pożywce indukującej proces androgenyzy) oraz kolchicynowanie *in vivo* haploidalnych roślin stwarza możliwość otrzymania takiej ilości linii DH, która może być wykorzystywana w programach hodowlanych = około 60–70% linii DH form ozimych i około 40–50% jarych

Osiągnięcia projektu

Uzyskanie 3 odmian pszenżyta jarego: SOPOT, MAMUT i MAZUR z wykorzystaniem metody kultur pylnikowych. Odmiany wyhodowane z materiału pochodzącego z Hodowli Roślin DANKO i zarejestrowane w 2015 i 2016 roku (współtwórcy odmian: dr Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina i dr Aleksandra Ponitka).

Wykaz publikacji wyników

- Plakat: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Pudelska H., Woźna J. 2015. Comparison of the effectiveness of haploid and doubled haploid induction in anther culture of winter and spring forms of triticale (*× Triticosecale* Wittm.). Streszczenie plakatu: BioTechnologia 96 (1): 94. (Prezentacja wyników z 2014 r. zawartych w sprawozdaniu merytorycznym na str. 5–7, 12–14)
- Publikacja: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 2015. Doubled haploid production of winter and spring triticale hybrids using colchicine in anther cultures. Biuletyn IHAR, 276: 57–67. (Publikacja wyników z 2014 r.

Badania nad zwiększeniem efektywności uzyskiwania haploidów w procesie androgenozy...

zawartych w sprawozdaniu merytorycznym na str. 7–11)

Publikacja: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Kaczmarek Z. 2014 (wydane w 2015). The efficiency of the production doubled haploid spring triticale through anther culture. Zeszyty Naukowe UP we Wrocławiu, Rolnictwo CIX, 605: 65–74. (Publikacja wyników z 2013 r.)

Publikacja: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Pudelska H., Woźna

J., Pniewski T. 2016 “Improved production of doubled haploids of winter and spring triticale hybrids via combination of colchicine treatments on anthers and regenerated plant”. J. Appl. Genet., DOI: 10.1007/s13353-016-0387-9. (Publikacja wyników z doświadczeń 2015 r. zawartych w sprawozdaniu merytorycznym na str. 5–8 oraz 11–14)

Tabela 1.

Efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur i zielonych roślin z mieszańców pszenżyta ozimego i jarego w latach 2014–2016.

Rok	Genotyp Liczba	Pylniki Liczba	Androgeniczne struktury		Zielone rośliny	
			Liczba	%	Liczba	%
2014	20	30156	24425	81,0	733	2,4
2015	10	22420	19864	88,6	643	2,9
2016	10	31200	25263	81,0	1386	4,4
Ogółem ozime	40	83776	69552	83,0	2762	3,3
2014	15	22531	20014	88,8	607	2,7
2015	17	38010	34139	89,8	1150	3,0
2016	10	29400	23099	78,6	889	3,0
Ogółem jare	42	89941	77252	85,9	2646	2,9

Tabela 2.

Podwojone haploidy pszenżyta ozimego i jarego otrzymane w kulturach pylnikowych z dodatkiem kolchicyny w latach 2014–2016.

Rok	Badane genotypy Liczba	Badane rośliny Liczba	Haploidy		Podwojone haploidy		Aneuploidy	
			Liczba	%	Liczba	%	Liczba	%
2014	17	469	279	59,5	175	37,3	15	3,2
2015	5	557	286	51,3	259	46,5	12	2,2
2016	10	996	647	65,0	283	28,5	66	6,6
Ogółem ozime	32	2022	1212	59,9	717	35,5	93	4,6
2014	9	246	155	63,0	81	32,9	10	4,1
2015	5	533	317	59,5	196	36,8	20	3,7
2016	10	504	304	60,3	170	33,7	30	6,0
Ogółem jare	25	1283	776	60,5	447	34,8	60	4,7

Identyfikacja regionów genomu oraz markerów DNA związanych z heterozją w heksaploidalnym pszenżytcie ozimym

Identification of genome regions and DNA markers associated with heterosis in hexaploid winter triticale

Michał Nowak¹✉, Piotr Tomasz Bednarek², Justyna Leśniowska-Nowak¹, Adam Kuzdraliński³, Edyta Paczos-Grzęda¹, Magdalena Sozoniuk¹, Karolina Dudziak¹, Magdalena Kawęcka¹, Karolina Różaniecka¹

¹ Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

² Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

³ Katedra Biotechnologii, Mikrobiologii i Żywności Człowieka, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

✉ e-mail: michal.nowak@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: DArT, heterozja, markery DNA, pszenżyto, zróżnicowanie genetyczne

Cel prowadzonych badań

Celem nadrzędnym projektu była weryfikacja hipotezy roboczej mówiącej, że zastosowanie markerów reprezentujących poszczególne chromosomy będzie bardziej użyteczne w prognozowaniu efektu heterozji u pszenżyta niż stosowanie ogólnej puli markerowej.

Cel ten został zrealizowany na drodze realizacji następujących celów szczegółowych:

- Fenotypowanie linii wsobnych oraz linii DH pszenżyta;
- Genotypowanie linii wsobnych oraz linii DH pszenżyta;
- Mapowanie genetyczne/asocjacyjne, analizy taksonomiczne w oparciu o pule markerowe oraz wybór na podstawie uzyskanych wyników komponentów rodzicielskich do krzyżowań;
- Genotypowanie populacji mapujących RIL;
- Krzyżowanie wybranych genotypów, ocena mieszańców F_1 i oszacowanie efektu heterozji.

Wszystkie zaplanowane do realizacji w projekcie zadania badawcze zostały zrealizowane, a cele projektu osiągnięte.

Materiały i Metody

Materiał roślinny

Materiał badawczy w projekcie stanowiło 470 wyrównanych linii hodowlanych

heksaploidalnego pszenżyta ozimego, 3 populacje rekombinowanych linii wsobnych pszenżyta (RIL) pokolenia S_6 liczące po 170 osobników każda oraz dwie serie mieszańców. Każda z serii mieszańców obejmowała 21 kombinacji krzyżówkowych, których formy rodzicielskie stanowiły genotypy wyselekcjonowane spośród linii hodowlanych na podstawie analiz podobieństwa genetycznego w oparciu o markery DArT lokalizujące się na poszczególnych chromosomach. Dodatkowo każda seria mieszańców uzupełniona była kombinacją krzyżówkową w której formami rodzicielskimi były genotypy o największym stopniu zróżnicowania genetycznego uzyskane w wyniku analizy pełnego zestawu markerów, bez uwzględniania ich lokalizacji chromosomowej.

Fenotypowanie badanych form w warunkach doświadczenia polowego

Ziarniaki badanych form pszenżyta wysiano na poletka doświadczalne o powierzchni, 10 m², przy gęstości zasiewu wynoszącej 350 ziarniaków/m². Doświadczenia polowe założono w stacjach hodowli roślin należących do spółek Hodowla Roślin Strzelce, Grupa IHAR oraz DANKO Hodowla Roślin. Każdy badany obiekt wysiany został w trzech oddalonych od siebie lokalizacjach. Przed oraz po siewie wykonano wszystkie niezbędne zabiegi uprawowe, zgodnie



ze schematem stosowanym przez spółki hodowli roślin dla doświadczeń międzyzakładowych.

Genotypowanie badanych linii oraz populacji RIL techniką DArT

Z roślin badanych 470 genotypów pszenżyta pobrano w warunkach doświadczenia polowego młode liście bez objawów porażenia w celu izolacji DNA z przeznaczeniem do analiz techniką DArT-seq. Pobraną tkankę zamrożono i przechowywano w temperaturze -80°C do czasu ekstrakcji DNA. Każda z roślin, z których pobrano materiał genetyczny została oznaczona, a przed fazą kwitnienia dokonano izolacji trzech pojedynczych kłosów celem uzyskania na drodze samozapylenia ziarniaków przeznaczonych do wykorzystania na kolejnych etapach projektu.

W przypadku wszystkich badanych populacji RIL materiał do izolacji DNA stanowiły liście 7-dniowych siewek uzyskane na drodze wykładowania ziarniaków na wilgotną bibułę na szalkach Petriego. Po pobraniu materiał roślinny zamrażano w ciekłym azocie i wykonywano procedurę izolacji DNA.

Izolację DNA wykonano w laboratorium Instytutu Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Zamrożoną tkankę homogenizowano w temperaturze ciekłego azotu za pomocą młynka i tłuczka. Uzyskany homogenat przenoszono do 2 ml probówek Eppendorfa, a następnie izolowano całkowity DNA z zastosowaniem komercyjnego zestawu odczynników opartego na oczyszczaniu kwasu nukleinowego na złożu w kolumnkach – DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Wyizolowane preparaty DNA poddano ocenie jakościowej i ilościowej za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 oraz analizie integralności przy użyciu elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

Uzyskane preparaty DNA doprowadzono następnie do jednakowego stężenia $100\text{ ng}/\mu\text{l}$ i przesłano do firmy Diversity Array Technology Ltd. (Canberra) w celu wykonania genotypowania. Genotypowanie wykonano techniką DArTseq w wersji z wykorzystaniem najbardziej obszernej dostępnej zestawu markerów.

Mapowanie genetyczne i analiza podobieństwa genetycznego w oparciu o markery lokalizujące się na poszczególnych chromosomach pszenżyta

Przed przystąpieniem do procedury mapowania dane uzyskane z genotypowania techniką DArTseq zostały poddane kontroli jakości oraz obróbce bioinformatycznej, tak aby uzyskać plik

wsadowy o strukturze właściwej dla oprogramowania TASSEL. Dane uzyskane w formie markerów przekształcone zostały w matryce binarne i usystematyzowane w oparciu o lokalizację chromosomową. W celu minimalizacji błędów z dalszych analiz wykluczono obiekty, w przypadku których ilość danych utraconych przekroczyła poziom 30%.

W pierwszym etapie prac na podstawie mapowania porównawczego określono lokalizację chromosomową markerów DNA identyfikowanych dla badanych linii. Wykorzystano do tego celu dostępne mapy genetyczne pszenicy, pszenżyta oraz żyta, a także własne mapy genetyczne oparte o linie rekombinacyjne. Mapowanie genetyczne wykonane zostało za pomocą pakietu oprogramowania Multi-Point. Drugi etap realizacji zadania obejmował analizę podobieństwa genetycznego badanych obiektów. Analizę tę wykonano w oparciu o markery DNA lokalizujące się na poszczególnych chromosomach pszenżyta. Na podstawie markerów DNA, analizowanych oddzielnie dla każdego z 21 chromosomów, oceniono podobieństwo genetyczne analizowanych form pszenżyta. W oparciu o uzyskane wyniki wytypowano formy o najwyższym stopniu zróżnicowania genetycznego, które przeznaczone zostały do wykorzystania jako formy rodzicielskie do krzyżowań.

Krzyżowanie form o najwyższym stopniu zróżnicowania genetycznego i ocena efektu heterozji w mieszańcach F_1

Krzyżowanie wykonane zostało w warunkach doświadczenia polowego na drodze ręcznego kastrowania i zapyłania kwiatów. Ziarniaki analizowanych genotypów pszenżyta wysiano na poletkach 2-rzędowych, w siewie gęstym, rzutowym. Doświadczenie polowe założono w gospodarstwie doświadczalnym Felin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Tuż przed kwitnieniem kwiaty w kłosach roślin przeznaczonych na formy maceczne kastrowano metodą manualną z użyciem pincety. Na każdy wykastrowany kłos założono izolator z folii paroprzepuszczalnej. Po osiągnięciu dojrzałości przez znamię słupka, nanoszony był na nie pyłek z roślin przeznaczonych na formę ojcowską. Każdy zapyłony kłos został ponownie zaizolowany. Po osiągnięciu dojrzałości pełnej, kłosy zostały zebrane ręcznie w celu omłotu uzyskanych ziarniaków F_1 . Ziarniaki mieszańców oraz odpowiednich form rodzicielskich wysiano następnie na poletka doświadczalne o powierzchni 1 m^2 przy gęstości wysiewu $350\text{ ziarniaków}/\text{m}^2$.

Efekt heterozji został oszacowany na podstawie oceny plonu z jednostki powierzchni, która

została wykonana w warunkach doświadczenia polowego. Plon mieszańców F_1 oceniano zarówno w porównaniu ze średnią wartością dla obu form rodzicielskich (mid-parent, MPH), jak również względem formy rodzicielskiej o lepszych parametrach (best-parent, BPH). Wartości współczynników MPH oraz BPH wyrażono w formie procentowej wykorzystując następujące formuły:

$$MPH = \frac{F1 - MP}{MP} \times 100\%$$

$$BPH = \frac{F1 - BP}{BP} \times 100\%$$

gdzie;

MPH – efekt heterozji mid-parent;

MP – średni plon obu form rodzicielskich;

BPH – efekt heterozji best-parent;

BP – plon formy rodzicielskich o wyższym plonowaniu.

Opis wyników

Analizy fenotypowe 470 badanych genotypów heksaploidalnego pszenżyta ozimego wykazały, że średni plon z jednostki powierzchni wyniósł w pierwszym roku badań 0,80 kg/m², natomiast w drugim roku badań 0,59 kg/m². W 1. roku badań najniższy średni plon uzyskano dla rodu BOHT_790 (0,38 kg/m²), natomiast najwyższy dla rodu DC_07051/01/2 (1,26 kg/m²). W 2. roku badań najniższy średni plon uzyskano dla rodu LD_122/08 (0,18 kg/m²) natomiast najwyższy dla rodu DC_07063/01 (1,4 kg/m²).

W wyniku kontroli jakości danych genotypowych uzyskanych techniką DaRT spośród obiektów poddanych genotypowaniu z dalszych analiz wykluczono 15, ze względu na ilość utraconych danych przekraczającą 30%. Uzyskane wyniki wykazały, że maksymalne i minimalne odległości genetyczne między analizowanymi genotypami pszenżyta były różne i zależne od lokalizacji chromosomowej markerów. Najwyższą wartość współczynnika maksymalnego dystansu genetycznego dla badanych genotypów uzyskano dla chromosomu 3R (0,9838), natomiast najniższą dla chromosomu 5A (0,8382). Ocena maksymalnego dystansu genetycznego pomiędzy analizowanymi formami pszenżyta wykazała, że jego średnia wartość wynosiła 0,91. Najwyższą wartość maksymalnego dystansu genetycznego wykazano w badaniach własnych dla markerów zlokalizowanych na chromosomach pochodzących z żytniego genomu R (0,94), natomiast najniższą dla markerów zlokalizowanych

na genomie B pszenicy (0,89). Na podstawie uzyskanych wyników wyznaczono również minimalne wartości współczynnika dystansu genetycznego, których wartości mieściły się w zakresie od 0,002 dla chromosomu 2R do 0,032 dla chromosomu 6A. Średnia wartość minimalnego dystansu genetycznego wyniosła 0,02. Uśredniona wartość dystansu genetycznego badanych form oszacowana na podstawie wyników opartych na całkowitej puli markerowej wynosiła 0,47. W ramach zadania dokonano również analizy klasteryzacji w obrębie poszczególnych chromosomów. Wykazała ona duże zróżnicowanie w zależności od chromosomu i wahała się od 3 (chromosomy 4A, 2B, 3B, 6R, 7R) do nawet 20 (chromosom 3R).

Uzyskane wartości współczynnika maksymalnego dystansu genetycznego stanowiły podstawę do wyboru komponentów rodzicielskich do krzyżowań. W ramach projektu wybrano po dwie pary genotypów skrajnych, które charakteryzowały się największym zróżnicowaniem genetycznym w obrębie poszczególnych chromosomów i przeznaczono je na formy rodzicielskie do krzyżowań celem oszacowania efektu heterozji w mieszańcach.

W wyniku realizacji zadania dokonano ponadto genotypowania trzech populacji rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL) pszenżyta pokolenia S_6 . Średnia ilość markerów silicoDaRT uzyskanych dla poszczególnych genotypów wyniosła 22 100, a zidentyfikowanych w ich obrębie markerów SNP 6 365. Średnia wartość PIC dla wszystkich analizowanych prób wyniosła w 3 latach badań odpowiednio: 0,375, 0,402 oraz 0,392. Współczynniki heterozygotyczności dla badanych populacji wyniosły odpowiednio: 0,120, 0,112 oraz 0,133.

Analiza plonowania mieszańców pokolenia F_1 uzyskanych na drodze krzyżowania form, które charakteryzowały się największym zróżnicowaniem genetycznym w obrębie poszczególnych chromosomów i ocena efektu heterozji wykazała, że wartości współczynnika MPH (mid-parent heterosis) dla badanych form wahały się w pierwszym roku badań w zakresie od -28% przy zastosowaniu markerów zlokalizowanych na chromosomie 6R do +129% przy zastosowaniu do projektowania formuły krzyżowania markerów zlokalizowanych na chromosomie 5A. Analiza drugiego zestawu mieszańców wykazała, że wartości tego współczynnika wahały się w zakresie od -96% przy zastosowaniu markerów zlokalizowanych na chromosomie 6A do +96% przy zastosowaniu do projektowania formuły krzyżowania markerów zlokalizowanych na chromosomie 4R. Ocena efektu heterozji mieszańców w porównaniu

z formami rodzicielskimi o lepszych parametrach plonowania – BPH (best-parent heterosis) wykazała, że dla pierwszego zestawu mieszańców najniższe i najwyższe wartości odnotowano, podobnie jak dla MPH, dla markerów zlokalizowanych

na chromosomach 6R i 5A i wyniosły one odpowiednio -38% i +111%. Dla drugiego zestawu mieszańców zanotowane wartości BPH wyniosły -98% dla markerów zlokalizowanych na chromosomie 6A i +130% dla markerów chromosomu 3B (tab. 1).

Tabela 1

Zestawienie wartości efektu heterozji mid-parent (MPH) i best-parent (BPH) dla badanych form mieszańcowych uzyskanych w wyniku krzyżowania form najbardziej oddalonych genetycznie, wytypowanych na podstawie markerów DArTseq zlokalizowanych na poszczególnych chromosomach pszenżyta w dwóch latach doświadczeń.

Rok badań	I		II	
Chromosom	MPH	BPH	MPH	BPH
1A	6%	-3%	20%	-2%
2A	20%	7%	7%	0%
3A	-23%	-36%	37%	0%
4A	57%	47%	-5%	-13%
5A	129%	111%	24%	21%
6A	110%	62%	-96%	-98%
7A	7%	-4%	29%	0%
1B	52%	14%	95%	34%
2B	105%	75%	81%	66%
3B	89%	71%	76%	130%
4B	-8%	-18%	63%	33%
5B	20%	20%	-15%	-43%
6B	24%	21%	18%	15%
7B	-12%	-18%	9%	-7%
1R	32%	8%	19%	-4%
2R	13%	-16%	40%	4%
3R	48%	44%	3%	-9%
4R	75%	67%	96%	57%
5R	18%	-13%	22%	0%
6R	-28%	-38%	-16%	-42%
7R	24%	20%	30%	4%
Ogółem	-11%	-11%	-37%	-61%

Wybór form w oparciu o ogólną pulę markerów nie pozwolił na uzyskanie efektu heterozji w obu latach badań, a plon formy mieszańcowej był niższy o 11% od średniego plonu form rodzicielskich i plonu formy o lepszych parametrach w pierwszym roku oraz o 37% od średniego plonu form rodzicielskich i o 61% od plonu formy o lepszych parametrach w drugim roku doświadczeń.

Zaproponowane w projekcie podejście pozwoliło na potwierdzenie założonej hipotezy, że analiza oparta na markerach lokalizujących się na konkretnych chromosomach pozwala na dużo bardziej precyzyjną predykcję wystąpienia zjawiska heterozji w pokoleniu F_1 w porównaniu z analizą ogólnej puli markerowej. W ramach

projektu wytypowano 5 lokalizacji chromosomowych markerów, na podstawie których uzyskano stabilną predykcję efektów MPH i BPH. W przypadku pozostałych chromosomów, porównanie wyników pomiędzy latami doświadczeń wykazało, że były one niestabilne lub nawet skrajnie różniące się (np. dla chromosomów 4A, 6A czy 5B).

Wnioski z prowadzonych badań

1. Analizowane formy pszenżyta charakteryzowały się dość dużym stopniem zróżnicowania pod względem plonowania, co pozwoliło na określenie profilu markerów dla form zarówno o bardzo niskim, jak i wysokim plonowaniu, a poziom polimorfizmu uzyskany

- w oparciu o markery DArT był wystarczający dla pewnej i wiarygodnej oceny zróżnicowania genetycznego analizowanych genotypów.
2. Lokalizacja chromosomowa markerów na podstawie których określano dystans genetyczny pomiędzy formami rodzicielskimi wykorzystanymi do krzyżowań miała istotny wpływ na uzyskany w mieszańcach efekt heterozji.
 3. Analiza zróżnicowania genetycznego badanych form pszenżyta w oparciu o markery zlokalizowane na chromosomach 5A, 1B, 2B, 3B i 4R pozwoliła na predykcję wystąpienia efektu heterozji w obu latach badań.
 4. Analiza zróżnicowania genetycznego badanych form pszenżyta w oparciu o ogólną pulę markerową nie pozwoliła na predykcję wystąpienia efektu heterozji w obu latach badań, a plon mieszańców był niższy niż form rodzicielskich.
 5. Uzyskane wyniki sugerują istnienie w genomie pszenżyta regionów, których zróżnicowanie genetyczne pomiędzy formami rodzicielskimi determinuje predyspozycję do wystąpienia zjawiska heterozji.
 6. Zaprezentowane podejście polegające na wyborze komponentów rodzicielskich na podstawie analizy zróżnicowania genetycznego w oparciu o markery zlokalizowane na pojedynczych chromosomach pszenżyta powinno być w następnej kolejności zwalidowane w doświadczeniach polowych prowadzonych na większej powierzchni i w zróżnicowanych warunkach środowiska.

Osiągnięcia projektu

Uzyskane wyniki przyczyniły się do poznania molekularnego podłoża heterozji i sugerują istnienie w genomie pszenżyta regionów, których zróżnicowanie genetyczne pomiędzy formami rodzicielskimi determinuje predyspozycję do wystąpienia tego zjawiska.

Analiza wyników projektu pozwoliła na potwierdzenie założonej hipotezy badawczej, mówiącej, że lokalizacja chromosomowa markerów, na podstawie których określano dystans genetyczny pomiędzy formami rodzicielskimi wykorzystanymi do krzyżowań ma istotny wpływ na uzyskany w mieszańcach efekt heterozji. Na podstawie uzyskanych danych wyselekcjonowano 5 chromosomów, dla których analiza dystansu genetycznego

powodowała stabilne występowanie efektu heterozji. Należą do nich chromosomy: 5A, 1B, 2B, 3B i 4R. Dodatkowo wykazano, że wybór form rodzicielskich do krzyżowań w oparciu o dystans genetyczny określony na podstawie ogólnej puli markerów nie pozwolił na uzyskanie efektu heterozji, a plon formy mieszańcowej był niższy od średniego plonu form rodzicielskich i plonu formy o lepszych parametrach w obu latach doświadczeń.

Wykaz publikacji wyników

Planowana publikacja naukowa obejmująca wyniki projektu jest obecnie w końcowej fazie przygotowywania.

Wyniki projektu prezentowane były dotychczas w formie 6 doniesień na 3 międzynarodowych konferencjach naukowych:

- Nowak M., Leśniowska-Nowak J., Dudziak K., Zapalska M., Bednarek P.T. „Genotyping of Polish triticale breeding materials by means of DArTseq technique” – 8th International Triticeae Symposium, 12.06.-16.06.2017 r., Wernigerode, Niemcy.
- Dudziak K., Leśniowska-Nowak J., Zapalska M., Nowak M. „Evaluation of the yielding capacity of Polish triticale breeding materials” – 8th International Triticeae Symposium, 12.06.-16.06.2017 r., Wernigerode, Niemcy.
- Nowak M., Leśniowska-Nowak J., Dudziak K., Zapalska M., Bednarek P.T. „Chromosome specific DArTseq markers analysis as an alternative approach for genetic similarity determination in polyploid cereals” – 17th EWAC – The European Cereals Genetics Co-operative, EUCARPIA Cereals Section Conference “Cereals for Tomorrow”, 03.06-08.06.2018 r., Bukareszt, Rumunia.
- Dudziak K., Leśniowska-Nowak J., Zapalska M., Bednarek P.T., Nowak M. „Analysis of the relationship between the genetic similarity and yielding for Polish triticale breeding materials” – 17th EWAC – The European Cereals Genetics Co-operative, EUCARPIA Cereals Section Conference “Cereals for Tomorrow”, 03.06-08.06.2018 r., Bukareszt, Rumunia.
- Nowak M., Leśniowska-Nowak J., Dudziak K., Sozoniuk M., Bednarek P.T. „Heterosis prediction in triticale based upon single chromosome genetic diversity assessment” – 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding, 04.11.-07.11.2019 r., Budapeszt, Węgry.
- Różaniecka K., Nowak M., Leśniowska-Nowak J., Sozoniuk M., Kawęcka M., Bednarek P.T. „Crossability of genetically diverse triticale genotypes selected on the basis of single chromosome localized DArTseq markers” – 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding, 04.11.-07.11.2019 r., Budapeszt, Węgry.

Genetyczne podłoże męskiej sterylności pszenżyta z różnymi cytoplazmami oraz możliwość wykorzystania badanych cytoplazm do tworzenia systemów CMS u pszenicy

Genetic background of male sterility in triticale with different cytoplasm and perspectives of their utilization for development of CMS system in wheat

Stefan Stojalowski¹✉, Marta Orłowska¹, Martyna Sobczyk¹, Anna Bienias¹, Marcin Berdzik¹, Beata Myśków¹, Halina Góral², Magdalena Simlat², Tomasz Warzecha², Wojciech Wesołowski², Marek Szklarczyk², Mirosław Pojma³

¹Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

²Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

³DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.

✉ e-mail: sstojalowski@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, odmiany mieszańcowe, pszenżyto

Pszenżyto jest w Polsce bardzo popularnym zbożem. Wynika to z wielu jego zalet takich jak wysoka plenność, dobra wartość paszowa, dobra odporność na choroby i stropy abiotyczne. W hodowli pszenżyta spore wysiłki są czynione dla szerszego wdrożenia odmian mieszańcowych. Podstawą produkcji nasiennej aktualnie uprawianych mieszańców pszenżyta jest system cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS) pochodzący z pszenicy *Triticum timopheevi* (CMS-Tt). System CMS-Tt ma pewne wady, które utrudniają jego wykorzystanie w praktyce. Jako alternatywę można wskazać cytoplazmę Pampa pochodzącą z żyta (Geiger i Schnell 1970) i cytoplazmę *Aegilops sharonensis* (Cauderon i in. 1985; Nalepa 1990; Warzecha i Góral 2009).

Lokalizacja genów przywracających płodność u pszenżyta z wyżej wymienionymi cytoplazmami sterylizującymi jest słabo poznana. Dotychczasowe badania dotyczące lokalizacji głównych genów restorerowych w cytoplazmie *T. timopheevi* wskazywały przede wszystkim na chromosom 6R (Curtis i Lukaszewski 1993; Stojalowski i in. 2013). Obecność restorerów działających w systemie CMS-Tt, które są obecne na innych chromosomach została ostatnio potwierdzona metodami mapowania interwałowego (Stojalowski i in. 2013; Wasiak i in. 2020). Badania nad mapowaniem restorerów dla

cytoplazmy Pampa wykonywano dotąd tylko u żyta – poznano lokalizację genów na chromosomach 1R, 3R, 4R, 5R i 6R (Miedaner i in. 2000; Hackauf i in. 2012).

Zasadniczym celem realizowanych badań było poznanie genetycznych mechanizmów determinujących męską płodność pszenżyta z różnymi cytoplazmami sterylizującymi. Hipoteza badawcza od początku zakładała, że w trzyletnim okresie nie da się poznać tych mechanizmów dogłębnie, ale możliwe jest zlokalizowanie głównych genów jądrowych przywracających męską płodność u pszenżyta z cytoplazmami *T. timopheevi* i CMS-Pampa, wykonanie mapowania porównawczego tych genów, jak również wykonanie wstępnych eksperymentów pozwalających na określenie przydatności dla hodowli dwóch innych źródeł CMS: *Aegilops sharonensis* i *Aegilops ventricosa*.

Materiałem badawczym były męskosterylne linie pszenżyta z cytoplazmami *T. timopheevi*, CMS-Pampa, *Aegilops sharonensis* i *Aegilops ventricosa*. Wszystkie badane linie zostały wyhodowane w Uniwersytecie Rolniczym w Krakowie. Formami restorerowymi były linie wsobne, linie DH i rody hodowlane pochodzące z Uniwersytetu Rolniczego w Krakowie oraz z Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o. W badaniach wykorzystano też serię 15 rodów pszenicy ozimej z Danko.



Populacje mapujące tworzone zapylając ręcznie męskosterylną roślinę linii matecznej pyłkiem linii ojcowskiej, a następnie izolując indywidualnie męskopłodne rośliny F1 w celu samozapylenia kłosów. Oceny fenotypowe wykonywano wzrokowo w 5-stopniowej skali wg Góral (2002) oraz na podstawie zawiązywania ziaren w izolowanych kłosach. Doświadczenia dla każdej kombinacji mieszańcowej prowadzono w dwóch lokalizacjach (Szczecin i Prusy k. Krakowa).

W badaniach wykorzystano markery oparte na dwóch metodach:

1. PCR (Polymerase Chain Reaction): markery STS, SSR, SCAR, tCOS o znanych lokalizacjach chromosomowych (Hackauf i in. 2012; Stojalowski i in. 2013)
2. GBS (Genotyping by Sequencing): wykorzystano wariant metody oferowany pod nazwą DArTseq w postaci usługi badawczej przez Diversity Arrays Technology Pty (Bruce, Australia)

Mapy sprzężeń konstruowano w programie JoinMap 3.0 (Van Ooijen i Voorrips 2001), a utworzone grupy sprzężeń przypisywano do konkretnych chromosomów na podstawie dwóch map referencyjnych zawierających markery DArTseq: mapy pszenżyta (Tyrka i in. 2015) oraz żyta (Milczarski i in. 2016).

W badaniach nad czynnikami mitochondrialnymi wykorzystano izogeniczne wersje linii 19 w różnych cytoplazmach (N, P i Tt), które po rozmnożeniu na dużą skalę użyto do wyizolowania DNA z etiolowanych kielków. Ekstrakty DNA poddano analizom sekwencyjnym przy zastosowaniu sekwenatora nowej generacji typu Mi-Seq (Illumina). Uzyskane dane poddano analizie bioinformatycznej.

W czasie trwania projektu wykonano ocenę męskiej płodności mieszańców F2 pszenżyta z czterema różnymi cytoplazmami (*T. timopheevi*, CMS-Pampa, *Aegilops sharonensis* i *Aegilops ventricosa*). We wszystkich przypadkach zaobserwowano duży wpływ środowiska na pylenie roślin pszenżyta – wyniki doświadczeń polowych wskazują na silne interakcje między typem CMS, genotypami i środowiskiem. Rozkłady fenotypowe w populacjach F2 wskazują na udział co najmniej kilku genów jądrowych w determinowaniu męskiej płodności w każdej z badanych cytoplazm.

Skonstruowane mapy genetyczne populacji mapujących F2 z cytoplazmami sterylizującymi *T. timopheevi* i Pampa obejmowały większą część genomu pszenżyta, ale niektóre grupy sprzężeń pozostały wciąż nieprzypisane do konkretnych chromosomów (lub przypisane w sposób

niejednoznaczny). Problemy wynikały głównie z małej transferowalności markerów DArTseq – pomimo dużej liczby markerów, markery wspólne dla map referencyjnych i dla badanych populacji, występowały rzadko. Nie można też wykluczyć, że w niektórych badanych materiałach obecne były translokacje między chromosomami pszenżyta.

Większość markerów PCR testowanych w czasie trwania projektu nie różnicowała form rodzicielskich lub dawała produkty o niespecyficznych długościach (mogły być amplifikowane w regionach innych niż zakładano na podstawie map genomów A, B i R). Żaden z testowanych markerów PCR nie wykazywał statystycznie istotnego związku z płodnością.

W wyniku analiz sekwencyjnych mitochondrialnego DNA złożono 3 hipotetyczne koliste genomy mitochondrialne pszenżyta. Wykonane złożenia były w wielu punktach niejednoznaczne (złożenia zawierały różne warianty sekwencji DNA). Wielkości złożonych genomów mieściły się w granicach od 390 kbp do 500 kbp. Przyczyny męskiej sterility pszenżyta z badanymi źródłami CMS nie zostały określone.

Wytworzono serię linii alloplazmatycznych pszenżyta w 4 cytoplazmach (T, P, A, V) (oceny fenotypowe zweryfikowane w 3 latach badań):

- Salvo 15 – uniwersalny dopełniacz
- DAD 1 – uniwersalny restorer
- Baltiko 1 – dopełniacz P, restorer A, częściowy restorer Tt i V
- Zorro 1 – dopełniacz P i A, restorer Tt i V

Przetestowano 27 odmian i rodów pszenżyta pod kątem zdolności do przywracania płodności w 4 różnych cytoplazmach sterylizujących (Tt, P, A, V) – obserwowano duże zróżnicowanie w zakresie interakcji między genotypem, a cytoplazmą (oceny fenotypowe 1-roczone)

Przetestowano 15 rodów pszenicy pod kątem zdolności do przywracania płodności w systemie CMS – *T. timopheevii*: ród D30 słabo przywrócił płodność w roku 2018, pozostałe nie przywracają męskiej płodności (oceny fenotypowe 1-roczone)

Najważniejsze wnioski

1. Wyniki wielosezonowej polowej oceny płodności linii i mieszańców pszenżyta z czterema źródłami CMS wskazują, że wszystkie cztery badane cytoplazmy sterylizujące (*T. timopheevi*, CMS-Pampa, *Ae. sharonensis*, *Ae. ventricosa*) pozwalają na stworzenie przydatnych w hodowli zestawów linii stanowiących kompletny system CMS. Na system taki w wariantem minimalistycznym składającą się: linia

męskosterylna fenotypowo stabilna w różnych warunkach środowiskowych, żywotna linia dopełniająca pozwalająca na odtwarzanie linii męskosterylnej oraz linia restorerowa pozwalająca na uzyskiwanie mieszańców o przywróconej zdolności do produkcji pyłku. Dla każdej z badanych cytoplazm taki podstawowy zestaw linii został uzyskany.

2. Kontrola genetyczna męskiej sterylności/przywracania męskiej płodności we wszystkich czterech badanych systemach CMS ma charakter kompleksowy. Wyniki oceny fenotypowej różnych populacji F2 wykonane w różnych środowiskach wskazują na udział co najmniej kilku genów jądrowych w kontroli tworzenia pyłku w każdej z badanych cytoplazm. Badane cytoplazmy różnią się między sobą pod względem genetycznym (współdziałają z nimi odmienne geny restorerowe). Pylenie roślin pszenżyta w każdej z badanych cytoplazm jest w znacznym stopniu modyfikowane przez wpływ środowiska.
3. Geny restorerowe dla pszenżyta z cytoplazmą *T. timopheevi*, które statystycznie wykazują najsilniejsze działanie, zostały zidentyfikowane na chromosomie 6R. Ich siła działania nie jest jednak na tyle duża, żeby samodzielnie gwarantowały pełną kontrolę nad męską płodnością. Analizy mieszańców pszenżyta z cytoplazmą Pampa wskazują na wpływ na męską płodność genów zlokalizowanych na chromosomie 1A, ale są to geny o przeciętnym efekcie fenotypowym, niezdolne do samodzielnego przywrócenia płodności w systemie CMS-P.
4. Stwierdzenie wielogenowego charakteru kontroli nad pyleniem roślin pszenżyta w badanych systemach CMS oraz brak zidentyfikowanych genów o silnym efekcie fenotypowym, prowadzi do wniosku, że w praktycznej hodowli odmian mieszańcowych pszenżyta wdrażanie metody MAS (*Marker Assisted Selection*) opartej o wykorzystanie markerów molekularnych do selekcji pojedynczego genu, może być mało efektywne.

Wykaz publikacji wyników

Materiały konferencyjne

Sobczyk M., Góralska M., Orłowska M., Góral H., Warzecha T., Simlat M., Stojalowski S. 2016. Męska płodność mieszańców F2 pszenżyta z cytoplazmami sterylizującymi *T. timopheevi* i CMS-Pampa. Konferencja Naukowa „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin”

Międzyzdroje, 8–10 czerwca 2016

Sobczyk M., Góralska M., Orłowska M., Góral H., Warzecha T., Simlat M., Stojalowski S. 2016. The use of GBS method for mapping the male Rf genes in triticale with sterility-inducing cytoplasm of *T. timopheevi*. V Kongres Genetyki, Łódź, 19–22.09.2016

Orłowska M., Sobczyk M., Simlat M., Góral H., Warzecha T., Stojalowski S., 2017. Wykorzystanie markerów DArTseq do konstrukcji mapy sprzężeń u mieszańca międzyliniowego pszenżyta z cytoplazmą Pampa. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” – Streszczenia, Zakopane, 30 stycznia – 3 lutego 2017, ISBN 83–891172–87–9: 134

M. Orłowska, M. Sobczyk, H. Góral, T. Warzecha, M. Simlat S. Stojalowski; “Fertility assessment in winter triticale F2 hybrids with different sources of cytoplasmic male sterility”; 7th International Conference for Young Researchers, Multidirectional Research in Agriculture, Forestry and Technology, 16–17 April 2018, Kraków; str.45

Literatura

Cauderon Y., Cauderon A., Gay G., Roussel J. (1985). Alloplasmic lines and nucleo-cytoplasmic interactions in triticale. In: Genetics and breeding of triticale, Eucarpia meeting, Clermont-Ferrand, France. July 2–5, 1984. INRA, Paris: 177–191

Curtis C. A., Lukaszewski A. J. (1993). Localization of Genes in Rye that Restore Male Fertility to Hexaploid Wheat with *T. timopheevi* Cytoplasm. *Plant Breeding* 111: 106–112

Geiger H. H., Schnell F. W. (1970). Cytoplasmic Male Sterility in Rye (*Secale cereale* L.). *Crop. Sci.* 10: 590–593.

Góral H. 2002, Biologiczno-hodowlane aspekty wykorzystania heterozji u pszenżyta (x *Triticosecale* Wittmack). *Zeszyty Nauk. AR im. H. Kołłątaja w Krakowie, Rozprawy* z. 283

Hackauf B., Korzun V., Wortmann H., Wilde P., Wehling P. (2012). Development of conserved ortholog set markers linked to the restorer gene Rfp1 in rye. *Mol Breeding* 30:1507–1518

Miedaner T., Glass C., Dreyer F., Wilde P., Wortmann H., Geiger H. H. (2000). Mapping of genes for male-fertility restoration in ‘Pampa’ CMS winter rye (*Secale cereale* L.). *Theor. Appl. Genet.* 101: 1226–1233.

Milczarski P., Hanek M., Tyrka M., Stojalowski S. (2016). The application of GBS markers for extending the dense genetic map of rye (*Secale cereale* L.) and the localization of the Rfc1 gene restoring male fertility in plants with the C source of sterility-inducing cytoplasm. *J Appl Genetics* 57:439–451

Nalepa S., (1990). Hybrid triticale: present and future. *Proc. 2nd International Triticale Symposium, Passo Fundo, Rio Grande do Sul, Brasil, 1–5 October 1990: 402–407*

Stojalowski S., Bobrowska A., Hanek M., Myśków B., (2013).

- The importance of chromosomes from the sixth homeologous group in the restoration of male fertility in winter triticale with *Triticum timopheevii* cytoplasm. *J. Appl. Genetics* 54: 179–184
- Tyrka M., Tyrka D., Wędzony M. (2015). Genetic Map of Triticale Integrating Microsatellite, DArT and SNP Markers. *PLoS ONE* 10 (12): e0145714
- Van Ooijen J. W., Voorrips R. E. (2001). JoinMap® 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant. Res. Intern. Wageningen, the Netherlands.
- Warzecha T., Góral H. (2009). Otrzymywanie mieszańców z krzyżowań zwrotnych heksaploidalnej pszenicy z cytoplazmą *Aegilops sharonensis* z pszenżytem. *Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych*. B. Naganowska, P. Kachlicki, P. Krajewski (red.), Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu, ISBN 978–83–61607–36–6, ISSN 1230–0721:305–311.
- Wasiak M., Niedziela A., Woś H., Pojmaj M., Bednarek P. T. (2020). Genetic mapping of male sterility and pollen fertility QTLs in triticale with sterilizing *Triticum timopheevii* cytoplasm. *Journal of Applied Genetics* w druku, <https://doi.org/10.1007/s13353–020–00595-z>

Analiza zmienności epigenetycznej indukowanej stresem suszy oraz ocena jej stabilności transgeneracyjnej w aspekcie tolerancji jęczmienia na stres niedoboru wody

The analysis of the epigenetic diversity induced by drought stress and the assessment of its transgenerational stability with respect to the drought stress tolerance in barley

Mirosław Kwaśniewski✉, Karolina Chwiałkowska, Urszula Nowakowska, Małgorzata Nawrot, Janusz Jelonek, Grażyna Skawińska-Zydroń, Agnieszka Bielska

Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski w Katowicach
✉ e-mail: miroslaw.kwasniewski@us.edu.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.7.2018, Zadanie 23.

Słowa kluczowe: epigenetyka, jęczmień, NGS, stres, susza, zmienność transgeneracyjna

Abiotyczne oraz biotyczne bodźce stresowe są istotnymi czynnikami wpływającymi na produktywność roślin uprawnych. Jednym z priorytetowych problemów badawczych w hodowli jęczmienia jest poznanie mechanizmów związanych z odpornością jęczmienia na stresse abiotyczne. Ze względu na zmiany klimatyczne i wzmagające się okresowe niedobory opadów w Polsce, szczególnego znaczenia nabiera analiza procesów decydujących o tolerancji jęczmienia na stres suszy. Jednym z mechanizmów szybkiej, indukowanej środowiskowo odpowiedzi roślin na stres abiotyczny są zmiany epigenetyczne w profilach metylacji DNA, czego konsekwencją mogą być zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów decydujących o tolerancji na występujący stres.

Cele projektu

Celem projektu była weryfikacja hipotezy zakładającej, że zmiany w metylacji DNA indukowane podczas stresu suszy u jęczmienia mogą mieć pozytywną wartość przystosowawczą. Szczegółowe analizy miały na celu:

- wykazanie, czy nowe profile metylacji DNA, powstałe pod wpływem stresu niedoboru wody, prowadzą do zmian w aktywności transkrypcyjnej genów warunkujących

- odpowiedź na suszę (cel zrealizowano),
- sprawdzenie, czy indukowane zmiany epigenetyczne i zmiany w ekspresji genów mają charakter dziedziczny (cel zrealizowano),
- ocenę, czy w konsekwencji istnieje potencjalna możliwość wykorzystania mechanizmów indukcji nowych profili epigenetycznych i transkrypcyjnych w programach hodowlanych jęczmienia, prowadzących do uzyskania stabilnych linii z epiallelami warunkującymi zwiększoną tolerancję na stres suszy (cel zrealizowano).

Podsumowanie uzyskanych wyników

W pierwszym roku realizacji badań przeprowadzono analizy transkryptomu liścia jęczmienia, które umożliwiły skatalogowanie genów ulegających ekspresji w drugim liściu siewek jęczmienia rosnących w warunkach kontrolnych, oraz ulegających zróżnicowanej ekspresji w stosunku do warunków kontrolnych po hodowli w warunkach niedoboru wody, oraz po późniejszym okresie 14 dni ponownej rehydratacji i przywróceniu optymalnych warunków wzrostu. Równoległe z analizami transkryptomu przeprowadzono pierwszą w świecie globalną analizę metylomu jęczmienia, umożliwiającą wysokorozdzielczą (na poziomie pojedynczych



nukleotydów), bezpośrednią charakterystykę metylomu oraz jego zmian pod wpływem stresu suszy. Uzyskane wyniki umożliwiły opracowanie referencyjnego zestawu informacji o sekwencji i stanie metylomu oraz transkryptomu jęczmienia, do których odnoszone będą wyniki analiz metylomu i transkryptomu roślin, będących potomstwem roślin, które przeszły stres suszy. Dodatkowo, rośliny, które poddawane były stresowi suszy oraz rośliny rosnące w warunkach kontrolnych poddano analizom fizjologicznym i fenotypowym, w którym oceniano kondycję roślin podczas stresu oraz oceniano wpływ stresu suszy na plon i fenotyp dojrziałych roślin.

Analizy transkryptomu roślin będących potomstwem roślin traktowanych stresem suszy w pokoleniu EPI_0 wykazały, że w transkryptomie roślin pokolenia EPI_1 nastąpiły zmiany, które mogą być wynikiem wyindukowanych na poziomie epigenetycznym zmian u roślin rodzicielskich. W kolejnych latach projektu przeprowadzono analizy transkryptomu, dzięki którym wykazano, że rośliny, które są potomstwem roślin poddawanych stresowi suszy w dwóch następujących po sobie pokoleniach, wykazują większe zróżnicowanie transkryptomu, niż rośliny, które są potomstwem roślin poddawanych stresowi w jednym pokoleniu, przy czym przejście roślin przez warunki kontrolne nie powoduje powrotu transkryptomu do stanu sprzed zadania stresu. Wyniki te wskazują na utrwalenie wyindukowanych stresem suszy zmian w transkryptomie a tym samym wskazują na stabilność transgeneracyjną zmian wywołanych stresem suszy w poprzednich pokoleniach. Co ważne, wykazano, że utrwalone zmiany w transkryptomie dotyczą procesów zaangażowanych w adaptację roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych, oraz procesów mogących mieć wpływ na produktywność roślin.

W kolejnych latach realizacji projektu przeprowadzono szereg analiz molekularnych, związanych z oceną stabilności wyindukowanych zmian w transkryptomie i metylomie roślin, jednak, co szczególnie istotne, przeprowadzono szereg eksperymentów związanych z oceną kondycji roślin będących potomstwem (kolejnymi pokoleniami) roślin, które w roku 2014 doświadczyły (lub nie – rośliny kontrolne) stresu niedoboru wody.

Wnioski z realizacji projektu w roku 2015, pokolenie Epi_1 – eksperyment przeprowadzony w kontrolowanych warunkach szklarni:

- Potomstwo roślin poddanych stresowi niedoboru wody w pierwszym roku realizacji projektu (eksperyment wyjściowy) wykazuje lepszą

tolerancję na ten stres niż potomstwo roślin wzrastających w warunkach kontrolnych;

- Linie te cechują się znacznie lepszą wydajnością procesów fotosyntetycznych, większym przyrostem biomasy oraz korzystniejszymi parametrami cech istotnych agronomicznie.
- Analizy transkryptomu roślin będących potomstwem roślin traktowanych stresem suszy w pokoleniu EPI_0 wykazały, że w transkryptomie roślin pokolenia EPI_1 nastąpiły zmiany, które mogą być wynikiem wyindukowanych na poziomie epigenetycznym zmian u roślin rodzicielskich. Wyindukowane zmiany w transkryptomie mogą mieć potencjalnie wpływ na adaptację roślin do warunków stresu abiotycznego.

Wnioski z realizacji projektu w roku 2016, pokolenie Epi_2 – eksperyment przeprowadzony w kontrolowanych warunkach polowych:

- Analizy roślin pokolenia Epi_2 wyprowadzonych w warunkach eksperymentu polowego wykazały istnienie potencjalnych zależności pomiędzy doświadczaniem stresu suszy w pokoleniach rodzicielskich roślin jęczmienia a tolerancją na stres niedoboru wody u potomstwa;
- W warunkach normalnych potomstwo roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody w stadium mejozy w dwóch poprzednich pokoleniach, charakteryzuje się lepszymi wynikami pod względem suchej masy, plonu i masy 1000 ziaren niż potomstwo roślin, które nie doświadczyły stresu suszy;
- Stres suszy zadany roślinom, których dwa poprzednie pokolenia poddawane były stresowi niedoboru wody w stadium mejozy powoduje uzyskiwanie gorszych wyników pod względem liczby pędów i liczby kłosów, jednak tylko nieznacznie wpływa na obniżenie całkowitego plonu (kompensacja dzięki wyższym wartościom masy 1000 ziaren);
- Stres suszy zadany roślinom w stadium siewki nie wywołuje tak istotnych zmian w mierzonych parametrach w kolejnych pokoleniach, jak stres zadany wcześniej w stadium kłoszenia. Wydaje się jednak sprzyjać nieco wyższemu plonowaniu (plon z rośliny oraz masa 1000 ziaren), w przypadku gdy potomstwo tych roślin wzrasta w warunkach normalnych.

Wnioski z realizacji projektu w roku 2017 i 2018, pokolenie Epi_3 – eksperyment przeprowadzony w kontrolowanych warunkach polowych w

powtórzeniach w trzech lokalizacjach geograficznych:

- Analizy roślin pokolenia Epi₃ uprawianych w warunkach polowych wykazały istnienie zależności pomiędzy doświadczaniem stresu suszy w pokoleniach rodzicielskich roślin jęczmienia a tolerancją na stres niedoboru wody u potomstwa;
- W optymalnych warunkach glebowych i pogodowych, potomstwo roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody w stadium mejozy w dwóch i trzech poprzednich pokoleniach, charakteryzuje się istotnie lepszymi wynikami pod względem plonu niż potomstwo roślin, które nie doświadczyły stresu suszy;
- Stres suszy zadany roślinom, których trzy poprzednie pokolenia poddawane były stresowi niedoboru wody w stadium mejozy powoduje uzyskiwanie nieznacznie gorszych wyników pod względem całkowitego plonu (kompensacja dzięki wyższym wartościom masy 1000 ziaren);
- W związku z tym wydaje się, że wykorzystanie materiału siewnego roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody, szczególnie w stadium kłoszenia/mejozy, może mieć korzystny efekt dla plonu roślin uprawianych w warunkach optymalnych w kolejnym pokoleniu.

Wnioski końcowe

Biorąc pod uwagę wyniki analiz fenotypowych roślin poddanych różnym kombinacjom traktowań w kolejnych pokoleniach oraz stabilności transgeneracyjnej zmian wyindukowanych stresem niedoboru wody, które wskazują na stabilny charakter takich zmian, wydaje się, że wykorzystanie materiału siewnego roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody, szczególnie w stadium kłoszenia/mejozy, może mieć korzystny efekt dla plonu roślin w kolejnym pokoleniu a cecha ta może mieć charakter stabilny. Wykazano, że u podstaw tego procesu może leżeć indukcja zmian w poziomie ekspresji kluczowych genów warunkowana częściowo - choć

na niewielką skalę - modyfikacjami epigenetycznymi. W konsekwencji wydaje uzasadnione stwierdzenie, że zmienność epigenetyczna może być wykorzystywana do generowania linii o korzystnych agronomicznie cechach a jej wykorzystanie może znaleźć zastosowanie w programach hodowlanych.

Osiągnięcia projektu

Po raz pierwszy u jęczmienia wykazano – na poziomie fenotypowym i molekularnym – istnienie zależności pomiędzy doświadczaniem stresu suszy w pokoleniach rodzicielskich roślin a tolerancją na stres niedoboru wody u potomstwa. Analizy molekularne wykazały, że związek ten wynika z powstania i utrwalenia zmian epigenetycznych, które skutkują zmienioną ekspresją genów odpowiedzi na stres środowiskowy. W konsekwencji, w optymalnych warunkach glebowych i pogodowych, potomstwo roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody w stadium mejozy w dwóch i trzech poprzednich pokoleniach, charakteryzuje się istotnie lepszymi wynikami pod względem plonu niż potomstwo roślin, które nie doświadczyły stresu suszy. W związku z tym wydaje się, że wykorzystanie materiału siewnego roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody, szczególnie w stadium kłoszenia/mejozy, może mieć korzystny efekt dla plonu roślin uprawianych w warunkach optymalnych w kolejnym pokoleniu. Wykazano więc, że podejście polegające na wprowadzeniu zmian epigenetycznych poprzez przeprowadzenie roślin rodzicielskich przez warunki stresu abiotycznego (tu stres niedoboru wody), może być skutecznym narzędziem znacznie zwiększającym plonowanie roślin potomnych. Ponadto przeprowadzone badania wskazują, że zmienność epigenetyczna może być wykorzystywana do generowania linii jęczmienia (i prawdopodobnie innych zbóż uprawianych w Polsce) o korzystnych agronomicznie cechach, a jej wykorzystanie może znaleźć zastosowanie w programach hodowlanych.

Badania nad wpływem brasinosteroidów na tolerancję roślin jęczmienia na stres niedoboru wody

Studies of the influence of brassinosteroids on tolerance of barley plants to drought stress

Damian Gruszka✉

Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Genetyki
✉ e-mail: damian.gruszka@us.edu.pl

Słowa kluczowe: brasinosteroidy, jęczmień, mutanty, półkarłowość, susza

Powody podjęcia tematyki badawczej i cele zadania

Jakość i wysokość plonu roślin zbożowych determinowana jest w znacznym stopniu przez warunki klimatyczne. Częstotliwość i nasilenie susz w Polsce w ostatnich latach stanowią coraz istotniejszy problem w wymiarze ogólnogospodarczym i środowiskowym. Susza występująca w wegetatywnej fazie rozwoju roślin obniża liczbę wschodzących roślin oraz powoduje silne hamowanie wzrostu siewek. Do szczególnie dużych strat w plonie może również prowadzić wystąpienie suszy w okresie krytycznym, który u zbóż występuje w fazie kłoszenia.

Brasinosteroidy (BR) są sterolowymi fitohormonami, wykazującymi wysoką aktywność w regulowaniu wzrostu i rozwoju roślin. Defekty w procesach biosyntezy i szlaku transdukcji sygnału BR prowadzą do wystąpienia zmian w pokroju roślin, w tym niższego wzrostu. Niższy, półkarłowy wzrost roślin zbożowych przy zachowaniu pełnej płodności jest pożądaną cechą hodowlaną, gdyż zmniejsza podatność roślin na wyleganie w niekorzystnych warunkach polowych, co umożliwia stosowanie wyższych dawek nawozów, a tym samym zwiększenie plonów. Badania z zakresu genomiki funkcjonalnej, dotyczące metabolizmu BR, prowadzone były w największym stopniu na gatunku modelowym – rzodkiewniku pospolitym (*Arabidopsis thaliana*). Doprowadziły one do identyfikacji szeregu genów uczestniczących w tym procesie.

Molekularne podstawy metabolizmu BR są jednak słabo poznane w przypadku roślin uprawnych, w tym zbóż. Co więcej, przed rozpoczęciem projektu brak było danych na temat

reakcji półkarłowych form jęczmienia, cechujących się zaburzeniami metabolizmu BR, na stres niedoboru wody. Biorąc pod uwagę funkcje BR oraz istotne znaczenie półkarłowych form zbóż dla rolnictwa, realizacja tematyki badawczej w tym zakresie jest kluczowa zarówno dla badań podstawowych, jak i potencjalnego wykorzystania rezultatów w hodowli jęczmienia.

Cele prowadzonych badań obejmowały:

- Identyfikację i analizę funkcjonalną genów *HvCPD* oraz *HvDIM1* jęczmienia związanych z biosyntezą BR oraz charakterystykę mutantów cechujących się zaburzeniami w tym procesie
- Określenie reakcji półkarłowych mutantów brasinosteroidowych jęczmienia na stres niedoboru wody w różnych fazach rozwoju roślin
- Określenie wpływu zaburzeń metabolizmu BR na przebieg kluczowych procesów fizjologicznych, w tym: fotosyntezy, wymiany gazowej, homeostazy BR oraz innych fitohormonów oraz akumulacji nieenzymatycznych antyoksydantów w warunkach optymalnego nawodnienia oraz stresu niedoboru wody
- Analizy ilościowe i jakościowe (składu chemicznego) plonu mutantów brasinosteroidowych uzyskanego w warunkach optymalnego nawodnienia oraz stresu niedoboru wody.

Pierwszy z realizowanych tematów badawczych dotyczył identyfikacji i analizy funkcjonalnej dwóch genów jęczmienia, *HvCPD* oraz *HvDIM1*, które kodują enzymy zaangażowane



w proces biosyntezy BR. W przypadku genu *HvCPD* wykazano, że przewidywanym miejscem jego lokalizacji jest rejon centromerowy chromosomu 5H. Zastosowanie metod biologii molekularnej umożliwiło identyfikację pełnej sekwencji genomowej o łącznej długości 2869 pz. Gen *HvCPD* zbudowany jest z siedmiu eksonów rozdzielonych intronami o zróżnicowanej długości. Sekwencjonowanie genu *HvCPD* umożliwiło identyfikację mutacji w przypadku linii BW084 (*brh13.p*) oraz BW089 (*brh18.ac*). Oba aminokwasy, Pro-445 oraz Pro-479, które uległy zmianie w wyniku zidentyfikowanych mutacji są wysoce konserwowane wśród homologicznych polipeptydów pochodzących zarówno z gatunków jedno- jak i dwuliściennych (Dockter i in., 2014).

Kolejnym genem poddanym analizie funkcjonalnej był *HvDIM1*. Przeprowadzone analizy wykazały, że gen *HvDIM1* jest zlokalizowany w telomerowej części długiego ramienia chromosomu 7H. Gen *HvDIM1* zbudowany jest z trzech eksonów, a jego łączna długość to 4101 pz. Sekwencjonowanie genu *HvDIM1* umożliwiło zidentyfikowanie mutacji w następujących liniach: BW053 (*ari-o.40*), BW072 (*brh.af*), BW085 (*brh14.q*), BW087 (*brh16.v*), BW325 (*ert-u.56*) oraz BW333 (*ert-zd.159*). Aminokwasy, które uległy zmianie w wyniku zidentyfikowanych mutacji w genie *HvDIM1* są wysoce konserwowane wśród homologicznych polipeptydów pochodzących zarówno z gatunków jedno- jak i dwuliściennych, co świadczy o istotnej roli tych aminokwasów w formowaniu struktury trzeciorzędowej polipeptydu *HvDIM1*, a tym samym w funkcji katalitycznej tego enzymu (Dockter i in., 2014). Potwierdzeniem funkcji enzymów *HvCPD* oraz *HvDIM1* była analiza stężenia endogennego kastasteronu, jako końcowego produktu biosyntezy BR u linii ze zidentyfikowanymi mutacjami w analizowanych genach oraz odmiany 'Bowman', jako genotypu referencyjnego. U linii niosących mutacje w genach *HvCPD* oraz *HvDIM1* odnotowano znaczące obniżenie stężenia kastasteronu, co potwierdza funkcje zidentyfikowanych genów i jednocześnie wskazuje genetyczne podłoże fenotypu badanych mutantów (Dockter i in., 2014).

Badania prowadzone w ramach kolejnych tematów badawczych dotyczyły charakterystyki reakcji półkarłowych mutantów BR jęczmienia na stres niedoboru wody

Przeprowadzone analizy wykazały, że zaburzenia metabolizmu BR u badanych mutantów nie wpływają na sprawność fotosystemu II. Nie

stwierdzono również istotnych różnic w zawartości barwników fotosyntetycznych wśród wszystkich analizowanych genotypów. Podczas prowadzonych obserwacji stwierdzono, że w reakcji na stres niedoboru wody rośliny półkarłowych mutantów BR wykazywały opóźniony moment wędnięcia i dłużej utrzymywały turgor w porównaniu z roślinami odmiany 'Bowman'. Opóźniony moment wędnięcia może być spowodowany półkarłowym fenotypem tych mutantów i mniejszą wartością biomasy części nadziemnych tych form, co wiąże się z mniejszym zapotrzebowaniem na wodę w warunkach jej niedoboru, w porównaniu z roślinami odmiany 'Bowman' (Gruszka i in., 2016). Należy również podkreślić, że w odróżnieniu od roślin odmiany 'Bowman', u roślin analizowanych mutantów BR nie odnotowano obniżenia aktywności enzymu Rubisco pod wpływem stresu suszy.

Analiza akumulacji endogennych BR wykazała, że w odpowiedzi na stres niedoboru wody stężenie kastasteronu (najbardziej aktywnej biologicznie formy BR u jednoliściennych) uległo znaczącemu zwiększeniu u wszystkich analizowanych genotypów, jednak efekt ten był najbardziej znaczący w przypadku mutantów niewrażliwych na BR. Ten wynik wskazuje, że kastasteron pełni rolę w regulacji odpowiedzi roślin jęczmienia na stres niedoboru wody (Gruszka i in., 2016).

Analiza profilu akumulacji biologicznie aktywnej formy giberelin, GA_7 , wykazała, że w warunkach kontrolnych mutanty BR zawierały znacząco obniżone koncentracje tego związku (ok. 14% – 46% wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'). Stres niedoboru wody spowodował znaczący wzrost akumulacji endogennej GA_7 u wszystkich analizowanych genotypów. W rezultacie w warunkach stresu suszy koncentracje endogennej GA_7 były porównywalne u wszystkich analizowanych genotypów. Te wyniki wskazują, że u jęczmienia GA_7 jest główną aktywną biologicznie formą giberelin, której akumulacja jest znacząco indukowana przez stres suszy (Gruszka i in., 2016).

W warunkach kontrolnych akumulacja kwasu absycynowego (ABA) u mutantów BR osiągała podobne wartości do odnotowanych u odmiany 'Bowman'. Stres niedoboru wody spowodował bardzo znaczący wzrost akumulacji ABA u wszystkich analizowanych genotypów. Wyniki te wskazują, że zaburzenia w biosyntezie lub sygnalizacji BR nie wpływają na homeostazę ABA w warunkach kontrolnych, jak również nie zmniejszają zdolności mutantów BR do reakcji na stres niedoboru wody,

objawiającej się znaczącym wzrostem akumulacji ABA (Gruszka i in., 2016).

W warunkach kontrolnych wszystkie mutanty BR zawierały znacząco obniżone stężenia kwasu jasmonowego (JA) w porównaniu do odmiany 'Bowman'. Uzyskane wyniki wskazują, że u jęczmienia homeostaza JA jest zależna od biosyntezy i sygnalizacji BR. Stres niedoboru wody spowodował bardzo znaczący wzrost akumulacji JA u wszystkich analizowanych genotypów, co wskazuje, że mutanty BR zachowują zdolność znaczącego zwiększania akumulacji JA w reakcji na stres suszy (Gruszka i in., 2016).

Przeprowadzone badania wykazały również, że zaburzenia metabolizmu BR wpływają na akumulację nieenzymatycznych antyoksydantów. W warunkach kontrolnych mutanty niewrażliwe na BR wykazywały znacznie niższą akumulację glutationu. Uzyskane wyniki wskazują, że prawidłowy przebieg sygnalizacji BR jest konieczny dla odpowiedniej akumulacji glutationu (szczególnie formy zredukowanej – GSH). W stresie suszy najwyższą zawartość glutationu odnotowano u odmiany 'Bowman', a u mutantów BR akumulacja glutationu była obniżona (Gruszka i in., 2018). Wykazano również, że zaburzenia metabolizmu BR wpływają na akumulację innych nieenzymatycznych antyoksydantów – tokoferoli. W warunkach kontrolnych stężenia α -tokoferolu i γ -tokoferolu były znacząco niższe u mutantów BR niż u odmiany 'Bowman'. Zróżnicowana zawartość α - i γ -tokoferolu występowała zarówno u roślin rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia, jak i w warunkach suszy. Niedobór wody powodował proporcjonalne zwiększenie produkcji tych tokoferoli zarówno u odmiany Bowman, jak i mutantów BR, jednak u mutantów BR stężenia obu antyoksydantów pozostały znacznie obniżone w porównaniu do odmiany 'Bowman'. Uzyskane wyniki wskazują, że endogenne BR oraz prawidłowy przebieg ich biosyntezy i sygnalizacji są konieczne dla normalnej akumulacji tokoferoli u jęczmienia (Gruszka i in., 2018).

Biorąc pod uwagę, że wystąpienie deficytu wody w trakcie kłoszenia ma znaczący wpływ na poziom plonu, określenie reakcji półkarłowych mutantów BR jęczmienia na stres suszy w tej fazie rozwoju było również bardzo istotne

Pierwszym z analizowanych parametrów była krzewistość ogólna (całkowita liczba źdźbeł, wliczając odrosty wegetatywne). W warunkach kontrolnych najwyższą wartość tego parametru odnotowano w przypadku niewrażliwej na BR linii

BW312 (ok. 141% wartości odnotowanej u odmiany Bowman) i była ona istotnie wyższa od wartości odnotowanych w przypadku pozostałych genotypów. Stres suszy spowodował znaczne zwiększenie krzewistości ogólnej u niemal wszystkich analizowanych genotypów. W warunkach stresu suszy większość analizowanych genotypów wykazywała zbliżone wartości krzewistości ogólnej.

Analiza krzewistości produkcyjnej (liczba źdźbeł z kłosami) w warunkach kontrolnych oraz podczas stresu suszy pozwoliła na dokonanie kilku istotnych spostrzeżeń. W warunkach kontrolnych wszystkie analizowane genotypy cechowały się bardzo zbliżonymi wartościami tego parametru. W warunkach niedoboru wody najwyższą wartość krzewistości produkcyjnej wykazywały linie BW312 oraz BW091, przy czym wartość odnotowana w przypadku linii BW312 była istotnie wyższa od pozostałych i stanowiła ok. 145% wartości odnotowanej u odmiany 'Bowman'. Najniższą wartość krzewistości produkcyjnej odnotowano u odmiany 'Bowman'.

Kolejnym z analizowanych parametrów plonowania była masa ziaren przypadająca na roślinę. W warunkach kontrolnych najwyższe wartości odnotowano w przypadku odmiany Bowman i linii BW333, przy czym różnica między tymi wartościami nie była istotna statystycznie. W warunkach suszy najwyższą wartość średniej masy ziaren przypadającej na roślinę wykazała linia BW312 i była ona istotnie wyższa od wartości odnotowanych u pozostałych genotypów. Ten wynik koreluje z obserwowaną krzewistością produkcyjną w warunkach stresu niedoboru wody, która miała najwyższą wartość właśnie w przypadku linii BW312.

Ostatnim z parametrów charakteryzujących plonowanie analizowanych genotypów była masa 1000 ziaren. W warunkach kontrolnych większość z analizowanych genotypów wykazywała zbliżone wartości tego parametru. Najwyższą wartość odnotowano w przypadku linii BW312 i była ona istotnie wyższa od wartości tego parametru u innych genotypów. W warunkach suszy u wszystkich analizowanych genotypów odnotowano podobne wartości tego parametru (dane niepublikowane).

W kolejnych badaniach dokonano analiz jakościowych (składu chemicznego) plonu ziaren mutantów BR jęczmienia oraz odmiany referencyjnej 'Bowman'

W eksperymentach przeprowadzonych w warunkach kontrolowanych zawartości składników mineralnych, błonnika oraz białka (ogółem)

były u badanych mutantów BR odnotowane na poziomie co najmniej tak wysokim, jak u odmiany 'Bowman' zarówno w warunkach optymalnego nawodnienia, jak i po zastosowaniu stresu niedoboru wody w fazie siewki oraz kłoszenia. W przypadku zawartości skrobi w warunkach kontrolnych (optymalne nawodnienie) nie odnotowano różnic między badanymi genotypami. Po zastosowaniu stresu niedoboru wody w fazie siewki obniżoną zawartość skrobi odnotowano u mutantów niewrażliwych na BR.

W eksperymentach przeprowadzonych w warunkach polowych zawartości składników mineralnych, błonnika, białka (ogółem) oraz skrobi były u badanych mutantów BR odnotowane na poziomie co najmniej tak wysokim, jak u odmiany 'Bowman' (dane niepublikowane).

Wnioski z badań prowadzonych w ramach realizowanego zadania:

- Wielokierunkowa analiza funkcjonalna genów *HvCPD* oraz *HvDIM1* połączona z analizą akumulacji endogenego kastasteronu u mutantów cechujących się mutacjami w tych genach potwierdziła funkcje kodowanych enzymów oraz ich rolę w regulacji architektury roślin.
- Zaburzenia metabolizmu BR u badanych mutantów nie wpływają na sprawność fotosystemu II oraz zawartość barwników fotosyntetycznych
- Półkarłowe mutanty BR jęczmienia wykazują zwiększoną tolerancję na stres niedoboru wody
- Stężenie BR (kastasteronu) wzrasta w reakcji na stres niedoboru wody
- BR regulują homeostazę innych fitohormonów (gibereliny GA₁ i kwasu jasmonowego) u jęczmienia w warunkach optymalnego nawodnienia
- BR regulują homeostazę kluczowych nieenzymatycznych antyoksydantów zarówno

w warunkach optymalnego nawodnienia, jak i podczas stresu niedoboru wody

- W warunkach stresu niedoboru wody w fazie kłoszenia najwyższą wartość krzewistości produkcyjnej oraz średniej masy ziaren przypadającej na roślinę wykazała niewrażliwa na BR linia BW312.

Wykaz publikacji wyników

- Dockter* C., Gruszka* D., Braumann I., Druka A., Druka I., Franckowiak J., Gough S.P., Janeczko A., Kurowska M., Lundqvist J., Lundqvist U., Marzec M., Matyszczyk I., Müller A.H., Oklestkova J., Schulz B., Zakhrebekova S., Hansson M. 2014. Induced variations in brassinosteroid genes define barley height and sturdiness, and expand the green revolution genetic toolkit. *Plant Physiology* 166: 1912–1927. (*obaj autorzy w równym stopniu przyczynili się do powstania publikacji)
- Janeczko A., Gruszka D., Pocięcha E., Dziurka M., Filek M., Jurczyk B., Kalaji H.M., Kocurek M., Waligorski P. 2016. Physiological and biochemical characterisation of watered and drought-stressed barley mutants in the HvDWARF gene encoding C6-oxidase involved in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology and Biochemistry*, 99: 126–141.
- Gruszka D., Janeczko A., Dziurka M., Pocięcha E., Oklestkova J., Szarejko I. 2016. Barley brassinosteroid mutants provide an insight into phytohormonal homeostasis in plant reaction to drought stress. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1824.
- Gruszka D., Janeczko A., Dziurka M., Pocięcha E., Fodor J. 2018. Non-enzymatic antioxidant accumulations in BR-deficient and BR-insensitive barley mutants under control and drought conditions. *Physiologia Plantarum*, 163: 155–169
- Gruszka D. 2018. Crosstalk of the brassinosteroid signalosome with phytohormonal and stress signaling components maintains a balance between the processes of growth and stress tolerance. *International Journal of Molecular Sciences*, 19: 2675.

Identyfikacja czynników determinujących odporność jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) na suszę i mróz

Identification of factors which determine drought and freezing tolerance in barley (*Hordeum vulgare* L.)

Iwona Żur¹✉, Ewa Dubas¹, Monika Krzewska¹, Anna Nowicka¹, Przemysław Kopec¹, Tomasz Hura¹, Agnieszka Ostrowska¹, Sabina Malaga¹, Anna Janeczko¹, Gabriela Gołębiowska-Pikania², Marcin Rapacz³, Magdalena Wójcik-Jagła³

¹Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* PAN, ul. Niezapominajek 21, 30–239 Kraków

²Instytut Biologii, Uniwersytet Pedagogiczny, ul. Podchorążych 2, 31–054 Kraków

³Katedra Fizjologii, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy, Podłużna 3, 30–239 Kraków

✉ e-mail: i.zur@ifr-pan.edu.pl

Słowa kluczowe: abiotyczne czynniki stresowe, hartowanie, mrozoodporność, susza, tolerancja

Cel prowadzonych badań

Jęczmień ozimy jest gatunkiem zboża o wysokim potencjale plonotwórczym i dużej wartości użytkowej i paszowej. Potencjalnie wysoka produktywność tego zboża jest jednak znacząco obniżana przez niską zimotrwałość tego gatunku, wynikającą przede wszystkim z jego niskiej odporności na mróz oraz niską tolerancję na niedobory wody występujące w fazie rozwoju generatywnego. Występowanie tych stresów może powodować znaczący spadek plonu oraz ogranicza areał uprawy jęczmienia ozimego do rejonów Polski o łagodniejszym klimacie.

Ze względu na fakt, iż zarówno mrozoodporność jak i odporność na suszę są cechami złożonymi, warunkowanymi przez szereg genów o zróżnicowanym sposobie dziedziczenia i interakcjach, strategia piramidyzacji korzystnych genów wydaje się być najbardziej odpowiednia. Jednak korzystny układ wielu alleli leżący u podłoża tolerancji na stresy środowiskowe może zostać zaburzony wskutek rekombinacji w kolejnych pokoleniach. Jedną z możliwości ominięcia tego problemu jest wykorzystanie technologii podwojonych haploidów (ang. *doubled haploids*, DH), prowadzącej do powstania całkowicie homozygotycznych linii hodowlanych. Ich zaletą jest możliwość jednoznacznej oceny genotypu, stabilność genetyczna oraz znaczne poszerzenie (zarówno *in plus* jak i *in minus*) zakresu

zmienności badanych cech.

Celem projektu była identyfikacja fizjologicznych, metabolomicznych i molekularnych podstaw adaptacji jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) do badanych czynników stresowych w najbardziej krytycznych fazach rozwojowych: temperatur mrozowych występujących w fazie siewki oraz suszy glebowej występującej w fazie kłoszenia. W obliczu dynamicznych zmian klimatycznych, postępującej degradacji środowiska naturalnego oraz wymogów nowoczesnych, zrównoważonych systemów produkcji rolniczej poszerzenie wiedzy dotyczącej mechanizmów determinujących odporność na suszę i mróz oraz opracowanie wiarygodnych procedur selekcji roślin o zwiększonej tolerancji na te czynniki stresowe może mieć istotne znaczenie dla uprawy tego gatunku.

Badania przeprowadzono na wyselekcjonowanych liniach DH, o istotnie różnej odporności na wyżej wymienione czynniki stresowe, które analizowano pod względem profilu białkowego, sprawności systemu antyoksydacyjnego, podłoża hormonalnego i poziomu ekspresji wybranych genów. Uzyskane wyniki pozwoliły na identyfikację czynników istotnie związanych z wysoką tolerancją na suszę i mróz.

Materiały i Metody

Wstępny materiał roślinny stanowiło 75 linii hodowlanych jęczmienia ozimego pochodzących



z polskich i zagranicznych firm hodowlanych (DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o., Saaten-Union GmbH, Secobra Saatzucht GmbH). Linie DH wyprowadzono metodą kultur pylnikowych opracowaną w IFR PAN na podstawie danych literaturowych oraz badań własnych.

Ocenę mrozoodporności wyprowadzonych linii DH wykonano wstępnie po mrożeniu odciętych liści (8h w -15°C) na podstawie pomiaru parametrów fluorescencji chlorofilu a. Analizie poddano również szybkość utraty wody z liści mierzoną metodą wagową (Malaga i in. 2016). Wybrane wstępnie linie DH namnożono, a uzyskane potomstwo podano dalszym testom w kontrolowanych warunkach szklarniowych, odpowiednio w fazie 3-liściowej siewki oraz w fazie kłoszenia (Gołębiowska-Pikania i in. 2017 a, b). Uzyskane wyniki pozwoliły na wyselekcjonowanie 10 linii DH skrajnie różnicowanych pod względem poziomu tolerancji na suszę i mróz, które stanowiły obiekt dalszych, szczegółowych badań.

Badania prowadzono w dwóch układach eksperymentalnych:

1. ze względu na fakt, iż tolerancja na mróz jest cechą indukowaną pod wpływem niskich temperatur, materiał do badań (liście) pobierano z siewek w fazie 3–4 liści, po 3 tyg. hartowania w $4/2^{\circ}\text{C}$ (dzień/noc). Obiekt kontrolny stanowiły siewki rosnące w $25/17^{\circ}\text{C}$ (dzień/noc).
2. obiekt badań stanowiły również liście pobierane z roślin w fazie kłoszenia, po 3 tyg. wzrostu w warunkach suszy (35% połowej pojemności wody, ppw). Obiekt kontrolny stanowiły rośliny rosnące w warunkach optymalnego nawodnienia (75% ppw).

Analizy proteomiczne (Gołębiowska-Pikania i in. 2017 a, b)

Białka wyekstrahowano metodą fenolową i rozdzielono za pomocą elektroforezy dwuwymiarowej (2DE). Analizy uzyskanych elektroforegramów wykonywano w programie PDQuest 8.0 (Bio-Rad). Wybrane białka najsilniej różnicujące badane linie DH, zostały wyekstrahowane i zidentyfikowane metodą MALDI-TOF MS/MS.

Aktywność systemu antyoksydacyjnego (Gołębiowska-Pikania i in. 2017a, b)

Sumaryczą zawartość wszystkich antyoksydantów drobnocząsteczkowych oznaczono kolorymetrycznie metodą DPPH (2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl) wg. Brand-Williams i in. (1995).

Pomiary aktywności enzymów antyoksydacyjnych: dysmutazy anionorodnika ponadtlenkowego (SOD), katalazy (CAT) i peroksydazy niespecyficznej (POX) wykonano spektrofotometrycznie, odpowiednio metodami: cytochromową wg. Minami i Yoshikawa (1979), Aebi (1984) i Luck (1963).

Analizy zawartości substancji wzrostowych (Malaga i in. 2020)

Zawartość kwasu abscysynowego (ABA) zmierzono pośrednią immunometodą ELISA wg. Walker-Simmons i Abrams (1991) z zastosowaniem monoklonalnych, specyficznych przeciwciał MAC 252 (Babraham Technix, Cambridge, UK).

Zawartość kwasu salicylowego (SA) oraz brasi-nosteroidów (BR) zmierzono metodą ultrasprawną chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemową spektrometrią masową [UPLC-ESI(+)-M/MS] odpowiednio wg zmodyfikowanego protokołu Moravcova i in. (2018) oraz Oklestkova i in. (2017).

Analizy molekularne genów potencjalnie zaangażowanych w determinację odporności na mróz i suszę (Wójcik-Jagła i in. 2020)

Selekcję wybranych do badań genów, kodujących: elongation factor 1 α (EF1 α), reduktazę ferrodoksyna-NADP, białko 14–3-3a, β -fructofuranazydazę, białka CBF4B i CBF2A, aktywną, transketolazę, peryplazmatyczną proteazę serynową, izomerazę triozofosforanową, gen *groES* kodujący białko z regionem ko-chaperonu oraz gen *pfam14200* kodujący białko ricin-type β -trefoil lectin domain-like, przeprowadzono na podstawie wyników analiz proteomicznych opublikowanych w pracach Gołębiowska i in. (2017a, b).

Sekwencje aminokwasowe wybranych białek analizowano przy pomocy aplikacji tblastn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=tblastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome). Dla każdego analizowanego genu zaprojektowano startery wykorzystując program Primer3Plus (<https://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>). Analizę ekspresji genów przeprowadzono techniką ilościowego RT qPCR.

Wyniki

Temat badawczy 1: Ocena stopnia odporności na mróz i suszę oraz selekcja form skrajnie różnicowanych w obrębie wyprowadzonej populacji linii DH jęczmienia ozimego (Malaga i in.2016)

Zastosowanie zoptymalizowanej metody kultur pylnikowych pozwoliło na uzyskanie ponad 3000 zielonych regenerantów, z których 1090 osiągnęło fazę kłoszenia. Analiza cytometryczna wykazała,

iż frekwencja roślin DH wyniosła 57%.

Wyniki testów odporności na suszę przeprowadzonych w fazie siewki oraz w fazie kłoszenia oraz testów odporności na mróz (analizy zmian zawartości wody w liściach, potencjału osmotycznego (Ψ_o) soku komórkowego oraz parametrów fluorescencji chlorofilu *a* i przeżywalności) stanowiły kryterium końcowej selekcji 10 linii DH o istotnym zróżnicowaniu odporności na suszę i mróz.

Temat badawczy 2: Analizy proteomiczne linii DH jęczmienia ozimego skrajnie zróżnicowanych pod względem odporności na suszę i mróz (Gołbiowska-Pikania i in. 2017a, b)

Większość puli zidentyfikowanych białek różniących linie DH o różnym poziomie tolerancji na suszę i mróz związana jest z procesem fotosyntezy (np. izoformy A i B aktywazy RuBisCO, białko strukturalne dużej podjednostki RuBisCO). Kolejne zidentyfikowane białka (transketolaza, dehydrogenaza aldehydu 3-fosfoglicerynowego, aldolaza fruktozo-1,6-bisfosforanu, kinaza fosfoglicerynowa i fosfataza sedoheptulozo-1,7-bisfosforanowa) uczestniczą w cyklu Calvina. Zidentyfikowano również białko OEE1 (oxygen-evolving enhancer protein 1) uczestniczące w reakcjach fazy świetlnej procesu fotosyntezy.

W reakcji na hartowanie istotne zmiany akumulacji obserwowano w przypadku białek związanych z metabolizmem energetycznym (fosfogliceromutaza zależna od 2,3-bisfosfoglicerynianu, izomeraza triozofosforanowa, dehydrogenaza jabłczanowa, urydylotransferaza utp-glukozy-1-fosforanowa, karboksylaza fosfoenolpirogrotonianowa i fruktozo-1,6-bisfosfataza). Dwa z nich (izomeraza triozofosforanowa i dehydrogenaza jabłczanowa) wydają się pełnić istotną funkcję również w odpowiedzi na stres suszy. Zidentyfikowano również białka typowe dla reakcji obronnych (S-transferazę glutationową i oksydazę poliaminową) biorące udział w odpowiedzi na stres oksydacyjny. Spora pula zidentyfikowanych białek uczestniczy w procesach syntezy, przemianach potranslacyjnych i metabolizmie białek. Począwszy od transkrypcji (2'-metylotranferaza guanino-tRNA) i dojrzewania RNA (chloroplast stem-loop binding protein), translacji (białka L12-3, L19-1, S3 i Sa2, ribosomal-recycling factor), modyfikacjach potranslacyjnych (β -1,3-galaktozylotransferaza) i transporcie (białka MCF), a skończywszy na procesie degradacji (PLCPs, cynkowa metaloproteinaza).

Temat badawczy 3: Analiza zawartości endogennych substancji hormonalnych (ABA, SA, BR) uczestniczących w nabywaniu odporności na stresy

abiotyczne (Malaga i in. 2020)

Zawartość ABA w siewkach wybranych linii DH wynosiła od 1,1 do 2,4 nmol g⁻¹ s.m. Pod wpływem hartowania nastąpił istotny spadek, (średnio o 33%) zawartości tego hormonu. Analiza korelacji pomiędzy konstytutywną zawartością ABA i poziomem mrozooporności badanych linii DH wykazała, że są istotnie ujemnie skorelowane ($r = -0,655$). Wykazano również, iż po usunięciu danych dla jednej z badanych linii DH (łamacz korelacji) względna zawartość ABA (% kontroli) w liściach po hartowaniu siewek koreluje dodatnio z poziomem tolerancji na mróz ($r = 0,718$, $p \leq 0,05$).

Zawartość ABA w liściach roślin w fazie kłoszenia, rosnących w warunkach optymalnego nawodnienia (75% ppw) wynosiła od 1,53 do 2,62 nmol g⁻¹ s.m i nie była istotnie zróżnicowana. Wynikiem suszy glebowej była intensywne akumulacja ABA (10,01 -20,12 nmol g⁻¹ s.m.), amplituda zmian była istotnie uzależniona od cech genotypowych.

Zawartość SA w siewkach badanych linii DH była istotnie zróżnicowana i wynosiła od 0,68 do 3,83 ng g⁻¹ św.m. Średnia zawartość SA była istotnie wyższa dla linii DH o wyższym poziomie tolerancji na mróz w stosunku do genotypów wrażliwych. U większości badanych linii DH, proces hartowania wywołał istotny, prawie 2-krotny spadek zawartości SA (średnio z 1,76 do 0,80 ng g⁻¹ św.m.). Nie wykazano jednak związku pomiędzy zawartością SA w liściach siewek hartowanych a poziomem tolerancji na mróz.

Średnia zawartość SA w liściach roślin w generatywnej fazie rozwoju była istotnie (ponad 5,5-krotnie) wyższa wynosząc od 1,9 do 24,9 ng g⁻¹ św.m. Istotny wpływ suszy na zawartość SA zaobserwowano jedynie w przypadku linii DH o wysokim poziomie tolerancji, u których susza wywołała istotny spadek zawartości tego hormonu (średnio z 15,5 do 4,5 ng g⁻¹ św.m.).

Bez względu na warunki wzrostu, w siewkach badanych linii DH wykazano jedynie obecność homokastasteronu (BR₁₂). Zawartość BR₁₂ była istotnie uzależniona od cech genotypowych i istotnie wyższa w siewkach linii DH wrażliwych na niskie temperatury. Jednak, tylko u linii DH o wyższym poziomie tolerancji na mróz obserwowano istotny, prawie 2-krotny wzrost zawartości tego BR pod wpływem hartowania.

W roślinach w fazie kłoszenia średni poziom BR₁₂ był prawie 5-krotnie wyższy w stosunku do fazy siewki. Wykryto również obecność kastasteronu (BR₂), teasteronu (BR₈) i dolicholidu (BR₃), jednakże poziom akumulacji tych BR był znacząco niższy. U większości linii DH deficyt

wody wywarł istotny wpływ na zawartość BR. Większość wrażliwych na suszę linii DH wykazała istotny wzrost zawartości BR₁₂, BR₈ i BR₃. Poziom tych BR pozostawał nie zmieniony w przypadku linii DH lepiej tolerujących deficyt wody w podłożu. I odwrotnie, linie DH o wyższej tolerancji na suszę reagowały wyraźnym wzrostem zawartości BR₂, czego nie obserwowano u linii bardziej wrażliwych na ten czynnik stresowy.

Temat badawczy 4. Analiza aktywności enzymatycznego i niskocząsteczkowego systemu antyoksydacyjnego (Gołębiowska–Pikania i in. 2017a, b)

Wykazano istotne różnicowanie aktywności antyoksydacyjnej, zarówno w liściach siewek jak i w liściach pobieranych z roślin w fazie kłoszenia, a jej poziom uzależniony był od genotypu rośliny, warunków środowiskowych i interakcji pomiędzy tymi czynnikami.

Hartowanie wywołało istotne zmiany w aktywności SOD. Z jednym wyjątkiem, bardziej tolerancyjne linie DH charakteryzowały się istotnie wyższą aktywnością tego enzymu w porównaniu do linii o wysokiej wrażliwości na temperatury mrozowe. Efektem działania suszy był drastyczny spadek aktywności SOD u linii DH o niskim poziomie tolerancji. Równocześnie u linii DH o najwyższym poziomie tolerancji aktywność SOD wzrosła lub nie uległa zmianie.

Proces hartowania drastycznie obniżył aktywność CAT u wszystkich badanych linii DH. Średnio, aktywność CAT zmalała o ponad 45% w stosunku do warunków kontrolnych. Obserwowana amplituda zmian była istotnie wyższa dla linii DH o niższej tolerancji na temperatury mrozowe.

Istotnym różnicowaniem aktywności CAT charakteryzowały się również rośliny rosnące w warunkach suszy. Tylko w przypadku trzech linii DH, w tym dwóch o najwyższym poziomie tolerancji na suszę, deficyt wody w podłożu nie wywołał spadku aktywności CAT. Istotne znaczenie wydaje się również posiadać amplituda obserwowanych zmian: największa, w przypadku linii DH wrażliwych na suszę.

U większości badanych linii DH aktywność POX rosła pod wpływem obu czynników stresowych. Podobnie jak w przypadku CAT charakterystyczną cechą różnicującą linie o istotnie różnej wrażliwości na mróz była wyraźna wyższa stabilność tego enzymu u tolerancyjnych linii DH. Aktywność POX po suszy była natomiast istotnie wyższa u linii DH wrażliwych na suszę.

Proces hartowania nie wpłynął istotnie na całkowitą aktywność antyoksydantów

drobnocząsteczkowych (AntyOx). Dla większości badanych linii DH obserwowane zmiany były genotypowo specyficzne i statystycznie nieistotne. W reakcji na suszę aktywność AntyOx u większości linii DH spadła, nie wykazano jednak istotnego związku tego parametru z poziomem tolerancji na suszę.

Temat badawczy 5: Analizy molekularne genów potencjalnie zaangażowanych w determinację odporności na mróz i suszę (Wójcik-Jagła i in. 2020)

Analiza ekspresji wybranych genów wykazała różnicowany poziom ekspresji pomiędzy liniami DH zarówno w przypadku hartowania na mróz, jak i suszy glebowej. Jednakże obserwowane zmiany poziomu ekspresji jedynie częściowo wiązały się ze stopniem tolerancji na badane stresy.

W przypadku hartowania na mróz wyraźnie kontrastowały ze sobą reakcje linii wrażliwej na mróz oraz mrozoodpornej. W przypadku wszystkich genów poziom ich ekspresji był statystycznie istotny, a w przypadku trzech odwrotny był kierunek obserwowanych zmian.

W przypadku suszy poziom ekspresji wszystkich badanych genów uległ obniżeniu. Co więcej, u linii DH lepiej tolerujących deficyt wody poziom ekspresji większości analizowanych genów uległ silniejszemu obniżeniu niż u linii DH wrażliwych na suszę. Geny te nie są bezpośrednio związane z tolerancją suszy, kodują natomiast białka uczestniczące w podstawowym metabolizmie komórkowym oraz potencjalnie związane z transdukcją sygnału.

Wnioski

1. Wyprowadzona populacja linii DH jęczmienia ozimego wykazała istotne różnicowanie pod względem odporności na suszę i mróz, co potwierdziło poprawność założeń projektu dotyczących możliwości rozszerzenia zakresu zmienności poszczególnych cech poprzez homozygotyzację genomu w procesie androgenyzy.
2. Badane linie DH jęczmienia ozimego charakteryzują się istotnym różnicowaniem profili białkowych zarówno w roślinach kontrolnych, roślinach poddanych hartowaniu i rosnących w warunkach suszy. Różnice miały głównie charakter ilościowy, co sugeruje ewolucyjne przystosowanie do niekorzystnych warunków środowiskowych. Dla obu stresów największe znaczenie ma prawidłowe funkcjonowanie aparatury fotosyntetycznej oraz metabolizm energetyczny.

3. Istotne znaczenie dla poziomu odporności na mróz ma konstytutywny poziom ABA w siewkach oraz amplituda zmian indukowanych działaniem niskiej temperatury. Natomiast, zawartość ABA w liściach roślin rosnących w warunkach suszy odzwierciedla poziom stresu, a nie poziom tolerancji na ten czynnik stresowy.
4. Linie DH o najwyższym poziomie tolerancji na oba czynniki stresowe (mróz, susza) charakteryzuje wysoki poziom SA w roślinach rosnących w warunkach fizjologicznie optymalnych oraz istotny spadek zawartości tego hormonu pod wpływem stresu.
5. Profil BR związany jest zarówno z fazą rozwojową jak i poziomem tolerancji na badane abiotyczne czynniki stresowe. Zmiany zawartości niektórych BR wydają się być istotnie związane z poziomem odporności na mróz (homokastasteron) i suszę (kastasteron). Akumulacja innych BR (homokastasteronu, teasteronu i dolicholodu) w reakcji na deficyt wody może stanowić potencjalny marker identyfikujący genotypy o wysokim poziomie wrażliwości.
6. Aktywność enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego ma istotne znaczenie dla poziomu tolerancji na mróz i suszę. Najbardziej istotnym elementem tolerancji na suszę jest zdolność od podtrzymania wysokiej aktywności enzymów antyoksydacyjnych (SOD i CAT), chroniących rośliny przed skutkami stresu oksydacyjnego. Rola POX i antyoksydantów drobnocząsteczkowych wydaje się mniej istotna.
7. Wyższy poziom tolerancji na badane stresy środowiskowe związany jest z obniżeniem ekspresji genów związanych z podstawowym metabolizmem komórkowym.

Osiągnięcia projektu

Przeprowadzone badania pozwoliły na identyfikację szeregu czynników fizjologicznych, metabolomicznych i molekularnych, stanowiących kryterium wysokiego poziomu odporności jęczmienia ozimego na suszę i mróz. Analiza uzyskanych wyników ma istotne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów adaptacyjnych, pozwoli również na opracowanie wiarygodnych procedur selekcji roślin o zwiększonej tolerancji na te czynniki stresowe.

Uzyskana populacja linii DH stanowić może zarówno obiekt dalszych badań o charakterze podstawowym jak i źródło cennych alleli w programach hodowlanych.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

- Malaga S., Krzewska M., Nowicka A., Dubas E., Ostrowska A., Wójcik-Jagła M., Hura T., Rapacz M. 2016. Increasing tolerance to abiotic stresses by haplodiploidization in *Hordeum vulgare* (L.) plant functioning under environmental stress. W: Plant Functioning Under Environmental Stress (red. Grzesiak M., Rzepka A., Hura T., Grzesiak S.). Monografia IFR PAN w Krakowie, str. 37–46.
- Gołębiowska-Pikania G., Kopeć P., Surówka E., Krzewska M., Dubas E., Nowicka A., Rapacz M., Wójcik-Jagła M., Malaga S., Żur I. 2017. Changes in protein abundance and activity involved in freezing tolerance acquisition in winter barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Proteomics* 169: 58–72.
- Gołębiowska-Pikania G., Kopeć P., Surówka E., Janowiak F., Krzewska M., Dubas E., Nowicka A., Kasprzyk J., Ostrowska A., Malaga S., Hura T., Żur I. 2017. Changes in protein abundance and activity induced by drought during generative development of winter barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Proteomics* 169:73-86
- Żur I., Dubas E., Malaga S., Janowiak F., Janeczko A., Rapacz M., Hura T., Waligórski P., Ostrowska A., Wójcik-Jagła M. 2019. Identyfikacja czynników determinujących odporność jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.) na suszę i mróz. *Biuletyn IHAR* 286: 113–116.
- Malaga S., Janeczko A., Janowiak F., Waligórski P., Oklestkova J., Dubas E., Krzewska M., Nowicka A., Surówka E., Rapacz M., Wójcik-Jagła M., Kopeć P., Hura T., Ostrowska A., Kaczanowska K., Żur I. 2020. Involvement of homocastasterone, salicylic and abscisic acids in the regulation of drought and freezing tolerance in doubled haploid lines of winter barley. *Plant Growth Reg* 90: 173-188
- Wójcik-Jagła M., Rapacz M., Dubas E., Krzewska M., Kopeć P., Nowicka A., Ostrowska A., Malaga S., Żur I. 2020. Candidate Genes for Freezing and Drought Tolerance Selected on the Basis of Proteome Analysis in Doubled Haploid Lines of Barley. *Int J Mol Sci* 21, 2062.

Doniesienia konferencyjne

- Żur I., Dubas E., Krzewska M., Nowicka A., Malaga S. Możliwości optymalizacji procedury wyprowadzania podwojonych haploidów na przykładzie jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) i pszenżyta (*Triticosecale* Wittm.). XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, 2–6.02.2015, Zakopane. Streszczenia referatów i plakatów str. 61.
- Malaga S., Dubas E., Krzewska M., Nowicka A., Żur I. Increasing tolerance to abiotic stresses by haplodiploidization in *Hordeum vulgare* L. 10th International Conference ‘Plant Functioning Under Environmental Stress’. The *Franciszek Górski* Institute of Plant Physiology PAS, Cracow & The Polish Botanical Society – Plant Physio-

- logy and Biochemistry Branch, 16–19.09.2015. Kraków. Book of abstracts p. 45.
- Gołębiowska-Pikania G., Kopeć P., Malaga S., Krzewska M., Dubas E., Nowicka A., Żur I. The effect of cold hardening on leaf protein profile in barley DH lines varying in frost tolerance. The 2nd INPPO (International Plant Proteomics Organization) World Congress, Bratysława, 4–8.09.2016. Book of abstracts p. 90.
- Malaga S., Żur I., Krzewska M., Dubas E., Gołębiowska-Pikania G., Kopeć P. Białka uczestniczące w nabywaniu tolerancji na mróz u jęczmienia ozimego (*Hordeum vulgare* L.). II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN, Łódź, 12–14.05.2016. Materiały konferencyjne str. 163
- Żur I., Surówka E., Dubas E., Nowicka A., Krzewska M., Hura T., Rapacz M., Wójcik-Jagła M., Ostrowska A., Malaga S., Janowiak F. Antioxidative system activity as the marker for freezing and drought tolerance in winter barley (*Hordeum vulgare* L.). 4th Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, Budapest 6–9.11.2017. Book of Abstracts p. 103.
- Kopeć P., Gołębiowska-Pikania G., Krzewska M., Żur I., Dubas E., Nowicka A., Hura T., Malaga S. Zmiany w proteomie liści linii DH jęczmienia ozimego wywołane niedoborem wody w podłożu. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych, Zakopane 30.01–3.02.2017 r. Materiały konferencyjne str. 128.
- Kopeć P., Gołębiowska-Pikania G., Surówka E., Janowiak F., Krzewska M., Dubas E., Nowicka A., Kasprzyk J., Ostrowska A., Malaga S., Hura T., Żur I. Changes in the barley leaf proteome during drought stress. 11th International Conference 'Plant Functioning under Environmental Stress', 12–15.09.2018, Kraków. Book of Abstracts p. 23.
- Malaga S., Janowiak F., Janeczko A., Oklestkova J., Waliński P., Dubas E., Krzewska M., Nowicka A., Juzoń K., Kopeć P., Żur I. Drought-induced changes in stress hormone content and their association with drought tolerance level in barley (*Hordeum vulgare* L.). 11th International Conference 'Plant Functioning under Environmental Stress', 12–15.09.2018, Kraków. Book of Abstracts p. 132.
- Kopeć P. Wykorzystanie podwojonych haploidów jęczmienia ozimego w identyfikacji molekularnych podstaw tolerancji na suszę glebową. Susza – zagrożenie dla roślin rolniczych w Polsce, 23.10.2019, Warszawa. Materiały konferencyjne str. 18–19.

Literatura

- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods Enzymol.* 105, 121–126.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., i in. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Sci. Technol.-Lebensm.-Wiss. Technol.* 28, 25–30.
- Luck, H. (1963). Peroxidase. W: Bergmeyer, H. U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis* (s. 895–897). Academic Press Inc., London.
- Minami, M., Yoshikawa, A. (1979). A simplified assay method at superoxide dismutase activity for clinical use. *Clin. Chim. Acta* 92, 337–342.
- Moravcova, S., Tuma J., i in. (2018). Influence of salicylic acid pretreatment on seeds germination and some defence mechanisms of *Zea mays* plants under copper stress. *Plant Physiol Biochem* 122, 19–30.
- Oklestkova, J., Tarkowska, D. I., i in. (2017). Immunoaffinity chromatography combined with tandem mass spectrometry: a new tool for the selective capture and analysis of brassinosteroids plant hormones. *Talanta* 170, 432–440.

Współdziałanie odporności na mączniaka (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) warunkowanej genem *mlo* z wartością cech gospodarczych jęczmienia ozimego

Interaction of resistance to mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) determined by the *mlo* gene with the agronomic value of winter barley

Jerzy H. Czembor✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: j.h.czembor@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*; gen *mlo*; jęczmień ozimy; odporność

Mączniak prawdziwy jęczmienia (*B. graminis* f.sp. *hordei*) to nadal ważna choroba jęczmienia jarego i ozimego w Polsce. Występuje na terenie całego kraju z różnym nasileniem powodując straty w plonach. W warunkach sprzyjających dla rozwoju grzyba straty w plonie ziarna mogą sięgać 25%, natomiast przeciętnie wynoszą ok. 10%. W dostępnej literaturze brak doniesień o odmianach jęczmienia ozimego z genem *mlo* dobrze przystosowanych do polskich warunków środowiska. Nie ma takich odmian również w doborze odmian jęczmienia ozimego w Niemczech, Wielkiej Brytanii, Danii czy Czechach. W dostępnej literaturze brak jest również informacji o badaniach, których celem będzie wyprowadzenie linii izogenicznych dla genu *mlo* v. *Mlo* u jęczmienia ozimego, co zrobiono dla form jarych. W latach 90-tych ubiegłego wieku badano współdziałanie genu *mlo* z cechami agronomicznymi form jarych.

Osiągnięte cele zadania

1. Wprowadzenie genu *mlo* warunkującego odporność na mączniaka prawdziwego jęczmienia zwyczajnego z genomu form jarych do genomu form ozimych dwurzędowych i sześciurzędowych
2. Określenie efektywności selekcji linii z genem *mlo* tradycyjnie, testami fitopatologicznymi oraz z wykorzystaniem dwóch markerów HVMlo1 oraz HVMlo3
3. Określenie interakcji genu *mlo* z wybranymi cechami wartości gospodarczej w genomie form ozimych – uzyskanie linii jęczmienia ozimego z genem *mlo* na poziomie wsobności

F₇ o potencjale plonowania na poziomie wzorców COBORU

Materiały i Metody

Do wytworzenia populacji mieszańcowych F₁ Mlomlo wykorzystano linie jęczmienia ozimego wielorzędowego BKH 735 i dwurzędowego linia 42, której odporność na mączniaka typu Mlo uwarunkowana jest recesywnym genem mlo11 (jako rodzice P₁) który został wprowadzony do genomu tych linii z form jarych w ramach badań prowadzonych w latach 2008 – 2013 (Czembor i in., 2016). Komponentami o wysokiej wartości innych cech gospodarczych były odmiany ozime: wielorzędowe Souleyka i Titus oraz dwurzędowe SU Vireni i Metaxa (jako rodzice P₂). Wykonano krzyżowania proste a następnie wypierające w celu uzyskania pokolenia F₁BC₁ z genem *mlo*.

W latach 2015 – 2018 prowadzono reSelekcję linii populacji mieszańcowych pokoleń od F₂BC₂ do F₅BC₂ w oparciu o wyniki testów fitopatologicznych fenotypowych w warunkach kontrolowanych, metodami molekularnymi (markery mikrosatelitarne SSR: HVMlo1 – 176bp, HVMlo3 – 230bp) oraz poprzez wielośrodowiskową ocenę połową uwzględniając: odporność na choroby, wyleganie, potencjał plonowania i składowe plonu. Corocznie, w obrębie każdej populacji badano 250 linii, z grupy których w oparciu o wyniki testów fitopatologicznych i molekularnych typowano 50 linii do dalszych badań prowadzonych wielośrodowiskowo (łącznie 200 linii).

Testy fitopatologiczne: Do oceny fenotypowej został wykorzystany izolat Bgh 27. Podstawą



wyboru tego izolatu był fakt, że jest on wirulentny w stosunku do odmian włączonych do krzyżowań, natomiast awirulentny w stosunku do wprowadzanego genu *Mlo*. Doświadczenie fitopatologiczne prowadzone było w warunkach kontrolowanych, przy fotoperiodzie 16 godz. światła i 8 godz. ciemności oraz w temperaturze w zakresie 16–22°C. Po upływie 8–10 dni od zakażenia, została oceniona reakcja odpornościowa roślin. Do oceny wykorzystano skalę, w której 0 (4) = rośliny odporne na *B. graminis f.sp. hordei*, 4 = rośliny podatne na *B. graminis f.sp. hordei*. Wzorce stanowiły odmiany/linie jęczmienia o profilu *mlo* (kontrola pozytywna, wzorzec odporności) oraz o profilu bez *mlo* (kontrola negatywna, wzorzec podatności).

Testy molekularne: W zależności od zastosowanych markerów (HVMlo1, HVMlo3), wykorzystywanych do selekcji genu *mlo*, DNA wyizolowano dwoma różnymi metodami. Pierwsza metoda ekstrakcji DNA, przeprowadzana była za pomocą buforu TPS. Otrzymany tą metodą ekstrakt, wykorzystany był w reakcji amplifikacji dla markera HVMlo3. Druga metoda izolacji, przeprowadzana była przy użyciu gotowego zestawu DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) i była wykorzystana podczas amplifikacji markera HVMlo1. Podział na dwie różne metody izolacji DNA, wynikała z faktu, iż zastosowane systemy markerowe, charakteryzują się różnymi profilami reakcji PCR, związanymi z ilością (ng) oraz czystością DNA, wymaganą podczas reakcji amplifikacji.

W zależności od temperatury przyklejania się starterów do matrycy zastosowano dwa profile termiczne reakcji PCR. Dla markera HVMlo1 warunki amplifikacji przebiegały według następującego profilu: 94°C/2min. denaturacji występniej, 10 cykli składających się z: 94°C/30 sek., 55°C/30 sek., 72°C/1 min., a także 30 cykli 90°C/30 sek., 55°C/30 sek., 72°C/1 min. Dla markera HVMlo3 profil reakcji PCR różnił się jedynie temperaturą hybrydyzacji, która wynosiła 55°C/30 sek. W ostatnim cyklu reakcji amplifikacji, etap elongacji został wydłużony do 5 min.

Produkty PCR, przed naniesieniem na żel poliakrylamidowy (Cambrex Bio Science Rockland, USA) zostały zdenaturowane w termocyklerze, w obecności formamidu (Sigma-Aldrich, Polska) z temperaturą grzewczą ustawioną na 105°C i temperaturą bloku 95°C przez 3 min.

Rozdział produktów amplifikacji PCR został przeprowadzony na sekwenatorze DNA ABI 377XL (Applied Biosystems, USA) na 4,75% denaturującym żelu poliakrylamidowym. Rozdział elektroforytyczny przeprowadzony został w buforze 1 × TBE

(0,1 M Tris, 90 mM H₃BO₃, 9 Mm EDTA). Czas rozdzielania produktów na żelu wynosił 2,5 godziny (Bilgic i in., 2006; Czembor i in., 2013, Higgins i in., 2000,

<http://wheat.pw.usda.gov/cgibin/graingenes/report.cgi?class=marker&name=HVMLOHA>).

Wielorodowiskowe testy polowe: Corocznie, 200 linii pokoleń od F₂BC₂ do F₇BC₂ (po 50 na populację) z genem *mlo* określonym w ocenie fenotypowej i molekularnej, były oceniane w doświadczeniach polowych prowadzonych w Radzikowie, Szelejewie i Wiatrowie. W okresie wegetacji oceniano: stan roślin przed zimą oraz po zimie, odporność na choroby: mączniak prawdziwy, rdza karłowa, żółta karłowatość jęczmienia, rynchosporioza, termin kłoszenia oraz wysokość roślin (zgodnie z metodyką COBORU).

W latach 2018 – 2020 prowadzono również doświadczenia poletkowe dla najbardziej plennych linii pokoleń F₅BC₂, F₆BC₂ oraz F₇BC₂. W roku 2018 badano 35 linii F₅BC₂, o genomie *mlo* określonym w ocenie fenotypowej i molekularnej prowadząc bonitację uwzględniając: stan roślin przed zimą, stan roślin po zimie, porażenie przez choroby: mączniak prawdziwy, rdza karłowa, żółta karłowatość jęczmienia, rynchosporioza, wysokość łanu oraz plon ziarna z poletka zgodnie z metodyką COBORU), składowe plonu. Doświadczenie założono w jednej lokalizacji w Radzikowie. Układ doświadczeń: doświadczenie 4-powtórzeniowe; poletka 10m² do zbioru; odmiany wzorcowe – Kosmoas i 4 odmiany rodzicielskie dla poszczególnych kombinacji mieszańcowych: BKH 735, Souleyka, Titus, L42, SU Vireni, Metaxa. Po zbiorach ocenie poddano plon ziarna z poletka (przy wilgotności 15%). Na podstawie wyników plonowania wykonano analizę wariancji dla plonu. Testem F badano istotność średnich kwadratów odchyłeń dla obiektów względem średniego kwadratu odchyłeń dla błędu doświadczalnego. Zestawiono plony obiektów (w dt/ha) uszeregowane malejąco, średnie wartości dla obiektów wzorcowych, współczynniki zmienności dla błędu, współczynniki zgodności plonu, ocenę NIR (0,05) oraz NIRP (%). Analizy statystyczne – za pomocą programu ADOWBLOK-TP). Wskazano linie plonujące powyżej odmian wzorcowych (9 linii 6-rzędowych i 7 linii 2-rzędowych) które badano w doświadczeniach poletkowych jako pokolenie F₆BC₂ (bonitacja jak w roku poprzednim).

Wyniki

Liczebność roślin/linii z genem *mlo* w populacjach mieszańcowych była różna zarówno dla

populacji jak i dla pokoleń. Liczba roślin z genem *mlo* dla populacji na poziomie wsobności F_2 do F_5 nie przekraczała 50%. W latach 2015 – 2018 badając 250 roślin reprezentujących każdą z 4 populacji osobno (50 linii x 5 roślin dla linii) wytypowano minimum 50 linii do dalszych etapów badań.

Marker HVMlo1 okazał się mniej efektywny ponieważ często uzyskane profile genetyczne roślin w stosunku do rodziców były nie polimorficzne, to umożliwił on potwierdzenie obecności genu *mlo* w genomie roślin, dla których na podstawie analiz markerem HVMlo3 obecności tego genu nie wykazano, lub które włączono do grupy roślin o niezidentyfikowanym profilu lub grupy o profilu heterogenicznym a testy fitopatologiczne również potwierdzały jego obecność.

W badaniach wielośrodowiskowych linie pokoleń F_5BC_2 oraz F_6BC_2 stan roślin przed zimą i wiosną wszystkich badanych linii oceniano jako dobry (oceny w zakresie 8 – 9). Linie były natomiast podatne lub bardzo podatne na rdzę karłową (duże zróżnicowanie stwierdzono w Radzikowie i Szelejewie). W Wiatrowie porażenie *Puccinia hordei* było niskie. Średnio, podobnie linie należące do populacji (Titus × BKH 735) × Titus były w mniejszym stopniu porażone rdzą karłową w stosunku do pozostałych populacji. W żadnej z lokalizacji nie stwierdzono dużego nasilenia żółtej karłowatości jęczmienia (jednak można było wydzielić grupę obiktów które oceniono na 6). Stwierdzono, że dla wczesności różnice pomiędzy liniami wynosiły ok. 10 dni w obrębie każdej populacji.

W latach 2018 – 2019 na podstawie analiz statystycznych wykonanych za pomocą programu ADOWBLOK- (TP) wykazano istotne zróżnicowanie pomiędzy badanymi liniami w obrębie każdej populacji oraz wskazano linie charakteryzujące się wyżą wartością pod względem wybranej cechy od wzorca. Pod względem potencjału plonowania linie były zbliżone do wzorców.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Prowadzenie równoczesnej selekcji metodami molekularnymi i na podstawie testów fitopatologicznych w obrębie populacji mieszańcowych pod względem recesywnego genu *mlo* warunkującego odporność na mączniaka prawdziwego zwiększa skuteczność trafnego wyboru homozygotycznych roślin o odporności typu Mlo. Reselekcja roślin/linii w obrębie populacji mieszańcowych na poziomie wsobności od F_2 do F_7 umożliwia wskazanie linii.
2. Marker HVMlo1 jest mniej efektywny ponieważ często uzyskane profile genetyczne roślin

w stosunku do rodziców były nie polimorficzne, jednak umożliwił potwierdzenie obecności genu *mlo* w genomie roślin, dla których na podstawie analiz markerem HVMlo3 obecności tego genu nie wykazano, lub które włączono do grupy roślin o niezidentyfikowanym profilu lub grupy o profilu heterogenicznym a testy fitopatologiczne również potwierdzały jego obecność.

3. Na podstawie wyników doświadczeń wielośrodowiskowych prowadzonych dla linii pokolenia F_7BC_2 można wydzielić materiały, które pod względem odporności na stesy biotyczne i abiotyczne i potencjału plonowania nie odbiegały od form wzorcowych lub je przewyższały.
4. Gen *mlo* może zostać włączony do programów hodowlanych, których celem jest uzyskanie odmian jęczmienia ozimego o wysokiej odporności na mączniaka prawdziwego (*B. graminis* f. sp. *hordei*) nie wpływając przy tym negatywnie na ich wartość agronomiczną.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe i praktyczne

Gen *mlo* warunkuje odporność form jarych na wszystkie znane patotypy *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, sprawcy mączniaka prawdziwego. Brak jest form ozimych, których odporność na mączniaka prawdziwego jest warunkowana tym genem. Bieżące badania mają charakter oryginalny, ponieważ wykazały na możliwość uzyskania genotypów jęczmienia ozimego o wysokiej odporności na mączniaka prawdziwego jęczmienia (*B. graminis* f. sp. *hordei*) warunkowanej efektywnym genem *mlo* przy równoczesnym zachowaniu wysokiej wartości agronomicznej.

Na podstawie wyników doświadczeń wielośrodowiskowych prowadzonych dla linii pokolenia F_7BC_2 o genomie *mlo* określonym w ocenie fenotypowej i molekularnej wskazano linie, które pod względem odporności na stesy biotyczne i abiotyczne i potencjału plonowania nie odbiegały od form wzorcowych, lub je przewyższały. Stanowią one cenne źródło odporności na mączniaka prawdziwego typu Mlo.

Mogą zostać włączone do dalszych badań/doświadczeń poletkowych wielośrodowiskowych, a następnie wstępnych doświadczeń rejestrowych

Wykaz publikacji wyników Doniesienia konferencyjne

Czembor J.H., Pietrusińska A. 2019. Mlo resistance to powdery mildew in winter barley in Poland. 4th Edition of Global

- Conference on Plant Science and Molecular Biology (GPMB, 2019), 19–21.09. Londyn, Wielka Brytania.
- Czembor J. H., Pietrusińska A., Smolińska K. 2018. Resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) in winter barley in Poland. 6th Global Summit on Plant Science Theme: “Plants in a Changing Environment, 29–30.10.2018r, Hiszpania, Walencja.
- Czembor J.H., Pietrusińska A. 2017. Effective resistance to powdery mildew (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) in winter barley in Poland. 12th EFPP (European Foundation for Plant Pathology), 29.05.-02.06.2017r., Dunkierka, Francja.
- Czembor J.H., Pietrusińska A. 2016. Resistance to powdery mildew in winter barley in Poland. 20th EUCARPIA General Congress, ETH Zurich, Szwajcaria 29.08–1.09.2016.
- Czembor J.H., Pietrusińska A. 2015. Mlo resistance to powdery mildew in winter barley in Poland. Book of Abstracts from. “14th International Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference 2015”. Dania, Helsingor, 5–8 czerwiec, 2015.
- Literatura**
- Bilgic H., Steffenson B. J., Hayes P. (2006). Molecular mapping of loci conferring resistance to different pathotypes of the spot blotch pathogen in barley. *Phytopathol.* (96): 699–708.
- Czembor P., Sejbuk K., Kleszcz R. (2013). Evaluation of a partially-automated magnetic bead-based method for DNA extraction for wheat and barley MAS. *Cereal Research Communications* (42): 27–37.
- Czembor J. H., Czembor P. Cz., Doraczyńska O., Pietrusińska A., Radecka-Janusik M. (2016). Wprowadzenie genu *mlo* do genomu jęczmienia ozimego. *Progress in Plant Protection* 56 (3): 379–387.
- Higgins, C. M., Hall, R. M., Campbell, P. R., Dietzgen, R. G. (2000). PCR rescue and analysis of transgene sequences directly from crude extracts of transgenic embryos and plants. *Plant Molecular Biology Reporter* 18: 285a-285g.
- <http://wheat.pw.usda.gov/cgibin/graingenes/report.cgi?class=marker&name=HVML0HA>.

Efekty pleiotropowe genów *Ppd-H1* i *Ppd-H2* a podatność roślin jęczmienia jarego na fuzariozę kłosów i akumulację mykotoksyn

Pleiotropic effects of *Ppd-H1* and *Ppd-H2* genes and the susceptibility of spring barley to *Fusarium* head blight and accumulation of mycotoxins

Anetta Kuczyńska✉, Tadeusz Adamski, Maria Surma, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogrodowicz, Michał Kempa, Hanna Ćwiek-Kupczyńska, Renata Trzeciak, Renata Holewińska, Alina Anioła

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60–479 Poznań
✉ e-mail akuc@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: deoksyniwalenol, fenotypowanie, *Fusarium* sp., indeks fuzariozy kłosów, plonowanie, stres biotyczny, uszkodzenie ziarniaków

Cel prowadzonych badań

Celem badań było wyjaśnienie molekularnego podłoża związku między reakcją fotoperiodyczną roślin jęczmienia a reakcją na infekcję grzybami powodującymi fuzariozę kłosów. W badaniach wykorzystano dwie populacje mapujące linii rekombinacyjnych (RIL) zróżnicowane pod względem wczesności i odporności na chorobę, w tym na FHB (stwierdzone we wstępnych doświadczeniach). Populacje te fenotypowano w doświadczeniach polowych w zakresie cech określających reakcję linii na infekcję grzybami z rodzaju *Fusarium*. Ponadto zostały także zgenotypowane z zastosowaniem markerów SSR i SNP, co pozwoliło na bardziej precyzyjną niż dotychczas identyfikację QTL-i dla cech określających porażenie kłosów i ziarna oraz dla zawartości mykotoksyn, a także genów-kandydatów dla zlokalizowanych QTL-i. Ponadto efektywność markerów sprzężonych z QTL-ami związanymi z reakcją roślin na infekcję była weryfikowana na zestawie 60 odmian jęczmienia jarego, które również były badane pod względem odporności na FHB w doświadczeniach polowych z zastosowaniem sztucznej inokulacji.

Materiały i Metody

Materiałem badawczym były dwie populacje linii rekombinacyjnych (RIL) stanowiących półrodzeństwo: Lubuski x Cam/B1/CI08887//CI0576 oraz Maresi x Cam/B1/CI08887//CI0576 oraz 60 odmian i rodów jęczmienia jarego.

Dobór komponentów do krzyżowań został oparty na wcześniejszych pracach prowadzonych przez Górnego i współautorów, w których badano tolerancję na stropy abiotyczne odmian i linii jęczmienia pochodzących z różnych rejonów geograficznych (Górny, 2001; Górny, Ratajczak, 2008). Linie RIL zostały wyprowadzone techniką pojedynczych nasion (single seed descent) począwszy od pokolenia F_2 do F_8 . W każdej populacji spośród 150 uzyskanych linii do badań wybrano losowo 100. Populacje zostały zgenotypowane z zastosowaniem markerów SSR i SNP. Dodatkowo linie RIL oraz odmiany badano w doświadczeniach polowych, w których zastosowano inokulację zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium*. Uzyskane dane z genotypowania oraz z obserwacji cech związanych z odpornością na FHB: porażenie kłosów, porażenie ziarna i zawartość deoksyniwalenolu (z zastosowaniem dostępnych komercyjnie kitów do testów przesiewowych) poddano analizie statystycznej i bioinformatycznej.

Wyniki i Wnioski

Na podstawie charakterystyki 60 odmian jęczmienia jarego w odniesieniu do analizowanych cech oraz stopnia porażenia w doświadczeniu kontrolnym wykazano:

- wysokość roślin wynosiła od 86,88 cm (Gawrosz) do 61,50 cm (Promyk), długość kłosa od 8,00 cm (Ella) do 6,00 cm (Merceda), liczba ziaren z kłosa od 30,10 (DC



6145–8) do 19,40 (Marthe) oraz masa ziarna z kłosa od 1,67 g (Victoriana) do 0,98 g (Marthe i Soldo),

- największy procent porażonych ziaren w próbie zaobserwowano dla odmiany Soldo wynoszący 13,21%. Dla odmiany tej indeks IFK wyniósł 9,7%, zaś koncentracja DON 17,18 µg/kg. Najmniejszy procent porażonych ziaren w próbie zaobserwowano dla odmiany Gawrosz wynoszący 0,34%. W przypadku tej odmiany nie stwierdzono porażenia, natomiast zawartość DON wynosiła 19,88 µg/kg. W warunkach bez inokulacji zaobserwowano grupę odmian, dla których indeks IFK wyniósł 0, natomiast dla wszystkich tych odmian test zawartości deoksyniwalenolu w badanej próbie ziarna wykazał obecność mikotoksyny: Barke – 4,30 µg/kg, Basic – 30,84 µg/kg, Class – 20,00 µg/kg, DC 6145–8 – 62,44 µg/kg, Fariba – 11,69 µg/kg, Gawrosz – 19,88 µg/kg, Granal – 11,55 µg/kg, Jersey – 10,20 µg/kg, Johan – 21,87 µg/kg, Kucyk – 13,45 µg/kg, Mercada – 73,56 µg/kg, Nadek – 6,00 µg/kg, Orthega – 10,00 µg/kg, Publikan – 48,20 µg/kg, Xanadu – 5,84 µg/kg.

W doświadczeniu z inokulacją zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium* wykazano:

- wysokość roślin wynosiła od 79,32 cm (Garner) do 59,17 cm (Olimpic), długość kłosa od 6,83 cm (Johan) do 4,80 cm (Mercada), liczba ziaren z kłosa od 22,86 (Gawrosz) do 15,77 (Natasia) oraz masa ziarna z kłosa od 1,10 g (Justina) do 0,69 g (Nadek); badane odmiany charakteryzowały się podobnym terminem kłoszenia wynoszącym około 157 dni,
- największy procent porażonych ziaren w próbie zaobserwowano dla odmiany Propino wynoszący 40,50%. Dla odmiany tej indeks IFK wyniósł 29,30%, zaś koncentracja DON wynosiła 26 992 µg/kg. Najmniejszy procent porażonych ziaren w próbie zaobserwowano dla odmiany Gawrosz wynoszący 0,44%. W przypadku tej odmiany indeks IFK wyniósł 0,5% natomiast zawartość DON wynosiła 22 630 µg/kg. Większość badanych odmian w warunkach inokulacji miała indeks IFK wynoszący ponad 10%. Największą koncentrację DON w badanej próbie ziarna zaobserwowano dla odmian Promyk (38 240 µg/kg) oraz Publikan (38 232 µg/kg), najmniejszą zawartością DON charakteryzowały się odmiany Conchita (19 238 µg/kg) oraz Tocada (12 197 µg/kg)

Interpretując wyniki uzyskane dla puli 60 odmian jęczmienia zauważono, że nie zawsze wzrost

stopnia porażenia ziarna w kłosie skutkowało zwiększoną zawartością DON w ziarnie. Ponadto zidentyfikowano odmiany, dla których nie stwierdzono porażenia kłosów na poletku, natomiast ich ziarno wykazało obecność DON. Mimo znacznych różnic w wartości IFK dla badanych odmian zawartość DON utrzymywała się w większości na zbliżonym poziomie zarówno w warunkach kontrolnych jak i w warunkach inokulacji zarodnikami grzybów w rodzaju *Fusarium*.

Rozporządzenie Komisji Europejskiej (WE) nr 881/2006 reguluje zawartość DON w produktach spożywczych oraz paszowych, określając maksymalną dopuszczalną zawartość DON w nieprzetworzonych ziarnach na poziomie 1250 µg kg⁻¹. Wiele badań wykazało wysoką, pozytywną korelację pomiędzy nasileniem objawów chorobowych a stężeniem DON w ziarnie (Zhu, i in., 1999; Buerstmayr, i in., 2004), jednak zależność między zawartością DON a stopniem porażenia kłosów i ziarna nie zawsze jest istotna (Mesterhazy, i in., 1999; Ūsele, i in., 2013).

Łącznie dla siedmiu badanych cech oraz dla zawartości deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie zidentyfikowano 29 QTL. Największą liczbę QTL zmapowano w obrębie chromosomu 3H (8), natomiast najmniejszą w chromosomie 7H (1). W chromosomie 1H nie wykryto QTL. Największą liczbę QTL zmapowano dla długości kłosa (7), a najmniejszą dla wysokości roślin (2), plonu z poletka (2) oraz koncentracji DON (1). Spośród zidentyfikowanych QTL 55% wykazało interakcję ze środowiskiem.

Zidentyfikowano dwa QTL związane z wysokością roślin w chromosomie 3H i 5H. Interakcję ze środowiskiem stwierdzono w przypadku obu QTL. QTL o najwyższej wartości LogP równej 13,47 wykazywał sprzężenie z markerem SNP SCRI_RS_150063 (3H), a zakres wyjaśnionej wariancji wynosił od 13,27% do 46,24%. Allel pochodzący z formy rodzicielskiej CamB podnosił wartość cechy we wszystkich badanych środowiskach.

Długość kłosa determinowało siedem QTL rozmieszczonych w chromosomach: 2H, 3H, 4H i 5H. Wśród nich odnotowano trzy QTL, których efekty były stabilne we wszystkich eksperymentach, przy czym większą długość kłosa warunkował allel formy rodzicielskiej Maresi dla QTL zlokalizowanych w chromosomie 2H, natomiast dla QTL zlokalizowanego w chromosomie 3H długość kłosa warunkował allel formy rodzicielskiej CamB zwiększając wartość cechy. Największą wartość LogP (10,09) stwierdzono dla QTL sprzężonego z markerem SCRI_RS_144102 (2H), w przypadku

którego allel pochodzący z formy rodzicielskiej Maresi podnosił wartość cechy. QTL ten wyjaśniał 5,32–17,14% obserwowanej zmienności.

Zidentyfikowano pięć QTL związanych z masą ziarna z kłosa, zlokalizowanych w chromosomach 2H, 3H, 5H i 6H. Stabilne okazały się trzy QTL, gdzie dla dwóch QTL (w 2H i 6H) obserwowano zwiększony efekt addytywny warunkowany przez allel formy rodzicielskiej Maresi, natomiast dla jednego QTL (6H) zwiększony efekt addytywny warunkowany był przez allel formy rodzicielskiej CamB. Najwyższą wartość LogP równą 5,47 stwierdzono dla QTL w chromosomie 5H sprzężonego z markerem SNP 11_10705. Allel obniżający wartość cechy pochodził z odmiany Maresi, poza danymi z lokalizacji Nagradowice i Tulce (doświadczenia z inokulacją zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium*), gdzie zwiększona wartość cechy warunkowana była allelem formy rodzicielskiej CamB. QTL ten wyjaśniał od 0,29% (NAD_I) do 8,23% (AND_K) obserwowanej zmienności masy ziarna z kłosa.

Spośród czterech QTL związanych z liczbą ziaren z kłosa wykrytych w chromosomach 2H, 3H, 5H i 6H, jeden (5H) wykazywał interakcję ze środowiskiem. Dla tego QTL stwierdzono najwyższą wartość LogP (13,92) oraz sprzężenie z markerem SNP 11_10705. QTL ten wyjaśniał 0,60–10,35% obserwowanej zmienności; allel pochodzący z odmiany CamB wpływał na zredukowanie liczby ziaren z kłosa w dwóch lokalizacjach Antoniny i Tulce. Inna sytuacja miała miejsce w doświadczeniu prowadzonym zarówno w warunkach naturalnego porażenia jak i z inokulacją w Nagradowicach, gdzie allel pochodzący z odmiany Maresi wpływał na zmniejszenie liczby ziaren w kłosie.

Zidentyfikowano dwa QTL kontrolujące plon z poletka – w chromosomach 2H i 7H. Interakcję ze środowiskiem stwierdzono w przypadku QTL w chromosomie 7H, natomiast jej brak dla QTL w chromosomie 2H. Wyższa wartość LogP, powyżej 4, charakteryzowała QTL w chromosomie 7H wykazujący sprzężenie z markerem SNP 11_10056, a zakres wyjaśnionej wariancji wynosił 0,60–16,53%. Allel zwiększający wartość cechy pochodził z odmiany CamB. W przypadku QTL w chromosomie 2H sprzężonego z markerem SNP 11_10823 procent wyjaśnionej wariancji wahał się od 5,15 do 7,23. Zwiększona wartość cechy była uzależniona od allelu formy rodzicielskiej Maresi.

Masa tysiąca ziaren determinowana była przez cztery QTL zlokalizowane w chromosomach 3H,

5H i 6H. Interakcję ze środowiskiem stwierdzono dla dwóch QTL. Spośród nich QTL w chromosomie 5H, o najwyższej wartości LogP równej 7,80, sprzężony z markerem SNP 11_10705, wyjaśniał od 1,91% do 14,25% wariancji. Allel zwiększający wartość cechy pochodził z formy rodzicielskiej Maresi.

Termin kłoszenia warunkowany był przez cztery QTL zlokalizowane w chromosomach 2H, 3H i 5H. Interakcję ze środowiskiem wykazały trzy spośród zidentyfikowanych QTL. Najwyższą wartość LogP równą 15,26 stwierdzono dla QTL w chromosomie 3H sprzężonego z markerem SNP 12_30096. Allel determinujący opóźnione kłoszenie pochodził z odmiany Maresi, natomiast wyjaśniona wariancja wynosiła od 18,32 do 32,16%.

Wykryto jeden QTL warunkujący zawartość DON w badanym ziarnie, zlokalizowany w chromosomie 2H i wykazujący interakcję ze środowiskiem. QTL ten (LogP=3,95) związany był z markerem SNP 11_21037. Procent wyjaśnionej wariancji wynosił od 5,74 w warunkach AND_I do 9,53 w warunkach TUL_I, a wzrost wartości cechy w warunkach inokulacji determinował allel pochodzący z formy rodzicielskiej Maresi. W doświadczeniach prowadzonych w warunkach naturalnego porażenia we wszystkich trzech lokalizacjach efekty addytywne tego QTL miały wartości nieistotne

Dzięki zastosowaniu w projekcie markerów SNP z platformy Illumina iSelect 9k, udało się wyznaczyć w obrębie chromosomów kluczowe loci reakcji fotoperiodycznej jęczmienia: *Ppd-H1* i *HvFT4* w chromosomie 2H, *HvFT2* i *HvGI* w chromosomie 3H, *Vrn-H1* i *CBF4* w chromosomie 5H, *Vrn-H3* i *HvCOI* w chromosomie 7H, jak również region *sdw1/denso* w chromosomie 3H, gdzie zmapowano największą liczbę QTL dla analizowanych cech, w tym dla terminu kłoszenia. Locus ten jako silnie związany ze szlakiem giberelinowym znacząco wpływa nie tylko na wysokość rośliny, ale i inne cechy plonu oraz na reakcję fotoperiodyczną. Tym samym uzasadniony jest fakt, że QTL ten w największym stopniu wpływał na kłoszenie (największa wartość LogP) spośród wszystkich zidentyfikowanych loci dla tej cechy. Ko-segregacja licznych QTL w danym regionie chromosomu może sugerować jego plejotropowe działanie na inne cechy. Dostarczyło to informacji o molekularnych podstawach zmienności obserwowanych cech, w szczególności tych, które determinują odporność jęczmienia jarego na fuzariozę kłosów w powiązaniu z efektami genów reakcji fotoperiodycznej odpowiadając celowi projektu.

Osiągnięcia projektu

1. Przeprowadzono fenotypowanie w doświadczeniu polowym (trzy lokalizacje × trzy powtórzenia) dwóch populacji RIL jęczmienia jarego (każda po 100 linii), które scharakteryzowano pod względem stopnia porażenia kłosa w wyniku inokulacji zarodnikami grzybów z rodzaju *Fusarium* oraz oceniono zawartość deoksyniwalenolu zakumulowanego w ziarnie. Przeprowadzono pomiary biometryczne cech takich jak: wysokość roślin, długość kłosa, masa ziarna z kłosa, liczba ziaren z kłosa, plon z poletka, masa tysiąca ziaren oraz termin kłoszenia. W sumie wykonano 12 600 pomiarów biometrycznych, 9 000 pomiarów związanych ze stopniem porażenia oraz 1 800 oznaczeń zawartości DON w ziarnie.
2. Wyniki fenotypowania populacji RIL zweryfikowano na puli 60 odmian jęczmienia co pozwoliło na potwierdzenie, że nie zawsze wzrost stopnia porażenia ziarna w kłosie skutkowało zwiększoną zawartością DON w ziarnie. Zidentyfikowano odmiany, podobnie jak w przypadku populacji RIL zidentyfikowano linie, dla których nie stwierdzono porażenia kłosów na poletku natomiast ich ziarno wykazało obecność DON.
3. Skonstruowano dwie mapy genetyczne dla dwóch populacji RIL jęczmienia jarego na podstawie genotypowania z wykorzystaniem markerów SNP na platformie Illumina iSelect. Opracowane mapy charakteryzowały się małą, średnią odległością między markerami co wskazuje na ich duże zagęszczenie. Ponadto dla każdej z populacji otrzymano siedem grup sprzężeń odpowiadających siedmiu chromosomom jęczmienia. Mapy o takich parametrach pozwalają na efektywne i precyzyjne mapowanie loci dla cech ilościowych.
4. Dzięki zastosowaniu w projekcie markerów SNP z platformy Illumina iSelect 9k, udało się wyznaczyć w obrębie chromosomów kluczowe loci reakcji fotoperiodycznej jęczmienia: *Ppd-H1* i *HvFT4* w chromosomie 2H, *HvFT2* i *HvGl* w chromosomie 3H, *Vrn-H1* i *CBF4* w chromosomie 5H, *Vrn-H3* i *HvCOL* w chromosomie 7H, jak również region *sdw1/denso* w chromosomie 3H, gdzie zmapowano największą liczbę QTL dla analizowanych cech, w tym dla terminu kłoszenia. Locus ten jako silnie związany ze szlakiem giberelinowym znacząco wpływa nie tylko na wysokość rośliny, ale i inne cechy plonu oraz na reakcję fotoperiodyczną. Tym samym uzasadniony

jest fakt, że QTL ten w największym stopniu wpływał na kłoszenie (największa wartość LogP) spośród wszystkich zidentyfikowanych loci dla tej cechy. Ko-segregacja licznych QTL w danym regionie chromosomu może sugerować jego plejotropowe działanie na inne cechy. Dostarczyło to informacji o molekularnych podstawach zmienności obserwowanych cech, w szczególności tych, które determinują odporność jęczmienia jarego na fuzariozę kłosów w powiązaniu z efektami genów reakcji fotoperiodycznej odpowiadając celowi projektu.

5. Stwierdzono sprzężenie QTL dla DON z markerem SNP 11_21037 (2H). Wyniki projektu wraz z innymi doniesieniami literaturowymi wskazują na potencjalne wykorzystanie sprzężeń marker-cecha w tym regionie do opartej na MAS (ang. marker assisted selection) hodowli jęczmienia o zmniejszonej podatności na FHB.
6. Postęp w badaniach nad kształtowaniem się cech plonotwórczych w warunkach stresu biotycznego może dokonywać się nie tylko przez identyfikację QTL o efektach stabilnych w różnych warunkach środowiska, lecz również poprzez poszukiwanie regionów genomu aktywnych tylko w warunkach stresu. Takie regiony genomu, wykazujące nawet niewielki, lecz istotny efekt na cechę w środowisku stresowym mogą wraz z głównymi loci o wysokich i stabilnych efektach korzystnie wpływać na finalną wartość danej cechy ilościowej w warunkach stresu biotycznego i być przydatne w selekcji form jęczmienia o wysokim potencjale plonowania w zmiennym środowisku.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

Przeprowadzone badania stanowią cenne źródło informacji zarówno z punktu widzenia naukowego jak i hodowlanego, ich rezultaty zostały zaprezentowane na konferencjach naukowych oraz w formie publikacji:

Mikołajczak K., Kuczyńska A., Krystkowiak K., Ogrodowicz P., Surma M., Adamski T., Kempa M., Wiśniewska H., Krajewski P. „Relationship between photoperiodic reaction and susceptibility to *Fusarium* head blight in spring barley”, 20th General Congress Plant Breeding: The Art of Bringing Science to Life, EUCARPIA, 29 sierpnia – 1 września 2015, Zurich, Szwajcaria, s. 220.

Jasińska D., Kuczyńska A., Mikołajczak K., Ogrodowicz P., Ćwiek-Kupczyńska H., Anioła M., Rubrycki K., Mazur R., Kempa M., Surma M., Adamski T., Wiśniewska H.

(2017). Zróżnicowana reakcja linii SSD jęczmienia jarego na infekcję grzybami z rodzaju *Fusarium*. Spring barley SSD lines variation to the *Fusarium* head blight infection. Biuletyn IHAR 282: 51–61.

Ogrodowicz P., Kuczyńska A., Mikołajczak K., Adamski T., Surma M., Krajewski P., Ćwiek-Kupczyńska H., Kempa M., Rokicki M., Jasińska D. (2020). Mapping of quantitative trait loci for traits linked to *Fusarium* Head Blight in barley. PlosOne 15 (2): 20222375.

Uzyskane wyniki stały się podstawą nowego projektu finansowanego przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi „Badania asocjacyjne oraz molekularne uwarunkowania odporności jęczmienia jarego na stresy środowiskowe”, Postęp biologiczny w produkcji roślinnej (nabór 2020 r.).

Literatura

Buerstmayr, H., Legzdina, L., Steiner, B., Lemmens, M. (2004). Variation for resistance to *Fusarium* head blight in spring barley. Euphytica, 137, 279–290.

Górny, A., Ratajczak, D. (2008). Efficiency of nitrogen and phosphorus utilization in progenies of factorial

crosses between European and exotic cultivars of spring barley (*Hordeum vulgare* L.). J. Appl. Genet., 49 (4), 349–55.

Górny, A.G. (2001). Variation in utilization efficiency and tolerance to reduced water and nitrogen supply among wild and cultivated barleys. Euphytica, 117 (1), 59–66.

Mesterhazy, A., Bartók, T., Mirocha, C. G., Komoróczy, R. (1999). Nature of wheat resistance to *Fusarium* head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. Plant Breed., 118 (2), 97–110.

Ūsele, G., Beinaroviča, I., Mežaka, I., Legzdina, L. (2013). Comparison of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) screening methods for *Fusarium* head blight resistance breeding. Zemdirbyste-Agriculture, 100 (3), 317–324.

Zhu, H., Gilchrist, L., Hayes, P., Kleinhofs, A., Kudrna, D., Liu, Z., Prom, L., Steffenson, B., Toojinda, T., Vivar, H. (1999). Does function follow form? Principal QTLs for *Fusarium* head blight (FHB) resistance are coincident with QTLs for inflorescence traits and plant height in a doubled-haploid population of barley. Theor. Appl. Genet., 99, 1221–1232.

Molekularna charakterystyka wpływu elementów mobilnych na zmienność genetyczną w zbożowych kulturach *in vitro*

Molecular characterization of the impact of transposable elements on genetic variation in cereals tissue cultures

Renata Orłowska✉, Piotr T. Bednarek, Katarzyna Pachota, Sławomir Bany

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB
✉ e-mail: r.orłowska@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: jęczmień, kultury tkankowe, MSTD, retrotranspozony, transpozony DNA

Cel

- Badanie poziomu zmienności indukowanej *in vitro* oraz dziedziczonej w cyklu generatywnym będącej wynikiem aktywacji elementów mobilnych (EM);
- Określenie, jakie nadrodziny EM mogą być aktywne u jęczmienia, jako rośliny modelowej;
- Zbadanie, w jakim stopniu zmiany powodowane migracją poszczególnych elementów mobilnych są powiązane ze zmianami metylacji genomowego DNA zachodzącymi podczas regeneracji roślin metodą kultur *in vitro*;

Wszystkie cele zostały zrealizowane

Materiały i Metody

Do badań wykorzystano rośliny jęczmienia jarego (genotypy 2dh/8, 19dh/4 i 7dh/3, materiały własne I HAR-PIB). Rośliny donorowe (D) były generatywnym potomstwem regeneranta uzyskanego w kulturach pylnikowych. Z roślin donorowych wyprowadzono regeneranty (R) na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych wykorzystując stres osmotyczny (0,3M mannitol i temperatury 8°C, 5 dni) do zaindukowania androgenyzy. Inkubacja pylników odbywała się na pożywkach indukujących KBP z dodatkiem 0,9 mg/l BAP (Kumlehn et al. 2006), regeneracja roślin przebiegała na pożywce regeneracyjnej K4 (Kumlehn et al. 2006) z 0,225 mg/l BAP. Zregenerowane, zielone rośliny przenoszono do kolb na pożywkę ukorzeniającą N₆J (Chu 1978) z 2 mg/l IAA w celu wykształcenia systemu korzeniowego a następnie wysadzano

je do palet wysiewnych i aklimatyzowano w fitotronie. Po okresie aklimatyzacji rośliny przeniesiono do szklarni i prowadzono w standardowych warunkach szklarniowych do osiągnięcia dojrzałości i zbioru nasion. Z regenerantów wyprowadzono generatywne potomstwo do badań (P).

Ze wszystkich roślin pozyskano DNA komercyjnym zestawem do izolacji (QIAGEN) do zaplanowanych analiz.

DNA wszystkich roślin poddano analizie techniką wysokosprawnej chromatografii cieczowej w układzie odwróconych faz (RP-HPLC) (Havliš and Trbušek 2002; Johnston et al. 2005). Powierzchnię pików RP-HPLC uzyskano w $\mu\text{V/s}$. Dla każdej badanej próby globalną metylację genomowego DNA obliczono jako iloraz zawartości 5-metyl-2'-deoksycytydyny (5mdC) przez sumę zawartości 2'-deoksycytydyny i 5-metyl-2'-deoksycytydyny oraz pomnożono przez 100. Policzone wartości średnie globalnej metylacji dla wszystkich roślin.

DNA z badanych roślin poddano analizie techniką Methyl-Sensitive Transposon Display (MSTD) (Parisod et al. 2009) opartą na założeniach metylacyjnego wariantu metody Amplified Fragment Length Polymorphism (metAFLP) (Orłowska and Bednarek 2020). W oparciu o dane literaturowe wybrano elementy mobilne należące do klasy I i II (retrotranspozony i transpozony DNA) i korzystając z programu CLC Main Workbench v. 7.6.4 zaprojektowano startery do reakcji PCR (Tabela 1). W technice MSTD do trawienia DNA wykorzystano enzymy restrykcyjne *Acc65I/MseI* oraz *KpnI/MseI*. Wzory prążków DNA uzyskane z cięcia enzymami *Acc65I/MseI* (A)



pozwołyły uzyskać informacje dotyczące zarówno zmian w sekwencji jak i metylacji DNA, zaś wzory uzyskane z cięcia enzymami *KpnI-MseI* (K) dostarczyły informacji dotyczących zmian w sekwencji DNA (zmiennosc sekwencyjna/genetyczna). Zestawienie wzorów prążków DNA z cięcia obydwoma zestawami enzymów restrykcyjnych pozwoliło na wyekstrahowanie danych *Acc65I/MseI* – *KpnI/MseI* odnoszących się tylko do zmian w metylacji DNA (M) (zmiennosc metylacyjna/epigenetyczna). Dla roślin donorowych (D) oraz generatywnego potomstwa regenerantów (P) określono poziom polimorfizmu związanego ze zmianami w sekwencji oraz metylacji DNA.

Dla regenerantów (R) uzyskanych na drodze androgenezy oszacowano całkowity poziom zmienności indukowanej w kulturze *in vitro* (TTCIV) oraz składowe tej zmienności: zmienność sekwencyjną (SV), demetylację (DMV) oraz metylację *de novo* DNA (DNMV), określono także zmianę metylacji dMET jako różnicę metylacji *de novo* i demetylacji genomu w miejscach cięcia DNA przez enzymy restrykcyjne.

Na bazie wyników molekularnych określono poziom polimorficznych loci (%P) dla roślin donorowych oraz generatywnego potomstwa regenerantów pochodzących z różnych genotypów (D68, D69, D70 i D72) wykorzystując oprogramowanie GenAlEx6.501 (dodatek Excel) (Peakall and Smouse 2012). Indeks Shannona – Weinera (*I*) został wykorzystany do scharakteryzowania informatywności systemu markerowego. Do analizy danych molekularnych wykorzystano także hierarchiczną analizę skupień przeprowadzoną w programie XLSTAT (Addinsoft 2020) z metodą średnich połączeń UPGMA (unweighted pair-group method using arithmetic averages) oraz miarą podobieństwa genetycznego ze współczynnikiem Jaccarda. Wykreślono dendrogramy dla danych odnoszących się do zmian w sekwencji oraz metylacji DNA dla wszystkich badanych roślin: donorów, regenerantów i generatywnego potomstwa regenerantów jęczmienia. Oszacowanie stopnia zmienności genetycznej przeprowadzono na poziomie wewnątrz- i międzygrupowym w oparciu o markery wygenerowane w technice MSTD dla zmienności sekwencyjnej (*KpnI/MseI*) oraz metylacyjnej (*Acc65I/MseI-KpnI/MseI*) korzystając z analizy wariancji molekularnej (AMOVA) w oprogramowaniu GenAlEx6.501 szacując indeks Φ_{PT} .

Opis wyników

Uzyskanie materiału do badań

W prezentowanym doświadczeniu uzyskano

rośliny donorowe, które były generatywnym potomstwem regeneranta pozyskanego na drodze androgenezy w kulturach pylnikowych. Finalnie prace prowadzono na 24 roślinach genotypu 2dh/8. Z roślin tych poprzez techniki kultur tkankowych uzyskano 80 regenerantów. Uzyskane rośliny będące podwojonymi haploidami nie odbiegały pokrojem (kształt i ilość liści, wysokość roślin) od roślin donorowych. Z regenerantów w warunkach polowych uzyskano 80 roślin będących generatywnym potomstwem.

Ekstrakcja DNA

Uzyskano materiał genetyczny z liści roślin donorowych, regenerantów oraz generatywnego potomstwa regenerantów. Ilość wyekstrahowanego DNA oraz jego jakość umożliwiły przeprowadzenie zamierzonych analiz molekularnych. Wyizolowany DNA był poddany cięciu enzymami restrykcyjnymi do techniki MSTD, natomiast w technice RP-HPLC wykorzystano całkowity genomowy DNA zgodnie z wybranymi metodykami.

Wyniki RP-HPLC

Oszacowano ilość globalnej metylacji DNA u roślin donorowych, regenerantów oraz generatywnego potomstwa regenerantów jęczmienia. Analiza całkowitej metylacji cytydyny (5mdC) genomowego DNA wykonana metodą RP-HPLC wykazała, że wartości te wynosiły odpowiednio 20,15%, 21,31% oraz 20,57% dla roślin donorowych, regenerantów oraz generatywnego potomstwa regenerantów. Porównanie wyników globalnej metylacji dla badanych roślin wykazało istotne zróżnicowanie ($F=73,264$; $p=0,0001$) między danymi dla D, R i P.

Wyniki MSTD rośliny donorowe

W prezentowanym temacie badawczym wykonano rozdziały elektroforetyczne wykorzystując technikę MSTD z 20 parami selektywnych startów. Analizie poddano DNA 24 roślin jęczmienia genotypu 2dh/8, otrzymując 1233 polimorficzne fragmenty DNA dla obydwu układów enzymów restrykcyjnych (*Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*). Polimorficzne markery w *KpnI/MseI* odzwierciedlające zmienność sekwencyjną stanowiły 66,74%, zaś odnoszące się do zmian w metylacji 82,50%. Zaobserwowano także zróżnicowanie pod względem polimorficznych fragmentów DNA odnoszących się zarówno do zmienności sekwencyjnej jak i metylacyjnej między rodzinami zastosowanych elementów mobilnych w technice MSTD. Najwyższy poziom zmian odnotowano dla rodziny CACTA (transpozony DNA) (76,23% zmiany w sekwencji

DNA i 88,02% zmiany w metylacji DNA), zaś najniższy dla rodziny LARD (nieautonomiczne retrotranspozony-LTR) (18,23% zmiany w sekwencji DNA i 43,01% zmiany w metylacji DNA).

Wyniki MSTD regeneranty

Wykonano rozdziały MSTD dla 80 regenerantów jęczmienia, oraz dla odpowiadających im roślin donorowych (4 rośliny). Rozdziały wykonano wykorzystując 10 par selektywnych starterów. Uzyskano czytelne elektroforegramy, które w zależności od zastosowanych starterów ukierunkowanych na sekwencje elementów mobilnych w genomie, różniły się wizualnie liczebnością fragmentów DNA. Amplifikowano w sumie 384 fragmentów DNA (od 24 do 68, zaś średnio każda para starterów powieliła 38 fragmentów).

Hierarchiczna analiza skupień oparta na danych molekularnych odnoszących się zarówno do zmian sekwencyjnych jak i metylacyjnych wykazała grupowanie się danych ze względu na pochodzenie regenerantów (skupianie się regenerantów pochodzących od jednej rośliny donorowej). Zaobserwowano, że rośliny donorowe D70 i D72 tworzą jedną grupę, która łączy się z regenerantami pochodzącymi z tych roślin, natomiast rośliny donorowe D68 i D69 nie tworzą wspólnej grupy, są zaś zgrupowane ze swoimi regenerantami. Taki sposób grupowania występuje zarówno wśród danych sekwencyjnych jak i metylacyjnych. Dane sekwencyjne charakteryzują się niższym poziomem zmienności niż dane odnoszące się do zmian w metylacji DNA.

Bazując na danych molekularnych określono całkowity poziom zmienności indukowanej w kulturze *in vitro* (TTCIV), który wynosił 17,84%. ANOVA wykazała istotne różnice ($F=499,745$; $p=0,0001$) między poszczególnymi charakterystykami metAFLP bez dzielenia danych według testowanych rodzin elementów mobilnych. Zmienność sekwencyjna wynosiła 8,79%, demetylacja 2,17 zaś metylacja *de novo* 2,17%, a różnica w metylacji dMET -0,19%. Analiza danych molekularnych pod względem wybranych rodzin elementów mobilnych wykazała istotne różnice między nimi ($F=340,5835$; $p=0,0001$, $\alpha=0,05$) (Rys.1).

Wyniki MSTD generatywne potomstwo regenerantów

Analizę techniką MSTD wykonano wykorzystując 10 par selektywnych starterów dla 8 roślin donorowych, 8 regenerantów oraz 80 roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów uzyskując sumarycznie 276 markerów, ze średnią liczbą 27 markerów przypadającą na parę

starterów. Obserwowany poziom polimorfizmu (%P) został określony na podstawie polimorficznych fragmentów DNA. Poziom polimorfizmu dla zmienności sekwencyjnej wynosił średnio 27,5% i wahał się od 24,2 do 30,8% w zależności od genotypu rośliny donorowej wykorzystanej do uzyskania potomstwa generatywnego regenerantów. Zmienność wzorów metylacji stanowiła 40,1% i wahała się w przedziale 36,9–42,4%. Na podstawie uzyskanych danych MSTD zgrupowanych pod względem użytych rodzin elementów mobilnych okazało się, iż najniższy polimorfizm był generowany przez startery ukierunkowane na rodzinę LARD, gdzie obserwowano 11,82% polimorfizmu dla danych sekwencyjnych oraz 28,72% dla danych metylacyjnych. Najwyższy polimorfizm był generowany przez startery oparte na elementach należących do rodziny CACTA.

Hierarchiczna analiza skupień danych molekularnych pochodzących z DNA ciętego enzymami *KpnI/MseI* dla generatywnego potomstwa regenerantów, wykonana w oparciu o współczynnik podobieństwa Jaccarda wskazała, że w obrębie potomstwa generatywnego regenerantów uzyskanych w wyniku regeneracji roślin metodami kultur *in vitro* występuje wysoki poziom zmienności powodowany zarówno migracją elementów mobilnych jak i zmiennością wzorów metylacji.

Podsumowania i wnioski z prowadzonych badań

Wybrana metoda pozyskiwania podwojonych haploidów (androgenesa w kulturach pylnikowych) pozwoliła uzyskać płodne regeneranty jęczmienia (genotyp 2dh/8), a z ich ziarniaków generatywne potomstwo do analiz.

Ekstrakcja DNA z liści roślin donorowych, regenerantów oraz generatywnego potomstwa regenerantów skutkowałą uzyskaniem niezbędnej ilości oraz jakości materiału do analiz technikami RP-HPLC oraz MSTD.

Analiza RP-HPLC określiła poziom globalnej metylacji DNA roślin donorowych, regenerantów oraz generatywnego potomstwa regenerantów jęczmienia wskazując na istotne różnice między badanymi grupami roślin.

Na podstawie danych literaturowych zaprojektowano startery do reakcji PCR do techniki MSTD. Przeprowadzone testy techniką PCR oraz wstępne analizy pozwoliły ocenić przydatność zaprojektowanych starterów oraz oszacować poziom polimorfizmu wśród roślin jęczmienia.

Zmiany metylacyjne odnoszące się do pięciu badanych rodzin elementów mobilnych dla DNA

roślin donorowych były wyższe niż zmiany dotyczące sekwencji DNA. W oparciu o dane dotyczące analizy MSTD wykonanej na DNA roślin donorowych wybrano materiał roślinny do badań.

Metoda MSTD oparta na założeniach techniki metAFLP pozwoliła oszacować zmiany genetyczne i epigenetyczne dla badanych regenerantów związane z obecnością różnych elementów mobilnych w genomie, przy czym zmienność sekwencyjna była wyższa niż demetylacja oraz metylacja *de novo* genomu.

Badane rodziny elementów mobilnych różniły się między sobą w ramach całkowitej zmienności indukowanej *in vitro* u regenerantów jęczmienia a rodzina CACTA wykazywała najwyższy poziom polimorfizmu.

Na podstawie zliczonych fragmentów DNA dla generatywnego potomstwa regenerantów określono polimorfizm badanych materiałów roślinnych obserwując większe zróżnicowanie wśród danych odnoszących się do zmian w metylacji DNA. Ponad to obserwowano różnice między generatywnym potomstwem regenerantów uzyskanych z różnych roślin donorowych (wpływ genotypu).

Osiągnięcia projektu

Na podstawie danych literaturowych zaprojektowano startery do techniki MSTD oraz oceniono ich przydatność do szacowania poziomu polimorfizmu wśród roślin jęczmienia. Zaproponowana metoda MSTD okazała się skuteczna do badań.

Wykonana w temacie badawczym analiza RP-HPLC określiła poziom globalnej metylacji DNA dla wszystkich badanych roślin. Obserwowano wzrost globalnej metylacji między roślinami donorowymi a regenerantami, a następnie nieznaczny spadek metylacji genomu po przejściu roślin przez cykl generatywny.

Wytypowane do analizy MSTD rodziny elementów mobilnych generowały różny poziom zmian w sekwencji i metylacji DNA.

Poziom zmienności genetycznej oraz zmian wzorów metylacji DNA u potomstwa generatywnego regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy pokazuje, że wyprowadzanie regenerantów tą metodą jest obciążone wysokim stopniem zmienności, zmienność ta jest transmitowana do potomstwa generatywnego regenerantów.

Wyprowadzenie wyrównanego materiału genetycznego metodami kultur *in vitro* może wymagać kilku cykli generatywnych stabilizujących różne typy zmienności. Liczba takich cykli nie jest ściśle zdefiniowana i prawdopodobnie zależy od genotypu.

Badanie podstaw biologicznych zjawiska oraz możliwości wpływania na poziom zmienności mają znaczenie zarówno badawcze jak i praktyczne.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

Manuskrypt pt.: "Androgenic-induced transposable elements dependent sequence variation in barley", w przygotowaniu do wysłania do recenzji do Plant Molecular Biology.

Doniesienia konferencyjne

„The Mobile Genom. Genetic and Physiological Impacts of Transposable Elements.” 11–14.10.2017 Heidelberg EMBL Advanced Training Centre, Germany; Sprawozdanie 2017 strony: 9–11. „Retrotransposition and methylation changes revealed by MSTD in generative progeny of barley regenerant”.

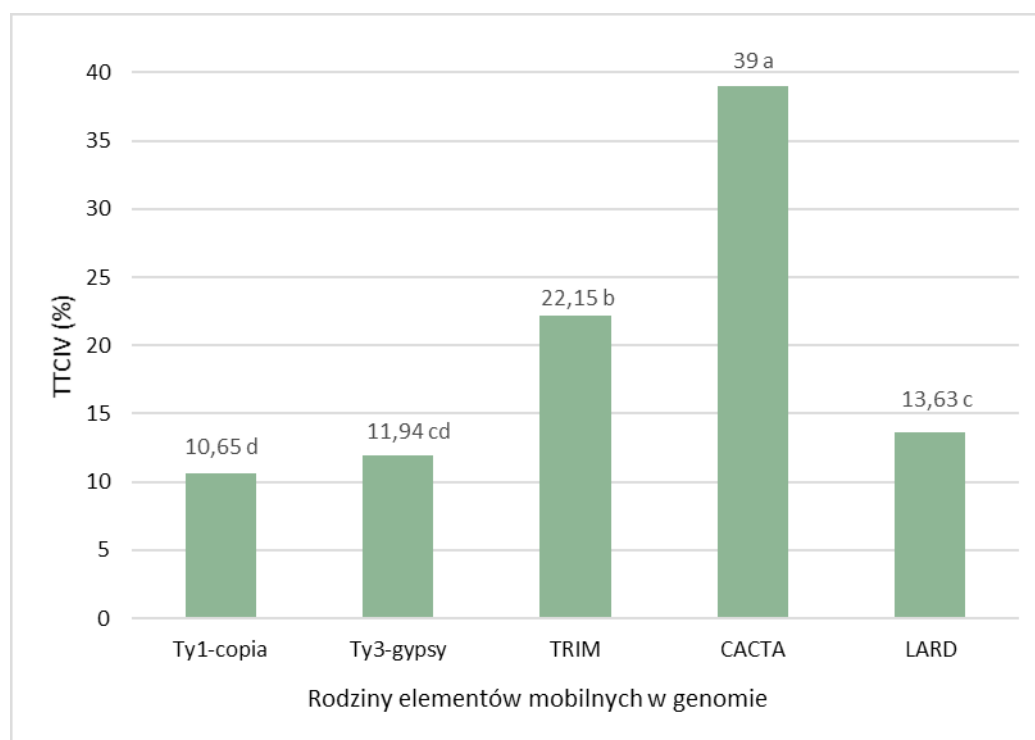
“Global Conference on Plant Science and Research in Valencia” 23–25.09.2019 r., Walencja (Hiszpania). Sprawozdanie 2018 strony: 4–7, sprawozdanie 2019 strony: 4–8 i 10–13. „Assessment of qualitative and quantitative changes in DNA sequence and methylation in barley regenerants based on MSTD”.

Literatura

- Addinsoft (2020). XLSTAT statistical and data analysis solution. New York, USA. <https://www.xlstat.com>
- Chu C. C. (1978). The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Science Press, Peking, pp 45–50.
- Havliš J., Trbušek M. (2002). 5 -Methylcytosine as a marker for the monitoring of DNA methylation Journal of Chromatography B 781:373–392
- Johnston J. W., Harding K., Bremner D. H., Souch G., Green J., Lynch P. T. (2005). HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors Plant Physiol Biochem 43
- Kumlehn J., Serazetdinova L., Hensel G., Becker D., Loerz H. (2006). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens* Plant Biotechnol J 4:251–261
- Orłowska R., Bednarek P. T. (2020). Precise evaluation of tissue culture-induced variation during optimisation of *in vitro* regeneration regime in barley Plant Mol Biol
- Parisod C., Salmon A., Zerjal T., Tenaillon M., Grandbastien M. A., Ainouche M. (2009). Rapid structural and epigenetic reorganization near transposable elements in hybrid and allopolyploid genomes in *Spartina* New Phytologist 184: 1003–1015
- Peakall R., Smouse P. E. (2012). GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update Bioinformatics 28

Tabela 1

Elementy mobilne wykorzystane do zaprojektowania starterów do techniki MSTD.	
Nazwa elementu mobilnego w genomie (nadrodzina/superfamily)	Nazwa startera
Ty1-copia (Autonomiczne LTR retrotranspozony)	BARE-1-5980
	BARE-1-C0700
Ty3-gypsy (Autonomiczne LTR retrotranspozony)	BAGY-1-C2043
	BAGY-1-C0651
	Sabrina-C0945
LARD (Nieautonomiczne LTR-retrotranspozony) (LArge Retrotransposon Derivative)	Sukkula E0228
	Sukkula 91673
TRIM (Nieautonomiczne LTR-retrotranspozony) (small non-autonomous Long Terminal Repeat Retrotransposons / Terminal Repeat Retrotransposons In Miniature)	CAS AY16F
	CAS AY16R
	CAS 978
	CAS 979
	Balduin
CACTA (DNA Transpozony)	CASP-124R
	CASP-1F
	CASP-1R



Rys. 1. Średnie wartości zmienności indukowanej *in vitro* (TTCIV) dla poszczególnych rodzin elementów mobilnych wykorzystanych w analizie regenerantów jęczmienia. Wartości średnie na wykresie oznaczone tą samą literą różnią się istotnie; grupowanie wykonane testem Tukeya.

Wpływ stresu niedoboru wody na rozwój i architekturę systemu korzeniowego u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)

Effects of drought on the development and architecture of barley root system

Anetta Kuczyńska✉, Tadeusz Adamski, Maria Surma, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogradowicz, Michał Kempa, Monika Mokrzycka, Renata Trzeciak, Renata Holewińska, Alina Anioła

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60–479 Poznań
✉ e-mail: akuc@igr.poznan.pl

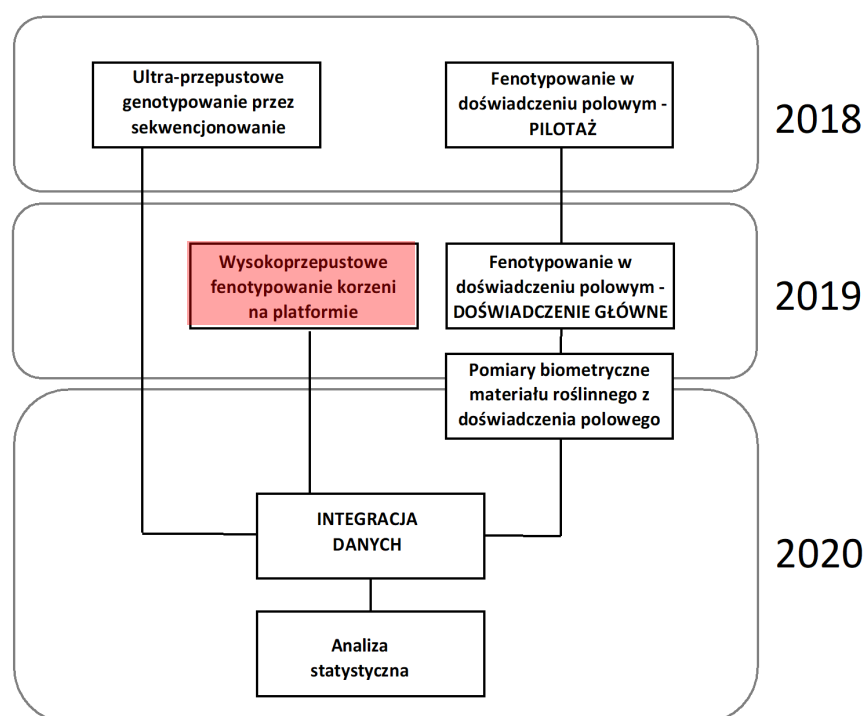
Słowa kluczowe: fenotypowanie, genotypowanie, obrazowanie korzeni, plonowanie, stres abiotyczny, susza, właściwości elektryczne systemu korzeniowego

Cel prowadzonych badań

System korzeniowy odgrywa kluczową rolę w pobieraniu wody i składników odżywczych, a tym samym determinuje rozwój całej rośliny. Dobrze rozwinięty system korzeniowy może wpływać na wzrost produktywności roślin w zróżnicowanych warunkach środowiska. Z tego względu opracowanie nowych koncepcji analizowania fenotypu korzeni i poznanie zmian w ich architekturze w zmiennych warunkach środowiska nabiera coraz większego znaczenia. Celem badań było zbadanie wpływu niedoboru wody

na rozwój i architekturę systemu korzeniowego u jęczmienia. W badaniach wykorzystano 150 różnych form jęczmienia jarego, to jest odmian, rodów lub linii o zróżnicowanym pochodzeniu, wybranych w porozumieniu z firmami hodowlanymi.

Wszystkie cele projektu zostały w pełni osiągnięte z wyjątkiem oceny parametrów systemu korzeniowego genotypów jęczmienia jarego w czasie rzeczywistym, bez uszkodzenia całej rośliny, poprzez zastosowanie najnowszych technik obrazowania korzeni w warunkach



Rys. 1. Schemat projektu.

kontrolnych oraz w warunkach deficytu wody na platformie do fenotypowania roślin wyposażonej w najnowsze urządzenia służące do ciągłego, nieinwazyjnego mierzenia parametrów korzeni (etap zaznaczony na rys. 1 kolorem czerwonym) przeprowadzone w Aberystwyth University National Plant Phenomics Centre w Wielkiej Brytanii. W związku z decyzją redukcji kosztów Zadania z dnia 27 maja 2019 roku skorygowanym miernikiem (zgodnie z korektą z dnia 5 czerwca 2019 roku) dla tego tematu badawczego było 50 w miejsce 150 genotypów jęczmienia jarego.

Materiały i metody

Realizacja zaplanowanych celów badawczych wiązała się z podziałem prac na pięć zadań:

1. Fenotypowanie badanych form w doświadczeniu polowym – pilotaż w pierwszym roku trwania projektu mający na celu ustalenie dokładnych warunków prowadzenia doświadczenia głównego. Opracowano metodykę analiz rozwoju i architektury systemu korzeniowego oraz wykorzystano mierniki pracujące w oparciu o pomiar pojemności elektrycznej (ang. electrical capacitance).
1. Fenotypowanie badanych form w doświadczeniu polowym – doświadczenie główne, w którym monitorowano poziom wilgotności gleby przy użyciu przyrządu FOM/mts działającego w oparciu o metodę reflektometryczną. W okresie wegetacji prowadzono analizy systemu korzeniowego z wykorzystaniem mierników pojemności elektrycznej. Po zbiorze roślin wykonano pomiary i obserwacje dotyczące architektury systemu korzeniowego, jak również wysokości roślin, krzewistości, plonu biomasy oraz cech kłosa.
2. Wysokoprzepustowe fenotypowanie korzeni jęczmienia na platformie – m.in. całkowita długość korzeni, liczba korzeni bocznych, szerokość systemu korzeniowego oraz szybkość

wydłużenia korzeni w Aberystwyth University National Plant Phenomics Centre w Wielkiej Brytanii. Analizy przeprowadzono przed wystąpieniem niedoboru wody, w trakcie jego trwania i kilka dni po ponownym nawodnieniu, łącznie przez około 40 dni. Stres niedoboru wody stosowano od fazy krzewienia (faza 21 w skali BBCH) przez okres 14 dni. Równolegle w ten sam sposób prowadzono i monitorowano rośliny kontrolne, rosnące w warunkach optymalnego nawodnienia.

3. Ultra-przepustowe genotypowanie przez sekwencjonowanie (GBS) – izolacja genomowego DNA analizowanych form jęczmienia wraz z oceną jakościową przeprowadzona została przez wykonawców projektu. Analizę GBS zlecono firmie zewnętrznej.
4. Przetwarzanie danych, integracja i wnioskowanie prowadzono we współpracy z Department of Biological, Environmental and Rural Sciences, Aberystwyth University w Wielkiej Brytanii oraz z Zakładem Biometrii i Bioinformatyki IGR PAN.

Wyniki i wnioski

Fenotypowanie badanych form w doświadczeniu polowym

Opracowano metodykę analiz rozwoju i architektury systemu korzeniowego, a także ustalenia stosunku części nadziemnej do części podziemnej rośliny. Poza metodyką manualnych obserwacji biometrycznych korzeni wykorzystano mierniki pracujące w oparciu o pomiar pojemności elektrycznej umożliwiające ocenę systemu korzeniowego *in situ*. Momenty pomiaru pojemności elektrycznej zostały wybrane w oparciu o zmieniającą się wrażliwość rośliny wraz ze wzrostem i stadium rozwojowym. Analizowano cechy korzeni podczas wegetacji, takie jak wielkość systemu korzeniowego *in situ* za pomocą przyrządu mierzącego

Tabela 1

Współczynniki korelacji dla cech związanych z systemem korzeniowym a wybranymi cechami części nadziemnej roślin.

	Biomasa części nadziemnej	Masa ziarna z rośliny	Biomasa korzenia	Długość korzenia
Biomasa korzenia	0,581**	0,442**		
Długość korzenia	0,271**	0,211**	0,318**	
T1	0,423**	0,381**	0,337**	n.s.
T2	0,533**	0,496**	0,394**	0,139*
T3	0,240**	0,201**	0,136*	n.s.
T4	0,392**	0,235**	0,323**	n.s.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$

n.s. – nieistotny (ang. not significant)

pojemność elektryczną w czterech fazach: krzewienia (T1), strzelania w źdźbło (T2), kłoszenia (T3) i nalewania ziarna (T4), natomiast po zbiorze roślin mierzono długość i masę korzeni. Ponadto wykonano pomiary cech morfologicznych części nadziemnych: wysokość roślin, długość kłosa, liczba i masa ziarna z kłosa, masa ziarna z rośliny, masa 1000-ziaren. Większość cech była ze sobą pozytywnie skorelowana na poziomie istotności $P < 0,01$ (tab. 1). Wykazano istotny związek między pomiarem pojemności elektrycznej we wszystkich momentach czasowych z biomasą systemu korzeniowego roślin po zbiorze. Na tej podstawie można stwierdzić, że zastosowana metoda pomiaru sytemu korzeniowego *in situ* może służyć do skutecznej predykcji rozwoju korzeni w sposób nieinwazyjny w warunkach naturalnych. Nie wykazano korelacji pomiędzy długością korzeni a pomiarem pojemności elektrycznej w fazie T1, T3 oraz T4.

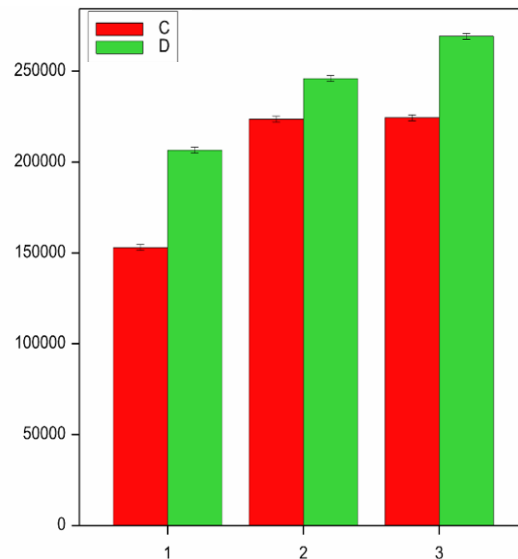
Wysokoprzepustowe fenotypowanie korzeni jęczmienia na platformie

Analiza cech dynamicznych z wykorzystaniem nowoczesnej platformy (dzięki współpracy międzynarodowej) wyposażonej w kamery RGB, UV i NIR pozwoliła na stwierdzenie:

— warunki deficytu wody stymulują rozwój

korzeni i ich sięganie głębszych regionów podłoża,

- korzeń główny charakteryzował się większą masywnością w warunkach kontrolnych w porównaniu do warunków deficytu wody,
- wzrost i rozwój systemu korzeniowego nie jest znacząco hamowany przez warunki stresowe a jedynie zmienia się jego struktura,
- zmniejszenie średnicy korzeni umożliwia roślinie efektywny wzrost przewodności hydraulicznej zwiększającej wydajność poboru wody,
- stres suszy stymuluje rozwój zarówno korzeni głównych jak i bocznych najbardziej na wczesnym etapie niedoboru wody – ta obserwacja może być związana z jeszcze dostępnymi zasobami energetycznymi, które w momencie wystąpienia suszy wykorzystywane są do intensyfikacji rozwoju systemu korzeniowego celem maksymalizacji pozyskiwania wody z podłoża,
- efekt traktowania (stres niedoboru wody) był dodatni w przypadku analizowanych genotypów jęczmienia zarówno pod względem długości korzeni jak i gęstości korzeni, przy czym efekt traktowania dla gęstości korzeni był największy na wczesnym etapie wystąpienia stresu suszy.



Rys. 2. Efekt traktowania dla gęstości korzeni dla wszystkich badanych genotypów jęczmienia jarego w odniesieniu do trzech punktów czasowych: 1 – pierwszy dzień stresu suszy, 2 – siódmy dzień stresu suszy, 3 – czternasty dzień stresu suszy.

Przetwarzanie danych i integracja

Pośród 10 genotypów (I grupa – tab. 2) o największej gęstości korzeni w suszy w 3 punkcie czasowym cztery genotypy miały plon (w polu) wyższy niż średnia (5.30 g) obliczona dla 50 genotypów wybranych do doświadczenia na platformie:

Rubaszek, MHR-PJ-1415, Basza, Kormoran. Rubaszek miał zdecydowanie większą gęstość korzeni niż pozostałe odmiany. Jednocześnie Rubaszek był wśród 10 form (II grupa – tab. 2) o największej długości systemu korzeniowego w suszy trwającej dwa tygodnie (3 punkt czasowy). Spośród nich

tylko dwa genotypy wykazały plon (w warunkach naturalnych) niższy od średniej dla badanych 50 genotypów na platformie do fenotypowania korzeni. Ponadto w II grupie zidentyfikowano dwa genotypy o najwyższym plonie, tj. Concerto i DC17.1.

W początkowym okresie suszy (1 punkt czasowy), w obrębie 10 genotypów (III grupa – tab. 2) o największej gęstości systemu korzeniowego, co potencjalnie może determinować wysoką efektywność pobierania wody z powierzchniowej warstwy gleby w początkowym okresie suszy, były

cztery odmiany o plonie wyższym niż średnia dla badanych 50 genotypów na platformie do fenotypowania korzeni, tj. Basza, DC17.2, Keops i Kucyk.

Pośród 10 genotypów (IV grupa – tab. 2) najlepiej plonujących w warunkach naturalnych pięć miało długość systemu korzeniowego po aplikacji suszy przez dwa tygodnie powyżej 80 cm, tj. Concerto, DC17.1, Teksas, Rufus, DC17.4. Gęstość ich systemu korzeniowego oscylowała wokół średniej dla wszystkich badanych genotypów na platformie do fenotypowania korzeni.

Tabela 2

Wyodrębnione grupy genotypów jęczmienia jarego z analiz prowadzonych w warunkach naturalnych oraz na platformie do fenotypowania korzeni uszeregowane malejąco w obrębie grupy.

I grupa	II grupa	III grupa	IV grupa
Evelina, Atico, Rubaszek, CamB, Ella, Estana, Goodluck, MHR-PJ-1415, Basza, Kormoran	Class, Ella, MPS106, DC17.1, DC17.2, Arthur, Concerto, Teksas, DC17.2, Rubaszek	Frontier, Estana, Basza, Fariba, DC17.2, Ella, Evelina, Conchita, Keops, Kucyk	Concerto, DC17.1, Podarek, Teksas, Suwren, Rufus, MHR-PJ-1415, Keops, Stratus, DC17.4

Osiągnięcia projektu

1. Ze względu na trudności metodologiczne związane z monitorowaniem wzrostu korzeni w glebie, istnieje ciągle zainteresowanie wykorzystaniem i rozwojem prostych, szybkich metod *in situ* dostarczających informacji na temat rozwoju systemu korzeniowego bez uszkodzenia całej rośliny. Jedną z takich nieinwazyjnych technik opiera się na właściwościach elektrycznych systemu korzeniowego i polega na wykorzystaniu mierników pracujących w oparciu o pomiar pojemności elektrycznej. W projekcie stwierdzono pozytywną, istotną korelację między większością cech związanych z częścią nadziemną rośliny oraz cechami systemu korzeniowego potwierdzając, że ta nieinwazyjna metoda jest odpowiednia do powtarzalnej oceny rozwoju systemu korzeniowego w warunkach polowych, dodatkowo prowadzonej także w różnych stadiach rozwojowych rośliny.
2. Zdolność wzrostu korzeni na długość w warunkach suszy jest kluczowa dla pobierania wody przez roślinę z głębszych warstw gleby zwłaszcza przy przedłużającej się suszy, gdy w powierzchniowej warstwie dostępność wody jest ograniczona. Stąd genotypy wykazujące największy potencjał wzrostu korzeni na długość w warunkach deficytu wody, a jednocześnie dobrze plonujące w warunkach polowych, mogą utrzymywać stabilną wydajność plonowania również w niekorzystnych warunkach środowiska przy ograniczonym
3. Zintegrowane badania w projekcie dostarczyły nowej wiedzy o adaptacji roślin do warunków stresowych, a uzyskane wyniki będą mogły stanowić odniesienie dla przyszłych hipotez badawczych dotyczących jęczmienia i innych zbóż. Ponadto formy jęczmienia wykorzystane w projekcie mogą w przyszłości stanowić źródło korzystnych alleli w selekcji odmian lepiej przystosowanych do stresowych warunków środowiska. Jako, że jęczmień coraz częściej określany jest mianem rośliny modelowej, wiedza zdobyta w projekcie przyczyni się do ulepszania również innych zbóż determinując postęp biologiczny oraz wpłynie na wzbogacenie obecnej wiedzy o podstawach odpowiedzi roślin na stresse abiotyczne.
4. Uzyskane wyniki stały się podstawą dwóch nowych projektów finansowanych ze środków unijnych przyznanych przez Europejską Sieć Fenotypowania Roślin (EPPN2020) wykorzystujących wysokoprzepustowe fenotypowanie na platformie z zastosowaniem najnowszych technik nieinwazyjnego obrazowania rozwoju roślin w czasie rzeczywistym (tego typu infrastruktury nie są dostępne w Polsce): *i)* “The architecture and development of the roots system in barley plants grown under drought conditions in relation to flowering acceleration”, Projekt ID 206 – realizowane we współpracy z The National Plant Phenomics Center (NPPC), Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences at Aberystwyth University,

Wielka Brytania, ii) “High-throughput phenotyping of barley varieties response to drought for understanding crops adaptation to arid climate”, Projekt ID 425 – realizowane we współpracy ALSIA-Metapontum Agrobios Research Center, Metaponto (MT), Włochy.

5. Uzyskane dane posłużą do analizy mapowania asocjacyjnego (Genome Wide Association Mapping) stanowiąc osiągnięcie poprojektowe.

Wykaz publikacji

Doniesienia konferencyjne:

Wykład Kuczyńska A., Surma M., Mikołajczak K., Ogródowicz P., Kaczmarek Z., Mejza I., Kempa M. „Statistical approach to evaluate phenotypic variation of barley varieties regarding root and shoot”, 15th Applied Statistics International Conference, 23–26 września 2018, Ribno, Słowenia, Streszczenia konferencyjne str. 54.

Wykład Kuczyńska A. „Wysokoprzepustowe i nieinwazyjne fenotypowanie roślin” w ramach Seminarium naukowego „Nowoczesne metody fenotypowania roślin” w Szkole Głównej Gospodarstwa Wiejskiego 15 listopada 2019 r., Warszawa.

Dwa plakaty na IV Ogólnopolskiej Konferencji „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany”, 5–7 listopada 2019 r., Poznań:

Kuczyńska A., Adamski T., Surma M., Krajewski P., Miko-

łajczak K., Ogródowicz P., Kempa M., Mokrzycka M., Trzeciak R. „Wpływ stresu niedoboru wody na rozwój i architekturę systemu korzeniowego u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)”,

Ogródowicz P., Kuczyńska A., Mikołajczak K., Kempa M., Doonan J., Corke F., Williams K., Krajewski P. „Wysokoprzepustowe fenotypowanie korzeni jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) w warunkach niedoboru wody”.

Publikacje:

Dwie publikacje w Biuletynie Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin; w tym Nr 286 (2019): Wydanie specjalne – Postęp Biologiczny 2019, str. 117–121.

Dwie publikacje w przygotowaniu, planowany termin złożenia do czasopism – początek 2021 roku.

Współpraca międzynarodowa:

The National Plant Phenomics Center (NPPC), Institute of Biological, Environmental and Rural Sciences at Aberystwyth University, Wielka Brytania; Zastosowanie najnowszych technik obrazowania korzeni jęczmienia jarego w warunkach kontrolnych oraz w warunkach deficytu wody na platformie do fenotypowania roślin wyposażonej w najnowsze urządzenia służące do ciągłego, nieinwazyjnego mierzenia parametrów korzeni – wspólne badania, wymiana osobowa.

Badania nad zwiększeniem odporności żyta na sporysz i na fuzariozę kłosów przez poznanie interakcji pasożyt – żywiciel – środowisko z wykorzystaniem genetycznych źródeł odporności na *Claviceps purpurea* i grzyby rodzaju *Fusarium*

The research on increasing resistance in rye to ergot and to *Fusarium* head blight by studying the host-parasite-environment relationship using genetic sources of resistance to *Claviceps purpurea* and *Fusarium* genus

Tomasz Kosiada✉, Roman Andrzejak, Marcin Wieczyński, Patrycja Marciniak

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60–637 Poznań
✉ e-mail: tomasz.kosiada@up.poznan.pl, roman.andrzejak@up.poznan.pl

Poniższe dane zostały opublikowane w Biuletynie Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, (286), 127-133

Słowa kluczowe: *Claviceps purpurea*, ergot, *Fusarium*, genotyp, rye, sporysz, żyto

Cel

Celem prowadzonych badań było określenie interakcji pomiędzy czynnikami wpływającymi na wystąpienie wybranych chorób kłosów żyta. Oceniano reakcje 90 genotypów żyta na porażenie przez *Claviceps purpurea* i grzyby rodzaju *Fusarium*. Badania prowadzono w trzech Stacjach Hodowli Roślin (Choryń, Smolice, Wiatrowo) oraz w Katedrze Fitopatologii i Nasiennictwa Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. W latach 2014–2018 tematyka poszczególnych badań obejmowała:

- pozyskanie izolatów grzybów patogenicznych oraz mikroorganizmów niepatogenicznych wykorzystywanych w dalszych etapach badań,
- ocena patogeniczności, zmienności genetycznej, przynależności gatunkowej patogenów oraz określenie przynależności gatunkowej i działania antagonistycznego pożytecznych mikroorganizmów,
- ocena porażenia żyta przez grzyby i występowania mykotoksyn,
- prowadzenie doświadczeń w różnych warunkach środowiska z udziałem różnych genotypów w warunkach polowych,
- prowadzenie doświadczeń w komorze wegetacyjnej i na mikropoletkach w celu określenia interakcji patogen – genotyp żyta.

Wyniki

W latach 2014–2015 z prób roślin pobieranych, z terenu Kujaw i Wielkopolski uzyskano izolaty grzybów patogenicznych należących do rodzaju *Fusarium* oraz grzybów niepatogenicznych, potencjalnych antagonistów. W wyniku prowadzonych prac udało się w roku 2014 się uzyskać 15 izolatów grzybów należących do rodzaju *Trichoderma* (*T. aureoviride* 2 szt., *T. brevicompactum* – 2 szt., *T. citrinoviride* – 2 szt., *T. hamatum* – 2 szt., *T. harzianum* – 2 szt., *T. koningii*, *T. longipilis* – 2 szt., *T. pseudokoningii*, *T. pubescens*, *T. strictipilis*). Spośród grzybów należących do rodzaju *Fusarium* najczęściej izolowano gatunki: *F. avenaceum*, *F. culmorum* i *F. graminearum*. W 2015 wyizolowano grzyby powszechnie uznawane za patogeny, szczególnie grzyby rodzaju *Fusarium*. Izolowano również grzyby rodzaju *Bipolaris* oraz *Drechslera*. W wyniku prowadzonych prac wyizolowano łącznie ponad 130 izolatów. Ponadto oznaczono grzyby należące do *Acremonium* sp. – 3 szt., *Alternaria alternata* – 14 szt., *Aspergillus flavus* – 4 szt., *Cladosporium cladosporioides* – 8 szt., *Epicoccum* – 11 szt., *Gliocladium* sp. – 7 szt., *Mucor* sp. – 6 szt., *Penicillium* sp. – 16 szt., *Rhizopus* sp. – 4 szt., *Trichoderma* sp. – 8 szt. Kultury *C. purpurea* uzyskiwano poprzez wyłożenie sklerocjów na pożywkę PDA. W przypadku pozyskiwania



izolatów *C. purpurea* sklerocja pochodziły z 3 miejscowości (Choryń, Smolice, Wiatrowo). Uzyskano 50 czystych kultur *C. purpurea*. Sklerocja używane do pozyskania patogenu zostały zebrane z kłosów różnych genotypów żyta.

Uzyskane izolaty niepatogenicznych grzybów testowane były wobec *C. purpurea* metodą szeregów biotycznych (Mańka 1974) w celu wybrania najbardziej antagonistycznych izolatów. Na podstawie oceny indywidualnego efektu biotycznego (IEB) stwierdzono, w 2014 roku, wzajemne różnicowanie oddziaływania między badanymi 15 izolatami rodzaju *Trichoderma* a izolatami *C. purpurea*. Wartości IEB, uzyskane w trakcie badań były wysokie i wahały się od +6 do +8. Uzyskane wyniki potwierdziły wysokie zdolności grzybów rodzaju *Trichoderma* w ograniczaniu wzrostu lub rozwoju *C. purpurea*. W 2015 roku metodą szeregów biotycznych (Mańka 1974) oceniano inne izolaty grzybów niepatogenicznych. Stwierdzono różnicowanie oddziaływania między badanymi izolatami różnych gatunków (*Acremonium alternatum*, *Epicoccum nigrum*, *Gliocladium catenulatum*, *Mucor hiemalis*, *Penicillium adametzii*, *P. funiculosum*, *P. nigricans*, *Trichoderma harzianum*, *T. viride* i *Zygorhynchus moellerii*) a izolatami *C. purpurea*. Wartości IEB, wahały się od +4 do +8, w zależności od testowanego wobec *C. purpurea* gatunku. Uzyskane wyniki potwierdziły pogląd o występującej zależności pomiędzy dużą szybkością wzrostu kultur a ich zdolnościami antagonistycznymi. W tym doświadczeniu patogen *C. purpurea* charakteryzował się najwolniejszym wzrostem. Potwierdziły się również wysokie zdolności antagonistyczne izolatów z rodzaju *Trichoderma*.

Dla 50 izolatów *C. purpurea* wyizolowano DNA. Następnie dla części z nich przeprowadzono reakcję PCR z użyciem staterów ITS1/ITS4. Następnie produkt PCR poddano sekwencjonowaniu. Porównanie wyników z danymi programu BLAST potwierdziły przynależność do gatunku *C. purpurea*. Dla starterów serii URP udało się uzyskać zmienność wewnątrz gatunkową. Przeprowadzone reakcje z użyciem starterów URP6R, URP4R, URP30F, URP25F, URP17R, URP38F pozwoliły dokonać pogrupowania izolatów. Nie udało się wyodrębnić grup związanych z innymi cechami np. z pochodzeniem izolatów.

W trzech miejscowościach (Choryń, Smolice, Wiatrowo) dokonano oceny porażenia 90 genotypów żyta przez grzyby rodzaju *Fusarium* w warunkach naturalnej infekcji oraz w wyniku sztucznego zakażenia. Badanie obejmowało 3 powtórzenia. W pierwszym i drugim roku oceniano wyłącznie

naturalne porażenie, w kolejnych latach (2016, 2017, 2018) jedno powtórzenie podlegało sztucznej inokulacji przez *Fusarium culmorum* (2016), *F. graminearum* (2017) i *F. poae* (2018). Dla części prób oceniano również występowanie mykotoksyn (2014, 2015). Ocenę zawartości mykotoksyn (deoksynivalenol (DON), zearalenon (ZEA)) w ziarniakach przeprowadzono przy użyciu testu ELISA.

Średni procent zasiedlenia ziarniaków przez grzyby rodzaju *Fusarium* w zależności od pochodzenia genotypów był bardzo podobny i wynosił dla genotypów z Wiatrowa: 7,5%, Smolic: 7,2% i Choryni: 7,1%. Z kolei średnie porażenie dla 90 genotypów z zależności od lokalizacji doświadczenia było największe dla Wiatrowa (16,7%) i Choryni (15,3%) a najmniejsze dla Smolic (8,4%). Gatunkami *Fusarium* identyfikowanymi w trakcie oceny były *F. graminearum*, *F. poae*, *F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum* i *F. equiseti*. Ziarniaki w wyniku naturalnej infekcji najczęściej porażane były przez *F. avenaceum* (3,1%), następnie w kolejności malejącej przez *F. graminearum* (1,4%), *F. culmorum* (1,2%) i *F. poae* (1,0%). Dominującymi gatunkami w poszczególnych latach badań były: *F. avenaceum* (2015, 2016), *F. graminearum* (2014) i *F. culmorum* (2017, 2018). Sztuczne zakażenie kłosów żyta w trakcie kwitnienia powodowało w przypadku *F. culmorum* i *F. graminearum* odpowiednio 5,2 i 2,65 razy większe porażenie ziarniaków niż w warunkach naturalnej infekcji. Z kolei zakażenie przez *F. poae* nie spowodowało większego zasiedlenia ziarniaków. Stwierdzono duże różnicowanie w zasiedleniu ziarniaków żyta przez poszczególne gatunki rodzaju *Fusarium*, nie znaleziono genotypu który nie był zasiedlany przez grzyby tego rodzaju. W tabeli 1 przedstawiono genotypy, w przypadku których stwierdzono najmniejszy procent zasiedlenia przez grzyby rodzaju *Fusarium* w poszczególnych latach badań.

Zawartość mykotoksyn we wszystkich próbkach w odniesieniu do obu mykotoksyn była na bardzo niskim poziomie, zbliżonym do błęd pomiarowego.

W trzech miejscowościach oceniano porażenie 90 genotypów żyta przez *C. purpurea* w warunkach naturalnej infekcji oraz w doświadczeniu fungicydowym interakcje pomiędzy genotypem, lokalizacją doświadczenia a ochroną fungicydową w występowaniu sporyszu. W zebranych plonie wydzielano frakcje zawierającą przetrwalniki *C. purpurea*, na tej podstawie obliczono udział sklerocjów w ogólnym plonie żyta. W doświadczeniu fungicydowym zastosowano fungicyd Adexar Plus, w dwóch terminach: początek kwitnienia

najwcześniejszej odmiany oraz siedem dni później. Czynnikiem pierwszego rzędu był genotyp żyta (trzy genotypy, różniące się długością kwitnienia), drugiego rzędu zastosowanie fungicydu w różnych terminach (trzy poziomy: początek kwitnienia najwcześniejszej odmiany, siedem dni później, równocześnie w obu terminach). Dodatkowo w latach 2016–2018 dodano kombinacje z opryskiwaniem roślin zawiesiną zarodników *Trichoderma* sp.

W latach 2014–2018 stwierdzono duże różnice w porażeniu pomiędzy 90 genotypami żyta uprawianymi w trzech miejscowościach. Jego występowanie bardzo silnie zależało od miejscowości. Największe ilości sklerocjów stwierdzono w Smolicach – 3,85 mg w 1 kg, mniej w Wiatrowie – 1,37 mg w 1 kg, a najmniej w Choryni 0,64 mg w 1 kg. Nie stwierdzono różnic w występowaniu sporyszu w zależności od pochodzenia genotypu. W genotypach pochodzących z PHR (Wiatrowo) było 0,47 mg sklerocjów w 1 kg, z Danko (Choryń) 0,53 mg sklerocjów w 1 kg, a ze Smolic 0,52 mg sklerocjów w 1 kg. W latach tych wystąpiły znaczne różnice w porażeniu poszczególnych genotypów, występowały też genotypy w których nie stwierdzono obecności sklerocji *C. purpurea* (tab. 2).

W przeprowadzonym w latach 2014–2018 doświadczeniu z ochroną fungicydową, stwierdzono duże różnice w porażeniu pomiędzy miejscowościami. W latach 2014–2015 najwięcej sporyszu (w mg sklerocjów w 1 kg) stwierdzono: 1403,6 – Wiatrowie, 704,1 – Smolice 26,2 – Choryń. Podobną zależność uzyskano w latach 2016–2018, z tym, że ilość sklerocjów w mg w 1 kg była niższa i wynosiła odpowiednio: 1,6; 1,1; 0,7. Średnio dla wszystkich miejscowości i lat najmniej sklerocjów było w kombinacji, w której wykonano tylko 1 zabieg 7 dni po początku kwitnienia (492,6 mg sklerocjów w 1 kg w latach 2014–2015 i 1,1 mg sklerocjów w 1 kg w 2016–2018). We wszystkich kombinacjach, w których stosowano opryskiwanie plon ziarna był wyższy (od 7 do 7,35 kg z poletka) niż w kombinacji nieopryskiwanej (6,75 kg z poletka). Zawartość sklerocjów w kombinacji z użyciem zawiesiny *Trichoderma* sp. była na podobnym poziomie jak w kombinacjach z fungicydem i wynosiła 1,2 mg w 1 kg.

Doświadczenia założone w celu określenia interakcji patogen-genotyp żyta było prowadzone na odmianie Dankowskie Złote. Do zakażenia w kolejnych latach używane były różne izolaty rodzaju *Fusarium*. W okresie kwitnienia roślin żyta były one opryskiwane zawiesiną zarodników odpowiedniego gatunku rodzaju

Fusarium (*F. avenaceum*, *F. culmorum*, *F. graminearum*, *F. poae*, *F. equiseti*). Dodatkowo przewidziano kombinacje z wykorzystaniem izolatów rodzaju *Trichoderma*, którymi opryskiwano rośliny żyta dwa dni po sztucznej inokulacji przy użyciu zawiesiny zarodników *Fusarium*. Sztuczna inokulacja roślin żyta zawiesiną zarodników odpowiedniego izolatu rodzaju *Fusarium* powodowała większe zasiedlenie ziarniaków żyta przez ten gatunek. Wynosiło ono dla *F. avenaceum* – 20,4%, *F. culmorum* – 22,7%, *F. graminearum* – 25,8%, *F. poae* – 12,8%, *F. equiseti* – 16,0%. Przy zastosowaniu ochrony z wykorzystaniem izolatów rodzaju *Trichoderma* procent porażenia ziarniaków żyta ulegał zmniejszeniu i wynosił dla *F. avenaceum* – 12,6%, *F. culmorum* – 10,4%, *F. graminearum* – 16,9%, *F. poae* – 8,1%, *F. equiseti* – 9,1%. W komorze vegetacyjnej przeprowadzono doświadczenie nad wpływem temperatury na przebieg infekcji przez *C. purpurea*. Oceniano wpływ trzech temperaturach: 10, 15, 20 °C. W trakcie kwitnienia rośliny opryskiwano zawiesiną zarodników pochodzącą z różnych izolatów. W temperaturze 10 °C uzyskano 0,06 mg sklerocjów w 1 kg, w 15 °C – 0,05 mg sklerocjów w 1 kg a w temperaturze 20 °C – 1,1 mg sklerocjów w 1 kg.

Wnioski

1. Jedną ze skuteczniejszych metod pozyskiwania kultur *C. purpurea* jest uzyskiwanie wzrostu grzybni wyrosłej ze sklerocjów.
2. Izolaty *Trichoderma harzianum*, *T. pseudokoningii*, i *T. viride* oraz *Penicillium adametzii* charakteryzowały się najwyższymi zdolnościami antagonistycznymi (wyrażone najwyższym IEB) wobec badanych izolatów *C. purpurea*.
3. Stwierdzono zróżnicowaną interakcję między badanymi izolatami *C. purpurea* a izolatami grzybów niepatogenicznych.
4. Startery serii URP generują produkty PCR różnicujące izolaty wewnątrz gatunku *C. purpurea*.
5. Największy wpływ na porażenie żyta przez *C. purpurea* i *Fusarium* sp. ma lokalizacja doświadczenia.
6. Występują różnice w porażeniu badanych 90 genotypów żyta przez *C. purpurea* i *Fusarium* sp. Nie znaleziono genotypów żyta, które były odporne na porażenie przez grzyby rodzaju *Fusarium*.
7. Sztuczne zakażenie roślin żyta zarodnikami konidialnymi *C. purpurea* lub izolatem konkretnego gatunku grzyba rodzaju *Fusarium* zwiększa porażenie ziarniaków.

8. Opryskiwanie roślin żyta fungicydem w okresie kwitnienia nie ma negatywnego wpływu na plon.
9. Opryskiwanie kwitnących roślin żyta zawieszoną zarodników *Trichoderma* dwa dni po zakażeniu przez *Fusarium* powoduje obniżenie porażenia ziarniaków przez *Fusarium* sp.

Osiągnięcia projektu

1. Uzyskanie wyników potwierdzających większą zależność wielkości porażenia przez *C. purpurea* oraz *Fusarium* od stanowiska (warunków meteorologicznych) niż od genotypu żyta.
2. Potwierdzenie w warunkach polowych przydatności grzybów rodzaju *Trichoderma* do ograniczania porażenia kłosów (ziarniaków) żyta przez *Fusarium*.
3. Identyfikacja genotypów żyta mniej podatnych na porażenie przez *C. purpurea* i *Fusarium*.
4. Potwierdzenie możliwości ograniczenia występowania sporyszu poprzez opryskiwanie fungicydami roślin żyta w fazie kwitnienia.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

Wieczyński M., Kosiada T., Andrzejak R., Nowak D. (2016).

Wpływ genotypu i zabiegów fungicydowych na zasiedlenie ziarniaków żyta przez grzyby rodzaju *Fusarium*. *Fragmenta Agronomica*, 33 (3).

Konferencje

Kosiada T., Andrzejak R., Wieczyński M., Nowak D. (2016). Występowanie grzybów rodzaju *Fusarium* na ziarniakach różnych genotypów żyta. 56. Sesja Naukowa Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego, Poznań 2016.

Wieczyński M., Andrzejak R., Kosiada T. (2016). Wpływ preparatu Adexar Plus na plonowanie żyta i zasiedlenie ziarniaków przez grzyby *Fusarium* ssp., Rola odmiany i ochrony roślin w intensyfikacji produkcji roślinnej: Poznań – Dymaczewo Nowe, 11–13 maja 2016 r.

Andrzejak R., Wieczyński M., Nowak D., Kosiada T. (2016). Wpływ opryskiwania *Trichoderma* ssp. na zasiedlenie ziarniaków żyta przez grzyby, Rola odmiany i ochrony roślin w intensyfikacji produkcji roślinnej: Poznań – Dymaczewo Nowe, 11–13 maja 2016 r.

Literatura

Mańka K. (1974). Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.* 160: 9–23.

Tabela 1

Genotypy, w których stwierdzono najmniejszy procent zasiedlenia ziarniaków żyta przez grzyby rodzaju *Fusarium*.

Pochodzenie genotypu	Lata				
	2014 poniżej 10%	2015 poniżej 10%	2016 poniżej 10%	2017 poniżej 5%	2018 poniżej 1%
PHR (Wiatrowo)	GRADAN WM 46R WM 41R WM 45R	WTD 32/14 WTD 29/14 WM 45/1	NS135N/4 NSIN 0723 WM 52R	WM 34R WTD 28/15 NSIN T1 ANTONIŃSKIE	WM 52R WTD 18/15
				WTD 21/15 NS 58N/08 WM 37/2 GRADAN WM 60 R WM 51R WM 62R	
Danko (Choryń)	DC 1168	DC 98 SZK 3N/12 DC 42	L 77/11 DC 63	DC 1431 SZK 15/13 DC 42 DC 63 DC 73 LS 256N/13 LS 266N/13 LS 229N/13 DC 92	DL 15 DL 16 DC 104 DC 84 DC 97 DL 10
				HRSM 238-3R HRSM 228-3R HRSM 209-4R HRSM 250-3R HRSM 200-4R HRSM 220-3R HRSM 239-3R HRSM 214-4R	HRSM 224-4R
Smolice	HRSM 102-4R HRSM 95-4R HRSM 11-4R	HRSM 147-4R HRSM 130-4R HRSM 135-4R HRSM 154-4R	HRSM 181-4R HRSM 185-4R HRSM 161-4R HRSM 186-4R		

Tabela 2

Genotypy w których nie stwierdzono obecności sklerocjów *C. purpurea*.

Pochodzenie genotypu	lata				
	2014	2015	2016	2017	2018
PHR (Wiatrowo)	Brak	WM 18 R WM 31 R WM 41 R WM 45 R WM 47 R WM 50 R WM 53 R WM 54 R WTD 33/14 RPD 492 NS 94N/06 NS 58N/08	WTD 16/15 WTD 21/15 WM 60R DC 1289 NS94N/06 NS 5N07 NS 857N/95	NS 135N/4 NS58/08	WM 52R WTD 27/15
Danko (Choryń)	Brak	DL 10 DL 11 DC 98 DC 88 DC 81	DL 13 LS 172N/10 TUR D.GRADAN	DC 42 DC 12	brak
Smolice	Brak	HRSM 127-4R HRSM 128-4R HRSM 130-4R HRSM 131-4R HRSM 132 4R HRSM 134-4R HRSM 136-4R HESM 138-4R HRSM 140-4R HRSM 141-4R HRSM 142-4R HRSM 143-4R HRSM 144-4R HRSM 147-4R HRSM 150-4R HRSM 153-4R HRSM 155-4R HRSM 156-4R	HRSM 162-4R HRSM 165-4R HRSM 169-4R HRSM 181-4R	brak	brak

Poszukiwanie wspólnych mechanizmów dziedziczenia płodności roślin z cytoplazmą CMS – C oraz z cytoplazmą CMS-Pampa

Search of common genetic mechanisms determining fertility of plants with cytoplasm CMS-C and CMS-Pampa

Stefan Stojalowski¹✉, Marta Orłowska¹, Martyna Sobczyk¹, Anna Bienias¹, Beata Myśków¹, Przemysław Tomczak¹, Wojciech Wesołowski², Marek Szklarczyk², Waldemar Brukwiński³, Katarzyna Banaszak³, Monika Hanek³, Renata Krysztofik³, Marek Zając⁴

¹ Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

² Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

³ DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.

⁴ Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o.

✉ e-mail: sstojalowski@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterility, odmiany mieszańcowe, żyto

Zjawisko cytoplazmatycznej męskiej sterility jest często spotykane w świecie roślin. W praktyce rolniczej jest wykorzystywane do produkcji nasion odmian mieszańcowych wielu gatunków uprawnych. W praktycznej hodowli żyta dominuje wykorzystanie odkrytej przez Geigera i Schnella (1970) cytoplazmy Pampa (CMS-P). Potencjalną alternatywą dla CMS-P może być źródło CMS-C, które odkryto niemal pół wieku temu w Szczecinie (Łapiński 1972). Cytoplazma sterylizująca C jest zaliczana do grupy cytoplazm o nazwie Vavilovii (CMS-V), która wykazuje wyraźną odrębność genetyczną względem cytoplazmy Pampa.

Celem ogólnym wykonywanych badań było bliższe poznanie podobieństw i różnic w genetycznej determinacji męskiej sterility u żyta z cytoplazmą Pampa i zaliczaną do typu Vavilovii cytoplazmą C.

Materiał badawczy stanowiły linie wsobne (w tym izogeniczne wersje linii 541 w różnych cytoplazmach), mieszańce międzyliniowe i odmiany uprawne (populacyjne i mieszańcowe) żyta ozimego. Większość linii wsobnych oraz mieszańców z cytoplazmą CMS-C została wyhodowana w Zachodniopomorskim Uniwersytecie Technologicznym w Szczecinie (ZUT), skąd pochodzi źródło cytoplazmy C, odkryte w latach 70-tych XX wieku przez prof. M. Łapińskiego (Łapiński 1972). Pozostałe

linie i mieszańce międzyliniowe wytworzono w dwóch spółkach zajmujących się hodowlą żyta (Danko HR i Poznańska Hodowla Roślin – PHR). Odmiany uprawne użyte w badaniach pochodziły z polskich i niemieckich spółek hodowlanych, a odmiany historyczne z Banku Genów IPK Gatersleben (Niemcy).

Mapowanie genów restorerowych wykonano z użyciem mieszańców międzyliniowych (linia męskosterylna x restorer), które wytworzono w ZUT Szczecin.

W badaniach wykorzystano markery oparte na dwóch metodach:

1. PCR (Polymerase Chain Reaction): markery STS, SCAR, tCOS o znanych lokalizacjach chromosomowych (Stracke i in. 2003; Stojalowski i in. 2011; Hackauf i in. 2012; Mileczarski i in. 2016)
2. GBS (Genotyping by Sequencing): wykorzystano wariant metody oferowany pod nazwą DArTseq w postaci usługi badawczej przez Diversity Arrays Technology Pty (Bruce, Australia)

W badaniach nad czynnikami mitochondrialnymi wykorzystano izogeniczne wersje linii 541 w różnych cytoplazmach (N, P i C), które po rozmnożeniu na dużą skalę użyto do wyizolowania DNA z etiolowanych kiełków. Ekstrakty DNA poddano analizom sekwencyjnym przy zastosowaniu sekwencjatora nowej generacji typu



Hi-Seq (Illumina). Uzyskane dane poddano analizie bio-informatycznej.

Badania nad frekwencją alleli sterility/płodności wykonano na drodze krzyżowania w izolowanych szkółkach typu top-cross lub w namiotach foliowych, a następnie płodność uzyskanych roślin mieszańcowych oceniano wzrokowo przy zastosowaniu skali bonitacyjnej opracowanej przez Geigera i Morgensterna (1975). Zapyłaczami w top-crossach było 5 odmian populacyjnych, 18 niezarejestrowanych populacji z polskiej hodowli oraz 3 historyczne odmiany z Europy środkowej i wschodniej (Rosja, Węgry, dawna Jugosławia). Część populacji była badana w dwóch sezonach wegetacyjnych, pozostałe w jednym sezonie. W każdej kombinacji oceniano min. 100 roślin.

Ocena zdolności kombinacyjnej linii męskosterylnych była wykonana na bazie top-crossów w doświadczeniach polowych dwu- lub trzy-powtórzeniowych prowadzonych w minimum dwóch lokalizacjach. Wielkość poletek doświadczalnych: 5m². Testerem dla badanych linii był syntetyk o nazwie SR27 (wytworzony przez spółki hodowlane PHR i Danko).

W trakcie realizacji badań potwierdzono wcześniejsze sugestie, że gen Rfpl zmapowany w populacji 541 x IRAN IX ma znaczenie dla płodności odmian mieszańcowych żyta (np. odmiana Gonello F1). Tym samym markery molekularne sprzężone z genem Rfpl mogą być pomocne przy wprowadzaniu tego genu na drodze krzyżowań wstecznych (Marker Assisted Backcrossing – MAB). Procedura MAB powinna być realizowana w oparciu o znane źródło genu Rfpl na drodze „śledzenia” go od formy rodzicielskiej przez kolejne pokolenia mieszańców. Należy podkreślić, że wskazane markery nie nadają się do zastosowania w materiałach roślinnych o nieznanym pochodzeniu.

Wyniki oceny płodności w obrębie odmian mieszańcowych wskazują, że produkcja pyłku przez pojedyncze rośliny jest mocno zróżnicowana. W każdej odmianie występują rośliny męskopłodne i męskosterylne. W odmianach „Pollen plus” zawierających wprowadzony gen Rfpl również spotykane są dość często rośliny męskosterylne i częściowo płodne. Przewaga odmian „Pollen plus” nad starszymi odmianami mieszańcowymi polega na większej częstotliwości występowania roślin silnie pyłących. Nie jest to jednak poziom, który by dorównywał pyleniu odmian populacyjnych.

Analizy mitochondrialnego DNA pozwoliły na wykonanie bio-informatycznych złożeń sekwencji mtDNA dla 3 typów cytoplazm żyta. Uzyskane wyniki są w wielu obszarach niejednoznaczne

i wskazują na brak jednorodności genomów mtDNA żyta. Genomy mitochondrialne badanych cytoplazm różnią się w co najmniej kilku obszarach. Identyfikacja czynników genetycznych determinujących męską sterility nie była jednak możliwa.

Przebadano łącznie 26 populacji żyta pod kątem występowania genotypów przywracających płodność lub dopełniających sterility w systemach CMS-P i CMS-C. Mieszańce sześciu populacji oceniano fenotypowo w 2 latach, pozostałe w doświadczeniach 1-roczych. Większość badanych populacji dobrze przywraca płodność w systemie CMS-C, a bardzo słabo w CMS-P. Wyjątki to dwie odmiany z hodowli Danko i jugosłowiańska populacja Landsorte K9538.

Oceną ogólnej zdolności kombinacyjnej objęto łącznie 39 linii męskosterylnych z cytoplazmą C (od 3 do 12 linii w każdym roku). Oceny wykonywano wykorzystując do porównań odmiany wzorcowe oraz mieszańce proste z cytoplazmą Pampa. Doświadczenia wykonywano w pojedynczych sezonach wegetacyjnych w minimum 2 miejscowościach (2–3 replikacje w każdej lokalizacji). Linie oparte o CMS-C plonowały przeciętnie lub słabo. Wysokość roślin była zróżnicowana (od względnie niskich do bardzo wysokich). Wyleganie form opartych o CMS-C było na poziomie przeciętnym. Obserwowane porażenie przez rdzę brunatną było zróżnicowane (w pierwszych latach badana seria mieszańców z cytoplazmą C była bardzo podatna, później badane mieszańce były porażane przeciętnie, ale linii dających mieszańce odporne nie zidentyfikowano).

Najważniejsze wnioski i osiągnięcia

1. Markery molekularne sprzężone z Rfpl mogą być pomocne przy wprowadzaniu tego genu do nowych materiałów hodowlanych (Marker Assisted Backcrossing – MAB)..
2. Ze względu na bliskie sąsiedztwo genów Rfpl i Rfcl, markery molekularne przydatne w hodowli opartej o system CMS-Pampa mogą być przydatne również w hodowli mieszańców stworzonych na bazie cytoplazmy C i *vice-versa* – markery opracowane dla cytoplazmy C mogą zostać użyte w hodowli mieszańców zawierających cytoplazmę Pampa (wniosek dotyczy wyłącznie markerów z chromosomu 4RL sprzężonych z silnie działającymi genami Rfpl i Rfcl).
3. Wszystkie zarejestrowane odmiany mieszańcowe żyta mają w swoim składzie liczne rośliny męskosterylne. Odmiany „Pollen plus” z wprowadzonym silnym genem restorerowym Rfpl

- charakteryzują się wyższą frekwencją roślin silnie pyłących, ale nie są wolne od roślin męskosterylnych, których udział na ogół przekraczał 30% (to oznacza, że nie wszystkie rośliny tych odmian zawierają gen Rf1).
4. Przyczyny męskiej sterylności żyta wywołanej czynnikami mitochondrialnymi pozostają wciąż nieznane. Wyjaśnienie mechanizmów genetycznych prowadzących do zaburzeń w mikrosporogenezie żyta z cytoplazmami sterylizującymi wymaga dalszych badań.
 5. Źródło CMS (Pampa vs. C) nie wpływa znacząco na ogólną zdolność kombinacyjną linii, kluczowy wydaje się sam genotyp linii.

Wykaz publikacji wyników:

Artykuły oryginalne w czasopismach

Stojałowski S., Hanek M., Orłowska M., Sobczyk M., 2017.

DArT Markers Linked with Genes Controlling Restoration of Male Fertility in Hybrid Rye Cultivars with Improved Pollen Shedding. *Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment., Pisc., Zootech.* 2017, 338(44): 205–216

Konferencje

Stojałowski S., Hanek M., Bobrowska-Chwat A., Myśków

B., 2014. Comparative mapping of major restorer genes in two sterility-inducing cytoplasm of rye. III Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany” – Program i streszczenia, Poznań, 5–7 listopada 2014, ISBN 978–83–64246–28–9: 41 poster

Stojałowski S., Hanek M., Góralska M., Orłowska M.,

Myśków B., 2015. Mapowanie porównawcze głównych genów kontrolujących przywracanie męskiej płodności żyta z cytoplazmami sterylizującymi C i Pampa. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” – Streszczenia, Zakopane, 2–6 lutego 2015, ISBN 83–891172–79–8: 49–50 referat

Hanek M., Materka M., Brukwiński W., Stojałowski S.,

2015. Perspektywa wykorzystanie linii wsobnych żyta z cytoplazmą CMS-C w hodowli mieszańcowej. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” – Streszczenia, Zakopane, 2–6 lutego 2015, ISBN 83–891172–79–8: 180–181 poster

Stojałowski S., Hanek M., Góralska M., Myśków B., Milczar-

ski P., Orłowska M., Hackauf B., 2015. Toward the localisation of restorer genes for the C source of cytoplasmic male sterility in rye. *International Conference on Rye Breeding and Genetics.* 24–26 June 2015, Wrocław, Poland – Conference Abstracts: 41 referat

Orłowska M., Hanek M., Góralska M., Myśków B., Stoja-

łowski S., 2015. Male fertility of hybrids between two CMS variants of the inbred line 541 pollinated by different populations of rye. *International Conference on Rye Breeding and Genetics.* 24–26 June 2015, Wrocław, Poland – Conference Abstracts: 66 poster

Orłowska M., Stojałowski S., 2015. Assessment of pollen shedding and genetic polymorphism within the hybrid rye cultivar Gonello F1. *Innovative Researches for the Future of Agriculture and Rural Areas Development. VIth International Scientific Symposium for PhD students and students of Agricultural Colleges.* 17–19 September 2015, Bydgoszcz-Ciechocinek, Poland, Abstracts: 103 poster

Stojałowski S., Wesołowski W., Szklarczyk M., 2016. W poszukiwaniu różnic genetycznych między cytoplazmami żyta. „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin” – Konferencja Naukowa z okazji 60-lecia Katedry Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Międzyzdroje, 8–10 czerwca 2016, Streszczenia: 68. referat

Orłowska M., Hackauf B., Stojałowski S., 2016. Nowe dane o lokalizacji genu Rf1 przywracającego płodność żyta ze sterylizującą cytoplazmą CMS-C. „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin” – Konferencja Naukowa z okazji 60-lecia Katedry Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Międzyzdroje, 8–10 czerwca 2016, Streszczenia: 57 referat

Orłowska M., Hackauf B., Stojałowski S., 2016. Application of COS markers for comparative mapping of Rf1 gene in two mapping population of rye. V Kongres Genetyki, Łódź 19–22 września 2016, „Program i materiały kongresowe” red. Andrzej K. Kononowicz, Lucjusz Jakubowski, Maciej Borowiec, Paweł Stączek, Wydawnictwo Grupa Medica S.C., Łódź 2016, ISBN: 978–83–925769–4–5: 304 poster

Sobczyk M., Orłowska M., Stojałowski S., 2017. Pylenie roślin z wybranych odmian mieszańcowych żyta. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” – Streszczenia, Zakopane, 30 stycznia – 3 lutego 2017, ISBN 83–891172–87–9: 292 poster

Hanek M., Stojałowski S. 2018. Markery DArT związane z genami kontrolującymi pylenie żyta z cytoplazmą sterylizującą Pampa. Ogólnopolska konferencja naukowa „Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy” Lublin, 25–27 czerwca 2018, Streszczenia: 19 referat

Literatura

Geiger H. H., Morgenstern K., (1975). *Angewandte-genetische*

- Studien zur cytoplasmatischen Pollensterilität bei Winterroggen. *Theor. Appl. Genet.* 46: 269–276.
- Geiger H. H., Schnell F. W., (1970). Cytoplasmic Male Sterility in Rye (*Secale cereale* L.). *Crop. Sci.* 10: 590-593.
- Hackauf B., Korzun V., Wortmann H., Wilde P., Wehling P. 2012. Development of conserved ortholog set markers linked to the restorer gene Rfp1 in rye. *Mol Breeding* 30:1507–1518
- Łapiński M., (1972). Cytoplasmic-genic type of male sterility in *Secale montanum* Guss. *Wheat Inform. Serv.* 35: 25-28.
- Milczarski P., Hanek M., Tyrka M., Stojalowski S. (2016). The application of GBS markers for extending the dense genetic map of rye (*Secale cereale* L.) and the localization of the Rfc1 gene restoring male fertility in plants with the C source of sterility-inducing cytoplasm. *J Appl Genetics* 57:439–451
- Stojalowski S., Milczarski P., Hanek M., Bolibok-Bragoszewska H., Myśków B., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. (2011). DArT markers tightly linked with the Rfc1 gene controlling restoration of male fertility in the CMS-C system in cultivated rye (*Secale cereale* L.). *J. Appl. Genet.* 52:313–318
- Stracke, S., Schilling, A. G., Forster, J., Weiss, C., Glass, C., Miedaner, T., Geiger, H. H. (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: 1184–1190.

Poszukiwanie markerów molekularnych genów przywracania płodności pyłku u żyta (*Secale cereale* L.) z CMS-Pampa

Identification of pollen fertility restoration markers in rye (*Secale cereale* L.) with CMS-Pampa

Piotr Tomasz Bednarek^{✉1}, Agnieszka Niedziela¹, Waldemar Brukwiński², Barbara Kozber²

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB, Radzików, 05–860 Błonie

²DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o., Choryń 27, 64–000 Kościan

✉ e-mail: p.bednarek@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: CMS Pampa, *Secale cereale* L., technologia DArTseq

Cele prowadzonych badań

1. Wyprowadzanie kolejnych pokoleń linii rekombinacyjnych (F5-F8) dla czterech populacji mapujących – cel został osiągnięty
2. Opracowanie zagęszczonej mapy genetycznej żyta w wykorzystaniem populacji mapujących RIL oraz markerów silicoDArT i SNP – cel został osiągnięty
3. Mapowanie QTLi (ang. Quantitative Trait Locus) przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa oraz identyfikacja markerów molekularnych DNA silnie sprzężonych oraz asocjowanych z cechą – cel został osiągnięty
4. Sekwencjonowanie obszarów genomu żyta w sąsiedztwie markerów silnie sprzężonych z genami przywracania płodności pyłku u form z CMS Pampa – cel został osiągnięty
5. Testowanie markerów silicoDArT i SNP na szerszej populacji genotypów – cel został osiągnięty
6. Selekcja genotypów o pożądanych kombinacjach genów przywracania płodności pyłku z wykorzystaniem dostępnych materiałów roślinnych w oparciu o markery molekularne – cel został osiągnięty

Materiały i Metody

Materiał badawczy stanowiły cztery populacje mapujące RILs (ang. Recombinant Inbred Lines) uzyskane w DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. oraz Poznańskiej Hodowla Roślin Sp. z o.o. i prowadzone do poziomu pokolenia F8:

1. S64/04/01: S305N/00 x SO37R
2. S60/08: S305N/00 x SO2R/05

3. RIL-A: NS08135N/2 x 83/81 (78A-674 TUR)/2)
4. RIL-B: NS08135N/4 x 83/81 (78A-674 TUR./4)

Metodyka badań obejmowała następujące etapy:

1. Analiza fenotypowa populacji RIL – krzyżowanie wsteczne poszczególnych linii z linią mateczną oraz ocena pylenia roślin BC1F1 według skali opracowanej przez Geiger'a i Morgenstern'a (1975).
2. Izolacja DNA z liści poszczególnych linii rekombinacyjnych (DNeasy Plant Mini Kit 250, Qiagen).
3. Genotypowanie materiału roślinnego (Diversity Arrays Technology Pty Ltd., Canberra, Australia).
4. Konstrukcja map genetycznych dla populacji mapujących RIL (Multipoint v3.3 ULD).
5. Identyfikacja QTLi cechy przywracania płodności pyłku (WinQTLCart2.5).
6. Identyfikacja markerów przywracania płodności pyłku na podstawie wyników mapowania kompozytowego (Composite Interval Mapping; WinQTLCart2.5) oraz asocjacyjnego (TASSEL 3.0).
7. Analiza bioinformatyczna sekwencji markerów sprzężonych i asocjowanych z cechą (The National Centre for Biotechnology Information (NCBI), algorytm BLASTn; IPK Rye Blast Server, <https://webblast.ipkgatersleben.de/ryeselect/>).
8. Konwersja markerów SNP (ang. Single Nucleotide Polymorphism) i SilicoDArT do warunków specyficznego PCR (ang. Polymerase Chain Reaction)



– projektowanie starterów na podstawie sekwencji homologicznych do sekwencji markerów SNP i SilicoDArT, m. in. z uwzględnieniem miejsc restrykcji dla enzymu PstI (program CLC Workbench). Dobór temperatury powielania markerów w termocyklerze z gradientem temperatur oraz ocena ich segregacji w populacjach mapujących RIL.

9. Testowanie konwertowanych markerów na szerszej populacji genotypów oraz selekcja genotypów o pożądanych kombinacjach genów przywracania płodności pyłku.

Wyniki

Fenotypowanie roślin BC1F1 uzyskanych w wyniku krzyżowania poszczególnych linii populacji S64/04/01 oraz S60/08 z linią mateczną wykazało obecność prawie wyłącznie roślin płodnych i sterylnych (tylko 9 z 239 roślin miało fenotyp pośredni). Podobne analizy dla pokolenia RIL5 populacji RIL-A oraz RIL-B wykazały obecność zróżnicowanych fenotypów z przewagą form płodnych, natomiast na poziomie pokolenia RIL8 występowały wyłącznie formy płodne, co uniemożliwiało detekcję markerów związanych z cechą na poziomie tego pokolenia (dodatkowo populacja RIL-B była mało liczna).

Średnia liczba markerów generowana dla populacji mapujących z zastosowaniem technologii DArTseq wynosiła 42 000 (SNP) oraz 130 000 (SilicoDArT).

Na podstawie wyników segregacji markerów SNP i silicoDArT opracowano mapy genetyczne dla każdej z badanych populacji mapujących. Otrzymane mapy składały się z 7 grup sprzężeń odpowiadających poszczególnym chromosomom żyta (1R-7R) i pokrywały od 880 cM (S60/08) do 1070.5 cM (S64/04/01). Średnio na mapie znajdowało się od 1.66 markera/cM (S64/04/01) do 3.20 markera/cM (S60/08).

Mapowanie kompozytowe wykazało, że główne QTL przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa odpowiedzialne za 58.0%, 60% i 30.9% wytłumaczonej wariancji cechy lokalizują się odpowiednio na chromosomie 1R (*QRft-1R*) w populacji RIL-A (F4) oraz w części dystalnej długiego ramienia chromosomu 4R (*QRft-4R*) w populacjach S64/04/01 (F8) i S60/08 (F8). Pozostałe QTL wyjaśniające 5.0–5.5%, 8.6% i 13.5% zmienności cechy identyfikowano odpowiednio na chromosomach 5R (RIL-A oraz S64/04/01), 3R (RIL-A) i 4R (RIL-A). Najbliżej maksymalnej wartości LOD (ang. Logarithm of odds) wynoszącej 30.8 dla *QRft-1R* lokalizowały się markery 5502529GT20

(9.1cM) oraz 349226 (6.6 cM). W obszarze *QRft-4R* lokalizowały się markery 3588232 i 3577180 (S60/08) oraz 5605674 i 5546063 (S64/04/01) oddalone odpowiednio o 0.84 cM, 1.13 cM, 0.49 cM i 3.01 cM od maksymalnej wartości funkcji LOD.

Mapowanie asocjacyjne umożliwiło identyfikację kilkudziesięciu markerów SNP i silicoDArT dla populacji RIL-A, S64/04/01 oraz S60/08. Lokalizacja markerów o najwyższych wartościach asocjacji była przypisana przede wszystkim do chromosomów, na których identyfikowano główne QTL cechy. Stopień asocjacji określany za pomocą współczynnika determinacji (R^2) wahał się od 0.163 do 0.583. Istotność wyników dochodziła do $1.20E-33$ przy wartościach odcięcia istotności danego markera wynoszących około $3.0E-06$ dla każdej z populacji (test Bonferroni'ego).

Ze względu na niską liczebność populacji RIL-B (39 linii) nie wykonano mapowania QTL oraz mapowania asocjacyjnego.

Analiza bioinformatyczna sekwencji markerów DNA sprzężonych i/lub asocjowanych z genami przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa wykazała, że przynajmniej część z sekwencji markerowych jest homologiczna do sekwencji genów. Dwadzieścia siedem markerów populacji S64/04/01 oraz S60/08 zlokalizowanych na chromosomie 4R wykazało homologię sekwencji z sekwencją locus genu przywracania płodności pyłku *Rfml* opisaną u jęczmienia (Rizzolatti i in. 2017). Ponadto sześć markerów wykazano podobieństwo sekwencji z genem białka *Rfl* kontrolującym przywracanie płodności pyłku u pszenicy z cytoplazmą sterylizującą *Triticum timopheevii* (Livers, 1964). Innym genem, którego adnotacja pojawiła się w odniesieniu do dwudziestu sekwencji markerów zlokalizowanych na 4R był czynnik terminacji transkrypcji MTERF (ang. transcription termination factor). Ciekawe wydaje się również odniesienie licznych sekwencji do genu keratyny (keratin-associated protein 5–5-like oraz 5–4-like). Analiza bioinformatyczna sekwencji markerów DNA asocjowanych z cechą przywracania płodności pyłku w populacji RIL-A zlokalizowanych na chromosomie 1R wykazała nieliczne, głównie pojedyncze adnotacje, między innymi do genów/białek: *Rfl*, pentatricopeptide repeat-containing protein, leucine-rich repeat receptor-like protein kinase, RRP15-like protein, nuclear pore complex protein NUP98A-like oraz F-box protein At5g07610-like.

Wybrane markery sprzężone i/lub asocjowane z cechą przywracania płodności pyłku u żyta konwertowano do warunków specyficznego PCR.

Spośród 35 markerów, 13 generowało polimorficzne sygnały na żelach agarozowych. Wszystkie markery lokalizowały się w obrębie *QRft-4R*. Osiem z nich powtarzało segregację swoich odpowiedników przed konwersją w testowanych populacjach S60/08 oraz S64/04/01. Dla dwóch markerów spodziewaną segregację uzyskano po zastosowaniu trawienia enzymem *Pst*I. Wśród w/w znalazły się markery z adnotacją do loci *Rfml* oraz białek *Rfl*, keratyny i PPR13. Dwa markery z adnotacją do czynnika terminacji transkrypcji MTERF oraz kolejny marker z adnotacją do keratyny generowały odwrotny sygnał w stosunku do markera przed konwersją u 92% badanych roślin (marker pojawiał się u roślin sterylnych). Pozostałe dwa polimorficzne markery segregowały w populacjach RIL niezgodnie z segregacją ich odpowiedników przed konwersją.

Markery różnicujące rośliny płodne oraz sterylne w populacjach mapujących testowano w obrębie 96 linii płodnych oraz 96 linii sterylnych udostępnionych przez hodowców. Każdy z markerów występował z różną częstotliwością w obu pulach roślin. Istotne asocjacje z cechą odnotowano dla markerów 16404809c oraz 3885887c (c – marker konwertowany). Najwyższą korelację z cechą (0.526) uzyskano dla markera 16404809c. Był on obecny w 75% roślin płodnych oraz 19.8% roślin sterylnych. Poziom korelacji dla markera 3885887c wynosił 0.395, a częstotliwość jego występowania w puli genotypów sterylnych była dwukrotnie wyższa niż 16404809c przy podobnej częstotliwości występowanie w roślinach płodnych. Segregacja tych markerów w liniach RIL była niezgodna z segregacją ich odpowiedników przed konwersją.

Markery DArT zlokalizowane się na chromosomach 1R (508859, 399799) i 4R (401955, 507026) konwertowane do warunków specyficznej reakcji PCR we wcześniejszych latach trwania projektu (2012–2013) wykorzystano do kontroli obecności genu/ów przywracania płodności pyłku wprowadzonych do linii restorerowych poprzez krzyżowania z linią BC4F1: S59/08/1/3/99 (dawca silnego QTL na 4R). Analiza 148 roślin odpowiadających siedmiu liniom restorerowym za pomocą czterech markerów molekularnych wykazała, że dla chromosomu 1R marker 508859 wystąpił u 62 osobników BC4F1, zaś marker 399799 u 95 roślin. Dla chromosomu 4R markery 401955 oraz 507026 wystąpiły odpowiednio u 138 oraz 65 osobników.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Zastosowanie populacji RIL charakteryzujących się kumulacją aktów rekombinacji

w połączeniu z wysoce wydajną technologią DArTseq umożliwiło opracowanie map genetycznych żyta o wysokiej rozdzielczości wskazanej do identyfikacji loci odpowiedzialnych za przywracanie płodności pyłku.

2. Najsilniejsze loci odpowiedzialne za przywracanie płodności pyłku u żyta z CMS Pampa występuje w dystalnej części długiego ramienia chromosomu 4R populacji S60/08 oraz S64/04/01. W obrębie tego loci znajdują się geny kodujące białka PPR (ang. pentatricopeptide repeat protein), czynnik terminacji transkrypcji MTERF (ang. transcription termination factor) oraz bogate w glicynę białko GRP (ang. Gly-rich protein).
3. Konwersja markerów silicoDArT i SNP do warunków specyficznego PCR umożliwiła opracowanie łatwych w użyciu markerów do selekcji genotypów płodnych, bądź sterylnych.
4. Przydatność konwertowanych markerów do selekcji materiału roślinnego o pożądanym fenotypie zależy od występowania określonych loci w puli badanych genotypów żyta.
5. Na obecnym etapie badań opracowane markery mogą być wykorzystane do selekcji wstecznej materiałów hodowlanych.
6. Pula genowa żyta w Polsce jest słabo reprezentowana przez silny QTL występujący na chromosomie 4R.

Osiągnięcia projektu

1. Opracowano mapy genetyczne żyta, które mogą zostać wykorzystane do mapowania licznych cech użytkowych.
2. Zidentyfikowano silne QTL przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa występujące w obrębie chromosomów 1R (*QRft-1R*) oraz 4R (*QRft-4R*), pozostałe QTL o niewielkim efekcie fenotypowym zidentyfikowano na chromosomach 3R, 4R i 5R.
3. Konwersja markerów DArT do warunków specyficznego PCR umożliwiła opracowanie markerów przydatnych do selekcji wstecznej względem QTL na 1R (2 markery) i 4R (2 markery). Markery te (a w szczególności markery względem 4R) wykorzystano w krzyżowaniach wstecznych celem wzbogacenia puli linii ojcowskich o silny allel 4R.
4. Wybrane formy ojcowskie/restorerowe stosowane w hodowli heterozyjnej zostały wzbogacone o QTL 4R i przekazane do hodowli. Materiały te charakteryzowały się wysokimi

- wartościami pylenia według bonitacyjnej skali płodności pyłku.
5. Markery SNP i silicoDArT (względem 4R) po konwersji do warunków specyficznego PCR wykazywały segregację identyczną z markerami przed konwersją (8 markerów). W przypadku szerszej puli genowej konwertowane markery wykazywały niższy poziom asocjacji z cechą co potwierdza fakt, że materiały polskie są ubogie w ten allel. Użyteczność markerów względem QTL na 4R wymaga dalszej weryfikacji. Bez wątpienia markery te mogą być wykorzystane w przypadku selekcji wstecznej.
 6. Ustalono, że markery zlokalizowane w obrębie QTLa cechy przywracania płodności pyłku u żyta na chromosomie 4R (*QRft-4R*) wykazują homologię sekwencji z sekwencją genu przywracania płodności pyłku *Rfml* zlokalizowanego u jęczmienia na chromosomie 6H oraz z sekwencją genów MTERF (transcription termination factor) i KAP5 (keratin-associated protein).

Wykaz publikacji

Doniesienia konferencyjne

- Niedziela, A., Wasiak, M., Kozber, B., Brukwiński, W., Bednarek, P.T. "Genetic map for the identification of molecular markers associated with pollen fertility restoration genes in winter rye with CMS PAMPA." Global Conference on Plant Science and Microbial Ecology, 17–19.06.2019, Walencja, Hiszpania. Materiały konferencyjne: str. 13.
- Szeląg, M., Niedziela, A., Bednarek, P.T., Kozber, B. "Genetic mapping of quantitative trait loci for cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.) with cytoplasm PAMPA." International Association for Plant Biotechnology Congress, 19–24.08.2018, Dublin, Irlandia, In Vitro Cellular and Developmental Biology 54/1: S90/P90.
- Grzesik, A., Szeląg M., Brukwiński, W., Kozber B., Zając, M., Bednarek, P.T. "A high-density genetic map of winter rye (*Secale cereale* L.) based on DArTseq and silico DArT markers." 4th International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources, 03–07.09.2017, Giessen, Niemcy, Materiały konferencyjne: str. 30.

- Grzesik, A., Szeląg, M., Brukwiński, W., Kozber, B., Zając, M., Bednarek, P.T. "The identification of DNA markers tightly linked to pollen-fertility restoration genes in rye (*Secale cereale* L.) with CMS Pampa using RIL mapping population." 4th International Symposium on Genomics of Plant Genetic Resources, 03–07.09.2017, Giessen, Niemcy. Materiały konferencyjne: str. 38.
- Koc, K., Niedziela, A., Kozber, B., Brukwiński, W., Zając, M., Bednarek, P.T. "Identification of pollen fertility restoration markers in rye with CMS Pampa." 20th EUCARPIA General Congress, 29.08–1.09.2016, Zurych, Szwajcaria. Materiały konferencyjne: str. 215.
- Koc, K., Niedziela, A., Kozber, B., Brukwiński, W., Matyka, M., Bednarek, P.T. "Identification of pollen fertility restoration markers in rye with CMS Pampa." EUCARPIA Cereals Section: „International Conference on Rye Breeding and Genetics." 24–26.06.2015, Wrocław. Materiały konferencyjne: str. 66–67.
- Bednarek, P.T., Koc, K.B., Kozber, B., Brukwiński, W. „Genetic mapping of winter rye (*Secale cereale* L.) based on DArTseq and GBS markers" "Cereals for Food, Feed and Fuel-Challenge for Global Improvement.", 29.06–04.07.2014 Wernigerode, Niemcy. Materiały konferencyjne: str. 308.

Publikacje

- Wasiak, M. (2019). Genetyczne podstawy cytoplazmatyczno-jądrowej męskiej sterylności (CMS) u roślin oraz jej wykorzystanie w hodowli. Praca przeglądowa. Agronomy Science, 74 (1), 15–30.
- Niedziela, A., Brukwiński, W., Bednarek, P.T. (2020). Genetic mapping of pollen fertility restoration QTLs in rye (*Secale cereale* L.) with CMS Pampa. Journal of Applied Genetics, DOI: 10.1007/s13353–020–00599–9.

Literatura

- Geiger H. H., Morgenstern K. (1975). Angewandte genetische Studien zur cytoplasmatischen Pollensterilität bei Winterroggen. Theor Appl Genet 46:269–276.
- Rizzolatti C., Bury P., Tataro E., Pin P. A., Rodde N., Berges H., Budar F., Mireau H., Gielen J. (2017). Map-based cloning of the fertility restoration locus *Rfml* in cultivated barley (*Hordeum vulgare*). Euphytica 213–276.
- Livers R. W. (1964). Fertility restoration and its inheritance in cytoplasmic male-sterile wheat. Science 144/3617, pp. 420.

Poszukiwanie źródeł genetycznej odporności na mączniaka i rdzę w kolekcji linii, rodów i odmian żyta

Search for genetic sources to powdery mildew and brown rust resistance in rye inbred lines and varieties collection

Henryk Bujak¹✉, Kamila Nowosad¹

¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

✉ e-mail: henryk.bujak@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: geny odporności, markery molekularne, mączniak prawdziwy, rdza brunatna, żyto

Największe zagrożenie dla wielkości i jakości plonu żyta stwarzają choroby wywołane przez mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *secalis*) oraz rdzę brunatną (*Puccinia recondita* f. sp. *secalis*). Patogeny te zasiedlają powierzchnie blaszek liściowych rozwijających się roślin zmniejszając ich powierzchnię asymilacyjną, co w konsekwencji może prowadzić do obniżenia produktywności zainfekowanych roślin. Mączniak prawdziwy zbóż jest jedną z najbardziej dewastacyjnych i powszechnie występujących chorób w uprawie zbóż. Wykazano ujemną zależność pomiędzy porażeniem roślin przez mączniaka prawdziwego, a ich plonowaniem, która uwidoczniła się szczególnie u form o skróconym źdźble. U żyta zidentyfikowano dziesięć genów warunkujących odporność na porażenie przez mączniaka prawdziwego, natomiast u pszenicy zidentyfikowano ponad 60 różnych alleli genów odporności na mączniaka prawdziwego (Pm). Dla około połowy z nich opracowano markery molekularne ściśle sprzężone z tymi allelami. Genami działającymi bardzo efektywnie i warunkującymi pełną odporność żyta na wszystkie rasy fizjologiczne patogena są *Pm17* i *Pm20*.

Markery molekularne dostępne są tylko dla niektórych ekonomicznie ważnych zbóż, między innymi dla pszenicy, ze względu na wysokie koszty związane z ich opracowaniem. Analiza porównawcza genomów ujawniała wysoki stopień współliniowości pomiędzy blisko spokrewnionymi gatunkami, co pozwala na wykorzystanie tych samych markerów w badaniach genetycznych żyta i pszenicy. Zespół Kuleung i in. (2004) wykazał zasadność stosowania markerów SSR opracowanych dla pszenicy w badaniach

genetycznych żyta oraz markerów SSR opracowanych dla żyta w badaniach pszenicy. W związku z tym, ze względów ekonomicznych, w badaniach żyta, w pierwszej kolejności przetestowane będą markery molekularne sprzężone z genami odporności na mączniaka prawdziwego, które już zidentyfikowano dla pszenicy.

Rdza brunatna corocznie poraża w większym lub mniejszym stopniu, wszystkie odmiany populacyjne oraz mieszańcowe żyta ozimego i jarego i jest ona, podobnie jak mączniak prawdziwy, szczególnie niebezpieczna dla odmian o skróconym źdźble, u których udział liści w ogólnym bilansie asymilacji jest większy niż u odmian wysokich. Szkodliwy wpływ rdzy brunatnej na żyto zaczyna się już po infekcji, gdy patogen zaczyna zarodnikować. Następuje wówczas obniżenie aktywności enzymu dehydrogenazy, natomiast znacznie wzrasta aktywność rybonukleazy, co powoduje zmniejszenie zawartości kwasów nukleinowych w liściach. Występują problemy z transkrypcją i następuje zatrzymanie syntezy RNA, czego konsekwencją jest zmniejszenie ilości produktów translacji i spadek poziomu białek. Postępujący proces degradacji białek powoduje osłabienie procesów życiowych w roślinach i dalszą przyspieszoną degradację białek. Dodatkowo pojawiające się na powierzchni liści ogniki rdzy redukują ich powierzchnię asymilacyjną, co w konsekwencji przyczynia się do zmniejszenia produktywności roślin.

Prowadzone dotychczas badania molekularne oraz próby mapowania genów odporności na rdzę brunatną u żyta pozwoliły na opracowanie markerów molekularnych RAPD i SSR sprzężonych z genem *Pr1* zmapowanym na chromosomie



6RL i genem *Pr2* na chromosomie 7RL (Korzun i in. 2001; Hackauf i Wehling 2002, Wehling i in. 2003). Ponadto wykazano, że geny *Pr3*, *Pr4*, *Pr5*, są związane z rasową opornością na rdzę brunatną. Udało się zidentyfikować niespecyficzne geny oporności kodujące transporter ABC i białko zawierające prolinę u pszenicy, jednak koncepcja niespecyficznej oporności na rdzę brunatną u żyta nie została szczegółowo zbadana.

Ponadto wykorzystując mapowanie asocjacyjne genomu (GWAM) na podstawie sekwencji markerów DArTSeq i mapowanie asocjacyjne genów kandydujących (CGAM) na podstawie sekwencji genów ScBx udało się wykryć dwa markery SNP silnie powiązane z cechą oporności na rdzę brunatną u żyta.

Celem realizowanego zadania badawczego była próba znalezienia efektywnych genów oporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną u różnych genotypów żyta ozimego oraz weryfikacja markerów molekularnych przydatnych do ich identyfikacji. Uzyskane wyniki badań pozwoliły na identyfikację i sprawdzenie efektywności działania genów oporności zarówno na obecni występujące rasy mączniaka prawdziwego oraz rdzy brunatnej. Do analizy molekularnej pozwalającej na identyfikację posiadanych genów oporności wykorzystano opracowane i pozyskane z literatury sekwencje starterowe sprzężone z najbardziej efektywnymi genami oporności na wymienione patogeny żyta.

Materiał badawczy stanowiły zgromadzone w kolekcji własnej homozygotyczne linie wsobne oraz przesłane przez hodowców genotypy żyta. Oceny oporności genotypów żyta ozimego na porażenie przez mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną prowadzono w warunkach sztucznej inokulacji oraz w warunkach infekcji polowej.

W trakcie prowadzonych badań przetestowano ponad 1000 obiektów żyta ozimego w doświadczeniach infekcyjnych, w kontrolowanych warunkach, w celu poszukiwania genotypów na odpornych zarówno na mączniaka prawdziwego, jak i na rdzę brunatną. Dodatkowo w warunkach polowych zweryfikowano oporność na patogeny około 580 linii wsobnych żyta.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pozwoliły wyselekcjonować wyprowadzone przez hodowców materiały pod kątem ich oporności zarówno na mączniaka prawdziwego, jak i rdzę brunatną. Niestety wśród otrzymanych materiałów wystąpiła niewielka liczba genotypów żyta odpornych na poszczególne patogeny, co świadczy o tym, że istnieje potrzeba jest dalszych badań

i wyprowadzenia genotypów o pożądanej odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną oraz genotypów posiadających odporność na obydwa patogeny jednocześnie. Liczba genotypów odpornych na poszczególne patogeny zależała od roku badań tzn. przesłanych przez hodowców materiałów do badań oraz wirulencji zebranych izolatów patogenów służących do infekcji. Stwierdzono bark korelacji pomiędzy porażeniem obiektów przez mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną, co spowodowało że udało się wyselekcjonować niewielką liczbę form odpornych na oba patogeny. Wyprowadzone nowe genotypów o podwyższonej odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną, które zostały przekazane zainteresowanym hodowcom.

Sprawdzono przydatność markerów molekularnych do identyfikacji genów oporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną u badanych genotypów żyta. Ponieważ dla żyta nie było opracowanych specyficznych markerów molekularnych sprzężonych z genami oporności na mączniaka prawdziwego (*Pm*), na początku wykorzystano znane z literatury, ale opracowane dla innych zbóż sekwencje starterów, które zostały i sprawdzone u żyta. Uzyskano także nowe specyficzne startery dla żyta. W realizowanym projekcie badawczym sprawdzono funkcjonowanie u żyta starterów dających markery molekularne sprzężone z następującymi genami *Pm1*, *Pm2*, *Pm3a*, *Pm3b*, *Pm3c*, *Pm3d*, *Pm3e*, *Pm3f*, *Pm3g*, *Pm4*, *Pm4a*, *Pm13*, *Pm16*, *Pm17*, *Pm34*, *Pm43*. Wyniki analiz molekularnych wykazały przydatność markerów mikrosatelitarnych związanych z genami *Pm4* i *Pm34* do poszukiwania genów oporności na mączniaka prawdziwego u żyta ozimego ponieważ charakterystyczne produkty amplifikacji występowały jedynie w grupie genotypów żyta odpornych.

Do identyfikacji genów oporności na rdzę brunatną wykorzystano markery sprzężone z genami oporności opracowane dla żyta oraz sprawdzono przydatność markerów opracowanych dla innych zbóż. Wykorzystano następujące startery stworzone na bazie sekwencji genów związanych z opornością na rdzę brunatną *Lr1*, *Lr4*, *Lr5*, *Lr6*, *Lr7*, *Lr9*, *Lr13*, *Lr19*, *Lr 24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr35*, *Lr36*, *Lr46*, *Lr47*, *Lrk 10* i *Lr_{Satu}* oraz opracowane na bazie sekwencji pszenicy TC76051, TC72745, TC77841. Spośród starterów związanych z genami oporności na rdzę brunatną można wyróżnić te, które pozwoliły na wykazanie obecności genów oporności u analizowanych genotypów żyta ozimego, są to startery specyficzna dla genów *Lr9*, *Lr36* i *Lr47*.

Markery dla obydwu patogenów wymagają jednak sprawdzenia na większej liczbie genotypów odpornych, aby można je było rekomendować do weryfikacji genów odporności na rdzę brunatną i mączniaka prawdziwego w materiałach hodowlanych żyta ozimego. Wyniki uzyskane w wyniku realizacji zadania badawczego mogą być bezpośrednio wprowadzone do programów hodowli żyta w celu uzyskania bardziej odpornych odmian na rdzę brunatną oraz mączniaka prawdziwego.

Osiągnięcia projektu obejmują: (1) identyfikację genotypów żyta posiadających pełną odporność na mączniaka prawdziwego zarówno w warunkach sztucznej inokulacji, jak i odporność polową; (2) wykazanie barku korelacji pomiędzy porażeniem genotypów żyta przez mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną, co spowodowało że udało się wyselekcjonować niewielką liczbę form odpornych na oba patogeny; (3) wykazanie przydatności markerów mikrosatelitarnych związanych z genami *Pm4* i *Pm34* do poszukiwania genów odporności na mączniaka prawdziwego u żyta ozimego; (4), opracowanie specyficznych starterów dla genów *Lr9*, *Lr36* i *Lr47*, które pozwoliły na wykazanie obecności genów odporności na rdzę brunatną u analizowanych genotypów żyta ozimego

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Nowosad K., Bujak H. 2014. Ocena porażenia materiałów hodowlanych żyta ozimego przez rdzę brunatną. Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Nauka dla Gospodar-

ki i Środowiska”, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie 15–16.09.2014 r.

Bujak H., Nowosad K. 2015. Assessment of the rye breeding material in respect of immunity to infections caused by the powdery mildew *Blumeria graminis*. International Conference on Rye Breeding and Genetics, Wrocław 24th-26th June 2015

Nowosad K., Bujak H. 2015. Ocena odporności materiałów hodowlanych żyta ozimego na rdzę brunatną. 55. Sesja Naukową Instytutu Ochrony Roślin – PIB Poznań 12–13.02.2015 r.

Nowosad K., Bujak H. 2017. Ocena odporności materiałów hodowlanych żyta ozimego na rdzę brunatną. Materiały konferencji „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” – Zakopane 30.01–03.02.2017 r.

Bujak H., Nowosad K. 2017. Ocena podatności linii wsobnych żyta ozimego na porażenie przez mączniaka prawdziwego. Materiały Sympozjum Naukowego „Zasoby Genowe Roślin Użytkowych na Rzecz Hodowli” – Kazimierz Dolny 6–8.09.2017 r.

Nowosad K., Bujak H. 2018. Wykorzystanie markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności na rdzę brunatną u żyta. markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności na rdzę brunatną u żyta. Materiały konferencji „Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy” – Lublin 25–27.06.2018 r.

Bujak H., Nowosad K. 2018. Ocena podatności linii wsobnych żyta ozimego na porażenie przez mączniaka prawdziwego. „Colloquium Biometryczne” – Szamotuły 9–13.09.2018 r.

Identyfikacja czynników determinujących efektywność otrzymywania podwojonych haploidów żyta (*Secale cereale* L.) metodami androgenezy i krzyżowań oddalonych

Identification of factors determining the efficiency of doubled haploids production in rye (*Secale cereale* L.) through androgenesis and distant crosses

Ewa Dubas[✉], Kamil Zieliński, Monika Krzewska, Iwona Żur, Anna Nowicka, Przemysław Kopeć, Izabela Marcińska, Ilona Czyczył-Mysza, Edyta Skrzypek

Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN w Krakowie, ul. Niezapominajek 21, 30–239 Kraków
[✉] e-mail: e.dubas@ifr-pan.edu.pl

Słowa kluczowe: androgeniza, auksyny, glutation, haploidy, mannitol, krzyżowania oddalone, żyto

Zainteresowanie uprawą żyta zwyczajnego (*Secale cereale* L.), jako gatunku o małych wymaganiach glebowych i klimatycznych, przeżywa renesans na rynku zbóż Unii Europejskiej. Trend ten wymusza na polskich hodowcach żyta wprowadzanie coraz wydajniejszych metod uzyskiwania, w krótkim czasie, ulepszonych odmian o wysokim i stabilnym plonowaniu. Przyspieszenie postępu biologicznego jest możliwe dzięki włączeniu w hodowlę tradycyjną nowoczesnych biotechnologicznych metod produkcji roślin, wliczając techniki roślinnych kultur *in vitro*. Dzięki wykorzystaniu zjawiska eliminacji chromosomów, z poziomu $2n$ do n (gametyczna liczba chromosomów), w krzyżówkach oddalonych oraz właściwości totipotencyjnych komórek męskiej linii generatywnej (embriogeneza mikrospor, androgeniza), możliwym jest zainicjowanie procesu różnicowania struktur przypominających zarodki. Zjawisko bezpłciowego formowania, zdolnych do regeneracji w rośliny, zarodków jest szeroko badane na różnych poziomach: fizjologicznym, cytologicznym i molekularnym. Do najważniejszych wyzwań naukowych należy (1) identyfikacja czynników bezpośrednio zaangażowanych w regulację procesu androgenezy na najwcześniejszych etapach, (2) optymalizacja warunków indukcji uzyskanych zarodków oraz (3) optymalizacja warunków regeneracji zarodków w rośliny, których płodność determinuje spontaniczne lub wymuszone zduplikowanie genomu ($2n$). Uzyskane w ten sposób podwojone haploidy

DH (z ang. *Doubled Haploids*) mają wiele aplikacyjnych zalet. Do jednej z nich należy uzyskanie stosunkowo wysokiej liczby ustalonych genetycznie osobników (homozygotycznych względem danej cechy), które tworzą tzw. czyste linie DH. Poszczególne linie DH, charakteryzujące się maksymalnym zróżnicowaniem cech, poddawane są selekcji i ocenie (około trzech lat) celem uzyskania nowej odmiany. W efekcie, cały cykl hodowlany skraca się o około sześć lat. Pomimo 40 lat badań nad haploidyzacją żyta, nie opracowano wydajnej metody produkcji DH.

Celem nadrzędnym realizowanego w okresie 2015–2018 projektu MRiRW nr 84 było określenie przyczyn braku podatności oraz identyfikacja czynników warunkujących przełamanie barier haploidyzacji żyta z wykorzystaniem dwóch metod: androgenezy w kulturach pylników i izolowanych mikrospor oraz krzyżowań oddalonych żyta z kukurydzą. Wszystkie założenia zostały osiągnięte w ramach czterech realizowanych tematów badawczych: (1) Ocena efektywności haploidyzacji żyta metodami androgenezy w kulturach pylników i izolowanych mikrospor oraz krzyżowań oddalonych z kukurydzą, (2) Określenie odpowiedniej fazy rozwoju gametofitu oraz optymalizacja warunków indukcji haploidalnych zarodków żyta w wybranej metodzie, (3) Optymalizacja warunków kiełkowania i regeneracji zarodków/kalusów dla uzyskania roślin diploidalnych (DH) żyta, (4) Identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną



produkcję DH żyta.

Badania przeprowadzono na 15 mieszańcach pokolenia F1 (samopylnego oraz obcopylnego) żyta ozimego (*Secale cereale* L. ssp. *cereale*) udostępnionych przez polskie spółki hodowli roślin. Testowano metody: (1) krzyżowań oddalonych żyta z kukurydzą (*Secale cereale* L. ssp. *cereale* x *Zea mays* L.) oraz (2) androgenezy w kulturach pylników (z ang. *Anther Culture* AC) i izolowanych mikrospor (z ang. *Microspore Culture* MC).

Metoda tzw. krzyżowania oddalonego wymagała zapylenia jednego gatunku pyłkiem z innego, odległego gatunku i zastosowana została w celu eliminowania chromosomów zapylacza. Do indukcji haploidalnych zarodków żyta wykorzystano liczne analogi auksyny kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy (2,4-D), kwas 3,6-dichloro-2-metoksybenzoesowy (dikamba) i kwas 4-amino-3,5,6-trichloropirydyno-2-karboksylowy (pikloram). Pomimo optymalizacji czasu pomiędzy emaskulacją a krzyżowym zapyleniem nie udało się uzyskać haploidalnych zarodków dla wszystkich genotypów. W sumie, z 17 154 zapylnych kwiatów, otrzymano 21 zarodków wyizolowanych z kłosów sześciu genotypów. Otrzymano średnio od 13,86 % (po traktowaniu 2,4-D) do 20,05% (po traktowaniu dikambą) powiększonych załączni. Podczas, gdy większość załączni była powiększona już cztery i sześć dni po zapyleniu, to potencjałem do kiełkowania charakteryzowały się jedynie zarodki wyizolowane z załączni w tym drugim terminie (Marcinińska i in. 2018). Powstałe haploidalne zarodki żyta, po wcześniejszej izolacji i sterylizacji, były przenoszone do sztucznych warunków kultury *in vitro*, celem ich regeneracji w DH. Jako, że metoda krzyżowań oddalonych dla gatunków obcopylnych (w tym większości linii żyta) jest bardziej problematyczna niż dla odmian samopylnych oraz wymaga nakładu pracy wielu osób oraz dużej powierzchni szklarniowej dostosowanej do zsynchronizowanej hodowli odległych od siebie gatunków, o odmiennych wymaganiach temperaturo-światlnych np. żyta oraz kukurydzy (Marcinińska i in. 2018), to z przyczyn ekonomicznych wybrano do dalszych badań metodę androgenezy.

W procesie androgenezy żyta, kiedy gametofitowy rozwój mikrospor w kierunku uformowania ziarna pyłku zostaje zahamowany, wykorzystano techniki kultury pylników oraz kultury izolowanych mikrospor, które stwarzają możliwość uzyskiwania z jednego pylnika dużej liczby struktur zdolnych do regeneracji roślin DH. Zmienność genotypowa linii hodowlanych populacji mieszańcowej powodowała zasadniczą trudność

w opracowaniu protokołu efektywnej produkcji DH żyta. Efektywność androgenezy zależała od stanu fizjologicznego rośliny donorowej, wrażliwości roślin donorowych/eksplantów na warunki wzrostu i rozwoju (m. in. etap wstępnego traktowania kłosów), stadium rozwojowego mikrospor, składu pożywki indukcyjnej i regeneracyjnej (różniących się zawartością i stężeniem mikro- i makroelementów, witamin, cukrów, roślinnych regulatorów wzrostu) oraz warunków fizycznych kultury *in vitro* (temperatura, oświetlenie). Często wydajność procesu uzależniona była także od nieprawidłowości w rozwoju zarodków obejmujących nie tylko fragmentację DNA, ale także aktywność proteolityczna enzymów programowanej śmierci komórki (PCD, z ang. *Programmed Cell Death*), na co najmniej dwóch etapach: podczas indukcji androgenezy i konwersji wielokomórkowych struktur w struktury zarodkowe podobne do zarodków zygotycznych (Zieliński i in. 2017). Największy problem w androgenezie żyta stanowiły: brak zoptymalizowanej metody indukcji, słaba regeneracja roślin oraz wysoki udział roślin albino-tycznych (Zieliński i in., 2020). W standardowych protokołach na etapie indukcji androgenezy u żyta, wykorzystuje się wstępne traktowanie kłosów niską temperaturą oraz mannitolem. U zbóż, takie łączone traktowanie, blokując niesymetryczny podział jądra w mikrosporach, stymuluje powstawanie dużej liczby struktur zarodkowych. Indukcja androgenezy może być inicjowana także działaniem innych typu stresów, co utrudnia identyfikację czynników bezpośrednio zaangażowanych w regulację tego procesu oraz sugeruje udział uniwersalnego mechanizmu uruchamianego w odpowiedzi na niekorzystne warunki środowiskowe. Jak wykazały ostatnie badania, czynnikiem determinującym proces androgenezy u żyta wydaje się być poziom stresu oksydacyjnego wywołany generowaniem reaktywnych form tlenu (RFT) i możliwości adaptacyjne mikrospor wynikające z wydajności systemu antyoksydacyjnego: enzymatycznego i nieenzymatycznego (Zieliński i in., 2015; Zieliński i in., 2016 a, b,c; Zieliński i in., 2017; Zieliński i in., 2018 a, b,c; Zieliński i in., 2020). Celem obniżenia natężenia stresu oksydacyjnego, istotnym było stosowanie substancji antyoksydacyjnych (w tym np. zredukowanego glutationu GSH). Traktowanie GSH (usuwa groźny dla komórek nadtlenu wodoru), w indukcji androgenezy u żyta, wpływa nie tylko na podniesienie efektywności indukcji, ale na przełamanie oporności na ten proces (Zieliński i in. 2020). Co więcej, traktowanie kłosów żyta GSH wpływa na endogenne stężenia tego tripeptydu (Zieliński

i in., 2017, 2018 a, b,c) oraz na zwiększenie aktywności enzymów, podniesienie żywotności mikrospor (poprzez ochronę DNA jądrowego przed fragmentacją) i poprawę indeksu mitotycznego (Zieliński i in., 2017, 2018c, Zieliński i in., 2020).

Proces androgenezy inicjowano poprzez traktowanie wstępne ściętych kłosów odpowiednim roztworem umieszczanym w warunkach niskiej temperatury (3 tygodnie w 4°C; kontrola/LT). Badano wpływ stresu osmotycznego wywołanego traktowaniem 0,7 M mannitolu (LT_MAN) i/lub zredukowanego glutationu o stężeniu 100 mg l⁻¹ (LT_GSH lub LT_GSH_MAN lub LT_MAN_GSH) na efektywność androgenezy w warunkach kultur *in vitro* z wykorzystaniem dwóch pożywek indukcyjnych (190–2, W-14) oraz trzech temperatur inkubacji kultur *in vitro* (4°C, 26°C, 32°C).

Opierając się na parametrze efektywności procesu androgenezy w kulturach AC, badane linie sklasyfikowano w trzy kategorie: podatne, średnio podatne i odporne. Zaobserwowano, że mikrospory wyizolowane z kłosów kontrolnych (kontrola/LT) linii podatnych i średnio podatnych (linie o numerach: 3, 4, 5, 7, 8, 10 i 14) są bardziej żywotne (do 3,9 razy) niż te, które uzyskano z linii opornych (1, 2, 6, 9, 11, 12, 13 i 15). Traktowanie wstępne glutationem (LT_GSH) lub w połączeniu z mannitolem (LT_GSH/MAN, LT_MAN/GSH) stymulowało żywotność mikrospor, odpowiednio 1,8; 2,3 oraz 2,6 razy. Traktowanie LT_MAN/GSH było jedynym traktowaniem umożliwiającym zwiększenie żywotności mikrospor do ok. 50% żywych komórek w zawieszynie MC linii opornych. Wykazano, że każde z pięciu zaproponowanych traktowań wstępnych kłosów wpływało nie tylko na żywotność mikrospor, ale i na częstotliwość symetrycznych podziałów prowadzących do powstania struktur androgenicznych (z ang. *Androgenic Structures* AS). Bazując na niniejszej informacji, stworzono kryterium w oparciu o współczynnik informujący o udziale dzielących się komórek w ogólnej puli żywych komórek. Udowodniono, że przekroczenie progowej wartości, wynoszącej co najmniej 25% dzielących się komórek w objętości 1 ml, jest konieczne do uzyskania embriogenicznej zawiesziny mikrospor. Zaobserwowano, że w niektórych wariantach traktowania wstępnego, szczególnie dla linii charakteryzowanych jako odporne na androgenezę, możliwym jest osiągnięcie bardzo dobrego efektu optymalizacji procedury. Względnie wysoka skuteczność indukcji androgenezy (do 4,6 AS na 10⁵ mikrospor w przeliczeniu na jeden kłos w MC i 21,3 AS na jeden kłos w AC) po traktowaniu wstępnym GSH i/lub MAN

przełamywała „barierę” tworzoną przez silny wpływ genotypu na efektywność androgenezy u żyta. W kulturach AC, uzyskano wyższą efektywność formowania AS, stosując: (1) traktowanie GSH (15-razy w porównaniu do traktowania MAN) lub (2) pożywkę 190–2 (2,5-razy w porównaniu do efektu na pożywce W-14). Podobnie, w kulturach MC, uzyskano wyższą efektywność formowania AS na pożywce 190–2 po traktowaniach kontrola/LT, LT_GSH i LT_MAN/GSH u wszystkich linii w badanych kategoriach. Ponadto, stosunkowo wysoka, spontaniczna diploidyzacja genomu (55%) zregenerowanych roślin zielonych wykazała, że opisane protokoły mogą być skutecznie włączone do konwencjonalnych programów hodowli żyta w Polsce (Zieliński i in. 2020).

Podsumowując, założone w projekcie cele zostały zrealizowane. Wykazano, że w określonych warunkach kultury *in vitro* metoda indukcji DH żyta z wykorzystaniem procesu androgenezy (gdzie zarówno chromosomy, jak i cytoplazma dziedziczone są w linii ojcowskiej) może być efektywna. Uzyskane wyniki stanowią osiągnięcie merytoryczne i praktyczne w zakresie technologii DH żyta.

Wnioski

1. Efektywność uzyskiwania roślin metodą androgenezy jest znacznie większa w porównaniu z metodą wykorzystującą zjawisko eliminacji chromosomów kukurydzy.
2. W uzyskiwaniu DH polskich odmian żyta na skalę komercyjną wydaje się uzasadnione równoczesne stosowanie kultur pylnikowych i izolowanych mikrospor.
3. Traktowanie GSH wpływa na żywotność mikrospor i poprawę możliwości adaptacyjnych wynikających z wydajności systemu antyoksydacyjnego: enzymatycznego i nieenzymatycznego.
4. Poprzez zastosowanie traktowania wstępnego kłosów GSH i/lub MAN możliwe jest przełamanie „bariery” tworzonej przez silny wpływ genotypu na efektywność androgenezy u żyta.

Osiągnięcia projektu

1. Identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną produkcję DH żyta.
2. Optymalizacja uzyskania roślin DH żyta na drodze androgenezy dzięki określeniu odpowiedniej fazy rozwoju mikrospor i doborowi warunków indukcji i regeneracji w kulturach pylników i izolowanych mikrospor.
3. Dwa wdrożenia (2018r., 2019r.), uzyskanego

materiału nasiennego F1 linii DH żyta, do praktyki rolniczej w dwóch wiodących spółkach DANKO Hodowla Roślin Sp. z o. o. oraz w Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o. o.

Wykaz publikacji

Publikacje

Zieliński, K., Krzewska, M., Żur, I., Juzoń, K., Kopeć, P., Nowicka, A., Moravčiková, J., Skrzypek, E., Dubas, E. (2020) The effect of glutathione and mannitol on androgenesis in anther and isolated microspore cultures of rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.* 140: 577–592. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01754-9>

Marcińska, I., Czyczyło-Mysza, I., Skrzypek, E., Warchoł, M., Zieliński, K., Dubas, E. (2018) Obtaining of winter rye (*Secale cereale* L. *spp. cereale*) haploid embryos through hybridization with maize (*Zea mays* L.). *Cereal Res Commun.* 46 (3), 521–532. <https://doi.org/10.1556/0806.46.2018.029>

Doniesienia konferencyjne

Zieliński, K., Fodor, J., Krzewska, M., Nowicka, A., Żur, I., Dubas, E. (2018a) Glutathionowa równowaga w indukcji androgenozy u żyta (*Secale cereale* L.). IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN, Łódź, 24–25 maj 2018, p. 85 (wykład).

Zieliński, K., Krzewska, M., Nowicka, A., Żur, I., Fodor, J., Dubas, E. (2018b) Redox regulation of androgenesis in rye (*Secale cereale* L.). 11th International Conference ‘Plant Functioning Under Environmental Stress’, Kraków, 12–15 wrzesień 2018, p. 82 (wykład).

Zieliński, K., Krzewska, M., Nowicka, A., Juzoń, K., Żur, I., Dubas, E. (2018c) Programmed cell death (PCD) and androgenesis induction in rye (*Secale cereale* L.).

11th International Conference ‘Plant Functioning Under Environmental Stress’, Kraków, 12–15 wrzesień 2018, p. 36 (wykład).

Zieliński, K., Nowicka, A., Żur, I., Krzewska, M., Dubas, E. (2017) Programowana śmierć komórki samobójczym zagrożeniem dla indukcji androgenozy u żyta (*Secale cereale* L.). III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN, Łódź, 11–12 maj 2017, p. 63 (poster).

Zieliński, K., Żur, I., Pocięcha, E., Krzewska, M., Nowicka, A., Fodor, J., Dubas, E. (2016a) Endogenne stężenie glutationu markerem w identyfikacji genotypów żyta (*Secale cereale* L.) podatnych na androgenzę. II Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN, Łódź, 12–14 maj 2016, p. 152 (wykład).

Zieliński, K., Żur, I., Dubas, E., Pocięcha, E., Krzewska, M., Nowicka, A., Fodor, J. (2016b) Endogenne stężenie glutationu czynnikiem warunkującym indukcję androgenzę u żyta (*Secale cereale* L.), Ogólnopolska Konferencja „Rośliny a środowisko – od ekosystemu do genu”, 10–12 czerwiec 2016, Rabka, (wykład).

Zieliński, K., Żur, I., Pocięcha, E., Krzewska, M., Nowicka, A., Fodor, J., Dubas, E. (2016c) Endogenous glutathione as a biochemical marker for androgenesis responsiveness in rye (*Secale cereale* L.). COST Action FA1306 ‘The quest for tolerant varieties-Phenotyping at plant and cellular level’ 2nd Work Group 2 Meeting. 1–2 luty 2016, Versailles, Francja (poster).

Zieliński, K., Pocięcha, E., Krzewska, M., Nowicka, A., Fodor, J., Żur, I., Dubas, E. (2015) The influence of the oxidative stress on androgenesis induction in rye (*Secale cereale* L.). 10th International Conference ‘Plant Functioning Under Environmental Stress’, 16–19 wrzesień 2015, Kraków p. 61 (poster).

Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury *in vitro*

Rye microspores response of to stress and *in vitro* culture conditions

Janusz Zimny✉, Sylwia Oleszczuk, Aleksandra Zimny, Katarzyna Makowska, Andrzej Czaplicki

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-PIB
✉ e-mail: j.zimny@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: androgeniza *in vitro*, mikrospory, kultury pylników, podwojone haploidy, żyto

Zastosowanie metod wytwarzania homozygotycznych linii na drodze androgeny w kulturach *in vitro* jest istotnym celem badań prowadzonych w wielu laboratoriach firm hodowlanych i instytutów rolniczych. Niestety wiedza na temat kontroli genetycznej zdolności do androgeny *in vitro* u żyta jest nadal niewystarczająca, a wykorzystanie kultur *in vitro* i manipulacji genetycznych jest bardzo trudne. Dlatego istotne są badania podstawowe, których celem jest wyjaśnienie wpływu czynników środowiskowych na proces indukowania androgeny u żyta.

Celem badań było:

- Określenie wpływu stosowanego stresu (chłód, stres cieplny, „głodzenie” mikrospor, kombinacja stresów) na reakcję androgeniczną mikrospor żyta.
- Zbadanie interakcji pomiędzy genotypem i pożywką oraz wskazanie warunków środowiskowych sprzyjających podziałom mikrospor. Poszukiwano czynników chemicznych, fizycznych, ale również organicznych (kultury „niańki”) zwiększających liczbę zielonych regenerantów i ograniczających zjawisko albinizmu.
- Określenie wpływu substancji chemicznych działających podobnie jak kolchicina, ale bardziej przyjaznych dla środowiska na proces podwajania liczby chromosomów i uzyskiwania płodnych linii homozygotycznych

Materiały i Metody

- Kultury *in vitro* pylników i izolowanych mikrospor żyta
- Zastosowanie różnorodnych stresów oraz ich niektórych kombinacji w celu indukowania

- przeprogramowania rozwoju mikrospor
- Zastosowanie związków blokujących proces mitozy w celu zastąpienia kolchicyny przy podwajaniu liczby chromosomów
- Zastosowanie namiotów z oświetleniem o różnej długości fali świetlnej w celu zbadania wpływu światła monochromatycznego na indukcję androgeny i regenerację roślin
- Techniki cytometrii przepływowej

Opis wyników

Analiza wpływu różnych stresów na indukcję androgeny.

Dobór sposobu indukowania mikrospor do androgeny wymaga indywidualnego podejścia zarówno do poszczególnych genotypów, jak również do sposobu prowadzenia kultury. Komórki izolowanych mikrospor wydają się być bardziej wrażliwe na rodzaj użytego stresu niż pylniki. Za najodpowiedniejszy typ stresu uznano chłodzenie pędów z kłosami przez okres 21 dni, jak również chłodzenie pędów z kłosami przez 14 dni w połączeniu z późniejszą inkubacją pylników w roztworze mannitolu. Stosowanie podwyższonych temperatur było stresem zbyt silnym, powodującym zamieranie komórek.

Zbadanie interakcji pomiędzy genotypem i pożywką, wskazanie warunków środowiskowych sprzyjających podziałom mikrospor żyta – pożywki, wpływ widma światła na regenerację.

W wyniku przebadania 15 genotypów żyta wyselekcjonowano modelowe linie, które reagują w kulturach *in vitro* sposób powtarzalny i z dużą efektywnością.

Niezwykle ważna dla uzyskania mierzalnych wyników doświadczeń była wstępna,



cytologiczna ocena rozwoju mikrospor przeprowadzona w fazie strzelania w źdźbło. Do eksperymentów pobierane były tylko kłosa znajdujące się na właściwym etapie rozwoju – od stadium średniej do późnej mikrospory.

Uzupełnienie pożywki indukującej gumą arabską (GA) w znaczący sposób oddziaływało na ogólną liczbę zregenerowanych roślin. Na pożywkach wzbogaconych o 10 mg/l GA średnia całkowita regeneracja przewyższała 2,4 krotnie tę uzyskaną na pożywkach bez dodatku GA, dla wszystkich reagujących genotypów. Uzyskane rezultaty nie potwierdziły stawianej tezy o korzystnym wpływie tiosiarczynu srebra (STS) na poprawę efektywności co pozostaje w sprzeczności z wynikami uzyskanymi dla pszenżyta (Würschum i wsp. 2015). Podobnie, wzbogacenie pożywki indukującej o trichostatynę A (TSA) nie miało istotnego wpływu na wydajność indukowania androgenezy w kulturach *in vitro*. Dodanie tego związku do obu wymienionych wcześniej pożywek nie spowodowało zahamowania indukcji androgenezy, ani nie obserwowano pozytywnego wpływu na wydajność androgenezy u większości genotypów. W przypadku tylko jednej kombinacji pożywki (KBP (Kumlehn i in. 2006)+TSA) i genotypu „8” wynik indukowania androgenezy był lepszy niż na pożywce bez TSA. W pozostałych przypadkach trichostatyna nie miała wpływu lub odnotowano jej negatywny wpływ na liczbę reagujących pylników.

Średnia efektywność androgenezy, obliczona dla pięciu genotypów, dość wyraźnie wskazuje na światło zielone jako najbardziej poprawiające badany parametr. W porównaniu do kultur w ciemności, wszystkie rodzaje światła monochromatycznego miały pozytywny wpływ na kultury z pojedynczych kłosów. Mniej oczywiste są wyniki dotyczące reakcji pylników na kulturę w obecności różnych barw światła. Najwyższą efektywność androgenezy uzyskano dla linii B20 i 5 na świetle zarówno zielonym jak i czerwonym, ale dla trzech genotypów (5, B20 i B14) odnotowano równie wysoką efektywność reakcji pylników w ciemności! Sumując wyniki uzyskane dla pojedynczych genotypów i wyciągając średnie okazuje się, że światło zielone poprawia efektywności androgenezy w porównaniu do kultur w ciemności, i to tak w przypadku procentu kłosów jak i procentu pylników, które zareagowały.

Badano też wpływ światła na regenerację roślin. Średnia obliczona dla pięciu genotypów dość wyraźnie wskazuje na światło zielone jako najbardziej poprawiające wydajność regeneracji zielonych roślin. Światło białe zazwyczaj stosowane

do regeneracji roślin okazało się mniej efektywne niż pozostałe dwa światła monochromatyczne – niebieskie i czerwone.

Zbadanie wpływu stresów i składu pożywek na liczbę pojawiających się regenerantów albinotycznych.

Poziom albinizmu wahał się w granicach od 0 do 90%, w zależności od genotypu, rodzaju użytego stresu i pożywki. Zastosowanie stresu obejmującego chłodzenie pędów z kłosami przez 21 dni może w przypadku niektórych genotypów obniżyć liczbę regenerujących roślin bezchlorofilowych. Uzupełnienie pożywki indukującej GA nie miało zasadniczego wpływu na poziom albinizmu. Próby ograniczenia albinizmu poprzez dodawanie STS do pożywki (Würschum i wsp. 2015) jak też indukowania androgenezy na pożywce KBP (Kumlehn i in. 2006) nie dały pozytywnych rezultatów.

Badania nad określeniem warunków indukowania podziałów komórkowych i rozwoju zarodków w kulturach izolowanych mikrospor (KIM).

Metoda izolacji mikrospor z wyizolowanych pylników przy pomocy plastikowych probówek homogenizacyjnych umożliwiła wyizolowanie o ok. 40% komórek więcej w porównaniu do metalowego blendera uwalniającego mikrospory na skutek mechanicznego cięcia kłosów. Przetrzywanie ściętych pędów z kłosami w obniżonej temperaturze (4°C/2 tyg.) w połączeniu z inkubacją pylników w 4°C/4 dni w roztworze mannitolu zwiększało efektywność indukcji embriogenezy w KIM prawie 3 krotnie (0,45% vs 0,015%) oraz dwukrotnie efektywność regeneracji roślin (18% vs 9%) w stosunku do 3 tyg. przetrzymywania ściętych kłosów w wodzie w 4°C. Użycie kultury “niańki” w formie załączni, pochodzących z pszenicy odm. Svilena, o wysokim potencjale androgenicznym, nie zwiększało żywotności mikrospor żyta, jak również efektywności indukcji androgenezy, natomiast przyspieszało proces – nieco szybciej powstawały agregaty komórkowe i struktury zarodkopodobne. 95% zregenerowanych w KIM roślin było albinotami.

Ocena wpływu herbicydów antymitotycznych na podwajanie liczby chromosomów w kulturach *in vitro*.

Wśród młodszych roślin (ok. 2cm) odnotowano wysoką śmiertelność powodowaną toksycznym działaniem 5 μM oryzaliny oraz 10 μM trifluraliny. Negatywny wpływ stosowanych związków

w tej grupie eksplantatów objawiał się żółknięciem i brązowieniem tkanek, w wyniku czego dalszy ich rozwój ulegał częściowemu spowolnieniu lub zahamowaniu. Śmiertelność regenerantów wzrastała wraz z wydłużeniem czasu stosowania antymityotyków. W obrębie badanych linii nie znaleziono powiązania pomiędzy liczbą regenerantów, które przeżyły/wypadły po wysadzeniu do gleby, a rodzajem inhibitora mitozy i czasem jego ekspozycji – otrzymane wskaźniki nie odbiegały od danych kontrolnych. W ramach przeprowadzonych prac zbadano też wpływ herbicydu z grupy fosforotioamidów – amiprofosmetylu (APM) na efektywność podwojenia garnituru chromosomowego w liniach wytworzonych drogą androgenyzy. Zastosowane APM w dawkach 50 i 100 μM w przy najdłuższym czasie działania (48h) nie zwiększało efektywności podwajania liczby chromosomów u regenerantów w porównaniu do kontroli. Nie odnotowano znaczących różnic dotyczących ploidalności roślin zregenerowanych na pożywkach o różnej zawartości auksyny 2.4D.

Morfologiczna i cytometryczna ocena poziomu płodności otrzymanych regenerantów.

Dokonano morfologicznej i cytometrycznej oceny potomstwa regenerantów oraz oceny poziomu ich płodności. Potomstwo regenerantów dwóch genotypów uprawiano w fitotronie w warunkach symulujących warunki polowe. Siewki obu genotypów wykazywały niejednakową intensywność rozkrzewiania. W obrębie jednego genotypu występowały niewielkie różnice w budowie morfologicznej roślin. Dopiero w fazie strzelania w źdźbło zarysowały się różnice głównie w długości źdźbła. Dla obu linii długość kolejnych faz rozwojowych do fazy pełnej dojrzałości, nie odbiegała od czasu trwania poszczególnych faz rozwojowych, charakterystycznych dla typowego żyta ozimego. Efektywność spontanicznego podwajania liczby chromosomów wyniosła 68,26%. Haploidy stanowiły 31,74%. Odnotowano obecność pojedynczych roślin aneuploidalnych, oraz osobników o innej ploidalności np. tetraploidalnych. Obserwowano zaburzenia płodności pojedynczych roślin niezależnie od ich pochodzenia.

Wnioski z prowadzonych badań

- Genotyp roślin donorowych w danych warunkach kultury ma wpływ na wydajność regeneracji i na poziom albinizmu wśród regenerantów.
- Zastosowanie na ścięte pędy z kłosami stresu obniżonej temperatury ($4^{\circ}\text{C}/2$ tyg.)

w połączeniu z inkubacją pylników w roztworze mannitolu ($4^{\circ}\text{C}/4$ dni) zwiększało efektywność indukcji embriogenezy w KIM prawie trzykrotnie oraz efektywność regeneracji roślin dwukrotnie w stosunku do 3 tyg. chłodzenia kłosów.

- Zastosowanie stresu polegającego na chłodzeniu pędów z kłosami przez 21 dni może w przypadku niektórych genotypów obniżyć liczbę regenerujących roślin bezchlorofilowych.
- Rodzaj zaproponowanych pożywek indukujących nie wpływał na poziom albinizmu w kulturach *in vitro*, jednakże w zasadniczy sposób podnosił ogólną efektywność regeneracji roślin.
- Zastosowanie pożywki KBP nie zwiększyło wydajności regeneracji roślin w stosunku do pożywki 190–2. Wzbogacenie pożywki indukującej o STS lub TSA nie wpływało na wydajność indukowania androgenyzy i poziom albinizmu w kulturach *in vitro* pożywki 190–2 natomiast dodatek GA podnosił liczbę regenerantów.
- Zastosowane trzy kolory światła monochromatycznego okazały się być skuteczne w indukowaniu androgenyzy.
- Indukowanie androgenyzy w ciemności jest mniej efektywne niż w obecności jednej zastosowanych barw światła
- Wyniki przeprowadzonych badań wskazują na pozytywny wpływ światła monochromatycznego na indukcję androgenyzy w porównaniu do powszechnie dotąd prowadzonych kultur pylników w ciemności.
- Światło białe zazwyczaj stosowane do regeneracji roślin okazało się mniej efektywne niż pozostałe zastosowane barwy światła monochromatycznego.
- Zastosowane herbicydów: oryzaliny, trifluraliny i amiprofosmetylu oraz 2,4-D w badanych dawkach i reżimach czasowych na różnych etapach kultur *in vitro* nie zwiększało efektywności podwajania liczby chromosomów u regenerantów w stosunku do kontroli.

Osiągnięcia projektu

1. Wyselekcjonowano linie o niespotykanej dotąd efektywności regeneracji DH żyta. Linie te zostały przekazane hodowcom.
2. Ustalono optymalny dla żyta rodzaj stresu indukujący podziały mikrospor i regenerację DH.
3. Wyniki projektu są wdrażane w spółkach

- hodowlanych i stały się podstawą do przygotowania kolejnego projektu: „Przeniesienie zdolności do androgenozy z linii modelowych do linii hodowlanych żyta w oparciu o opracowane markery molekularne tej cechy”, który będzie realizowany od stycznia 2021 roku.
4. Dzięki odkryciu modelowego genotypu żyta dalsze badania nad kulturami *in vitro* będą mogły być prowadzone z pozytywnym skutkiem i dawać powtarzalne wyniki. W wyniku prowadzonych prac udało się wyselekcjonować takie modelowe genotypy żyta, które w sposób powtarzalny pozwalają na testowanie czynników determinujących androgenezę.
 5. Opanowano metodę KIM żyta i zbadano czynniki sprzyjające tej kulturze.
 6. Stwierdzono pozytywny wpływ światła monochromatycznego na kultury pylnikowe żyta

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- Zimny J., Oleszczuk S., Makowska K., Androgeniza dla hodowli mieszańcowej żyta. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa – Nauka Dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych – Zakopane 30.01–3.02.2017r. Wykład.
- Zimny J., Makowska K., Zimny A., Czaplicki A., Oleszczuk S. Highly efficient rye androgenesis – impact of genotype and various stress factors. 8th International 2017/13th Gatersleben Research Conference. EUCARPIA Cereals Section. Wykład
- Zimny J., Makowska K., Zimny A., Czaplicki A., Oleszczuk S. 2017. Effect of stress factors and media composition on the appearance of albinism within androgenic rye regenerants. 2017/13th Gatersleben Research Conference. EUCARPIA Cereals Section

Zimny J., Indukowana embriogeneza u żyta – podsumowanie 35 lat badań, Induced rye embryogenesis – a summary of 35 years of research. XV Ogólnopolska Konferencja Kultur *In vitro* i Biotechnologii Roślin. Rogów.2018. Wykład.

Zimny J., Makowska K., Zimny A., Czaplicki A., Sowa S., Oleszczuk S. Considerable progress in the induction of efficient rye androgenesis”. Plant Genetics & Breeding Technologies IV: July 12–13, 2018 w Wiedniu. Wykład.

Zimny J., Makowska K., Zimny A., Czaplicki A., Oleszczuk S. Czy możemy wpływać na pojawianie się albinotycznych regenerantów w trakcie androgenozy żyta (*Secale cereale* L. 2019 XI Konferencja „Kultury *in vitro* w biotechnologii i fizjologii roślin. Kraków. Wykład

Zimny J., Oleszczuk S., Zimny A., Czaplicki A., Sowa S. Stress factors influencing androgenesis of rye. 4th Edition of Global Conference on Plant Science and Molecular Biology, September 19–21, 2019 Londyn. Wykład

Publikacje

Zimny J., Michalski K. 2019. The development of rye (*Secale cereale* L.) *in vitro* culture techniques for biotechnology and crop improvement. ABC, Series Botanica 61/1: 7–15, 2019. DOI: 10.24425/abcsb.2019.127735 IF. 0,66, 40pkt MNiSW

Literatur

- Kumlehn J., Serazetdinova, L., Hensel G., Becker D., and Lörz H. (2006). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnol. J. 4, 251–261. doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x
- Würschum T., Tucker M. R., Maurer H. P., Leiser W. (2015). Ethylene inhibitors improve efficiency of microspore embryogenesis in hexaploid triticale. Plant Cell Tissue Organ Cult 122:751–757

Haploidyzacja żyta – diagnostyka molekularna oraz wpływ nanomolekuł na wspomaganie indukcji i regeneracji roślin w warunkach *in vitro*

Haploidization of the rye – the molecular diagnostics and the influence of nanomolecules on supporting the induction and the regeneration of plants in *in vitro* conditions

Sylwia Mikołajczyk¹✉, Zbigniew Broda¹, Dorota Weigt¹, Agnieszka Tomkowiak¹, Jan Bocianowski²

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa, Ogrodnictwa i Bioinżynierii

¹Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

²Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych

✉ e-mail: sylwia.mikolajczyk@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: androgeniza, gen *SERC*, markery ISSR, markery RAPD, żyto

Wstęp

Podwojone haploidy żyta (*Secale cereale* L.) stanowią potencjalne narzędzie dla badań podstawowych oraz dla hodowli roślin. Metody otrzymywania haploidów żyta, obejmują androgenezę (kultury pylników i izolowanych mikrospor) oraz kultury załączków lub haploidalnych zarodków po zapyleniu pyłkiem kukurydzy. Efektywność haploidyzacji żyta jest silnie uzależniona od genotypu i była ona przedmiotem badań podstawowych z zakresu genetycznego uwarunkowania zdolności do androgenyzy dla szerokiego spektrum genotypów oraz opracowania metodologii efektywnego indukowania linii podwojonych haploidów.

Targońska i in. (2013) wskazuje ortologię genów pozytywnie lub negatywnie kontrolujące odpowiedź żyta w kulturach tkankowych podkreślając jednocześnie, że wiedza na ten temat jest fragmentaryczna, a wykorzystanie kultur tkankowych żyta w inżynierii genetycznej i hodowli ograniczają nieznanne w pełni mechanizmy kontroli zdolności regeneracyjnych. Targońska i in. (2013) wskazują także na złożony mechanizm pozytywnej i negatywnej regulacji procesów TCR (tissue culture response) u żyta, w którym dużą rolę odgrywają badane w zadaniu geny *ScSERK*.

Za odpowiedź w kulturach tkankowych żyta (TCR) odpowiadają geny *SERK* (*SERK* – *Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*). Geny *SERK* zostały uznane za markery molekularne

dla procesu embriogenezy somatycznej. Związek genów *SERK* z embriogenezą somatyczną został opisany u wielu gatunków, między innymi *Dactylis glomerata*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* (Somleva i in., 2000; Hecht i in., 2001; Nolan i in., 2003). Ekspresja genów *SERK* jest szczególnie wysoka w tkankach embriogenicznych i niektórych niezróżnicowanych komórkach występujących na wczesnych etapach embriogenezy somatycznej (Kwaaitaal i in., 2005).

Zdolność do regenerowania form haploidalnych jest uwarunkowana genetycznie i powoduje silne zróżnicowanie w liczbie otrzymywanych roślin haploidalnych poszczególnych gatunków, a nawet genotypów tego samego gatunku. Pershina i in. (2003) oraz Dobrovolskaya i in. (2003) zbadały wpływ chromosomów żyta na indukcję kalusa i regenerację w kulturach niedojrzałych zarodków linii substytucyjnych pszenica-żyto (pszenica odmiany Saratovskaya – żyto odmiany Onokhoiskaya), a wyniki tych badań wskazują, że poszczególne parametry androgenyzy (tworzenie kalusa embriogenicznego, całkowita regeneracja roślin oraz regeneracja roślin zielonych) są kontrolowane przez różne mechanizmy genetyczne. Ponadto geny za nie odpowiadające zlokalizowane są na różnych chromosomach genomu R.

Cele prowadzonych badań

Celem zrealizowanego zadania było zbadanie wybranych czynników decydujących o indukcji



androgenezy i regeneracji roślin haploidalnych. Projekt miał za zadanie rozpoznanie wpływu stresu termicznego oraz dodatku do pożywek indukujących androgenezę związków chemicznych korzystnych dla zaindukowania sporofitycznego rozwoju mikrospor żyta. Ponadto w trakcie zrealizowanego projektu rozpoznano możliwość selekcjonowania form o zróżnicowanej zdolności do androgenezy w oparciu o markery DNA.

Cele szczegółowe zadania:

- określenie fazy rozwojowej roślin i mikrospor żyta optymalnej do indukowania androgenezy (faza rozwojowa rośliny, odległość od liścia podflagowego do flagowego, długość pylników, faza rozwojowa mikrospor określana w preparatach rozmazowych zgodnie z Immonen i Anttila, 1998) – cel zrealizowany;
- stres abiotyczny (termiczny i osmotyczny) jako czynnik indukujący sporofityczny rozwój mikrospor żyta – cel zrealizowany;
- selekcja pożywek o wysokiej efektywności indukcji androgenezy (pożywka C17, 190–2, N6, dodatek auksyn 2,4-D i dikamby, dodatek Zn, Cu, ficollu i n-butanolu a odpowiedź w kulturach pylników) – cel zrealizowany;
- rozpoznanie możliwości selekcjonowania form o wysokiej zdolności do androgenezy w warunkach *in vitro* w oparciu o markery DNA (RAPD i ISSR) oraz ekspresję dwóch wybranych genów *SERC* i *SNAC* – cel zrealizowany.

Materiały i Metody

Materiał roślinny stanowiły odmiany populacyjne żyta ozimego oraz 94 genotypy żyta pokolenia S0 i S1 o zróżnicowanym pochodzeniu.

Lista badanych odmian żyta wraz z pochodzeniem: Agrikolo (HR Smolice), Amilo (Danko HR), Antonińskie (Poznańska Hodowla Roślin), Arant (Poznańska Hodowla Roślin), Bosmo (HR Smolice), Dańkowskie Amber (Danko HR), Dańkowskie Diament (Danko HR), Dańkowskie Granat (Danko HR), Dańkowskie Hadron (Danko HR), Dańkowskie Nowe (Danko HR), Dańkowskie Rubin (Danko HR), Dańkowskie Skand (Danko HR), Dańkowskie Turkus (Danko HR), Dańkowskie Złote (Danko HR), Domir (Rolnas), Horyzo (HR Smolice), Pastar (Poznańska Hodowla Roślin, Rolnas), Piastowskie (Poznańska Hodowla Roślin), Poznańskie (Poznańska Hodowla Roślin), Rostockie (HR Smolice), Słowiańskie (HR Smolice).

Materiały hodowlane o zróżnicowanym pochodzeniu:

- a. PHR2/15, PHR4/15, PHR9/15, PHR12/15,

PHR16/15, PHR20/15, PHR40/15, PHR42/15, PHR43/15, PHR57/15, PHR65/15, PHR74/15, PHR75/15, PHR76/15, PHR79/15, PHR1R/2017, PHR2R/2017, PHR3R/2017, PHR1NR/2017, PHR2NR/2017, PHR3NR/2017, NS16134/4, NS16135/1, NS16135/2, NS16137/7, NS16143/6, NS16144/1, NS16149/1, NS16153/2, NS16153/4, NS16156/4, PHR1/19, PHR2/19, PHR3/19, PHR4/19, PHR5/19, PHR6/19, PHR7/19, PHR8/19, PHR1/20, PHR2/20, PHR3/20, PHR4/20, PHR5/20, PHR6/20, PHR7/20, PHR8/20;

- b. S1108/14, S1117/14, S1118/14, S1120/14, S1122/14, S1126/14, S1127/14, S1128/14, S1136/14, S1142/14, S2545/14, S2550/14, S2574/14, S2587/14, S2608/14, S1170/16, S1183/16, S1187/16, S1218/16, S1223/16, S1228/16, S01175/17, S01176/17, S01179/17, S01185/17, S01216/17, S04284/17, S04298/17, S04319/17, S04329/17, S04351/17, S1128/18, S1194/18, S1272/18, S1278/18, S1304/18, S1321/18, S1322/18, S1174/19, S1253/19, S1292/19, S1323/19, S1337/19, S1341/19, S1347/19, S1350/19.

Wyżej wymienione genotypy żyta poddano indukcji androgenezy w latach 2015 – 2020. Ścięte kłosa przed zastosowaniem traktowania wstępnego poddawano pomiarom biometrycznym. Wybrano cechy pozwalające na ocenę optymalnej fazy rozwojowej roślin do indukowania androgenezy w kulturach pylników żyta: odległość od liścia podflagowego do flagowego (mm), długość pylników (mm), faza rozwojowa roślin w skali BBCH, stadium rozwojowe mikrospor określone w preparatach rozmazowych. W traktowaniu wstępnym badanych genotypów zastosowano stres termiczny (4°C) i stres osmotyczny (0,3M mannitol).

Kłosa badanych roślin były odkażane w podchlorynie sodu (NaClO). Z kłosów preparowano pylniki i umieszczano w płytkach Petriego na pożywkach indukujących androgenezę C17, 190–2, N6 z dodatkiem optymalnej kombinacji auksyn (2,4-D i dikamby) wybranej w pierwszym roku realizacji zadania. W każdej płytce o średnicy 90 mm, zawierającej 25 ml pożywki C17 lub 2,5 ml płynnej pożywki 190–2 na płytkach Petriego o średnicy 35 mm, umieszczano pylniki z jednego kłosa – od 50 do 100 szt. (kultury pylników) lub 10 szt. (kultury izolowanych mikrospor). Utworzone z pylników struktury embriogenne większe od 1,5 mm przenoszono na pożywkę regenerującą (pożywka MS bez dodatku regulatorów wzrostu).

DNA badanych roślin donorowych oraz DNA z otrzymanych struktur kalusowych i regenerantów poddano analizie polimorfizmu DNA z zastosowaniem markerów RAPD i ISSR oraz ekspresji wybranych 2 genów *SERC* i *SNAC*. Izolację DNA każdorazowo przeprowadzono z wykorzystaniem gotowych zestawów do izolacji genomowego DNA z roślin. Po izolacji stężenie preparatów z genomowym DNA oznaczono za pomocą spektrofotometru DeNovix. Następnie otrzymane próby DNA rozcieńczono wodą destylowaną w celu uzyskania jednakowego stężenia 50 ng/μl.

Do analizy polimorfizmu DNA techniką RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) zastosowano 15 wyselekcjonowanych starterów 10 nukleotydowych o losowej sekwencji, które wybrano na podstawie literatury i badań własnych. (Bolibok i in., 2006; Broda i in., 2008; Ćwiklińska i in., 2010; Kiviharju i in., 2004). Warunki przeprowadzenia reakcji PCR zostały ujednolicone dla każdego z identyfikowanych polimorfizmów i różniły się jedynie temperaturą przyłączania starterów, ustaloną na podstawie temperatury ich topnienia.

DNA badanych roślin donorowych zostało również poddane analizie ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) z zastosowaniem 15 starterów reakcji wybranych na podstawie literatury (Bolibok i in., 2006; Saal i Wricke, 1999). Profile reakcji PCR stosowano zgodnie z danymi literaturowymi z modyfikacjami dotyczącymi temperatury przyłączania startera wynikającymi z różnych temperatur topnienia i wiązania poszczególnych starterów.

Reakcję amplifikacji (PCR) dla obu typów analiz prowadzono w termocyklerze Proffesional Basic Gradient firmy Biometra. Rozdział amplifikowanych produktów reakcji prowadzono w 1,5% lub 2,5% żelu agarozowym z dodatkiem 3 μl barwnika. Wizualizacja otrzymanych elektroforogramów została wykonana w transiluminatorze High Performance UV Transiluminator UVP, a ich archiwizację prowadzono za pomocą systemu KTE – Video. Następnie określono współczynniki zróżnicowania genetycznego i na ich podstawie sporządzono dendrogram metodą UPGMA według wzoru:

$$GS_{xy} = \frac{2n_{xy}}{n_x + n_y},$$

gdzie n_{xy} oznacza liczbę amplikonów obecnych u genotypu x i genotypu y, n_x – liczbę amplikonów obecnych u genotypu x, n_y – liczbę amplikonów obecnych u genotypu y (Nei i Li, 1979).

Do analizy ekspresji genów *SERC* i *SNAC* wybrano te same genotypy, które poddano analizie techniką RAPD i ISSR. Po zoptymalizowaniu

reakcję PCR przeprowadzono w tych samych warunkach dla identyfikowanych genów *SERC* i *SNAC*. Startery, zostały zaczerpnięte z literatury (Gruszczyńska i Rakoczy-Trojanowska, 2011; Liu i in., 2014).

Wyniki

Średnia odległość w mm liścia podflagowego wynosiła 138,4 mm dla badanych genotypów żyta. Zakres zmienności mieścił się w zakresie od 181,8 mm do 91 mm. Kolejną analizowaną cechą była długość pylników żyta. Pylniki badanych genotypów miały średnio od 5,1 mm do 6,7 mm, a zakres wartości badanej cechy wynosił od 7,8 mm do 5 mm. Kłosa badanych genotypów żyta ścinano w zbliżonej fazie rozwojowej – od 49 do 52 w skali BBCH. W preparatach rozmazowych obserwowano również zbliżone stadia rozwojowe mikrospor – głównie późnojednojądrowe.

Średnia efektywność indukcji androgenyzy dla badanych odmian i materiałów hodowlanych żyta o zróżnicowanym pochodzeniu była zróżnicowana. W latach 2015 – 2020 efektywność otrzymywania struktur androgenicznych wyniosła od 6,4% do 0%, a średnia efektywność regeneracji roślin osiągnęła wartość od 1,6% do 0%. Najwyższą efektywność regeneracji struktur kalusowych dla badanych odmian zaobserwowano na pożywce C17 z dodatkiem 2,4-D i dikamby. Pożywka C17 zawierająca dodatek 2,4-D była efektywniejsza dla indukowania androgenyzy dla materiałów hodowlanych żyta pokolenia S0 i S1. Najwyższą liczbę zielonych regenerantów otrzymano dla odmian Arant i Rostockie oraz materiałów hodowlanych PHR9/15, PHR65/15, S1128/14, S1142/14, S2550/14, S2587/14.

Na podstawie analizy wariancji wykazano istotne statystycznie znaczenie genotypu, dla badanych w kulturach pylników genotypów żyta (odmian i materiałów hodowlanych o zróżnicowanym pochodzeniu). Genotyp wpływał istotnie na analizowane parametry androgenyzy to jest liczby reagujących pylników i liczby zregenerowanych roślin. Pomimo wyższej liczby kalusów otrzymanych na pożywce C17 zawierającej 2,4-D nie stwierdzono istotnej statystycznie różnicy pomiędzy zastosowanymi kombinacjami auksyn w pożywce C17.

Kolejnym analizowanym czynnikiem w trakcie realizacji zadania był dodatek $ZnSO_4$, $CuSO_4$, fikolu 400 i n-butanolu do wyselekcjonowanej pożywki C17. Pożywka C17 z dodatkiem $ZnSO_4$ była korzystna dla indukcji androgenyzy w kulturach pylników odmiany Dańkowskie Złote i genotypów

PHR2/15, PHR9/15, S1142/14, S2545/14. Dodatek CuSO_4 do pożywki C17 charakteryzował się wyższą efektywnością indukcji androgenyzy dla odmian Agrikolo, Antonińskie, Horyzo, Pastar i genotypu S2587/14. Dodatek fikollu 400 i n-butanolu do pożywki C17 wykazał działanie inhibujące na indukcję androgenyzy w kulturach pylników badanych genotypów żyta.

W kulturach izolowanych mikrospor prowadzonych na pożywkach płynnych 190–2 i PG-96M wykorzystano odmiany i genotypy żyta wyselekcjonowane w kulturach pylnikowych, a jako czynniki stresowe zastosowano temperaturę 4°C i 0,3M roztwór mannitolu. Najwyższą liczbę powiększonych mikrospor zaobserwowano po 7 dniach przechowywania kłosów badanych genotypów żyta w 4°C . Długa ekspozycja kłosów żyta na niską temperaturę oraz połączenie stresu termicznego i osmotycznego spowodowały obniżenie liczby mikrospor w zawieszynie po izolacji blenderem.

Z wybranych na podstawie literatury i przetestowanych starterów RAPD i ISSR wybrano po 15 sekwencji oligonukleotydowych, które generowały polimorfizm prążkowy pozwalający na określenie podobieństwa genetycznego pomiędzy badanymi odmianami i materiałami hodowlanymi żyta. Stwierdzono, że w reakcjach ISSR otrzymywano wyższą liczbę produktów, a wyniki analiz były bardziej powtarzalne. Wartości podobieństwa genetycznego uzyskane w oparciu o polimorfizm markerów RAPD i ISSR mieściły się w zakresie od 23% do 85%.

Z badanych genów zróżnicowanie pomiędzy genotypami wykazywały dwa (*SERC* i *SNAC*) z pięciu analizowanych genów (*SERC*, *Lecl*, *VPI*, *NiR*, *SNAC*). Geny *SERC* i *SNAC* wykazywały polimorfizm na otrzymanych elektroforogramach po reakcji PCR z zastosowanymi dla nich starterami oraz zmienne poziomy ekspresji oznaczone za pomocą RT-PCR, zależne od czasu traktowania kłosów żyta temperaturą 4°C . Najwyższe zmiany poziomu ekspresji zaobserwowano dla genu *SNAC* po 2 i 7 dniach traktowania. Ekspresja genu *SERC* wykazywała znaczne zróżnicowanie pomiędzy genotypami. Niski poziom ekspresji zaobserwowano dla odmian Antonińskie, Dańkowskie Nowe i Słowiańskie, natomiast wysoki dla materiałów hodowlanych PHR16/15, PHR65/15, S1122/14 i S1128/14.

Wnioski

- Optymalną długością pylnika dla zakładania kultur pylnikowych z odmian żyta była średnia długość 5,1 mm, a dla materiałów

hodowlanych długość ta mieściła się w zakresie od 5,8 – 6,3 mm.

- Na pożywce C17 zawierającej 2,4-D i dikambę otrzymano wyższą efektywność indukcji androgenyzy jednak różnica pomiędzy pożywkami nie była istotna statystycznie.
- Na postawie analizy statystycznej wykazano, że odmiany Amilo, Antonińskie, Arant, Dańkowskie Amber, Pastar i Rostockie oraz genotypy żyta PHR9/15, PHR65/15, PHR75/15, S1128/14, S1142/14, S2550/14 charakteryzowały się istotnie wyższą indukcją androgenyzy i regeneracją roślin w kulturach pylników.
- Zastosowane dodatki związków chemicznych do pożywki C17 (ZnSO_4 , CuSO_4 , fikollu 400, n-butanolu) obniżały ogólną wydajność procesu haploidyzacji, jednak dla genotypów żyta PHR2/15, S1142/14, S2545/14 i S2587/14 dodatek ZnSO_4 , CuSO_4 do pożywki C17 wpływał pozytywnie na liczbę otrzymanych struktur kalusowych i liczbę zregenerowanych roślin.
- Wybrane w kulturach pylników odmiany i genotypy żyta nie wykazały zdolności do androgenyzy w kulturach izolowanych mikrospor.
- Geny *SNAC* i *SERC* wykazywały różnice w polimorfizmie i poziomie ekspresji dla badanych odmian i materiałów hodowlanych żyta co może zostać wykorzystane do selekcji form żyta podatnych na indukcję androgenyzy w kulturach pylników żyta.

Osiągnięcia projektu

- Określenie optymalnego stadium rozwojowego roślin donorowych żyta do zakładania kultur pylników i izolowanych mikrospor.
- Wykazanie stymulującego wpływu dodatku CuSO_4 i ZnSO_4 na indukcję androgenyzy w kulturach genotypów żyta o niskiej odpowiedzi w kulturach pylników.
- Wykaz zmian poziomu ekspresji genów *SERC* będącego markerem embriogenezy somatycznej u genotypów podatnych na indukcję androgenyzy w kulturach pylników żyta oraz genu *SNAC* odpowiadającego za reakcję na stresy abiotyczne.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- Mikołajczyk S., Broda Z., Weigt D., Tomkowiak A. 2016. Haploidyzacja żyta. Konferencja Naukowa z okazji 60-lecia Katedry Genetyki i Hodowli Roślin na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie

- pt.: Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin. Międzyzdroje, 8–10 czerwca 2017; komunikat ustny
- Mikołajczyk S., Broda Z., Weigt D., Tomkowiak A., Bocianowski J. 2016. The influence of genotype, developmental phase of the spike and developmental stage of microspores on the induction of androgenesis in anther culture of rye (*Secale cereale* L.). Plant Breeding: the art of bringing science to life: 20th EUCARPIA General Congress, 29 Aug – 1 Sep 2016, Zurich. Abstracts of the 20th EUCARPIA General Congress/Ed. Roland Kölliker and Beat Boller, Agroscope: 221; poster
- Mikołajczyk S., Broda Z., Weigt D., Tomkowiak A. 2017. Wpływ dodatku nanomolekuł do pożywki C17 na indukcję androgenyzy i regenerację roślin w kulturach pylników żyta – XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” Zakopane 30 stycznia – 03 lutego 2017 r.: 131 poster
- Mikołajczyk S., Weigt D., Tomkowiak A., Broda Z. 2018. Rye (*Secale cereale* L.) androgenesis and the search for RAPD and ISSR markers related with the response in the anther culture. XV Ogólnopolska Konferencja Kultur in vitro i Biotechnologii Roślin „Biotechnologiczne wykorzystanie zmienności w warunkach in vitro” Rogów, 17 – 20 września 2018 r., BioTechnologie vol. 99 (3): 292. poster
- Mikołajczyk S., Tomkowiak A., Weigt D., Broda Z. 2019. The *SERK* gene expression vs the androgenic capacity in the rye (*Secale cereale* L.) anther culture. 5th Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, 4 – 7 November 2019, Budapest, Hungary. Poster
- J. Appl. Genetics 52: 1–8.
- Hecht V., Vielle-Calzada J.-P., Hartog m.V., Schmidt E. D.L., Boutilie K., Grossniklaus U., de Vries S. C. (2001). The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. Plant Physiology 127: 803–816.
- Immonen S., Anttila A. (1998). Impact of microspore developmental stage on induction and plant regeneration in rye anther culture. Plant Sci. 139: 213–222.
- Kiviharju E., Laurila J., Lehtonen M., Tanhuanpää P., Manninen O. (2004). Anther culture properties of oat x wild red oat progenies and a search for RAPD markers associated with anther culture ability. Agricultural and Food Sci. 13:151–162.
- Kwaaitaal M., de Vries S., Russinova E. (2005). Arabidopsis thaliana Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 protein is present in sporophytic and gametophytic cells and undergoes endocytosis. Protoplasma 226: 55–65.
- Liu G., Li X., Jin S., Liu X., Zhu L., Nie Y., Zhang X. (2014). Overexpression of rice *NAC* gene *SNAC1* improves drought and salt tolerance by enhancing root development and reducing transpiration rate in transgenic cotton. PloS one, 9 (1): e86895.
- Nei M., Li W. H. (1979). Mathematical model for studying genetic variation in terms of restriction endonucleases. Proceeding National Academy of Sciences USA, 79: 5269–5273.
- Nolan K. E., Irwanto R. R., Rose R. J. (2003). Auxin up-regulates *MtSERK1* expression in both *Medicago truncatula* root-forming and embryogenic cultures. Plant Physiol. 33 (1): 218–230.
- Pershina L. A., Dobrovolskaya O. B., Rakovtseva T. S., Kravtsova L. A., Shchapova A. I., Shumny V. K. (2003). The effect of rye chromosomes on callus induction and regeneration in callus cultures of immature embryos of wheat-rye substitution lines, *Triticum aestivum* L. cultivar Saratovskaya 29-*Secale cereale* L. cultivar Onokhoiskaya. Russian Journal of Genetics 39: 902–908.
- Saal B, Wricke G. (1999). Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale* L.). Genome 42 (5): 964–72.
- Somleva M. N., Schmidt E. D. L., de Vries S. C. (2000). Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (*Poaceae*) explants identified by cell tracking and by *SERC* expression. Plant Cell Reports 19: 718–726.
- Targońska M., Hromada-Judycka A., Bolibok-Bragoszewska H., Rakoczy-Trojanowska M. (2013). The specificity and genetic background of the rye (*Secale cereale* L.) tissue culture response. Plant Cell Rep. 32:1–9.

Literatura

- Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M., Wyrzykowska M., Radecka M., Orczyk W. (2006). Identification of microsatellite markers in the rye genome. Cel. Mol. Biol. Lett. 11: 291–298
- Broda Z., Kurasiak-Popowska D., Kowalska A., Ćwiklińska A. (2008). Analiza podobieństwa genetycznego wybranych gatunków w rodzaju *Secale*. Biuletyn IHAR 247: 65–71.
- Ćwiklińska A., Broda Z., Bocianowski J. (2010). Analiza porównawcza cech dzikich gatunków rodzaju *Secale* L. w celu poszerzenia zmienności genetycznej przydatnej w hodowli. Biuletyn IHAR 252: 119–137.
- Dobrovolskaya O. B., Pershina L. A., Kravtsova L. A., Shchapova A. I. (2003). Comparative effects of rye chromosomes 1R and 5R on androgenesis in cultured anthers of wheat-rye substitution lines as dependent on the line origin. Russian Journal of Genetics 39: 467–470.
- Gruszczyńska A., Rakoczy-Trojanowska M. (2011). Expression analysis of somatic embryogenesis-related *SERK*, *LEC1*, *VPI* and *NiR* orthologues in rye (*Secale cereale* L.).

Badania wewnętrznej struktury genetycznej odmian żyta oraz dziedzicznego podłoża efektu heterozji

Study on internal genetic structure of rye cultivars and genetic background of heterosis

Stefan Stojalowski¹✉, Marta Orłowska¹, Martyna Sobczyk¹, Anna Bienias¹, Beata Myśków¹, Marzena Ostrowska², Marek Zając², Róża Martofel², Dorota Jasińska², Michał Materka^{2,3}

¹ Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

² Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o.

³ Syngenta Polska Sp. z o.o.

✉ e-mail: sstojalowski@zut.edu.pl

Słowa kluczowe: efekt heterozji, odmiany populacyjne i mieszańcowe, żyto

Żyto należy do najważniejszych roślin uprawnych w Polsce i krajach ościennych. Z uwagi na wybitnie obcypylny charakter tego gatunku, tradycyjne odmiany uprawne miały strukturę populacji charakteryzującą się wyraźnym zróżnicowaniem wewnętrznym. W połowie lat 80. XX wieku w Niemczech wprowadzono do użytkowania pierwsze odmiany mieszańcowe żyta. Strategia prac hodowlanych nad tą kategorią odmian została opracowana w Uniwersytecie Hohenheim i zakładała wydzielenie dwóch heterotycznych pól genetycznych (Geiger 1985) dla komponentów matecznych (Petkus-pool) i ojcowskich (Carsten-pool). Początkowe działania polegały na tworzeniu nowych linii na drodze chowu wsobnego w obrębie wydzielonych pul. Systematyczne krzyżowanie najlepszych linii wsobnych w obrębie każdej puli genetycznej połączone z selekcją najlepszych genotypów, prowadzi do zawężania zmienności genetycznej (Duvick i in. 2004). Niezbędny jest systematyczny dopływ do każdej z pul nowych genów np. z populacji żyta charakteryzujących się obecnością wartościowych alleli (Fischer i in. 2010). Znajomość genetycznej zmienności obecnej w obrębie odmian populacyjnych, ale też wewnątrz aktualnie uprawianych odmian mieszańcowych, może pomóc w realizacji tego typu działań w sposób bardziej efektywny.

Celem badań było określenie (przy zastosowaniu zaawansowanych technologii markerowych) struktury populacji w tradycyjnych i mieszańcowych odmianach żyta, próba identyfikacji

regionów genomu mających kluczowe znaczenie dla plonowania odmian i opracowanie systemu markerów molekularnych przydatnego przy rozszerzaniu zmienności genetycznej w obrębie pul heterotycznych stanowiących materiał wyjściowy do hodowli. Badania pierwotnie planowano na lata 2015–2020, ale z przyczyn niezależnych od Ministerstwa i od wykonawców, realizacja została zapoczątkowana z rocznym opóźnieniem, tj. w 2016 roku. Osiągnięto w pełni cel związany z określeniem struktury genetycznej odmian populacyjnych, mieszańcowych oraz populacji syntetycznych, a pozostałe cele zostały zrealizowane częściowo.

Material badawczy

- Odmiany mieszańcowe żyta: Bono F1, Konto F1, Skaltio F1, Stakatto F1
- Odmiany populacyjne: Armand, Bosmo, D. Diament, D. Granat, Horyzo, Stanko oraz trzy odmiany zarejestrowane ponad 30 lat temu: Amilo, Motto i Vjatka
- Populacje syntetyczne (6 syntetyków 2–4 liniowych wytworzonych w ramach tego projektu)
- Linie wsobne i mieszańce linowo-populacyjne (4 hodowlane linie wsobne krzyżowane z roślinami z 5 odmian: Poznańskie, Horyzo, Amilo, Motto, Vjatka)
- Linie introgressyjne tworzone w ramach tego projektu w liczbie ok. 180. Linie tworzone na bazie mieszańca między liniami: 541N (linia z Zachodniopomorskiego Uniwersytetu



Technologicznego w Szczecinie) i WM18R (linia z Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o.)

Metody badawcze zastosowane w projekcie

- Doświadczenia polowe 1–3 powtórzeniowe z wzorcami – ocena fenotypowa cech użytkowych w różnych lokalizacjach
- Doświadczenia i rozmnożenia wazonowe (w warunkach kontrolowanego nawadniania w szklarni)
- Krzyżowania (w tym krzyżowania wsteczne) oraz chów wsobny
- Analizy PCR: markery genetyczne o znanej lokalizacji chromosomowej – SCAR, STS, Tcos (Stracke i in. 2003; Stojalowski i in. 2011; Hackauf i in. 2012; Milczarski i in. 2016)
- Analizy DArTseq (markery genetyczne typu GBS opracowane przez firmę Diversity Arrays Technology Pty, Bruce, Australia)
- Analiza statystyczna wyników (statystyki charakteryzujące wariancję cech fenotypowych, podobieństwo genetyczne itp.)

Wyniki

Badania realizowano w obrębie czterech tematów (zadań) badawczych:

1. Ocena wewnętrznej struktury genetycznej odmian populacyjnych i mieszańcowych żyta
 Badaniami objęto dziesięć zarejestrowanych odmian żyta: cztery odmiany mieszańcowe (Bono F1, Konto F1, Skaltio F1 i Stakkato F1) oraz sześć odmian populacyjnych (Armand, Bosmo, Dańkowskie Diament, Dańkowskie Granat, Horyzo i Stanko). Pojedyncze rośliny tych odmian (min. 90 osobników) oceniano fenotypowo w warunkach polowych i poddano analizom genetycznym z udziałem technologii DArTseq. Dodatkowo w badaniach na poziomie genetycznym uwzględniono dwie odmiany populacyjne o charakterze historycznym (Amilo i Vjatka).

Wyniki oceny wykonanej w warunkach polowych w dwóch sezonach wegetacyjnych wskazują na stosunkowo niewielką zmienność fenotypową pomiędzy odmianami. Odmiany mieszańcowe charakteryzowały się przeważnie nieco większą zdolnością do krzewienia oraz nieznacznie wyższą liczbą zawiązywanych ziaren w kłosach, ale różnice nie były statystycznie istotne.

Przystępując do badań nie znano jaki jest realny poziom podobieństwa genetycznego roślin wchodzących w skład odmian żyta, ale na podstawie ocen fenotypowych zakładano, że wyrównanie genetyczne odmian mieszańcowych powinno

być większe niż odmian populacyjnych. Uzyskane wyniki potwierdziły te przypuszczenia.

Przystępując do badań nie znano jaki jest realny poziom heterozygotyczności (odsetek loci w stanie heterozygotycznym). Na podstawie założeń teoretycznych przyjęto, że w odmianach mieszańcowych udział loci heterozygotycznych powinien być znacznie większy niż w odmianach populacyjnych. Identyfikacja obszarów genomu o zwiększonym poziomie heterozygotyczności w odmianach mieszańcowych miała pozwolić na wytypowanie obszarów kluczowych dla wysokiego efektu heterozji.

Uzyskane wyniki były całkowicie sprzeczne z przyjętymi wstępnie hipotezami – obserwowana heterozygotyczność odmian mieszańcowych była na podobnym lub nawet niższym poziomie niż odmian populacyjnych.

2. Ocena przydatności odmian populacyjnych do zasilania heterotycznych pul genetycznych dla przyszłych komponentów matecznych i ojcowskich.

W ramach tematu badawczego nr 2 wykonano analizy genetyczne zestawu linii hodowlanych z puli „non-restorer” i „restorer”, które pochodziły z dwóch spółek hodowlanych: Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o. (PHR) oraz DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. Z PHR badano po 45 linii non-restorer i restorer, z DANKO 37 linii non-restorer i 53 restorer. Analiza podobieństwa genetycznego oparta o wyniki ponad 65 tys. markerów DArTseq wykazała, że zarówno w PHR, jak i w DANKO linie z puli non-restorer i restorer grupują się zasadniczo oddzielnie (odstępstwa były sporadyczne). Wewnątrz pul genetycznych widoczne jest dość duże zróżnicowanie genetyczne i granica między pulami nie jest wyraźnie zarysowana (wskazane jest konsekwentne kontynuowanie dotychczasowej strategii hodowlanej dla utrwalenia odrębności obu pul).

Dwie linie z puli non-restorer i dwie z puli restorer (SE 76N/12, S 237N/16, SR81 i SR13) wykorzystano do krzyżowań z pojedynczymi roślinami pochodzącymi z pięciu odmian populacyjnych żyta (Poznańskie, Horyzo, Vjatka, Amilo i Motto). Na bazie uzyskanych mieszańców rozpoczęto tworzenie linii wsobnych – prace hodowlane są na wczesnym etapie (w 2020 roku uzyskano nasiona S2).

3. Ocena plonowania populacji syntetycznych o zróżnicowanej strukturze genetycznej

Materiałem do badań było sześć populacji syntetycznych. Populacje SYN1, SYN2, SYN3

i SYN4 to syntetyki dwuliniowe, SYN5 to syntetyk trójliniowy, a SYN6 – czteroliniowy. Plonowanie badanych syntetyków pozostawało na przeciętnym poziomie. Inne cechy użytkowe też nie dawały syntetykom przewagi nad zarejestrowanymi odmianami wzorcowymi.

Nie zaobserwowano związku między wartością gospodarczą populacji syntetycznych, a dystansem genetycznym między liniami rodzicielskimi syntetyka. Również liczba linii użytych do stworzenia syntetycznej populacji nie miała dużego znaczenia: najlepiej plonował SYN4 (2-liniowy), niewiele gorzej SYN5 (3-liniowy). SYN1 (2-liniowy) i SYN6 (4-liniowy) plonowały na tym samym poziomie.

Do utworzenia populacji syntetycznych użyto dwóch linii z programu non-restorer (po jednej ze spółek Danko i PHR) oraz dwóch z programu restorer (jak wyżej). Linie z programów „restorer” były mniej wyrównane wewnętrznie i miały dość znaczący udział *loci* heterozygotycznych. Dystanse genetyczne między wszystkimi liniami były podobne i nie wykazywały związku z przynależnością do puli „non-restorer” lub „restorer”.

Nie odnotowano u syntetyków dwuliniowych zwiększonego udziału roślin powstałych na drodze samozapylenia jednej z linii rodzicielskich. Rośliny takie pojawiały się sporadycznie.

4. Wytworzenie i ocena zestawu linii introgressyjnych (w oparciu o mieszańce między linią hodowlaną, a linią o znikomym poziomie adaptacji do nowoczesnych programów hodowlanych).

W toku wieloletnich prac uzyskano 180 linii introgressyjnych. Wśród nich 121 linii bazuje na genotypie hodowlanym WM18R, do którego wprowadzono introgressje z prymitywnej linii 541N. Pozostałych 59 linii posiada w większości geny z linii 541N, ale z dodanymi fragmentami genomu WM18R. Analizy molekularne potwierdziły podobieństwo genetyczne linii introgressyjnych do ich rodziców „bazowych”, ale poziom wyrównania (a co za tym idzie homozygotyczność) jest wciąż niewystarczający. Wymagane jest wykonanie kolejnych cykli samozapylenia, aby tworzony zestaw linii mógł znaleźć zastosowanie przy mapowaniu genów kontrolujących cechy plonotwórcze.

Najważniejsze wnioski i główne osiągnięcia

Określono realny poziom wyrównania genetycznego wewnątrz odmian populacyjnych i mieszańcowych. Potwierdzono większe wyrównanie odmian mieszańcowych żyta w porównaniu do populacji.

Stwierdzono, że odmiany mieszańcowe żyta nie wykazują wyższego poziomu heterozygotyczności w porównaniu do odmian populacyjnych.

Wytworzone populacje syntetyczne plonowały słabo – dobór linii do stworzenia plennej populacji syntetycznej wymaga lepszego rozpoznania zdolności kombinacyjnej stosowanych linii.

Wytworzono zestaw linii introgressyjnych żyta (podstawa do stworzenia tzw. biblioteki introgressyjnej). Linie, które aktualnie są na poziomie S3-S4, stanowią wartościowy materiał badawczy, który w połączeniu z poszerzeniem wiedzy nt. sekwencji DNA genomu żyta może pomóc w przyszłym realizowaniu nieosiągniętych dotąd celów

Publikacje z lat 2016–2020

Materiały konferencyjne

- Stojałowski S., Orłowska M., Sobczyk M., Góralska M., 2016. Assessment of genetic diversity within a hybrid cultivar of rye by mean DArTseq technology. V Kongres Genetyki, Łódź 19–22 września 2016, „Program i materiały kongresowe” red. Andrzej K. Kononowicz, Lucjusz Jakubowski, Maciej Borowiec, Paweł Stączek, Wydawnictwo Grupa Medica s.c., Łódź 2016, ISBN: 978–83–925769–4–5: 327
- Stojałowski S., Orłowska M., Sobczyk M., Skurko E., 2017. Ocena wybranych cech morfologicznych u roślin pochodzących z odmian mieszańcowych i populacyjnych żyta. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” – Streszczenia, Zakopane, 30 stycznia – 3 lutego 2017, ISBN 83–891172–87–9: 294
- Orłowska M., Stojałowski S., 2017. Preliminary data on genetic diversity within chosen commercial rye cultivars, „Biologia, Chemia i Środowisko – spojrzenie młodych naukowców”, Kraków 9 grudnia 2017 – Streszczenia wystąpień, s. 69
- Sobczyk M., Orłowska M., Stojałowski S. 2018 “ASSESSMENT OF GENETIC DIVERSITY IN RYE VARIETIES”; 7th International Conference for Young Researchers, Multidirectional Research in Agriculture, Forestry and Technology, 16-17 April 2018, Kraków; str.49
- Stojałowski S., Orłowska M., Sobczyk M., 2019. Wykorzystanie markerów DArTseq do analizy struktury genetycznej wybranych odmian żyta ozimego. IV Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany” Poznań, 5–7 listopada 2019: 75

Literatura

- Duvick D. N., Smith J. S. C., Cooper M., (2004). Long-term selection in a commercial hybrid maize breeding program. Plant Breed Rev 24: 109–151

- Fischer S., Melchinger A. E., Korzun V., Wilde P., Schmiedchen B., Möhring J., Piepho H. P., Dhillon B. S., Wurschum T., Reif J. C., (2010). Molecular marker assisted broadening of the Central European heterotic groups in rye with Eastern European germplasm. *Theor Appl Genet* 120:291–299
- Geiger H. H., (1985). Hybrid breeding in rye. Proceedings of the EUCARPIA Meeting of the Cereal Section on Rye. Svalöv, Sweden, 11–13 June 1985: 237–265.
- Hackauf B., Korzun V., Wortmann H., Wilde P., Wehling P. (2012). Development of conserved ortholog set markers linked to the restorer gene Rfp1 in rye. *Mol Breeding* 30:1507–1518
- Milczarski P., Hanek M., Tyrka M., Stojalowski S. (2016). The application of GBS markers for extending the dense genetic map of rye (*Secale cereale* L.) and the localization of the Rfc1 gene restoring male fertility in plants with the C source of sterility-inducing cytoplasm. *J Appl Genetics* 57:439–451
- Stojalowski S., Milczarski P., Hanek M., Bolibok-Brągoszewska H., Myśków B., Kilian A., Rakoczy-Trojanowska M. (2011). DArT markers tightly linked with the Rfc1 gene controlling restoration of male fertility in the CMS-C system in cultivated rye (*Secale cereale* L.). *J. Appl. Genet.* 52:313–318
- Stracke S., Schilling A. G., Forster J., Weiss C., Glass C., Miedaner T., Geiger H. H. (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: 1184–1190.

Poszukiwanie źródeł odporności owsa (*Avena sativa* L.) na nowy patogeniczny i mykotoksynotwórczy gatunek – *Fusarium langsethiae*

Searching for oat (*Avena sativa* L.) resistance to a new pathogenic and mycotoxigenic species - *Fusarium langsethiae*

Grzegorz Lemańczyk✉, Aleksander Łukanowski, Anna Batur-Cieśniewska

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. J. Śniadeckich w Bydgoszczy
✉ e-mail: grzegorz.lemanczyk@utp.edu.pl

Słowa kluczowe: *Fusarium langsethiae*, hodowla odpornościowa, owies, postęp hodowlany, real-time PCR, wrażliwość genotypów

Wstęp i cel prowadzonych badań

Wiechy owsa oraz kłosa innych zbóż są porażane przez różne gatunki *Fusarium*. W Polsce, jak i innych krajach Europy, są to najczęściej *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* i *F. avenaceum*. Ich szkodliwość polega nie tylko na zmniejszeniu ilości plonu ziarna, ale także na pogorszeniu jego jakości, zwłaszcza zanieczyszczeniu go mykotoksynami. W poprzednim dziesięcioleciu w Europie stwierdzono występowanie nowego gatunku tego rodzaju – *Fusarium langsethiae*. Początkowo opisywany był jako prószysta forma gatunku *F. poae*. W 2004 r. Torp i Nirenberg prószyste izolaty *F. poae* sklasyfikowali jako odrębny gatunek, któremu nadali nazwę *F. langsethiae*. W Polsce występowanie tego gatunku po raz pierwszy stwierdzono w 2006 r. w ziarnie pszenicy (Łukanowski i in. 2008), a jego obecność na owsie potwierdzona została dopiero w badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu. Na owsie, zarówno na wiekach jak i na ziarnie, nie obserwuje się wyraźnych objawów porażenia przez *F. langsethiae* dlatego identyfikacja obecności tego grzyba jest możliwa tylko w warunkach laboratoryjnych, w tym z wykorzystaniem techniki Real-Time PCR. W badaniach dotyczących odporności genotypów na porażenie przez *F. langsethiae* pomocny jest również test liściowy (Imathiu i in. 2009, 2013).

Głównym celem zadania było uzyskanie informacji o wrażliwości linii hodowlanych i genotypów owsa na izolaty *Fusarium langsethiae*

o zróżnicowanej wirulencji oraz wyodrębnienie genotypów owsa cechujących się najmniejszą wrażliwością na tego patogena. Założony cel zadania został osiągnięty. Przebadano zaplanowaną liczbę prób. Wprawdzie w trakcie badań nie wyodrębniono genotypów całkowicie odpornych na *F. langsethiae*, niemniej jednak wytypowano genotypy mniej wrażliwe na porażenie. Ponadto przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR ustalono znaczenie *F. langsethiae* dla owsa uprawianego w Polsce, oraz określono zanieczyszczanie prób ziarna pochodzących z pól produkcyjnych toksynami T-2 i HT-2.

Materialy i Metody

W ramach badań prowadzono trzy tematy badawcze:

- Określenie znaczenia *F. langsethiae* w Polsce na podstawie przeprowadzonego monitoringu zasiedlenia zebranego ziarna owsa, przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR oraz zanieczyszczenia ziarna mykotoksynami
- Analiza odporności owsa na porażenie przez *F. langsethiae* prowadzona w formie testu liściowego
- Analiza odporności owsa na *F. langsethiae* na podstawie jego analizy ilościowej w ziarnie techniką Real-Time PCR

Przez pierwsze trzy lata projektu prowadzono badania dotyczące określenia znaczenia *F. langsethiae* w Polsce na podstawie przeprowadzonego monitoringu zasiedlenia zebranego ziarna owsa



przy zastosowaniu techniki Real-Time PCR. Łącznie analizom tym poddano 116 prób ziarna owsa zebranego w latach 2013–2016 pochodzących z pól produkcyjnych z terenu całej Polski. Dla wybranych 33 prób ziarna owsa pochodzących z pól produkcyjnych wykonano analizę dotyczącą jego zanieczyszczenia toksynami T-2 i HT-2, co zostało zrealizowane metodą HPLC-MS/MS.

W latach 2014–2018 prowadzono badania odporności owsa na *F. langsethiae* na podstawie analizy ilościowej w ziarnie techniką Real-Time PCR. W badaniach tych uwzględniono 100 rodów hodowlanych, 45 odmian i 3 gatunki. Materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą odmian owsa, tj. Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR. Ziarno genotypów owsa pochodziło ze ścisłych doświadczeń poletkowych zlokalizowanych w Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach. Ponadto materiał badawczy pozyskano z doświadczeń prowadzonych przez Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych w ramach Porejestrowego Doświadczalnictwa Odmianowego, z różnych rejonów Polski, a w dwóch pierwszych latach także od Przedsiębiorstwa Nasiennego „ROLNAS” Sp. z o.o. z Minikowa.

W pierwszych trzech latach badań (2014–2016) w ziarnie niektórych genotypów owsa uprawianego w warunkach ścisłych doświadczeń polowych z inokulacją naturalną nie stwierdzono obecności DNA *F. langsethiae* i trudno jednoznacznie stwierdzić czy wynikało to z odporności danego genotypu czy też małej presji patogena. Z tego względu w dwóch ostatnich latach projektu (2017, 2018) rozszerzono zakres badań o testowanie wrażliwości genotypów owsa w warunkach polowych prowokacyjnych, z zastosowaniem sztucznej inokulacji zarodnikami *F. langsethiae*. Badania te przeprowadzono w Stacji Badawczej Mochełek należącej do Uniwersytetu Technologiczno-Przyrodniczego. Łącznie w doświadczeniu tym przebadano 30 genotypów owsa na porażenie przez *F. langsethiae* w wariacie ze sztuczną inokulacją i dla porównania bez sztucznej inokulacji (kombinacje kontrolne).

Wrażliwość genotypów owsa na porażenie przez *F. langsethiae* badano również w formie testu liściowego. Badania te obejmowały 190 genotypów owsa, w tym 6 gatunków owsa. Oprócz owsa zwyczajnego (*Avena sativa*), zarówno o ziarnie oplewionym jak i nieoplewionym, przebadano również *Avena strigosa* (owies szorstki), *Avena fatua* (owies głuchy), *Avena magna*, *Avena insularis* i *Avena*

sterilis. Na przebadane genotypy owsa składało się również 48 zarejestrowanych odmian uprawnych owsa, 135 rodów hodowlanych oraz 2 genotypy formy ozimej owsa zwyczajnego, w tym 1 o ziarnie żółtym i 1 o ziarnie ciemnym. Materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą owsa, tj. Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o., Centralnego Ośrodka Badania Odmian Roślin Uprawnych oraz Przedsiębiorstwa Nasiennego „ROLNAS” Sp. z o.o. Do sztucznej inokulacji liści owsa wykorzystano izolaty *F. langsethiae* różniące się wirulencją pozyskane z ziarna owsa (FL 11H4, FL 292P5, FL 298P5, FL 303P5) i ziarna pszenicy (FL 0609, FL 0809, FL 9P1–7).

Opis wyników

Wykorzystanie techniki Real-Time PCR umożliwiło określenie ilości DNA badanego grzyba w ziarnie nawet przy bardzo małych jego ilościach. Największe stężenie DNA *F. langsethiae* dla wartości średnich stwierdzono w ziarnie owsa pochodzącego z 2014 r., następnie z 2013 r., 2016 r. i 2015 r. Na zasiedlenie ziarna owsa przez grzyba miała również wpływ lokalizacja. Najwięcej DNA *F. langsethiae* w ziarnie owsa zebranego w 2013 r. stwierdzono w próbach pochodzących z Biskupiec, Strzelec, z ziarna zebranego w 2014 r. – z Samokłęk Dużych i Sławianowa, z 2015 r. – z miejscowości Dobre i Bieganowo, a z 2016 r. – miejscowości Legięć, Strzelce, Białogard i Dukla. Zazwyczaj więcej DNA tego patogena odnotowano w próbach ziarna pochodzącego z północnych rejonów Polski, zwłaszcza województwa warmińsko-mazurskiego. Należy również zaznaczyć, iż nie we wszystkich próbach wykryto obecność *F. langsethiae*. DNA tego patogena wykryto w 48,3% wszystkich analizowanych próbach. Ogólnie można stwierdzić, że w Polsce *F. langsethiae* jak dotąd nie stanowił dużego zagrożenia w uprawach owsa. Jednak takie zagrożenie występowało lokalnie. Dlatego nie można go lekceważyć, zwłaszcza iż lata objęte projektem cechowały się wyższymi temperaturami od średnich z wielolecia. Jest to bardzo istotne, gdyż według literatury patogenowi temu sprzyjają niższe temperatury, a lokalnie stanowił on duże zagrożenie, co wykazano za pomocą techniki Real-Time PCR wskazującej na wyższe stężenia DNA tego grzyba w próbach ziarna.

W badaniach potwierdzono przydatność techniki Real-Time PCR w monitorowaniu występowania *F. langsethiae* w ziarnie owsa uprawianego w Polsce, która charakteryzuje się dalece wyższą czułością w detekcji tego grzyba w porównaniu

z metodą tradycyjną polegającą na izolacji kultur grzybów na sztucznych podłożach mikrobiologicznych. W wyniku przeprowadzonej izolacji grzybów na pożywce PDA, obecność *F. langsethiae* średnio stwierdzono na 0,07% analizowanych ziarniakach owsa. Znacznie więcej wyodrębniono izolatów innych gatunków grzybów, które nie były głównym przedmiotem badań, jednak ich występowanie mogło znacząco wpływać na liczbę uzyskanych izolatów *F. langsethiae*, który jest przez nie łatwo zarastany. W próbach ziarna owsa dużo stwierdzono *Fusarium poae*. Znacznie rzadziej izolowano *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, *F. tricinctum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* i *F. crookwellense*. Badane próby ziarna owsa najczęściej było jednak zasiedlone przez gatunki saprotroficzne, przede wszystkim *Alternaria alternata*, rzadziej *Epicoccum nigrum* i *Gonatotryps simplex*.

We wszystkich przebadanych próbach ziarna owsa pochodzącego z lat 2013, 2014 i 2016 stwierdzono obecność toksyn T-2 i HT-2, natomiast w ziarnie pochodzącym z 2015 r. toksyny te stwierdzono w 10 spośród 11 prób. Najwyższe zanieczyszczenie ziarna owsa toksyną T-2 i HT-2 odnotowano w 2013 r. Najmniej tych metabolitów było w 2015 r. Bardziej zanieczyszczone toksynami T-2 i HT-2 było ziarno owsa oplewionego niż nieoplewionego. Silniejszemu skażeniu badanymi mykotoksynami uległo ziarno owsa z północnej Polski i rejonów podgórskich. W 2013 r. najbardziej zanieczyszczone ziarno toksyną T-2 pochodziło z miejscowości Biskupiec, a toksyną HT-2 ze Sławki Wielkiej oraz Strzelec. W 2014 r. toksyny T-2 było w ziarnie z Chrzastowa a toksyny HT-2 w ziarnie z Łosina. W 2015 r. najwięcej toksyny T-2 i HT-2 było w ziarnie pochodzącym z Kończewa, a w 2016 r. – z Dukli. Stwierdzono zależność pomiędzy zawartością w ziarnie owsa DNA grzyba *F. langsethiae* a zanieczyszczeniem go toksyną T-2 i toksyną HT-2. Próby ziarna owsa zawierające więcej tego grzyba były również silniej zanieczyszczone tymi toksynami. Przeprowadzone analizy wskazują na fakt, iż nawet przy słabym zasiedleniu ziarna przez *F. langsethiae* może dojść do znacznego zanieczyszczenia ziarna owsa toksyną T-2 wytwarzaną przez ten gatunek grzyba.

Na podstawie przeprowadzonej analizy ilościowej DNA *F. langsethiae* w ziarnie owsa techniką Real-Time PCR stwierdzono zróżnicowanie dotyczące wrażliwości przebadanych rodów hodowlanych. W ziarnie znacznej części rodów owsa nie stwierdzono obecności DNA grzyba. W 2014 r. obecności grzyba nie stwierdzono w ziarnie

następujących rodów hodowlanych: DC 6011–8, DC 07116–11/2, DC 07136–10/2/4, DC 07004a/13/3, DC 07005a/6/2, DC 07030a/11/2, DC 07051a/10/2, DC 08121/1/4, DC 9005/4, DC 9012/1, DC 9013/6, DC 09024/8, DC 09026/2, DC 9031/2, DC 9041/7, DC 9043/6, DC 9053/4, DC 9055/4, DC 9076/2, DC 9099/3, DC 9105/9, DC 9107/4; w 2015 r. ziarnie z rodów: DC 06011–8, DC 07030a/11/2, DC 07129–4/4/2, DC 08114/3/2, DC 09055/4, DC 09124/2, DC 09130/2, DC 10007/1/2, DC 10056/8/2, DC 11138/1, DC 11138/2, POB 1428/11, POB 432/11, POB 961–1248/11, STH 5.13); w 2016 r. w ziarnie rodów: DC 16–1, DC 16–4, DC 16–7, DC 16–11, DC 16–16, POB 5378/16, POB 5502/16, POB 6438/16; w 2017 r. w ziarnie rodu POB 6483/13. W 2018 r. patogen ten występował w ziarnie wszystkich rodów.

Badając występowanie *F. langsethiae* w ziarnie odmian owsa pozyskanych z doświadczeń poletkowych, w warunkach inokulacji naturalnej, stwierdzono zróżnicowaną jego ilość. W niektórych odmianach patogen ten nie występował, jednak było to zróżnicowane w poszczególnych latach nadeń. W 2014 r. DNA *F. langsethiae* nie stwierdzono w ziarnie odmian: Berdysz, Breton, Nagus; w 2015 r. – w ziarnie odmian Amant, Bingo, Nagus, Nawigator, Paskal; w 2016 r. – Amant, Arden, Haker, Harnaś, Nagus, Romulus, Siwek, Zuch; w 2017 r. – Nawigator. W 2018 r. obecność grzyba stwierdzono w ziarnie wszystkich badanych odmian a najmniej było go w przypadku odmiany Monsun. Ze względu na brak obecności lub małą ilość DNA *F. langsethiae* w ziarnie powyższych genotypów warto je uwzględnić w dalszym procesie hodowli odpornościowej owsa przeciwko grzybom rodzaju *Fusarium*. Należy również dodać, iż spośród wszystkich przebadanych genotypów owsa większe stężenie DNA grzyba stwierdzono w ziarnie owsa zwyczajnego o ziarnie oplewionym niż ziarnie nieoplewionym. Ilość grzyba w ziarnie poszczególnych gatunków była zróżnicowana w latach badań i trudno jednoznacznie wskazać gatunek o mniejszej wrażliwości na porażenie.

Wykonanie sztucznej inokulacji wiech zarodnikami *F. langsethiae* przyczyniło się do znacznego wzrostu ilości DNA tego grzyba w ziarnie testowanych genotypów owsa, w porównaniu z kombinacjami bez sztucznej inokulacji. To sprawiło, iż po zastosowaniu sztucznej inokulacji można uzyskać wyniki miarodajne, precyzyjne, a tym samym lepiej można zweryfikować podatność genotypów na porażenie przez *F. langsethiae*. Po zastosowaniu sztucznej inokulacji DNA grzyba stwierdzono w 80% prób ziarna a przy braku

inokulacji – tylko 16,7% genotypów. W badaniach tych nie obserwowano większego zróżnicowania pomiędzy testowanymi gatunkami, tj. owsem zwyczajnym, owsem szorstkim i owsem głuchym. Odnotowano natomiast wyraźne zróżnicowanie pomiędzy rodami hodowlanymi. Ze względu na podatność poszczególnych rodów, do dalszej hodowli szczególnie polecane mogą być takie rody hodowlane jak: DC10067/10/2/4, DC 17–2, POB 5547/16, POB 5770/15, STH 11215 i STH 11315, w ziarnie których nie stwierdzono obecności DNA *F. langsethiae*. Pomimo tego, iż uważa się go za grzyba, dla którego sztuczna inokulacja jest mało efektywna, to i tak w badaniach wrażliwości genotypów zalecane jest przeprowadzenie w okresie kwitnienia owsa inokulacji jego wiech.

W teście liściowym wszystkie przebadane genotypy owsa były porażane przez *F. langsethiae* i stwierdzono zróżnicowanie w ich podatności na tego patogena. Długość nekrozy obserwowana dla poszczególnych genotypów była jednak zróżnicowana w zależności od gatunku owsa, odmiany, rodu hodowlanego i izolatu *F. langsethiae* zastosowanego do testowania wrażliwości. Spośród przebadanych gatunków owsa najdłuższą średnią długość strefy z nekrozą na liściach zanotowano dla formy nieoplewionej *A. sativa*, najkrótszą dla *A. sterilis*. Wśród przebadanych rodów hodowlanych odnotowano różnice w ich podatności na *F. langsethiae* zarówno dla wartości średnich, jak również dla zastosowanych izolatów patogena. W 2014 r. najmniej wrażliwymi rodami hodowlanymi były: DC 07030a/11/2, DC 08114/3/2 i DC 9055/4; w 2015 r. – DC 08114/3/2; w 2016 r. – POB 6438/16; w 2017 r. – DC 17–1 i POB 5224/15; w 2018 r. – STH 8.25 i POB 3938/14. Zaobserwowano jednak odmienną wrażliwość rodów na poszczególne izolaty *F. langsethiae*. Zróżnicowanie w podatności na porażenie zaobserwowano również dla odmian owsa. W 2015 r. najmniej wrażliwymi z badanych odmian owsa były: Bingo i Amant; w 2016 r. – Nawigator; w 2017 r. – Krezus; w 2018 r. – Bingo. Natomiast w 2014 r. nie odnotowano wyraźnego zróżnicowania w podatności odmian owsa na porażenie przez *F. langsethiae*.

Wnioski z prowadzonych badań

1. W warunkach klimatycznych Polski *Fusarium langsethiae* w trakcie prowadzonych badań nie stanowił dużego zagrożenia w uprawach owsa. Lokalnie stwierdzono jednak znaczące nasilenie tego patogena w uprawach owsa. Zazwyczaj więcej DNA tego grzyba odnotowano w próbach ziarna pochodzących z północnej

Polski i rejonów podgórskich.

2. Na pożywce mikrobiologicznej PDA z ziarna owsa najczęściej izolowano *Alternaria alternata*. Z grzybów rodzaju *Fusarium* dominował *F. poae*, natomiast *F. langsethiae* tradycyjnymi metodami izolowano sporadycznie.
3. Zastosowanie techniki Real-Time PCR znacznie podniosło wykrywalność *F. langsethiae* w ziarnie owsa. Duża czułość analizy Real-Time PCR okazała się przydatna w monitoringu *F. langsethiae* jak i określaniu podatności owsa na porażenie przez tego patogena. Wykonanie izolacji grzybów na sztucznych pożywkach mikrobiologicznych jest niewystarczające w badaniach nad tym patogenem ze względu na zbyt niską czułość tej metody.
4. Większość prób ziarna owsa pochodzących z pól produkcyjnych była zanieczyszczona toksynami T-2 i HT-2. Poziom zanieczyszczenia był zróżnicowany, ale nie stanowiący jeszcze poważnego zagrożenia.
5. Stwierdzono istotną zależność pomiędzy zawartością w ziarnie DNA *F. langsethiae* a jego zanieczyszczeniem toksyną T-2.
6. Izolaty *F. langsethiae* cechowały się zróżnicowaną wirulencją wobec badanych liści owsa. Nie odnotowano większego zróżnicowania w wirulencji między izolatami pozyskanymi z owsa a pochodzącymi z pszenicy ozimej.
7. Wszystkie przebadane gatunki owsa były porażane przez *F. langsethiae*. Większą długość nekroz charakterystycznych dla porażenia *F. langsethiae* stwierdzono na liściach owsa zwyczajnego nieoplewionego, a najmniejszą na liściach *Avena sterilis*.
8. W teście liściowym odnotowano zróżnicowanie w podatności analizowanych rodów hodowlanych owsa na *F. langsethiae*. Najmniejszą wrażliwością odznaczały się rody hodowlane DC 07030a/11/2, DC 08114/3/2, DC 9055/4, DC 08114/3/2, POB 6438/16, DC 17–1, POB 5224/15, STH 8.25, POB 3938/14. Spośród odmian najmniej wrażliwymi były odmiany Nawigator, Krezus i Bingo.
9. W testowaniu wrażliwości genotypów owsa na *F. langsethiae* w warunkach polowych zalecane jest przeprowadzenie w okresie kwitnienia owsa inokulacji jego wiech, która znacznie przyczyniła się do wzrostu stężenia DNA patogena w ziarnie owsa, a tym samym do miarodajności uzyskanych wyników.
10. Nie stwierdzono istnienia genotypów owsa całkowicie odpornych na porażenie przez *F. langsethiae*.

11. Genotypy owsa, dla których w zebranych ziarnie nie stwierdzono obecności *F. langsethiae* mogą stanowić podstawę do uzyskania odmian o istotnie ulepszonej odporności na tego patogena.

Osiągnięcia projektu

Wyniki powyższych badań mogą być użyteczne dla firm zajmujących się hodowlą odpornościową owsa. Wprawdzie nie udało się wyodrębnić genotypów całkowicie odpornych, ale wytypowano rody hodowlane, odmiany i gatunki owsa wykazujące cechy zmniejszonej podatności na porażenie przez *F. langsethiae*. Badania te dostarczają również informacji hodowcom, które metody najlepiej użyć i w jakich warunkach najlepiej testować wrażliwość genotypów, niekoniecznie tylko owsa, na porażenie przez *F. langsethiae*. Ponadto badania te dostarczyły informacji o znaczeniu grzyba *F. langsethiae* dla owsa uprawianego w Polsce, w warunkach produkcyjnych, jak i poletkach doświadczalnych. Wskazują również na zagrożenie skażeniem ziarna owsa toksynami T-2 i HT-2, wytworzonymi w ziarnie w następstwie porażenia *F. langsethiae* w warunkach naturalnych. Rezultaty badań mogą być również wykorzystane przez producentów owsa. W rejonach o dużym zagrożeniem ze strony *F. langsethiae* pozwalają na wybór odpowiedniej odmiany do uprawy, by uniknąć porażenia, a tym samym skażenia ziarna mykotoksynami.

Wykaz publikacji wyników

- Konferencja naukowa „Dziś i jutro fitopatologii”, 13–15.09.2017 r., UWM Olsztyn:
- Referat „Zanieczyszczenie mykotoksynami ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych zlokalizowanych w różnych rejonach Polski oraz zasiedlenie ich przez grzyby z uwzględnieniem molekularnej detekcji *Fusarium langsethiae* techniką Real Time PCR”.
 - Poster „Zasiedlenie ziarna wybranych odmian owsa przez grzyby z uwzględnieniem molekularnej detekcji *Fusarium langsethiae* techniką Real Time PCR”

Publikacje

- Lemańczyk G., Łukanowski A., Batur-Cieśniewska A. 2019. Poszukiwanie źródeł odporności owsa (*Avena sativa* L.)

na nowy patogeniczny i mykotoksynotwórczy gatunek – *Fusarium langsethiae*. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin 286: 165–168.

Doniesienia konferencyjne

- Lemańczyk G., Łukanowski A., Batur-Cieśniewska A., Twarużek M. 2017. Zanieczyszczenie mykotoksynami ziarna owsa pochodzącego z pól produkcyjnych zlokalizowanych w różnych rejonach Polski oraz zasiedlenie ich przez grzyby z uwzględnieniem molekularnej detekcji *Fusarium langsethiae* techniką Real Time PCR. „Dziś i jutro fitopatologii”, 13–15 września 2017 r., UWM Olsztyn: 53–54.
- Łukanowski A., Lemańczyk G., Batur-Cieśniewska A. 2017. Zasiedlenie ziarna wybranych odmian owsa przez grzyby z uwzględnieniem molekularnej detekcji *Fusarium langsethiae* techniką Real Time PCR. „Dziś i jutro fitopatologii”, 13–15 września 2017 r., UWM Olsztyn: 126–127.

Publikacja popularnonaukowa

- Lemańczyk G. 2018. *Fusarium* niejedno ma imię. Farmer 6: 58–61.

Wyniki badań z poszczególnych lat realizacji zadania zostały umieszczone na stronie internetowej Uczelni, pod adresem: http://wr.utp.edu.pl/wspolpraca_gospodarka/postep_biologiczny.html

Literatura

- Imathiu S. M., Edwards S. G., Ray R. V., Back M. A. (2013). *Fusarium langsethiae* – a HT-2 and T-2 Toxins Producer that Needs More Attention. J. Phytopathol 161: 1–10.
- Imathiu S. M., Ray R. V., Back M., Hare M. C., Edwards S. G. (2009). *Fusarium langsethiae* pathogenicity and aggressiveness towards oats and wheat in wounded and unwounded in vitro detached leaf assays. Eur. J. Plant Pathol. 124: 117–126.
- Łukanowski A., Lenc L., Sadowski C. (2008). First report on the occurrence of *Fusarium langsethiae* isolated from wheat kernels in Poland. Plant Dis. 92 (3): 488.
- Torp M., Langseth W. (1999). Production of T - 2 toxin by *Fusarium* resembling *Fusarium poae*. Mycopathologia 147: 89–96.
- Torp M., Nirenberg H. I. (2004). *Fusarium langsethiae* sp. nov. on cereals in Europe. Int. J. Food Microbiol. 95: 247–256.

Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego

Linkage and association mapping of oat

Edyta Paczos-Grzęda¹✉, Sylwia Sowa¹, Aneta Koroluk¹, Joanna Toporowska¹, Ewelina Marek¹, Piotr Bednarek²

¹Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

²Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

Słowa kluczowe: mieszańce międzygatunkowe, mieszańce międzyodmianowe, mapowanie sprzężeniowe, mapowanie asocjacyjne, identyfikacja QTL

W realizowanym projekcie wyprowadzono, fenotypowano i genotypowano międzyodmianowe populacje mieszańcowe z różnymi genami karłowatości oraz populacje międzygatunkowe *A. sativa* z *A. sterilis* i *A. fatua*. Przeprowadzono również mapowanie asocjacyjne panelu odmian i linii hodowlanych owsa zwyczajnego. Celem prowadzonych badań było:

1. Uzyskanie zaawansowanych międzyodmianowych i międzygatunkowych rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL).
2. Precyzyjne fenotypowanie i genotypowanie za pomocą markerów DNA międzyodmianowych i międzygatunkowych populacji mapujących.
3. Opracowanie map genetycznych bazujących na liniach rekombinacyjnych wyprowadzonych w oparciu o krzyżowania biparentalne.
4. Lokalizacja na mapach genetycznych cech ilościowych i jakościowych oraz identyfikacja markerów genetycznych sprzężonych z tymi cechami.
5. Przeprowadzenie mapowania asocjacyjnego (GWAS – genome wide association studies) na panelu polskich odmian.

Materiały i Metody

W oparciu o materiały polskie i zagraniczne wyprowadzono międzyodmianowe populacje mieszańcowe z różnymi genami karłowatości oraz populacje międzygatunkowe z *A. sterilis* i *A. fatua*. W wyniku rozmnożeń prowadzonych metodą SSD uzyskano 9 zaawansowanych linii RIL. W celu uzyskania map genetycznych populacje poddano genotypowaniu metodą DArTseq. Identyfikację QTLi przeprowadzono na podstawie

fenotypowania wybranych cech w eksperymentach polowych.

Przedmiotem badań w mapowaniu asocjacyjnym było 600 polskich i zagranicznych odmian i linii owsa zwyczajnego. Ilość tę zredukowano do 370 po przeprowadzeniu fenotypowania i poddano genotypowaniu metodą DArTseq. Ocena fenotypów została wykonana w oparciu o eksperymenty polowe. Mapowanie asocjacyjne zostało wykonane z zastosowaniem metod GLM (general linear model) oraz MLM (multiple linear model) przy wykorzystaniu oprogramowania TASSEL.

Wyniki

Uzyskanie zaawansowanych międzyodmianowych i międzygatunkowych rekombinacyjnych linii wsobnych (RIL)

W latach 2014–2019 prowadzono krzyżowania mające na celu uzyskanie mieszańców międzyodmianowych i międzygatunkowych, a następnie populacji mapujących. Otrzymano w sumie 1097 mieszańcowych ziarniaków F_1 reprezentujących 163 kombinacje krzyżówkowe. Spośród uzyskanych mieszańców szczegółowym analizom fenotypowym poddano 27 populacji pokolenia F_2 oraz F_3 . Spośród nich wybrano 9, które rozmnażano metodą pojedynczych ziarniaków (SSD), aż do uzyskania linii pokolenia F_8 . W pokoleniu F_2 populacje te reprezentowane były przez 2958 roślin. Do pokolenia F_8 doprowadzono 1742 linie.

Precyzyjne fenotypowanie i genotypowanie za pomocą markerów DNA międzyodmianowych i międzygatunkowych populacji mapujących



W latach 2014–2020 prowadzono fenotypowanie mieszańców międzyodmianowych i międzygatunkowych pokoleń F_1 i F_2 oraz linii F_3 i F_8 . Na poziomie F_1 sfenotypowano 108 kombinacji, zaś na F_2 ok. 3000 roślin reprezentujących 26 kombinacji. Linii F_3 sfenotypowano 2488, zaś rekombinacyjnych linii wsobnych, reprezentujących zarówno mieszańce międzyodmianowe, jak i międzygatunkowe – 1163. Każdą linię RIL reprezentowało 10 roślin, co oznacza, że oceniono fenotyp ok. 11,5 tys. roślin w pokoleniu F_8 .

Genotypowaniu metodą DArTseq poddano w sumie 1591 roślin lub linii, z czego 392 stanowiły rośliny F_2 trzech populacji (326, 337 i 822), zaś 829 to rekombinacyjne linie wsobne reprezentujące 2 populacje międzygatunkowe i 4 populacje międzyodmianowe z genami *Dw6* i *Dw7*.

Genotypowanie metodą DARTseq przeprowadzono również dla 370 odmian i linii panelu asocjacyjnego, wybranych na podstawie eksperymentów polowych i fenotypowania prowadzonych w latach 2014–2016 oraz 2019.

Opracowanie map genetycznych bazujących na liniach rekombinacyjnych wyprowadzonych w oparciu o krzyżowania biparentalne

Na podstawie danych genotypowych uzyskanych metodą DArTseq dla dwóch populacji F_2 326 i 337, segregujących pod względem genu karłowatości *Dw7* oraz sześciu populacji RIL (52, 56, 101, 310, 337, 366) w latach 2014 – 2020 opracowano mapy genetyczne. Populacje E52 i E56 są efektem krzyżowania międzygatunkowego *A. sterilis* i *A. fatua* z *A. sativa*. Populacje międzyodmianowe E101 i E310 segregują pod względem genu karłowatości *Dw6*, zaś E337 oraz E366 – *Dw7*.

Lokalizacja na mapach genetycznych cech ilościowych i jakościowych oraz identyfikacja markerów genetycznych sprzężonych z tymi cechami

W latach 2014–2020 prowadzono genotypowanie populacji mapujących metodą DArTseq poszukując silnie sprzężonych markerów, których segregacja odpowiadała określonym fenotypom. Jednocześnie wykorzystując metodę BSA (Bulked Segregant Analysis), na pulach DNA reprezentujących przeciwstawne fenotypy poszukiwano markerów cech prowadząc genotypowanie metodami RAPD i SRAP. Celem obu tych podejść było opracowanie markerów silnie sprzężonych z badanymi genami, między innymi *Dw6* i *Dw7*.

Przeprowadzenie mapowania asocjacyjnego (GWAS – genome wide association studies)

na panelu polskich odmian

Fenotypowaniu poddano 635 odmian i linii. Ocenę prowadzono w dwóch lokalizacjach, w jednym lub dwóch powtórzeniach w roku. Genotypowanie przeprowadzono dla 370 genotypów. Wybrano te, dla których dane z fenotypowania były kompletne. Dane genotypowe uzyskane metodą DArTseq poddano wielokrotnemu filtrowaniu i analizom uzyskując 39747 markerów, spośród których 26546 zostało zmapowanych do genomu owsa. Na podstawie analizy GWAS zidentyfikowano w sumie 80 markerów zasocjowanych z badanymi cechami.

Wnioski

1. Do pokolenia F_8 doprowadzono 3 populacje międzygatunkowe, których komponentami krzyżowania były *A. fatua* i *A. sterilis*. Największa z populacji liczy 347 linii. Spośród populacji międzyodmianowych populacjami o największej liczebności są E101 i E310 z segregującym genem *Dw6*. Sześć z dziewięciu populacji zostało poddanych mapowaniu genetycznemu.
2. Fenotypowaniu w różnych pokoleniach, poddano ponad 17 tys. roślin mieszańcowych. Genotypowaniu metodą DArTseq poddano 1221 mieszańców pokoleń F_2 i F_8 . Fenotypowaniu poddano 635 odmian i linii, z których do panelu asocjacyjnego wybrano i poddano genotypowaniu metodą DArTseq 370.
3. Opracowano 2 mapy genetyczne w oparciu o populacje E326 i E337 oraz 6 map genetycznych dla populacji rekombinacyjnych linii wsobnych E52, E56, E101, E310, E337 i E366. W porównaniu z mapami uzyskanymi dla populacji F_2 , mapy opracowane dla populacji RIL były krótsze, zawierały kilkukrotnie więcej markerów, umożliwiały wyodrębnienie mniejszej liczby LG, a zagęszczenie markerów było dużo większe.
4. Opracowano liczne markery dla genów *Dw6* i *Dw7*, które pozwolą na zrozumienie mechanizmu karłowatości warunkowanej tymi genami. Z uwagi na to, że żaden z tych genów nie może zostać bezpośrednio wykorzystany w hodowli, a dotychczas nie zidentyfikowano innego genu, który redukowałby długość słomy w owsie nie wpływając negatywnie na inne cechy, poznanie mechanizmów działania tych genów oraz ich regulacji pozostaje jedyną perspektywą.
5. Zidentyfikowane markery poddano próbie

konwersji na markery specyficzne. Wydajność konwersji była niska, a z uwagi na brak korelacji marker – cecha, markery te nie mogą być wykorzystane w selekcji wspomagananej markerami (MAS).

Osiągnięcia projektu

1. Wprowadzono w oparciu o polskie odmiany populacje mapujące RIL: międzyodmianowe (*A. sativa* × *A. sativa*) oraz międzygatunkowe (*A. sterilis* × *A. sativa* i *A. fatua* × *A. sativa*). Populacje te mogą być wykorzystywane do dalszych badań genetycznych oraz w pracach hodowlanych.
2. Uzyskano liczne materiały mieszańcowe, z których część wykorzystano bezpośrednio w projekcie, inne zostaną wykorzystane w przyszłych badaniach genetycznych, a pozostałe zostały przekazane lub zostaną przekazane hodowcom jako materiały wyjściowe.
3. W ramach projektu gromadzono liczne materiały roślinne o dużym potencjale badawczym i hodowlanym, które w razie potrzeby udostępniano.
4. Opracowano 6 map genetycznych w oparciu o rekombinacyjne linie wsobne, które mogą być wykorzystywane w dalszych pracach nad owsem.
5. Bazując na polimorfizmie markerów RAPD, SRAP oraz DARtseq opracowano markery molekularne dla genów karłowatości *Dw6* i *Dw7*.
6. Prowadząc obserwacje licznych materiałów roślinnych do krzyżowań przeznaczano te, charakteryzujące się zredukowaną długością słomy. Zidentyfikowano w ten sposób kilka potencjalnych źródeł karłowatości.
7. Wśród analizowanych mieszańców znaleziono formy charakteryzujące się wydłużonym dokłosem przy jednoczesnym skróceniu słomy warunkowanym genem *Dw6*. Wydłużenie dokłosa osiągnięto poprzez krzyżowanie z mieszańcami międzygatunkowymi z *A. sterilis*.
8. Wytypowano geny odpowiedzialne za syntezę długołańcuchowych kwasów tłuszczowych jako odpowiedzialne za osypywanie dzikich form owsa. Określono regiony genomu owsa związane z dzikim fenotypem.
9. Wytypowano markery asocjowane z istotnymi cechami hodowlanymi owsa. Markery te mogą zostać wykorzystane w hodowli wspomagananej markerami.
10. Dwie międzygatunkowe populacje mapujące

A. sterilis × *A. sativa* i *A. fatua* × *A. sativa* są wykorzystywane w projekcie finansowanym przez BBRSC: Oat domestication - understanding the origin of a European cereal. BBSRC Biotechnology and Biological Sciences Research Council, Wielka Brytania (BB/S008195/1).

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- Paczos-Grzęda E., Ostrowska A., Koroluk A., Róg S., Bednarek P.T. 2014 Identification of potential markers for dwarfing *Dw6* gene from oat. W: Genetics and genomics in improving plants: from model plant to new variety: III National Conference, Poznań, 5–7 November 2014, s. 88.
- Paczos-Grzęda E., Bednarek P.T. 2014. Association mapping in oats. W: Genetics and genomics in improving plants: from model plant to new variety: III National Conference, Poznań, 5–7 November 2014, s. 87.
- Paczos-Grzęda E., Ostrowska A., Koroluk A., Róg S., Chrzęstek M., Bednarek P.T., Kowalczyk K. 2015 Putative markers towards *Dw6* dwarfing gene in oats. W: EWAC – The European Cereals Genetics Co-operative: EUCARPIA Cereals Section: EWAC 2015 International Conference, Lublin, Poland, 24–29 May 2015 s. 44.
- Paczos-Grzęda E., Ostrowska A., Koroluk A., Róg S., Chrzęstek M., Bednarek P.T. 2015 Poszukiwanie uniwersalnych markerów dla genu *Dw6* w owsie. W: Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych: XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, 2–6 lutego 2015 r., Zakopane, s. 208.
- Paczos-Grzęda E., Róg S., Ostrowska A., Bednarek P.T. 2015 DARtseq markers towards *Dw6* dwarfing gene in oats. W: Oats 2020, 23–25 listopada 2015 r., Solihull, Birmingham, Wielka Brytania. s. 67.
- Paczos-Grzęda E., Ostrowska A., Sowa S. 2016. Identyfikacja markerów molekularnych dla genu *Dw7* warunkującego karłowatość owsa. W: Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin: Konferencja Naukowa z okazji 60-lecia Katedry Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin na Wydziale Kształtowania Środowiska i Rolnictwa Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Międzyzdroje, 8–10 czerwca 2016 s. 58.
- Paczos-Grzęda E., Sowa S., Ostrowska A., Bednarek P.T. 2016. DARtseq markers towards *Dw7* dwarfing gene in oats. W: The 10th International Oat Conference 11–15 July 2016, St. Petersburg, Russia: Innovation for Food and Health, s. 141–142.
- Paczos-Grzęda E., Bisaga, M., Langdon, T., Tinker N. 2017. Fine Mapping of the *Dw7* Dwarfing Gene in Oat. Plant and Animal Genome XXV Conference, January 14–18,

- 2017, San Diego, California. P0915. <https://pag.confex.com/pag/xxv/meetingapp.cgi/Paper/25966>
- Bisaga, M., Griffiths, I., Vickerstaff, R., Paczos-Grzęda, E., Abugalieva, A., Dumlupinar, Z., Huang, Y-F, Giorgi, D., Lucretti, S., Langdon, T. 2017. Genomics tools for oat breeding. 4th International Scientific Conference „Plant Genetics, Genomics, Bioinformatics And Biotechnology” Kazakhstan, Almaty, May 29 – June 2, 2017.
- Paczos-Grzęda E., Bednarek P.T. 2018. Mapowanie asocjacyjne wysokości roślin owsa. W: Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania i perspektywy: Ogólnopolska Konferencja Naukowa. Streszczenia. Lublin, 2018 s. 43.
- Paczos-Grzęda E., Sowa S., Bednarek P., Koroluk A., Toporowska J., Marek E., Jędra K., Sadurski J. 2019. Identyfikacja markerów zasocjowanych z MTZw owsie zwyczajnym. IV Ogólnopolska Konferencja Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany 5–7.11.2019, Poznań, str. 63.
- Sowa S., Paczos-Grzęda E., Bednarek P., Koroluk A., Toporowska J., Marek E., Jędra K. Identyfikacja QTL dla wysokości w populacji RIL *Avena fatua* L. × *Avena sativa* L. ‘Sam’ IV Ogólnopolska Konferencja Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany, 5–7.11.2019, Poznań, str. 67.
- ### Publikacje
- Tinker N.A., Jackson E.W., Snyder S., Tiede T., Azar C., Babiker E., Beuch S., Björnstad A., Ceplitis A., Chao S., Cowan S, Dumlupinar Z., Esvelt Klos K., Fetch T., Harrison S., Howarth C., Hu G., Huang Y.F., Isidro Sanchez J., Jellen R., Kolb F., Langdon T., Ma B., Maughan J., McCartney C., McMullen M., Miller S., Mitchell Fetch J., Paczos-Grzęda E., Peng Y., Prats E., Ren C., Singh J., Sorrells M.E., Tumino G., Vallenback P., Wight C.P., Winkler L., Zwer P. 2016. Achievements and impact of the Collaborative Oat Research Enterprise (CORE). Oat Newsletter 53(18). MNiSW₂₀₁₈ – 5 pkt.
- Paczos-Grzęda E.*, Bednarek P.T., Koroluk A. 2014. Zastosowanie markerów silicoDART do oceny polimorfizmu międzyodmianowego *Avena sativa* L. Folia Pomoranae Universitatis Technologiae Stetinensis. Agricultura, Alimentaria, Piscaria et Zootechnica 30, 75–84. MNiSW₂₀₁₄ – 5 pkt.
- Paczos-Grzęda E.*, Nowak M. 2017. Analiza elementów plonu mieszańców międzyodmianowych owsa o zredukowanej długości źdźbła. Agronomy Science (Annales UMCS sec. E, Agricultura) VOL. LXXII (3), 117-127. MNiSW₂₀₁₈ – 9 pkt.
- Paczos-Grzęda E.*, Sowa S., Koroluk A., Toporowska J., Marek E., Bednarek P. 2019. Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego. Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl. 2019 Nr 286 s. 169-172 MNiSW₂₀₁₉ – 20 pkt.

Piramidyzacja genów odporności na rdzę koronową w genomie owsa oraz identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla tych genów

Crown rust resistance genes pyramiding in oat genome and identification of DNA markers for these genes

Edyta Paczos-Grzęda✉, Sylwia Sowa, Aneta Koroluk, Joanna Toporowska, Ewelina Marek

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie

Słowa kluczowe: geny odporności, markery molekularne, owies zwyczajny, piramidyzacja genów, *Puccinia coronata*, rdza koronowa

Chorobą bardzo często pojawiającą się na owsie w warunkach naszego kraju jest rdza koronowa. Czynnikiem infekcyjnym jest grzyb *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. Monitorowanie zmian w populacji patogenu jest niezbędne do określenia efektywnych na obszarze Polski genów odporności. Celem prowadzonych badań było:

1. Stworzenie i utrzymanie kolekcji linii referencyjnych owsa z genami odporności na rdzę koronową.
2. Określenie spektrum patogeniczności izolatów *P. coronata* pochodzących z różnych obszarów kraju.
3. Identyfikacja efektywnych w warunkach kraju genów odporności owsa na rdzę koronową.
4. Określenie podstaw odporności na rdzę koronową odmiany Celer.
5. Charakterystyka genów odporności na rdzę koronową pod względem sposobu dziedziczenia.
6. Piramidyzacja efektywnych w warunkach kraju genów odporności i wyprowadzenie w oparciu o polskie odmiany mieszańców o poprawionej odporności na rdzę koronową.
7. Opracowanie markerów molekularnych sprzężonych z efektywnymi genami odporności oraz ich lokalizacja na chromosomach owsa.

Materiały i Metody

W każdym roku z wybranych lokalizacji na terenie Polski zbierano izolaty rdzy koronowej i testowano na zestawie linii izogenicznych.

Najbardziej efektywne geny odporności przeznaczono do piramidyzacji i opracowania markerów molekularnych. W celu określenia profili wirulencji izolatów, bądź profili odporności badanych mieszańców wykorzystywano testy żywicieli-patogenów.

Prowadzono również krzyżowania mające na celu uzyskanie populacji segregujących pod względem jednego z genów odporności m.in. *Pc39*, *Pc52* czy *Pc60*, a następnie poddawano je genotypowaniu. Do genotypowania populacji wykorzystano metodę DArTseq, z kolei do analizy pul mieszańców o przeciwstawnych genotypach (metoda BSA – bulk segregant analysis) stosowano metody będące modyfikacjami PCR typu RAPD, ISSR czy SRAP. Zidentyfikowane markery poddawano konwersji na łatwe w użyciu markery typu SCAR.

Wyniki

W 2014 roku skompletowano kolekcję 45 linii referencyjnych owsa z genami odporności na rdzę koronową *Pc*, pochodzących z Iowa State University oraz AAFC Cereal Research Centre w Winnipeg w Kanadzie. W latach 2015–2020 linie referencyjne poddawano rozmnożeniu w warunkach polowych z zachowaniem izolacji w celu utrzymania kolekcji do dalszych badań.

W latach 2014–2019 w celu określenia struktury populacji *P. coronata* zbierano populacje patogenu z różnych obszarów kraju. Z populacji wyprowadzono 250 izolatów i określono ich profile wirulencji. Poziom wirulencji izolatów wahał się od 0% do 58%, przy czym średnio wynosił 13%. Najwyższym poziomem wirulencji



charakteryzowały się izolaty zebrane w 2016 (16%) i 2019 roku (19%). Izolaty średnio przełamywały 5 do 7 genów *Pc*. Ponad 75% izolatów stanowiły unikatowe patotypy, co świadczy o bardzo dużej zmienności populacji.

Testy prowadzone zarówno w warunkach laboratoryjnych, jak i polowych wykazały, że spośród badanych genów całkowicie efektywny był jedynie *Pc9I*. Pełną efektywnością w warunkach naturalnej infekcji polowej charakteryzowały się geny *Pc5IU*, *Pc7I*, *Pc59K* oraz *Pc59U*. Tylko pojedyncze izolaty przełamywały geny *Pc70*, *Pc60*, *Pc52*, *Pc5IK* i *Pc50K*.

Na podstawie analizy rozszczepeń wykazano, że odporność na *P. coronata* w odmianie Celer kontrolowana jest przez pojedynczy gen dominujący. Analiza porównawcza profili wirulencji izolatów *P. coronata* względem odmiany Celer i linii referencyjnych z genami *Pc* oraz wyniki testu alleliczności dowiodły, że za odporność na rdzę koronową w tej odmianie odpowiada gen *Pc39*.

W latach 2014–2020 prowadzono krzyżowania mające na celu wyprowadzenie populacji z genami odporności na rdzę koronową w tle odmiany podatnej na porażenie oraz piramidyzację efektywnych genów *Pc*. Na podstawie oceny efektywności genów *Pc* wytypowano kombinacje mieszańcowe do dalszego rozmnożenia. W celu określenia sposobu dziedziczenia tych genów przeprowadzono ocenę segregacji fenotypów z wykorzystaniem pozyskanych izolatów *P. coronata* o zróżnicowanej wirulencji reprezentatywnej dla populacji rdzy koronowej na terenie kraju. Na poziomie F_2 sfenotypowano 1842 rośliny reprezentujące 14 kombinacji. 1130 linii F_3 tych populacji sfenotypowano w celu wytypowania homozygotycznych rośliny F_2 , które posłużyły do identyfikacji markerów molekularnych.

Ocena efektywności genów odporności na rdzę koronową umożliwiła wytypowanie genów *Pc* do krzyżowań. Za najbardziej perspektywiczne uznano geny *Pc39*, *Pc5IU*, *Pc7I*, *Pc59K*, *Pc59U*, *Pc70*, *Pc60*, *Pc52*, *Pc5IK* i *Pc50 K*. Donorem *Pc39* była odmiana Celer. Krzyżowania prowadzono z najlepszymi pod względem cech plonotwórczych polskimi odmianami owsa, a mieszańcami wielogenowymi. W sumie wykastrowano i zapyłono 8459 kwiatków i otrzymano 1366 ziarniaków. Efektem krzyżowań były między innymi 24 kombinacje wielogenowe łączące w sobie od 3 do 5 genów *Pc*, wśród których znalazły się *Pc39*, *Pc50U*, *Pc52*, *Pc50K*, *Pc59U*, *Pc60*, *Pc70* i *Pc9I*. Uzyskano również wiele mieszańców zawierających inne kombinacje genów.

W celu opracowania markerów molekularnych do identyfikacji genu *Pc39* w populacji E310 (Celer × STH9210) przetestowano 500 starterów RAPD, 960 par starterów SRAP oraz 15 par starterów RGA. Wytypowane homozygoty populacji poddano również genotypowaniu metodą mikromacierzy DArT oraz sekwencjonowania DArTseq. Zidentyfikowano 6 markerów sprzężonych z genem *Pc39* typu RAPD, SRAP, DArT i DArTseq, które przekonwertowano na specyficzne markery typu SCAR. Analiza BLASTn z T3/Oat umożliwiła zlokalizowanie markerów w obszarze 3,7 – 6,7 cM Mrg 11.

Genotypowaniu za pomocą metody DArTseq, a w niektórych przypadkach także markerów RAPD lub SRAP, poddano również populacje 983 (Kasztan × *Pc50K*), 630 (*Pc50U* × Kasztan), E635 (*Pc5IU* × Kasztan), 552 (Bingo × *Pc52*) oraz E660 (*Pc60* × Kasztan). Wytypowane sekwencje DArTseq i silicoDArT konwertowano do warunków specyficznego PCR.

Wnioski

1. Badania umożliwiły ocenę struktury populacji *P. coronata* na terenie Polski, która charakteryzuje się bardzo dużą zmiennością i stosunkowo niską wirulencją. Pozyskane izolaty *P. coronata* o określonym profilu wirulencji mogą być wykorzystane w testach żywiciel-patogen do postulowania genów odporności na rdzę koronową w różnych formach owsa oraz do testowania materiałów wyjściowych i linii hodowlanych.
2. Wiele genów *Pc* pozostaje efektywnych w Polsce, jednak wprowadzanie monogenicznie warunkowanej odporności do odmian, a następnie długotrwała uprawa tych odmian w monokulturze może przyczynić się do zwiększenia presji selekcyjnej na populacje patogenu. Efektem może być pojawianie się bardziej agresywnych izolatów i przełamanie odporności warunkowanej pojedynczym genem. Alternatywą jest piramidyzacja genów i łączenie w jednej formie co najmniej kilku genów odporności o jak najszerszym spektrum działania.
3. Odmianę Celer wytypowano jako najbardziej odporną z polskich odmian owsa. Ponieważ odmiana ta charakteryzuje się szeregiem korzystnych cech agronomicznych, może być z powodzeniem wykorzystywana jako bezpośredni donor genu *Pc39* w hodowli.
4. W efekcie krzyżowań przeprowadzonych w ramach tematu uzyskano mieszańce dla niemal wszystkich wartościowych genów

nadających odporność na rdzę koronową. Mieszańce wykorzystano do oceny sposobu dziedziczenia warunkowanej przez te geny odporności, poszukiwania sprzężonych markerów oraz wyprowadzania wysoce złożonych kombinacji.

5. Genotypowanie metodą DArTseq umożliwiło lokalizację genu *Pc39* na mapie konsensusowej owsa, a także opracowanie markerów molekularnych zarówno dla genu *Pc39*, jak i *Pc50U*, *Pc50K* oraz *Pc60*.

Osiągnięcia projektu

1. Skompletowanie zestawu linii referencyjnych z genami *Pc*, wyprowadzenie linii czystych, usunięcie duplikatów. Linie referencyjne mogą być nadal wykorzystywane zarówno do bezpośredniego wprowadzania genów *Pc* do materiałów hodowlanych, jak i do testowania wirulencji populacji i izolatów.
 - Skompletowane linie referencyjne zostały przesłane do University of Sydney w Australii i są przedmiotem międzynarodowego eksperymentu mającego na celu stworzenie zunifikowanego zestawu linii do testowania wirulencji *P. coronata* w laboratoriach na całym świecie.
 - Mieszańce F₂ odmian Kasztan i Bingo z genami *Pc* uzyskane w ramach projektu zostały przesłane do Agriculture and Agri-Food Canada, Morden Laboratory w Winnipeg, w Kanadzie, gdzie zostały poddane genotypowaniu metodą GBS i fenotypowaniu wraz z populacjami kanadyjskimi. Efektem tej współpracy są dwie publikacje z JCR:
 - Kebede A.Z., Friesen-Enns J.R., Gnanesh B.N., Menzies J.G., Mitchell Fetch J.W., Chong J., Beattie A.D., Paczos-Grzęda E., McCartney C.A. 2019. Mapping Oat Crown Rust Resistance Gene *Pc45* Confirms Association with *PcKM*. *G3: Genes, Genomes, Genetics*. 9 (2).505–511. MNiSW 2019 – 30 pkt, IF = 2,742
 - Zhao J., Kebede A.Z., Menzies J.G., Paczos-Grzęda E., Chong J., Mitchell Fetch J., Beattie A.D., Peng Y.Y., McCartney C. 2020. Chromosomal location of the crown rust resistance gene *Pc98* in cultivated oat (*Avena sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 133 (4) s. 1109–1122. MEN 2020 – 100 pkt, IF = 4,439
2. Utworzenie kolekcji izolatów *P. coronata* f. sp. *avenae*, które mogą być wykorzystane w testach żywiciel-patogen do postulowania genów odporności na rdzę koronową w różnych formach owsa oraz do testowania materiałów wyjściowych i linii hodowlanych.

- Izolaty wyprowadzone w ramach projektu zostały wykorzystane do analizy polskich odmian *A. sativa* i licznych form dzikich z rodzaju *Avena*, czego efektem były publikacje z JCR:
 - Sowa S., Paczos-Grzęda E., Koroluk A., Okoń S., Ostrowska A., Ociepa T., Chrząstek M., Kowalczyk K. 2016. Resistance to *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* in *Avena murphyi*, *Avena magna* and *Avena insularis*. *Plant Disease*, 100 (6), s.1184–1191. MNiSW 2019 – 35 pkt, IF = 3,173.
 - Paczos-Grzęda, E., Sowa, S., Koroluk, A., Langdon T. 2018. Characteristics of resistance to *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* in *Avena fatua* L. *Plant Disease*. 102 (12), s.2616–2624. MNiSW 2019 – 35 pkt, IF = 3,583.
 - Paczos-Grzęda, E., Sowa, S., Boczkowska, M., Langdon T. 2019. Detached leaf assays for resistance to crown rust reveal diversity within populations of *Avena sterilis* L. *Plant Disease*. 105(5), s.832-840. MNiSW 2019 – 35 pkt, IF = 3,809.
 - Sowa, S., Paczos-Grzęda, E. 2020 A study of crown rust resistance in historical and modern oat cultivars representing 120 years of Polish oat breeding. *Euphytica* 216, 12. MEN 2020 – 70 pkt, IF = 1,614.
- 3. Poznanie wirulencji populacji *P. coronata* na terenie kraju, co pozwala zaplanować kierunki hodowli odpornościowej na najbliższe lata.
- 4. Uzyskanie mieszańców wielogenowych, w których spiramidyzowano od 3 do 5 genów *Pc*. Stanowią one wartościowy materiał badawczy i hodowlany
- 5. Opracowanie markerów dla genów odporności na rdzę koronową owsa *Pc39*, *Pc50U*, *Pc50K* i *Pc60*. Opatentowanie trzech par starterów identyfikujących markery dla genu *Pc39*.
 - Paczos-Grzęda E., Sowa S. **P.422535**; 11.08.2017; 06.06.2019; Dwie pary oligonukleotydowych starterów do wykrywania obecności alleli dominującego lub recesywnego genu odporności na rdzę koronową *Pc39* w genomie owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.), kombinacja dwóch par starterów oraz sposób wykrywania układu alleli genu *Pc39*
 - Paczos-Grzęda E., Sowa S. **P.422536**; 11.08.2017; 06.06.2019; Para oligonukleotydowych starterów do wykrywania oraz sposób wykrywania allelu dominującego genu odporności na rdzę koronową *Pc39* w roślinach owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.)

— Paczos-Grzęda E., Sowa S.; **P.422537**; 11.08.2017; 06.06.2019; Para oligonukleotydo-
wych starterów do wykrywania oraz sposób
wykrywania allelu recesywnego genu odpor-
ności na rdzę koronową *Pc39* w roślinach owsa
zwyczajnego (*Avena sativa* L.)

Doniesienia konferencyjne

Paczos-Grzęda E., Koroluk A., Róg S., Okoń S., Ostrowska A., Kowalczyk K. (2014) Spectrum patogeniczności *Puccinia coronata* f.sp. *avenae* w centralnej i południo-
wo-wschodniej Polsce. Międzynarodowa Konferencja
Naukowa „Nauka dla gospodarki i środowiska” Lublin,
15–16.09.2014 r.

Paczos-Grzęda E., Koroluk A., Róg S., Okoń S., Ostrowska A., Kowalczyk K. (2014) Identification of effective oat
crown rust resistance genes. III Ogólnopolska Konfe-
rencja „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin
uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany”,
Poznań, 5–7.11.2014 r.

Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Róg, Aneta Koroluk, Agniesz-
ka Ostrowska, Maria Chrzęstek. 2015. Wyprowadzanie
populacji mapujących dla genów odporności na rdzę
koronową. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa
„Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”,
2–6 lutego 2015 r., Zakopane.

Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Róg, Aneta Koroluk, Sylwia
Okoń, Agnieszka Ostrowska, Tomasz Ociepa, Patrycja
Erdzik, Maria Chrzęstek, Krzysztof Kowalczyk. 2015.
Virulence structure of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*
in Central and South Eastern Poland. XIV International
Cereal Rusts and Powdery Mildews Conference, 5-8 lipca
2015, Helsingør, Dania.

Sowa S., Paczos-Grzęda E., Ostrowska A., 2016. Virulence of
Puccinia coronata f. sp. *avenae* in Poland during 2013-
2015; X International Oat Conference, 11 - 15 lipca 2016,
St. Petersburg, Rosja, – poster.

Sowa S., Paczos-Grzęda E., Ostrowska A., 2016. Ocena odpor-
ności na rdzę koronową polskich odmian owsa zwyczaj-
nego. „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych
w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin”,
Konferencja Naukowa Katedr Jednoimiennych, Między-
zdroje 8–10 czerwiec 2016, str. 70. – streszczenie wystą-
pienia.

Paczos-Grzęda E., Sowa S., Koroluk A., Erdzik P. 2017.
Ocena efektywności genów odporności na rdzę korono-
wą owsa w warunkach naturalnej infekcji polowej. XIII
Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli
i nasiennictwa roślin uprawnych – Innowacje w hodowli
roślin i rolnictwie”, Zakopane, 30.01.- 03.02.2017 r.

Sowa S., Paczos-Grzęda E., Koroluk A. 2017. Compari-
son of crown rust resistance reaction of oat different
lines obtained from different sources. 12th Conference
of the European Foundation for Plant Pathology (EFPP)

“Deepen knowledge in plant pathology for innovative
agro-ecology” 29.05 - 2.06. 2017 r. Malo-les-bains k.
Dunkierki, Francja, Book of abstracts, session 2, poster
35, str. 104

Paczos-Grzęda E., Sowa S., Koroluk A. Efektywność genów
odporności w warunkach naturalnej infekcji polowej.
Ogólnopolska Konferencja Naukowa Katedr Jedno-
imiennych „Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin
– osiągnięcia, wyzwania, perspektywy” Lublin, 25–27.
06.2018 r. Streszczenia, str. 44.

Paczos-Grzęda E., Sowa S., Koroluk A., 2019. Efektywność
krzyżowań odmian owsa z liniami o zdefiniowanych
genach odporności na *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*.
Międzynarodowa Konferencja Naukowa połączona
z Jubileuszem 75-lecia Wydziału Agrobiotechnologii
„Nauka dla zrównoważonego rozwoju i biogospodarki”
12 -13.06.2019 r. Streszczenia s.97.

Sowa S., Paczos-Grzęda E., Marek E. 2019. Ocena zróżnico-
wania genetycznego izolatów *Puccinia coronata* f. sp.
avenae. Międzynarodowa Konferencja Naukowa połą-
czona z Jubileuszem 75-lecia Wydziału Agrobiotechnologii
„Nauka dla zrównoważonego rozwoju i biogospodarki”
12 -13.06.2019 r. Streszczenia s.94.

Paczos-Grzęda E., Sowa S., Koroluk A., Marek E., Toporo-
wska J. 2019. Piramidyżacja genów odporności na rdzę
koronową owsa. „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin
uprawnych” – XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa,
5–8 luty 2019, Zakopane. Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl.,
285, s.327–328.

Publikacje

Sowa S., Paczos-Grzęda E. 2017. *Puccinia coronata* f.sp.
avenae virulence in south-eastern Poland in 2014.
Folia Pomer. Univ. Technol. Stetin., Agric., Aliment.,
Pisc., Zootech. 336 (43)3, s.157–166. MNiSW 2017
– 10 pkt

Paczos-Grzęda E., Sowa S. 2019. Virulence structure
and diversity of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* P. Syd. &
Syd. in Poland during 2013–2015. Plant Disease. 103 (7),
s.1559–1564. MNiSW 2019 – 35 pkt, IF = 3,809

Paczos-Grzęda E., Sowa S., Koroluk A., Toporowska J.,
Marek E. 2019. Piramidyżacja genów odporności na rdzę
koronową w genomie owsa oraz identyfikacja i lokaliza-
cja markerów DNA dla tych genów. Biuletyn IHAR 286,
173–176. MNiSW 2019 – 20 pkt

Sowa S., Paczos-Grzęda E. 2020. Identification of mole-
cular markers for the *Pc39* gene conferring resistance
to crown rust in oat. Theor Appl Genet 133, s.1081–1094.
MEN 2020 – 100 pkt, IF = 4,439

Sowa S., Paczos-Grzęda E. 2020. Virulence structure of *Pucci-
nia coronata* f. sp. *avenae* and effectiveness of *Pc* resistan-
ce genes in Poland during 2017–2019. Phytopathology.
doi: <https://doi.org/10.1094/PHYTO-10-20-0457-R>.
MEN 2020 – 100 pkt, IF = 3,234

Badanie składników determinujących wartość odżywczą i funkcjonalną owsa oraz ich relacji w ziarnie obłuszczonej i oplewionym

Study of components determining the nutritional and functional value of oats and their relations in hulled and dehulled grain

Danuta Boros✉, Damian Gołębiowski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: d.boros@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: udział łuski, składniki odżywcze, włókno pokarmowe, β -glukan, lepkość ekstraktów ziarna

Celem badań było opracowanie współczynników konwersji umożliwiających charakterystykę składu chemicznego ziarna obłuszczonego na podstawie składu ziarna oplewionego, niezbędnych do szybkiego wyodrębniania genotypów owsa najbardziej przydatnych do produkcji żywności funkcjonalnej. By ten cel osiągnąć badanie składu chemicznego prowadzono równoległe na ziarnie oplewionym i obłuszczonej, możliwie najbardziej zróżnicowanych pod względem genetycznym genotypów owsa. Dodatkowo celem było opracowanie prostych i wiarygodnych testów lepkości ekstraktów jako narzędzi ułatwiających w przyszłości prace w tworzeniu genotypów owsa o wysokiej wartości funkcjonalnej bądź paszowej. Metoda dotychczas stosowana do oznaczania lepkości, opracowana dla ziarna żyta, wymagała optymalizacji, polegającej na dostosowaniu warunków ekstrakcji, wirowania i samego pomiaru lepkości do specyficznych właściwości ziarna owsa, a także do kierunku jego użytkowania.

Materiałem badawczym w okresie realizacji zadania były 203 próbki ziarna owsa oplewionego oraz tyle samo próbek ziarna obłuszczonego. Ręcznemu obłuszczeniu poddano 50 g ziarna każdej z próbek owsa. Po zważeniu oddzielonej łuski obliczono jej udział w ziarnie oplewionym owsa. W obu zestawach próbek ziarna oznaczono masę tysiąca ziarniaków (MTZ) oraz masę objętościową (MHL). W pracach metodycznych nad udoskonaleniem pomiaru lepkości ekstraktów materiałem do badań było ziarno 3 odmian (Siwek, Bingo, Krezus) w formie oplewionej oraz obłuszczonej.

Próbki ziarna przed analizami chemicznymi

i oznaczeniem lepkości ekstraktów zmielono na młynku laboratoryjnym Cyclotec™ (firmy Foss), wyposażonym w sito o wielkości oczek 0,5 mm.

Analizy chemiczne. W ziarnie oplewionym i obłuszczonej wykonano analizy zawartości suchej masy, białka ogółem i popiołu surowego, skrobi przyswajalnej zgodnie z metodami standardowymi AACC (2011), lipidów ogółem metodą grawimetryczną według Marchello i in. (1971) oraz cukrów wolnych według Bach Knudsen i Li (1991). Suma zawartości białka, składników mineralnych, lipidów i cukrów wolnych składała się na ilość składników odżywczych (SSO). Włókno pokarmowe analizowano metodą (TDF) enzymatyczno-grawimetryczną, zwanej metodą Uppsalską, jako sumę nieskrobiowych polisacharydów (NSP i ligniny, zgodnie z metodą AACC nr 32–25 (2011). NSP oznaczono metodą chromatografii gazowej według Englysta i Cumminga (1984), z podziałem na frakcję rozpuszczalną (S-NSP) i nierozpuszczalną w wodzie (I-NSP), co umożliwiło obliczenie zawartości arabinoksylianów ogółem (TAX) oraz arabinoksylianów ekstrahowalnych (WE-AX) i nieekstrahowalnych w wodzie (WUE-AX). Kolorymetrycznie oznaczono zawartość β -glukanu zgodnie z metodą nr 32–23 wg AACC (2011). Wyniki przedstawiono w przeliczeniu na% suchej masy.

W pracach metodycznych oznaczania lepkości ekstraktów standaryzowano optymalny stopień rozcieńczenia ziarna w ekstrakcie wodnym i buforze kwaśnym, temperaturę ekstrakcji oraz prędkość wirowania. W ekstraktach wodnym i kwaśnym oznaczono zawartość lipidów, β -glukanu, białka oraz skrobi.



Wyniki. Uzyskane wyniki potwierdzają istotne różnicowanie genotypowe badanych odmian i linii owsa pod względem analizowanych cech jakości użytkowej (tab. 1). Mimo stwierdzenia w ziarnie oplewionym małego różnicowania zawartości składników odżywczych ogółem, na poziomie 6% przy wartości średniej około 64%, krańcowe wartości tej cechy różniły się znacznie, w zakresie od 54,7% do 75,3%. Jeszcze mniejszą zmienność SSO wykazano w odniesieniu do ziarna obłuszczonego (3%), jednakże zawartość składników odżywczych ogółem była średnio o blisko 29% większa niż w ziarnie oplewionym. Spośród składników odżywczych w ziarnie linii hodowlanych i odmian owsa aktualnie uprawianych w Polsce największym różnicowaniem odznaczała się zawartość cukrów wolnych (16%), przy ilości średniej 1,5%, lipidów (16%) z ilością średnią 5,7%, następnie białka (14%) z ilością średnią 11,5% i składników mineralnych (11%) średnio 2,7%, a najmniejszym skrobi (8%) przy ilości średniej 42,7%. Udział plewki w badanych odmianach i liniach owsa wyniósł średnio 25,8%, w zakresie od 19,4% do 33,3%. Wśród badanych odmian, odmiana wzorcowa Bingo charakteryzowała się najmniejszym udziałem plewki (średnio około 22%). Mniejszy jej udział stwierdzono w ziarnie kilku linii hodowlanych owsa, jako efekt prac selekcyjnych prowadzonych w tym kierunku. Usunięcie plewki wpłynęło na zwiększenie zawartości w ziarnie składników odżywczych, średnio o 28,5%, w tym białka, o 28,7%, lipidów, o 26,3%, skrobi, o 32,2% oraz cukrów wolnych, o 13,3%. Zmniejszyła się ilość popiołu, średnio o 18,5%, ponieważ składniki mineralne ziarna owsa są w dużym stopniu powiązane z nierozpuszczalnymi składnikami plewki.

Zawartość błonnika pokarmowego w ziarnie oplewionym badanych odmian i linii hodowlanych owsa wynosiła średnio 32,2%, przy zmienności około 10%, podczas gdy w ziarnie obłuszczonego jego ilość zmniejszyła się ponad 2,5-krotnie (tab. 2). Błonnik pokarmowy jest kompleksem heterogenicznych substancji, wśród których wyróżnia się frakcję rozpuszczalną i nierozpuszczalną w wodzie. Obydwie frakcje błonnika pełnią różne, ale równie ważne funkcje w organizmie. W ziarnie oplewionym frakcja nierozpuszczalna, będąca podstawowym składnikiem ścian komórkowych plewki, stanowi aż 88,8% błonnika pokarmowego ogółem. Usunięcie plewki zmniejszyło ponad 4-krotnie zawartość nierozpuszczalnej frakcji NSP i 3-krotnie ilość ligniny, a zwiększyło o 30,5% zawartość rozpuszczalnej frakcji NSP w ziarnie obłuszczonego owsa. Frakcja ta w 87% składała się z β -glukanu.

Z obecnością w ziarnie dużej ilości β -glukanu powiązane są w największym stopniu właściwości prozdrowotne owsa. Ziarno obłuszczone owsa miało średnio 4,1% β -glukanu, przy czym zakres zmienności był dość duży i wynosił od 3% do 5,3% w suchej masie. Na przestrzeni lat badań, odmiana Bingo charakteryzowała się dużą zawartością β -glukanu, na poziomie około 4,4%. Wykazano także, że linia HI-FI, będąca źródłem odporności na rdzę koronową, może być wykorzystana jednocześnie w pracach hodowlanych, których celem jest zwiększenie ilości β -glukanu w ziarnie owsa.

Zestawione wyniki pięcioletnich badań wykorzystano do obliczenia współczynników korelacji Pearsona i regresji liniowej i wskazania, które parametry jakości ziarna oplewionego można wykorzystać do szacowania ich ilości w ziarnie pozbawionym plewki (tab. 3). Największym odwzorowaniem charakteryzowały się MTZ i MHL, a spośród składników ziarna zawartość białka, lipidów, β -glukanu i S-NSP, dla których współczynniki determinacji miały wartość powyżej 50%.

W pracach metodycznych nad udoskonaleniem testu lepkości ziarna owsa, oplewionego i obłuszczonego, przeznaczonego odpowiednio na paszę bądź do produkcji żywności ustalono, że w czasie godzinnej ekstrakcji w przypadku użycia wody destylowanej jako ekstrahenta, najbardziej optymalne rozcieńczenie było w układzie 1:5 w/v, przy temperaturze tego procesu w zakresie od 25–40°C. Przy takim rozcieńczeniu i temperaturze ekstrakcji, zawiesina jest na tyle płynna, że wydaje się gwarantować maksymalną ekstrahowalność składników wpływających na lepkość wodnych ekstraktów ziarna owsa. W przypadku ekstrakcji kwaśnym buforem wykazano, iż optymalne warunki ekstrakcji występują przy rozcieńczeniu 1:20 w/v i temperaturze 30°C. Ważnym czynnikiem jest także prędkość wirowania zawiesiny, która powinna być mniejsza niż w przypadku ziarna żyta, pszenżyta czy pszenicy, nieprzekraczająca 6000 obrotów/minutę. Lepkość ekstraktów w największym stopniu była zależna od zawartości β -glukanu. Wykazaliśmy ponadto, że inne składniki ziarna, jak białko, lipidy i arabinoksylany mają wpływ na wartość lepkości ekstraktów owsa.

Wnioski z przeprowadzonych badań

1. Stopień oplewienia ziarna wpływa odwrotnie proporcjonalnie na zawartość składników odżywczych i wprost proporcjonalnie na zawartość frakcji nierozpuszczalnej błonnika w owsie.
2. Zmniejszony udział plewki w masie ziarna

warunkuje większą wartość odżywczą ziarna owsa, co jest istotne w przypadku ziarna przeznaczonego na paszę.

3. Ze względu na zróżnicowanie stopnia oplewienia ziarna odmian uprawnych i linii hodowlanych owsa oraz fakt, że surowcem do produkcji żywności jest ziarno pozbawione plewki, pomiar zawartości kluczowych składników odżywczych i tych o właściwościach prozdrowotnych w ziarnie oplewionym może dawać nieobiektywne informacje na temat potencjału funkcjonalnego ziarna.
4. Wykorzystując opracowane w tym zadaniu równania regresji można z dużym prawdopodobieństwem szacować zawartość białka, lipidów i β -glukanu w ziarnie obłuszczonego na podstawie ich zawartości w ziarnie oplewionym.
5. Stwierdzono, że lepkość ekstraktów ziarna owsa jest zależna w największym stopniu od β -glukanu, jednakże białko, lipidy i arabinoksyłany mają wpływ na wartość tej cechy.
6. Ustalono optymalne warunki pomiaru ekstraktów wodnego i kwaśnego ziarna owsa.

Osiągnięcia projektu

Surowcem do produkcji żywności jest ziarno obłuszczone owsa. Proces obłuszczenia w warunkach laboratoryjnych jest czynnością bardzo pracochłonną, a do obłuszczenia małych próbek ziarna nie da się zastosować obłuszczonek dostępnych w przemyśle kaszarskim czy zbożowo-młynarskim. Możliwość predykcji składu chemicznego ziarna obłuszczonego z ziarna oplewionego stało się istotną potrzebą dla usprawnienia prac selekcyjnych w hodowli owsa ukierunkowanej na poprawę właściwości prozdrowotnych. Badania prowadzone w ramach zadania 32 wychodziły naprzeciw tym potrzebom.

Wykaz publikacji

Publikacje

Gołębiewski, D., Boros, D., Gołębiewska, K., Fraś, A. (2019).

Potencjał odżywczy i bioaktywny odmian owsa zwyczajnego. *Biul. IHAR.* 287, 57–58.

Monografie

Boros D., Fraś A., Gołębiewska K., Gołębiewski D., Paczkowska O., Wiśniewska M. (2015). Wartość odżywcza i właściwości prozdrowotne ziarna odmian zbóż i nasion rzepaku zalecanych do uprawy w Polsce. Monografia pod. red. Boros D. i Fraś A. Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR-PIB, nr 49: 1–119. ISBN 83–891172–83–6.

Doniesienia konferencyjne

Gołębiewski D., Boros D. (2015). Zróżnicowanie zawartości składników odżywczych i bioaktywnych w nowych genotypach owsa w porównaniu do odmian wzorcowych. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych. Zakopane 2–6.02.2015. Streszczenia Referatów i Plakatów, str. 391–392.

Boros D., Gołębiewski D. (2016). Nutritional and bioactive properties of hulled and naked genotypes of oat intended for cultivation in Poland. Abstracts of oral and poster presentation: The 10th International Oat Conference, 11–15 July 2016, St. Petersburg, pp. 76–77.

Gołębiewski D., Boros D. (2016). Viscosity of water and buffer extract as a new tool in selection of oat genotypes for specific end-uses. Abstracts of oral and poster presentation: The 10th International Oat Conference, 11–15 July 2016, St. Petersburg, pp. 185–186.

Gołębiewski D., Boros D., Szydłowska A. (2017). Porównanie zawartości składników odżywczych i bioaktywnych w ziarnie oplewionym i obłuszczonego owsa. Streszczenia Referatów i Posterów XIII Ogólnopolska konferencja naukowa: „NAUKA DLA HODOWLI I NASIENNICTWA ROŚLIN UPRAWNYCH. ISBN 83–891172–87–9. Zakopane, 30.01 – 3.02. 2017, str. 264.

Gołębiewski D., Boros D., Gołębiewska K., Fraś A. (2018). Potencjał odżywczy i bioaktywny odmian owsa zwyczajnego. Książka abstraktów VI Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej “Jakość a wykorzystanie ziarna zbóż”, Puławy, 25–26 październik 2018, str.: 25–26 (ISBN-978–83–7562–296–6).

Tabela 1

Porównanie cech fizycznych i zawartości składników odżywczych w ziarnie 203 odmian i linii hodowlanych owsa oplewionego oraz po jego obluszczeniu, na przestrzeni lat badań 2014–2018 [w% sm].

Wartości	Ziarno	Udział łuski [%]	MTZ [g]	Białko	Popiół	Lipidy	Skrobia	Cukry wolne	SSO**
Wartość średnia	Ziarno oplewione	25,8	35,9	11,5	2,7	5,7	42,7	1,5	64,1
CV [%] *		10	15	14	11	16	8	16	6
Wartość min.		19,4	23,8	7,7	2,1	4,3	30,6	1,0	54,7
Wartość max.		33,3	48,9	17,1	3,4	13,7	49,8	2,2	75,3
Wartość średnia	Ziarno obluszczone	-	26,7	14,8	2,2	7,2	56,5	1,7	82,4
CV [%]		-	17	13	5	18	5	13	3
Wartość min.		-	16,7	10,3	1,9	5,5	48,2	1,1	75,1
Wartość max.		-	38,8	19,4	2,5	18,2	61,5	2,2	91,3

*CV – współczynnik zmienności, **SSO – suma składników odżywczych: białka, składników mineralnych, lipidów, skrobi i cukrów wolnych.

Tabela 2

Porównanie zawartości błonnika pokarmowego oraz jego komponentów w ziarnie 203 odmian i linii hodowlanych owsa oplewionego oraz po jego obluszczeniu, na przestrzeni lat badań 2014–2018 [w% sm].

Wartości	Ziarno	I-NSP	S-NSP	T-NSP	Lignina	TDF	β-glukan	WUE-AX	WE-AX	T-AX
Wartość średnia	Ziarno oplewione	18,4	3,6	22,0	10,2	32,2	3,1	8,8	0,3	9,1
CV [%] *		14	12	11	13	10	13	14	15	14
Wartość min.		12,6	2,5	16,4	6,6	24,1	2,3	5,7	0,2	6,0
Wartość max.		25,0	4,8	28,5	14,5	41,0	4,6	12,0	0,5	12,3
Wartość średnia	Ziarno obluszczone	4,2	4,7	8,9	3,4	12,3	4,1	2,0	0,3	2,3
CV [%] *		11	10	9	32	12	11	12	10	11
Wartość min.		2,7	3,7	6,9	1,3	8,3	3,0	1,1	0,2	1,5
Wartość max.		5,6	6,2	10,5	6,3	15,9	5,3	2,6	0,4	3,2

Objaśnienia: T-NSP – nieskrobiowe polisacharydy ogółem, I-NSP, S-NSP – frakcja nierozpuszczalna i rozpuszczalna w wodzie; TDF – włókno pokarmowe; w tym: T-AX – arabinoksylany ogółem; WUE-AX i WE-AX – arabinoksylany nieekstrahowalne i ekstrahowalne w wodzie.

Tabela 3

Składowe modelu regresji liniowej do wyliczenia cech fizycznych ziarna oraz zawartości składników w ziarnie obluszczonym na podstawie parametrów ziarna oplewionego, dla których współczynnik determinacji R² był powyżej 50.

Cecha/składnik	a	b	R ²
MTZ	0,8293	-2,9605	0,9077
MHL	0,6239	28,287	0,7102
Białko	1,0289	2,9061	0,7895
Lipidy	1,2976	-0,119	0,9023
β-glukan	0,8281	1,4966	0,6001
S-NSP	0,8177	1,8199	0,5900

Identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla wybranych genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie zwyczajnym oraz piramidyzacja efektywnych genów odporności w genomie owsa

Identification and localization of DNA markers for selected powdery mildew resistance genes in common oat and pyramiding of the effective resistance genes in the oat genome

Sylwia Okoń✉, Tomasz Ociepa, Aleksandra Nucia

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin
✉ e-mail: sylwia.okon@up.lublin.pl

Słowa kluczowe: *A.sativa*, *Blumeria graminis* f.sp. *avenae*, geny odporności, markery molekularne, MAS, mączniak prawdziwy,

Mączniak prawdziwy owsa powodowany jest przez *Blumeria graminis* DC. f.sp. *avenae* Em. Marchal. Choroba ta występuje powszechnie w wielu regionach świata powodując duże straty jakościowe i ilościowe owsa (Clifford 1995; Hsam et al. 1997; Banyal et al. 2016; Xue et al. 2017). Ograniczenie strat powodowanych występowaniem mączniaka prawdziwego można osiągnąć między innymi przez wprowadzenie do uprawy odmian z efektywnymi genami odporności (Feuillite and Keller 1998). Pietrusińska i Czembor (2015) wskazują, że proces uzyskiwania odmian odpornych powinien być poprzedzony dokładną charakterystyką populacji patogenu, analizą efektywności genów odporności obecnych w odmianach uprawnych oraz opracowaniem metody pozwalającej na szybką i pewną identyfikację tych genów. Dlatego też realizacja badań prowadzonych w ramach projektu była oparta o następujące główne cele badawcze:

- Ocena poziomu odporności polskich odmian owsa zwyczajnego na mączniaka prawdziwego zbóż i traw
- Ocena efektywności genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie w warunkach naturalnej infekcji polowej
- Analiza wirulencji *Blumeria graminis* f.sp. *avenae* w Polsce
- Wprowadzanie efektywnych genów odporności na mączniaka prawdziwego do genomu

owsa

- Identyfikacja markerów DNA powiązanych z efektywnymi genami odporności na mączniaka prawdziwego w owsie

Materiały i Metody

Materiałem badawczym w projekcie były linie i odmiany kontrolne owsa zwyczajnego posiadające opisane do tej pory geny odporności na mączniaka prawdziwego, które posłużyły do oceny efektywności genów odporności i analizy chorobotwórczości izolatów *B.graminis* f.sp. *avenae* uzyskanych z populacji patogenu w latach 2010–2017. Linie z genami *Pm4*, *Pm5* i *Pm7* wraz z polskimi odmianami owsa zostały wykorzystane do wprowadzania genów odporności do genomu odmian uprawnych. Populacje F_2 i F_3 uzyskane w wyniku krzyżowań posłużyły do identyfikacji markerów powiązanych z efektywnymi genami odporności.

Ocenę efektywności genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie prowadzono w czterech lokalizacjach: Kopaszewo – Hodowla Roślin DANKO, Strzelce – Hodowla Roślin Strzelce, Polanowice – Małopolskiej Hodowli Roślin, Czesławice koło Nałęczowa – Gospodarstwo Doświadczalne Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Porażenie mączniakiem prawdziwym zestawu linii kontrolnych, w warunkach infekcji naturalnej, oceniono według 9-cio stopniowej



skali, gdzie 9 oznacza brak porażenia przez mączniaka prawdziwego, 1- porażenie, w którym objawy widoczne są na całej powierzchni liścia.

Ocenę poziomu odporności polskich odmian, wirulencji populacji *Bga* oraz analizę segregacji odporności w populacjach F_2 i F_3 prowadzono w oparciu o testy żywiciel-patogen zgodnie z metodyką opisaną przez Hsam i in (1998) oraz Okoń i Kowalczyk (2012).

Chorobotwórczość izolatów *Bga* zebranych na terenie Polski określono w skali 5-cio stopniowej według Mains'a (1934) a analizy prowadzono w oparciu o program HaGiS Tool (Schachtel et al. 1999). Do identyfikacji markerów powiązanych z efektywnymi genami odporności wybrano systemy RAPD (Williams et al. 1990), SRAP (Li and Quiros 2001), genotypowanie populacji segregujących prowadzono również w oparciu o markery DArTseq (Appleby et al. 2009).

Wyniki

Badania prowadzone w ramach projektu potwierdziły, że najbardziej efektywne w warunkach Polski są obecnie geny *Pm4* i *Pm7*. Analiza chorobotwórczości populacji *B. graminis* f.sp. *avenae* wykazała, że odporność warunkowana genami *Pm1*, *Pm3* i *Pm6* została niemal całkowicie przełamana. Zidentyfikowano pojedyncze izolaty przełamujące odporność warunkowaną genami *Pm7* i *Pm2*. Żaden z testowanych w ramach projektu izolatów *Bga* nie był wirulentny wobec linii z genami *Pm4* i *Pm5* (Okoń and Ociepa 2017). Zmiany zachodzące w populacji patogenu na przestrzeni kilku lat były bardzo małe, nie obserwowano pojawienia się izolatów całkowicie przełamujących efektywne geny odporności.

Testy żywiciel patogen przeprowadzone w oparciu o zróżnicowane izolaty *Bga* pozwoliły postulować obecność genów odporności na mączniaka prawdziwego w polskich odmianach owsa. Spośród testowanych 30 polskich odmian owsa zwyczajnego 22 wykazały całkowitą wrażliwość lub odpowiedź pośrednią na pojedyncze izolaty mączniaka prawdziwego zastosowane w doświadczeniu. Porównanie profili porażenia linii i odmian kontrolnych z profilami porażenia analizowanych odmian pozwoliło na identyfikację genu *Pm6* w odmianie Rajtar, genu *Pm1* w odmianie Gniady i genu *Pm3* w odmianie Deresz. Wzór porażenia odmiany Harnaś pozwala przypuszczać, iż odmiana ta posiada gen *Pm6* połączony z innym, niezidentyfikowanym genem lub genami odporności. Wzory porażenia uzyskane dla odmian Maczo, Nawigator, Kasztan i Celer nie pasowały

do wzorów porażenia linii i odmian kontrolnych, można więc przypuszczać, że posiadają one kombinacje różnych genów odporności (Okoń et al. 2016).

Uzyskane w ramach projektu wyniki pozwoliły na określenie najbardziej efektywnych genów odporności na mączniaka prawdziwego na terenie kraju. W związku z tym, linie zawierające geny *Pm4*, *Pm5* i *Pm7* wykorzystano w procesie krzyżowania do podnoszenia poziomu odporności odmian uprawnych owsa. W rezultacie uzyskano szereg odpornych mieszańców, które stanowią podstawę w programach hodowlanych ukierunkowanych na zwiększenie odporności odmian owsa na mączniaka prawdziwego. Populacje F_2 i F_3 uzyskane w wyniku krzyżowania form z genami *Pm4* i *Pm7* i wrażliwą odmianą Fuchs posłużyły do identyfikacji markerów powiązanych z genami odporności. Genotypowaniu poddano trzy populacje Av1860 x Fuchs, APR122 x Fuchs, Canyon x Fuchs wykorzystując trzy różne metody: RAPD, SRAP i DArTseq. W każdym systemie markerowym dla każdej populacji uzyskano produkty polimorficzne, wśród których zidentyfikowano fragmenty DNA specyficzne, powiązane z efektywnymi genami odporności na mączniaka prawdziwego w owsie. W wyniku konwersji markerów losowych uzyskano markery specyficzne, które można wykorzystać do selekcji genotypów posiadających geny *Pm4* i *Pm7* (Okoń et al. 2018).

Wnioski

1. Najwyższy poziom odporności na mączniaka prawdziwego w stadium rośliny dorosłej utrzymywały geny *Pm4* i *Pm7*. Linia z genem *Pm3* wykazała umiarkowany poziom odporności, natomiast odporność warunkowana genami *Pm1* i *Pm6* została całkowicie przełamana w warunkach naturalnej infekcji polowej.
2. Izolaty mączniaka prawdziwego wykazały najwyższy poziom wirulencji dla genów *Pm1*, *Pm3* i *Pm6*, najniższy zaś dla genów *Pm2*, *Pm4*, *Pm5* i *Pm7*.
3. Geny *Pm4* i *Pm7* są obecnie najbardziej efektywne przeciwko mączniakowi prawdziwemu zarówno w stadium siewki jak i w stadium rośliny dorosłej
4. Polskie odmiany owsa zwyczajnego charakteryzuje bardzo niski poziom odporności na mączniaka prawdziwego. Geny *Pm1*, *Pm3* i *Pm6* zidentyfikowane w odmianach Deresz, Gniady i Rajtar są już nieefektywne wobec istniejących ras patogenów.
5. W wyniku krzyżowania linii i odmian owsa z liniami zawierającymi geny *Pm4*, *Pm5* i *Pm7*

- uzyskano szereg mieszańców, które mogą być wykorzystane w programach hodowli owsa do podnoszenia poziomu odporności na mączniaka prawdziwego.
6. Segregacja odporności na mączniaka prawdziwego we wszystkich analizowanych populacjach pasowała do modelu 3 rośliny odporne: 1 roślina wrażliwa, co wskazuje, że geny *Pm4* i *Pm7* są genami dominującymi
 7. Analiza rozszczepienia w pokoleniu F₃ potwierdziła dominujący charakter analizowanych genów. Proporcja rozszczepień wynosiła 1:2:1.
 8. Dla wszystkich analizowanych populacji zidentyfikowano produkty polimorficzne zarówno po włączeniu do PCR starterów RAPD jak i SRAP.
 9. Próba konwersji produktów RAPD i SCAR specyficznych dla analizowanych genów nie przyniosła oczekiwanych rezultatów, co może wskazywać na konieczność zastosowania większej liczby starterów lub innych metod losowych do poszukiwania markerów specyficznych dla tych źródeł odporności.
 10. Zastosowanie technologii DArT pozwoliło na uzyskanie markerów sprzężonych z efektywnymi genami odporności na mączniaka prawdziwego w owsie
 11. Próba konwersji markerów silicoDArT potwierdziła możliwość ich wykorzystania do opracowania metody identyfikacji genotypów posiadających ważne cechy użytkowe.

Osiągnięcia projektu:

Publikacje naukowe

- Okoń S., Ociepa T., Nucia A. (2018) Molecular identification of *Pm4* powdery mildew resistant gene in oat. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 2018, 46 (2): 350–355.
- Analiza poziomu odporności polskich odmian owsa zwyczajnego (*Avena sativa* L.) na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* DC. f.sp. *avenae* Em. Marchal.) Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa, Edyta Paczos-Grzęda, Krzysztof Kowalczyk. 2016 *Annales UMCS* 71 (3) 51–60
- Virulence structure of the *Blumeria graminis* DC.f. sp. *avenae* populations occurring in Poland across 2010- 2013. Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa. *European Journal of Plant Pathology* 149:711–718

Doniesienia konferencyjne

- Analiza poziomu odporności na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* dc.f. sp. *Avenae*) polskich odmian owsa zwyczajnego. Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa, Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa, Krzysztof Kowalczyk. Nowe osiągnięcia polskich

zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin. Międzyzdroje, 8–10 czerwca 2016 srt 54

Wirulencja mączniaka prawdziwego owsa (*Blumeria graminis* dc.f. sp. *Avenae*) występującego na terenie polski wschodniej Tomasz Ociepa, Sylwia Okoń – prezentacja. Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin. Międzyzdroje, 8–10 czerwca 2016 srt 53

Ocena poziomu wirulencji populacji mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis* f. sp. *avenae*) na terenie Polski w latach 2014- 2015. Tomasz Ociepa, Sylwia Okoń, Aleksandra Nucia. *Nauka Dla Hodowli I Nasiennictwa Roślin Uprawnych*. Zakopane 30.01.2017–03.02.2017 str 185–186.

Odporność owsa na mączniaka prawdziwego – poszukiwanie nowych źródeł odporności i ich identyfikacja molekularna. Okoń S. Prezentacja wyników badań naukowych i możliwości ich praktycznego wykorzystania w produkcji roślinnej. 19–20 października 2017, Radom, Polska

Cultivar Canyon – effective source against oat powdery mildew. Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa, Aleksandra Nucia. 17th EWAC – The European Cereals Genetics Co-operative EUCARPIA Cereals Section International Conference 03 – 08 czerwca 2018, Bukareszt, Rumunia.

Oat powdery mildew – identification and characterization of new sources of resistance. Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa, Aleksandra Nucia, Krzysztof Kowalczyk. 17th EWAC – The European Cereals Genetics Co-operative EUCARPIA Cereals Section International Conference 03 – 08 czerwca 2018, Bukareszt, Rumunia

Mączniak prawdziwy owsa – identyfikacja i charakterystyka nowych źródeł odporności. Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa, Aleksandra Nucia, Krzysztof Kowalczyk. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy” Lublin, 25–27 czerwca 2018 r.

Molecular characterization and virulence structure of *Blumeria graminis* f.sp. *avenae* in Poland. Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa, Aleksandra Nucia. 15TH International Cereal Rusts And Powdery Mildews Conference 2018, 23 –26 September 2018 Skukuza, Republika Południowej Afryki

Literatura

- Appleby N., Edwards D., Batley J. (2009). New technologies for ultra-high throughput genotyping in plants. *Methods Mol Biol* 513:19–39. doi: 10.1007/978-1-59745-427-8_2
- Banyal D. K., Sood V. K., Singh A., Mawar R. (2016). Integrated management of oat diseases in north-western Himalaya. *Range Manag Agrofor* 37:84–87
- Clifford B. C. (1995). Diseases, pest and disorders of oat. In: Welch RW (ed) *The Oat Crop*. Chapman & Hall, London, pp 252–278

- Feuillite C., Keller B. (1998). Molecular aspects of biotic stress resistance in wheat. In: Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp. Saskatoon, Canada, pp 171–177
- Hsam S. L. K., Paderina E. V., Gordei S., Zeller F. J. (1998). Genetic studies of powdery mildew resistance in cultivated oat (*Avena sativa*L.) II. Cultivars and breeding lines grown in Northern and Eastern Europe. *Hereditas* 230:227–230
- Hsam S. L. K., Peters N., Paderina E. V., et al (1997). Genetic studies of powdery mildew resistance in common oat (*Avena sativa* L.) I. Cultivars and breeding lines grown in Western Europe and North America. *Euphytica* 96:421–427. doi: 10.1023/A: 1003057505151
- Li G., Quiros C. F. (2001). Sequence-related amplified polymorphism (SRAP), a new marker system based on a simple PCR reaction: Its application to mapping and gene tagging in Brassica. *Theor Appl Genet* 103:455–461. doi: 10.1007/s001220100570
- Mains E. B. (1934). Inheritance of resistance to powdery mildew, *Erysiphe graminis tritici*, in wheat. *Phytopathology* 24:1257–1261
- Okoń S., Kowalczyk K. (2012). Deriving isolates of powdery mildew (*Blumeria graminis* DC. f.sp. *avenae* Em. Marchal.) in common oat (*Avena sativa* L.) and using them to identify selected resistance genes. *Acta Agrobot* 65:155–160. doi: 10.5586/aa.2012.069
- Okoń S., Ociepa T., Nucia A. (2018). Molecular identification of Pm4 powdery mildew resistant gene in oat. *Not Bot Horti Agrobot Cluj-Napoca* 46:350–355. doi: 10.15835/nbha46210904
- Okoń S., Ociepa T., Paczos-Grzęda E., Kowalczyk K. (2016). Analiza poziomu odporności polskich odmian owsa zwyczajnego (*Avena sativa*L.) na mączniaka prawdziwego (*Blumeria graminis*DC. f. sp. *avenae*Em. Marchal.). *Ann UMCS – Sect E Agric* 71:51–60
- Okoń S. M., Ociepa T. (2017). Virulence structure of the *Blumeria graminis* DC.f. sp. *avenae* populations occurring in Poland across 2010–2013. *Eur J Plant Pathol* 149:711–718. doi: 10.1007/s10658–017–1220-y
- Pietrusińska A., Czembor J. H. (2015). Gene pyramiding — a tool commonly used in breeding programs breeding programs. *Biul Inst Hod i Aklim Roślin* 278:3–16
- Schachtel G. A., Herrmann A., Lo C. F. (1999). LETTER TO THE EDITOR A new tool for entry and analysis of virulence data for plant pathogens. *Plant Pathol* 48:154–158
- Williams J. G., Kubelik A. R., Livak K. J., et al (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res* 18:6531–6535
- Xue L. H., Li C. J., Zhao G. Q. (2017). First Report of Powdery Mildew Caused by *Blumeria graminis* on *Avena sativa* in China. *Plant Dis* 101:1954. doi: 10.1094/PDIS-05–17–0678-PDN

Jedno- i wielozmienne modele analizy wariancji i kowariancji dla doświadczeń populacyjnych i mieszańcowych z rzepakiem ozimym

Uni- and multivariate models of variance and covariance analyses for winter oilseed rape experiments

Elżbieta Adamska, Tadeusz Adamski, Tadeusz Caliński, Teresa Cegielska-Taras, Zygmunt Kaczmarek ✉, Laurencja Szała, Renata Trzeciak, Bernadeta Borucka, Halina Gdeczyk

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60–479 Poznań
✉ e-mail: zkac@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: analiza wariancji wielocechowa, doświadczenia polowe, rzepak ozimy.

Cele badań (osiągnięte)

1. Opracowanie zaawansowanych modeli analizy wariancji i kowariancji, analizy regresji wielokrotnej, a także innych przydatnych statystycznych metod wielowymiarowych pozwalających dokonać w sposób kompleksowy i obiektywny ocenę rodów hodowlanych i mieszańców rzepaku ozimego oraz ich linii matecznych i restorerów pod względem plonu nasion i innych obserwowanych cech.
2. Zaproponowanie odpowiednich metod statystycznych do konstrukcji rankingów najwyżej plonujących genotypów na podstawie wyników doświadczeń jednopowtórzeniowych z wzorcami.
3. Dokonanie oceny zdolności kombinacyjnych linii matecznych i restorerów na podstawie obserwacji mieszańców uzyskiwanych w wyniku określonego (kompletnego bądź niekompletnego) schematu krzyżowania.

Material i Metody

W pierwszych etapach prac hodowlanych prowadzone są najczęściej doświadczenia jednopowtórzeniowe z wzorcami, czyli doświadczenia, które nie spełniają podstawowych założeń koniecznych dla stosowania metod statystyki matematycznej. W latach 2014–2016 przeprowadzano w 6 stacjach hodowli roślin szereg doświadczeń jednopowtórzeniowych z rodami rzepaku ozimego i jednym bądź dwoma wzorcami. Stąd też dla osiągnięcia nakreślonych celów konieczne było zaproponowanie odpowiednich modeli analizy wariancji i kowariancji, analizy

regresji wielokrotnej, analizy zmiennych kanonicznych oraz innych przydatnych statystycznych metod wielowymiarowych, pozwalających dokonać w sposób kompleksowy i obiektywny oceny rodów i mieszańców rzepaku ozimego oraz ich linii matecznych i ojcowskich pod względem plonu nasion i innych obserwowanych cech.

Wyniki

Zastosowanie do analizy wyżej nakreślonych modeli umożliwiło:

1. przeprowadzenie weryfikacji eksperymentalnej szeregu propozycji metodycznych oceny genotypów w doświadczeniach pojedynczych i seriach tych doświadczeń w wyniku zastosowania dwóch metod: „wzorcowej”, uwzględniającej trend zmienności glebowej umożliwiającej odtworzenie za pomocą interpolacji liniowej hipotetycznych wartości plonu dla każdego replikowanego jeden raz genotypu i metody opartej na ogólnej teorii układów o blokach niekompletnych umożliwiającej „poprawienie” plonu genotypu ze względu na niekompletność bloku, z replikowanymi wzorcami,
2. sprawdzenie pod względem teoretycznym i metodycznym oceny zgodności wyników obliczeń uzyskiwanych w ramach jednego i dwuetapowego podejścia do analizy statystycznej serii doświadczeń prowadzonych z tymi samymi genotypami w kilku lokalizacjach,
3. opracowanie wraz z weryfikacją eksperymentalną możliwości oceny i testowania



- istotności efektów ogólnej (GCA) i specyficznej (SCA) zdolności kombinacyjnej form rodzicielskich (linii męskosterylnych (MS) i restorerów), a w przypadku serii takich doświadczeń także badania istotności interakcji efektów GCA i SCA ze środowiskiem,
4. opracowanie metodyki oceny efektów zdolności plonowania form rodzicielskich i ich interakcji ze środowiskiem wyjaśnianej za pomocą metod regresyjnych na podstawie obserwacji mieszańców otrzymanych w wyniku dowolnego krzyżowania linii z wybranymi restorerami w seriach jednopowtórzeniowych doświadczeń z wzorcami, w sytuacji gdy żaden ze znanych schematów krzyżowania nie jest stosowany,
 5. zaproponowanie wielowymiarowej analizy wariancji, regresji liniowej, regresji liniowej wielokrotnej oraz innych wielowymiarowych metod statystycznych przydatnych w wielocechowej, kompleksowej ocenie mieszańców i na ich podstawie, w ocenie wielocechowych efektów zdolności kombinacyjnych ich form rodzicielskich.

Wnioski

1. Badania przeprowadzone w projekcie potwierdziły postawioną w pracy hipotezę dotyczącą rzeczywistej i niezbędnej konieczności stosowania metod statystyki matematycznej i metod genetyki ilościowej dla właściwej oceny mieszańców, rodów i linii DH rzepaku ozimego obserwowanych w doświadczeniach jednopowtórzeniowych z wzorcami, zwłaszcza wtedy gdy są zakładane z tym samym zestawem genotypów w większej liczbie stacji (środowisk).
2. Proponowane metody statystyczne umożliwiają dokonanie odpowiedniej charakterystyki badanych genotypów wraz z konstrukcją rankingów najbardziej plennych i jednocześnie najbardziej stabilnych genotypów.
3. Koncepcja oceny genotypów i tworzenia rankingów najlepszych z nich, oparta na dwóch niezależnie prowadzonych metodach numerycznych, pozwala w sposób możliwie najbardziej wiarygodny i obiektywny oceniać genotypy występujące w doświadczeniach i dokonywać wyboru najbardziej plennych i jednocześnie stabilnych.
4. Opracowane metody analizowania serii doświadczeń jednopowtórzeniowych z wzorcami umożliwiają nie tylko bardziej obiektywne i wnikliwie oszacowanie efektów głównych poszczególnych genotypów i testowanie ich

istotności lecz także testowanie ich interakcji ze środowiskiem wraz z badaniem struktury tej interakcji.

5. Wielce pomocna w pracach hodowlanych może być propozycja predykcji zdolności kombinacyjnej form rodzicielskich przeprowadzona na podstawie analizy ich potomstwa (mieszańców) uzyskanego w wyniku zastosowania kompletnego bądź niekompletnego schematu krzyżowania linia \times restorer.
6. Zaproponowanie wielowymiarowej analizy wariancji (MANOVA) dla doświadczeń prowadzonych w układach o blokach kompletnych i niekompletnych oraz innych wielozmiennych metod statystycznych umożliwia dokonanie porównań obserwowanych genotypów między sobą i porównań ich z wzorcami nie tylko pod względem poszczególnych cech indywidualnie ale także pod względem zespołu badanych cech równocześnie.

Osiągnięcia projektu

Doświadczenia wykonywane w pierwszych etapach prac hodowlanych są najczęściej doświadczeniami jednopowtórzeniowymi z wzorcami, czyli takimi, które nie spełniają podstawowych założeń koniecznych dla stosowania metod statystyki matematycznej. Stąd też podstawowym celem badań prowadzonych w projekcie było zaproponowanie i zastosowanie takich metod statystycznych, które pozwoliłyby uzyskiwać możliwie najbardziej obiektywne i wiarygodne oceny obserwowanych w doświadczeniach genotypów.

Zestawienie doświadczeń prowadzonych w stacjach hodowli roślin w latach badań projektu, na których dokonywano weryfikacji proponowanych metod statystycznych i metod genetyki ilościowej jest przedstawione w tabeli 1.

Wnioski

1. Badania przeprowadzone w projekcie potwierdziły postawioną w pracy hipotezę dotyczącą rzeczywistej i niezbędnej konieczności stosowania metod statystyki matematycznej i metod genetyki ilościowej dla właściwej oceny mieszańców, rodów i linii DH rzepaku ozimego obserwowanych w doświadczeniach jednopowtórzeniowych z wzorcami, zwłaszcza wtedy gdy są zakładane z tym samym zestawem genotypów w większej liczbie stacji (środowisk).
2. Proponowane metody statystyczne umożliwiają dokonanie odpowiedniej charakterystyki badanych genotypów wraz z konstrukcją

- rankingów najbardziej plennych i jednocześnie najbardziej stabilnych genotypów.
3. Koncepcja oceny genotypów i tworzenia rankingów najlepszych z nich, oparta na dwóch niezależnie prowadzonych metodach numerycznych, pozwala w sposób możliwie najbardziej wiarygodny i obiektywny oceniać genotypy występujące w doświadczeniach i dokonywać wyboru najbardziej plennych i jednocześnie stabilnych.
 4. Opracowane metody analizowania serii doświadczeń jednopowtórzeniowych z wzorcami umożliwiają nie tylko bardziej obiektywne i wnikliwie oszacowanie efektów głównych poszczególnych genotypów i testowanie ich istotności lecz także testowanie ich interakcji ze środowiskiem wraz z badaniem struktury tej interakcji.
 5. Wielce pomocna w pracach hodowlanych może być propozycja predykcji zdolności kombinacyjnej form rodzicielskich przeprowadzona na podstawie analizy ich potomstwa (mieszanców) uzyskanego w wyniku zastosowania kompletnego bądź niekompletnego schematu krzyżowania linia \times restorer.
 6. Zaproponowanie wielowymiarowej analizy wariancji (MANOVA) dla doświadczeń prowadzonych w układach o blokach kompletnych i niekompletnych oraz innych wielozmiannych metod statystycznych umożliwi dokonanie porównań obserwowanych genotypów między sobą i porównań ich z wzorcami nie tylko pod względem poszczególnych cech indywidualnie, ale także pod względem zespołu badanych cech równocześnie

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

Kaczmarek Z., Woś H., Adamska E., Adamski T., Biliński R., Budzianowski G., Mańkowski Ł., Majchrzak E., Woś J., Szała L., Cegielska-Taras T., Trzeciak R. (2015). Ocena linii rodzicielskich rzepaku ozimego na podstawie plonu mieszanców z niekompletnego układu krzyżowania. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Nr 277, 47–59.

Szała L., Kaczmarek Z., Adamska E., Cegielska-Taras T. (2015). Assessment of winter oilseed rape DH lines using uni- and multivariate methods of quantitative genetics and mathematical methods. *BioTechnologia Journal of Biotechnology, Computational Biology and Bionanotechnology* vol. 96(2),171-177.

Caliński T., Czajka S., Kaczmarek Z., Krajewski P., Pilarczyk W., Siatkowski I., Siatkowski M. (2017). On a mixed model analysis of multi-environment variety trials: a reconsideration of the one-stage and two-stage models and analyses. *Statistical Papers* 58: 433-465.

Konferencje

Konferencja Międzynarodowa „Tenth Working Seminar on Statistical Methods in Variety Testing” Będlewo, 2014, wykład plenarny na zaproszenie “On a mixed model analysis of multi-environment variety trials: a reconsideration of the one-stage and two-stage models and analyses” Zaprezentowano wyniki badań przedstawionych w sprawozdaniu z roku 2014, tematy 1 i 2, na stronach 4 – 8, 11 i 19 – 24.

XXXII Konferencja Naukowa “Rośliny Oleiste – Oilseed Crops” Poznań, 2014, wykład plenarny na zaproszenie „Ocena mieszanców rzepaku ozimego na podstawie wyników doświadczeń prowadzonych we wczesnych stadiach hodowli. Zaprezentowano wyniki badań przedstawionych w sprawozdaniu z roku 2014 na stronach 27–33.

XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” Zakopane, 2015, poster. Zaprezentowano częściowe wyniki badań przedstawionych w sprawozdaniu z roku 2014 (temat 3, str. 9, 26, i 32 – 33).

Symposium „Genetyka Ilościowa: Jugowice 2015, wykład na zaproszenie „Statystyczne metody analizy jednej i wielu zmiennych wykorzystywane w doświadczeniach z rzepakiem ozimym”. Zaprezentowano wyniki badań przedstawionych w sprawozdaniu z roku 2015 na stronach 4–6, 10–11 i 15–16.

XIII Międzynarodowa Konferencja „Applied Statistics”, Słowenia, Ribno, 2016, wykład “Multivariate statistical methods in evaluation of GE interaction of parental lines on the basis of incomplete MS line \times restorer hybrids” Prezentacja wyników badań przedstawionych w sprawozdaniu z roku 2016 na stronach 2–7.

Tabela 1

Zestawienie doświadczeń wraz z liczbą obserwowanych genotypów i wzorców, dla których przeprowadzono analizy statystyczne.

Rok	Doświadczenie	Stacja Hodowli Roślin						Liczba doświadczeń
		BKH	BOH	KOH	MAH	STH	LAG	
2014	linie DH	118+2	88+2					2
	populacyjne	96+2	96+2			23+2	23+2	-
	mieszane wstępne	23+2	23+2	96+2	96+2			4
				23+2	23+2			6
2015	linie DH	521+2						1
	populacyjne	96+2	96+2	96+2	96+2			4
	mieszane wstępne	96+2	96+2	96+2	96+2			4
								-
2016	linie DH	136, 74						2
	populacyjne	96+2	96+2	96+2	96+2	23+2	23+2	4
	mieszane wstępne	96+2	96+2	96+2	96+2			4
		23+2	23+2	23+2	23+2			6
								37

Badanie genomu rzepaku ozimego przy wykorzystaniu markerów molekularnych

The investigation of winter rapeseed genome with the use of molecular markers

Iwona Bartkowiak-Broda✉, Alina Liersch, Katarzyna Mikołajczyk,
Marcin Matuszczak, Joanna Nowakowska, Wiesława Popławska,
Joanna Wolko

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików
✉ e-mail: ibart@nico.i.har.poznan.pl; i.bartkowiak-broda.@i.har.edu.pl

Słowa kluczowe: asocjacje, fenotypowanie, genotypowanie, markery molekularne, mikromacierze, rzepak ozimy (*Brassica napus* L.)

Cele prowadzonych badań

Skuteczna selekcja w hodowli roślin opie-
ra się, w coraz szerszym zakresie na analizach
genomów. Umożliwiają one poznanie struktury
genomów, wyznaczenie zmienności genetycznej
w obrębie badanych form hodowlanych, iden-
tyfikację markerów genetycznych charakterystycz-
nych dla danego genotypu (ang. fingerprinting),
a także wytypowanie markerów genetycznych
znajdujących zastosowanie w procesie hodowli
(ang. MAB, marker-assisted breeding).

Z tego względu podjęto badania dotyczą-
ce charakterystyki zgromadzonych genotypów
rzepaku ozimego za pomocą obserwacji fenot-
ypowych w powiązaniu z badaniami genomu
różnymi metodami analizy DNA. Zadanie było
podzielone na 3 komplementarne tematy badaw-
cze:

Temat 1. Określenie struktury genetycznej
dwóch kolekcji rzepaku: PB14–17 i PB17–20 obej-
mujących 50 genotypów. Do badań włączono 35
genotypów dodatkowych, obejmujących nowe
mieszance F1 oraz ich formy rodzicielskie, jak
również zarejestrowane odmiany hodowlane.
Badania prowadzono przy użyciu markerów
mikrosatelitarnych (SSR) oraz mikromacierzy
SNP-chip *Brassica* 15K. Ponadto, monitorowa-
no czystość genotypów przy użyciu specyficz-
nych markerów DNA. Cel osiągnięto, wykonano
“Charakterystykę molekularną kolekcji genoty-
pów rzepaku stanowiących obiekt badań w I HAR
-PIB, Oddział w Poznaniu.”

Temat 2. Ocena zmienności fenotypowej
dwóch kolekcji: PB14–17 i PB17–20 obejmującej 50
genotypów, badanych w wielopowtórzeniowych

doświadczeniach polowych z uwzględnieniem
warunków środowiskowych – cel osiągnięto,
wykonano “Fenotypowanie roślin pod wzglę-
dem cech agronomicznych i biochemicznych.”

Temat 3. Analizy asocjacji GWAS (ang.
genome-wide association study) pomiędzy geno-
typem, a 6 badanymi cechami fenotypowymi
z wykorzystaniem markerów SSR, jak również
mikromacierzy *Brassica* 15K – cel osiągnięto,
przeprowadzono “Analizy asocjacyjne pomiędzy
genotypem a plonem nasion i innymi ważnymi
gospodarczo cechami.”

Analizy z wykorzystaniem mikromacierzy
Brassica 15K, w Tematach 1. i 3. zostały prze-
prowadzone przez prof. dr hab. W. M. Karłow-
skiego oraz mgr P. Kopeć, z Zakładu Biologii
Obliczeniowej Instytutu Biologii Molekularnej
i Biotechnologii, Wydział Biologii Uniwersytetu
im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, w ramach
umowy na wykonanie usługi badawczej nr
48/2020/3/UAM.

Materiały i Metody

Materiał roślinny stanowiły dwie kolekcje
PB14–17 i PB17–20 obejmujące 50 genotypów
rzepaku ozimego, w tym: 37 nowych genotypów
linii hodowlanych oraz 13 odmian zarejestrowa-
nych. Nowe genotypy stanowiły: 4 mieszance F1
w systemie ogu-INRA, 9 komponentów rodzi-
cielskich mieszańców F1 – linie z genem resto-
rerem *Rfo* i męsko-sterylną cytoplazmą *ogura*
(CMS), 15 linii rekombinacyjnych rzepa-
ku ozimego podwójnie ulepszanego (typ canola),
3 linie rekombinacyjne mutanta o podwyższonej
zawartości kwasu oleinowego (C18:1) w oleju



nasion (typ HO), 5 linii rekombinacyjnych mutantów typu HOLL [o podwyższonej zawartości kwasu (C18:1) i obniżonej kwasu linolenowego (C18:3), LL], jak również 1 linia resyntetyczna (semi-RS). Ponadto, na 35 genotypów dodatkowych składały się inne niż zgromadzone w obu kolekcjach, nowe mieszańce F1 i ich formy rodzicielskie, a także odmiany zarejestrowane.

Analizę struktury genetycznej badanych dwóch kolekcji przeprowadzono przy użyciu markerów 109 loci SSR oraz dla 85 genotypów (dwie kolekcje oraz 35 genotypów dodatkowych) przy użyciu mikromacierzy SNP-chip 15K BRASSICA (TraitGenetics, Gatersleben, Niemcy). Specyficzne markery DNA zostały wykorzystane do identyfikacji genotypów z genem restorerem *Rfo* oraz posiadających męskosterylną cytoplazmę CMS *ogura* w genotypach mieszańców F1 i ich formach rodzicielskich, przy użyciu testu 'multipleks SCAR' (Mikołajczyk, i in., 2011). Identyfikację sekwencji nukleotydowych specyficznych dla mutacji HOR3 i HOR4 w genie desaturazy *BnaA.FAD2* w genotypach rzepaku typu HO i HOLL wykonano przy użyciu markera CAPS (Falentin, i in., 2007, Matuszczak, i in., 2020), a identyfikację form allelicznych genów desaturazy FAD3 w genomach A i C linii niskolinolenowych mutantów rzepaku oraz ich rekombinantów, typ HOLL, przy użyciu analizy SNaPshot (Mikołajczyk, i in. 2010).

Fenotypowanie kolekcji PB14–17 i PB17–20 przeprowadzono w wielopowtórzeniowych doświadczeniach polowych w dwóch lokalizacjach: Borowo – HR Strzelce Grupa IHAR i Łagiewniki – HR Smolice Grupa IHAR, w układzie bloków losowanych kompletnych, w trzech sezonach wegetacyjnych. Kolekcję PB14–17 badano odpowiednio w sezonach 2014/2015, 2015/2016 i 2016/2017, a kolekcję PB17–20 w sezonach 2017/2018, 2018/2019 oraz 2019/2020.

Badanie obu kolekcji obejmowało obserwacje i pomiary – wschody, stan roślin przed zimą, przezimowanie (skala 1–9⁰), wczesność (liczba dni od początku roku), długość kwitnienia (liczba dni). Na analizę plonu i cech struktury plonu składały się: długość łuszczyń, liczba nasion w łuszczyńce, MTN, plon nasion. Wykonano ocenę biochemiczną nasion, zbadano zawartość: kwasów tłuszczowych – oleinowego (C18:1), linolowego (C18:2), linolenowego (C18:3), sumy glukozyolanów (GLS) i glukozyolanów alkenowych (metodą chromatografii gazowej), tłuszczu w nasionach (wykonaną szerokopasmowym analizatorem magnetycznym – NMR) oraz białka i włókna – ADF, NDF (metodą bliskiej podczerwieni NIRS).

Wyniki doświadczeń polowych opracowano statystycznie przy pomocy arkusza kalkulacyjnego Excel, pakietu STATISTICA; analizę interakcji genotypowo-środowiskowej wykonano za pomocą modelu AMMI.

Analizy asocjacyjne GWAS wykonano: przy użyciu markerów SSR i AFLP, z zastosowaniem programu GenStat; przy użyciu mikromacierzy Brassica 15K – przeprowadzono w oparciu o mapę fizyczną markerów sporządzoną na podstawie przyrównania lokalnego sekwencji flankujących markery do genomu referencyjnego Darmor-*bzh* 4.1 (Chalhoub, i in., 2014). Dla każdego fenotypu przeprowadzono 4 analizy posługując się modelami GLM, MLM, FarmCPU oraz BLINK.

Opis wyników

Zróżnicowanie genetyczne w obrębie 50 genotypów badanych kolekcji PB14–17 i 17–20 z wykorzystaniem markerów 109 loci SSR przedstawiono graficznie w formie dendrogramu „rys. 1”. Zdefiniowano 420 alleli polimorficznych dla kolekcji PB14–17, od 2 do 9 alleli na 1 locus oraz 316 dla kolekcji PB17–20, od 2 do 7 alleli na 1 locus. Analiza ta umożliwiła określenie grup heterotycznych wskazujących na pokrewieństwo genetyczne pomiędzy nowo-wytwarzanymi liniami hodowlanymi, w odniesieniu do odmian zarejestrowanych rzepaku ozimego.

Zróżnicowanie genetyczne puli 85 genotypów (2 kolekcje i 35 dodatkowych) zbadano z wykorzystaniem 7393 różnicujących polimorfizmów SNP zdefiniowanych przy użyciu mikromacierzy 15K Brassica i przedstawiono w formie dendrogramu „rys. 2”. Zdefiniowane grupy heterotyczne stanowią cenną informację, niezbędną dla dalszych badań genetyczno-hodowlanych.

Monitorowano 10 genotypów z *Rfo* i CMS *ogura* oraz 4 z CMS *ogura*. Potwierdzenie czystości genotypów linii rodzicielskich z *Rfo* oraz mieszańców F1 jest niezbędne, ponieważ fenotypowo nie różnią się od linii populacyjnych w hodowli rekombinacyjnej.

Zdefiniowano 1 genotyp homozygotyczny oraz 7 heterozygotycznych ze względu na obecność zmutowanych alleli FAD2, odpowiedzialnych za podwyższoną zawartość kwasu oleinowego C18:2 w oleju nasion.

Wyodrębniono 3 genotypy homozygotyczne oraz 2 heterozygotyczne ze względu na obecność zmutowanych alleli genów FAD3, decydujących o niskiej zawartości kwasu linolenowego C18:3 w oleju nasion form LL i HOLL w badanych kolekcjach. Formy te będą dalej wykorzystywane

w eksperymentach hodowlanych.

W wyniku przeprowadzonej analizy wariancji stwierdzono istotne różnice dla wszystkich badanych cech pomiędzy badanymi genotypami i środowiskami dla obu analizowanych kolekcji rzepaku ozimego: PB 14–17 i PB 17–20 oraz istotną interakcję genotypu ze środowiskiem. Plon nasion, zawartość tłuszczu i białka w sposób istotny zależał od warunków środowiskowych, natomiast zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych w sposób istotny zależała przede wszystkim od genotypu i w mniejszym stopniu była modyfikowana przez warunki środowiskowe. Istotne zróżnicowanie obu kolekcji pozwoliło na przeprowadzenie badań związku markerów molekularnych z wybranymi cechami fenotypowymi.

Wykorzystując analizę fenotypową kolekcji PB14–17, PB17–20 oraz genotypową przy wykorzystaniu markerów SSR, AFLP, jak również różnicujących polimorfizmów SNP określonych przy użyciu mikromacierzy Brassica 15K poszukiwano markerów związanych w sposób istotny z ważnymi gospodarczo cechami takimi jak: plon nasion, zawartość tłuszczu, białka i sumy glukozydów oraz kwasów tłuszczowych C:18 jedno- i wielonienasyconych.

Na podstawie analiz genotypowych SSR i AFLP, w kolekcji PB14–17 zaobserwowano 3132 asocjacje z przynajmniej jedną cechą w przynajmniej jednym środowisku „tab. 1”, natomiast w kolekcji PB17–20, odpowiednio 3568 asocjacji. Najwięcej markerów SSR i AFLP było związanych z plonem nasion oraz kwasami tłuszczowymi C18:1, C18:2 i C18:3, w obu kolekcjach. Najmniej markerów w obu badanych kolekcjach było związanych z zawartością tłuszczu i białka w nasionach, w kolekcji PB14–17 i sumą glukozydów w kolekcji PB17–20 „tab. 2”.

Na podstawie analizy danych z mikromacierzy Brassica 15K do badań asocjacyjnych wykorzystano 7393 markery różnicujące. Z plonem nasion związane były 4 markery SNP w przypadku modelu Blink, z zawartością tłuszczu – 3 (Blink) oraz 5 (CPU), z zawartością C18:1 – 4 SNP w przypadku modelu FarmCPU, C18:2 – 2 (Blink) oraz 6 SNP (CPU), C18:3 – 4 (Blink) oraz 1 (CPU), z sumą GLS – 4 (Blink) oraz 3 (CPU), natomiast z zawartością białka w nasionach – 7 SNP (CPU).

Wnioski z prowadzonych badań

1. Zastosowanie markerów genetycznych typu SCAR, CAPS i SNaPshot, a także SSR i AFLP może zwiększyć efektywność i skuteczność

selekcji materiałów hodowlanych.

2. Wielopowtórzeniowe doświadczenia polowe pozwoliły na ocenę fenotypową obu kolekcji rzepaku ozimego, ocenę wpływu genotypu, środowiska oraz interakcji genotypowo-środowiskowej na najważniejsze cechy fenotypowe.
3. Plon nasion, zawartość tłuszczu i białka w sposób istotny statystycznie zależały od warunków środowiskowych. Zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych zależała przede wszystkim od genotypu, natomiast w mniejszym stopniu była modyfikowana przez warunki środowiskowe.
4. Stwierdzono istotny statystycznie związek markerów SSR i AFLP z wczesnością, plonem nasion, jego strukturą oraz z zawartością białka i osiemnastowęglowych, jedno- i wielonienasyconych kwasów tłuszczowych.

Najważniejsze osiągnięcia

1. Wdrożono do badań obu kolekcji rzepaku ozimego markery mikrosatelitarne (SSR), które znalazły zastosowanie zarówno w badaniach dystansu genetycznego jak również w poszukiwaniu związku z ważnymi gospodarczo cechami rzepaku.
2. Uzyskane informacje uzupełniają bazę danych analiz SSR dla genotypów rzepaku ozimego wytwarzanych w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu.
3. Zdefiniowanie pokrewieństwa pomiędzy genotypami badanymi w doświadczeniach polowych stanowi cenną informację niezbędną do planowania kolejnych badań genetycznych oraz przewidywania potencjału plonotwórczego tworzonych rekombinantów.
4. Rozpoczęto wysokoprzepustowe analizy genotypów rzepaku z wykorzystaniem mikromacierzy Brassica 15K, w ramach współpracy z prof. dr hab. W. M. Karłowskim oraz mgr P. Kopeć, z UAM w Poznaniu. Dzięki współpracy naukowej w tym zakresie, rozpoczętej w ramach realizowanego projektu, możliwa jest implementacja innowacyjnych metod analiz genomu rzepaku w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu.

Wykaz publikacji wyników

Wystąpienia ustne

Mikołajczyk K., Dabert M., Karłowski W. M., Bocianowski J., Nowakowska J., Spasibionek S., Popławska W., Liersch A., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. Molecular assays in winter oilseed rape breeding programs at the IHAR-PIB, Poznan Division. XXXIII Konfe-

rencia Naukowa Rośliny Oleiste – Postępy w Genetyce, Hodowli, Technologii i Analityce Lipidów, Poznań, 05–06.04.2016.

Mikołajczyk K., Spasibionek S., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. Development of HOLL winter rapeseed genotypes accompanied by MAS. GCIRC Technical Meeting Alnarp, Sweden, 08–11.05.2017.

Liersch A., Bocianowski J., Popławska W., Spasibionek S., Szała L., Mikołajczyk K., Matuszczak M., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. Markery molekularne związane z wybranymi cechami fenotypowymi rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) określone poprzez mapowanie asocjacyjne. XI sympozjum „Genetyka ilościowa roślin uprawnych”, Świeradów Zdrój, 06–09.06.2017.

Prezentowane plakaty

Liersch A., Bocianowski J., Popławska W., Spasibionek S., Piętka T., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I., Mikołajczyk K. Molecular characteristics of oilseed rape genetic resources collection from the IHAR-NRI, Research Division in Poznań. III National Conference „Genetics and Genomics in Improving Plants – From Model Plant to New Variety”, Poznań, 05–07.11. 2014.

Liersch A., Popławska W., Bocianowski J., Spasibionek S., Piętka T., Matuszczak M., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I., Mikołajczyk K. Phenotypic and molecular characterization of winter oilseed rape germplasms collected at the IHAR-NRI, Poznań, Poland. 14th IRC, Saskatoon, Canada, 05–09.07.2015.

Mikołajczyk K., Nowakowska J., Bocianowski J., Liersch A., Popławska W., Spasibionek S., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. Assessment of genetic diversity among oilseed rape (*Brassica napus* L.) cultivars using single locus microsatellite markers. 20th Eucarpia General Congress, Zurich, Switzerland, 29.08–01.09 2016.

Liersch A., Mikołajczyk K., Popławska W., Spasibionek S., Cegielska-Taras T., Bocianowski J., Nowakowska J., Bartkowiak-Broda I. AFLP and STR markers – a valuable tool for genetic diversity analysis of winter rapeseed (*B. napus* L.). V Polski Kongres Genetyki, Łódź, 19–22.09.2016.

Liersch A., Mikołajczyk K., Bocianowski J., Popławska W., Nowakowska J., Matuszczak M., Bartkowiak-Broda I., Michalski K., Krótka K. Analizy asocjacyjne markerów mikrosatelitarnych i AFLP z plonem oraz cechami jakościowymi nasion rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). XXXIV Konferencja Naukowa, Rośliny Oleiste – Postępy w Genetyce, Hodowli, Technologii i Analityce Lipidów, Poznań, 10–11.04.2018.

Liersch A., Mikołajczyk K., Bocianowski J., Popławska W., Nowakowska J., Matuszczak M., Michalski K., Krótka K., Bartkowiak-Broda I. Association of microsatellite and AFLP markers with yield and seed quality

in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). 21st Crucifer Genetics Conference, Brassica, Saint-Malo, France, 01–04.07.2018.

Liersch A., Bocianowski J., Popławska W., Michalski K., Krótka K., Mikołajczyk K., Nowakowska J., Matuszczak M., Wolko J., Bartkowiak-Broda I. Analiza asocjacji markerów mikrosatelitarnych i AFLP z elementami struktury plonu i plonem kolekcji genotypów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, 05–08.02.2019.

Liersch A., Mikołajczyk K., Bocianowski J., Nowakowska J., Matuszczak M., Michalski K., Krótka K., Popławska W., Bartkowiak-Broda I. Association of microsatellite and AFLP markers with traits of agronomic importance in winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). 15th IRC, Berlin, Germany, 16–19.06.2019.

Matuszczak M., Kopeć P., Wolko J., Liersch A., Szała L., Sosnowska K., Cegielska-Taras T., Mikołajczyk K., Karłowski W., Bartkowiak-Broda I. Zastosowanie mikromacierzy Brassica 60K w analizie zróżnicowania genetycznego rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). IV Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i Genomika w Doskonaleniu Roślin Uprawnych” Od rośliny modelowej do nowej odmiany, Poznań, 05–07.11.2019.

Publikacje naukowe

Liersch A., Bocianowski J., Nowosad K., Mikołajczyk K., Spasibionek S., Wielebski F., Matuszczak M., Szała L., Cegielska-Taras T., Sosnowska K., Bartkowiak-Broda I. 2020. Effect of Genotype × Environment Interaction for Seed Traits in Winter Oilseed Rape (*Brassica napus* L.). *Agriculture*, 10 (12), 607. <https://doi.org/10.3390/agriculture10120607>;

[IF=2,072; MEiN=100 pkt]

Matuszczak M., Spasibionek S., Gacek K., Bartkowiak-Broda I. 2020. Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) marker for identification of two mutant alleles of the rapeseed *BnaA.FAD2* gene. *Mol Biol Rep* 47: 7607–7621. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05828-2>; [IF=1.402; MEiN=70 pkt]

Bartkowiak-Broda I., Liersch A., Matuszczak M., Mikołajczyk K., Popławska W., Wolko J., Nowakowska J. 2019. Badanie genomu rzepaku ozimego przy wykorzystaniu markerów molekularnych. The investigations of winter rapeseed genome with the use of molecular markers. *Biuletyn IHAR*, 286: 183–189. [MEiN=20 pkt]

Literatura

Chalhoub, B., Denoeud, F., Liu, S., Parkin, I. A. P., Tang, H., Wang, X., i in. (2014). Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science*, 345: 950–953. doi: 10.1126/science.1253435;

Falentin, C., Brégeon, M., Lucas, M. O., Renard, M. (2007)

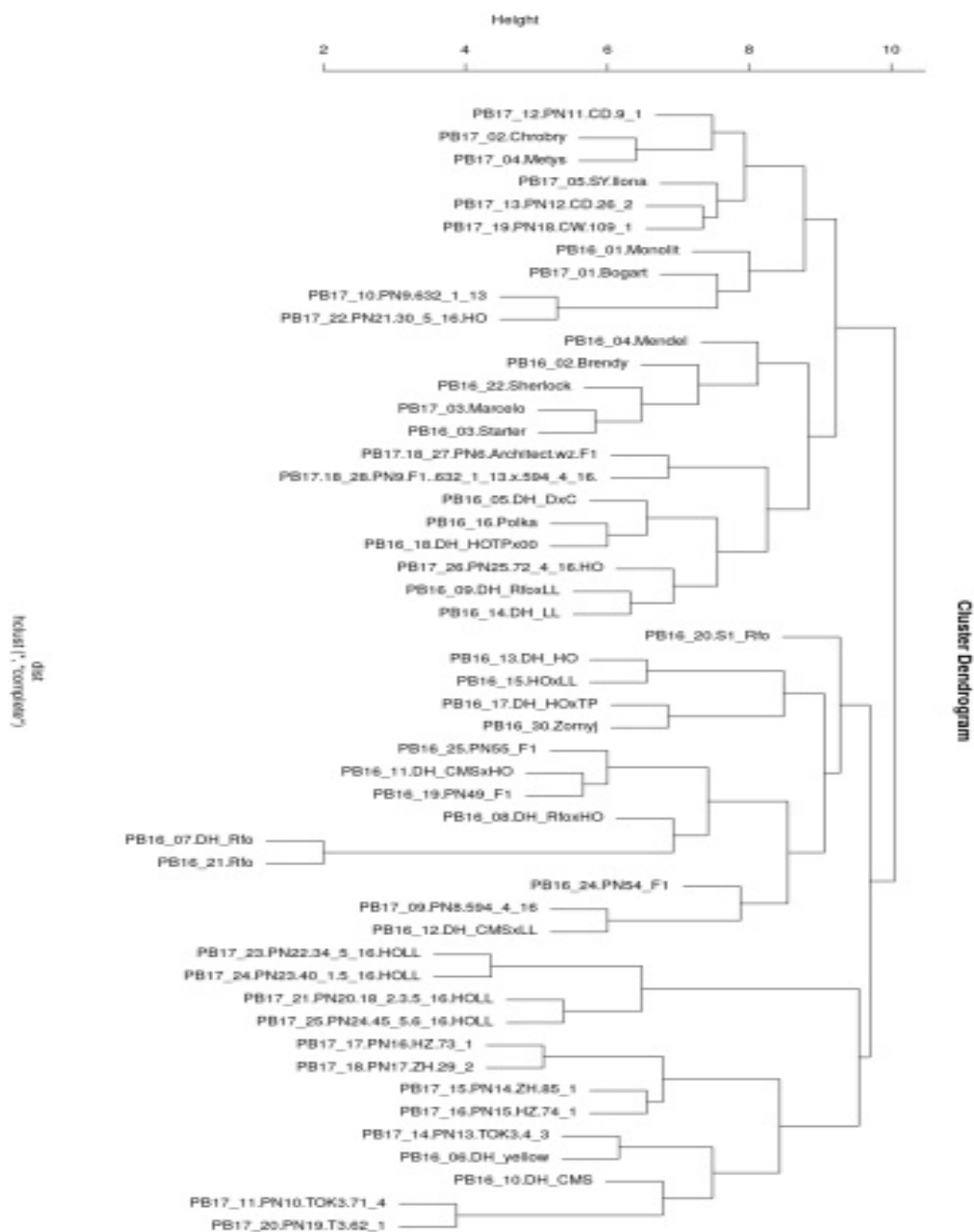
Genetic markers for high oleic content in plants. International Patent Publication WO 2007/138444, 6 December 2007.

Matuszczak, M., Spasibionek S., Gacek, K., Bartkowiak-Broda, I. (2020). Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) marker for identification of two mutant alleles of the rapeseed *BnaA.FAD2* gene. *Mol Biol Rep*, 47: 7607–7621. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05828-2>;

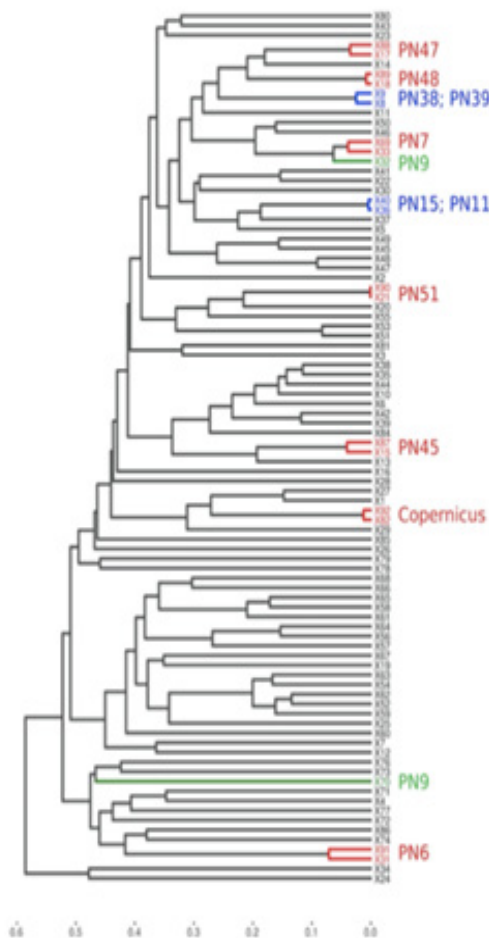
Mikolajczyk, K., Bartkowiak-Broda, I., Poplawska, W.,

Spasibionek, S., Dobrzycka, A., Dabert, M. (2011) A multiplex fluorescent PCR assay in molecular breeding of oilseed rape. W: *Plant Breeding*, wyd. przez InTech Open Access Publisher (red. Abdurakmonov I. Y.), rozdz. 8, str. 185–200 (całość 352 str.).

Mikolajczyk, K., Dabert, M., Karlowski, W. M., Spasibionek, S., Nowakowska, J., Cegielska-Taras, T., et al. (2010). Allele-specific SNP markers for the new low linolenic mutant genotype of winter oilseed rape. *Plant Breeding*, 129: 502–507.



Rys. 1. Zróżnicowanie genetyczne genotypów kolekcji PB14–17 i PB17–20 z wykorzystaniem 109 loci SSR.



Rys. 2. Zróżnicowanie 85 genotypów z wykorzystaniem polimorfizmów SNP zdefiniowanych przy użyciu mikromacierzy 15K Brassica.

Tabela 1

Liczba markerów DNA SSR i AFLP związanych z wybranymi cechami fenotypowymi kolekcji genotypów PB14–17.

Cecha/Liczba markerów	Plon nasion	Zawartość tłuszczu	C18:1	C18:2	C18:3	Suma GLS	Zawartość białka
SSR – 5 środowisk	6	-	4	4	-	-	1
SSR – 6 środowisk	4	1	2	2	13	2	-
AFLP – 5 środowisk	8	1	6	8	5	2	-
AFLP – 6 środowisk	3	-	6	7	4	4	-

Tabela 2

Liczba markerów DNA SSR, AFLP i polimorfizmów SNP związanych z wybranymi cechami fenotypowymi kolekcji genotypów PB17–20.

Cecha/Liczba markerów	Plon nasion	Zawartość tłuszczu	C18:1	C18:2	C18:3	Suma GLS	Zawartość białka
SSR – 5 środowisk	8	-	2	3	19	-	11
SSR – 6 środowisk	10	-	38	29	9	-	-
AFLP – 5 środowisk	5	-	-	1	9	1	16
AFLP – 6 środowisk	3	-	11	8	4	2	-
SNP_Brassica 15K, 6 środowisk, 69 genotypów	4	3–5	4	2–6	4–1	4–3	7

Badanie bioróżnorodności gatunków z plemienia *Brassicaceae* w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny

Biodiversity studies of species of *Brassicaceae* to obtain forms of oilseed rape improved in terms of resistance to pathogens

Michał Starzycki✉, Elżbieta Starzycka-Korbas, Renata Daleka

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05–870 Błonie,
Samodzielna Pracownia Stresów Środowiskowych Roślin Oleistych IHAR-PIB w Poznaniu ul. Strzeszyńska 36,
60–479 Poznań

✉ e-mail: m.starzycki@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: mieszańce międzygatunkowe, odporność na patogeny, rzepak

Cel prowadzonych badań

Podstawowym celem prowadzonych badań było wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych techniką *in vitro* oraz wykorzystanie technik klonowania *in vitro* i *in vivo* dla otrzymania roślin mieszańców międzygatunkowych. Ponadto poszukiwano genotypów z plemienia *Brassicaceae* odpornych na porażenie powodowane przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Podczas prowadzonych prac przeprowadzono także badania odporności siewek otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych i roślin kontrolnych i donorowych rzepaku, wybranych genotypów na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. (punkt ten dotyczy tylko roślin kontrolnych i donorowych). Dla wybranych obiektów wykonano analizy DNA u roślin mieszańcowych.

Materiały Metody

Do krzyżowań międzygatunkowych wykorzystano preselekcjonowane na odporność genotypy roślin: kapustę brukselską *B. oleracea* var. *gemmifera* $2n = 18$ (CC), kapustę pastewną *B. oleracea* var. *acephala* $2n = 18$ (CC), kapustę jarmuż *B. oleracea* var. *acephala* subvar. *Lacinista* $2n = 18$ (CC), oraz *B. campestris* o liczbie chromosomów $2n = 20$ (AA), *B. carinata* $2n = 34$ (BBCC), (Starzycki i in., 2017; Starzycki i in., 2018). Po osiągnięciu przez rośliny fazy kwitnienia krzyżowano je tak, aby otrzymane potomstwo posiadało cytoplazmę genotypów selekcjonowanych pod względem odporności na *Alternaria*

sp. i *Leptosphaeria* sp. Otrzymane, preparowane embriony stadiów: globularnych lub sercowatych zostały nałożone na pożywki agarowe B5 z fitohormonami (cytokinina BAP 1mg/l i auksyna 0,01mg/l IAA) lub bez fitohormonów dla większych stadiów.

Poza pracami laboratoryjnymi, wykonano badania odporności na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., form donorowych z plemienia *Brassicaceae* w warunkach polowych w doświadczeniach DW (Starzycka-Korbas i in., 2015; Starzycki i in., 2019). Bonitację odporności wykonano wielokrotnie w ciągu sezonu wegetacyjnego ze względu na możliwość wystąpienia chorób od wiosny do fazy zbioru.

Wybrane rośliny – siewki mieszańcowe testowano *in vitro* testem Williamsa na patogeny grzybowe: *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. (Starzycki i in., 2016; Starzycka-Korbas i in., 2016). Dla stwierdzenia czystości gatunkowej użytych w testach grzybów stosowano metodę sekwencjonowania DNA ITS oraz NGS (Starzycka i in., 2014). Ponadto po użyciu opracowanej w Pracowni metody kaleczenia łodyg i inokulacji patogenami, wyselekcjonowano odporne starsze rośliny donorowe. Otrzymane potomstwo pochodzące z mieszańców międzygatunkowych posłużyło do badań odporności na poziomie DNA-RAPD.

Opis wyników

W obrębie mieszańców międzygatunkowych corocznie wykonano 50 przekrzyżowań, z czego



ok. 15% udanych. Z tego materiału preparowano żywe zarodki. Także, co roku klonowano 50 nowych genotypów w warunkach *in vitro* i *in vivo* w kulturach hydroponicznych oraz w glebie.

Prowadzone badania zmierzały w kierunku otrzymywania roślin rzepaku o genotypach tolerancyjnych lub odpornych na *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. Podczas wykonywania powyższych prac, (co roku) zaobserwowano dwie następujące zależności. Pierwsza to stosunkowo dobra wydajność w otrzymaniu embrionów mieszańcowych, a druga związana była z zamieraniem zarodków globularnych. W pracy podjęto próby hodowli mieszańców międzygatunkowych stosując metodę polegającą na „przykryciu powierzchniowym – osłonięciu” zarodków (tylko małych) pożywką B5 bez antybiotyków, co przyczyniło się do podwyższenia wydajności. Otrzymane na drodze *in vitro* klonowane mieszańce międzygatunkowe, bardzo dobrze ukorzeniały się w kulturach hydroponicznych, a po przesadzeniu ich do gleby w 100% rozwijały się prawidłowo. W obrębie roślin donorowych oceniono indeks porażenia przez *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. poszczególnych form *B. napus*. Z reguły od wiosny do końca kwitnienia nie obserwowano porażen roślin. Dopiero silniejsze infekcje wystąpiły przed zbiorem, dlatego w tym okresie dokonano ich szczegółowej bonitacji. Pod koniec badań najodporniejsze na *Leptosphaeria* sp. były formy: Oriolus38A/18295x 645TP/06 p. (Br. X Bn) x Lisek (7D/16) x (79 bt/19)- IP= 0,038, a na *Alternaria* sp. Amazon x 78 bt-IP= 0,033. Wykonano także badania odporności rzepaku w doświadczeniach DW2 i PDO wskazując odmiany o wyższej odporności na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Powyższe badania IP – indeksów porażenia były prowadzone przez cały okres trwania projektu w warunkach polowych w miejscowościach: Małyszyn, Borowo i Bąków. Na podstawie badań odporności indywidualnie ocenianych pod względem chorób (*Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.) roślin donorowych z płemienia *Brassicae*, wyselekcjonowano najodporniejsze z doświadczeń w celu sumowania rezystencji. Na podstawie otrzymanych wyników wyróżniono: genotypy rzepaku oraz grupy odmian charakteryzujące się podwyższoną odpornością na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. (Starzycka-Korbas i in., 2020).

Ponadto dla stwierdzenia odporności otrzymanych roślin mieszańcowych na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. użyto testu Williamsa *in vitro*. Na siewkach wybranych genotypów oceniano indeksy porażenia (IP). Najodporniejsze

na *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. były kombinacje: 295 x 645TP/06 p. (Br. X Bn) x Lisek (7D/16) x MEN23A/17xAmaz/18 x Ori/19 oraz Basalt/18 x 420/08 38B.t.x B.n./3 (17D/16) x MEN33A/17xAmazon. Przeprowadzono także badania odporności roślin starszych mieszańców międzygatunkowych, donorowych. Selekcjonowano formy wykazujące maksymalną odporność na wybrane patotypy z rodzaju *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp., stosując metodę zakażenia łądyg. Z wybranych obiektów: (kap.biała x bruk.) x (B. cret. x B.n.) i (Kapusta Taurica x Rzepak B.n.) odpornych mieszańców międzygatunkowych wyizolowano DNA do badań w celu wyboru fragmentów DNA, które mogły być kojarzone z odpornością roślin. Startery OPY 10 i OPW 04 amplifikowały fragmenty DNA, które okazały się dodatnio skorelowane z odpornością badanych roślin (Starzycka-Korbas i in., 2020).

Wnioski z prowadzonych badań

Użycie do hodowli *in vitro* pożywek pozbawionych antybiotyków oraz zastosowanie powierzchniowej osłony medium dla zarodków, pozwoliło na zachowanie ich możliwości wzrostowych i mniejszego procentu ich zamierania. Najbardziej prawdopodobną przyczyną zamierania bardzo małych zarodków mogą być genotypy mateczne i ojcowskie użyte do pierwszych krzyżowań. Potwierdzono także przydatność kultur hydroponicznych, dla otrzymania roślin mieszańcowych. Metoda ta pozwoliła na otrzymanie wyższego procentu żywych roślin mieszańców międzygatunkowych po przesadzeniu ich do warunków glebowych.

Podczas prowadzenia badań nad odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. oraz odmian rzepaku (roślin donorowych) odnotowano pewien procent roślin, u których porażenie było na niskim poziomie. Coroczna selekcja i wybór najodporniejszych form, pozwoliła na piramidyzację odporności u *B. napus*. Wyniki odporności poziomej (poligenicznej) rzepaku posiadają charakter naukowy oraz aplikacyjny dla rolnictwa, wskazując odmiany o małym stopniu porażenia na podane patogeny.

Potwierdzono także przydatność testów laboratoryjnych *in vitro* do oceny odporności mieszańców międzygatunkowych oraz rzepaku w stadium siewki.

- Metoda inokulacji patogenami *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., polegającej na kaleczeniu i zakażaniu łądyg pozwala na wyselekcjonowanie nowych genotypów odpornych.
- Stwierdzono przydatność starterów OPY

10 oraz OPW 04, których amplikony mogą być kojarzone z podwyższoną odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Najbardziej odporne genotypy w większości przypadków posiadały DNA pochodzące od gatunku *B. oleracea*, *B. taurica* oraz innych kapust.

Osiągnięcia projektu

- Zastosowanie do hodowli in vitro pożywek pozbawionych antybiotyków oraz użycie powierzchniowej osłony medium dla zarodków globularnych mieszańców międzygatunkowych, pozwoliło na ich wzrost oraz mniejszy procent ich zamierania.
- Podczas prowadzenia badań nad odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. oraz odmian rzepaku odnotowano pewien procent roślin, u których porażenie było na niskim poziomie. Coroczna selekcja i wybór najodporniejszych form, pozwoliła na sumowanie efektu odporności u *B. napus*. Wyniki odporności poziomej (poligenicznej) rzepaku posiadają charakter naukowy oraz aplikacyjny dla rolnictwa, wskazują odmiany o małym stopniu porażenia na badane patogeny.

Potwierdzono również przydatność testów laboratoryjnych in vitro do oceny odporności mieszańców międzygatunkowych oraz rzepaku w stadium siewki. Ponadto metoda in vivo, inokulacji patogenami *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., polegającej na kaleczeniu i zakażaniu łodyg roślin pozwala na wyselekcjonowanie nowych odpornych genotypów. Po badaniach DNA stwierdzono przydatność starterów, OPY 10 oraz OPW 04, których amplikony były skorelowane z podwyższoną odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Najbardziej odporne genotypy w większości przypadków posiadały DNA pochodzące od gatunku *B. taurica* oraz innych kapust *B. oleracea*.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

Starzycki M, Starzycka-Korbas E., Kamiński P. 2017. Badanie odporności mieszańców międzygatunkowych przy pomocy metod inokulacyjnych oraz analiz DNA na porażenie powodowane przez patogeny *Leptosphaeria* spp.

oraz *Alternaria* spp. Biuletyn IHAR 2017, str. 123–138 „13 Ogólnopolska Konferencja Naukowa – Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane w dniach od 30.01.17. – 03.02.17.

Starzycki M., Starzycka-Korbas E., Kamiński P., Rybiński W. 2019. Plonowanie mieszańców międzygatunkowych z płemienia *Brassicaceae* DC. i ich odporność na porażenie powodowane przez najgroźniejsze patogeny w 2018 roku. Biuletyn IHAR nr 285. Str. 331–332.

Doniesienia konferencyjne

Starzycka E., Starzycki M., Rybiński W., Dabert M. 2014. Identification of rape pathogens' on interspecific crosses by DNA sequencing ITS. Conference of the European Foundation for Plant Pathology, Healthy plants– healthy people 8–13 September 2014, Krakow, Poland, Plakat, Book of abstracts: 218.

Starzycka-Korbas E., Starzycki M., Rybinski W., Lyczko L. 2015. Reducing plant infection caused by *Alternaria* spp., *Leptosphaeria* spp. after using EM preparation on yellow-seed forms of *B. napus* obtained in vitro “interspecific hybrids”. Book of abstracts: Bari Italy 07–11 czerwca 2015. Book of abstracts: 162.

Starzycki M, Starzycka-Korbas E., Kamiński P., Rybiński W. 2016. Porównanie odporności siewek in vitro oraz roślin in vivo mieszańców międzygatunkowych po inokulacji patogenami *Leptosphaeria* spp. i *Alternaria* spp. – poster i streszczenie w wydawnictwie konferencyjnym RO str. 94–96.

Starzycka-Korbas E., Starzycki M., Rybiński W. 2016. Test Williamsa i jego modyfikacja w badaniach nad odpornością rzepaku *Brassica napus* L. na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* spp. – poster i streszczenie w wydawnictwie konferencyjnym RO str. 93–94.

Starzycki M., Starzycka-Korbas E., Kamiński P., Rybiński W. 2018. Mieszańce międzygatunkowe z płemienia *Brassicaceae* DC. i ich odporność na porażenie powodowane przez patogeny *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp. w 2017 roku. XXXIV Konferencja Naukowa Rośliny Oleiste – Postępy w Genetyce, Hodowli, Technologii i Analizie Lipidów, 10–11.04. 2018 Poznań, Str. 79–81.

Starzycka-Korbas E., Starzycki M., Budzianowski G., Stefanowicz M. 2020. Materiał informacyjny dla hodowców i plantatorów rzepaku dotyczący chorób: *Leptosphaeria* spp. oraz *Alternaria* spp., występujących na odmianach *B. napus* zachodniej Polski (wyniki z 3 doświadczeń PDO, 2020, spr. PBwPR zad. 49).



INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE
NATIONAL RESEARCH INSTITUTE
 REGON 000079480-00080, NIP 529-000-70-29, KRS 0000074008
 Oddział Poznań, ul. Strzeszyńska 36, 60-479 Poznań,
 tel. + (48 61) 823 37 21; fax +(48 61) 823 38 71; postbox@nico.ihar.poznan.pl
 Nr konta: 48 1160 2202 0000 0000 5809 8187, Bank Millennium S.A. Poznań

IHAR PIB w Poznaniu,

Poznań, 19.09.2020 r.

Samodzielna Pracownia Stresów Środowiskowych Roślin Oleistych
Independent Laboratory of Environmental Stress in Oilseed Plants

Sz. Pan

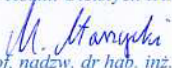
Dr Grzegorz Budzianowski

Zgodnie z harmonogramem realizacji tematu lp. 49 PBwPR: „Badanie bioróżnorodności gatunków z płemienia *Brassicaceae* w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny”, Samodzielna Pracownia Stresów Środowiskowych Roślin Oleistych, IHAR-PIB w Poznaniu, **przekazujemy** do Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o., Grupa IHAR, Oddział Małyszynie 5 rodów rzepaku ozimego, otrzymanych z mieszańców międzygatunkowych. Przekazane linie charakteryzują się podwyższoną odpornością na patogeny pochodzenia grzybowego.

L.p	Pochodzenie mieszańców międzygatunkowych	Cytoplazma kapusty	Data zbioru
1.	85 Oriolus38A/18295x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek (7D/16) x (79 bt/19)	Kapusta Brukselska	2020
2.	71 295 x 645TP/06 p.(Br. X Bn)x Lisek (7D/16) xMEN23A/17xAmaz/18 x Ori/19	Kapusta Brukselska	2020
3.	69 301 x Digr/06 p.(Choryń x Bn)xCalif (3D/16)xMEN21A/17x Amazon/18 xMen	Kapusta Pastewna	2020
4.	Mendel /18x 10 Tau x B.n./10 (18A/15) xM	Kapusta Taurica	2020
5.	Mieszanina pojedynków z 3 linii zółtych 5, 13, 20, z 2019 r.	Kapusta Jarmuz	2020

Z poważaniem,

Kierownik Samodzielnej Pracowni Stresów
 Środowiskowych Roślin Oleistych IHAR PIB w Poznaniu


 Prof. nadzw. dr hab. inż. Michał Starzycki

Rys. 1. Dokument stwierdzający przekazanie nasion mieszańców międzygatunkowych do hodowli: HR Strzelce Spółka z o.o. Oddział w Małyszynie.

Zastosowanie konwencjonalnych i molekularnych narzędzi fitopatologicznych w poszukiwaniu źródeł odporności na kiłę kapusty oraz charakterystyka aktualnej populacji patogenu w Polsce

The use of conventional and molecular phytopathological tools in searching for sources of resistance to clubroot and characterisation of the current pathogen population in Poland

Małgorzata Jędrzycka¹✉, Joanna Kaczmarek¹, Witold Irzykowski¹, Joanna Majka¹, Tomasz Książczyk¹, Noor Ramzi¹, Janetta Niemann², Idzi Siatkowski², Agnieszka Wolna-Maruwka², Lidia Irzykowska², Marek Korbas³, Ewa Jajor³, Jakub Danielewicz³, Anna Nieróbca⁴

¹Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

³Instytut Ochrony Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Poznaniu

⁴Instytut Uprawy, Nawożenia i Gleboznawstwa w Puławach

✉ e-mail: mjed@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: *Brassica*, kiła kapusty, odporność rzepaku, *Plasmodiophora brassicae*;

Cel badań

Celem projektu były:

1. identyfikacja źródeł odporności na kiłę kapusty w światowych zasobach kolekcyjnych *Brassica*,
2. uzyskanie form mieszańcowych w obrębie Brassicaceae oraz ich charakterystyka cytologiczna i cytogenetyczna,
3. określenie i utrwalenie odporności form mieszańcowych na kiłę kapusty,
4. oznaczenie składu patotypów *Plasmodiophora brassicae* aktualnie porażających rzepak w Polsce.

Cele projektu osiągnięto. Hipoteza badawcza zakładała zmienność patotypów patogenu w Polsce oraz występowanie odporności rasowo-specyficznej i możliwość przeniesienia jej do rzepaku metodami kultur tkankowych. Hipotezę potwierdzono. W trakcie projektu prowadzono szeroko zakrojone testy oceny odporności roślin z rodzajów *Brassica* i *Raphanus* na kiłę kapusty w materiałach ze światowych kolekcji oraz form mieszańcowych w obrębie Brassicaceae.

Materiały i Metody

Roślina

Corocznie oceniano odporność 300 linii, w tym głównie *Brassica* sp., a także *Raphanus* sp. uzyskanych z banków genów a zwłaszcza Krajowych Roślinnych Zasobów Genowych IHAR w Radzikowie (Polska), Centre for Genetic Resources (Wageningen, Holandia), UK Vegetable Genebank, Warwick Crop Centre, Genetic Resources Unit (Warwick, Wielka Brytania) i Plant Gene Resources (Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon, Saskatchewan, Kanada). Zbadano także odporność form *Brassica* i *Raphanus* uzyskanych z Kurdystanu (Irak), form mieszańcowych otrzymanych w niniejszym projekcie na UP w Poznaniu oraz form mieszańcowych uzyskanych w IHAR Oddział w Poznaniu. W badaniach każdorazowo stosowano genotypy kontrolne cechujące się odpornością na kiłę kapusty oraz formy podatne. Wśród form odpornych znajdowały się odmiany rzepaku zarejestrowane w COBORU lub w katalogu UE i wcześniej sprawdzone pod względem odporności w ramach odrębnie przeprowadzonych testów



w IGR PAN np. odmiany SY Alister F1 (Syngenta), Alasco F1 (LG Seeds), Andromeda F1 (LG Seeds), Archimedes F1 (LG Seeds) i Mendel (NPZ Lembke). Wzorcami podatności były odmiany *B. rapa* Bristol, Granaat i Hilton oraz odmiany mieszańcowe rzepaku Architekt F1 (LG Seeds) i Graf F1 (Monsanto) oraz odmiany populacyjne Californium (Monsanto) i Harry (Saatzucht Donau, Austria).

Oznaczenia prowadzono w formie testów inokulacyjnych w doniczkopaletach. W celu wykonania testu odpornościowego poszczególne genotypy wysiewano do gleby o pH 5.8. Po upływie 5 dni, do podłoża, w którym rosły młode rośliny w stadium wczesnego rozwoju liści dodawano inokulum w stężeniu 1×10^7 zarodników *P. brassicae* ml⁻¹. Testy odpornościowe każdorazowo prowadzono z zastosowaniem tych samych sześciu patotypów pierwotniaka *Plasmodiophora brassicae*, wywołującego kiłkę kapusty (P1A, P1B, P2A, P3A, P4A, P5A). Inokulację każdym z patotypów przeprowadzono na osobnych tacach dla uniknięcia przenoszenia się zarodników w wodzie. Mnożenie materiału prowadzono przez osiem tygodni, natomiast testy inokulacyjne trwały sześć tygodni. Ocenę odporności wykonywano w skali 0–4, gdzie 0 oznaczało rośliny zdrowe, natomiast 4 – rośliny z korzeniami całkowicie przekształconymi w wyrośla. Badania wykonywano w szklarniach Wielkopolskiego Centrum Zaawansowanych Technologii oraz szklarni IGR PAN przeznaczonej do testowania odporności roślin na choroby. Oba w/w miejsca doświadczeń posiadały kontrolowane komputerowo systemy sterujące temperaturą i oświetleniem.

W celu otrzymania mieszańców międzygatunkowych krzyżowano wybrane odmiany rzepaku ozimego z genotypami odpornymi na kiłkę kapusty. Materiał roślinny do badań stanowiły odmiany rzepaku ozimego (*B. napus*) Jet Neuf, Californium, Lisek, Graf F1, Hybrirock, Exocet F1, Roxete, Walery, Anderson, Arsenal, Andromeda, Monolit oraz gatunki pokrewne z rodzaju *Brassica*, w tym *B. rapa* ssp. *pekinensis* – 3 genotypy kapusty pekińskiej: j-1, j-2 oraz 08.006169, *B. rapa* var. *rapa* (Fodder turnip), *B. rapa* ssp. *didofoma* CR 2301/99, genotypy *B. rapa* Akiriso i Akimeki, *B. rapa* ssp. *trilocularis* oraz *B. oleracea* i *Raphanus sativus*. Zastosowano technikę kultur *in vitro* izolowanych zarodków. Kastrację poszczególnych odmian rzepaku ozimego wykonywano w stadium wyrosniętego pąka kwiatowego. Zapylenie pyłkiem komponentu ojcowskiego wykonywano bezpośrednio po kastracji. Część zapylnych słupków pozostawiono na roślinach do momentu

pełnej dojrzałości łuszczyn. Z pozostałych zapylnych słupków pobierano łuszczyny w wieku 14 – 19 dni od zapylenia celem izolacji zarodków i ich hodowli w warunkach *in vitro*. Hodowlę *in vitro* izolowanych zarodków prowadzono przy użyciu pożywek White'a, Murashige i Skoog'a bez oraz z modyfikacją Kellera oraz Nisha i Nitsha (H₃). Zregenerowane rośliny, po uprzednim ukorzenieniu na pożywce H₃ sadzono do gleby w doniczkach i przez okres 3 tygodni utrzymywano w temperaturze 20°C. Następnie na okres 10 tygodni rośliny umieszczano w chłodni (+2°C) celem jaryzacji. Po tym czasie rośliny umieszczano w szklarni i doprowadzano do kwitnienia. Analizę jakości nasion wybranych linii mieszańcowych otrzymanych z krzyżowań oddalonych wykonano metodą NIRS. Ogółem analizom jakości poddano 20 kombinacji roślin mieszańcowych, średnio po 15 linii, dla których analizowano nasiona z 3 pojedynczych względem zawartości tłuszczu, białka, glukozyolanów oraz włókna (ADF i NDF).

W celu identyfikacji chromosomów u gatunków i form mieszańcowych *Brassicaceae*, wykorzystano technikę fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z sekwencjami chromosomowo i genomowo specyficznymi. Przeprowadzono mapowanie fizyczne sekwencji 5S i 35S rDNA w chromosomach *B. napus*, *B. oleracea* i *B. rapa* i w formach mieszańcowych. Zastosowane sondy w metodzie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* pozwoliły na określenie całkowitej liczby loci 5S i 35S rDNA.

W celu przeprowadzenia badań cytologicznych wszystkie rośliny hodowano w warunkach szklarniowych. Dla zapewnienia odpowiedniego stadium oceny zbiorów korzeni z siewek badanych form wykonywano kilkukrotnie. Zebrane wierzchołki korzeni traktowano roztworem 8-hydroksychinolin, a następnie inkubowano przez 1 godzinę w temp. 4°C oraz 2 godziny w ciemności w temperaturze pokojowej. Materiał utrwalano w mieszaninie alkoholu etylowego i lodowatego kwasu octowego (3:1). Utrwalony materiał macerowano w mieszaninie enzymów (20% pektynaza, 1% celulaza, 1% celulaza 'Onozuka R-10'). Preparaty cytologiczne analizowano przy użyciu mikroskopu kontrastowo-fazowego. Do mapowania fizycznego wykorzystano sondy: (i) 5S rDNA: sekwencja pTa794 o długości 410 pz wyizolowana z *Triticum aestivum* (Gerlach, Dyer, 1980); (ii) 35S rDNA: odcinek kodujący geny 26S rDNA o długości 2,3 kbp, otrzymany w wyniku trawienia fragmentu 18S-5,8S-26S rDNA *Arabidopsis thaliana* (Unfried, Gruendler, 1990) przy pomocy enzymu restrykcyjnego *Cla*I. Procedurę FISH wykonano

według metodyki opracowanej przez Hasteroka i in. (2006), zmodyfikowanej przez Majkę i in. (2017). Detekcję sond znakowanych digoksygeniną przeprowadzono z wykorzystaniem przeciwciała I-rzędowego, skoniugowanego z izotiocyjanianem fluoresceiny. Analizę preparatów mikroskopowych przeprowadzono przy użyciu epifluorescencyjnego automatycznego mikroskopu BX-61 (Olympus) z systemem analizy obrazu (Cell-F). Dokumentację fotograficzną wykonano przy zastosowaniu cyfrowej kamery monochromatycznej XM10. Otrzymane obrazy przetwarzano graficznie przy użyciu programu Micrografx Picture Publisher 10.0.

Patogen

Corocznie oznaczano przynależność 50 izolatów *P. brassicae* zebranych z terenu Polski do patotypów oraz charakteryzowano je pod względem molekularnym. Oznaczenie patotypów wykonywano na zestawie testowym Somé i in. (1996). Porażenie prób roślin, gleby i wody badano także z wykorzystaniem metod real time qPCR oraz LAMP. W celu scharakteryzowania izolatów pod względem molekularnym ze świeżych wyrosli przygotowano zawiesiny zarodników, z których izolowano DNA. Fragmenty DNA powielone metodą PCR znakowano fluorescencyjnie, oczyszczano z niewłączonych fluorochromów a następnie

sekwencjonowano w serwisie zewnętrznym. Uzyskane sekwencje zestawiano przy pomocy programów MEGA i Clustal X. Ponadto badano mikrobiom glebowy w celu poznania składu zbiorowisk mikroorganizmów występujących w ryzosferze roślin rzepaku porażonych przez *P. brassicae*. W badaniu stosowano metodę Shotgun w systemie MiSeq Illumina, a opracowanie bioinformatyczne wykonywano w programie R. Rekomendacje dotyczące uprawy rzepaku i zasiewów odmian kiłoodpornych opracowano na podstawie progów wyznaczonych metodą real-time qPCR przez Wallenhammar i in. (2012).

Wyniki

Roślina

Badany materiał był w przeważającej części podatny lub bardzo podatny na porażenie przez *P. brassicae*, bez wyraźnego zróżnicowania reakcji na poszczególne rasy patogenu. Szczególnie podatne okazały się genotypy *B. juncea*. Wśród genotypów *B. rapa* i *B. oleracea* znaleziono formy cechujące się odpornością rasowo-specyficzną na jeden lub kilka patotypów *P. brassicae* (tab. 1). Odmiany wzorcowe cechowała odporność na rasy P1A, P2A-P5A i podatność na rasę P2B. Genotypy *Raphanus* były w większości odporne na kiłę kapusty.

Tabela 1

Odporność form *Brassica* z Centre for Genetic Resources (CGN), Wageningen, Holandia oraz Plant Gene Resources (CN), Saskatoon, Kanada na poszczególne patotypy *Plasmodiophora brassicae*, wywołujące kiłę kapusty (Ramzi, i in. 2018).

Gatunek <i>Brassica</i>	Forma	Patotyp					
		P1A	P2A	P3A	P4A	P5A	PIB
<i>B. oleracea</i>	CGN06903	XX	X	XX	X	XX	XX
	CGN18947		X	X		XX	XX
	CGN11062		XX		XX		
	CGN11127	XX					
	CGN11128						XX
	CGN11129		XX			X	
	CGN11130	X	X	X	X	X	X
	CGN11131	XX	XX		XX	XX	
	CGN11138		X				
	CGN11150	XX	XX	XX	XX	XX	XX
	CGN14048	XX	XX	XX	XX	XX	X
	CGN14078	XX	XX	XX	XX	XX	XX
	CGN15227	XX	XX	XX	XX	XX	XX
	<i>B. napus</i>	CN114234	XX	XX	XX		XX
CN105404				XX		XX	
<i>B. rapa</i>	CN105405		XX	XX	XX	XX	
	CN105406		XX	XX	XX		X
	CN107727		XX	XX		XX	
	CN107744		XX		XX	XX	
	CN107759		XX	XX	XX	XX	XX
	CN107764		XX			XX	

XX- odporność całkowita, X- odporność częściowa

W celu uzyskania form mieszańcowych w obrębie *Brassicaceae* wykonano 4767 krzyżowań w 78 kombinacjach zapyleń. Efektywność krzyżowań międzygatunkowych wyrażono płodnością (% stosunek liczby zawiązanych łuszczyń/liczby zapylnych kwiatów) oraz plennością (średnia liczba nasion w łuszczyńce). Ogółem otrzymano 1727 łuszczyń – średnia płodność 33,7%, natomiast średnio ze wszystkich kombinacji krzyżowania zebrano 0,8 nasion/łuszczyńce. Efektywność prowadzonych kultur *in vitro* izolowanych zarodków mierzono liczbą zregenerowanych roślin (1343). Średnio wyniosła ona 61,5% przy zakresie od 0,0% do 94,1%. Największą liczbę roślin zregenerowano w kombinacji: *B. napus* Californium × *B. rapa* ssp. *pekinensis* – 60.

W nasionach potomstw mieszańcowych średnia zawartość tłuszczu wynosiła 34,9%, przy czym najniższą zawartość obserwowano dla mieszańców *B. napus* × *B. rapa* j-1 (27,09%), a najwyższą (36,85%) odnotowano dla *B. napus* × *B. rapa* j-2. Wśród analizowanych roślin mieszańcowych zawartość białka w nasionach wyniosła średnio 25,9%. W obrębie potomstw, które powstały po zapyleniu rzepaku pyłkiem *B. rapa* wystąpiły rośliny, w nasionach których zawartość białka wynosiła 34,93%. Średnia zawartość włókna w nasionach analizowanych potomstw wykazywała zróżnicowanie i skrajne, odnotowane wartości wyniosły od 2,37 (ADF) do 38,5 (NDF). Średnia zawartość glukozynolanów wyniosła 24,3 μmol/g s. m. nasion, przy zakresie zmienności tej cechy wśród analizowanych linii wynoszącej odpowiednio 0,1–44,7 μmol/g s. m. nasion.

W materiałach mieszańcowych zaobserwowano od 8 do 12 loci 5S rDNA oraz od 10 do 15 loci 35S rDNA. Najczęściej występującym wzorem było 10 loci 5S rDNA oraz 35S rDNA. Ponadto, na podstawie rozmieszczenia loci rDNA określono liczbę poszczególnych par chromosomów niosących geny rybosomalnego RNA, tj.: A1, A10, A3, A5/A6/A9 (pochodzące z genomu *B. rapa*) oraz C4, C7 i C8 (pochodzące z genomu *B. oleracea*). Największe zróżnicowanie (0–6) obserwowano dla chromosomów typu A1. Całkowity brak zróżnicowania w liczbie chromosomów obserwowano dla chromosomów typu C8. Zmiany w liczbie loci rDNA oraz różnice w liczbie poszczególnych par chromosomowych najprawdopodobniej wynikały z różnego pochodzenia otrzymanych linii lub rearanżacji oddziałujących na siebie genomów. W materiałach mieszańcowych stwierdzono występowanie odporności rasowo-specyficznej. Utrwalenie cechy odporności dotyczyła 6,5% badanych materiałów, najmniej w przypadku patotypu P2 (0,45%) oraz patotypów P1A (2,4%)

i P1B (1,8%), zaś najwięcej w przypadku P3-P5 (10,6–12,9%).

Patogen

Wykazano obecność ośmiu patotypów, przy czym przeważały patotypy P3A (25%) oraz P1A (24%). Patotypy występujące w kolejności to P1B (13%), P4A (12%) a następnie P2A (10%), P3B (9%) i P5A (7%). Stwierdzono także występowanie patotypu P9 (poniżej 1%); w badaniach prowadzonych w ramach niniejszego projektu po raz pierwszy wyodrębniono go w 2020 r. Na roślinach rzepaku z silnymi objawami kiły kapusty najczęściej występował patotyp P1, przy czym 27,3% stanowiły izolaty zdolne do wywołania objawów chorobowych na kiłoodpornych odmianach rzepaku. U izolatów *P. brassicae* nie stwierdzano polimorfizmu sekwencji w regionach rybosomalnych kodujących podjednostki 5,8S, 18S i 28S, natomiast stwierdzono polimorfizm sekwencji ITS1 i ITS2.

Na podstawie oceny stężenia DNA *P. brassicae* oznaczonego metodą qPCR w próbach gleby opracowano rekomendacje dla producentów rzepaku (rys. 1). Wykazano, że bezpieczna uprawa odmian podatnych lub niewielkie straty plonu spowodowane występowaniem kiły kapusty dotyczą 36,6% powierzchni gruntów ornych, natomiast wskazanie do uprawy odmian kiłoodpornych dotyczy 53,5% gruntów, przy czym ich zdecydowana rekomendacja dotyczy 25,7% gruntów. Na 9,9% gruntów nadających się pod uprawę rzepaku należy wstrzymać się z zasiewami aż do spadku stężenia DNA patogenu poniżej 330 tys. kopii DNA g⁻¹ gleby.

Analiza genetyczna mikrobiomu zawartego w próbkach gleby wykazała wszechobecność bakterii, stanowiły one aż 97% z 10 milionów odczytów. Najliczniejszą grupę stanowiły *Proteobacteria* (44%), z nich zaś 31% należało do klasy *Alpha-proteobacteria*, do rzędu *Rhizobiales*. W obrębie gromady stwierdzono 257 identycznych jednostek taksonomicznych (OTU), w obrębie klasy 356 OTU, w obrębie rzędu było ich 945, rodziny 1177, rodzaju 1260, natomiast identycznych gatunków było aż 3414. Wykazano, że w badanych glebach pojawiały się sekwencje należące między innymi do rodzajów *Bacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces* oraz *Arthrobacter*. W mykobiomie glebowym towarzyszącym stanowiskom z rzepakiem porażonym kiłą kapusty najczęściej występowały gatunki grzybów rodzaju *Fusarium*, w tym głównie *F. oxysporum*, a także kilka gatunków z rodzaju *Trichoderma*.

Najważniejsze wyniki

1. Według oceny metodą Somé z dodatkowym włączeniem odmiany *B. napus* Mendel, w Polsce występuje 8 patotypów *P. brassicae*. Frekwencja występowania patotypów jest zróżnicowana, najczęściej występują P1A oraz P3A. Na najsilniej zainfekowanych polach przeważa patotyp P1. Odporność wywiedziona z odmiany Mendel jest często przełamywana a hodowla odpornościowa wymaga wprowadzenia nowych źródeł odporności.
2. W światowych kolekcjach *Brassica* znajdują się formy odporne lub o podwyższonej odporności na kiłę kapusty, jednak są one nieliczne. Źródłami odporności na kiłę kapusty są m. in. *B. napus* genotyp CN 114234, *B. oleracea* genotypy CGN11150, 14048, 14078, 15227 oraz *B. rapa* genotyp CN107759.
3. Formy mieszańcowe w obrębie Brassicaceae uzyskane w ramach projektu wykazywały duże zróżnicowanie odnośnie zawartości tłuszczu, białka, glukozynolanów oraz włókna (ADF i NDF). U 6,5% badanych materiałów mieszańcowych stwierdzono odporność na kiłę kapusty, a w licznych materiałach (19–60% w zależności od patotypu zastosowanego do inokulacji) cecha ta nie była stabilna (badane formy znajdowały się na różnych etapach procesu hodowlanego). Uzyskana odporność była rasowo-specyficzna. Można ją wykorzystać do piramidyzacji genów odporności, uwzględniając nowo pojawiające się patotypy, np. P9. Stwarza to szansę na wyselekcjonowanie nowych linii, służących do uzyskania wartościowych odmian rzepaku o podwyższonej odporności na kiłę kapusty.
4. Obserwowano zmienność w liczbie i dystrybucji loci 5S i 35S rDNA pomiędzy badanymi genotypami z rodzaju *Brassica*. Polimorfizm w liczbie sekwencji 35S rDNA wynikać może z delecji lub duplikacji w obrębie chromatyny zawierającej sekwencje rDNA i przenoszenia ich do nowych chromosomów a także z różnego pochodzenia materiału roślinnego.
5. Metoda izolacji DNA miała wpływ na skład i proporcje ilościowe mikroorganizmów w próbie. Różnice w składzie populacji mikroorganizmów związane były z lokalizacją pola, z którego dokonywano poboru prób gleby z ryzosfery porażonych roślin.
6. Sekwencjonowanie nowej generacji umożliwiło wykrycie ponad 6 tysięcy mikroorganizmów towarzyszących roślinom rzepaku z objawami kiły kapusty. Szczegółowa

ich analiza może umożliwić znalezienie mikroorganizmów ograniczających występowanie *P. brassicae*. W mikrobiomie glebowym stwierdzono obecność licznych mikroorganizmów (bakterii, grzybów i in.), w tym gatunków stosowanych w ochronie biologicznej roślin uprawnych przed chorobami.

Najważniejsze osiągnięcia projektu

1. W wyniku projektu Polska jako jedyny kraj na świecie ma opracowaną mapę występowania *Plasmodiophora brassicae* w glebie, uzyskaną na podstawie detekcji patogenu metodą real-time qPCR w próbach obejmujących wszystkie regiony uprawy rzepaku oraz warzyw kapustowatych.
2. Dla terenu Polski określono zapotrzebowanie dla uprawy kiłoodpornych odmian rzepaku. Wyniki badań zostaną przekazane do wiadomości Komisji ds Rejestracji Odmian Oleistych i Włókniстых COBORU oraz firm zajmujących się hodowlą rzepaku.
3. Wyniki stały się podstawą do złożenia kolejnego projektu MRiRW. Projekt uzyskano.

Wykaz publikacji wyników**Publikacje**

- Czubatka-Bieńkowska, A., Kaczmarek, J., Marzec-Schmidt, K., Nieróbca, A., Czajka, A., Jędrzycka M. (2020) Country-wide qPCR based assessment of *Plasmodiophora brassicae* spread in agricultural soils and recommendations for the cultivation of Brassicaceae crops in Poland. *Pathogens* 9: 1070. DOI: 10.3390/pathogens9121070
- Kaczmarek, J., Irzykowski, W., Burzyński, A., Jędrzycka, M. (2014). The detection of *Plasmodiophora brassicae* using Loop-mediated isothermal DNA amplification. *Acta Agrobotanica* 67 (4): 59–66.
- Ramzi, N., Kaczmarek, J., Jędrzycka, M. (2018). Identification of clubroot resistance sources from world gene bank accessions. *Integrated Control in Oilseed Crops. IOBC-WPRS Bulletin* 136: 144–147.

Artykuły w czasopiśmie branżowym

- Jędrzycka, M., Kaczmarek J. (2019). Kiła kapusty na rzepaku. *Przedsiębiorca Rolny* 6 (56)/2019, str. 87–89.
- Kaczmarek, J., Jędrzycka, M. (2018). Kiła kapusty w Polsce – koktajl patotypów. *Przedsiębiorca rolny* 6 (44): 65–67
- Jędrzycka, M., Kaczmarek, J. (2015). Kiła kapusty pod LAMPami. *Top Agrar* 2: 120–123.
- Kaczmarek, J., Jędrzycka, M. (2015). Epidemia kiły kapusty. Rzepak w opałach. *Przedsiębiorca rolny* 90–91.

Wybrane komunikaty

- Jędrzycka M. (2019). Integrated control of clubroot

- (*Plasmodiophora brassicae* Wor.) of oilseed rape (*Brassica napus* L.). 8th Congress on Plant Protection 'Integrated Plant Protection for Sustainable Crop Production and Forestry', Zlatibor, Serbia, 24-29 November 2019. Abstract book: IPFC 01.
- Ramzi, N., Kaczmarek, J., Marzec-Schmidt, K., Cłapa, T., Narożna, D., Jędryczka, M. (2019). Fungi accompanying the protist *Plasmodiophora brassicae* in the soil. 8th Mycological Congress, Warszawa - Białowieża, 16-21 September 2019. Programme book: P98.
- Ramzi, N., Siatkowski, I., Wolna-Maruwka, A., Jędryczka, M. (2019). Mikrobiom bakteryjny w ryzosferze rzepaku (*Brassica napus*) z objawami kiły kapusty (*Plasmodiophora brassicae*). IV Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany” Poznań, 5–7 listopada 2019. Streszczenia: 53.
- Hasterok, R., Wolny, E., Hosiawa, M., Kowalczyk, M. (2006). Comparative analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. *Annals of Botany* 97: 205–216.
- Majka, J., Książczyk, T., Kielbowicz-Matuk, A., Kopecky, D., Kosmala, A. (2017). Exploiting repetitive sequences and BAC clones in *Festuca pratensis* karyotyping. *PLoS ONE* 12(6): e0179043.
- Somé, A., Manzanares, M. J., Laurens, F., Baron, F., Thomas, G., Rouxel, F. (1996). Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathology* 45: 432–439.
- Unfried, I., Gruendler, P. (1990). Nucleotide sequence of the 5.8S and 25S rRNA genes and the internal transcribed spacers from *Arabidopsis thaliana*. *Nucl Acids Res.* 18: 4011.
- Wallenhammar, A. C., Almquist, C., Jonsson, A. (2012). In-field distribution of *Plasmodiophora brassicae* measured using quantitative real-time PCR. *Plant Pathol.* 61, 16–28.

Literatura

Gerlach, W. L., Dyer, T. A. (1980). Sequence organisation of the repeating units in the nucleus of wheat which contain 5S rRNA genes. *Nucl Acids Res.* 8: 4851–4865.

Wprowadzanie nowych alleli z pul genowych różnych gatunków z rodzaju *Brassica* do bazy genowej rzepaku ozimego

Introduction of new alleles from gene pools of various *Brassica* species to the winter oilseed rape genome

Teresa Cegielska-Taras[✉], Laurencja Szała, Katarzyna Sosnowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05–870 Błonie, Oddział w Poznaniu, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych, Pracownia Kultur Tkankowych
✉ e mail: tceg.@nico.ihar.poznan.pl

Słowa kluczowe: androgeniza *in vitro*, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*, genotypowanie, linie semi-resyntetyzowane, resynteza

Głównym celem projektu było uzyskanie homozygotycznych linii „nowego” rzepaku ozimego *Brassica napus*, podwójnie ulepszanego, wykazującego odrębność genetyczną od rzepaku naturalnego. W kolejnych etapach badań realizowano następujące cele:

- uzyskanie roślin z rodzaju *Brassica rapa* i *Brassica oleracea* z pędami generatywnymi odpowiednimi do krzyżowań międzygatunkowych
- uzyskanie roślin mieszańcowych – rzepak resyntetyzowany (RS) poprzez krzyżowanie międzygatunkowe z diploidalnych gatunków podstawowych: *B. rapa* i *B. oleracea*
- określenie zdolności do wytwarzania nasion przez każdą roślinę uzyskaną z krzyżowania międzygatunkowego poprzez analizę prawidłowego wykształcenia pyłku i badanie zdolności do samozapylenia roślin mieszańcowych
- uzyskanie nasion z mieszańców F₁ otrzymanych z krzyżowań rzepaku RS i rzepaku podwójnie ulepszanego
- androgeniza *in vitro* mieszańców F₁ otrzymanych z krzyżowań rzepaku RS i rzepaku podwójnie ulepszanego i uzyskanie populacji linii DH semi-RS, spośród których będzie można wyselekcjonować linie DH semi-RS podwójnie ulepszone
- analiza biochemiczna nasion rzepaku semi-RS pod względem zawartości glukozyzolanów (GSL) i składu kwasów tłuszczowych oraz wyselekcjonowanie linii DH rzepaku semi-RS o jakości rzepaku podwójnie

ulepszanego: zero-erukowych oraz o niskiej zawartości GSL

- badanie odrębności genetycznej rzepaku RS i semi-RS
- uzyskanie informacji dotyczącej sekwencji genomu rzepaków RS w porównaniu do wyjściowych diploidalnych form rodzicielskich

Material i metody

Material roślinny

Źródłem nowych alleli służących do wzbogacenia puli genowej rzepaku były trzy podgatunki *B. rapa* – kapusta chińska i pekińska a także rzepik w formie jarej i ozimej, tradycyjny, jednozerowy i dwuzerowy, oraz trzy podgatunki *B. oleracea* – jarmuż, kapusta brukselska i kalafior.

Do poprawy jakości nasion rzepaku RS i uzyskania linii semi-RS wybrano następujące odmiany: Tosca, Tactic, Arot, Lohana, Architect i Platinum.

W badaniach wykorzystano także linie CMS ogura do krzyżowań z podwójnie ulepszonymi liniami DH semi-RS w celu wprowadzenia nowej zmienności genetycznej do linii męskosterylnych do hodowli mieszańcowej.

Metody

Krzyżowania międzygatunkowe wykonano stosując zapylenie *in vitro* i *in vivo*, a następnie izolowano zarodki lub zalążki i hodowano je na pożywkach w warunkach *in vitro* (ang. embryo rescue).

Populacje linii DH semi-RS z mieszańców F₁



pochodzących z krzyżowań pomiędzy rzepakiem RS a odmianami uzyskano metodą androgenozy *in vitro* w kulturze izolowanych mikrospor.

Rośliny RS i ich formy rodzicielskie zostały poddane analizie na zawartość jądrowego DNA metodą cytometrii przepływowej w celu potwierdzenia ich mieszańcowości. Metodę cytometrii przepływowej wykorzystano także do określenia ploidalności linii DH semi-RS.

Badano także żywotność pyłku roślin RS i semi-RS w preparatach z rozgniatanych pylników wybarwionych acetokarminem.

Skład kwasów tłuszczowych i glukozyolanów w nasionach oznaczono metodą chromatografii gazowej.

W celu uzyskania informacji genetycznej o liniach RS rzepaku i ich komponentach rodzicielskich wykonano badania molekularne poddając analizie za pomocą mikromacierzy Brassica 60K (Traits Genetics) DNA wyizolowane z 12 genotypów. Do badań wybrano: 7 linii RS, 2 odmiany jarmużu (*B. oleracea*) i trzy podgatunki *B. rapa*: kapustę pekińską, kapustę chińską i bezerukową odmianę rzepiku. Mikromacierz zawierała sondy charakterystyczne dla poszczególnych markerów SNP, stanowiące sekwencje komplementarne do sekwencji badanych. Analiza prowadzona była na zasadzie hybrydyzacji sond zlokalizowanych na płycie z badanym DNA. Sekwencjonowanie NGS wykonano dla 4 próbek DNA z roślin różnych gatunków rodzaju *Brassica* w firmie Genomed S.A.

Opis wyników

W pierwszym etapie badań określono potrzeby jarowizacyjne niektórych gatunków z rodzaju *Brassica*:

- większość badanych rzepików (*B. rapa*) wymagała jaryzacji w stadium 4–5 liści w temp. 4°C przy 8 h oświetlenia przez okres 8 tygodni
- rzepik odm. Ludowy i linia Cr2877 potrzebował 12 tygodni jaryzacji do wytworzenia prawidłowych pędów generatywnych
- dla wszystkich badanych odmian jarmużu (*B. oleracea*) stadium pięciu liści było odpowiednie do rozpoczęcia jaryzacji
- dla jarmużu odm. Vitessa ustalono 8-tygodniowy, a dla odm. Kapral i jarmużu tradycyjnego 12-tygodniowy okres jaryzacji
- do prawidłowego przebiegu jaryzacji kapusta warzywna brukselska (*B. oleracea*) wymagała 8–10 tygodni traktowania niską temperaturą (4°C) w fazie 10 liści
- kalafior (*B. oleracea*) nie wymagał okresu

chłodu, a cały proces wytwarzania pędów generatywnych trwał ok. 6 miesięcy

Następnie wykonano krzyżowania międzygatunkowe, w których wykorzystano 10 odmian rzepiku (jare i ozime, tradycyjne, jednozerowe i dwuzerowe) i 1 odmianę kapusty pekińskiej z gatunku *B. rapa*, a z gatunku *B. oleracea* – 3 odmiany jarmużu, 1 odmianę kapusty brukselskiej i 1 odmianę kalafiora. Stosując dwie metody zapylenia zoptymalizowane na potrzeby realizowanego projektu: *in vivo* i *in vitro* oraz metodę hodowli *in vitro* izolowanych zarodków lub załączków (ang. *embryo rescue*) i regeneracji z nich roślin w kulturze *in vitro*. otrzymano 58 mieszańców międzygatunkowych o liczbie chromosomów $n=19$. Metodą cytometrii przepływowej potwierdzono mieszańcowość wszystkich roślin uzyskanych w wyniku krzyżowań pomiędzy *B. rapa* a *B. oleracea*. Po podwojeniu liczby chromosomów przy użyciu roztworu kolchicyny otrzymano rzepak RS.

U wszystkich badanych mieszańców międzygatunkowych zaobserwowano samoniezdgodność wywołaną czynnikami genetycznymi i zróżnicowaną żywotność pyłku. Wykonana analiza wykazała, że żywotność ziaren pyłku badanych roślin RS wynosiła od 38,8% u do 92,4%. Nie stwierdzono związku pomiędzy żywotnością ziaren pyłku a pochodzeniem linii RS. Na żywotność pyłku nie wpływał także ani kierunek krzyżowania, ani podgatunki rodzicielskie danego mieszańca. Aby pokonać barierę samoniezdgodności rośliny zapyłano ręcznie w zamkniętym pąku kwiatowym w celu otrzymania nasion.

Analiza biochemiczna nasion rzepaku RS wykazała obecność kwasu erukowego (13,8 – 43,4%) i wysoką zawartość GSL (24,3 – 119,2 $\mu\text{mol g}^{-1}$ nasion). W celu poprawy cech jakości rzepaku RS wykonano krzyżowania pomiędzy odmianami rzepaku ozimego charakteryzującymi się wysoką zawartością tłuszczu w nasionach i wysokim plonowaniem: Lohana, Arot, Tactic, Tosca i Platinium oraz linią semi-RS S₁A/8 a trzema liniami rzepaku RS: RS63, RS68 i RS69. Uzyskano nasiona z mieszańców F₁ pochodzących z 12 kombinacji. Przeprowadzono androgenezę *in vitro* wybranych mieszańców F₁ (odmiana × RS) i otrzymano 5 populacji linii DH semi-RS (tab. 1).

Uzyskane wyniki wskazują na bardzo niską częstotliwość występowania segregantów o obniżonej zawartości glukozyolanów i pozbawionych kwasu erukowego w populacjach linii DH semi-RS. Szczególnie trudno jest uzyskać linie o normalnej zawartości GSL ze względu na wielość i różnorodność tych związków, a tym samym wysoką

liczba genów odpowiedzialnych za ich syntezę. W celu wprowadzenia nowej zmienności genetycznej do materiałów hodowlanych wyselekcjonowane podwójnie ulepszone linie DH semi-RS skrzyżowano z liniami męskosterylnymi CMS ogura w układzie: CMS 896 x semi-RS 25/4 oraz CMS 430 x semi-RS 27/25, a w następnych pokoleniach prowadzono krzyżowania wsteczne.

W końcowych etapach projektu skupiono się na uzyskaniu informacji genetycznej o liniach RS rzepaku i ich komponentach rodzicielskich. Wykonano badania molekularne poddając analizie za pomocą mikromacierzy *Brassica* 60K (Traits Genetics) DNA wyizolowane z 12 genotypów. Wizualizacja uzyskanych wyników ujawniła liczne zmiany w genomie linii RS w porównaniu do linii rodzicielskich, a rozmieszczenie badanych genotypów w układzie dwóch składowych głównych wykazało odrębność genetyczną linii RS od rzepaku. Sekwencjonowanie genomowe dla wybranych czterech prób *Brassica* wykonała firma Genomed S.A. Analizy te obejmowały przygotowanie bibliotek i sekwencjonowanie na urządzeniu HiSeq4000/NovaSeq6000 (Illumina) w trybie sparowanych końców (ang.: *paired end*) w dwóch odczytach, po 150 zasad (tryb PE150), z gwarancją 50-krotnego pokrycia genomu. Wykonano podstawową analizę bioinformatyczną dla otrzymanych danych z sekwencjonowania – filtrowanie uzyskanych sekwencji oraz usuwanie sekwencji adapterów (tab. 2). Obecnie przeprowadzana jest dalsza analiza bioinformatyczna. Obejmuje ona m.in. wykonanie mapowań odczytów do genomów referencyjnych dla każdego z genomów badanych roślin. Dla próbki z rzepiku wykonane zostanie mapowanie do genomu A, natomiast dla próbki z kapusty mapowanie do genomu C. Z kolei dla rzepaku resyntetyzowanego wykonane zostaną mapowania do obu genomów (A i C) (tabela). Planowane jest także wskazanie mutacji różnicujących badane rośliny względem zastosowanych genomów referencyjnych oraz wytypowanie wariantów wspólnych i unikalnych dla badanych prób.

Wnioski

1. szczegółowe określenie wymagań jarowizacyjnych roślin z rodzaju *Brassica* umożliwiło zsynchronizowanie terminów kwitnienia komponentów do krzyżowań międzygatunkowych
2. wszystkie linie RS charakteryzowały się samoniezgodnością, a ich nasiona zawierały kwas erukowy i wysoki poziom GSL

3. populacje linii semi-RS uzyskiwane z mieszańców pomiędzy liniami RS i rzepakiem podwójnie ulepszonym muszą być liczne, ze względu na niską częstotliwość występowania rekombinantów podwójnie ulepszonych
4. na podstawie badań molekularnych wykazano odrębność linii RS od rzepaku naturalnego
5. dalsza analiza genomu umożliwi wskazanie mutacji różnicujących badane linie RS i ich formy rodzicielskie względem zastosowanych genomów referencyjnych oraz wytypowanie wariantów wspólnych i unikalnych dla badanych prób.

Osiągnięcia

1. Opracowanie schematu uzyskiwania rzepaku ozimego resyntetyzowanego (RS) poprzez krzyżowania międzygatunkowe pomiędzy różnorodnymi diploidalnymi liniami rodzicielskimi *B. rapa* i *B. oleracea*, odrębnego genetycznie zarówno od odmian tradycyjnych, jak i odmian podwójnie ulepszonych rzepaku naturalnego.
2. Opracowanie metody zapylenia „*in vitro*” *B. rapa* × *B. oleracea* w obu kierunkach w celu uzyskania roślin mieszańcowych RS. Metoda ta pozwala ominąć niektóre z prezygotacyjnych barier krzyżowalności występujących pomiędzy gatunkami o zróżnicowanej liczbie chromosomów.
3. Opracowanie metody otrzymywania linii DH semi-RS rzepaku ozimego o jakości canoli na drodze androgenezы *in vitro* w kulturze izolowanych mikrospor z mieszańców F₁ uzyskanych z krzyżowania rzepaku RS i rzepaku podwójnie ulepszanego oraz selekcji linii podwójnie ulepszonych.
4. Włączanie do doświadczeń hodowlanych genotypów rzepaku ozimego wzbogaconych o rzepak RS we współpracy z H R Strzelce.
5. Złożenie projektu badawczego pt: „Identification of markers for the traits that vary between resynthesized and natural genotypes of winter *Brassica napus* „w ramach konkursu OPUS NCN.

Publikacje

Cegielska-Taras T., Szała L., Matuszczak M., Babula D., Mikołajczyk K., Popławska W., Sosnowska K., Hernacki B., Olejnik A., Bartkowiak-Broda I. 2015. Doubled haploid as a material for biotechnological manipulation and a modern tool for breeding of oilseed rape (*Brassica napus*). *BioTechnologia* 96 (1): 171–177.

Szała L., Sosnowska K., Popławska W., Liersch A., Olejnik A., Kozłowska K., Bocianowski J., Cegielska-Taras T. 2016. Development of new restorer lines for CMS ogura system with the use of resynthesized oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Breeding Science* 66 (4): 516–521. doi: 10.1270/jsbbs.15042.

Sosnowska K., Cegielska-Taras T., Liersch A., Karłowski W.M., Bocianowski J., Szała L., Mikołajczyk K., Popławska W. 2017. Genetic relationships among resynthesised, semi-resynthesised and natural *Brassica napus* L. genotypes. *Euphytica* 213:212, 1–12.

Sosnowska K., Majka M., Majka J., Bocianowski J., Kaspro-wicz M., Książczyk T., Szała L., Cegielska-Taras T. 2020. Chromosome instabilities in resynthesized *Brassica napus* revealed by FISH. *Journal of Applied Genetics* 61: 323–335.

Doniesienia konferencyjne

Cegielska-Taras T., Szała L., Sosnowska K., Popławska W., Liersch A., Bocianowski J., Bartkowiak-Broda I. 2014. Resynteza *Brassica napus* L. nowe możliwości i wyzwania

w hodowli rzepaku ozimego. XXXII Konferencja Naukowa Rośliny Oleiste, Poznań, 19–22.05.2014 r., streszcz. str. 19–20.

Szała L., Sosnowska K., Popławska W., Liersch A., Bocianowski J., Bartkowiak-Broda I., Cegielska-Taras T. 2015. Wykorzystanie resyntetyzowanych linii DH w hodowli mieszańcowej rzepaku ozimego. *Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych*, XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, Zakopane, 2–6.02.2015 r., streszczenia str. 83–85.

Sosnowska K., Cegielska-Taras T., Liersch A., Karłowski W., Bocianowski J., Szała L., Mikołajczyk K., Popławska W. 2017. Assessment of genetic relationship among resynthesized, semi-resynthesized and natural *Brassica napus* L. genotypes. Technical Meeting GCIRC Alnarp-Malmö, Sweden, 8–11.05.2017.

Szała L., Cegielska-Taras T., Sosnowska K., Liersch A., Popławska W. 2018. Introduction of the resynthesized *Brassica napus* for breeding of winter oilseed rape. 21st Crucifer Genetics Conference – Brassica 2018. Saint-Malo, France, July 1- 4, 2018, Abstracts – Posters p. 11

Tabela 1

Selekcja linii semi-RS podwójnie ulepszonych.

Populacja	Liczba uzyskanych roślin	Liczba analizowanych linii	Liczba linii bez kwasu erukowego	Liczba linii z obniżoną zawartością GSL	Liczba linii podwójnie ulepszonych
D 23 (RS 69 × odm. Arot)	158	97	12	2	0
D 24 (odm. Arot × RS 69)	156	88	9	2	0
D 25 (odm. Lohana × RS 63)	186	52	15	4	2
D 26 (odm. Tactic × RS 68)	62	30	0	0	0
D 27 (odm. Tosca × RS 68)	84	43	1	2	1

Tabela 2

Zestawienie wyników po filtrowaniu i przycinaniu sekwencji.

	091-04-R1-RS69_S30_R1_001.fastq.gz	091-04-R1-RS69_S30_R2_001.fastq.gz	091-03-R1-RS68_S31_R1_001.fastq.gz	091-03-R1-RS68_S31_R2_001.fastq.gz
Liczba sekwencji	321979701	321979701	276506844	276506844
Długość sekwencji (pz)	15-151	15-151	15-151	15-151
%GC	38	38	38	38
%AT	62	62	62	62
%Q20	99.99	99.97	100	99.98
%Q30	97.23	96.75	97.19	96.9
	091-02-R1-kapusta_S32_R1_001.fastq.gz	091-02-R1-kapusta_S32_R2_001.fastq.gz	091-01-R1-rzepik_S33_R1_001.fastq.gz	091-01-R1-rzepik_S33_R2_001.fastq.gz
Liczba sekwencji	116530708	116530708	107681495	107681495
Długość sekwencji (pz)	15-151	15-151	15-151	15-151
%GC	36	36	39	39
%AT	64	64	61	61
%Q20	100	99.97	100	99.98
%Q30	97.28	96.56	97.28	97.31

Badania nad indukcją embriogenezy mikrospor u roślin z rodzaju *Brassica* sp.

Studies on the induction of microspore embryogenesis in plants of the genus *Brassica* sp.

Teresa Cegielska-Taras[✉], Laurencja Szała, Katarzyna Sosnowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05–870 Błonie, Oddział w Poznaniu, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych, Pracownia Kultur Tkankowych

✉ e mail: tceg.@nico.ihar.poznan.pl; t.cegielska@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: androgeniza *in vitro*, *Brassica napus* L., gorczyca biała, organogeneza *in vitro* podwajanie liczby chromosomów haploidom, rzepak ozimy, *Sinapis alba*

Celem badań było opracowanie optymalnej i skutecznej stymulacji embriogenezy mikrospor w kulturze *in vitro* izolowanych mikrospor oraz uzyskanie homozygotycznych linii z gatunków rodzaju *Brassica* sp.

Materiały i Metody

Materiał: rzepak ozimy (*Brassica napus* L.), oraz gorczyca biała (*Sinapis alba* = *Brassica hirta*).

Metody: jaryzacja roślin dawców mikrospor, doprowadzanie do kwitnienia w kontrolowanych warunkach temperatury i długości dnia, opracowanie markera morfologicznego pyłków z mikrosporami podatnymi na zmianę drogi rozwoju z generatywnej na wegetatywną, kultury *in vitro* izolowanych mikrospor, stymulacja rozwoju pędów oraz korzeni w kulturze *in vitro*, cytometryczna analiza ploidalności, podwajanie liczby chromosomów haploidom, jaryzacja, androgenicznych roślin, wzrost roślin podwojonych haploidów do fazy kwitnienia i zawiązania nasion.

Opis wyników

Rzepak ozimy (*Brassica napus*)

Efektywność procesu androgenyzy *in vitro* (embriogenezy *in vitro* mikrospor) rzepaku ozimego uwarunkowana jest wieloma czynnikami endogennymi i egzogennymi, spośród których do najważniejszych można zaliczyć genotyp roślin-dawców mikrospor, warunki wzrostu rośliny na poszczególnych etapach rozwoju do fazy kwitnienia, a także rodzaj pożywek i regulatorów wzrostu, substancji stymulujących bezpośrednio proces embriogenezy

i organogenezy oraz warunki w jakiej przebiega kultura.

Badania nad fizjologiczną kondycją roślin dawców mikrospor rzepaku ozimego wykazały, że młode rośliny w fazie 4–6 właściwych liści mogą być jarowizowane w komorach chłodniczych przez 7 tygodni w temperaturze +4° C przy ośmiogodzinnym oświetleniu. Po tym okresie rośliny były przesadzane do większych pojemników z glebą i dalsza ich wegetacja przebiegała w fitotronie w warunkach 13°–15° C przy 16-godzinnym fotoperiodzie. Tak prowadzone rośliny wytwarzały pędy generatywne w ciągu kolejnych 8–9 tygodni.

Ważnym etapem w metodyce izolowanych mikrospor, warunkującym skuteczną indukcję androgenyzy *in vitro*, jest prawidłowe określenie stadium rozwoju mikrospor, w którym możliwa jest zmiana kierunku ich rozwoju. Określono długość pąka kwiatowego, jako markera morfologicznego, dla selekcji pożądanego stadium rozwoju mikrospor w pylniku, podatnego na zmianę kierunku rozwoju z generatywnego na wegetatywny.

Badano również wpływ kolchicyny, na indukcję podziałów mikrospor rzepaku, stosowanej zaraz po ich izolacji, a także inicjacji podwajania liczby chromosomów. Analizowano wpływ wysokości temperatury w czasie inkubacji mikrospor w pierwszych dniach prowadzenia kultury i stymulującej wydajność procesu embriogenezy. Stosowanie kolchicyny w pożywce NLN w pierwszej dobie po izolacji mikrospor, jest skutecznym bodźcem w procesie stymulacji mikrospor do podziałów. W masowym uzyskiwaniu podwojonych haploidów ważnym etapem



jest stymulowanie konwersji zarodków w rośliny (Cegielska-Taras i in. 2002, Cegielska –Taras i in. 2014). Skuteczność podwojenia liczby chromosomów badano u 400 androgenicznych roślin pochodzących z różnych dawców mikrospor rzepaku ozimego, które rozwinęły się z mikrospor traktowanych roztworem kolchicyny w pożywce NLN w ciągu pierwszej doby po ich izolacji. Analiza cytometryczna wykazała, że procent diploidalnych roślin wyniósł od 29,7% do 75,0% w zależności od dawcy mikrospor rzepaku ozimego (Szała i in. 2020). W przypadku niskiej diploidyacji dla uzyskania większej liczby podwojonych haploidów możliwe jest traktowanie kolchicyną odciętych pędów bocznych roślin haploidalnych. Z haploidalnych roślin o różnym pochodzeniu pobierano po trzy pędy do traktowania roztworem kolchicyny (Szała i in. 2020). Skuteczność podwojenia liczby chromosomów, przejawiająca się pojawieniem płodnych kwiatów wyniosła nawet 98%.

W warunkach szklarniowych z jednej rośliny, podwojonego haploidu, jest uzyskano od 0,10 g do 26,0 g nasion Z każdej rośliny DH otrzymanej metodą androgenyzy *in vitro* możliwe jest otrzymanie nasion (Rys.1).

Gorzycza biała (*Sinapis alba*)

Gorzycza biała, chociaż jest rośliną jarą, w sztucznych warunkach fitotronu po okresie działania chłodu rozwijała się szybciej i tworzyła bujne pędy generatywne. Z wyselekcjonowanych pąków kwiatowych preparowano pylniki, które wykładano na stałą pożywkę. Pre-kulturę pylników w niskiej temperaturze (4°C) prowadzono przez 24 godziny, a następnie izolowano z nich mikrospory w pożywce KB5. Traktowanie mikrospor gorzycy w pylnikach temperaturą 4°C było na tyle skutecznym bodźcem do ich podziałów, po następnych kilku dniach pojawiły się pojedyncze prazarodki. Doprowadzono także do kwitnienia rośliny zregenerowane z zarodków mikrosporowych. Badanie cytometryczne wykazało diploidalną liczbę chromosomów w otrzymanych androgenicznych roślinach gorzycy białej (Rys.2)

Wnioski z prowadzonych badań,

1. Wymagania jarowizacyjne roślin z różnych genetycznie dawców mikrospor rzepaku ozimego były podobne. Wskazuje to na zawężenie puli genetycznej rzepaku ozimego pod względem tej cechy.
2. Badania cytologiczne, ustalające stadia rozwoju mikrospor w pylnikach, skorelowane

z długością pąków selekcionowanych do izolacji mikrospor, determinują efektywność procesu androgenyzy *in vitro*.

3. Podatność do stymulacji embriogenezy mikrospor jest uwarunkowana genetycznie, jednak stosowanie różnych czynników stymulujących, jak kolchicyna lub temperatura inkubacji mikrospor zaraz po ich izolacji, umożliwiają uzyskanie mikrosporowych zarodków z nawet genotypów rzepaku ozimego uważanych za „trudne”.
4. Stosowanie kolchicyny na świeżo wyizolowane mikrospory również umożliwia uzyskanie w krótkim czasie prawidłowo wykształconych roślin (homozygotycznych) podwojonych haploidów rzepaku ozimego. Skuteczną metodą alternatywną uzyskiwania podwojonych haploidów jest również kolchicynowanie odciętych pędów bocznych haploidalnych roślin.
5. Z każdej rośliny DH otrzymanej metodą androgenyzy w kulturze *in vitro* możliwe jest uzyskanie nasion.
6. Gorzycza biała, roślina jara, po okresie działania chłodu rozwijała się szybciej i posiadała bujne pędy generatywne.
7. Traktowanie mikrospor gorzycy w pylnikach temperaturą 4°C było skutecznym bodźcem do ich podziałów

Osiągnięcia projektu

1. Opracowanie optymalnej i skutecznej metodę uzyskiwania z różnych genetycznie dawców rzepaku ozimego roślin androgenicznych (podwojone haploidy).
 - Opracowanie wydajnej metody indukowania wtórnej embriogenezy i organogenezy, otrzymywanie podwojonych haploidów z zarodków mikrosporowych.
 - Opracowanie metody podwajania liczby chromosomów na różnych etapach procesu androgenyzy *in vitro* (od izolowanych mikrospor, poprzez młode rośliny, po rośliny kwitnące) umożliwiając uzyskanie nasion z każdej pojedynczej rośliny.
2. Wdrożenie do hodowli rzepaku wydajnej metody uzyskiwania podwojonych haploidów *Brassica napus* L. z kultury *in vitro* izolowanych mikrospor różnych genetycznie dawców rzepaku ozimego.
3. Po raz pierwszy uzyskano podwojone haploidy metodą kultury *in vitro* izolowanych mikrospor gorzycy białej, podwójnie ulepszonej, rośliny obcopolnej i samoniezgodnej.

Publikacje

Cegielska-Taras T., Szała L., Matuszczak M., Babula D., Mikołajczyk K., Popławska W., Sosnowska K., Hernacki B., Olejnik A., Bartkowiak-Broda I. 2015. Doubled haploid as a material for biotechnological manipulation and a modern tool for breeding of oilseed rape (*Brassica napus*). *BioTechnologia* –96 (1): 7-18.

Szała L., Sosnowska K., Cegielska-Taras T. 2020. Induced chromosome doubling in microspores and regenerated haploid plants of *Brassica napus*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 62, 1, 23–31.

Prezentacje

Wykład – III Ogólnopolska Konferencja Genetyka i Genomika w Doskonaleniu Roślin Uprawnych –Poznań 5–7 XI 2014.

Plakat - International Association for Plant Biotechnology Congress ,10-14 VIII 2014 Melbourne , Australia.

Wykład – XIV Ogólnopolska Konferencja Kultur *in vitro* in Biotechnologii- Poznań 14–17.IX.2015;

Wykład – XII Ogólnopolska Konferencja naukowa, Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych, Zakopane 2–6 II 2015,

Plakat-14th International Rapessed Congress Saskatoon, Kanada 5-9VII 2015

Plakat - EUCARPIA -20th General Congress, Zurich, Szwajcaria, 29.VIII-IX 2016 - „Effect of *in vitro* and *in vivo* colchicine treatment on efficient production of doubled haploid plants of oilseed rape (*Brassica napus* L.)”

Plakat – V Polski Kongres Genetyki, Łódź, 10-22 IX 2016; „Development of homozygous lines of open-pollinated and self – incompatible plants *Brassica hirta*.”

Literatura

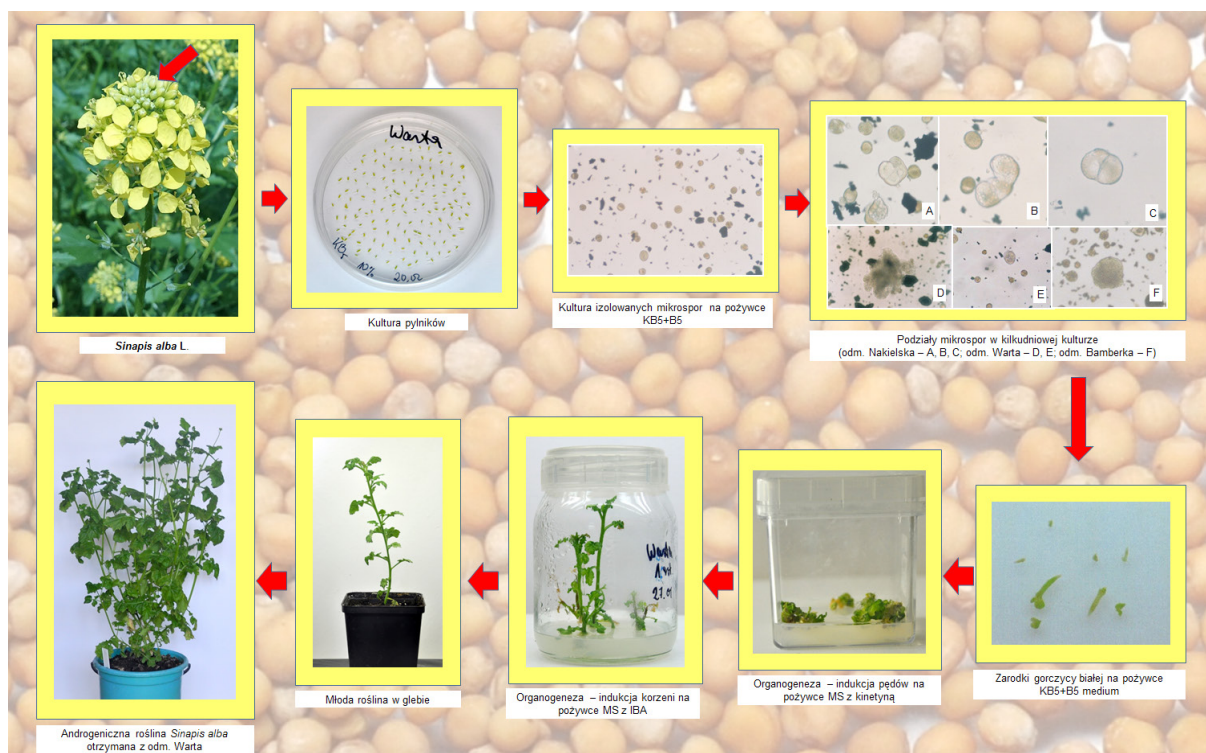
Cegielska-Taras T., Tykarska T., Szała L., Kuraś L., Krzymański J. (2002). Direct plant development from microspore-derived embryos of winter oilseed rape *Brassica napus* L. ssp. *Oleifera* (DC.) Metzger. *Euphytica*, 124, 3, 341–347.

Cegielska-Taras T., Szała L., Matuszczak M., Babula D., Mikołajczyk K., Popławska W., Sosnowska K., Hernacki B., Olejnik A., Bartkowiak-Broda I. (2015). Doubled haploid as a material for biotechnological manipulation and a modern tool for breeding of oilseed rape (*Brassica napus*). *BioTechnologia* –96 (1): 7–18.

Szała L., Sosnowska K., Cegielska-Taras T. (2020). Induced chromosome doubling in microspores and regenerated haploid plants of *Brassica napus*. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 62, 1, 23–31.



Rys. 1. Schemat otrzymywania linii DH rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) w kulturze izolowanych mikrospor.



Rys. 2. Schemat otrzymywania androgenicznych roślin gorczycy białej w kulturze izolowanych mikrospór (*Sinapis alba* L.).

Wykorzystanie nowej puli genowej dla uzyskania form rzepaku ozimego o zmienionych cechach jakościowych

The use of a new gene pool for obtaining forms of winter oilseed rape with changed quality characteristics

Stanisław Spasibionek✉, Katarzyna Mikołajczyk, Marcin Matuszczak, Magdalena Walkowiak, Joanna Nowakowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Oddział w Poznaniu, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych, Pracownia Genetyki i Hodowli Jakościowej
✉ e-mail: sspas@nico.ihar.poznan.pl

Słowa kluczowe: glukozytolany, kwasy tłuszczowe, markery genetyczne, rzepak ozimy, zawartość tłuszczu

Obecnie jednym z ważniejszych kierunków prac badawczo-hodowlanych jest uzyskanie odmian typu HOLL (skrót od ang. *high oleic low linolenic*) o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego (C18:1) do ($\geq 75\%$) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (C18:3) do ($\leq 3\%$) (Spasibionek i in., 2020). Olej o takim składzie w porównaniu z tradycyjnym podwójnie ulepszonym olejem rzepakowym typu CANOLA nie tylko wykazuje ulepszone właściwości prozdrowotne, ale także wyższą stabilność podczas obróbki termicznej, a także ogranicza tworzenie szkodliwych dla zdrowia izomerów trans podczas procesu utwardzania (Barth, Christian A. 2009). Ponadto olej tego typu ze względu na znacznie spowolniony proces oksydacji nadaje się do celów technicznych np. jako komponent biopaliwa (Matthäus i in., 2011, Rogowska, 2017). Może się stać konkurencyjnym do wysokooleinowego oleju słonecznikowego. Drugim ważnym prozdrowotnym kierunkiem prac jest uzyskanie odmian typu HO (skrót od ang. *high oleic*) o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego (ok. 77%) i obniżonej zawartości kwasu linolowego (ok. 7%) i kwasu linolenowego (ok. 7%). Wysoka zawartość kwasu oleinowego wpływa korzystnie na obniżenie poziomu szkodliwej frakcji cholesterolu LDL, a stosunek ilościowy zawartości niezbędnych nienasyconych kwasów tłuszczowych (NNKT) tj. kwasu linolowego (C18:2; ω -6) do zawartości kwasu linolenowego (C18:3; ω -3) równy 1:1 jest optymalny dla prawidłowego funkcjonowania organizmu człowieka. Po ekstrakcji lub wytlóczeniu oleju w śrucie bądź wytlókach

pozostaje od 37% do 43% białka pastewnego charakteryzującego się wysoką wartością żywnościową ze względu na korzystny skład aminokwasów. Możliwości wykorzystywania białka są jednak limitowane przez związki antyżywniowe – glukozytolany alkenowe występujące w nasionach rzepaku. Stąd konieczne były dalsze badania nad wytworzeniem form pozbawionych zawartości tych związków. Uzyskane w IHAR-PIB Oddział w Poznaniu mutanty oraz kolekcja własna (wyselekcjonowana w wyniku krzyżowań w obrębie gatunku *Brassica napus* L.) stanowią cenne źródło zmienności kwasów tłuszczowych: oleinowego, linolowego i linolenowego oraz zawartości tłuszczu i glukozytolanów w nasionach rzepaku (Spasibionek, 2006, Spasibionek i in. 2016).

Zadanie realizowano w ramach czterech tematów badawczych:

1. Fenotypowanie roślin pod względem cech agronomicznych i biochemicznych
2. Określenie determinacji genetycznej cech jakościowych
3. Ocena genotypów w doświadczeniach porównawczych
4. Genotypowanie roślin

Cele badań

Temat badawczy 1: Poszukiwanie nowych źródeł zmienności o pożądanych parametrach agronomicznych oraz biochemicznych do dalszych badań związanych z przeprowadzeniem szczegółowej analizy genetycznej w odniesieniu do ekspresji cech fenotypowych,



decydujących o wartości gospodarczej danego genotypu. Cel został osiągnięty w całości.

Temat badawczy 2: Wyprowadzenie drogą krzyżowań nowych form rzepaku o zróżnicowanej zawartości 18-to węglowych kwasów tłuszczowych jedno- i wielonienasyconych, o podwyższonej zawartości tłuszczu i ekstremalnie niskiej zawartości glukozyznanów dla określenia efektów ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej ważnych cech fenotypowych. Cel został osiągnięty w całości.

Temat badawczy 3: Ocena nowych genotypów w doświadczeniach porównawczych pod względem cech jakościowych i agronomicznych oraz oszacowanie wpływu różnych środowisk na cechy ilościowe i jakościowe wybranych genotypów. Cel został osiągnięty w całości.

Temat badawczy 4: Poszukiwanie różnych form allelicznych oraz monitorowanie występowania niezmutowanych i zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w populacjach obejmujących rekombinanty typu HO, LL, HOLL oraz ich formy rodzicielskie z wykorzystaniem markerów genetycznych. Cel został osiągnięty w całości.

Materiały i Metody

W badaniach brało udział 1382 genotypów w tym: 2 mutanty typu HO o wysokiej zawartości kwasu oleinowego—18:1 (78,6—79,5%), mutant typu LL o niskiej zawartości kwasu linolenowego—18:3 (1,5%) oraz 269 rekombinantów typu HO o zawartości C18:1 (79,3—82,2%) i 517 rekombinantów typu HOLL o wysokiej zawartości C18:1 (75,0—85,6%) i obniżonej zawartości C18:3 (1,0—4,5%). Włączono również 593 rekombinanty typu HO&LGLS (skrót od ang. *high oleic & low glucosinolates*) o wysokiej zawartości C18:1, niskiej zawartości glukozyznanów alkenowych ($0,2\text{--}0,9\mu\text{M g}^{-1}\text{ nasion}$) i wysokiej zawartości tłuszczu (49,2—53,6%). W trakcie wegetacji w szkółkach hodowlanych prowadzono fenotypowanie roślin pod względem cech agronomicznych. Wyselekcjonowany i zaizolowany materiał roślinny oceniono pod względem zawartości kwasów tłuszczowych: palmitynowego, stearynowego, oleinowego, linolowego, linolenowego, eikozenowego i erukowego oraz pod względem zawartości sumy glukozyznanów i glukozyznanów alkenowych za pomocą chromatografii gazowej. W badanych materiałach (nasionach) oznaczono procentową zawartość tłuszczu za pomocą szerokopasmowego analizatora magnetycznego (NMR) firmy Newport Instruments Ltd).

Wybrane genotypy o ustabilizowanej, zróżnicowanej zawartości kwasów tłuszczowych, podwyższonej zawartości tłuszczu i ekstremalnie niskiej zawartości glukozyznanów krzyżowano w układzie diallelicznym i w układzie linia x tester dla określenia determinacji genetycznej, efektów ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej oraz interakcji ze środowiskiem. Łącznie przeprowadzono siedem doświadczeń po 25—36 obiektów w trzech lokalizacjach (Oddział Hodowli Roślin: Boro-wo i Małyszyn „Spółka Hodowli Roślin Strzelce”, Oddział Łagiewniki „Spółka Hodowli Roślin Smolice”). W doświadczeniach prowadzono następujące obserwacje i pomiary: wschody, stan roślin przed zimą, przezimowanie (skala 1—9⁰), pomiar zawartości chlorofilu w liściach jesienią i wiosną, wczesność (liczba dni od początku roku), długość kwitnienia (liczba dni), wysokość roślin, wylęganie (skala 1—9⁰). Analiza struktury plonu: liczba rozgałęzień, liczba łuszczyń na roślinie, długość łuszczyń, liczba nasion w łuszczyńce, masa 1000 nasion, plon nasion, ocena biochemiczna nasion.

Selekcja genotypów typu HO i HOLL wspierana była również analizami molekularnymi z zastosowaniem markerów CAPS dla *FAD2* (HOR3 i HOR4) (niezmutowane i zmutowane allele genów desaturaz *FAD2* w genomie A rzepaku) i markerów typu SNP dla *FAD3* (niezmutowane i zmutowane allele genów desaturaz *FAD3* w genomach A i C rzepaku). Łącznie (2014—2020) przeprowadzono 1547 analiz DNA.

Wyniki

Temat badawczy 1: Zastosowane metody hodowli rekombinacyjnej z wykorzystaniem zmienności naturalnej oraz zmienności uzyskanej w wyniku mutagenyzy w selekcji linii wsobnych, chociaż pracochłonne i długotrwałe, okazały się skuteczne. Z wykorzystaniem mutantów (typu HO, LL) wytworzono 71 ustabilizowanych linii pokoleń F10—F5 typu HO o bardzo wysokiej zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (79,1—80,1%) oraz uzyskano 260 genotypów typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (79,0—80,0%) i o obniżonej zawartości kwasu linolenowego (2,8—3,9%) rys.1. Z wykorzystaniem zmienności naturalnej uzyskano 228 ustabilizowanych genotypów typu HO&LGLS pokoleń F13—F6 z wysoką zawartością kwasu oleinowego (77,3—79,4%) oraz z niską zawartością glukozyznanów alkenowych ($1,3\text{--}2,5\mu\text{M g}^{-1}\text{ nasion}$) i sumy glukozyznanów ($4,5\text{--}7,3\mu\text{M g}^{-1}\text{ nasion}$) rys. 2.

Temat badawczy 2: Badania przeprowadzono w oparciu o krzyżowania dialleliczne 6

genotypów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych typu HO, LL, HOLL, niskiej zawartości glukozyzolanów typ LGLS oraz w typie CANOLA. Analiza wariancji wg Griffinga wykazała istotne różnicowanie efektów GCA dla wszystkich badanych cech. Istotne różnicowanie SCA stwierdzono dla zawartości kwasu linolowego, linolenowego i dla zawartości sumy wszystkich glukozyzolanów oraz sumy glukozyzolanów alkenowych. Linie rodzicielskie (565, 537 typ LGLS, Polka typ HO, 342/6i typ HOLL) o wysokiej dodatniej wartości GCA dla kwasu oleinowego i ujemnej wartości GCA dla kwasu linolowego odpowiednio zwiększały zawartość kwasu oleinowego i obniżały zawartość kwasu linolowego w mieszańcach. Mutant (M681 typu LL) oraz linie (342/6i typ HOLL) o wysokiej ujemnej wartości GCA dla kwasu linolenowego wpływały na znaczne obniżenie zawartości tego kwasu. Linia rodzicielska (565 typ LGLS) o wysokiej ujemnej wartości GCA dla zawartości sumy wszystkich glukozyzolanów oraz sumy glukozyzolanów alkenowych decydowała o znacznym obniżeniu tych związków. Analiza wariancji wg Haymana oraz ocena parametrów genetycznych wg Mathera i Jinksa wykazały, że addytywne działanie genów było istotne dla wszystkich badanych cech. Świadczy to o przewadze addytywnego działania genów w determinowaniu badanych cech. Wysokie współczynniki odziedziczalności w szerokim (h^2BS) (0,65–0,95) i w wąskim (h^2NS) sensie (0,85–0,97) wskazują zarówno na duży udział zmienności genetycznej w zmienności fenotypowej dla zawartości kwasów tłuszczowych i glukozyzolanów jak i na znaczące addytywne działanie genów w dziedziczeniu tych cech. Wysokie współczynniki odziedziczalności wskazują również na możliwość uzyskania postępu w selekcji pod względem zmiany proporcji badanych kwasów tłuszczowych oraz glukozyzolanów w nasionach rzepaku. W ramach badania linia x tester zidentyfikowano 8 genotypów rodzicielskich: L11, L12, L13, L14 (typ HOLL) o zawartości (C18:1 77,4–82,8%; C18:3 2,0–3,8%); L18, L19, L20, L22 (typ HO&LGLS) o zawartości (C18:1 78,4–80,6%; glukozyzolany alkenowe 0,5–0,9 μ M g⁻¹nasion) oraz tester T24 (typ HOLL) o zawartości (C18:1 80,2%; C18:3 3,0%), które można wykorzystać w programie krzyżowania w celu wytworzenia maksymalnej zmienności w kierunku zmian proporcji kwasów tłuszczowych, głównie kwasu oleinowego i linolenowego oraz zawartości tłuszczu i glukozyzolanów w nasionach. Linie o wysokich efektach GCA dla poszczególnych cech przynosiły pozytywne efekty na SCA mieszańców. Na podstawie efektów SCA

wytypowano 3 najbardziej korzystne kombinacje krzyżowań (13x24, 15x24, 20x23) do dalszej selekcji pod kątem zmian badanych cech. Te kombinacje umożliwią wyselekcjonowanie odmian w typie HOLL.

Temat badawczy 3: Ustabilizowane pod względem cech biochemicznych genotypy typu HO, HOLL i HO&LGLS oceniano w doświadczeniach przedwstępnych (porównawczych) dla określenia wartości rolniczej rodów w 3 powtórzeniach w 3 lokalizacjach. Uzyskane linie hodowlane typu HO i HOLL osiągnęły poziom plonowania zbliżony do uprawianych obecnie odmian populacyjnych. Wyselekcjonowano cztery genotypy (1732/14-HO, 880/15-HOLL, 593/15-HO, 440/15-HOLL), które plonowały istotnie lepiej od wzorcowej odmiany Monolit (tab. 1). Stwierdzono, że o poziomie plonowania genotypów decydowały trzy elementy struktury plonu tj. masa 1000 nasion, długość łuszczyń i liczba nasion w łuszczyźnie. W kolejnym etapie prac przeprowadzono analizę wariancji dla plonu, zawartości kwasów tłuszczowych, tłuszczu i glukozyzolanów: oleinowego, linolowego i linolenowego, w której wyodrębniono następujące źródła zmienności: środowiska (E), genotypy (G), interakcja genotypy x środowiska (z rozbiem na dwa składniki: regresja względem środowiska i odchylenia od regresji) oraz błąd doświadczenia. Stwierdzono istotne różnice wśród badanych wszystkich cech pomiędzy środowiskami i genotypami. Wystąpiła również istotna interakcja genotypów ze środowiskami pod względem plonu, zawartości tłuszczu, kwasu oleinowego i glukozyzolanów. Istotne odchylenia od regresji dla plonu nasion, zawartości tłuszczu oraz glukozyzolanów wskazują na małą zależność regresyjną efektów interakcji (G x E) od przeciętnej zawartości tych cech w danych środowiskach. Analiza doświadczeń z genotypami uwzględniająca badanie interakcji genotypowo-środowiskowej umożliwiła wytypowanie najlepszych z punktu widzenia hodowlanego form, a także pozwoliła uzyskać informacje o ich stabilności w różnych środowiskach pod względem plonu, zawartości tłuszczu, kwasów tłuszczowych i glukozyzolanów w nasionach.

Temat badawczy 4: Wykorzystanie markerów genetycznych w hodowli znacznie zwiększyło efektywność i skuteczność selekcji. Selekcja genotypów typu HO i HOLL wspierana była analizami molekularnymi z zastosowaniem markerów CAPS dla FAD2 (HOR3 i HOR4) (niezmutowane i zmutowane allele genów desaturaz FAD2 w genomie A rzepaku) i markerów typu SNP dla FAD3 (niezmutowane i zmutowane allele genów desaturaz

FAD3 w genomach A i C rzepaku) (Mikołajczyk i in., 2010). Łącznie (2014–2020) przeprowadzono 1547 analiz DNA. Wyodrębniono 344 homozygotycznych prób o zmutowanym genotypie typu HOR3 (HOR3/HOR3) i HOR4 (HOR4/HOR4) oraz zidentyfikowano 312 genotypów zmutowanych i homozygotycznych w obu loci w genomach A i C *B. napus* (typ genotypu aacc). Genotypy wyselekcjonowano w powiązaniu z najlepszymi cechami agronomicznymi. Zastosowana analiza z wykorzystaniem markerów genetycznych pozwoliła precyzyjnie wyselekcjonować pożądane genotypy zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* wyrażających się fenotypem typu HO o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (73,8%–80,3%) oraz fenotypem typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (78–80,3%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (2,0–3,7%).

Wnioski

1. Wyselekcjonowano genotypy typu HO charakteryzujące się bardzo wysoką zawartością kwasu oleinowego w oleju nasion (do 82,6%), genotypy z wysoką zawartością tłuszczu (do 51,4%) oraz niską zawartością glukozyzolanów alkenowych (do 0,2 μM g⁻¹nasion) i sumy glukozyzolanów (do 0,4 μM g⁻¹nasion). Uzyskano genotypy typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (do 83,8%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (do 1,5%).
2. W badaniach nad dziedziczeniem zawartości kwasów tłuszczowych 18-węglowych addytywne efekty genetyczne odgrywały główną rolę w warunkowaniu zawartości kwasów: oleinowego, linolowego i linolenowego oraz glukozyzolanów wśród rodziców i ich mieszańców. Wysokie współczynniki odziedziczalności w szerokim i w wąskim sensie wskazują zarówno na duży udział zmienności genetycznej w zmienności fenotypowej dla zawartości kwasów tłuszczowych i glukozyzolanów jak również na znaczące addytywne działanie genów w dziedziczeniu tych cech. Wysokie współczynniki odziedziczalności wskazują również na możliwość uzyskania postępu w selekcji pod względem zmiany proporcji badanych kwasów tłuszczowych oraz glukozyzolanów w nasionach rzepaku.
3. W badaniach linia x tester zidentyfikowano 8 genotypów rodzicielskich: L11, L12, L13, L14 (typ HOLL); L18, L19, L20, L22 (typ HO&LGLS) oraz tester T24 (typ HOLL), które można wykorzystać w programie krzyżowania

w celu wytworzenia maksymalnej zmienności w kierunku zmian proporcji kwasów tłuszczowych, głównie kwasu oleinowego i linolenowego oraz zawartości tłuszczu i glukozyzolanów w nasionach. Linie o wysokich efektach GCA dla poszczególnych cech przносиły pozytywne efekty na SCA mieszańców. Na podstawie efektów SCA wytypowano 3 najbardziej korzystne kombinacje krzyżowań (13x24, 15x24, 20x23) do dalszej selekcji pod kątem zmian badanych cech. Te kombinacje umożliwiają wyselekcjonowanie odmian w typie HOLL.

4. Na podstawie przeprowadzonych serii doświadczeń polowych wynika, że warunki pogodowe w badanych latach wywierały istotny wpływ na udział środowiska w interakcji G x E, a charakter i stopień interakcji w poszczególnych środowiskach zależał bardziej od przebiegu pogody w danym roku niż od lokalizacji doświadczeń.
5. Analiza doświadczeń z genotypami uwzględniająca badanie interakcji genotypowo-środowiskowej, umożliwiła wytypowanie najlepszych z punktu widzenia hodowlanego form, a także pozwoliła uzyskać informacje o ich stabilności w różnych środowiskach pod względem plonu, zawartości tłuszczu, kwasów tłuszczowych i glukozyzolanów w nasionach.
6. Zastosowana analiza z wykorzystaniem markerów genetycznych pozwoliła precyzyjnie wyselekcjonować pożądane genotypy zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* wyrażających się fenotypem typu HO o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (73,8%–80,3%) oraz fenotypem typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (78,0–80,3%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (2,0–3,7%).

Osiągnięcia projektu

1. W wyniku przeprowadzonych krzyżowań linii mutantów z rodami hodowlanymi i z najlepszymi odmianami populacyjnymi poszerzono pulę genową w postaci wyselekcjonowanych linii rekombinacyjnych typu HO, LL i HOLL o wysokiej zawartości tłuszczu i niskiej zawartości glukozyzolanów.
2. Wyselekcjonowane stabilne linie hodowlane: plenne, wysokotłuszczowe o zmienionych kwasach tłuszczowych i o obniżonej zawartości związków antyżywnościowych (glukozyzolanów) zostaną wykorzystane do hodowli nowych odmian populacyjnych i mieszańcowych rzepaku.

3. Wdrożono patent do selekcji genotypów typu HO i HOLL pt. „Sekwencje nukleotydowe fragmentów niezmutowanych i zmutowanych alleli loci A i C genu desaturazy *fad3* 3 form – podwójnie ulepszonej (00) oraz niskolinolenowego mutantu (LLMut) roślin rzepaku ozimego, sekwencje nukleotydowe par starterów do amplifikacji loci A i C genu desaturazy *fad3* (...)”, na który został udzielony Instytutowi Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, Polska przez Urząd Patentowy Rzeczypospolitej Polskiej – Patent nr PAT.211126, dnia 11.05.2012 r.; twórcy wynalazku: Katarzyna Mikołajczyk, Iwona Bartkowiak-Broda, Mirosława Dabert, Wojciech M. Karłowski, Stanisław Spasibionek.
4. Użyte do selekcji markery typu CAPS i SNP umożliwiają jednoznaczną identyfikację zmutowanych form allelicznych genów desaturazy *FAD2* w genomie *A. B. napus* i desaturazy *FAD3* w genomach A i C *B. napus* odpowiedzialnych za zawartości odpowiednio kwasu oleinowego i linolenowego w nasionach linii mutantów i rekombinantów typu HO i HOLL rzepaku ozimego (Mikołajczyk i wsp., 2010).
5. Zastosowanie markerów genetycznych w hodowli zwiększyło efektywność i skuteczność selekcji. Stanowią one dogodne narzędzie selekcyjne, wspomagające i uzupełniające tradycyjne metody w oparciu o czasochłonną analizę cech morfologicznych, fenologicznych i fenotypowych, których ekspresja ulega często modyfikującemu wpływowi środowiska.
6. Uzyskane dotychczas wyniki z przeprowadzonych badań biochemicznych, molekularnych i doświadczeń polowych dały podstawę do kontynuowania dalszych badań ukierunkowanych na wytworzenie krajowej odmiany populacyjnej rzepaku ozimego o wysokiej zawartości tłuszczu i zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych przy jednocześnie odpowiedniej wartości rolniczej warunkującej jej praktyczną popularyzację w uprawie. 50 genotypów typu HOLL zostało włączonych do dalszych badań w ramach projektu badawczego NR 3/2020/PSPO (lata 2020–2023) „Wytworzenie odmiany populacyjnej rzepaku ozimego o wysokiej zawartości tłuszczu i zmienionych proporcjach kwasów tłuszczowych”, finansowanego przez Fundusz Promocji Roślin Oleistych.

Wykaz publikacji wyników

Wystąpienia ustne

- Spasibionek S., Mikołajczyk K., Matuszczak M., Teresa Piętka. Postęp w badaniach nad uzyskaniem odmian rzepaku ozimego o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych w oleju. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych” Zakopane 31.01.-03.02.2017. Streszczenia str. 68–69.
- Mikołajczyk K., Spasibionek S., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. Development of HOLL winter rapeseed genotypes accompanied by MAS. GCIRC Technical Meeting Alnarp, Sweden, 08–11.05.2017.
- Spasibionek S., Piętka T., Krótka K., Walkowiak M. Analiza wartości hodowlanej i zróżnicowania genetycznego mutantów i rekombinantów rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). XI Międzynarodowe Sympozjum „Genetyka Ilościowa Roślin Uprawnych”, Świeradów Zdrój 07–09.06.2017 r. Streszczenia str. 51.
- Spasibionek S., Mikołajczyk K., Walkowiak M., Nowakowska J., Matuszczak M., Piętka T., Krótka K. Postęp w badaniach nad uzyskaniem odmian rzepaku ozimego o nowej jakości oleju. XXXIV Konferencja Naukowa „Rośliny Oleiste – Postępy w Genetyce, Hodowli, Technologii i Analityce Lipidów” Poznań 10–11. IV. 2018 r.
- S. Spasibionek, M. Walkowiak, K. Mikołajczyk, M. Matuszczak, T. Piętka. Modyfikacje składu kwasów tłuszczowych w olejach nasion rzepaku, gorczyca białej i lnu oleistego. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych” Zakopane 05–08.02.2019 r. Biuletyn IHAR, Nr 285/2019. Streszczenie 117–119.

Prezentowane postery

- S. Spasibionek, K. Mikołajczyk, T. Piętka, M. Matuszczak, I. Bartkowiak-Broda. The use of a new gene pool for obtaining winter oilseed rape (*Brassica napus*L.) breeding lines with changed quality characteristics. 14th IRC Saskatoon, Canada, 5–9.07.2015.
- S. Spasibionek, T. Piętka, K. Krótka, J. Krzymański. Możliwości dalszego obniżania zawartości glukozyolanów w nasionach rzepaku podwójnie ulepszonego (*Brassica napus* L.) XXXIII Konferencja Naukowa „Rośliny Oleiste – Postępy w Genetyce, Hodowli, Technologii i Analityce Lipidów” Poznań 5–6. 04.2016.
- K. Mikołajczyk, M. Dabert, S. Spasibionek, J. Bocianowski, J. Nowakowska, T. Cegielska-Taras, I. Bartkowiak-Broda. 2016. Marker assisted breeding of new winter oilseed rape lines (*Brassica napus* L.) with changed seed oil fatty acid composition, poster, 20th General Eucarpia General Congress, Zurich, Szwajcaria, 29.08. – 1.09.2016.
- Spasibionek S., Walkowiak M., Piętka T. Zmienność zawartości glukozyolanów alifatycznych w nasionach nowych genotypów rzepaku ozimego. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa

roślin uprawnych” Zakopane 31.01.-03.02.2017. Streszczenia str. 248.

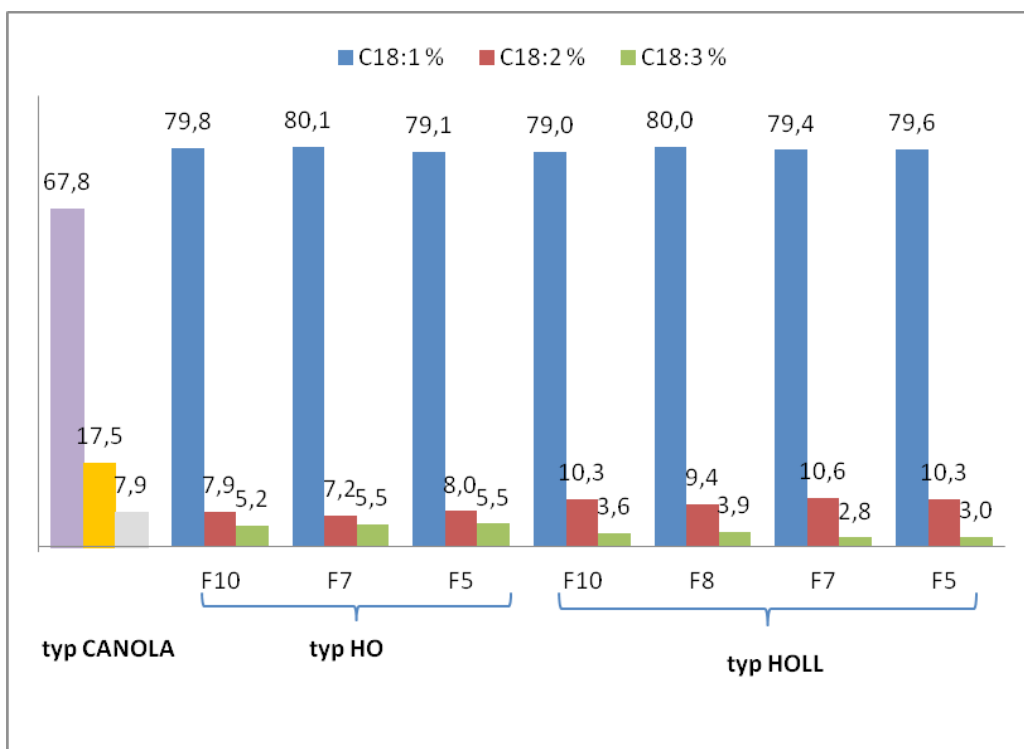
- M. Matuszczak, S. Spasibonek, I. Tokarczuk, J. Nowakowska, K. Gacek, K. Mikołajczyk, I. Bartkowiak-Broda. The use of CAPS marker to study the influence of mutated alleles of the *BnaA.FAD2* gene on the oleic acid content in seeds of winter rapeseed. 15th International Rapeseed Congress, Berlin. 16 – 19.06.2019 r. Book of Abstracts, str. 266.
- M. Walkowiak, S. Spasibonek, K. Krótka, T. Piętka, K. Michalski. Analiza genetycznego uwarunkowania cech ilościowych i jakościowych genotypów rzepaku ozimego. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasennictwa roślin uprawnych” Zakopane 05–08.02.2019 r. Biuletyn IHAR, Nr 285/2019. Streszczenie 347–348.

Publikacje naukowe

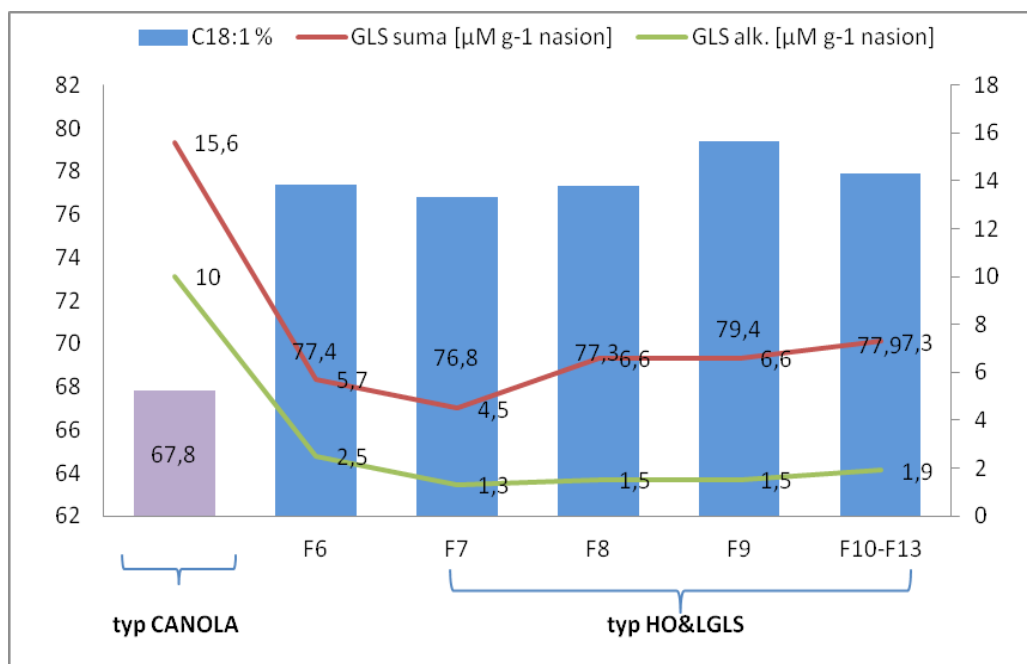
- Spasibonek, S., Walkowiak, M., Piętka, T., Michalski, K., Mikołajczyk, K., & Matuszczak, M. (2019). Modyfikacje składu kwasów tłuszczowych w olejach nasion rzepaku, gorczyca białej i lnu oleistego. *Biuletyn Instytutu Hodowli I Aklimatyzacji Roślin*, (285), 117–119. <http://ojs.ihar.edu.pl/index.php/biul/article> (MEiN – 20pkt)
- Spasibonek, S., Mikołajczyk, K., Matuszczak, M., Walkowiak, M., & Nowakowska, J. (2019). Wykorzystanie nowej puli genowej dla uzyskania form rzepaku ozimego o zmienionych cechach jakościowych. *Biuletyn Instytutu Hodowli I Aklimatyzacji Roślin*, (286), 203–206. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0046> (MEiN – 20pkt)
- Spasibonek S, Mikołajczyk K, Ćwiek–Kupczyńska H, Piętka T, Krótka K, Matuszczak M, Nowakowska J, Michalski K, Bartkowiak-Broda I. (2020) Marker assisted selection of new high oleic and low linolenic winter oilseed rape (*Brassica napus L.*) inbred lines revealing good agricultural value. *PLoS ONE* 15 (6): e0233959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233959>, IF 2.776 (MEiN – 100pkt.)
- Matuszczak M, Spasibonek S, Gacek K, Bartkowiak-Broda I. 2020. Cleaved amplified polymorphic sequences (CAPS) marker for identification of two mutant alleles of the rapeseed *BnaA.FAD2* gene. *Mol Biol Rep* 47: 7607–7621, <https://doi.org/10.1007/s11033-020-05828-2>, IF 1.402 (MEiN – 70pkt.)

Literatura

- Barth, Christian A. (2009). Nutritional value of rapeseed oil and its high oleic/low linolenic variety – A call for differentiation. *European journal of lipid science and technology*. – ISSN 1438–7697. – 111 (2009), 10, S. 953 – 956.
- Matthäus B., Haase N., Unbehend G. (2011). Impact of HOLL rapeseed oil during frying on product quality during storage. *Proc. 13th Int. Rapeseed Congress, Prague, Czech Republic*, 528–531/www.irc2011.org.
- Mikołajczyk K., Dabert M., Karłowski W. M., Spasibonek S., Nowakowska J., Cegielska-Taras T., Bartkowiak-Broda I. (2010). Allele-specific SNP markers for the low linolenic mutant genotype of winter oilseed rape. *Plant Breeding* 129: 502–507.
- Rogowska A. (2017). Rzepak ozimy odmiany typu HOLL http://www.wir.org.pl/raporty/2017/2017_07_10_rzepak/.
- Spasibonek S. (2006) New mutants of winter rapeseed (*Brassica napus L.*) with changed fatty acid composition. *Plant Breeding* 125: 259–267.
- Spasibonek S., Matuszczak M., Piętka T., Krótka K., Krzymański J. (2016). Możliwości dalszego obniżania zawartości glukozyolanów w nasionach rzepaku podwójnie ulepszanego (*Brassica napus L.*). *Rośliny Oleiste Oilseed Crops*, tom XXXVII: 21–36.
- Spasibonek S., Mikołajczyk K., Ćwiek–Kupczyńska H., Piętka T., Krótka K., Matuszczak M., Nowakowska J., Michalski K., Bartkowiak-Broda I. (2020). Marker assisted selection of new high oleic and low linolenic winter oilseed rape (*Brassica napus L.*) inbred lines revealing good agricultural value. *PLoS ONE* 15 (6): e0233959. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233959>, IF 2.776



Rys. 1. Cechy biochemiczne rekombinantów typu HOLL w porównaniu do rzepaku typu CANOLA.



Rys. 2. Cechy biochemiczne rekombinantów typu HO&LGLS porównaniu do rzepaku typu CANOLA.

Tabela 1

Plonowanie (dt/ha) najlepszych genotypów typu HO, HOLL i HO&LGLS w porównaniu z wzorcem w latach badań 2015–2020.

Obiekt typ	Rok 2015	Obiekt typ	Rok 2016	Obiekt typ	Rok 2017	Obiekt typ	Rok 2019	Obiekt typ	Rok 2020
Monolit wz.	52,0	Monolit wz.	31,1	Monolit wz.	38,7	Ilona wz.	33,5	Ilona wz.	58,8
1732/14HO	53,7	880/15 HOLL	32,0	1186/1 HO	34,1	491/18 HOLL	31,3	806/19 HO	50,8
246/14 HO	51,7	593/15 HO	31,4	1160/1 HO	33,5	897/18 HO&L-GLS	28,2	855/19 HOLP	49,3
255/14 HO	50,3	440/15 HOLL	31,2	67/16 HOLL	33,2	444/18 HOLL	27,9	865/19 HOLL	49,0
256/13 HO	49,3	550/15 HO	29,8	1200/16 HO&L-GLS	33,0	493/18 HOLL	27,6	863/19 HO&L-GLS	49,0
440/14 HOLL	48,3	882/15 HOLL	29,5	1161/1 HO	32,6	437/18-HOLL	27,6	813/19 HO&L-GLS	48,8
1680/14HO&L-GLS	47,2	873/15 HO	29,4	34/5i/16 HOLL	32,4	490/18 HOLP	27,0	836/19 HOLL	48,7
253/14 HO	46,7	535/15 HO	29,4	1135/16HO&L-GLS	31,8	525/18 HOLL	26,2	843/19 HOLL	48,3
1762/14HO&L-GLS	46,8	481/15 HO	29,1	30/5i/16 HO	31,5	541/18 HOLL	26,0	861/19 HOLL	47,8
401/14 HO	45,6	480/15 HO	29,1	1173/16HO&L-GLS	30,6	537/18 HOLL	25,9	801/19 HO&L-GLS	47,0
259/13 HO	45,4	519/15 HO&L-GLS –	29,0	18/16 HOLL	30,4	495/18 HOLP	25,6	845/19 HOLL	46,8

Introdukcja genów odporności na choroby i owady oraz męskiej sterylności z pokrewnych gatunków rodzaju *Brassica* do rzepaku (*Brassica napus* L.)

Introduction of disease and pest resistance genes and male sterility from *Brassica* relatives to rapeseed (*Brassica napus* L.)

Janetta Niemann¹✉, Dorota Weigt¹, Justyna Szwarc¹, Jan Bocianowski¹, Andrzej Wojciechowski¹, Małgorzata Jędryczka², Joanna Kaczmarek², Witold Irzykowski², Joanna Majka², Marek Mrówczyński³, Wojciech Karłowski⁴, Andrzej Zieleziński⁴

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

²Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań

³Instytut Ochrony Roślin PIB, Poznań

⁴Uniwersytet Adama Mickiewicza w Poznaniu

✉ e-mail: niemann@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH), geny odporności, krzyżowanie, markery ISSR, mieszańce *Brassica*, rzepak

Realizowane zadanie badawcze dotyczyło poszerzenia zakresu zmienności cech istotnych z punktu widzenia użytkowego wykorzystania rzepaku ozimego. Szczególne znaczenie miały cechy decydujące o odporności rzepaku na strepy biotyczne (choroby grzybowe – sucha zgnilizna kapustnych (*Leptosphaeria* spp.) i mączniak rzekomy (*Perenospora parasitica*), odporność na owady – śmietka kapuściana (*Delia radicum*), mszyca kapuściana (*Brevicoryne brassicae*) i pchełka rzepakowa (*Phyllotreta cruciferae*) oraz męska sterylność, jako niezmiernie istotna przy wytwarzaniu odmian mieszańcowych.

Cele prowadzonych badań

W związku z powyższym, celem prowadzonych badań w latach 2014–2020 było otrzymanie międzygatunkowych mieszańców w rodzaju *Brassica*, oszacowanie odporności na szkodniki i choroby grzybowe komponentów rodzicielskich i mieszańców pokoleń F₂ – F₆, potwierdzenie mieszańcowego charakteru roślin pokolenia F₂ przy pomocy techniki GISH i FISH oraz określenie zróżnicowania genetycznego mieszańców metodą ISSR, a także identyfikacja sekwencji odpowiadających wybranym genom zaangażowanym w odporność na choroby u roślin metodami analizy obliczeniowej i molekularnej. Założone cele projektu zostały zrealizowane.

Materiały i Metody

Materiał roślinny do krzyżowań oddalonych stanowiły wybrane odmiany rzepaku tj. *Brassica napus* cv. Californium, Lisek, Jet Neuf, Monolit, Górczański, Roxete, Anderson, Arsenal oraz gatunki pokrewne z rodzaju *Brassica* tj. *B. tournefortii*, *B. fruticulosa*, *B. rapa* ssp. *pekinensis*, *B. rapa* ssp. *chinensis*, *B. rapa* ssp. *rapifera*, *B. oleracea* var. *alboglabra*, *Raphanus sativus* oraz *Sinapis alba* – temat badawczy nr 1.

Materiał roślinny wykorzystany do testów odpornościowych oraz analiz cytogenetycznych i molekularnych stanowiły otrzymane potomstwa mieszańcowe pokoleń F₂–F₆ oraz 46 wybranych odmian rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) – temat badawczy nr 2, 3 i 4.

Zastosowane metody badawcze:

1. Krzyżowanie oddalone wybranych odmian rzepaku (*B. napus* L.) z gatunkami pokrewnymi oraz kultury *in vitro* izolowanych zarodków stosowane w celu otrzymania mieszańców oddalonych.
2. Testy odpornościowe na choroby i owady.
3. Analizy molekularne oraz cytogenetyczne otrzymanego materiału roślinnego:
 - Weryfikacja tożsamości mieszańców – metoda GISH (genomowa hybrydyzacja *in situ*), FISH (fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ*)
 - Określenie zróżnicowania genetycznego



mieszkańców – metoda ISSR (Inter-Simple Sequence Repeat),

- Identyfikacja genów ortologicznych – techniki bioinformatyczne, wykorzystano meta-serwer ORCAN.

Wyniki

Temat badawczy 1

Otrzymanie międzygatunkowych mieszańców w rodzaju *Brassica*.

Łącznie wykonano 10 710 krzyżowań, z czego w kulturach *in vitro* zregenerowano 867 roślin. Efektywność zarodkowych kultur *in vitro* wyrażona jako procent zregenerowanych roślin do liczby wyizolowanych na pożywkę zarodków wyniosła 53,3%. Największą liczbę roślin otrzymano z kombinacji *B. napus* × *B. rapa ssp. pekinensis* – 298, natomiast żadnych roślin nie uzyskano w kombinacji krzyżowania *B. napus* × *Raphanus sativus* – temat badawczy nr 1.

Temat badawczy 2

Oszacowanie odporności na choroby grzybowe oraz szkodniki komponentów rodzicielskich i mieszańców pokoleń $F_2 - F_6$.

Wśród form rodzicielskich najmniejszy procent roślin porażonych przez grzyby powodujące suchą zgniliznę kapustnych stwierdzono u *Brassica carinata*, *B. fruticulosa* i *B. napus* odmian Arsenal i Anderson (2%), posiadających gen odporności *Rlm7*. Procent roślin mieszańcowych z objawami suchej zgnilizny kapustnych wynosił od 2,33% do 19%. Najmniej porażone były mieszańce *B. napus* × *B. carinata* oraz *B. napus* × *B. fruticulosa* (2,5 i 4,8%, odpowiednio).

W warunkach polowych nie obserwowano objawów powodowanych przez mączniaka rzekomego. Natomiast, w warunkach kontrolowanych możliwe było wyselekcjonowanie form mniej podatnych na *P. parasitica*. W tym przypadku najsłabiej porażane były mieszańce *B. napus* × *B. rapa ssp. pekinensis* (1%).

Obserwacje komponentów rodzicielskich i mieszańców pokoleń $F_2 - F_6$ odnośnie występowania szkodników wykazały różne nasilenie ich występowania pomiędzy analizowanymi genotypami roślin. W Dłoni, jeden spośród trzech ocenianych szkodników tj. śmietka kapuściana wystąpił w największym nasileniu. Przeprowadzone obserwacje wykazały znaczny stopień uszkodzenia roślin rzepaku przez śmietkę kapuścianą zarówno u odmian rzepaku (18,0–88,0%), jak i u analizowanych mieszańców (15,0–75,0%). Obserwowane zasiedlenie roślin przez mszycę

wyniosło od 0 do 80,0% w zależności od kombinacji krzyżowania. Natomiast pchełki nie odnotowano wcale ani na testowanych odmianach, ani na roślinach z pokoleń mieszańcowych.

Temat badawczy 3

Weryfikacja tożsamości mieszańców pokolenia F_2 metodą genomowej hybrydyzacji *in situ* (GISH) i fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz określenie stopnia zróżnicowania genetycznego mieszańców na podstawie markerów ISSR.

Zastosowanie metody GISH pozwoliło tylko na identyfikację chromosomów genomu F (*B. fruticulosa*) i chromosomów z genomu T (*B. tournefortii*) u wybranych form mieszańcowych. Natomiast niemożliwe było rozróżnienie chromosomów pochodzących z genomu B (*B. nigra*) w formach mieszańcowych otrzymanych na skutek krzyżowań: *B. napus* (AACC) × *B. juncea* (AABB), *B. napus* (AACC) × *B. carinata* (BBCC), *B. napus* (AACC) × *B. nigra* (BB) oraz chromosomów genomu A (*B. rapa*) w formach mieszańcowych otrzymanych na skutek krzyżowań: *B. napus* (AACC) × *B. rapa* (AA) oraz *B. napus* (AACC) × *B. oleracea* (CC), ze względu na bliskie pokrewieństwo między genomami A, C i B.

Jednakże, zastosowanie metody FISH i sekwencji rDNA (5S i 35S rDNA) pozwoliło na identyfikację chromosomów markerowych u form mieszańcowych *Brassica* pochodzących z genomów rodzicielskich – genom AA (*B. rapa*), genom CC (*B. oleracea*) oraz genom BB (*B. nigra*).

Ponadto, przy użyciu markerów ISSR potwierdzono mieszańcowe pochodzenie analizowanych roślin. Przeanalizowano 50 starterów reakcji ISSR, które dawały od 4 do 11 produktów reakcji PCR dla każdej ścieżki elektroforetycznej. Grupowanie hierarchiczne przedstawione w formie dendrogramu potwierdziło, że mieszańce z danej grupy krzyżowań utworzyły odrębne klastry, a tym samym wykazały największe podobieństwo w obrębie roślin o tych samych komponentach rodzicielskich.

Temat badawczy 4

Poszukiwanie ortologów wybranych genów odporności na choroby i szkodniki – analizy PCR i sekwencjonowanie.

W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano potencjalne ortologii dla 30 wybranych genów roślinnych związanych z odpornością na analizowane choroby. Na podstawie zidentyfikowanej sekwencji ortologów dla genów odporności

na mączniaka tj. *Rpp1*, *Rpp27* i *Rpp13* zweryfikowano mieszańce pochodzące z krzyżowania *B. napus* × *B. rapa*.

Wnioski

1. Ogółem w kulturach *in vitro* zregenerowano 867 roślin, efektywność regeneracji wyniosła 53,3%. Największą liczbę roślin otrzymano z kombinacji *B. napus* × *B. rapa ssp. pekinensis* – 298, natomiast żadnych roślin nie uzyskano w kombinacji krzyżowania *B. napus* × *Raphanus sativus* – temat badawczy nr 1.
2. Mieszańce *B. napus* × *B. carinata* oraz *B. napus* × *B. fruticulosa* charakteryzowały się podwyższoną odpornością na grzyby powodujące suchą zgniliznę kapustnych oraz na śmietkę kapuścianą – temat badawczy nr 2.
3. Jesienią na roślinach mieszańcowych dominował grzyb *L. maculans*, natomiast przed zniwami stwierdzano wyższy procentowy udział *L. boglobosa* – temat badawczy nr 2.
4. Odporność na śmietkę kapuścianą dla roślin mieszańcowych była wyższa we wszystkich badanych latach w porównaniu do analizowanych odmian rzepaku ozimego. Natomiast średnia odporność na mszycę kapuścianą u mieszańców była wyższa tylko w 2018 roku – temat badawczy nr 2.
5. Zastosowanie metody FISH pozwoliło na charakterystykę składu genomowego oraz identyfikację poszczególnych typów chromosomów u mieszańców otrzymanych w wyniku krzyżowania *B. napus* × *B. juncea*, *B. napus* × *B. carinata*, *B. napus* × *B. rapa ssp. chinensis* oraz *B. napus* × *B. rapa ssp. pekinensis* – temat badawczy nr 3.
6. Możliwe jest rozróżnienie przy pomocy trawienia restrykcyjnego *B. napus* oraz jego mieszańców ze wszystkim badanymi *B. rapa*. Ma to bardzo praktyczne znaczenie podczas prowadzenia programów krzyżowań w celu odróżnienia mieszańców F_1 od roślin, które przypadkowo uległy samozapyleniu – temat badawczy nr 4.

Osiągnięcia projektu

1. Otrzymano formy mieszańcowe z podwyższoną odpornością na suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria spp.*) oraz na śmietkę kapuścianą (*Delia radicum*), które mogą stanowić materiały wyjściowe do hodowli odpornościowej.
2. Zaprojektowano specyficzne startery dla ortologów, na podstawie których można przy pomocy trawienia restrykcyjnego rozróżnić

B. napus oraz jego mieszańce ze wszystkimi badanymi genotypami *B. rapa*.

3. Wyniki otrzymane w toku realizacji projektu stały się podstawą do przygotowania kolejnego projektu badawczego, finansowanego w ramach MRiRW.

Wykaz publikacji wyników projektu Doniesienia konferencyjne

- Wojciechowski A., Jędryczka M., Mrówczyński M., Kalinka A., Kaczmarek J., Niemann J. 2014. The use of *in vitro* embryo rescue cultures for introduction of resistance genes from related *Brassica* species into oilseed rape (*Brassica napus* L.). Abstracts of III National Conference “Genetics and Genomics in Improving plants – from model plant to new variety, 5–7 November, Poznań, p. 79.
- Niemann J., Kaczmarek J., Wojciechowski A., Jędryczka M. 2014. Resistance of interspecific hybrids within the genus *Brassica* to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) in glasshouse and field conditions. Abstracts of 11th Conference of the European Foundation for Plant Pathology – “Healthy plants – healthy people”, 11–13 September Kraków, Poland, p. 353.
- Niemann J., Kaczmarek J., Brachaczek A., Wojciechowski A., Jędryczka M. 2015. Ocena odporności wybranych odmian rzepaku ozimego na suchą zgniliznę kapustnych i mączniaka rzekomego. 55 Sesja Naukowa Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego, 12–13 luty, Poznań, s.76.
- Niemann J., Olender M., Wojciechowski A. 2015. Interspecific hybridization between chosen *Brassica napus* and *Brassica rapa ssp. chinensis* genotypes through embryo rescue and their evaluation for crossability. XIV Ogólnopolska Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin. Poznań, 14–17 września, s. 147.
- Niemann J., Kaczmarek J., Wojciechowski A., Jędryczka M. 2016. Ocena odporności wybranych odmian rzepaku ozimego na naturalne porażenie przez *Leptosphaeria ssp.* 56 Sesja Naukowa Instytutu Ochrony Roślin Państwowego Instytutu Badawczego, 11–12 luty, Poznań, s. 65.
- Niemann J., Kaczmarek J., Wojciechowski A., Jędryczka M. 2016. Resistance to stem canker (*Leptosphaeria spp.*) in interspecific *Brassica* hybrids and rapeseed (*Brassica napus* L.) cultivars. IOBC-WPRS Working Group „Integrated Control in Oilseed Crops”, „Prospects and progress for sustainable oilseed crop protection”, 7–9.09.2016, Tartu, Estonia. IOBC-WPRS Bulletin Vol. 116, 2016 p. 90.
- Niemann J., Wojciechowski A., Mrówczyński M. 2017. Ocena odporności wybranych odmian rzepaku ozimego na inwazję śmietki kapuścianej (*Delia radicum* L.) w warunkach naturalnego zagrożenia szkodnikiem. 57 Sesja Naukowa Instytutu Ochrony Roślin IOR-PIB. Poznań, 09–10 luty

2017, streszczenia str. 109.

Niemann J., Kaczmarek J., Jędrzycka M. 2017. Screening for resistance to stem canker (*Leptosphaeria ssp.*) in selected rapeseed cultivars and *Brassica* genotypes. Pontevedra, Spain, 22–25.05.2017, abstracts book pp.64.

Niemann J., Weigt D., Mrówczyński M. 2018. Ocena odporności na śmietkę kapuścianą (*Delia radicum* L.) u mieszańców oddalonych z rodzaju *Brassica*. 58 Sesja Naukowa IOR-PIB, Poznań, 06–08 luty 2018.

Niemann J., Kaczmarek J., Weigt D., Jędrzycka M. 2018. Screening for resistance to stem canker (*Leptosphaeria ssp.*) and downy mildew (*Hyaloperonospora parasitica*) in *Brassica* hybrids. Zagrzeb, Chorwacja, 18–20.09.2018, abstracts book pp.176–179.

Niemann J., Kaczmarek J., Majka J., Szwarc J., Jędrzycka M. 2019. Zastosowanie techniki FISH do analizy struktury genomowej u mieszańców *Brassica* z podwyższoną odpornością na suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria spp.*). IV Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany”. Poznań, 507.11.2019, abstrakty str. 35.

Niemann J., Szwarc J., Kaczmarek J., Jędrzycka M. 2019. Broadening the genetic basis of *Leptosphaeria ssp.* resistance in *Brassica napus* by interspecific hybridization. 15th International Rapeseed Congress. Berlin, Niemcy, 16–19.06.2019, abstracts book pp. 375.

Publikacje

Niemann J., Olender M., Wojciechowski A., Tomkowiak A. 2015. Interspecific hybridization between *B. napus* and *Brassica rapa ssp. chinensis* genotypes through embryo rescue and their evaluation for crossability. *Biotechnologia* 96/2:184–191.

Niemann J., Kaczmarek J., Wojciechowski A., Jędrzycka M. 2016. Ocena odporności na suchą zgniliznę kapustnych (*Leptosphaeria spp.*) u mieszańców oddalonych z rodzaju *Brassica*. *Prog. Plant Prot./Post.Ochr. Roślin* 56 (2): 245–250.

Kaczmarek J., Niemann J., Weigt D., Jędrzycka M. 2018. Screening and identification of resistance to stem canker (*Leptosphaeria spp.*) and downy mildew (*Hyaloperonospora brassicae*) in *Brassica* hybrids. *Integrated Control in Oilseed Crops IOBC-WPRS Bulletin Vol. 136*: 176–179.

Niemann J., Jędrzycka M., Majka J., Mrówczyński M., Kaczmarek J., Weigt D. 2019. Introdukcja genów odporności na choroby i owady oraz męskiej sterility z pokrewnych gatunków rodzaju *Brassica* do rzepaku (*Brassica napus* L.). *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 286:199–201.

Niemann J., Szwarc J., Bocianowski J., Weigt D., Mrówczyński M. 2020. In-field screening for host plant resistance to *Delia radicum* and *Brevicoryne brassicae* within selected rapeseed cultivars and new interspecific hybrids. *Open Life Sciences* 15 (1): 711–720, <https://doi.org/10.1515/biol-2020-0074>.

Opracowanie modeli kalibracyjnych dla spektrometru NIRS o zakresie widma 400 – 2500 nm dla oznaczania glukozynolanów, białka, NDF, ADF oraz steroli i badania zmienności tych związków w roślinach oleistych

Development of calibration models for NIRS spectrometer with spectra range 400 – 2500 nm destined to quantitative measurement of glucosinolates, protein, NDF, ADF, sterols sum and research of variability of those in oilseed plants

Krzysztof Michalski✉, Renata Daleka

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy (IHAR-PIB), Radzików, Oddział w Poznaniu Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych
✉ email: km2@nico.ihar.poznan.pl

Słowa kluczowe: NIR, glukozynolany, białko, tłuszcz, włókno, analiza instrumentalna.

Projekt podzielono na cztery tematy badawcze

Cel

Temat badawczy 1 Określenie zmienności składu i zawartości glukozynolanów w próbkach nasion rzepaku. Celem tematu jest stworzenie bazy danych zawierającej skany w bliskiej podczerwieni oraz zawartość glukozynolanów próbek nasion.

Temat badawczy 2. Określenie zmienności zawartości białka, tłuszczu i włókna w próbkach nasion. Celem tematu jest wyselekcjonowanie próbek nasion rzepaku o zróżnicowanej zawartości białka, włókna i tłuszczu w nasionach, zeskanowanie widm tychże oraz ich analiza referencyjna.

Temat badawczy 3: Określenie zmienności w składzie i zawartości podstawowych steroli w oleju. Celem tematu jest wyselekcjonowanie we współpracy z hodowcami próbek rzepaku o zróżnicowanej zawartości steroli, zapis widm na spektrofotometrze NIRS 6500 oraz ich analiza metodą referencyjną aby stworzyć bazę danych do ewentualnej kalibracji.

Temat badawczy 4: Opracowanie kalibracji NIRS i oszacowanie błędu metody. Celem tematu jest opracowanie kalibracji do oszacowania błędu metody i wykorzystania otrzymanych równań do selekcji próbek.

Cele zrealizowano w całości

Materiały i metody

Temat 1 W latach 2014- 2020 r zebrano 1750 próbek nasion rzepaku pochodzących z materiałów własnych IHAR (Poznań) oraz Hodowli Roślin Strzelce które poddano analizie referencyjnej na skład i zawartość glukozynolanów metodą chromatografii gazowej silylowych pochodnych desulfogukozynolanów. Próbkę wybrano tak aby w miarę możliwości pokrywały cały dostępny zakres zmienności chemicznej glukozynolanów.

Temat 2 Pobrano próbki nasion rzepaku z linii i odmian będących w opracowaniu w IHAR O/ Poznań i spółkach IHAR w ilości 520 próbek. Zebrane próbki poddano analizie referencyjnej na zawartość białka, włókna, tłuszczu.

Temat 3 Pobrano próbki nasion rzepaku z linii i odmian będących w opracowaniu w IHAR O/ Poznań i spółkach IHAR oraz z kolekcji odmian rzepaku w ilości 300 próbek. Zebrane próbki poddano analizie referencyjnej steroli w oleju metodą chromatografii gazowej

Temat 4 Zebrane widma z wynikami referencyjnymi z lat 2014–2020 użyto do wyliczenia kalibracji służących do szybkiego oznaczania badanych składników w nasionach rzepaku.

Wnioski z prowadzonych badań

Temat 1. Stworzony zbiór kalibracyjny stanowi podstawę do stabilnej, odpornej na próbki nietypowe, kalibracji na zawartość glukozynolanów.



Udało się poszerzyć zakres zmienności glukozynolanów do 90 mikromoli/g co pokrywa praktycznie całą wariację dla glukozynolanów.

Baza próbek obejmuje lata 2014–2020 i pokrywa duży zakres zmienności klimatycznej jaka wystąpiła na obszarze północnej i zachodniej Polski.

Temat 2. Zebrane próbki mogą posłużyć wraz z zebranymi wcześniej do wyliczenia zaawansowanej kalibracji obejmującej analizę zawartości białka, tłuszczu, włókna.

Baza próbek umożliwia stworzenie taniej kompleksowej metody oceny nasion rzepaku obejmującej wszystkie podstawowe składniki występujące w nasionach rzepaku.

Temat 3. Zebrana baza próbek widmz oznaczoną zawartością steroli posłużyła do wyliczenia screeningowej kalibracji, która umożliwia hodowcom wstępną selekcję próbek nasion rzepaku

Temat 4. Stworzony zbiór kalibracyjny praktycznie pokrywa całą zmienność glukozynolanów

w rzepaku i może być podstawą do równania selekcyjnego. Również dokładność równań dla białka, tłuszczu, włókna ADF i NDF jest wystarczająca dla ich praktycznego użytkowania. Sterole nadal wymagają ulepszenia poprzez powiększenie bazy danych. Porównanie błędów dla zbioru 2014–19, 2014–20 pokazuje stabilizację dokładności dla glukozynolanów, poprawę dokładności dla steroli oraz NDF i ADF i lekkie pogorszenie dla tłuszczu. Porównując wyniki kalibracji z poprzednich lat z obecnymi można uznać iż kalibracje się stabilizują i stają się odporne na losowe próbki.

Osiągnięcia i zastosowanie

Zebrane dane (widma i wyniki referencyjne) wykorzystano do otrzymania równań kalibracyjnych, które zostały zainstalowane w programach pomiarowych

- HR Strzelce – DS2500
- HRr Strzelce O/Małyszyn= NIRS 6500
- IHAR O/Poznań – NIRS 6500

Badanie czynników determinujących niską strawność białka śruty uzyskanej z nasion rzepaku ozimego

Study of the factors determining the low protein digestibility of meal obtained from winter oilseed rape

Danuta Boros✉, Kinga Gołębiewska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: d.boros@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: białko, lignina, nieskrobiowe polisacharydy, niestrawny kompleks białkowo-polisacharydowy, glukozynolany, związki fenolowe

Celem badań było wyjaśnienie przyczyn mniejszej strawności białka śruty rzepakowej w porównaniu do strawności białka śruty sojowej oraz wskazanie innych składników poza włóknem, które powinny być wyeliminowane bądź ich ilość znacznie obniżona w nasionach rzepaku aby poprawić wartość paszową wyprodukowanej śrut. Cele realizowano poprzez: analizę zawartości składników odżywczych i antyżywnieniowych w śrutach rzepakowych uzyskanych z nasion o różnej barwie, ze szczególnym zwróceniem uwagi na różnice w składzie włókna pokarmowego, stopień powiązania składników włókna z białkiem, określenie zawartości innych składników śrutę mogących mieć niekorzystny wpływ na wykorzystanie białka, badanie wartości żywieniowej krucyferyny i napiny, wsparte doświadczeniami bilansowymi *in vivo*.

Materiałem badawczym był zestaw sześciu śrut rzepakowych uzyskanych z nasion pochodzących ze zbioru z 2014 roku, obejmujący trzy śrutę żółtonasienne otrzymane z nasion najbardziej zaawansowanych wówczas linii (PN-1038, PN-1027/3i i PN-1058/6i) oraz 3 śrutę czarnonasienne z odmian Brendy, Monolit i Konkret, a także śruta sojowa dostępna komercyjnie (SBM). Linie żółtonasienne rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) wykorzystane w badaniach otrzymano z Oddziału Roślin Oleistych IHAR-PIB w Poznaniu. Śrutę rzepakowe uzyskano w warunkach laboratoryjnych, po ekstrakcji rozdrobnionych nasion heksanem na gorąco. Tak uzyskane śrutę miały od 3,5% do 4,7% tłuszczu. W badaniach wykorzystano także izolaty białka rzepakowego, czystej krucyferyny i mieszaninę krucyferyny

z napiną oraz koncentrat białka sojowego, dostępnych komercyjnie na rynku.

Analizy chemiczne. W śrutach oznaczono zawartość suchej masy, białka ogółem i popiołu surowego zgodnie z metodami standardowymi AACC (2011), lipidów reszkowych metodą grawimetryczną według Marchello i in. (1971) oraz sacharozy i oligosacharydów według Bach Knudsen i Li (1991). Skład aminokwasowy białka analizowano metodą chromatografii jonowymiennej według Masona i in. (1980). W celu oszacowania wartości odżywczej białka wyliczono wskaźnik aminokwasu ograniczającego (CS) oraz wskaźnik aminokwasów egzogennych (EAAI), przyjmując jako wzorzec skład aminokwasowy białka wzorcowego FAO (1965) (Rakowska i in., 1978). Zawartość glukozynolanów (GLS) oznaczono chromatograficznie według procedury opisanej w Polskiej Normie, PN-EN ISO 9167–1 (1999) na HPLC, związki fenolowe ogółem metodą kolorymetryczną z zastosowaniem odczynnika Folina-Ciocalteu (Singleton i Rossi, 1965), taniny metodą kolorymetryczną z wykorzystaniem odczynnika wanilinowego (Price i in. 1978; Naczek i in. 1996), a włókno pokarmowe metodą (TDF) enzymatyczno-grawimetryczną, zwanej metodą Uppsalską, jako sumę nieskrobiowych polisacharydów (NSP), oligosacharydów, kwasów uronowych i ligniny, zgodnie z metodą AACC nr 32–25 (2011). W przypadku polifenoli wyniki przedstawiono jako ekwiwalent miligramów kwasu sinapowego na g śrutę, natomiast tanin w mg katechiny na g śrutę. Oznaczono ponadto zawartość włókna detergentowego neutralnego (NDF) i detergentowego kwaśnego



(ADF), zgodnie z metodą Van Soesta (1963). Każdą analizę wykonano w co najmniej dwóch powtórzeniach, a wyniki przeliczono na suchą masę beztłuszczową (smbtł). Suma zawartości białka, składników mineralnych i sacharozy składała się na ilość składników odżywczych (SSO). Pozostałe oznaczone związki zaliczono do grupy składników antyżywniowych śruty rzepakowej. Doświadczenie bilansowe wykonano na rosnących szczurach według procedury Egguma (1973).

Wyniki opracowano statystycznie, wykorzystując do tego celu analizę wariancji modelu ANOVA oraz procedurę porównań wielokrotnych Tukeya – Kramera (Statistica 9.1).

Wyniki. Stwierdzono istotne różnice w zawartości składników pokarmowych oraz składników antyżywniowych między śrutami rzepakowymi żółtonasiennymi i czarnonasiennymi, a także między śrutami rzepakowymi a śrutą sojową. Śruty otrzymane z nasion rzepaku żółtonasiennego miały średnio o blisko 8 jednostek procentowych więcej białka w porównaniu do śrut otrzymanych z odmian czarnonasiennych (tab. 1). Śruta sojowa jest bogatszym źródłem białka niż śruty rzepakowe, niezależnie od koloru nasion rzepaku z jakich zostały otrzymane. Śruty rzepakowe miały istotnie więcej sacharozy, a śruty żółtonasienne także składników mineralnych w porównaniu do śruty sojowej. Zawartość białka miała największy wpływ na zróżnicowanie sumy składników odżywczych w badanych śrutach, stąd śruty żółtonasienne miały istotnie więcej ogółem tych składników w porównaniu do śruty czarnonasiennej, a oba rodzaje śruty rzepakowej istotnie mniej niż śruta sojowa. Białko rzepakowe charakteryzowało się bardzo dobrze zbilansowanym składem aminokwasowym, lepszym niż skład aminokwasowy białka śruty sojowej. Wartość średnia wskaźnika aminokwasu ograniczającego CS obliczona dla białka śrut rzepakowych była istotnie większa aniżeli wartość CS uzyskana dla śruty sojowej (60,9 vs. 51,0). Nie stwierdzono istotnych różnic w zawartości aminokwasów w białku między śrutami rzepakowymi wyprodukowanymi z nasion o różnej barwie.

Glukozynolany w nasionach rzepaku, pomimo istotnie obniżonej zawartości, są wciąż ważnym celem brany pod uwagę w pracach hodowlanych. W żywieniu zwierząt, zawartość glukozynolanów w nasionach na poziomie obecnej normy (15 $\mu\text{mol/g}$ nasion), zapewnia dobre przyrosty wagi i reprodukcję zwierząt, jednakże nadal skutkuje powiększeniem tarczycy (Święch i in., 2016). Badane genotypy rzepaku miały znacznie mniej glukozynolanów od wyznaczonej normy, przy czym

nasiona linii rzepaku żółtonasiennego charakteryzowały się istotnie mniejszą ich ilością niż nasiona odmian czarnonasiennych (9,1 vs. 12,3 $\mu\text{mol/g}$ nasion). Do składników antyżywniowych rzepaku zalicza się także polifenole, w tym kwasy fenolowe oraz taniny skondensowane. Śruty rzepakowe różniły się nieznacznie pod względem zawartości polifenoli ogółem, choć śruta żółtonasienna miała średnio istotnie mniej tych związków niż śruta czarnonasienna (tab. 1). Istotnie większe ilości tanin stwierdzono natomiast w śrutach żółtonasiennych. Śruta sojowa miała tylko śladowe ilości tych związków.

Duża zawartość włókna jest uznana obecnie za główny czynnik odpowiedzialny za niską strawność białka rzepaku. Badane śruty rzepakowe różniły się istotnie zawartością włókna pokarmowego oraz włókna detergentowego neutralnego i detergentowego kwaśnego (tab. 2). Śruty czarnonasienne charakteryzowały się największą ilością każdego z oznaczonych rodzajów włókna. Różnica wynikała głównie z zawartości ligniny, która jest głównym składnikiem okrywy owocowo-nasiennej nasion rzepaku. Z tego względu śruty żółtonasienne miały średnio o 10 jednostek procentowych mniej ligniny niż śruty czarnonasienne (3,5 vs. 13,5%). Pod względem zawartości włókna pokarmowego śruty żółtonasienne nie różniły się istotnie od śruty sojowej, miały natomiast istotnie więcej obu rodzajów włókna detergentowego.

Obniżona zawartość włókna w śrucie lub makużu nie wpływa jednakże na poprawę strawności białka rzepaku, co wykazały nasze wcześniejsze wyniki jak również dane literaturowe (Gołębiowska, 2018; Święch i in., 2016). W badaniach *in vitro* prowadzonych w niniejszym zadaniu stwierdziliśmy natomiast, że stopień strawności czystych, wyizolowanych białek rzepaku jest bardzo wysoki, dorównujący lub nawet istotnie lepszy od strawności izolatu białka sojowego. Ponadto z dwóch głównych białek rzepaku, napina stanowiąca około 20% wszystkich białek rzepaku, w uwagi na korzystniejszy skład aminokwasowy, odznacza się większą przyswajalnością i w efekcie lepszym wykorzystaniem netto niż krucyferyna, główne białko rzepakowe. Wyniki tych badań wskazują, że za niską strawność białka śruty rzepakowej odpowiedzialne są składniki niebiałkowe, tworzące kompleksy niestrawne z białkami.

Wnioski z przeprowadzonych badań

1. Rzepaki żółtonasienne charakteryzują się większą wartością odżywczą niż tradycyjne rzepaki czarnonasienne, mają zarówno

- wiecej białka oraz tłuszczu. Hodowla odmian o zmniejszonym udziale łuski w nasionach jest więc kierunkiem który powinien być kontynuowany.
2. Śruty żółtonasienne mają znacznie mniejszą niż śrutę czarnonasienną zawartość włókna pokarmowego, porównywalną jego ilości w śrucie sojowej.
 3. Różnica w zawartości włókna pokarmowego oraz włókna detergentowego między śrutami rzepakowymi wynika głównie z różnicy w zawartości ligninu.
 4. Mniejsza zawartość włókna w śrutach żółtonasiennych w porównaniu do śrut czarnonasiennych, związana niemal wyłącznie z ligniną, nie wpływa na poprawę strawności białka rzepakowego.
 5. Czyste frakcje białka rzepaku mają dużą wartość odżywczą, istotnie większą niż białko sojowe. Na wartość tę składa się, przy podobnej strawności, korzystniejszy skład aminokwasowy, większa ich przyswajalność i wykorzystanie. Napina, białko typu albumin, jest białkiem rzepaku jakościowo istotnie lepszym niż frakcja globulinowa, krucyferyna.
 6. Za mniejszą strawność białka śrutę rzepakową niż śrutę sojową odpowiedzialne są składniki niebiałkowe, polisacharydy tworzące kompleksy niestrawne z białkami.

Osiągnięcia projektu

W naszej strefie klimatycznej nie ma możliwości wyprodukowania pasz białkowych z roślin bobowatych grubonasiennych mogących całkowicie zastąpić importowaną śrutę sojową. Najważniejszą alternatywną rośliną białkową w tych warunkach jest więc tylko śruta rzepakowa. Wyniki dostarczyły wiedzy, która może być wykorzystana do prac selekcyjnych mających na celu dalszą poprawę wartości paszowej śrutę rzepakową. Zapoczątkowane prace nad zamianą proporcji frakcji głównych białek w nasionach rzepaku są kierunkiem bardzo obiecującym w hodowli rzepaku. Wyniki wskazują także sposoby dalszego udoskonalania wartości paszowej śrutę na drodze technologicznej. Niezbędne są dalsze prace w tym zakresie.

Wykaz publikacji z wyników

Monografie

Boros D., Fraś A., Gołębiewska K., Gołębiewski D., Paczkowska O., Wiśniewska M. (2015). Wartość odżywcza i właściwości prozdrowotne ziarna odmian zbóż i nasion

rzepaku zalecanych do uprawy w Polsce. Monografia pod red. Boros D. i Fraś A. Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR-PIB, 49, 1–119. ISBN 83–891172–83–6.

Gołębiewska K. (2018). Żółtonasienny rzepak ozimy jako źródło białka i energii w żywieniu zwierząt monogastycznych. Praca doktorska, IHAR-PIB Radzików, promotor prof. dr hab. Danuta Boros, promotor pomocniczy dr Anna Fraś. Praca obroniona 02.10.2018.

Doniesienia konferencyjne

Gołębiewska K., Boros D., Bartkowiak-Broda I. (2016). Charakterystyka chemiczna śrutę otrzymanej z najnowszych genotypów czarno- i żółtonasiennych rzepaku ozimego. Streszczenia XXXIII Konferencji Naukowej „Rośliny Oleiste-Oilseed Crops, Poznań, 05–06.04.2016, str. 119–122.

Gołębiewska K., Boros D., Gzowska M. (2017). Śruta rzepakowa podstawowe, krajowe źródło białka paszowego – możliwe kierunki badań nad poprawą jej jakości. Streszczenia Referatów i Posterów XIII Ogólnopolska konferencja naukowa: „NAUKA DLA HODOWLI I NASIENICTWA ROŚLIN UPRAWNYCH. ISBN 83–891172–87–9. Zakopane, 30.01 – 3.02. 2017., str. 104–105.

Boros D., Gołębiewska K., Bartkowiak-Broda I. (2018). Śruta rzepakowa podstawowym źródłem krajowego białka paszowego – stan obecny i perspektywy. Streszczenia – Abstracts XXXIV Konferencji Naukowej „Rośliny Oleiste – Postępy w Genetyce, Hodowli, Technologii i Analityce Lipidów”, Poznań 10–11.04.2018, pp.: 20–23 (ISBN 978–83–64246–83–8).

Gołębiewska K., Boros D. (2018). Skład aminokwasowy oraz wartość odżywcza krucyferyny i napiny – głównych białek rzepaku. Streszczenia – Abstracts XXXIV Konferencji Naukowej „Rośliny Oleiste – Postępy w Genetyce, Hodowli, Technologii i Analityce Lipidów”, Poznań 10–11.04.2018, pp.: 96–98 (ISBN 978–83–64246–83–8).

Bartkowiak-Broda I., Boros L., Oleksiak T., Boros D. (2019). Stan badań dla hodowli roślin białkowych w Polsce w celu poprawy krajowego bilansu białkowego. Streszczenia Referatów i Posterów: XIV Ogólnopolska konferencja naukowa: NAUKA DLA HODOWLI I NASIENICTWA ROŚLIN UPRAWNYCH – „Nowe wyzwania dla hodowli i nasiennictwa roślin”, Zakopane 5–8.02.2019. Biul. IHAR 285, 285.

Gołębiewska K., Gołębiewski D., Boros D. (2019). Wpływ odmiany na zróżnicowanie zawartości składników włókna pokarmowego w śrucie rzepakowej. Streszczenia Referatów i Posterów: XIV Ogólnopolska konferencja naukowa: NAUKA DLA HODOWLI I NASIENICTWA ROŚLIN UPRAWNYCH – „Nowe wyzwania dla hodowli i nasiennictwa roślin”, Zakopane 5–8.02.2019. Biul. IHAR. 285. 297–298.

Tabela 1

Zawartość składników odżywczych oraz glukozydów, tanin i polifenoli w śrutach uzyskanych z nasion linii żółtonasiennych i odmian czarnonasiennych rzepaku ozimego oraz w śrucie sojowej (% smbtł).

Rodzaj śruty	Białko	Popiół	Sacharoza	Suma składników odżywczych	Suma glukozydów ($\mu\text{mol/g}$ nasion)	Taniny skondensowane (mg/g smbtł)	Polifenole ogółem (mg/g smbtł)
Śruta żółtonasienna	47,1 ^b	8,3 ^a	9,3 ^a	64,7 ^b	9,1 ^b	8,2 ^a	21,7 ^a
Śruta czarnonasienna	39,3 ^c	8,0 ^{ab}	8,7 ^a	56,0 ^c	12,3 ^a	6,3 ^b	22,3 ^a
Śruta sojowa	52,7 ^a	7,5 ^b	7,4 ^b	67,6 ^a	-	0,2 ^c	2,0 ^b

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $P < 0,05$.

Tabela 2

Zawartość włókna pokarmowego (TDF), jego składników oraz włókna detergentowego neutralnego (NDF) i kwaśnego (ADF) w śrutach otrzymanych z nasion linii żółtonasiennych i odmian czarnonasiennych rzepaku ozimego oraz w śrucie sojowej (% smbtł).

Rodzaj śruty	NSP	Oligosacharydy	Kwasy uronowe	Lignina	TDF	NDF	ADF
Śruta żółtonasienna	16,9 ^a	2,2 ^b	4,5 ^b	3,5 ^b	27,1 ^b	18,0 ^b	11,4 ^b
Śruta czarnonasienna	17,0 ^a	1,9 ^b	5,1 ^a	13,5 ^a	37,5 ^a	25,4 ^a	21,2 ^a
Śruta sojowa	15,4 ^b	4,1 ^a	3,2 ^c	4,3 ^b	27,0 ^b	10,4 ^c	5,6 ^c

Wartości średnie w kolumnach oznaczone różnymi literami różnią się istotnie przy $P < 0,05$.

Badanie możliwości zwiększenia żywotności i stopnia zapylenia kwiatów gryki zwyczajnej w celu uzyskania wyższego plonu nasion

Study of the possibility of increasing the vitality and pollination of buckwheat flowers in order to obtain a higher seed yield

Agnieszka Płażek✉, Franciszek Dubert, Aneta Słomka, Przemysław Kopeć, Michał Dziurka

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
✉ e-mail: rrplazek@cyf-kr.edu.pl

Słowa kluczowe: biologia kwitnienia, biostymulatory, gryka zwyczajna, embriologia, nektar, plon nasion

Założenia i cel projektu

Gryka zwyczajna (*Fagopyrum esculentum* Moench.) jest cenną rośliną z rodziny *Polygonaceae*, uprawianą głównie na cele spożywcze ze względu na bardzo dobry skład chemiczny nasion, a zwłaszcza na wysoką zawartość żelaza, rutyny, błonnika oraz lizyny i innych aminokwasów (Halbrecq i in., 2005; Christa i Soral-Śmietana, 2008). Roślina ta posiada także działanie fitosanitarne, wysoką zdolność przyswajania azotu i fosforu z gleby, odporność na szkodniki i choroby, oraz małe wymagania glebowe. Ze względu na powyższe właściwości gryka ma duży potencjał gospodarczy, jednakże wciąż niedostatecznie wykorzystywany w polskim rolnictwie, prawdopodobnie ze względu na niestabilne i niskie plonowanie. Niski plon nasion gryki przypisuje się głównie skomplikowanej biologii kwitnienia i dużej wrażliwości na szereg czynników środowiskowych, jak też wysokim stopniem zaburzeń w rozwoju embriologicznym, co jest warunkowane głównie podłożem genetycznym (Cawoy i in., 2009; Słomka i in., 2017). Gatunek ten cechuje samoniezgodność, wynikająca z występowania heterostylii, tj. kwiatów typu Pin i Thrum, o zróżnicowanej długości słupków i pręcików, pomiędzy którymi musi dojść do zapłodnienia krzyżowego. Gryka jest rośliną niesamokończącą i kwitnie przez cały okres wegetacji, co powoduje występowanie silnej konkurencji o asymilaty pomiędzy związanymi już nasionami a wciąż produkowanymi kwiatami.

Proces kwitnienia i zapyłania zależy w dużej

mierze od warunków pogodowych, a zwłaszcza od temperatury i uwodnienia gleby. Gryka zapyłana jest głównie przez pszczoły zwabiane nektarem bogatym w cukry, aczkolwiek w naszych doświadczeniach głównymi zapyłaczami okazały się trzmiele i muchówki. Największym problemem w uprawie gryki jest niestabilność plonowania ze względu na słabe zawiązywanie nasion w stosunku do liczby wytworzonych kwiatów (około 10% kwiatów zawiązuje nasiona).

Gryka ma krótki okres wegetacji (70–90 dni). Jest wrażliwa na przymrozki, stąd optymalny termin siewu przypada po 15 maja. Zbyt wysoka temperatura i susza z kolei powodują zamieranie zawiązków nasion. Długotrwałe opady wymywają nektar, co powoduje, że oblot przez pszczoły jest niewystarczający do zapylenia. Zbyt wysokie temperatury i susze wysuszają znamię słupka, które szybko zasycha, pyłek lub łagiewka pyłkowa zamierają i nie dochodzi do zapłodnienia (Adachi i in., 1983).

Współczesne rolnictwo dopuszcza do użytku szereg biostymulatorów, które nie mają szkodliwego wpływu na środowisko. Ich rola polega na zwiększaniu plonów poprzez wpływ na przebieg procesów fizjologicznych związanych z kwitnieniem, zapłodnieniem, rozwojem owoców i nasion. Ponadto, niektóre z tych substancji podwyższają tolerancję roślin na niekorzystne czynniki środowiskowe i łagodzą ich negatywny wpływ na rośliny.

Celem projektu było zbadanie możliwości przedłużenia fazy kwitnienia roślin gryki poprzez



zwiększenie żywotności kwiatów, jak też zwiększenie stopnia ich zapylenia, co miałyby bezpośredni wpływ na plon nasion. Ponadto, prowadzone badania miały pozwolić na wskazanie odmiany lub rodzaju gryki o wyższej zawartości cukrów w nektarze i o dłuższym okresie kwitnienia i nektarowania, co miałyby wpływ na intensywniejszy oblot owadów zapylających.

Zrealizowany projekt dotyczył analizy biologii kwitnienia sześciu polskich odmian i rodów gryki, określenia przyczyn krótkiej żywotności kwiatów oraz zbadania możliwości jej przedłużenia i wspomaganie procesu zawiązywania nasion. Wykonano ocenę wpływu różnych biostymulatorów – roślinnych regulatorów wzrostu oraz komercyjnych preparatów na prawidłowy rozwój woreczków zalążkowych, żywotność pyłku, skład nektaru oraz plon nasion. Analizowano też procent aborcji kwiatów i zarodków tak u roślin kontrolnych, jak i pod wpływem stosowanych stymulatorów.

Wymiernym rezultatem projektu było rozpoznanie biologii kwitnienia badanych materiałów hodowlanych gryki, wytypowanie najlepiej plonującego rodzaju/odmiany oraz wybranie stymulatorów poprawiających żywotność kwiatów, stopień ich zapylenia oraz strukturę plonu.

Material i Metody

Material roślinny

Badania prowadzono na polskich odmianach „Kora” i „Panda” oraz czterech rodach: PA13,14, 15 i 16. Nasiona uzyskiwano z Zakładu Produkcyjnego w Palikijach, Oddziału w Zamościu Małopolskiej Hodowli Roślin w Polanowicach. Projekt realizowano w doświadczeniach prowadzonych pod otwartym tunelem foliowym, w którym zapewniano optymalne podlewanie roślin i możliwość oblotu owadów. Rośliny wysiewano do pojemników o objętości 4 l, wypełnionych ziemią komercyjną (Ekoziem, pH 6.0) zmieszaną z perlitem w stosunku objętościowym 1:1.

Stymulatory

Zastosowano wodne roztwory stymulatorów w następujących stężeniach: GA₃ (kwas gibberelowy) – 100 mg/l; NAA (kwas naftylo-1-octowy) – 50 mg/l; BAP (6-benzyloamino-puryna) – 50 mg/l; putrescyna – 290 mg/l; cysteina – 100 mg/l; ASAHI SL – 1 ml/l; Tytanit – 0,3 ml/l; NaCl – 10 mg/l; kontrola była opryskiwana wodą destylowaną. Stymulatory aplikowano na początku kwitnienia i w fazie pełnego kwitnienia. Po dwóch tygodniach po aplikacji stymulatorów zbierano pąki i kwiaty do analiz embriologicznych oraz do analiz

ilościowych i jakościowych nektaru, oceniano liczbę kwiatów. Rośliny uprawiano aż do uzyskania plonu nasion.

Analizy embriologiczne

Badania embriologiczne zalążków wykonano standardową metodą parafinową z hematoksyliną żelazistą wg Heidenhaina w połączeniu z błękitem alcjanowym i/lub metodą przejaśniania (Słomka i in. 2017). Pyłek izolowano z kwiatów utrwalanych w roztworze FAA (mieszanina formaliny, alkoholu i kwasu octowego) i barwiono barwnikiem Alexandra. Standardowo z kwiatu pobierano pyłek i podliczano liczbę żywotnych i nieżywotnych ziaren na dziesięć losowo wybranych pól widzenia. Żywotność pyłku sprawdzano w mikroskopie świetlnym. Woreczki zalążkowe utrwalone w roztworze FAA, izolowano, traktowano alkoholem absolutnym, oczyszczano w salicylanie metylu rozpuszczonym w etanolu. Preparaty obserwowano w mikroskopie Nikonu Eclipse 80i. Z każdego obiektu wykonywano po 10 preparatów pyłku i woreczków zalążkowych.

Analizy chromatograficzne składu nektaru

Analizę wykonywano w 5 powtórzeniach: pobierano po 50 kwiatów na każdą próbę z każdej odmiany i traktowania oraz terminu oprysku stymulatorami. Skład nektaru analizowano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), używając standardów cukrów firmy Sigma-Aldrich. Próbkę nektaru rozcieńczano acetonitrylem, wirowano i po przefiltrowaniu przez membranę 0,22 µm nastrzykiwano na kolumnę chromatograficzną. Analizy wykonano na chromatografie z detektorem elektrochemicznym w trybie amperometrycznym z impulsową zmianą potencjału na złotej elektrodzie. Rozdział badanych cukrów prowadzono na kolumnie Hamilton RCX-10; zastosowano elucję gradientową 80 mM roztworem wodnym NaOH i 500 mM roztworem wodnym octanu sodu.

Analiza liczby kwiatów, ich aborcji, oraz parametrów plonu

Liczbę kwiatów produkowanych przez jedną roślinę, w tym także kwiatów niezapylnych i pąków kwiatowych oceniano na 15 roślinach z każdego traktowania. Po analizie nasion obliczano aborcję kwiatów według wzoru: $(1 - \text{liczba nasion/liczba kwiatów}) \times 100$. Obliczano masę nasion uzyskanych z jednej rośliny i masę tysiąca nasion (MTN). Przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy liczbą kwiatów, ich aborcją oraz liczbą

uzyskanych nasion i ich masą.

Najważniejsze wyniki

Biologia kwitnienia

Analizy mikroskopowe wykazały wysoką żywotność pyłku wszystkich badanych rodów i odmian (99–100%). Negatywny wpływ na żywotność pyłku wykazano po zastosowaniu NAA, NaCl oraz GA₃, jednakże tylko w niektórych przypadkach.

W zalążkach traktowanych stymulatorami wzrostu oraz w zalążkach kontrolnych badanych genotypów, w większości wypadków rozwój gametofitu żeńskiego, zarodka i bielma był prawidłowy (rys. 1). Degeneracje zalążków i zarodków znaleziono u wszystkich badanych odmian i rodów niezależnie od zastosowanego biostymulatora (rys. 2). U odmian „Kora” i „Panda” obserwowano 25–30% zdegenerowanych woreczków zalążkowych, u rodów PA13 i PA14 degeneracje zalążków sięgały 30–40%, a degeneracje zarodków – 20%. W przypadku rodów PA15 i PA16 degenerowało najmniej woreczków zalążkowych, około 10–13% i tylko 3% zarodków. Należy zaznaczyć, że w niektórych przypadkach przyczyną obumierania zarodków było „zagłodzenie” wynikające z dużej konkurencji o asymilaty.

Nektarowanie

U wszystkich badanych odmian i rodów najobfitsze nektarowanie notowano na początku kwitnienia. W tym terminie stwierdzono też w nektarze największą zawartość cukrów, w porównaniu do fazy pełnego kwitnienia. Wyjątek stanowił ród PA16, dla którego termin aplikacji biostymulatorów nie odgrywał roli. Nektar gryki składał się głównie z fruktozy (ponad 40% ogólnej puli cukrów), glukozy, sacharozy, maltozy i fruktanów. Dodatkowo w skład nektaru wchodził inozytol i glicerol, który spełniał rolę „wypełniacza”. W przypadku odmian „Kory” i „Pandy” nie znaleziono różnic w zawartości cukrów na początku i w pełni kwitnienia, pomimo, że masa i objętość nektaru były zdecydowanie większe na początku kwitnienia. Na zwiększenie nektarowania wpływały takie stymulatory, jak putrescyna, ASAHI SL i Tytanit. Najslabiej nektarowały rody PA15 i PA16 i w ich przypadku nie stwierdzono większego nektarowania po aplikacji stymulatorów.

Efektywność kwitnienia, produkcja nasion i ich masy

Najwięcej kwiatów produkował ród PA15, a najmniej odmiana „Panda”. Wszystkie rody

kwitły obficie od „Pandy” i „Kory”. Pomiędzy liczbą kwiatów a aborcją wykazano dla wszystkich odmian i rodów dodatnią korelację (średnio dla wszystkich odmian i rodów wynosiła ona $r = 0,85$; $p < 0,05$), co oznacza, że im więcej roślina produkowała kwiatów, tym więcej kwiatów ulegało aborcji. Najwięcej nasion w obu terminach produkował ród PA15, najmniej odmiana „Panda”. Masa tysiąca nasion była największa w przypadku rodu PA15. Wykazano negatywną korelację pomiędzy liczbą nasion a MTN. Tylko w przypadku rodu PA15 wykryto statystycznie istotną korelację pomiędzy liczbą kwiatów a liczbą nasion. U pozostałych odmian i rodów korelacja ta nie była istotna, lecz we wszystkich przypadkach wykazano ujemną zależność pomiędzy tymi dwoma parametrami.

Wnioski

1. Wszystkie badane w projekcie rody i odmiany wykazują bardzo wysoką żywotność mikrospor (ziaren pyłku).
2. Woreczki zalążkowe roślin kontrolnych oraz traktowanych różnymi stymulatorami degenerują (od 10% do 40%) albo w wyniku braku zapłodnienia, albo w wyniku konkurencji o asymilaty z wciąż powstającymi kwiatami. Ich aborcja ma przede wszystkim podłoże genetyczne. Najmniejszy stopień degeneracji zalążków i zarodków wykazują rody PA15 i PA16, a największy rody PA13 i PA14.
3. Pomiędzy intensywnością kwitnienia i aborcją istnieje silna dodatnia korelacja.
4. Obfitość nektarowania jest większa na początku kwitnienia. Zawartość większości cukrów jest wyższa w początkowej fazie kwitnienia, niż w fazie pełnego kwitnienia. Wyjątkiem w tym przypadku jest ród PA16.
5. Głównymi składnikami nektaru gryki zwyczajnej jest fruktoza i glukoza, przy czym fruktozy jest więcej niż glukozy.
6. Na zwiększenie obfitości nektarowania wpływają putrescyna, ASAHI SL i Tytanit, co znajduje odzwierciedlenie w zwiększeniu plonu nasion, z wyjątkiem rodów PA15 i PA16.
7. Pomiędzy liczbą wyprodukowanych kwiatów przez rośliny gryki a liczbą uzyskanych pełnych nasion nie ma istotnej korelacji (z wyjątkiem PA15). Zawsze jednak obserwuje się negatywną zależność pomiędzy tymi parametrami.
8. Badane odmiany i rody gryki reagują specyficznie na zastosowane stymulatory. W większości przypadków najlepsze efekty w stymulowaniu zawiązywania nasion oraz

uzyskiwaniu ich masy daje putrescyna, Tytanit i ASAHI SL.

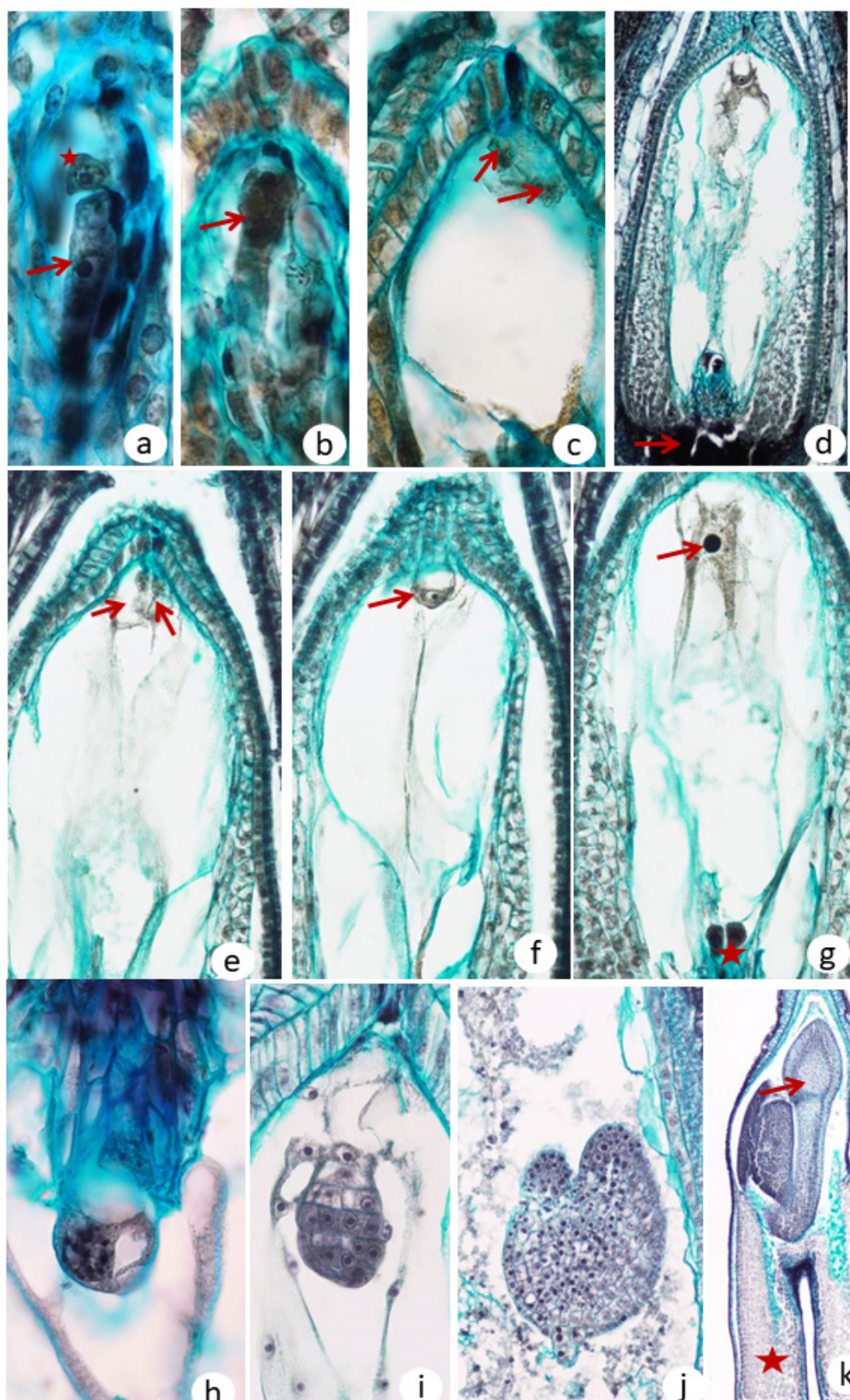
9. Tytanit i putrescyna zmniejszają liczbę odrzuconych kwiatów i zwiększają liczbę zapłodnionych kwiatów, co skutkuje zwiększoną liczbą dojrzałych nasion.
10. Stymulatory stosowane na początku kwitnienia zwiększają liczbę i masę nasion w przeliczeniu na jedną roślinę.
11. Najbardziej interesującym materiałem hodowlanym wydaje się ród PA15 (obecnie zarejestrowany jako odmiana „Korona”).
12. Hodowla nowych form roślin gryki powinna iść w kierunku roślin samokończących lub produkujących mniejszą liczbę kwiatów.

Publikacja zawierająca wyniki z projektu

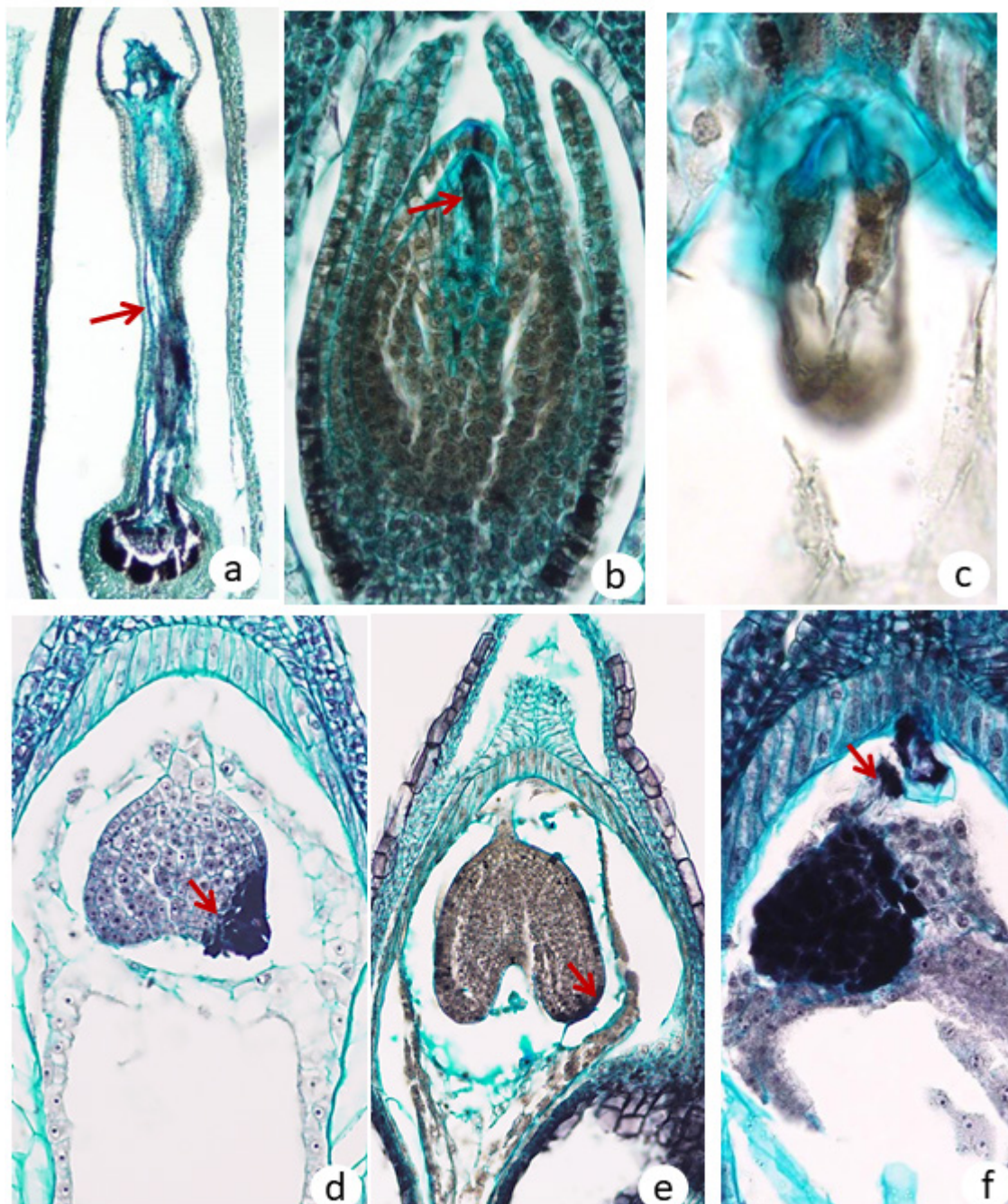
Słomka, A., Michno, K., Dubert, F., Dziurka, M., Kopeć, P., Płażek, A. (2017). Embryological background of low seed set in distylous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) with biased morph ratios, and biostimulant-induced improvement of it. *Crop & Pasture Science*, 68 (7), 680–690.

Literatura

- Adachi, T., Kawabata, K., Matsuzaki, N. (1983). Observation of pollen tube elongation, fertilization and ovule development in autogamous autotetraploid buckwheat. *Proc. 2nd Int. Symp. Buckwheat Miyazaki Buckwheat Research*: 103-113.
- Cawoy, V., Ledent, J-F., Kinet, J-M., Jacquemart, A-L. (2009). Floral biology of common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench). *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*, 3(1), 1–9 .
- Christa, K., Soral-Šmietana, M. (2008). Buckwheat grains and buckwheat products—Nutritional and prophylactic value of their components—A review. *Czech Journal of Food Science*, 26(3), 153–162.
- Halbrech, B., Rommedenne, P., Ledent, J. F. (2005). Evolution of flowering, ripening and seed set in buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench): quantitative analysis. *European Journal of Agronomy*, 23(3), 209–224.
- Słomka, A., Michno, K., Dubert, F., Dziurka, M., Kopeć P., Płażek, A. (2017). Embryological background of low seed set in distylous common buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) with biased morph ratios, and biostimulant-induced improvement of it. *Crop & Pasture Science*, 68 (7), 680–690.



Rys. 1. Prawidłowy rozwój woreczka zalążkowego (wz), zarodka i bielma u dwóch odmian *Fagopyrum esculentum*, „Kora” i „Panda” traktowanych różnymi biostymulatorami oraz w kontroli. 1-jądrowy wz (strzałka) oraz megaspóra (gwiazdka) (a); 2-jądrowy wz (strzałka) (b); 2 jądra 4-jądrowego wz (strzałki) (c); ciemno barwiąca się warstwa u nasady zalążka (strzałka) (d); kolejne przekroje tego samego wz (e-g): synergidy (strzałki) (e); komórka jajowa (strzałka) (f); komórka centralna (strzałka) oraz antypody (gwiazdka) (g); zygota (h); prazarodek (i); zarodek sercowaty (j); zarodek dojrzały (strzałka) oraz bielmo komórkowe (gwiazdka) (k). Kontrola „Kora” (a), NAA „Panda” (b), NaCl „Kora” (c), NaCl „Kora” (d), ASAHI „Kora” (e-g), Kontrola „Panda” (h), Putrescyna „Panda” (i), GA_3 „Kora” (j, k).



Rys. 2. Degeneracje zalążków, woreczków zalążkowych oraz elementów budowy woreczków zalążkowych u dwóch odmian *Fagopurum esculentum* „Kora” i „Panda” traktowanych różnymi biostymulatorami oraz w kontroli. Degeneracja całego zalążka (strzałka) (a); degeneracja 1-jądrowego wz (strzałka) (b); degeneracja synergid (c); degeneracja części zarodka (strzałka) (d); degeneracja praskórki zarodka (strzałka) (e); zdegenerowany zarodek wraz z wieszadelkiem (strzałka) (f). BAP Kora (a, b), Titanit „Panda” (c), Titanit „Kora” (d), Kontrola „Panda” (e), BAP „Panda” (f).

Poszukiwanie form kukurydzy o wysokiej odporności na fuzariozę kolb i zgorzeli podstawy łodygi powodowanej przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.

Identification of new sources highly resistant to ear rot and stalk rot of maize caused by *Fusarium* spp.

Elżbieta Czembor✉, Seweryn Frasiński

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: e.czembor@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: fuzarioza kolb, *Fusarium graminearum*, kukurydza, mykotoksyny, zgorzel podstawy łodygi

W Polsce, nasilenie fuzaryjnej zgorzeli łodyg kukurydzy może lokalnie sięgać nawet 100%, a straty ilościowe w plonie ziarna wynoszą wówczas 60–70%. Z danych z poletek doświadczalnych wynika, że przy porażeniu roślin na poziomie 30–40% i wyleganiu na poziomie 15–20%, straty ilościowe w plonie ziarna sięgają 20% i należy je powiększyć o straty jakościowe. W Polsce straty ilościowe w plonie ziarna powodowane przez fuzariozę kolb są niższe (sięgają ok. 10–20%), ale przy znacznym pogorszeniu jego parametrów jakościowych dyskwalifikuje je jako nie nadające się na cele konsumpcyjne bądź paszowe, ze względu na wysoką zawartość mykotoksyn. Wysoka odporność roślin na porażenie przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. nie koniecznie świadczy również o odporności genotypu na zdolność do gromadzenia mykotoksyn (Czembor, obserwacje własne).

Osiągnięte cele zadania to:

- identyfikacja cech morfologicznych i fenologicznych powiązanych z odpornością na fuzariozę kolb,
- określenie efektu heterozji i współczynnika odziedziczalności dla stopnia odporności na fuzariozę kolb,
- określenie efektu heterozji i współczynnika odziedziczalności dla cech fenologicznych i morfologicznych powiązanych z odpornością kukurydzy na fuzariozę kolb,
- określenie efektywności poszukiwania źródeł odporności na fuzariozę kolb i zgorzeli podstawy łodygi metodą rodowodową uwzględniając markery morfologiczne powiązane z odpornością na fuzariozę kolb.

Materiały i Metody

Identyfikacja markerów fenologicznych i morfologicznych powiązanych z odpornością na fuzariozę kolb oraz określenie współczynnika odziedziczalności dla tych cech

Materiałem roślinnym był było 50 elitarnych linii wsobnych, z których na podstawie dwuletniej oceny został wypracowany zestaw genotypów o znanej, zróżnicowanej odporności na fuzariozę kolb. Zostały one wyłączone do krzyżowań prostych jako formy rodzicielskie. Uzyskano mieszańce pokolenia F_1 , osobno dla grupy o ziarnie szklistym (flint) i zębokształtnym (dent).

Charakterystykę linii i mieszańców prowadzono w warunkach polowych zgodnie z metodyką UPOV (http://archive.maizegdb.org/UPOV_Maize_tg_2_7.pdf) uwzględniając: (1) wysokość roślin, (2) wczesność, (3) morfologię kwiatostanów żeńskich: długość rdzenia (cm), długość kanału od końca rdzenia kolby do końca liści okrywowych (cm), długość słupków nie pokrytych liśćmi okrywowymi (cm), zbitość liści okrywowych, (4) zawartość anocyjanów – wizualnie w słupkach, rdzeniu kolby i łodydze, (5) typ ziarna.

Zakażenia sztuczne prowadzono jednozarnikowymi kulturami *F. graminearum* należącymi do kolekcji PTPiRM, IHAR – PIB w Radzikowie. Zostały one wyosobnione z prób nasion kukurydzy pobranych z poletek doświadczalnych i scharakteryzowanych w trakcie wcześniejszych badań pod względem tempa wzrostu na pożywkach sztucznych i agresywności w warunkach polowych.



Izolaty po odszczepieniu na szalki Petriego z pożywką PDA inkubowano przez okres 3–4 tygodni w temp. 20–22°C. Następnie grzybnia została zmyta i rozcieńczona płynną pożywką SNA (3 g agaru/l wody), kontrolując ilość zarodników w powstałym roztworze. Inokulacja (zakażenia sztuczne) wykonano zawiesiną o stężeniu 5×10^5 zarodników/ml.

Zakażenia sztuczne przeprowadzono po mechanicznym uszkodzeniu ziarniaków 10–12 dni od daty kwitnienia kwiatostanów męskich (faza początkowej dojrzałości mlecznej BBCH 73), poprzez iniekcję 1 ml zawiesiny zarodników *F. graminearum* na wysokości 1/3 od podstawy kolby wykorzystując do tego celu strzykawkę czterokanałową. Kwiatostany żeńskie roślin kontrolnych nie były zakażane. Ocenę fenotypową stopnia odporności badanych obiektów przeprowadzono w fazie dojrzałości pełnej. Do oceny wykorzystano skalę 1–7 w której, stopnie odzwierciedlały procent powierzchni kolby z objawami choroby, odpowiednio: 1= brak objawów porażenia; 2= 1–3%, 3 = 4–10%; 4=11–25%; 5=26–50%; 6=51–75% i 7=76–100%.

Po ocenie fenotypowej kolby zostały zebrane dla każdego powtórzenia osobno, wysuszone, a następnie wymłócone. Próby ziarna zmielono blenderem laboratoryjnym, próby osadek rozdrobniono rozdrabniaczem, a następnie domielono młynkiem laboratoryjnym IKA A 11 basic na mąkę i poddano analizie na obecność deoksynivalenolu. Analizy prowadzono aparatem RIDA QUICK SCAN (analiza na bazie testu immunoenzymatycznego ELISA).

Również ocena stopnia porażenia łodyg prowadzona była przy infekcji naturalnej oraz po zakażeniu sztucznym łodyg. Łodygi były zakażane patyczkami na których rósł grzyb *F. graminearum* przez okres ok. 2 tygodni po ich odkażeniu w wysokiej temperaturze. Łodygi nakłuwano pomiędzy 2 a 3 międzywęzłem. Rośliny kontrolne zostały nakłute patyczkami czystymi. Ocena fenotypowa porażenia łodyg prowadzona była w fazie dojrzałości pełnej w skali 1–9.

Badanie efektywności selekcji

Materiałem roślinnym w badaniach były mieszańce pokolenia S_0 , formy o ziarnie szklistym (flint) i zębokształtnym (dent), dwu lub trójliniowe.

Poszukiwanie źródeł odporności prowadzono po zapyleniach wsobnych roślin, których kolby były następnie zakażane sztucznie zawiesiną zarodników *F. graminearum* a ocena prowadzona w skali 1–7. Rośliny były charakteryzowane z uwzględnieniem cech fenologicznych i morfologicznych, które

mogą być potencjalnymi markerami odporności na infekcję i rozwój grzyba. Rośliny o podwyższonej odporności włączono do dalszych badań jako linie pokolenia S_1 . Reselekcja prowadzona była poprzez zapylenia wsobne i selekcji pozytywnej do S_4 . Pokolenie to było oceniane w dwóch środowiskach – w jednym środowisku po zakażeniach sztucznych a drugim środowisku przy infekcji naturalnej.

Wyniki

Metodyka zakażeń sztucznych po mechanicznym uszkodzeniu ziarniaków była skuteczna, umożliwiała różnicowanie materiału roślinnego. Stwierdzono powtarzalność wyników uzyskanych przy infekcji naturalnej i po zakażeniach sztucznych (współzależności dodatnie, statystycznie istotne). Ocena dynamiki rozwoju choroby na przestrzeni czasu oraz opis morfologii kolby zestawu 50 elitarnych linii na poziomie wsobności F_0 , umożliwiła opracowanie zestawu linii różnicujących do dalszych badań nad odziedziczalnością odporności na fuzariozę kolb oraz cech, fenologicznych i morfologicznych, które mogą być jej potencjalnymi markerami. Wstępnie wykazano, że na podstawie odporności słupków kukurydzy do degradacji po inokulacji w warunkach laboratoryjnych można wnioskować o stopniu odporności badanego genotypu.

Zawartość DON korespondowała do ocen fenotypowych stopnia porażenia kolby a poziom skażenia osadek był znacznie wyższy niż ziarna. Po zakażeniach sztucznych współzależności pomiędzy ocenami fenotypowymi a zawartością DON były wysoko istotne, dodatnie (0,77***, $p=0,001$). Współzależność pomiędzy wczesnością a zawartością DON była dodatnia. Długość kanału od rdzenia do końca liści okrywowych statystycznie istotnie wpływała na stopień porażenia kolb. Oceny zawartości antocyjanu w osadkach i słupkach ujemnie korespondowały do ocen stopnia porażenia kolb grzybem *F. graminearum* i do poziomu skażenia ziarna DON. Zbitość liści okrywowych kolby wpływała na rozwój fuzariozy kolb.

Efekty heterozji dla FK, DON, ZP oraz cech morfologicznych i fenologicznych roślin wpływających na porażenia grzybami z rodzaju *Fusarium* spp. były różne. W grupie kombinacji krzyżówkowych w której dwa komponenty rodzicielskie były podatne lub bardzo podatne na fuzariozę kolb to efekt heterozji dla tej cechy był wysoki (dla ocen fenotypowych zakres $H=-56,1\%$ – $H=-38\%$ a dla DON $H= -86,2-91,8\%$). W wariancie gdy jedna

forma rodzicielska była podatna, druga o podwyższonej odporności: $H = 20 - 30\%$; w wariancie gdy oba komponenty należały do grupy średnio-odpornych: $H < 20\%$, średnio $H = -11\%$. Nie stwierdzono różnic, czy komponentem rodzicielskim macecznym była forma podatna/o podwyższonej odporności czy forma ojcowska.

Dla fuzariozy kolb i poziomu skażenia DON współczynnik odziedziczalności w wąskim sensie były wysokie h_{ns}^2 i warunkowały je pula genowa i typ ziarna (badano pule genowe KOB i SH, które są wyraźnie odległe od siebie). Cechy powiązane z fuzariozą kolb, dla których określono wysokie współczynniki odziedziczalności w wąskim sensie h_{ns}^2 to: zawartość antocyjanu w słupkach (i wspomagająco w rdzeniu), długości kanału kolby (od rdzenia do końca liści okrywowych w okresie kwitnienia kwiatostanów żeńskich), długości osadki kolby po zbiorze oraz długość słupków.

Wykazano, że selekcja cykliczna metodą rodowodową w warunkach polowych jest wprawdzie długotrwała, ale efektywna i zapewnia uzyskanie postępu biologicznego dla tych cech. Opisując morfologię kolb pokolenia S_0 stwierdzono istotne różnice pomiędzy populacjami dla długości słupków, kanału od końca rdzenia do końca liści okrywowych oraz długości kolbowej. Stwierdzono również istotne różnice pomiędzy badanymi pulami genowymi SH i KOB. Średnio, słupki obiektów puli genowej SH są krótsze w stosunku do obiektów puli genowej KOB. Krótsza jest również osadka kolby, natomiast rdzeń kolby dłuższy. Zakres zmienności dla długości kanału kolby jest większy w obrębie puli genowej KOB. W obrębie populacji S_0 oraz w kolejnych pokoleniach, typ ziarna typu istotnie wpływał na frekwencję roślin o podwyższonej odporności na fuzariozę kolb. Efektywność selekcji rośnie z pokolenia na pokolenie – średnio liczba roślin o podwyższonej odporności jest o 10% wyższa w stosunku do formy wyjściowej. Prowadząc trzyletni cykl selekcji cyklicznej przy infekcji sztucznej w obrębie pokolenia F_4 liczba roślin o podwyższonej odporności w grupie populacji o typie ziarna flint stanowiła 43,4% wszystkich ocenianych tego typu natomiast w grupie materiałów o typie ziarna dent – stanowiła 18,4%. Selekcja musi być prowadzony po zakażeniach sztucznych *Fusarium graminearum* i na przestrzeni wielu lat. Zawartość antocyjanu w słupkach i rdzeniu oraz długość kanału kolby od rdzenia do końca liści okrywowych mogą być potencjalnymi markerami odporności na fuzariozę kolb. Wysoki współczynnik odziedziczalności dla tych cech zapewnia powtarzalność wyników.

Wnioski

1. Na podstawie stopnia degradacji słupków po zakażeniu grzybem *F. graminearum* w warunkach laboratoryjnych można wnioskować o stopniu odporności badanego genotypu na fuzariozę kolb w warunkach polowych.
2. Do cech fenologicznych powiązanych z odpornością genotypu na fuzariozę kolb należy jego wczesność, dla której stwierdzono dodatnią współzależność z objawami fenotypowymi porażenia kolby grzybami z rodzaju *Fusarium* spp. jak i zdolnością do akumulacji toksyn w ziarnie.
3. Do cech morfologicznych powiązanych z odpornością na fuzariozę kolb zaliczyć należy: długość kanału od rdzenia do końca liści okrywowych, długość słupków oraz zbitość liści okrywowych.
4. Zawartość antocyjanów istotnie wpływa na stopień odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi.
5. Współczynniki odziedziczalności w wąskim sensie dla fuzariozy kolb i cech ją warunkujących są wysokie.
6. W selekcji cyklicznej jej efektywność rośnie z pokolenia na pokolenie – średnio liczba roślin o podwyższonej odporności jest o 10% wyższa w stosunku do formy wyjściowej.
7. Typ ziarna istotnie wpływa na efektywność selekcji. W grupie o ziarnie szklistym jest wyższa ona wyższa niż w grupie roślin o ziarnie zębokształtnym.

Osiągnięcia projektu

1. Opracowanie powtarzalnej metody zakażeń sztucznych kolb kukurydzy grzybami z rodzaju *Fusarium* spp. – warunkującej uzyskanie wyników oceny podatności na fuzariozę kolb korespondującej do odporności przy dużej presji czynnika chorobotwórczego w warunkach naturalnych.
2. Opracowane metody efektywnej selekcji dla stopnia odporności kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi,
3. Opracowanie zestawu linii różnicujących dla stopnia odporności na fuzariozę kolb, osobno dla grup genetycznych o ziarnie typu szklistym i zębokształtnym,
4. Określenie markerów fenotypowych powiązanych z stopniem odporności kukurydzy na fuzariozę kolb – określenie ich odziedziczalności.
5. Określenie interakcji genotypowo – środowiskowej dla stopnia odporności kukurydzy na fuzariozę kolb.

6. Potencjalne źródła odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi jako linie pokolenia S₄ zostały udostępnione do wykorzystania w dalszych programach hodowlanych.

Wykaz prac opublikowanych w roku sprawozdawczym

Publikacje

- Frasiński, S., Czembor, E., Lalak-Kańczugowska, J. 2020. Znaczenie fuzariozy kolb kukurydzy w Polsce i metody ograniczenia strat powodowanych przez tą chorobę. Biuletyn IHAR 290: 43-. DOI: 10.37317/biul-2020-0025 (20 pkt.)
- Czembor E., Frasiński S. 2020. Monitorowanie populacji grzyba *Ustilago maydis*, sprawcy głównej guzowatej kukurydzy na terenie Polski w latach 2016 – 2019. Biuletyn IHAR 293: 3 – 13. DOI: 10.37317/biul-2020-0024 (20 pkt.)
- Czembor E., Waśkiewicz A., Piechota U., Puchta M., Czembor J. H., Stępień Ł. Differences in ear rot resistance and *Fusarium verticillioides*-produced fumonisin contamination between Polish currently and historically used maize inbred lines. *Frontiers in Microbiology*. doi.org/10.3389/fmicb.2019.00449 (100 pkt.)
- Czembor E. i in. 2019. Poszukiwanie źródeł odporności na fuzariozę kolb. Biul. IHAR, 228: 223 – 225. (20 pkt.)
- Czembor E., Frasiński S., Stępień Ł. 2018. Reakcja genotypów kukurydzy na infekcję wybranymi izolatami grzybów z rodzaju *Fusarium* sekcji *Liseola*. 2018. Reakcja genotypów kukurydzy na infekcję wybranymi izolatami grzybów z rodzaju *Fusarium* sekcji *Liseola*. *Prog Plant Prot*; 58:81–86 (12 pkt.)
- Czembor E., Frasiński S. 2018. Polskie elitarne linie wsobne kukurydzy źródłem odporności na fuzariozę kolb (*Fusarium* spp.) i głównie guzowatą (*Ustilago maydis*). *Prog Plant Prot*; 58:22–27 (12 pkt.)

- Pasquali M, Beyer M, Logrieco A, Audenaert K, Balmas V, Basler R, Boutigny A, Chrprová J, Czembor E, Gagkaeva T, González-jaén M, Hofgaard I, Köycü N, Hoffmann L, Levic J, García P, Miedaner T, Migheli Q, Moretti A, Müller M, Munaut F, Parikka P, Pallez-barthel M, Pic J, Scauflaire J, Scherm B, Stankovic S, Thrane U, Uhlig S, Vanheule A, Yli-mattila T and Vogelgsang S. 2016. A European database of *Fusarium graminearum* and *F. culmorum* trichothecene genotypes. *Front. Microbiol.* 7:406. doi:10.3389/fmicb.2016.00406 (100 pkt)
- Czembor, E., Stępień, Ł., Waśkiewicz, A. 2015. Effect of environmental factors on *Fusarium* species and associated mycotoxins in maize grain grown in Poland. *PLOS ONE* <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0133644> (100 pkt)
- Czembor, E., Stępień, Ł., Waśkiewicz, A. 2014. *Fusarium temperatum* as a new species causing ear rot in Poland. *Plant Disease*, 98 (7): 1001.

Doniesienia konferencyjne

- Frasiński S., Czembor E. i in. 2019. Resistance to fusarium ear rot in maize: heritability and trait associations. 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding, Budapest 4–7.11.2019, Węgry
- Seweryn Frasiński, Elżbieta Czembor, Krzysztof Wojcik, Jozef Adamczyk. Genetic resources for maize breeding programmes to improve ear rot resistance in Poland. European Fusarium Seminar, 8-11.04.2018, Tulln, Austria
- Czembor, E. i in. 2016. Breeding maize for resistance to fusarium ear rot: impact of plant morphology for disease development and deoxynivalenol formation. EUCARPIA.
- Czembor E. i in. 2015. Impact of plant morphology for kinetics of red ear rot of maize caused by *Fusarium graminearum* development and deoxynivalenol formation. The 13th European Fusarium Seminar (EFS13), Bari.

Określenie zróżnicowania genetycznego linii wsobnych kukurydzy za pomocą markerów molekularnych

Evaluation of genetic diversity of inbred maize lines using molecular markers

Henryk Bujak¹✉, Kamila Nowosad¹, Jerzy Nawracała², Agnieszka Tomkowiak², Danuta Kurasiak-Popowska², Dorota Weigt²

¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

²Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

✉ e-mail: henryk.bujak@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: heterozja, kukurydza, linie wsobne, markery molekularne, zróżnicowanie genetyczne

Postęp hodowlany u wszystkich gatunków roślin uprawnych w dużej mierze uzależniony jest od posiadania materiałów wyjściowych o możliwie dużej różnorodności genetycznej. Właściwy dobór komponentów rodzicielskich tworzących wysoko plonujące mieszańce jest jednym z najbardziej kosztownych etapów w programach hodowlanych. Dobre rozpoznanie i podział materiałów wyjściowych na grupy heterotyczne skutkuje wzrostem efektywności i obniżeniem kosztów całego procesu hodowli mieszańców. Do najczęściej stosowanych kryteriów grupowania genotypów, obok pochodzenia geograficznego i krzyżowania w układach diallelicznych, należą analiza pochodzenia genetycznego (rodowodów) oraz analiza podobieństwa genetycznego przy użyciu metod genetyki molekularnej. Na podstawie analizy pokrewieństwa wyprowadzane linie wsobne kukurydzy przypisywane są do pięciu podstawowych pul genetycznych, takich jak Red Yellow Dent, Iodent, Lancaster Sure Crop, Stiff Stalk Synthetic. Podział ten umożliwia odpowiedni dobór materiałów wyjściowych do krzyżowań i gwarantuje uzyskanie wysokiego efektu heterozji. Wnioskowanie o zróżnicowaniu genetycznym materiałów na podstawie ich pochodzenia geograficznego bywa jednak zawodne, ponieważ istnieje duża wymiana międzynarodowa materiałów hodowlanych, natomiast krzyżowanie dialleliczne, mimo, iż dostarcza najwięcej informacji o posiadanym materiale jest bardzo kosztowne. W ostatnim 20-leciu w wielu ośrodkach naukowych prowadzone są intensywne prace zmierzające do podziału materiałów hodowlanych na grupy

heterotyczne w oparciu o analizę markerów molekularnych. Metody genetyki molekularnej w połączeniu z analizą pochodzenia genetycznego (rodowodu) pozwalają na wybór komponentów rodzicielskich do krzyżowań ograniczając liczbę testowanych linii w kosztownych doświadczeniach polowych do niezbędnego minimum, a tym samym obniżają koszty całego procesu hodowlanego.

Rozwój badań molekularnych opartych o metodę PCR pozwala na wykorzystanie jej jako narzędzia do charakterystyki kolekcji genotypów i oceny ich przydatności jako materiałów wyjściowych w hodowli heterozyjnej. Spośród dostępnych typów markerów DNA, markery SSR (Simple Sequence Repeat) są szeroko wykorzystywane w celu charakterystyki genotypów roślinnych. Ponieważ wykazują wysoki stopień polimorfizmu, ich użycie jest stosunkowo niedrogi i wysoce powtarzalne ze względu na budowę starterów i ich specyficzność gatunkową. Przydatność tego typu starterów została również potwierdzona do oceny zróżnicowania genetycznego linii wsobnych kukurydzy, a polimorfizm uzyskany dzięki zastosowaniu metody SSR-PCR pozwala na rozróżnienie linii pochodzących z różnych pul genetycznych. Poznanie genomu na poziomie zmian pojedynczych nukleotydów pozwala na jeszcze dokładniejsze analizy dystansu genetycznego. Jedną ze stosowanych technik jest genotypowanie metodą KASP (ang. Kompetitive Allele Specific PCR), które opiera się na wykorzystaniu zmodyfikowanego protokołu PCR oraz sond typu FRET (ang. Fluorescence Resonance Energy Transfer) z barwnikami



fluorescencyjnymi (FAM i HEX). Dane uzyskane na podstawie ustalenia polimorfizmu SNP dla innych materiałów pozwoliły na dokładne poznanie zależności pomiędzy analizowanymi genotypami kukurydzy.

Celem zadania było sprawdzenie systemu markerów molekularnych, które pozwolą na efektywne ustalanie dystansu genetycznego pomiędzy liniami kukurydzy. Sprawdzone w tym celu markery RAPD, SSR oraz SNP, które wykazują wysoki stopień polimorfizmu, są wysoce powtarzalne ze względu na budowę starterów, a ich użycie jest stosunkowo niedrogie. Polimorfizm uzyskany dzięki zastosowaniu tych systemów molekularnych pozwolił na rozróżnienie linii pochodzących z różnych pul genetycznych. Analiza efektów heterozji mieszańców w zależności od dystansu genetycznego dzielącego linie biorące udział w krzyżowaniach, pozwoliła ponadto na weryfikację przydatności markerów molekularnych do oceny zróżnicowania genetycznego linii w celu otrzymania maksymalnego efektu heterozji w procesie hodowli kukurydzy. Dokonano podziału linii wsobnych kukurydzy na grupy heterotyczne na podstawie zidentyfikowanych markerów molekularnych sprzężonych z loci determinującymi plon ziarna i jego podstawowe komponenty.

Materiałem badawczym były wyprowadzone w polskich spółkach hodowlanych linie wsobne kukurydzy. Badane linie charakteryzowały się zróżnicowanym pochodzeniem i zostały wyprowadzone z materiałów będących w dyspozycji hodowli i nie były ze sobą spokrewnione. Podstawę klasyfikacji tych linii stanowiła budowa ziarniaka i można je było wstępnie podzielić na formy o ziarnie zębokształtnym (dent) oraz szklistym (flint). W trakcie trwania zadania przeanalizowano łącznie 476 linii wsobnych kukurydzy wyprowadzonych w polskich hodowlach (Hodowla Roślin Smolice, Małopolska Hodowla Roślin Oddział Koberzyce). Analizowane linie wykazywały duże zróżnicowanie pod względem cech morfologicznych, jak i użytkowych, co potwierdzono stosując jedno- i wielocelowe narzędzia statystyczne.

W pierwszym roku badań wykonano analizy molekularne genotypów kukurydzy zróżnicowanych przede wszystkim pod względem cech struktury plonu. Do analizy zróżnicowania genetycznego wykorzystane zostały początkowo markery molekularne typu RAPD i SSR. Markery SSR wybrano z dostępnych baz danych, a przy ich wyborze kierowano się ich powiązaniem z plonem oraz cechami struktury plonu, a następnie dokonywano oceny ich specyficzności i wiarygodności na materiałach

hodowlanych. Podobna procedura dotyczyła markerów RAPD. W dalszym etapie realizacji zadania system markerowy został uzupełniony o badanie polimorfizmu pojedynczych loci (SNP), a do genotypowania linii kukurydzy zastosowano metodę KASP (ang. Kompetitive Allele Specific PCR).

W sumie do określenia zróżnicowania genetycznego linii kukurydzy zastosowano trzy różne systemy markerowe (RAPD, SSR, SNP), które pozwoliły na efektywne grupowanie linii. Wyniki analiz molekularnych wykazały, że linie kukurydzy z polskich hodowli charakteryzowały się podobnym tłem genetycznym, o czym świadczą ich pozycje w układzie składowych głównych oraz umiejscowienie na dendrogramach podobieństwa.

Następnie na podstawie obliczonych dystansów genetycznych wybrano komponenty rodzicielskie do krzyżowań w celu uzyskania mieszańców eksperymentalnych, które pozwoliły na określenie związku pomiędzy efektem heterozji mieszańców F_1 a dystansem linii rodzicielskich. Uzyskane mieszańce testowe kukurydzy wykazały wysoki istotny efekt heterozji względem form rodzicielskich dla plonu i suchej masy ziarna. Nie wykazano natomiast powiązania obliczonych, z wykorzystaniem różnych systemów markerowych, wartości odległości genetycznych pomiędzy formami rodzicielskimi z efektami heterozji mieszańców. Można zatem stwierdzić, że zastosowane systemy markerowe pozwoliły na włączanie linii do grup homogenicznych, natomiast obliczone wyniki odległości genetycznych pomiędzy formami rodzicielskimi nie miały bezpośredniego przełożenia na wielkość efektu heterozji mieszańców dla plonu ziarna i zawartości suchej masy. Podobnie nie wykazano liniowego związku pomiędzy wielocelowym zróżnicowaniem linii a wielkością efektu heterozji mieszańców.

Zastosowane systemy markerowe pozwoliły natomiast na bardzo efektywne genotypowanie linii kukurydzy i na ich podział na grupy heterogenne, co jest ważnym elementem współczesnej hodowli odmian mieszańcowych kukurydzy. Spośród zastosowanych systemów markerowych najbardziej przydatne do określania zróżnicowania genetycznego linii kukurydzy wydają się być markery mikrosatelitarne SSR ze względu na dobre grupowanie genotypów oraz niskie koszty analiz i łatwość ich wykonania. Ten system markerowy z wybranymi i zweryfikowanymi w trakcie realizacji zadania starterami do reakcji PCR można polecić do bezpośredniego stosowania w hodowli kukurydzy.

Osiągnięciem projektu jest wybór najbardziej

przydatnego do określania zróżnicowania genetycznego systemu markerów molekularnych jakim są markery mikrosatelitarne SSR, które pozwalają na dobre grupowanie genotypów, a ponadto analizy z wykorzystaniem markerów SSR są tanie, łatwe do wykonania, a interpretacja wyników dość prosta.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Nowosad K., Bujak H. 2015. Wykorzystanie markerów molekularnych do określenia dystansu genetycznego linii wsobnych kukurydzy. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” Zakopane 2–6.02.2015 r.

Nowosad K., Bujak H., 2016. Wykorzystanie markerów molekularnych do określenia dystansu genetycznego linii wsobnych kukurydzy. V Polski Kongres Genetyki Łódź 19–22.09.2016 r.

Nowosad K., Bujak H. 2017. Wykorzystanie markerów KASP do określenia zróżnicowania genetycznego linii wsobnych kukurydzy. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa

„Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” Zakopane 30.01–03.02.2017 r.

Nowosad K., Bujak H., Adamczyk J., Rejek D., Wójcik K. 2017. Zmienność linii wsobnych kukurydzy na podstawie analizy wielocechowej. Materiały konferencyjne XI Sympozjum „Genetyka Ilościowa Roślin Uprawnych” Świeradów Zdrój 6–9.06.2017 r.

Nowosad K., Bujak H., Adamczyk J., Wójcik K. 2017. Wykorzystanie markerów SSR do określenia dystansu genetycznego linii wsobnych kukurydzy. Konferencja „Zasoby Genowe Roślin Użytkowych na Rzecz Hodowli” Kazimierz Dolny 6–8.09.2017 r.

Nowosad K., Bujak H. 2018. Wykorzystanie markerów KASP do określenia zróżnicowania genetycznego linii wsobnych kukurydzy. Konferencja „Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy” – Lublin 25–27.06.2018 r.

Nowosad K., Bujak H. 2018. Genotypowanie kukurydzy z wykorzystaniem markerów KASP. Konferencja „Charakterystyka zasobów genowych dla hodowli roślin” Karpacz 18–21.09.2018 r.

Fusarium temperatum – znaczenie i szkodliwość w uprawie kukurydzy, poszukiwanie i charakterystyka źródeł odporności

Fusarium temperatum – importance and harmfulness in maize crops, search and characterization of resistance sources

Marcin Wit^{1*}, Piotr Ochodzki², Roman Warzecha², Monika Żurek², Ewa Mirzwa-Mróż¹, Emilia Jabłońska¹, Józef Adamczyk³, Anna Rogacka³, Janusz Rogacki³, Krzysztof Wójcik⁴, Wojciech Wakuliński¹

¹Instytut Nauk Ogrodniczych, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02–776 Warszawa

²Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05–870 Błonie

³Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Smolice 146, 63–740 Kobylin

⁴Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Stacja Hodowli Roślin Kobierzyce, ul. Sportowa 21, 55–040 Kobierzyce

✉ e-mail: marcin_wit@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe: amylose content, *Fusarium temperatum*, mycotoxins, *Zea mays*

Cele projektu

(wszystkie cele osiągnięte)

1. Ocena podatności linii hodowlanych *Zea mays* na porażenie przez *Fusarium temperatum*.
2. Analiza profilu metabolitów wtórnych występujących w materiale roślinnym porażonym przez *Fusarium temperatum*.
3. Analiza populacji *Fusarium temperatum* w zakresie cech istotnych w patogenezie i epidemiologii fuzariozy kolb kukurydzy.

Cele szczegółowe tematów obejmowały:

A. Ocenę stopnia porażenia kolb kukurydzy przez *Fusarium temperatum* celem rozpoznania i określenia znaczenia tego grzyba jako sprawcy fuzariozy kolb kukurydzy. **B.** Analizę ilościową i jakościową metabolitów wtórnych wytwarzanych *in-vivo* przez *F. temperatum*; ponadto ziarniaki zostały poddane analizie zawartości amylopektyn/amylozy. **C.** Ocenę patogeniczności, spektrum biosyntetyzowanych metabolitów oraz zmienności populacji *F. temperatum*. **D.** Analizę molekularną, która opierała się na sekwencjonowaniu otrzymanych produktów amplifikacji fragmentów *ITS* (w 2015r.) oraz fragmentów genów czynnika elongacji alfa (*EF-1α*) i *β-tubuliny*, uznawanych za podstawowe geny umożliwiające jednoznaczny identyfikację gatunku grzyba (markery barkodingu) (w latach 2015–2019).

E. Prosta analizę molekularną populacji patogena w zakresie frekwencji dopełniających typów kojarzeniowych *F. temperatum* (*MAT1-1* i *MAT1-2*). Ich wyznaczenie dostarczyło wiedzy na temat epidemiologii i zmienności tego grzyba (latach 2017–2019).

Material i Metody

Izolaty *F. temperatum* pochodziły z ziarniaków uzyskanych z kolb wykazujących objawy fuzariozy rozwijającej się w następstwie infekcji naturalnych. Izolację i identyfikację prowadzono z zastosowaniem standardowych metod mających zastosowanie w diagnostyce mykologicznej *Fusarium* (Kwaśna i in. 1991). Wiarygodność diagnostyki była potwierdzana molekularnie z zastosowaniem metody barkodingu w oparciu o markery *EF-1α* i *β-tubuliny*. Zgromadzona populacja izolatów była następnie badana pod kątem pokrewieństwa filogenetycznego, frekwencji typów kojarzeniowych, biosyntetyzowanych metabolitów oraz patogeniczności.

Analizę pokrewieństwa filogenetycznego izolatów przeprowadzono z zastosowaniem metody największej wiarygodności (Maximum Likelihood, ML) w oparciu o sekwencje *EF-1α* i *β-tubuliny*, jako sekwencje ukorzeniające zastosowano sekwencje izolatu ITEM17582 *F. verticillioides* (*EF-1α*: LS423164.1; *β-tubulina*:



LS423272.1).

Identyfikację typów kojarzeniowych *F.temperatum* przeprowadzono z zastosowaniem markerów SCAR *MATI-1* i *MATI-2*.

Analizę spektrum metabolitów biosyntetyzowanych przez *F.temperatum* przeprowadzono w kierunku zdolności do biosyntezy fumonizyn (B_1 i B_2) pochodnych trichotecenowych (DON, 3AcDON, 15AcDON, NIV), fuzarenonu (w 2015 r.) oraz bowerycyny i eniatyn oraz ergosterolu stosując metodę HPLC.

Ocenę patogeniczności izolatów *F.temperatum* przeprowadzano metodą „toothpicks”, będącą adaptacją metody opisaną przez Scauflaire i in. (2012).

Wykorzystywany w badaniach polowych materiał roślinny stanowiły rekomendowane przez hodowców reprezentujących Hodowlę Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz Małopolską Hodowlę Roślin Sp. z o.o. Stacja Hodowli Roślin Kobierzycze linie podgatunków kukurydzy: kukurydzy pastewnej – koński ząb (*Zea mays* var. *indentata*) oraz kukurydzy zwykłej (*Zea mays* var. *indurata*). W badaniach, każdego roku uwzględniano 120 genotypów (60 form kukurydzy typu flint oraz 60 form kukurydzy typu dent).

Genotypy oceniano pod kątem podatności na porażenie przez *F.temperatum*, akumulacji mykotoksyn oraz zawartości amylozy. Każda z powyższych cech była oceniana w dwóch lokalizacjach.

Opis wyników

Badania związane z realizacją tematu przeprowadzono w okresie 2015 – 2019. Pozyskane na potrzeby badań izolaty charakteryzowały się znaczącą zmiennością molekularną i fenotypową w zakresie patogeniczności oraz zdolności do biosyntezy metabolitów wtórnych. Podobieństwo analizowanych sekwencji nukleotydowych genu kodującego *EF-1a*, pomiędzy 330 badanymi izolatami *F.temperatum* mieściło się w zakresie 95,9-100%, natomiast sekwencji nukleotydowych genu kodującego β -*tubuliny*, pomiędzy 330 badanymi izolatami *F.temperatum* mieściło się w zakresie 87,6-100%. Frekwencja typów kojarzeniowych *MATI-1* do *MATI-2* w populacji izolatów uzyskanych w latach 2017-2019 wyniosła 103 do 87 i odpowiadała stosunkowi 1:1 ($\chi^2 = 1,184$; $p = 0,27654318$). Utrzymywanie się obydwu populacji typów kojarzeniowych *MATI-1* i *MATI-2* wskazuje na możliwość generowania perytecji w warunkach polowych, aczkolwiek proces ten o ile występuje ma charakter kryptyczny. Dominującą grupą mykotoksyn

biosyntetyzowanych przez izolaty *F.temperatum* były związki heksadepsyptydowe – bowerycyna (BEA) oraz w mniejszym stopniu eniatyna (ENN). Na ziarniakach ryżu i kukurydzy żaden z 25 badanych izolatów (2015r.) nie biosyntetyzował pochodnych trichotecenów oraz fuzarenonu. W trakcie 5 letnich badań średni poziom bowerycyny (BEA) na ryżu wynosił od 406,00 ppm do 1056,1 ppm, natomiast na kukurydzy od 33,79 ppm do 140,98 ppm. Rozpoznano występowanie izolatów biosyntetyzujących BEA, ENN oraz obydwa metabolity. Obserwowana zmienność składu cyklicznych heksadepsyptydów może sugerować na występowanie wśród badanej populacji chemotypów.

Porażenie kolb kukurydzy w warunkach polowych w oparciu o 6. stopniową skalę było na poziomie średnim. Wartości maksymalne analizowanej cechy wynosiły odpowiednio: 4,35 (w 2015r.), 3,07 (w 2016r.), 4,22 (w 2017r.), 2,88 (w 2018r.) i 2,95 (w 2019r.). Stwierdzono również istotny wpływ środowiska na stopień porażenia kolb przez *F.temperatum*. Średnia wartość tego parametru dla badanych genotypów kukurydzy za okres 5. lat badań była wyższa w Smolicach (1,84) i Kobierzycach (1,97), niż w Radzikowie (1,63).

W badanej populacji genotypów nie stwierdzono występowania form całkowicie odpornych, natomiast podatność na porażenie form flint była istotnie mniejsza niż dent. Średni stopień porażenia kolb w latach 2015–2019 wynosił 1,88 i 1,70 odpowiednio dla form dent i flint.

Jednocześnie udział amylozy w strukturze skrobi ziarniaków form flint kukurydzy był istotnie wyższy niż dent. Średnia zawartość amylozy w ziarniakach form dent i flint za okres 5. lat wynosiła odpowiednio 29,78% i 30,68%. Podobną zależność odnotowano we wszystkich lokalizacjach doświadczeń.

Dominującą grupą mykotoksyn biosyntetyzowanych przez izolaty *F.temperatum* i stwierdzanych w porażonych ziarniakach kukurydzy były związki heksadepsyptydowe, głównie bowerycyna (BEA). Poziom tego metabolitu wahał się od wartości śladowych na granicy limitu detekcji związku do maksymalnie 103,59 ppm. Jak stwierdzono istotny wpływ na poziom tego związku w porażonych ziarniakach miały genotyp gospodarza, odmiana botaniczna i warunki środowiska, W materiałach hodowli Smolice najwyższy średni poziom BEA w próbach kukurydzy typu dent wynosił 11,70 ppm (doświadczenie w Smolicach w 2015r.) i 6,96 ppm (doświadczenie w Radzikowie w 2017r.), zaś w próbach kukurydzy typu flint najwyższa średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 15,07 ppm

i 9,79 ppm, odpowiednio dla dwóch wyżej wymienionych lokalizacji, w doświadczeniach zrealizowanych w 2015r.

Przeprowadzona analiza regresji opisująca relację pomiędzy porażeniem kolb kukurydzy (wyrażanym w umownie przyjętej 6. stopniowej skali) oraz udziałem amylozy wskazuje na występowanie istotnej funkcyjnej zależności wiążącej wymienione parametry. Jak pokazuje analiza regresji wraz ze wzrostem zawartości amylozy obserwowany był spadek stopnia porażenia kolb kukurydzy (**POR = -0,032 AMYL + 2,783**), jak też spadek stężenia ergosterolu (**ERG = -0,354 AMYL + 26,40**) oraz spadek poziomu bowerycyny (**BEA = -0,210 AMYL + 12,26**). Wzrastający stopień porażenia kolb oraz wzrastająca zawartość ergosterolu były skorelowane z poziomem bowerycyny w ziarniakach kukurydzy (**BEA = 4,507 POR - 2,272**, **BEA = 0,245 ERG + 1,950**). Równania regresji opisujące zależność pomiędzy zawartością ergosterolu, a zawartością bowerycyny w ziarniakach materiałów hodowlanych pochodzących ze Smolic i z Kobierzyc, wskazują na wprost proporcjonalną zależność pomiędzy wyżej wymienionymi metabolitami.

Wnioski

1. *Fusarium temperatum* stanowi wyodrębnioną populację w obrębie gatunku *Fusarium fujikuroi* species complex (FFSC).
2. Sekwencje *EF-1a* oraz *β tubulina* umożliwiają jednoznaczną i szybką diagnostykę *F.temperatum*.
3. Z uwagi na znaczenie *F.temperatum* za celowe należałoby uznać podjęcie prac zmierzających do opracowania markerów SCAR dla wspomnianego gatunku.
4. Gatunek *F.temperatum* jest istotnym producentem bowerycyny.
5. Uzyskane wyniki mogą wskazywać na występowanie w populacji *F.temperatum* gatunków chemotypów, produkujących tylko bowerycynę oraz bowerycynę i eniatynę.
6. Struktura populacji *F.temperatum* w zakresie występowania idiomorf *MAT1-1* i *MAT1-2* odbiega od stosunku 1:1, tym niemniej obydwa typy kojarzeniowe występują w populacji tego grzyba często, zatem możliwa jest indukcja teleomorfy stadium doskonałego.
7. Formy flint i dent różnią się pod względem udziału amylozy w strukturze skrobi.
8. Istotny wpływ na zawartość amylozy w skrobi mają warunki środowiska.
9. Badane materiały hodowlane różnią się podatnością na porażenie przez *F.temperatum*.
10. Formy dent są bardziej podatne na porażenie przez *F.temperatum* niż flint.
11. Istnieje duże ryzyko zanieczyszczenia bowerycyną kolb kukurydzy, porażonych przez *F.temperatum*.
12. Struktura endospermu ma istotny wpływ na porażenie ziarniaków przez *F.temperatum* oraz zawartość bowerycyny.

Literatura

- Kwaśna, H., Chelkowski, J., Zajkowski, P. (1991). Grzyby (Mycota), Grzyby niedoskonałe (Deuteromycetes), Strzępczakowe (Hyphomycetales), Gruźelkowate (Tuberculariaceae), Sierpik (*Fusarium*). PAN, Inst. Botaniki, Warszawa – Kraków. T. XXII: 136 ss.
- Scauflaire, J., Gourgue, M., Callebaut, A., Munaut, F. (2012). *Fusarium temperatum*, a mycotoxin-producing pathogen of maize. Eur J Plant Pathol 133: 911–922.

Osiągnięcia projektu

1. Określono zróżnicowanie badanej populacji genotypów kukurydzy, na porażenie kolb przez *F.temperatum* oraz zdolność do akumulacji bowerycyny, które to wyniki przekazano na potrzeby prac hodowlanych (Hodowla Roślin Smolice Sp. z o. o. Grupa IHAR oraz Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Stacja Hodowli Roślin Kobierzyc).
2. Stwierdzono wpływ struktury endospermu jako istotnego czynnika wpływającego na porażenie ziarniaków przez *F.temperatum* oraz zawartość bowerycyny.
3. Badania molekularne populacji *F.temperatum* są kontynuowane w ramach konkursu MINIATURA 3 na pojedyncze działania naukowe ogłoszonego przez Narodowe Centrum Nauki, w dniu 17 czerwca 2019r. Tytuł działania naukowego: „Analiza wpływu długości fali świetlnej na ekspresję genów zaangażowanych w biosyntezę bikaweryny u wybranych gatunków grzybów z kompleksu *Fusarium fujikuroi*”, Kierownik działania naukowego: dr inż. Emilia Jabłońska (Nr 2019/03/X/NZ9/01640).

Wykaz publikacji wyników badań wykonanych w ramach zadania

- Wit, M., Ochodzki, P., Warzecha, R., Zawadzka, A., Żurek, M., Mirzwa-Mróż, E., Jabłońska, E., Bylicka, D., Adameczyk, J., Rogacka, A., Rogacki, J., Wójcik, K., Wakuliński, W. (2019). *Fusarium temperatum* – znaczenie i szkodliwość w uprawie kukurydzy, poszukiwanie i charakterystyka źródeł odporności. Biul. IHAR, 286: 227–230.

- Wit, M., Ochodzki, P., Warzecha, R., Żurek, M., Mirzwa-Mróż, E., Jabłońska, E., Adamczyk, J., Rogacka, A., Rogacki, J., Wójcik, K., Wakuliński, W. (2020). *Fusarium temperatum* – znaczenie i szkodliwość w uprawie kukurydzy, poszukiwanie i charakterystyka źródeł odporności. Biul. IHAR, 291 (Suplement 1): 107–109.
- Jabłońska, E., Piątek, K., Wit, M., Mirzwa-Mróż, E., Wakuliński, W. (2020). Molecular diversity of the *Fusarium fujikuroi* species complex from maize. Eur J Plant Pathol. 158: 859–877.
- Wit, M., Jabłońska, E., Mirzwa-Mróż, E., Ochodzki, P., Warzecha, R., Lewandowska, A., Wakuliński, W. (2020). Variability of carotenoid biosynthesis in meiotic offspring of *Fusarium temperatum* strains. International Journal of Sciences: Basic and Applied Research (IJSBAR). 50 (1): 156–166.
- Wit, M., Leng, Y., Du, Y., Cegielko, M., Jabłońska, E., Wakuliński, W., Zhong, S. (2021). Genome sequence resources for the maize pathogen *Fusarium temperatum* isolated in Poland. Molecular Plant-Microbe Interactions. 34 (2): 214–217.
- Wyniki badań przedstawiono na konferencjach krajowych i zagranicznych**
- Wit, M., Jabłońska, E., Ochodzki, P., Warzecha, R., Mirzwa-Mróż, E., Wakuliński, W. (2016). *Fusarium temperatum* jako nadal nowy sprawca fuzariozy kolb kukurydzy w Polsce. V Konferencja „Nowe patogeny i choroby roślin”. Instytut Ogrodnictwa. Skierniewice, 6 kwietnia 2016. Streszczenia: 55.
- Wit, M., Jabłońska, E., Ochodzki, P., Warzecha, R., Mirzwa-Mróż, E., Wakuliński, W. (2016). *Fusarium temperatum* – main factor of ear rot of maize in Poland. VII International Scientific Agriculture Symposium "Agrosym 2016". Jahorina, Bosnia and Herzegovina. 6–9 October 2016. Abstracts: 629.
- Ochodzki, P., Warzecha, R., Wit, M., Grzeszczak, I., Żurek, M., Jabłońska, E., Mirzwa-Mróż, E., Adamczyk, J., Wolf, Z., Wakuliński, W. (2017). Ocena podatności linii hodowlanych *Zea mays* na porażenie przez *Fusarium temperatum*. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”. Zakopane, 30 stycznia – 03 lutego 2017. Streszczenia: 184.
- Wit, M., Ochodzki, P., Warzecha, R., Grzeszczak, I., Żurek, M., Jabłońska, E., Mirzwa-Mróż, E., Adamczyk, J., Wolf, Z., Wakuliński, W. (2017). Occurrence of beauvericin and enniatins in maize kernels inoculated with *Fusarium temperatum*. 39th Mycotoxin Workshop. Bydgoszcz, Poland. 19–21 June 2017. Abstracts: 89.
- Wakuliński, W., Wit, M., Jabłońska, E., Mirzwa-Mróż, E., Ochodzki, P., Warzecha, R. (2017). Znaczenie *Fusarium* spp. w uprawie kukurydzy. Sesja Naukowa pt. „Mykologia dla Fitopatologii, Aktualne problemy mykoz w Polsce”. Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, Warszawa, 21 czerwca 2017. Streszczenia: 66–67.
- Wit, M., Ochodzki, P., Warzecha, R., Grzeszczak, I., Żurek, M., Jabłońska, E., Mirzwa-Mróż, E., Adamczyk, J., Wolf, Z., Wakuliński, W. (2018). The susceptibility of Polish breeding flint and dent *Zea mays* lines to *Fusarium temperatum*. The 9th CASEE Conference “Research based education at life science universities in the Danube region towards asustainable future”, University of Agronomic Sciences and Veterinary Medicine, București, Romania. 6–9 June 2018. Abstracts: 28.
- Ochodzki, P., Wit, M., Warzecha, R., Grzeszczak, I., Żurek, M., Jabłońska, E., Mirzwa-Mróż, E., Adamczyk, J., Wolf, Z., Wakuliński, W. (2018). Beauvericin and enniatins formation in maize kernels inoculated with new pathogen - *Fusarium temperatum*. 40th Mycotoxin Workshop. Munich, Germany. 11-13 June 2018. Abstracts: 164.
- Wit, M., Ochodzki, P., Warzecha, R., Grzeszczak, I., Żurek, M., Jabłońska, E., Mirzwa-Mróż, E., Adamczyk, J., Wolf, Z., Wakuliński, W. (2018). Ocena podatności genotypów *Zea mays* var. *saccharata* na porażenie przez *Fusarium temperatum*. 58. Sesja Naukowa Instytutu Ochrony Roślin – PIB, Poznań, 6 – 8 lutego 2018. Streszczenia: 116.
- Wit, M., Ochodzki, P., Warzecha, R., Olchowik, J., Żurek, M., Jabłońska, E., Mirzwa-Mróż, E., Adamczyk, J., Rogacki, J., Wójcik, K., Wakuliński, W. (2019). *Fusarium temperatum* – the important producer of beauvericin and enniatins. XVIII Congress of European Mycologists, 16-21 Sept. 2019, Warsaw and Białołęka, Poland. Abstracts: 102.
- Wit, M., Ochodzki, P., Warzecha, R., Żurek, M., Jabłońska, E., Mirzwa-Mróż, E., Adamczyk, J., Rogacki, A., Wójcik, K., Wakuliński, W. (2020). Podatność materiałów hodowlanych kukurydzy na porażenie przez *Fusarium temperatum*. 60. Sesja Naukowa Instytutu Ochrony Roślin – PIB, Poznań, 11 – 13 lutego 2020. Streszczenia: 98.

Badania ekspresji i genetyczna charakterystyka odporności na bakterie *Dickeya solani* w wyróżnionych źródłach odporności w ziemniaku na poziomie diploidalnym

Research on the expression and genetic characterization of the resistance to bacteria *Dickeya solani* in selected for resistance diploid potato

Renata Lebecka¹✉, Jadwiga Śliwka¹, Anna Grupa-Urbańska¹, Zofia Murawska¹, Katarzyna Szajko¹, Janusz Dębski², Michał Kistowski², Waldemar Marczewski¹, Ewa Zimnoch-Guzowska¹

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

²Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk

✉ e-mail: r.lebecka@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: białka ziemniaka, *Dickeya solani*, loci cech ilościowych, mokra zgnilizna bulw ziemniaka, odporność

Cel podjętego tematu i prowadzonych badań w latach 2014-2019

Celem zadania było:

- scharakteryzowanie reakcji odpornościowej bulw ziemniaka na bakterie *D. solani* w zależności od temperatury,
- zbadanie zdolności do systemicznej kolonizacji wysokoodpornej rośliny ziemniaka przez bakterie *D. solani* oraz możliwości przenoszenia tej infekcji na bulwy potomne,
- zbadanie różnic w ekspresji białek we wczesnej fazie objawowej w bulwach odmian ziemniaka o różnym poziomie odporności na bakterie *D. solani*,
- zidentyfikowanie genów/loci cech ilościowych odporności na bakterie *D. solani* w populacji mapującej ziemniaka diploidalnego.

Mokra zgnilizna bulw i czarna nóżka ziemniaka są chorobami powodowanymi przez szereg bakterii pektynolitycznych należących do dwóch rodzajów, *Pectobacterium* i *Dickeya*. Obserwuje się zmiany w strukturze populacji bakterii, w Europie Zachodniej nowy gatunek *D. solani* rozprzestrzenił się po roku 2000, by obecnie ustąpić pierwszeństwa *P. carotovorum* subsp. *brasiliense*. Bakterie gatunku *D. solani* charakteryzują się wyższą agresywnością i preferują wyższe temperatury wzrostu niż bakterie *P. atrosepticum*. Do badań wybrano wysokoagresywny izolat *D. solani* - IFB0099 – syn. IPO 2276.

W ramach projektu oceniono optymalną temperaturę do wzrostu *in vitro* tego izolatu, która wynosi 33-35°C. Badano wpływ temperatury i czasu inkubacji na porażenie bulw czterech odmian ziemniaka. Miarą odporności były dwa oceniane parametry: proporcja bulw porażonych i masa zgniłej tkanki. Proporcja bulw porażonych rosła wraz z temperaturą, ale zależała również od odmiany. W dwóch niższych temperaturach (20 i 23°C) było istotnie więcej bulw porażonych u podatnej odmiany Irys niż u odmiany Sonda. W dwóch niższych temperaturach różnice w masie zgniłej tkanki nie były istotne pomiędzy odmianami, natomiast w dwóch wyższych (26 i 30°C) podatna odmiana Irys charakteryzowała się istotnie silniejszym gniciem. Do oceny odporności bulw na bakterie pektynolityczne użyto dwóch parametrów oceny, których ekspresja różniła się w zależności od temperatury. Na podstawie wyników badań wybrano warunki testowania odporności bulw ziemniaka na bakterie *D. solani*: trzy dni w temperaturze 26°C (Lebecka i in. 2018).

Ze względu na występowanie interakcji izolatu/gatunku bakterii z genotypem/odmianą ziemniaka w testach oceny odporności bulw, różnic w czynnikach wirulencji, enzymach pektynolitycznych, pomiędzy gatunkami bakterii oraz różnic w preferencjach temperaturowych tych bakterii, przeprowadzono ocenę odporności bulw 25 diploidalnych mieszańców *Solanum*



przy użyciu wysokoagresywnego izolatu *D. solani* - IFB0099. Klony badane były uprzednio wyselekcjonowane w testach porażenia bulw jako wysoko odporne na *P. atrosepticum*. Stwierdzono wysoką odporność bulw na *D. solani* testowanych mieszańców. Ze względu na niezależne w dużej mierze dziedziczenie odporności bulw i roślin ziemniaka na bakterie pektynolityczne oceniono po raz pierwszy odporność 25 diploidalnych klonów na porażenie łądog ziemniaka. Piętnaście z 25 klonów charakteryzowało się istotnie wyższą odpornością niż wzorzec wysokiej odporności – odmiana Głada. Oceniono płodność pyłku testowanych klonów ziemniaka i występowanie pyłku o niezredukowanej liczbie chromosomów. Dziewięć klonów łączących odporność bulw i roślin na *D. solani* posiada cechę gamet $2n$, co daje możliwość bezpośredniego wykorzystania ocenianych w tym projekcie diploidalnych mieszańców w hodowli odpornościowej, w celu podniesienia odporności odmian ziemniaka na bakterie pektynolityczne, należące do obu rodzajów, *Pectobacterium* i *Dickeya*.

W badaniach kolonizacji roślin ziemniaka przez bakterie *D. solani* zastosowano metodę zakażenia sadzeniaków ziemniaka przez zanurzenie sadzeniaków w zawiesinie bakterii w podciśnieniu. Sadzeniaki wysokoodpornych diploidalnych mieszańców międzygatunkowych w mniejszym stopniu uległy całkowitemu gniciu od bulw podatnej odmiany Irys. W roślinach, które wyrosły z porażonych sadzeniaków, wykryto bakterie w pojedynczych przypadkach. Występujące objawy zasychania końców liści mogą wskazywać na reakcję obronną rośliny w postaci nekrotyzacji tkanki roślinnej. W większości przypadków drugie pokolenie bulw klonu DG 06-28 otrzymane po zakażeniu sadzeniaków metodą moczenia w zawiesinie nie było porażone latentnie, tylko 5 bulw na 260 testowanych (zebranych z 41 roślin) uległo gniciu po dwóch tygodniach inkubacji w sprzyjających gniciu warunkach, wilgotnych i o obniżonej zawartości tlenu. Wstępne badania wskazują, że badany diploidalny klon DG 06-28 charakteryzuje się wysoką odpornością bulw i łądog na bakterie *D. solani* a ponadto bakterie w roślinach otrzymanych z porażonych sadzeniaków bardzo sporadycznie przenoszą się do bulw potomnych, co jest bardzo ważną informacją dla hodowli odpornościowej.

Określono długość fazy bezobjawowej w stosowanych warunkach testu (wysoka wilgotność, temperatura 26°C) w celu wybrania czasu pobierania prób tkanki bulw ziemniaka do badań proteomicznych. Do badania ekspresji białek we wczesnej objawowej fazie infekcji wybrano 8 h po zakażeniu

bulw przez bakterie.

Opracowano i opublikowano procedurę izolacji białka z bulwy ziemniaka do oceny metodą tandemową spektrometrii mas i chromatografii cieczowej (LC-MS-MS/MS), w wyniku której oznaczano w próbce średnio 1225 peptydów (Murawska i in. 2017).

Zidentyfikowano osiem białek różnicowych pomiędzy dwiema grupami odmian, odpornych i podatnych na porażenie bulw przez bakterie *D. solani*. Dwa białka, przypuszczalnie nieaktywne patatyna-03-Kuras i inhibitor proteiny PTI, występowały w większej ilości u obu odmian odpornych w porównaniu do odmian podatnych. Dwa białka, inhibitor metalokarboksypeptydazy i inhibitor białka podobnego do metalokarboksypeptydazy wykazywały istotne różnice pomiędzy odpornym i podatnym diploidalnym mieszańcem międzygatunkowym *Solanum*, zwłaszcza po inokulacji przez bakterie *D. solani* (274.4- i 368.6-krotnie, odpowiednio), w porównaniu do pozorowanej inokulacji (165.5- i 130.7-krotnie, odpowiednio). Analiza PCA wykazała zróżnicowanie pomiędzy odmianami odpornymi i podatnymi oraz to, że podczas inokulowania bulw w zranienia duży wpływ na powstawanie białek ma efekt zranienia. Wykazano różnice w białkach indukowanych we wczesnej objawowej fazie infekcji pomiędzy odpornymi i podatnymi odmianami i klonami ziemniaka. Porównanie białek w roślinach inokulowanych i kontroli daje informację o odpowiedzi roślin na zakażenie/zranienie, nie na temat mechanizmu obrony. Identyfikacja czynników genetycznych zaangażowanych w odpowiedź obronną rośliny będzie przedmiotem dalszych badań (Lebecka i in. 2019). W diploidalnej populacji mapującej, otrzymanej po skrzyżowaniu klonu DG 00-270, wysokoodpornego na *D. solani*, z podatnym klonem DG 08-305 zmapowano geny kandydujące, kodujące białka różnicowe wykryte we wczesnej fazie infekcji w formach rodzicielskich populacji mapującej na chromosomach: VII – M1D4V9 – inhibitor metalokarboksydazy (zmapowano po raz pierwszy), XII – M0ZJ50 – przypuszczalnie inhibitor metalokarboksydazy (zmapowano po raz pierwszy), II – B3F8F4 – glutaredoksyna (potwierdzono lokalizację), III – Q43652 – inhibitor proteiny typu 2 CM7 (potwierdzono lokalizację), IX – P08454 – indukowany zranieniem inhibitor proteiny (potwierdzono lokalizację). Wyjaśnienie roli tych białek w reakcji odporności ziemniaka na bakterie *D. solani* wymaga dalszych badań.

W diploidalnej populacji mapującej, wykryto na chromosomie IV ziemniaka *locus* cech

ilościowych (ang. Quantitative Trait Locus, QTL) o dużym wpływie na wszystkie trzy parametry porażenia: 1) średnią masę zgniłej tkanki w bulwach, które uległy porażeniu – 23,3 % (RT), 2) udział bulw porażonych – 25,1 % (DI) i 3) średnią masę zgniłej tkanki wszystkich bulw testowanych – 26,5 % (SR). Drugi QTL na chromosomie II ziemniaka, o słabszym efekcie na dwa parametry, RT – 16,1 % i SR – 6,7 %. Wymienione QTL były istotne we wszystkich trzech latach badań i na średnich trzyletnich. Wykryte QTL nie pokrywają się ze zidentyfikowanymi uprzednio *loci* odporności bulw na *P. atrosepticum* (Zimnoch-Guzowska i in. 2000), które były liczniejsze i o znacznie mniejszym wpływie na cechę badaną. Wyniki pracy są przygotowywane do publikacji. Otrzymane wyniki dają możliwość poszukiwania genów kandydujących odporności bulw na bakterie w zidentyfikowanych regionach QTL. Niewielka liczba wykrytych QTL i ich duży wpływ na badane cechy wskazują, że badane źródło odporności może stosunkowo łatwo być wykorzystane w praktycznej hodowli ziemniaków odpornych na *D. solani*. Zmapowano zawartość skrobi w populacji mapującej ziemniaka na chromosomach III, V, VI, VII, VIII, IX, XI i XII. Nie potwierdzono związku zawartości

skrobi z cechą badaną. Z powodu braku genetycznego sprzężenia obu cech możliwe będzie wyselekcjonowanie genotypów ziemniaka łączących wysoki poziom odporności z wysoką zawartością skrobi.

Literatura

- Lebecka R., Flis B., Murawska Z. (2018). Comparison of temperature effects on the in vitro growth and disease development in potato tubers inoculated with bacteria *Pectobacterium atrosepticum*, *P. carotovorum* subsp. *carotovorum* and *Dickeya solani*. *J Phytopathol* 166:654-662.
- Lebecka R., Kistowski M., Dębski J., Szajko K., Murawska Z., Marczewski W. (2019). Quantitative proteomic analysis of differentially expressed proteins in tubers of potato plants differing in resistance to *Dickeya solani*. *Plant and Soil*, 441: 317-329.
- Murawska Z., Dębski J., Szajko K., Lebecka R. (2017). Isolation of proteins from potato tubers. *Plant Breeding Seed Sci* 75:23-27.
- Zimnoch-Guzowska E., Marczewski W., Lebecka R., Flis B., Schäfer-Pregl R., Salamini F., Gebhardt C. (2000). QTL analysis of new sources of resistance to *Erwinia carotovora* ssp. *atroseptica* in potato done by AFLP, RLFP, and resistance-gene-like markers. *Crop Sci* 40:1156-1167.

Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czułej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych

Research and development of selective isolation and sensitive identification methods of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria in difficult diagnostic environmental samples

Włodzimierz Przewodowski✉, Grzegorz Gryń, Milena Pietraszko, Katarzyna Salamońska, Dorota Szarek, Agnieszka Przewodowska, Wioleta Stochła, Teresa Pastuszewska, Wojciech Nowacki, Krzysztof Treder, Danuta Sekrecka, Dorota Michałowska, Katarzyna Franke, Joanna Chołuj, Anna Pawłowska, Agata Trocka, Małgorzata Łabańska, Paulina Dederko-Kantowicz, Mateusz Nowakowski i Zuzanna Munczkowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: w.przewodowski@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: bakterioza pierścieniowa ziemniaka, *Clavibacter sepedonicus*, kultury *in vitro*, metody diagnostyczne, nanokolojdy, próby środowiskowe, ziemniak

Cele prowadzonych badań

Głównym realizowanego w latach 2014–20 projektu było opracowanie materiałów i procedur do selektywnej izolacji kwarantannowej bakterii *Clavibacter sepedonicus* (Cs) (poprzednia nazwa *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*, Cms) z różnych prób środowiskowych oraz opracowanie i weryfikacja wysoce czułych i specyficznych metod identyfikacji tej bakterii.

Cel główny osiągnięto poprzez realizację celów poszczególnych tematów badawczych:

- Opracowanie przeciwciał anti-Cs oraz materiałów pozwalających na selektywną i specyficzną izolację bakterii Cs z prób środowiskowych (Temat 1).
- Opracowanie wysoce specyficznych metod diagnostycznych pozwalających na ultraczułe wykrycie bakterii Cs (Temat 2).
- Weryfikacja i optymalizacja procedur pozwalających na izolację i identyfikację bakterii Cs w próbach pobranych z naturalnego źródła występowania tej bakterii (Temat 3).
- Określenie zdolności Cs do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro*

poprzez opracowanie efektywnego sposobu porażania roślin *in vitro* bakteriami Cs, opracowanie metody izolacji i identyfikacji bakterii Cs z roślin *in vitro* oraz selekcja odmian ziemniaka o największej wrażliwości na porażenie bakteriami Cs (Temat 4).

- Identyfikacja potencjalnych źródeł zakażeń mikrobiologicznych w pożywkach hodowlanych i opracowanie metodyki zapobiegania tego typu kontaminacjom (Temat 5).

Wszystkie założone cele zostały osiągnięte.

Materiały i Metody

Jako materiał biologiczny w ramach projektu stosowano 16 odmian ziemniaka (w formie roślin/bulw w tematach 1–3 oraz kultur *in vitro* w tematach 4–5), 1 odmianę bakłażana w temacie 3 oraz 15 wzorcowych szczepów bakterii *C. sepedonicus* i 6 innych, referencyjnych patogenicznych szczepów bakterii ziemniaka w tematach 1–5.

Badane odmiany ziemniaka wyselekcjonowane i zróżnicowane do badań pod względem wczesności i zawartości skrobi posłużyły w tematach 1 i 3 do opracowania i oceny działania



immunopodłoża, w temacie 2 do opracowania i oceny skuteczności metody izolacji DNA, w temacie 3 do oceny wrażliwości na bakterie Cs, w tematach 4 i 5 odpowiednio do oceny zdolności bakterii Cs do infekowania kultur *in vitro* oraz oceny fitotoksyczności koloidów metali szlachetnych.

Bakterie Cs w temacie 1 posłużyły do opracowania i oceny jakości przeciwciał anti-Cs, w temacie 2 do opracowania metody izolacji DNA, w temacie 3 do oceny patogeniczności na bakłażanie oraz inokulacji bulw badanych odmian ziemniaka na różnych profilach glebowych w Jadwisinie i Bydgoszczy, w temacie 4 do określenia zdolności do infekowania roślin *in vitro*, natomiast w temacie 5 do opracowania warunków pozwalających zapobiegać kontaminacjom mikrobiologicznym w podłożach do hodowli roślin *in vitro*.

Uzyskane przeciwciała użyto do opracowania podłoża do specyficznej izolacji bakterii *C. sepedonicus* z prób środowiskowych, którego efektywność działania oceniano testem PCR oraz IFAS w 3 zewnętrznych laboratoriach badawczych w obecności komponentów soku zróżnicowanych pod względem wczesności i zawartości skrobi odmian ziemniaka.

Przydatność opracowanego testu immuno-PCR oceniano na próbach ekstraktów roślinnych z łodyg oraz bulw potomnych z bulw inokulowanych dwoma skrajnie zróżnicowanymi pod względem mukoidalności szczepami Cs, inkubowanych w różnych warunkach glebowych w ramach tematu 3.

Opracowane nanocząsteczki metali koloidalnych posłużyły w ramach zadania 5 do opracowania mieszanin, które oceniano pod względem fitotoksyczności na badane kultury *in vitro* oraz oddziaływania antybakteryjnego na zróżnicowane szczepy bakterii Cs.

Opis wyników

Wynikiem pierwszego etapu prac wykonanych w ramach tematu 1 było opracowanie materiału biologicznego do badań. W tym celu wyselekcjonowano i zakupiono 15 szczepów kwarantannowych bakterii *C. sepedonicus* oraz 6 szczepów innych patogennych, niekwarantannowych bakterii ziemniaka. Stosując odpowiednie metody mikrobiologiczne, molekularne oraz immunologiczne potwierdzono tożsamość badanych bakterii. Wykonana dodatkowo charakterystyka i różnicowanie mukoidalnie wszystkich szczepów *C. sepedonicus*, pozwoliły wyselekcjonować do dalszych badań szczepy najbardziej różniące się pod względem stopnia wytwarzania śluzów bakteryjnych. Szczepy te

podzielono na 3 grupy zróżnicowane pod względem stopnia wytwarzania śluzów bakteryjnych, odpowiednio na silnie – średnio – i niemukoidalne, które zastosowano następnie jako antygeny do opracowania różnych mieszanin immunizacyjnych do immunizacji królików. Zastosowanie odpowiednich antygenów do immunizacji oraz opracowanej w ramach projektu metodyki oczyszczania i wzbogacania IgG, pozwoliło opracować poliklonalne przeciwciała królicze skierowane na komórki bakterii *C. sepedonicus*. Spośród otrzymanych przeciwciał, których jakość (miano, czystość i specyficzność) oceniano technikami elektroforetycznymi oraz metodą PTA- i DAS-ELISA, wyselekcjonowano do dalszych badań te, które miały najlepsze parametry. Przeciwciała o najwyższej czułości detekcji i specyficzności względem badanych szczepów *C. sepedonicus* i innych patogenów ziemniaka zastosowano do opracowania immunopodłoża do specyficznej izolacji komórek bakterii Cs z prób środowiskowych. Do opracowania konstrukcji matrycy immunopodłoża użyto opracowanych w ramach tematu, wyselekcjonowanych i ocenionych pod względem użyteczności syntetycznych materiałów polimerowych. Aby otrzymać powierzchnię aktywną chemicznie, wybrane matryce polimerowe modyfikowano poddając ich powierzchnie aktywacji chemicznej oraz bioaktywacji przy pomocy opracowanych IgG anti-Cs. Dzięki temu uzyskano efektywnie działające immunopodłoże z IgG anti-Cs jako elementem biologicznie aktywnym, które posłużyło do selektywnego wyłapywania komórek Cs z badanych prób. Na podstawie oceny czułości izolacji badanych bakterii Cs w obecności komponentów soku różnych odmian ziemniaka w laboratoriach zewnętrznych potwierdzono skuteczność działania immunopodłoża oraz opracowanej metodyki. Jednocześnie, stosowany jako odnośny, zalecany przez EPPO, klasyczny test IFAS oceniono jako mniej czuły i kłopotliwy w diagnostyce prób z bulw, w szczególności odmian wysokoskrobiowych z powodu ziaren skrobi i innych wielkocząsteczkowych komponentów tkankowych utrudniających obserwację i identyfikację bakterii Cs pod mikroskopem.

Badania wykonane w ramach drugiego tematu badawczego skupiały się na opracowaniu metod molekularnych pozwalających wysoce specyficzną i czułą diagnostykę bakterii Cs w próbach środowiskowych. W tym celu w ramach badań wstępnych na bazie dostępnej literatury oraz zaleceń EPPO wytypowano do badań różne pary starterów molekularnych przeznaczonych do diagnostyki bakterii

C. sepedonicus klasycznym testem PCR oraz testem Real-Time PCR. Po wykonaniu dla każdej pary optymalizacji warunków temperaturowych reakcji amplifikacji, do dalszych badań wyselekcjonowano startery najbardziej efektywne, które testowano następnie na wszystkich badanych szczepach bakterii *C. sepedonicus*. Wykonany w ten sposób screening molekularny pozwolił ocenić i potwierdzić przydatność działania wybranych starterów względem zróżnicowanych mukoidalnie szczepów Cs.

W dalszym etapie badań opracowano metodykę izolacji bakterii Cs z różnych mediów, w tym z H₂O, różnych buforów oraz roślinnych ekstraktów tkankowych pozyskanych z bulw i roślin ziemniaka. Oceniono przydatność 4 enzymów litycznych oraz 4 metod izolacji DNA bakterii Cs z wody i soku bulw ziemniaka. Jako odnośne stosowano 2 komercyjne zestawy do izolacji DNA. Najwyższą ilość DNA bakterii Cs uzyskano w metodzie wysokosolnej i soku ziemniaka. Niższe ilości DNA uzyskano metodami CTAB i EPPO. Z kolei wysoki stopień degradacji DNA uzyskanego metodą wysokosolną nie skutkowało obniżeniem czułości testu PCR. Najwyższą czułość testu PCR przy izolacji DNA badanych bakterii *C. sepedonicus* z soku roślin i bulw uzyskano metodą wysokosolną z użyciem enzymu proteinazy K. Z reguły dodatek enzymów litycznych w izolacji DNA bakteryjnego poprawiał wydajność ocenianych metod izolacji DNA, jednakże izolacji DNA z zawiesin wodnych nie stwierdzono jednak wpływu obecności enzymów na czułość reakcji. Wyjątek stanowiła metoda CTAB stosowana standardowo do izolacji DNA z tkanek roślinnych, w której enzymy wykazały relatywnie niższą przydatność.

Efektywność opracowanej metody izolacji DNA oceniano w identyfikacji zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cs w obecności komponentów z soku ziemniaka. Oceny dokonywano stosując klasyczny PCR oraz Real-Time PCR na podstawie odpowiednio analizy elektroforegramów zawierających produkty amplifikacji DNA oraz krzywych amplifikacji i krzywych topnienia. Wykonywane badania potwierdziły skuteczność opracowanej metody zarówno w obecności wody, jak i komponentów soku ziemniaka. Po zaobserwowaniu wpływu komponentów soku ziemniaka, w opracowanej metodyce izolacji DNA z ekstraktów roślinnych wprowadzono modyfikację, która pozwoliła na złagodzenie działania obecnych w badanym soku roślinnym inhibitorów reakcji PCR i tym samym eliminację reakcji fałszywie negatywnych. Wynikiem kończącym prace

w ramach tematu 2 potwierdzającym wysoką przydatność opracowanej metodyki izolacji i identyfikacji DNA było uzyskanie pozytywnego wyniku dla wszystkich badanych prób ocenianych w obecności 16 badanych odmian ziemniaka.

Dobranie w ramach tematu 2 odpowiednich warunków izolacji i identyfikacji DNA pozwoliło na opracowanie i optymalizację testu immuno-PCR do identyfikacji prób środowiskowych z roślin i bulw ziemniaka pozyskanych w ramach badań realizowanych w temacie 3.

Wyniki badań uzyskane w temacie 3 dotyczyły weryfikacji i optymalizacji procedur pozwalających na izolację i identyfikację sprawcy bakteriozy pierścieniowej w próbach środowiskowych. W ramach badań wstępnych z udziałem wszystkich 15 szczepów *C. sepedonicus* wykonano test biologiczny, który pozwolił ocenić patogeniczność badanych bakterii oraz wyselekcjonować do dalszych badań skrajnie różniące się mukoidalnością, najbardziej patogeniczne szczepy. Zgodnie z zaleceniami EPPO, ocenę patogeniczności szczepów Cs w teście biologicznym przeprowadzono na roślinach bakłażana (odmiana Black Beauty) inokulując rośliny skoncentrowanymi zawiesinami bakterii Cs i dokonując w czasie inkubacji oceny makroskopowej w celu ustalenia stopnia porażenia badanych roślin. Jako pomocniczy w ocenie patogeniczności stosowano test celulolityczny pozwalający potwierdzić patogeniczność badanych szczepów na zasadzie wielkości uzyskanych stref hydrolizy na badanych podłożach mikrobiologicznych.

Aby uzyskać odpowiednie warunki do weryfikacji i optymalizacji opracowanych w ramach tematów 1 i 2 materiałów i procedur, z krajowego rejestru odmian ziemniaka wyselekcjonowano 16 odmian zróżnicowanych pod kątem wartości użytkowej, agrotechnicznej, wczesności (3 odmiany bardzo wczesne, 4 wczesne, 7 średnio wczesne i 2 średnio późne), zawartości skrobi (13 odmian jadalnych i 3 odmiany skrobiowe) oraz pochodzenia (10 odmian polskich i 6 zagranicznych).

Badane odmiany inokulowano sztucznie dwoma zróżnicowanymi mukoidalnie, patogenicznymi szczepami NCPPB 4053 i NCPPB 2140 bakterii *C. sepedonicus* odpowiednio i wysadzano na początku maja na specjalnie przygotowanych do tego celu mikroplotkach doświadczalnych o różnych profilach glebowych, odpowiednio na jednym i sześciu profilach w Oddziałach IHAR-PIB Bydgoszczy i Jadwisinie. Wyniki uzyskanych badań pozwoliły na ocenę wrażliwości badanych odmian na bakterie Cs w różnych warunkach glebowych.

Aby móc ocenić badane próby w sposób

kompleksowy, przy pozyskaniu prób do badań weryfikacyjnych, jednym z ocenianych aspektów badawczych była ocena wpływu warunków środowiskowych podczas vegetacji badanych odmian ziemniaka. W tym celu przed wysadzeniem inokulowanych prób bulw przeprowadzono badanie wł. fizykochemicznych badanych profili glebowych, natomiast po wysadzeniu, w okresie vegetacji dokonywano pomiaru temperatury i wilgotności gleby, temperatury powietrza oraz sumy opadów. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że ocena wpływu czynników środowiskowych na stopień porażenia się roślin ziemniaka z punktu widzenia identyfikacji bakterii w próbach środowiskowych, jak również weryfikacji i optymalizacji procedur diagnostycznych jest istotna.

Aby zapewnić powtarzalne warunki, badane odmiany ziemniaka inokulowano i wysadzano do gleby z reguły w I dekadzie maja, w okresie vegetacji (II dekada lipca i I dekada sierpnia) pobierano próby z liści i łodyg, natomiast po zbiorze (wrzesień – październik) pozyskiwano próby z bulw. Zarówno w trakcie, jak i po zakończonym okresie vegetacji badanych roślin wykonano szereg badań i obserwacji. Dla określenia różnic pomiędzy roślinami inokulowanymi Cs i roślinami kontrolnymi (bez Cs) odnotowywano różnice wschodów, pełni kwitnienia roślin oraz zasychania naci badanych odmian ziemniaka. Dodatkowo w trakcie vegetacji dokonywano obserwacji pod kątem symptomów chorobowych części nadziemnej porażonych roślin ziemniaka, natomiast po zbiorze spod każdego krzaka notowano liczbę i wagę bulw potomnych z uwzględnieniem bulw z objawami, porażonych latentnie oraz zgniłych.

Pozyskane w warunkach polowych przy dokładnie scharakteryzowanych warunkach wzrostu próby z liści/łodyg oraz po zbiorze próby z bulw potomnych analizowano testem IFAS równolegle w Oddziałach IHAR-PIB w Jadwisinie i Bydgoszczy, natomiast opracowanym testem molekularnym w Oddziale w Boninie. Wykazano wysoką przydatność opracowanego testu molekularnego, którego wyniki w dużej mierze korelowały z otrzymanymi wynikami testu IFAS. Z reguły badane próby z bulw pozyskane po zbiorze charakteryzowały się znacznie wyższym stopniem porażenia latentnego niż próby z liści i łodyg pozyskane w trakcie vegetacji badanych roślin. Stosując analogiczną metodycę inokulacji bulw oraz identyfikacji testem IFAS, zarówno dla prób z bulw, jak i roślin obserwowano na przełomie lat relatywnie wyższy indeks porażenia badanych prób w Jadwisinie niż w Bydgoszczy. W przypadku prób z liści/łodyg i bulw potomnych

indeksy porażenia oceniane testem IFAS wynosiły dla badanych odmian odpowiednio 4–73% i 0–79% w Bydgoszczy oraz 17–83% i 54–100% w Jadwisinie.

Uzyskane wyniki badań wykazały również zróżnicowaną reakcję badanych odmian na inokulację badanymi bakteriami Cs i pozwoliły w toku badań wyselekcjonować odmiany najbardziej i najmniej tolerancyjne na porażenie sprawcą bakteriozy pierścieniowej. Odmiany ocenione jako najbardziej tolerancyjne na obecność sprawcy bakteriozy pierścieniowej (w szczególności Anabelle, Courage i Ikar), wykazywały mniej objawów makroskopowych na roślinach i łodygach oraz mniejszą ilość porażonych bulw w stosunku do odmian najbardziej wrażliwych (Gwiazda, Jurek i Sagitta). Wyniki z obserwacji makroskopowej w znacznym stopniu korelowały z wynikami testu IFAS i immuno-PCR.

Wykazano istotny wpływ obecności bakterii Cs na liczbę i plon bulw. Zarówno średnia liczba bulw, jak i średni plon bulw w plonie roślin inokulowanych Cs były statystycznie istotnie niższe od średniej liczby/plonu bulw w plonie roślin wolnych od Cs. Z reguły pełni kwitnienia i pełni zasychania roślin ziemniaków inokulowanych przed sadzeniem zawieszoną Cs odnotowano później niż u roślin z bulw niezakażanych. W przypadku tych danych nie udowodniono jednak istotnych różnic statystycznych. Różnice statystyczne odnotowano jednak w stosunku do badanych profili glebowych. Z reguły porażeniu latentnemu łodyg sprzyjały warunki glebowe występujące na glebie lżejszej charakteryzującej się niższą wilgotnością, natomiast porażenie latentne bulw notowano częściej w warunkach gleby ciężkiej i wilgotnej. Wykazano również istotny wpływ profili glebowych na wysokość plonu i liczbę bulw potomnych. Najwyższy plon i liczbę bulw odnotowano u roślin niezakażanych, uprawianych na glebie lżejszej (profil II), natomiast na profilu glebowym charakteryzującym się najcięższą glebą warstwy ornej spośród badanych profili, uzyskano istotnie najniższy plon o najmniejszej liczbie bulw oraz stwierdzono najwięcej bulw z objawami porażenia Cs i bulw zgniłych. Z kolei profil glebowy o charakterze pośrednim odznaczał się uzyskaniem najniższego plonu o najmniejszej liczbie bulw w porównaniu do plonów z innych profili w obrębie tej samej grupy jednorodnej. Na profilu tym najliczniej występowały objawy porażenia na roślinach w trakcie okresu vegetacji oraz znaczna liczba objawów na bulwach. Niezależnie, brak lub niskie porażenie pędów nie przekładało się na niewielką liczbę komórek

w plonie bulw.

Porównując efektywność działania zróżnicowanych mukoidalnie szczepów Cs na stopień porażenia badanych odmian w kontekście badanych profili glebowych, stwierdzono, że stopień porażenia bakteriami Cs badanych odmian zależał od profilu glebowego, ale większe znaczenie miał rodzaj użytego do inokulacji szczepu Cs. Najwyższy indeks porażenia łądyg i bulw stwierdzono przy użyciu szczepu mukoidalnego na glebie ciężkiej (łądygi – 42,6%, bulwy – 76,2%), najmniejszy na glebie lekkiej po inokulacji szczepem niemukoidalnym Cs. Nie udowodniono jednak statystycznego wpływu rodzaju badanego szczepu *C. sepedonicus* na wysokości plonu i liczby bulw potomnych.

W ramach badań dotyczących tematu nr 4 dotyczącego badań nad zdolnością bakterii *C. sepedonicus* do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro*, opracowano sposób porażania roślin *in vitro* bakteriami oraz metodę izolacji i identyfikacji bakterii Cs z tkanek tych roślin. Opracowanie takiego sposobu pozwoliło w sposób skutecznie inokulować bakteriami Cs badane kultury *in vitro* i wykonać założone badania. Wykazano, że badane odmiany w kulturach *in vitro* wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność bakterii Cs. Wśród badanych odmian nie zaobserwowano odmian całkowicie tolerancyjnych na porażenie badanymi szczepami bakterii Cs. Potwierdziły to badania wykonane przy pomocy opracowanej metodyki molekularnej, która pozwalała potwierdzić obecność bakterii Cs praktycznie w większości badanych prób pozytywnych, często pomimo braku objawów makroskopowych na badanych roślinach. Zaobserwowano, że stosowanie mieszanin złożonych z kilku patogenicznych szczepów *C. sepedonicus* powodowało znacznie silniejsze oddziaływanie fitotoksyczne u badanych odmian niż stosowanie pojedynczych szczepów tej mieszaniny przy analogicznej koncentracji komórek bakterii w próbce. Zauważono jednak, że stopień oddziaływania na kultury *in vitro* danego szczepu zależy przede wszystkim od wrażliwości badanej odmiany oraz stopnia patogeniczności szczepu, natomiast w mniejszym stopniu od koncentracji bakterii w badanej próbce.

W ramach badań dotyczących tematu 5 zidentyfikowano potencjalne źródła zakażeń mikrobiologicznych w podłożach wzrostowych kultur *in vitro* ziemniaka. To z kolei pozwoliło ustalić potencjalne miejsca pojawienia się kontaminacji kultur *in vitro* oraz opracować odpowiednie sposoby pozwalające zniwelować ryzyko pojawienia

się zakażeń w tych miejscach. Ponieważ za jedno z miejsc uznano podłoża wzrostowe dla kultur *in vitro*, celem prac było opracowanie dodatku do podłoża pozwalającego na działanie prezencyjne w stosunku do potencjalnie mogących pojawić się kontaminacji bakteryjnych, ze wyszczególnieniem kwarantannowej bakterii *C. sepedonicus*. W tym celu opracowano metodykę wytwarzania i standaryzacji nanocząsteczek metali koloidalnych złota, srebra, miedzi i platyny, która pozwoliła uzyskać w sposób powtarzalny jednorodne zawiesiny poszczególnych koloidów, jak i ich mieszanin. Prowadząc badania, zaobserwowano zróżnicowany wpływ opracowanych koloidów zarówno na badane szczepy bakterii *C. sepedonicus*, jak i kultury *in vitro* badanych odmian ziemniaka. Silne oddziaływanie antybakteryjne w stosunku do *C. sepedonicus* zaobserwowano przy zastosowaniu nanocząsteczek miedzi i srebra, natomiast pośrednie i neutralne działanie wykazywały odpowiednio koloidy platyny i złota. Wyższą efektywność działania nanokoloidów obserwowano u szczepów silnie mukoidalnych i przy zastosowaniu wyższych koncentracji nanocząsteczek. Z kolei badane odmiany kultur *in vitro* z różną wrażliwością reagowały na koloidy, natomiast w podobny sposób na te same koncentracje. Stosując badane koloidy zaobserwowano zarówno działanie stymulujące, jak i fitotoksyczne badanych nanocząsteczek koloidalnych, przy czym nawet zastosowanie toksycznie działających koloidów, w niższej koncentracji powodowało lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin. Zaobserwowano, że synergizm działania kilku koloidów w mieszaninach pozwalał uzyskać lepszą efektywność antymikrobiologiczną oraz niższą fitotoksyczność przy relatywnie niższej koncentracji.

Wnioski z prowadzonych badań:

Temat 1:

- Zastosowanie odpowiednie metod diagnostycznych (mikrobiologiczne, molekularne oraz immunologiczne) pozwoliło potwierdzić tożsamość, scharakteryzować i zróżnicować mukoidalnie szczepy badanych bakterii *C. sepedonicus* oraz szczepy innych badanych patogennych bakterii ziemniaka.
- Dzięki opracowaniu antygenów i mieszanin do immunizacji królików, jak również metodyki oczyszczania IgG uzyskano specyficzne, poliklonalne przeciwciała królicze skierowane na komórki bakterii *C. sepedonicus*.
- Opracowane przeciwciała w porównaniu do przeciwciał komercyjnych charakteryzowały

się wyższą specyficznością wobec badanych szczepów Cs oraz relatywnie niższym oddziaływaniem niespecyficznym w stosunku do szczepów innych badanych bakterii.

- Selekcja i modyfikacja chemiczna powierzchni materiałów do opracowania matryc oraz zastosowanie opracowanych IgG pozwoliły na opracowanie immunopodłoża do selektywnej izolacji bakterii *Clavibacter sepedonicus* z prób środowiskowych.
- Skuteczność opracowanego immunopodłoża potwierdzono w ramach badań dotyczących tematu 3 na próbach środowiskowych z liści/łodyg i bulw ziemniaka pozyskanych w warunkach polowych, jak również w zewnętrznych laboratoriach badawczych w obecności komponentów soku różnych odmian ziemniaka zróżnicowanych pod względem wczesności i zawartości skrobi.
- Opracowane immunopodłoże oceniono jako proste w użyciu, trwałe i niewrażliwe na komponenty tkankowe oraz dużą zawartość skrobi. Z kolei ocena preparatów zalecanym przez EPPO testem IFAS była utrudniona z powodu obecności skrobi i komponentów soku ziemniaczanego utrudniających obserwację i zliczanie bakterii pod mikroskopem.

Temat 2:

- Wykonane badania molekularne testem PCR i Real-Time PCR potwierdziły tożsamość badanych szczepów *C. sepedonicus*.
- Wykazano przydatność działania różnych starterów molekularnych względem zróżnicowanych mukoidalnie szczepów Cs.
- Opracowano metodykę izolacji bakterii Cs z różnych mediów, w tym z H₂O oraz roślinnych ekstraktów tkankowych z bulw i roślin ziemniaka, oceniając m.in. przydatność 4 enzymów litycznych oraz 4 metod izolacji DNA bakterii Cs z wody i soku bulw ziemniaka.
- Najwyższą ilość DNA bakterii Cs uzyskano w metodzie wysokosolnej i soku ziemniaka. Niższe ilości uzyskano metodami CTAB i EPPO.
- Wysoki stopień degradacji DNA uzyskanego metodą wysokosolną nie skutkowało obniżeniem czułości testu PCR.
- Największą czułość testu PCR przy izolacji DNA badanych bakterii *C. sepedonicus* z soku roślin i bulw uzyskano metodą wysokosolną z użyciem enzymu proteinazy K. Przy zawiesinach wodnych nie stwierdzono wpływu obecności enzymów na czułość reakcji.

- Z reguły dodatek enzymów litycznych w izolacji DNA bakteryjnego poprawiał wydajność metod izolacji DNA. Wyjątek stanowiła metoda CTAB stosowana standardowo do izolacji DNA z tkanek roślinnych, w której enzymy wykazały relatywnie niższą przydatność.
- Dobranie odpowiednich warunków izolacji DNA pozwoliło na zwiększenie efektywności testu immuno-PCR do identyfikacji prób środowiskowych z roślin i bulw ziemniaka w tematach 3–5.

Temat 3:

- Wyniki badań związane z porównaniem stopnia porażenia badanych roślin oraz bulw potomnych potwierdziły funkcjonalność opracowanych materiałów oraz metodyki izolacji DNA.
- Pomimo zmiennych w poszczególnych latach warunkach pogodowych, wykazano zróżnicowaną podatność badanych odmian ziemniaka na porażenie bakteriami *C. sepedonicus*.
- Określono patogeniczność badanych szczepów *C. sepedonicus* i wyselekcjonowano najbardziej patogeniczne szczepy do badań.
- Stwierdzono, że z punktu widzenia identyfikacji bakterii w próbach środowiskowych, jak również weryfikacji i optymalizacji procedur diagnostycznych, ważna jest ocena wpływu czynników środowiskowych na stopień porażenia się roślin ziemniaka.
- Badane odmiany wykazały zróżnicowaną podatność na sztuczną inokulację bakteriami Cs. Najmniejszą podatność uzyskano dla odmian Courage, Annabelle i Ikar, natomiast największe porażenie bulw zanotowano u odmian Gwiazda, Jurek i Sagitta.
- Ogólnie większą ekspresję objawów chorobowych badanych roślin i bulw potomnych obserwowano w Jadwisinie. Tam też uzyskiwano wyższe indeksy porażenia latentnego roślin i bulw potomnych, przy czym indeks porażenia latentnego bulw był z reguły 2-krotnie wyższy niż roślin.
- Indeks porażenia latentnego badanych odmian bakteriami *C. sepedonicus* zależał od profilu glebowego, ale większe znaczenie miała wrażliwość samej odmiany, jak również patogeniczność użytego do inokulacji szczepu Cs.
- Stwierdzono, że na poziom porażenia latentnego łodyg oddziaływały wszystkie badane czynniki tj. warunki pogodowe w latach badań, skład granulometryczny podłoża glebowego oraz odmiana ziemniaka. Z kolei stopień

porażenia bulw różnicowały warunki meteorologiczne i odmiana ziemniaka.

- Porażenie latentne łodyg i bulw ziemniaka było zróżnicowane w latach badań.
- Nasilenie porażenia łodyg było znacznie niższe od porażenia bulw.
- Nie udowodniono istotnego wpływu składu granulometrycznego gleb na nasilenie infekcji w bulwach.
- Masa bulw badanych prób była z reguły wyższa u roślin niezakażanych, niezależnie od stopnia wrażliwości danej odmiany na Cs.
- Najwyższy plon uzyskały rośliny uprawiane na glebie najlżejszej, ale jednocześnie wykazano tu największe różnice w plonowaniu między roślinami zakażanymi Cs i kontrolą, stwierdzono najwięcej objawów i bulw zgniłych oraz najwyższe porażenie pędów.
- Wykazano wysoką przydatność opracowanego testu immuno-PCR. Wyniki w dużej mierze korelowały z wynikami testu IFAS.

Temat 4:

- Opracowano efektywny sposób porażania roślin *in vitro* bakteriami oraz metodę izolacji i identyfikacji bakterii Cs z tkanek tych roślin.
- Badane odmiany kultur *in vitro* wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność bakterii Cs.
- Badając kultury *in vitro* nie zaobserwowano odmian całkowicie tolerancyjnych na porażenie badanymi szczepami bakterii.
- Wykazano przydatność opracowanej metodyki molekularnej w diagnostyce kontaminacji kultur *in vitro*. Obecność bakterii testem molekularnym potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych, często pomimo braku objawów makroskopowych na badanych roślinach.
- Stosowanie mieszanin patogenicznych szczepów *C. sepedonicus* powodowało znacznie silniejsze oddziaływanie fitotoksyczne u badanych odmian niż stosowanie pojedynczych szczepów tej mieszaniny przy analogicznej koncentracji komórek bakterii w próbce.
- Zauważono jednak, że stopień oddziaływania na kultury *in vitro* danego szczepu zależy przede wszystkim od wrażliwości badanej odmiany oraz patogeniczności szczepu, natomiast w mniejszym stopniu od koncentracji bakterii w badanej próbce.

Temat 5:

- Zidentyfikowano potencjalne źródła zakażeń

mikrobiologicznych w podłożach wzrostowych kultur *in vitro*.

- Opracowano metodykę wytwarzania i standaryzacji nanocząsteczek metali koloidalnych złota, srebra, miedzi i platyny, która pozwoliła uzyskiwać w sposób powtarzalny jednorodne zawiesiny poszczególnych koloidów, jak i ich mieszanin.
- Zaobserwowano zróżnicowany wpływ opracowanych koloidów na badane szczepy bakterii *C. sepedonicus* oraz kultury *in vitro* badanych odmian ziemniaka.
- Silne oddziaływanie antybakteryjne w stosunku do *C. sepedonicus* zaobserwowano przy zastosowaniu nanocząsteczek miedzi i srebra, natomiast pośrednie i neutralne działanie wykazywały odpowiednio koloidy platyny i złota. Wyższą efektywność działania nanokoloidów obserwowano u szczepów silnie mukoidalnych i przy zastosowaniu wyższych koncentracji nanocząsteczek.
- Badane odmiany kultur *in vitro* z różną wrażliwością reagowały na koloidy, natomiast w podobny sposób na te same koncentracje. Działanie stymulujące zaobserwowano przy zastosowaniu nanocząsteczek złota i platyny, natomiast fitotoksyczne srebra i miedzi, przy czym niższe stężenia toksycznych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin.
- Synergizm działania kilku koloidów w mieszaninach pozwalał uzyskać lepszą efektywność antymikrobiologiczną oraz niższą fitotoksyczność przy relatywnie niższej koncentracji.

Ważniejsze osiągnięcia projektu

- Opracowanie i ocena metodyki oczyszczania przeciwciał poliklonalnych,
- Opracowanie i ocena jakości nowych przeciwciał anty-Cs,
- Opracowanie nowych materiałów diagnostycznych do identyfikacji bakterii Cs oraz materiałów do budowy matrycy do izolacji bakterii z tkanki roślinnej w warunkach środowiskowych,
- Opracowanie immunopodłoża z IgG anty-Cs oraz potwierdzenie jego skuteczności jako narzędzia diagnostycznego w zewnętrznych laboratoriach badawczych w obecności komponentów soku różnych odmian ziemniaka zróżnicowanych pod względem wczesności i zawartości skrobi.
- Opracowanie i potwierdzenie skuteczności nowej procedury izolacji DNA bakteryjnego

- z tkanki roślin i bulw ziemniaka w obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cs,
- Ocena podatności wybranych odmian ziemniaka, na sztuczną inokulację zawiesiną komórek Cs w zależności od warunków glebowych,
 - Opracowanie i potwierdzenie skuteczności opracowanej metody molekularnej w diagnostyce *C. sepedonicus* z prób liści/łodyg i bulw ziemniaków pozyskanych w warunkach środowiskowych,
 - Określenie zdolności zróżnicowanych mukoidalnie bakterii Cs do infekowania roślin utrzymywanych w kulturach *in vitro*, poprzez opracowanie efektywnego sposobu porażania roślin *in vitro* bakteriami Cs, opracowanie metody izolacji i identyfikacji bakterii Cs z kultur *in vitro* oraz selekcja odmian ziemniaka o największej wrażliwości na porażenie bakteriami Cs.
 - Opracowanie mieszanin nanocząsteczek metali koloidalnych i ocena ich wpływu na zróżnicowane mukoidalnie szczepy bakterii Cs oraz badane kultury *in vitro*.
 - Opracowanie założeń do nowego projektu na bazie uzyskanych wyników.

Wykaz publikacji

Publikacje

- Stochła W., Przewodowski W., Przewodowska A. 2014. Wybrane metody otrzymywania przeciwciał służących do wykrywania i identyfikacji patogenów ziemniaka. *Ziemn. Pol.* 3:46–49.
- Chołuj J., Przewodowski W. 2014. Technika PCR i jej modyfikacje w identyfikacji patogenów ziemniaka. *Ziemn. Pol.* 2: 40–45.
- Pietraszko M., Gryń G., Pastuszewska T., Przewodowski W., Przewodowska A. 2015. Podatność wybranych odmian ziemniaka na porażenie bakteriami *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w zróżnicowanych warunkach glebowych. *Biul. IHAR-PIB (277)*: 97–108.
- Stochła W., Przewodowska A., Przewodowski W. 2015. Wykrywanie bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* przy użyciu przeciwciał króliczych uzyskiwanych dwoma różnymi sposobami. *Postępy w Ochronie Roślin/Prog. Plant Prot.* 55, 3: 352–357.
- Chołuj J., Przewodowski W., Przewodowska A. 2015. Wpływ różnych sposobów izolacji kwasów nukleinowych z bakterii na czułość testu PCR. *Postępy w Ochronie Roślin/Prog. Plant Prot.* 55, 3: 321–326.
- Gryń G., Pastuszewska T., Przewodowski W. 2016. Ocena patogeniczności wybranych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* pochodzących z kolekcji NCPPB w Wielkiej Brytanii. *Postępy w Ochronie Roślin/Prog. Plant Prot.* 56 (1): 73–78. DOI: 10.14199/ppp-2016–013.
- Pietraszko M., Gryń G., Przewodowski W. 2018. An Effect of Weather and Soil Conditions and Their Interaction on Infection of Leaves and Tubers of Potato with Bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Am. J. Potato Res.* (2018) 95: 278–285. <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9629-6>.
- Przewodowski W., Salamońska K., Szarek, Michałowska D., Stochła W., Przewodowska A., Gryń G., Pietraszko M., Franke K. 2019. Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czulej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych. *Biuletyn IHAR (286)*: 265–269.

Publikacje w trakcie recenzji

- Gryń G., Pietraszko M., Przewodowski W., Franke K., Nowakowski M., Nowakowski M. Reaction of the selected potato varieties to *Clavibacter sepedonicus* infestation under changing weather conditions. Praca w recenzji w *European Journal of Plant Pathology*.

Doniesienia konferencyjne

- Chołuj J., Przewodowski W. 2014. Wpływ sposobu izolacji kwasów nukleinowych bakterii Cms na czułość testu PCR. (poster) (W:) Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konferencja naukowo-szkoleniowa. Dźwirzyno, 15–16 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 59.
- Stocha W., Przewodowska A., Przewodowski W. 2014. Wpływ sposobu izolacji przeciwciał króliczych na ich jakość. (poster) (W:) Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konferencja naukowo-szkoleniowa. Dźwirzyno, 15–16 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 60.
- Przewodowski W., Przewodowska A. 2014. Interaction between potato proteins and quarantine bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. (208 poster) *Molecular Plant-Microbe Interactions*. International Society of Molecular Plant-Microbe Interactions. 6-11.06.2014 Rodos, Grecja.
- Pastuszewska T., Gryń G. 2015. Charakterystyka patogeniczności wybranych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* z kolekcji zagranicznych. Dźwirzyno, 13–15 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 83–85.
- Pietraszko M., Przewodowski W., Pastuszewska T., Gryń G. 2015. Podatność wybranych odmian ziemniaka na porażenie bakteriami *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* w zróżnicowanych warunkach glebowych. Dźwirzyno, 13–15 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 85–87.
- Przewodowski W., Stochła W. 2015. Oczyszczanie przeciwciał króliczych metodą powinowactwa. Dźwirzyno, 13–15 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 87.
- Przewodowska A., Przewodowski W. 2015. Rapid diagnostic

- assay for detection of bacteria using colloidal gold nanoparticles. 15 International Conference on Nanotechnology – IEEE NANO 2015, Rzym, Włochy 27 – 30 lipca 2015 r. Poster nr 629.
- Salamońska K., Przewodowski W., Przewodowska A., Stochła W. 2016. Wpływ enzymów litycznych na izolację DNA oraz czułość testu PCR w diagnostyce kwarantannowych bakterii ziemniaka. Konferencja naukowo – szkoleniowa. Dźwirzyno, 11–13 maja, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 72–73.
- Przewodowski W., Przewodowska A. 2016. The Effect of Colloidal Metals Nanoparticles on Quarantine Bacterium – *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*. 18th International Conference on Biotechnology and Nanotechnology – ICBN 2016, WASET, Wenecja, Włochy 13–14 czerwca 2016r. 18 (6) Part IX. Streszczenia: 1329.
- Przewodowski W., Przewodowska A., Sekrecka D., Michałowska D. 2016. The Influence of Colloidal Metal Nanoparticles on Growth and Proliferation of *In vitro* Cultures of Potato. 18th International Conference on Biotechnology and Nanotechnology – ICBN 2016, WASET, Wenecja, Włochy 13–14 czerwca 2016r. 18 (6) Part IX. Streszczenia: 1330.
- Przewodowski W., Przewodowska A. 2017. Opracowanie nowej jakości przeciwciał poliklonalnych wykrywających kwarantannowe bakterie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* (Prezentacja) [W:] 50 Konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka”, Dźwirzyno, 7–9 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 37.
- Salamońska K., Przewodowski W. 2017. Wpływ warunków izolacji DNA na czułość testu molekularnego w diagnostyce sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. (Prezentacja) [W:] 50 Konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka”, Dźwirzyno, 7–9 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 39.
- Przewodowski W., Przewodowska A., Michałowska D., Salamońska K., Szarek D., Stochła W., Sekrecka D., 2017. Reduction of *in vitro* plant growth as an effect of pathogenic bacteria interaction. (Poster) [In:] European Biotechnology Congress 2017, EUROBIOTECH, Dubrovnik, Croatia, May 25 – 27. Journal of Biotechnology, Vol 256, Supplement, 2017: 106–107. (doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.1165).
- Przewodowski W., Przewodowska A., Michałowska D., Sekrecka D., Salamońska K., Stochła W., Szarek D. 2017. The influence of colloidal metal nanoparticles on *in vitro* plants of potato. (Short Presentation) [In:] European Biotechnology Congress 2017, EUROBIOTECH, Dubrovnik, Croatia, May 25 – 27. Journal of Biotechnology, Vol 256, Supplement, 2017: 35 (doi.org/10.1016/j.jbiotec.2017.06.667).
- Salamońska K., Przewodowski W., Szarek D., Stochła W., Przewodowska A. 2018. Ocena obecności śluzów bakteryjnych w diagnostyce molekularnej zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii *Cms*. (Prezentacja) [W:] 51 Konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka”, Dźwirzyno, 6–8 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 32.
- Stochła W., Przewodowski W., Salamońska K., Szarek D., Przewodowska A. 2018. Oczyszczanie i ocena jakości poliklonalnych przeciwciał króliczych do identyfikacji sprawcy bakteriozy pierścieniowej ziemniaka. (Prezentacja) [W:] 51 Konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka”, Dźwirzyno, 6–8 czerwca, IHAR-PIB ZNiOZ, Bonin, Streszczenia: 31.
- Salamońska K., Przewodowski W., Szarek D., Przewodowska A., Stochła W. 2018. Evaluation of DNA isolation to the sensitivity of molecular diagnostics of *Cms* bacteria. (Poster) [In:] The 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic, 7–12 July 2018: P.01080Tue. (https://2018.febscongress.org/abstract_preview.aspx?idAbstractEnc=4424170094092094093099424170)
- Przewodowski W., Szarek D., Salamońska K., Michałowska D., Przewodowska A., Stochła W. 2018. Determination of the ability of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* strains to infect various *in vitro* cultures of potato. (Poster) [In:] The 43rd FEBS Congress, Prague, Czech Republic, 7–12 July 2018: P.08–043–Mon.
- Salamońska K., Przewodowski W., Szarek D., Stochła W., Przewodowska A. 2019. Diagnostyka molekularna bakterii *Clavibacter sepedonicus* comb. nov. w obecności komponentów tkankowych ziemniaka. (Prezentacja) [W:] Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka, 50 jubileuszowa konferencja naukowo-szkoleniowa, Dźwirzyno, 22–24 maja, Streszczenia: 31.
- Przewodowski W., Przewodowska A., Salamońska K., Szarek D., Stochła-Potentas W. 2019. Opracowanie nowoczesnych materiałów do diagnostyki kwarantannowych bakterii ziemniaka z prób środowiskowych. (Prezentacja) [W:] Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka, 50 jubileuszowa konferencja naukowo-szkoleniowa, Dźwirzyno, 22–24 maja, Streszczenia: 32.

Literatura

- Barnyk A., Lewosz J., Treder K., Przewodowski W., Pilecki T. (2008). Zastosowanie chromatografii tiofilnej do izolacji przeciwciał poliklonalnych z surowicy krwi królików. Biul. IHAR, 248: 87–95.
- Nowacki W. (2009). Problemy profilaktyki i zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka wywoływanej przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. PPP/Postępy w Ochronie Roślin nr 49 (2): 678–685.
- Pastuszewska T., Gryń G., Franke K. (2010). Podatność odmian ziemniaka na porażenie przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Protection/Post. Ochr. Roślin 50: 244–248.

- Pastuszewska T., Gryń G. (2012). Przeżycie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na powierzchniach wybranych materiałów w warunkach różnych temperatur. *PPP* 52 (2): 443–446.
- Przewodowski W., (2009). Nowoczesne metody w diagnostyce bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Prog. Plant Prot.* 49, 3: 1335–1343.
- Przewodowski W., Sekrecka D., Przewodowska A. (2012). The influence of colloidal metals on growth and proliferation of potato plants. *Eurobiotech 2012 IV Congress of Polish Biotechnology and IV EUROBIOTECH*, Krakow, Poland, 12 -15.10.2011: 28.
- Przewodowski W., Przewodowska A. (2017). Development of a Sensitive and Specific Polyclonal Antibody for Serological Detection of *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *PLoS ONE* 12 (1): e0169785. doi: 10.1371/journal.pone.0169785.
- Waleron M., Waleron K., Kamasa J., Przewodowski W., Lojkowska E. (2011). Polymorphism analysis of housekeeping genes for identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies. *Europ. J. Plant Pathol.* 131: 341–354.

Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka

Development of sensitive methods for detection of the most important potato viruses

Krzysztof Treder[✉], Anna Pawłowska, Joanna Chołuj, Bogumiła Zacharzewska, Mateusz Mielczarek, Agata Kaczmarek, Maria Fedczak

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii
✉ e-mail: k.treder@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: test ELISA, RT-PCR, RT-LAMP, wirusy ziemniaka, wykrywanie, ziemniak

Celem głównym projektu było opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych patogenów wirusowych (PVY, PVM, PLRV) w bulwach, kielkach i liściach ziemniaka, dedykowanych do realizacji różnych celów badawczych. Cel główny realizowano w ramach szczegółowych tematów badawczych: (I) Opracowanie i optymalizacja nowych metod wykrywania wirusów, (II) Ocena wpływu odporności odmian ziemniaka na skuteczność wykrywania wirusów w bulwach, (III) Badania nad wykrywaniem wirusów w bulwach i kielkach ziemniaka, (IV) Adaptacja i optymalizacja metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach *in vitro*, (V) Opracowanie testów diagnostycznych do szybkiego wykrywania wirusów w warunkach polowych. Osiągnięto wszystkie założone cele projektu.

Materiały i Metody

Temat badawczy 1. Syntezowano nanocząsteczki magnetyczne, koniugowano z IgG oraz kupiono komercyjne nanomateriały i mikroplątki filtracyjne ze złożami jonowymiennymi. Optymalizowano wiązanie przeciwciał i zagęszczanie wirusów z soku ziemniaka na nanocząstkach magnetycznych oraz wiązanie i elucję cząstek wirusowych na złożach jonowymiennych. Porównywano czułość opracowanych metod z testem ELISA.

Temat badawczy 2. Zdrowe bulwy odmian o różnym stopniu odporności na wirusy PVY, PLRV i PVM wysadzano na polu w obecności infektorów. Po zbiorze wykrywano wirusy w bulwach. Jako badanie kontrolne, określające

rzeczywiste porażenie badanych bulw wykonywano próbę oczkową. Identyczne badanie zlecono do wykonania na mniejszej liczbie odmian trzem niezależnym laboratoriom diagnozującym ziemniaki.

Temat badawczy 3. Porównano wykrywanie wirusów PVY, PLRV i PVM w kielkach za pomocą testu ELISA z próbą oczkową w doświadczeniu własnym oraz zleconym trzem laboratoriom. W doświadczeniu własnym porównano również skuteczność wykrywania wirusów w bulwach, kielkach i w próbie oczkowej za pomocą testów molekularnych (RT-qPCR, RT-LAMP) z testem ELISA.

Temat badawczy 4. Opracowano własne startery do wykrywania PVY, PLRV i PVM. Porównano ich skuteczność ze starterami literaturowymi. Optymalizowano izolację RNA z roślin *in vitro* oraz warunki reakcji RT-PCR i RT-qPCR oraz. Za pomocą optymalnej procedury badano zasoby Banku Genów Ziemniaka.

Temat badawczy 5. Projektowano startery oraz optymalizowano warunki wykrywania wirusów za pomocą izotermicznego testu RT-LAMP. Optymalizowano izolację RNA i przygotowanie soku do wykrywania bez izolacji. Porównano czułość i szybkość wykrywania wirusów za pomocą testu RT-LAMP oraz testów paskowych.

Opis wyników i wnioski z prowadzonych badań

Temat badawczy 1. Opracowano procedurę zagęszczania i wykrywania wirusów za pomocą magnetycznego testu ELISA. Wytworzono



mikrosfery o dobrych właściwościach magnetycznych i dyspersyjnych lecz o niskiej pojemności wiązania przeciwciał. Mimo to test był bardziej czuły niż DAS-ELISA. Dalsze zwiększenie czułości wykrywania wirusów uzyskano stosując komercyjne mikrosfery magnetyczne. Kolejną opracowaną metodą był test filtracyjny na mikroplątkach, w których w dnie studzienek znajdują się membrany jonowymienne. Wirusy PVY, PLRV i PVM wiązały się do dodatnio naładowanej membrany Q lepiej niż do posiadającej ładunek ujemny membrany S. Optymalne wiązanie wirusów do membrany Q zachodziło w pH 5,5. Zagęszczanie PVY i PLRV na membranie Q zwiększało około dwukrotnie czułość ich wykrywania za pomocą testu ELISA w porównaniu do tych samych prób niezagęszczanych. W przypadku PVM test był mniej skuteczny niż ELISA. Porównanie czułości testu filtracyjnego, z magnetycznym wariantem i klasyczną DAS-ELISA wykazało, że magnetyczna ELISA ma największą czułość a test filtracyjny równą lub mniejszą niż DAS-ELISA. Test magnetyczny stanowi więc czułą alternatywę dla DAS-ELISA i ma potencjał aplikacyjny. Test filtracyjny może znaleźć zastosowanie w badaniach nad biologią wirusów lecz nie nadaje się do diagnostyki na dużą skalę. Niewielki wzrost czułości lub nawet jego mniejsza czułość mogą wynikać z tego, że pH optymalne dla wiązania wirusów do membrany Q nie pokrywa się z pH optymalnych dla stabilności cząstek wirusowych.

Temat badawczy 2. Wykazano, że ze wzrostem odporności odmian na PVY skuteczność jego detekcji w bulwach wyraźnie malała. Nie obserwowano takiej zależności dla PVM i PLRV, jednak w latach 2014–2020 PVM występował nielicznie a PLRV w niektórych latach w ogóle nie był wykrywany. W przypadku PVY zależność między odpornością odmian a porażeniem pozwalała na szacowanie odporności odmian, dla których nie była ona dotąd określana. Poziom presji wirusem PVY był wysoki we wszystkich latach badań.

Temat badawczy 3. Potwierdzono, że w bulwach za pomocą testu ELISA wykrywa się istotnie mniejszą liczbę porażań wirusem PVY niż za pomocą próby oczkowej. Badanie kielków zarówno za pomocą testu koktajl-ELISA jak i DAS-ELISA pozwalało na wiarygodną ocenę porażenia bulw wirusem PVY, wyniki tych testów nie różniły się od uzyskanych za pomocą próby oczkowej. W przypadku wirusa PVM badanie bulw jest równie wiarygodne jak próba oczkowa czy badanie kielków. Podobny wynik w przeszłości uzyskano

dla PLRV. Bezpośrednią detekcję PVY w bulwach umożliwia test RT-qPCR. Test ten, w połączeniu z optymalną metodą izolacji RNA wykrywał więcej porażań PVY w bulwach, kielkach i w roślinach uzyskanych za pomocą próby oczkowej niż test RT-LAMP, czy test ELISA.

Temat badawczy 4. Optymalizowano metody izolacji RNA z roślin *in vitro* oraz warunki reakcji RT-PCR. Izolacja RNA na krzemionce (Zacharzewska i in, 2014) umożliwiła wykrywanie PVY w roślinach *in vitro* z taką samą skutecznością jak procedura wykorzystująca komercyjny zestaw do izolacji RNA. Dzięki temu obniżono koszt analizy. Zastosowanie cząstek magnetycznych do izolacji RNA pozwoliło na skrócenie czasu analizy (Treder i in, 2018). Opracowano test tripleks RT-PCR do jednoczesnego wykrywania PVY, PVM i PLRV. Dla dwóch ostatnich wirusów opracowano własne pary starterów. Czułość wykrywania wirusów PVY i PLRV w reakcji uniplex-PCR była taka sama jak multiplex-PCR (100 pg/reakcję), natomiast czułość wykrywania wirusa PVM była mniejsza niż multiplex-PCR i pozwalała wykryć wirus w reakcji zawierającej 1 ng całkowitego RNA. Za pomocą opracowanego testu RT-PCR przebadano kolekcję bazową polskich odmian ziemniaka i wykazano, że jest wolna od wirusów. W celu dalszego uproszczenia badania zasobów genowych Banku Genów Ziemniaka opracowano test RT-qPCR w czasie rzeczywistym do wykrywania PVY i PLRV w reakcji multiplexowej i PVM w reakcji pojedynczej.

Temat badawczy 5. Opracowano szybki test Y4 RT-LAMP do wykrywania PVY (Treder i in. 2018). Test wykrywa wirus z czułością 1000-krotnie większą niż testy paskowe i test ELISA oraz 10-krotnie większą niż RT-PCR. Duża szybkość wykonania testu RT-LAMP świadczy, że można go adaptować do warunków polowych. Za pomocą testu Y4 RT-LAMP można różnicować populację PVY pod względem typu białka płaszcza na grupy serologiczne O i N. Opracowano również szybkie testy RT-LAMP do wykrywania PLRV i PVM. Wykazano, że test fluorescencyjny RT-LAMP wykrywa PVY, PVM i PLRV bezpośrednio w rozcieńczonych sokach z co najmniej taką samą czułością jak w preparatach RNA izolowanych z tych soków. Test na sokach pozwalał na wykrycie wirusa w ciągu 5–20 minut. Przebadano również różne barwniki i komercyjnych zestawy do kolorymetrycznego RT-LAMP, w którym pod wpływem specyficznej amplifikacji powinien zmieniać się kolor reakcji. Stwierdzono, że spośród testowanych barwników specyficzne wykrywanie PVY, PVM i PLRV

w preparatach RNA izolowanych z badanych prób umożliwia błękit hydroksynaftolowy oraz kalceina. Jednak gdy test wykonywano bezpośrednio na sokach, kolor nie zmieniał się w próbach do których dodano wodę zamiast soku z roślin. Jednocześnie dodanie do reakcji RT-LAMP zarówno prób z roślin porażonych wirusami jak i z roślin zdrowych powodowało zmianę koloru. Dlatego do wykrywania wirusów bezpośrednio w sokach należy stosować fluorescencyjny test RT-LAMP, a test kolorymetryczny jedynie do wykrywania wirusów w wyizolowanych z roślin preparatach RNA.

Osiągnięcia projektu

1. Opracowano magnetyczny test ELISA w oparciu o mikrosfery magnetytowe, który umożliwia zagęszczanie cząstek wirusa z większych objętości soku i jego czułą detekcję.
2. Opracowano test filtracyjny na mikropłytkach z membranami jonowymiennymi, za pomocą którego można badać właściwości biochemiczne wirusów.
3. Wykazano, że wraz ze wzrostem odporności odmian ziemniaka na PVY spada wykrywalność wirusa w bulwach. Zależność poziomu porażenia PVY od odporności odmian ma przebieg sigmoidalny.
4. Stosując wzorcowe odmiany ziemniaka stworzono model, za pomocą którego można szacować poziom odporności odmian na PVY, dla których nie był on określony.
5. Wykazano, że wykrywanie PVY i PVM za pomocą badania kiełków jest równie skuteczne jak próba oczkowa. Zastąpienie próby oczkowej testowaniem kiełków eliminuje koszty szklarni i skraca czas certyfikacji bulw o ok 3–4 tygodnie (czas wzrostu roślin w szklarni).
6. Wykazano, że przy zastosowaniu odpowiedniej metody izolacji RNA z bulw test RT-qPCR pozwala na wykrywanie PVY w bulwach co najmniej równie wiarygodne jak próba oczkowa.
7. Opracowano test multipleks RT-PCR oraz test RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania PVY, PVM i PLRV w roślinach *in vitro* i przebadano za pomocą tych metod kolekcję bazową polskim odmian ziemniaka w Banku Genów Ziemniaka, potwierdzając, że jest wolna od wirusów.
8. Opracowano szybkie testy izotermiczne RT-LAMP do wykrywania PVY, PVM i PLRV. Opracowane testy były tysiąc razy bardziej

czułe niż testy paskowe przy podobnym czasie wykonania.

9. Wyniki uzyskane w ramach realizacji projektu umożliwiły przeprowadzenie przewodu habilitacyjnego kierownikowi projektu.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

- Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014. The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of potato virus Y. *Am. J. Potato Res.*, 91: 525–531. Publikacja oryginalna. MEiN: 70 pkt. IF: 1,085.
- Przewodowska A., Zacharzewska B., Chołuj J., Treder K. 2015. A one-step, real-time reverse transcription loop-mediated isothermal amplification assay to detect potato virus Y. *American Journal of Potato Research*, 92: 303–311. Publikacja oryginalna. MEiN: 70 pkt. IF: 1,085.
- Treder K. Metody wykrywania obecności wirusów ziemniaka. 2015. *Ziemniak Polski*, 4: 18–23. Publikacja przeglądowa. MEiN: 5 pkt.
- Treder K., Zacharzewska B. 2017. Opracowanie nowych starterów do wykrywania wirusa M ziemniaka (Potato virus M, PVM) za pomocą testu RT-PCR. *Ziemniak Polski*, 3: 32–35. Publikacja oryginalna. MEiN: 5 pkt.
- Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Mielczarek M. 2017. Detection of potato virus Y (PVY) by reverse-transcription loop-mediated nucleic acid amplification (RT-LAMP). *Plant Breeding and Seed Science*, 75: 77–85. Publikacja oryginalna. MEiN: 20 pkt.
- Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Babujee L., Mielczarek M., Burzyński A., Rakotondrafara A. 2018. Optimization of a magnetic capture RT-LAMP assay for fast and real-time detection of potato virus Y and differentiation of N and O serotypes. *Arch. Virol.*, 163: 447–458. Publikacja oryginalna. MEiN: 70 pkt. IF: 2,176.

Doniesienia konferencyjne (6 referatów, 11 posterów)

- Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. 2014. Wpływ sposobu izolacji RNA na czułość wykrywania wirusa Y ziemniaka za pomocą RT-PCR. [W:] *Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno*, 15 16.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 63–64. Poster.
- Treder K., Zacharzewska B. 2014. Optymalizacja wykrywania wirusów ziemniaka za pomocą RT-PCR. [W:] *Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno*, 15 16.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 36–37. Referat.
- Przewodowska A., Zacharzewska B., Treder K. 2014. Izotermiczna technika LAMP w diagnostyce wirusów ziemniaka. [W:] *Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno*, 15 16.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 22–23. Referat.
- Chołuj J., Zacharzewska B., Treder K. 2015. Adaptacja izotermicznego testu RT-LAMP do oceny porażenia bulw

- wirusem Y ziemniaka. [W:] XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, Nauka dla Hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych. Streszczenia referatów i posterów. Zakopane, 2–6.02. IHAR-PIB: 171–173. Poster.
- Zacharzewska B., Chołuj J., Treder K. Opracowanie izotermicznego testu RT LAMP do wykrywania wirusów ziemniaka. [W:] XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, Nauka dla Hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych. Streszczenia referatów i posterów. Zakopane, 2–6.02. IHAR-PIB: 217–218. Poster.
- Treder K., Zacharzewska B., Chołuj J. 2015. Zastosowanie izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych w diagnostyce wirusa Y ziemniaka. [W:] XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa, Nauka dla Hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych. Streszczenia referatów i posterów. Zakopane, 2–6.02. IHAR-PIB: 65–68. Referat.
- Treder K., Zacharzewska B., Chołuj J. 2015. Wykrywanie wirusa Y ziemniaka za pomocą izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 13–15.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 50–51. Referat.
- Treder K., Chołuj J., Pawłowska A., Dybner M., 2016. Wykrywanie wirusa Y w bulwach i kielkach ziemniaka. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 11–13.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 45–46. Referat.
- Chołuj J., Zacharzewska B., Treder K. 2016. Izotermiczna amplifikacja kwasów nukleinowych, jako szybki test wykrywania wirusów ziemniaka na przykładzie wirusa PVY. [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 11–13.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 46–47. Referat.
- Zacharzewska B., Treder K. 2016. Opracowanie testu RT-PCR do wykrywania wirusa M ziemniaka [W:] Nasiennictwo i ochrona ziemniaka. Konf. nauk.-szkol. Dźwirzyno, 11–13.05. IHAR ZNiOZ Bonin: 71–72. Poster.
- Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Mielczarek M. 2017. New sensitive assay for the detection of potato leafroll virus by conventional and real-time reverse transcription polymerase chain reaction. (W:) EAPR 20th Triennial Conference, Versailles, 9–10 July. Potato facing global challenges. Keynote lectures and abstracts, P052, p. 227. Poster.
- Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Rakotondrafara A., Babujee L. 2017. Sensitive detection of potato virus Y and differentiation of O and N types by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. (W:) EAPR 20th Triennial Conference, Versailles, 9–10 July. Potato facing global challenges. Keynote lectures and abstracts, P052, p. 223. Poster.
- Treder K., Mielczarek M., Zacharzewska B. 2018. Detection of potato viruses by reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. Plant Biology Europe, June 18–21, Copenhagen, Denmark. Abstr. No. 413. Wyniki z lat 2016 (str. 13–15) i 2017 (str. 1–14). Poster.
- Treder K., Zacharzewska B., Mielczarek M., Chołuj J. 2018. Development of multiplex RT-PCR and real-time RT-PCR assays to detect three potato viruses. Plant Biology Europe, June 18–21, Copenhagen, Denmark. Abstr. No.: 412. Wyniki z lat 2016 (str. 11–13) i 2017 (str. 9–11). Poster.
- Treder K., Pawłowska A., Kaczmarek A., Mielczarek M. 2019. Ion exchange membrane chromatography and gel filtration as tools to investigate plant RNA viruses. RNA 2019. The 24th Annual Meeting of the RNA Society. June 11 – 16, 2019 ICE Kraków Congress Centre, Kraków, Poland. PROGRAM & ABSTRACTS, Poster 864.
- Mielczarek M., Pawłowska A., Kaczmarek A., Treder K. 2019. Colorimetric detection of potato virus Y by Loop-mediated isothermal amplification of nucleic acids (LAMP) as an example of a development point-of-care test for potato viruses. Eurobiotech 2019, Kraków, Poland, 23–25 September 2019. Book of abstracts: Poster P5.3, p. 25.
- Pawłowska A., Mielczarek M. 2019. Detection of the crucial potato viruses in different potato tissues by immunological and molecular methods. Eurobiotech 2019, Kraków, Poland, 23–25 September 2019. Book of abstracts: Poster P5.4, p. 25.

Literatura

- Treder K., Chołuj J., Zacharzewska B., Babujee L., Mielczarek M., Burzyński A., Rakotondrafara A. (2018). Optimization of a magnetic capture RT-LAMP assay for fast and real-time detection of potato virus Y and differentiation of N and O serotypes. *Arch. Virol.*, 163: 447–458.
- Zacharzewska B., Przewodowska A., Treder K. (2014). The adaptation of silica capture RT-PCR for the detection of potato virus Y. *Am. J. Potato Res.*, 91: 525–531.

Badania tolerancji odmian ziemniaka na stresy abiotyczne w świetle postępujących zmian klimatycznych

Drought tolerance of potato cultivars to abiotic stress in relation to climate change

Dominika Boguszevska-Mankowska¹✉, Krystyna Zarzyńska¹, Beata Wasilewska-Nascimento¹, Cezary Trawczyński¹, Krzysztof Treder², Mateusz Mielczarek², Anna Pawłowska², Bogumiła Zacharzewska²

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB

¹Zakład Agronomii Ziemniaka w Jadwisinie

²Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie

✉ e-mail: d.boguszevska-mankowska@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: odmiana, susza glebowa, wysoka temperatura, ziemniak

Stres abiotyczny jest jednym z głównych ograniczeń produkcji roślinnej i bezpieczeństwa żywnościowego na całym świecie. Sytuacja pogorsza się z powodu drastycznych i szybkich zmian klimatu. Upał i susza są niewątpliwie dwoma najważniejszymi stresami mającymi ogromny wpływ na wzrost i wydajność roślin. Bardzo ważne jest zrozumienie zależności fizjologicznych, biochemicznych i ekologicznych związanych z tymi stresami w celu wykorzystania ich w hodowli nowych odmian. Wpływ stresów abiotycznych na produkcję ziemniaków wzrosło w ciągu następnego dziesięciolecia ze względu na zmiany klimatu i rozszerzenie uprawy tej rośliny w warunki suszy/upałów (Hijmanns 2003). Ziemniak jest podatny na suszę (Monneveux i in. 2013) z powodu płytkiego systemu korzeniowego i niskiej zdolności do regeneracji (Iwama i Yamaguchi 2006). Susza zmniejsza wzrost roślin (Deblonde i in. 2001) oraz liczbę i wielkość (Schafleitner i in. 2007) bulw. Wielkość skutków suszy zależy od czasu jej trwania i stopnia nasilenia (Schafleitner 2009). Hodowla ziemniaków odpornych na wysoką temperaturę i suszę jest jednym z najbardziej wykonalnych i praktycznych sposobów radzenia sobie z globalnym ociepleniem. Dobrą wskazówką dla hodowców mogą stanowić informacje o wielkości systemu korzeniowego.

Celem podjętych badań było wytypowanie odmian o różnej wrażliwości na suszę glebową, wysoką temperaturę, poznanie zależności między tolerancyjnością ziemniaka na suszę glebową

i wysoką temperaturę a budową morfologiczną i architekturą systemu korzeniowego, opracowanie metod szybkiego wykrywania enzymów odpowiedzialnych za tolerancyjność ziemniaka na suszę glebową.

Nasze wyniki wskazują, że oba stesy tj. suszy glebowej i wysokiej temperatury powodowały zmiany w morfologii roślin. Susza miała większy wpływ niż stres wysokiej temperatury. Największe zmiany zachodziły jednak przy obu stresach występujących jednocześnie.

Wykazano również różnice odmianowe. Spośród badanych odmian jako tolerancyjne na suszę glebową wytypowano odmiany: Gawin, Tajfun, Gwiazda. Odmiany dobrze tolerujące stres suszy i wysokiej temperatury to: Bojar, Aldona i Laskara.

Dużą rolę w tolerowaniu odwodnienia spełniają aparaty szparkowe. W naszych badaniach stwierdzono zróżnicowanie odmian pod względem ilości ich występowania na górnej i dolnej części blaszki liściowej. Odnotowano dodatnią zależność między ilością występowania aparatów szparkowych na górnej stronie blaszki liściowej a spadkiem plonu.

W ramach projektu badano również wielkość i architekturę systemu korzeniowego. Stwierdzono istotne zróżnicowanie odmian dotyczące zarówno wielkości systemu korzeniowego, jak i jego architektury. Największe różnice w poszczególnych warstwach profilu korzeniowego dotyczyły średnicy korzeni, najmniejsze długości i powierzchni. Stwierdzono również



dotadnią zależność między wielkością systemu korzeniowego a plonem bulw. Wykazano większą zależność między długością i masą korzeni w głębszych warstwach gleby a spadkiem plonu, niż w warstwie najpłytszej. Odmiany bardziej odporne na suszę zareagowały wydłużeniem systemu korzeniowego, podczas gdy u odmian mniej tolerancyjnych długość korzeni pozostawała na tym samym poziomie

U odmian odpornych odnotowano mniejszy spadek średnicy korzeni w warunkach suszy glebowej. Udowodniono, że mniejsze zmiany części nadziemnej roślin ziemniaka spowodowane suszą glebową odzwierciedlają również mniejsze zmiany w systemie korzeniowym (Zarzyńska i in. 2017; Boguszewska-Mańkowska i in. 2020)

Wykazano, że w warunkach suszy glebowej w początkowym okresie rozwoju roślin stosunek root/sprout jest wyższy niż w warunkach optymalnego uwilgotnienia gleby. Zarysowują się również duże różnice odmianowe.

W analizie porównawczej proteomu korzeni ziemniaka u odmiany odpornej na suszę glebową (Gwiazda) zidentyfikowano 18 białek różnicujących rośliny rosnące w warunkach kontrolnych i rośliny poddane suszy glebowej, a u odmiany wrażliwej (Oberon) zidentyfikowano 13 białek. U odmiany Gwiazda zidentyfikowano 21 białek różnicujących rośliny rosnące w warunkach kontrolnych i rośliny poddane stresowi wysokiej temperatury, a u odmiany Oberon 13 białek. W przypadku obu odmian obserwowano zmianę ekspresji białek związanych z metabolizmem energetycznym, stresem, budową ściany komórkowej oraz funkcjonowaniem struktur kwasów nukleinowych. W przypadku odmiany Gwiazda obserwowano zróżnicowaną reakcję w zależności od rodzaju stresu. W warunkach suszy w korzeniach odmiany odpornej Gwiazda zwiększyły ekspresję białka związane z metabolizmem energetycznym z takimi procesami jak glikoliza, glukogenogeneza oraz cykl Calvina, co wydaje się być skutecznym mechanizmem w tolerowaniu odwodnienia (Boguszewska i in. 2020). Ponadto w ramach zadania opracowano mikropłytkowe testy do oznaczania zawartości kwasu L-askorbinowego, polifenoli, L-proliny, chlorofilu, aktywności dysmutazy ponadtlenkowej, reduktazy azotanowej oraz peroksydazy klasy III (Treder 2017 i in.)

Publikacje

Zarzyńska K, Boguszewska-Mańkowska D, Nosalewicz A. (2017). Differences in size and architecture of the potato

cultivars root system and their tolerance to drought stress; Plant, Soil and Environment; 63 (4), 159–164, IF-1,324.

Boguszewska-Mańkowska D, Zarzyńska K, Nosalewicz A. (2020). Drought Differentially Affects Root System Size and Architecture of Potato Cultivars with Differing Drought Tolerance, American Journal of Potato Research 97 (1): 54–62. IF-1,11.

Boguszewska-Mańkowska D, Gietler M, Nykiel M. (2020). Comparative proteomic analysis of drought and high temperature response in roots of two potato cultivars, Plant Growth Regulation, 92 (2): 345–363, IF-2,38.

Rykaczewska K. (2017). Impact of Heat and Drought Stresses on Size and Quality of the Potato Yield. Plant, Soil and Environment 63 (1): 40–46; IF-1,324.

Rykaczewska K, Zarzyńska K, Boguszewska-Mańkowska D. (2018). Architecture of the root system of potato cultivars grown in aeroponics. Electronic Journal of Polish Agricultural Universities. 21 (1) DOI: 10.30825/5. EJPAU.14.2018.21.1

Boguszewska-Mańkowska D. (2016). Biuletyn IHAR, Odporność ziemniaka na suszę glebową i metody oceny 279/2016 s. 65–75.

Łotocka B., Kozak M., Rykaczewska K. (2016). Morphology and anatomy of the root system of new potato cultivars. Part II. Root anatomy. Biuletyn IHAR 279: 31–43.

Treder K, Mielczarek M, Boguszewska-Mańkowska D. (2017). Wpływ suszy na koncentrację l-proliny w wybranych odmianach ziemniaka, Ziemiak Polski; 4, 2017

Literatura

Deblonde P. M. K., Ledent J. F. (2001). Effects of moderate drought conditions on green leaf number, stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars. Eur. J. Agron. 14: 1–41.

Hijmans R. J. (2003). The effect of climate change on global potato production. American Journal of Potato Research, 80: 271–280.

Iwama K., Yamaguchi J. (2006). Abiotic stresses. In: Gopal J, Khurana SM, editors. Handbook of potato production, improvement and postharvest management. New York: Food Product Press. pp. 231–278

Monneveux P., Ramirez D. A., Pino M. T. (2013). Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.) Can we learn from drought tolerance research in cereals? Plant Science, 205–206, 76–86.

Schafleitner R., Rosales R. O. G., Gaudin A., Aliaga C. A. A., Martinez G. N., Marca L. R. T., Bolivar L. A., Delgado F. M., Simon R., Bonierbale M. (2007). Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress. Plant Physiol. Biochem.; 45: 673–690.

Wyróżnianie form ziemniaka o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak przy wykorzystaniu metod konwencjonalnych i molekularnych. Charakterystyka nowego źródła odporności na *Globodera pallida* znalezionej w *Solanum gourlayi*

Selection of potato forms with accumulated resistances to nematodes attacking the potato by using conventional and molecular methods. Characterization of a new source of resistance to *Globodera pallida* found in *Solanum gourlayi*

Dorota Milczarek✉, Anna Podlewska-Przetakiewicz, Bogdan Flis

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: d.milczarek@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: hodowla ziemniaka, odporność, *Globodera* spp., *Solanum gourlayi*, MAS

Cele projektu

1. Wyróżnienie w obrębie ziemniaka o różnych kierunkach użytkowania form o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak (*Globodera rostochiensis* i *G. pallida*) – cel osiągnięto
2. Sprawdzenie możliwości selekcji form odpornych za pomocą markerów molekularnych – cel osiągnięto
3. Poznanie genetycznych uwarunkowań odporności na mątwika agresywnego zaobserwowanej w gatunku *Solanum gourlayi* – cel osiągnięto

Materiały i metody

Materiał badawczy obejmował: (a) 6 populacji 2x pochodzących z wykonanych w ramach tematu krzyżowań spośród których wybrano populację mapującą DW 94–4235 × Sg 2/7 (b) 3 populacje 4x pochodzące z wykonanego w ramach tematu krzyżowania odmiany Innovator, donora genu *GpaV_{vrrn}* nadającego odporność na patotypy Pa2/3 *G. pallida* oraz (c) uzyskane w ramach tematu klony interploidalne

Badane w ramach tematu klony 2x i 4x (w tym interploidy) poddano fenotypowej ocenie odporności na patotypy *Globodera* spp. zgodnie z procedurą EPPO (OEPP/EPPO Biuletyn 2006).

Klony tetraploidalne badano

w doświadczeniach polowych 2016 – 2018 wykonując ocenę plonu i morfologii bulw. Do oceny zastosowano metody opisane w „Metody oceny i selekcji stosowane w pracach genetycznych i hodowli ziemniaka” (Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR, 2001, nr 10).

Ponadto klony tetraploidalne zbadano pod kątem amplifikacji markerów związanych z genami odporności na mątwiki: *H1* (marker 57R), *Gro1–4* (*Gro1–4*) i *GpaV_{vrrn}* (HC) (Finkers-Tomczak i inni 2011, Gebhardt i inni 2006, Sattarzadeh i inni 2006). Dla wybranych klonów wykonano również analizę molekularną obecności fragmentów diagnostycznych markera GP122 genu *Ry-f_{sto}*, warunkującego odporność na wirus Y ziemniaka (Witek i inni 2006) oraz markera NI25 genu *Sen1* (Przetakiewicz i Plich 2017), warunkującego odporność na raka ziemniaka. Ponadto wybrane wyróżniające się klony oceniono pod kątem cech kulinarnych.

Stworzono mapę genetyczną oraz przeprowadzono analizy QTL. Analizy QTL przeprowadzono stosując mapowanie interwałowe. QTL wykrywano przyjmując wartość LOD = 3, za krytyczną. Wykorzystano programy: Van Ooijen JW (2006) JoinMap®4 oraz Van Ooijen JW (2009) MapQTL®6. Następnie z wykorzystaniem bazy danych Spud DB Potato Genomics Resource określono locus w genomie



referencyjnym Potato (*Solanum tuberosum* group *Phureja* DM1–3) PGSC v4.03 Pseudomolecules. Na podstawie wytypowanych sekwencji z wykorzystaniem programu Primer3 (v. 0.4.0) wybrano sekwencje starterów PCR, których selekcyjność w stosunku do wybranej badanej cechy (odporność na patotyp Pa3) weryfikowano w pierwszej kolejności na populacji mapującej, a następnie na klonach pochodzących z krzyżowań interploidalnych oraz wybranej grupie form zgromadzonych w kolekcji IHAR-PIB.

Wyniki

Badany materiał 4x posłużył do zbadania możliwości selekcji polskich materiałów hodowlanych pod kątem odporności na patotypy Pa2/3 *G. pallida* przy użyciu markera HC genu *GpaV_{vrrn}*. Stwierdzono wyraźny związek pomiędzy obecnością markera HC a oceną odporności na patotypy Pa2/3 (dla dokładnego testu Fishera wartość $P < 0.0001$) potwierdzając jego selekcyjność w stosunku do badanej cechy. Zgodność amplifikacji markera HC z oceną odporności na patotypy Pa2/3 *G. pallida* wynosiła 80%.

Materiał 4x zbadano również pod kątem amplifikacji markerów, o potwierdzonej selekcyjności, związanych z genami odporności na mątwiki: *Hl* (marker 57R), *Gro1–4* (Gro1–4). Wykorzystując marker 57R wyselekcjonowano 92 klony 4x posiadające gen *Hl* nadający odporność na patotypy Ro1,4 *G. rostochiensis*. Na podstawie amplifikacji markera Gro1–4 wyselekcjonowano 58 klonów 4x posiadających gen *Gro1–4* nadający odporność na Ro1,5 *G. rostochiensis*. Wybrane, wyróżniające się w ocenie cech jakościowych klony sprawdzono również pod kątem amplifikacji markerów związanych z genami odporności na wirus Y ziemniaka (*Ry-f_{sto}*) i na raka ziemniaka (*Sen1*). Szesć klonów wykazało amplifikację markerów 5 genów odporności: *Hl*, *Gro1–4*, *GpaV_{vrrn}*, *Ry-f_{sto}* i *sen1*.

Materiał 4x badano w doświadczeniach polowych 2016 – 2018. Ocena cech użytkowych wskazuje na dobry poziom plonowania i cech morfologicznych bulw klonów uzyskanych w wyniku krzyżowań form o złożonej odporności na *Globodera* spp. w porównaniu do wykorzystanych w doświadczeniach odmian wzorcowych. Również poziom plonowania oraz cech morfologicznych bulw klonów z markerem i bez markera HC nie różnił się statystycznie. Przeprowadzono także porównanie średnich wartości cech pomiędzy grupą klonów charakteryzujących się amplifikacją markerów genów *Hl*, *Gro1–4* i *GpaV_{vrrn}*. Klony posiadające wszystkie markery charakteryzowały

się najwyższym plonem bulw. Badane klony nie wykazywały różnicowania w ramach pozostałych badanych cech. Klony posiadające markery HC, Gro1–4 i 57R charakteryzowały się dobrym poziomem cech agronomicznych.

Dysponując własnymi diploidalnymi liniami mieszańców z *grl* wyprowadzono w ramach projektu populację mapującą, która posłużyła do stworzenia mapy genetycznej z wykorzystaniem markerów DArTseq. Uzyskana mapa genetyczna liczy 1316 loci i mierzy łącznie 1021 cM. Na podstawie utworzonej mapy przeprowadzono analizę QTL dla odporności na patotypy Pa2 i Pa3 mątwika agresywnego. Uzyskano trzy lokalizacje dla chromosomu XI, kodujące w genomie referencyjnym katalazę, ekspansynę 9 i monoksygenazę, tłumaczące odpowiednio 13,6%, 14,8% i 22,3% obserwowanej zmienności dla odporności na patotyp Pa3 *G. pallida*. Zidentyfikowano marker PCR typu CAPS (trawiony enzymem restrykcyjnym RsaI) dla sekwencji kodującej ekspansynę 9: Exp928, związany z odpornością na patotyp Pa3 *G. pallida* ze źródła *Solanum gourlayi* oraz potwierdzono jego selekcyjność w stosunku do badanej cechy. Zgodność obrazu trawienia produktu amplifikacji markera Exp928 z oceną odporności wynosiła 89%.

W ramach tematu przeprowadzono również program krzyżowań interploidalnych dla wprowadzenia do puli materiałów 4x odporności z *S. gourlayi*. Uzyskano finalnie jeden klon interploidalny Inter-2 o potwierdzonej odporności (Pa2 = st7; Pa3 = st9) wprowadzonej ze źródła *S. gourlayi* (klon Sg2/7).

Wnioski

1. Stwierdzono wyraźny związek pomiędzy obecnością fragmentu diagnostycznego markera HC a odpornością roślin ziemniaka na patotypy Pa2 i Pa3 *G. pallida* w badanej puli materiałów można więc stwierdzić, że marker ten jest przydatnym narzędziem diagnostycznym dla tej cechy.
2. Wyselekcjonowano 6 klonów łączących odporność na patotypy mątwika ziemniaczanego i agresywnego z odpornością na wirus Y ziemniaka i na raka ziemniaka (potwierdzone amplifikacja markerów genów odporności: *Hl*, *Gro1–4*, *GpaV_{vrrn}*, *sen1* i *Ry-f_{sto}*). Wskazuje to na możliwość kreowania materiałów hodowlanych o złożonych opornościach oraz materiałów, które wnoszą odporność na szkodniki od niedawna szerzące się w Europie, jak *G. pallida*.
3. Zidentyfikowano marker PCR typu CAPS

(trawiony enzymem restrykcyjnym RsaI) dla sekwencji kodującej ekspansynę 9: Exp928, związany z odpornością na patotyp Pa3 *G. pallida* ze źródła *Solanum gourlayi* oraz potwierdzono jego selekcyjność w stosunku do badanej cechy (89% zgodności). Uzyskane wyniki sugerują udział ekspansyny 9 w reakcji odpornościowej zaobserwowanej w *Solanum gourlayi*.

4. Uzyskano klon interploidalny Inter-2 o potwierdzonej odporności na patotypy Pa2/3 wprowadzonej ze zmapowanego źródła *S. gourlayi*, co wskazuje na możliwość wprowadzenia odporności z *Solanum gourlayi* na poziom tetraploidalny.

Osiągnięcia projektu

1. Stwierdzono selekcyjność markera HC genu *GpaV_{vrn}* w stosunku do odporności na patotypy Pa2/3 *G. pallida*
2. Wyselekcjonowano sześć klonów z markerami 5 genów odporności: *H1*, *Grol-4*, *GpaV_{vrn}*, *Ry-f_{sto}* i *sen1*
3. Stwierdzono, że selekcja z użyciem markera HC nie ma negatywnego wpływu na poziom cech agronomicznych, oraz że nagromadzenie genów odporności na mątwiki nie wpływa negatywnie na poziom cech agronomicznych. Wyselekcjonowano grupę 12 rodów ziemniaka wysokoodpornych na wszystkie patotypy *Globodera* spp., oraz o dobrych cechach agronomicznych
4. Bazując na danych uzyskanych z analizy DArTseq dla populacji mapującej stworzono mapę genetyczną *Solanum gourlayi*. Uzyskana mapa liczy 1316 loci i mierzy łącznie 1021 cM
5. Przeprowadzono analizę QTL wyznaczając na chromosomie XI loci kodujące ekspansynę 9, oraz uzyskano dla niego marker PCR Exp928, który wykazał zgodność amplifikacji z oceną odporności na patotyp Pa3 *G. pallida*
6. Uzyskano klon interploidalny Inter-2 o potwierdzonej odporności na patotypy Pa2/3 wprowadzonej ze zmapowanego źródła *S. gourlayi*

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Milczarek D., Przetakiewicz A., Flis B. 2017 Odmiany odporne na mątwiki sgresywnego: wykorzystanie markerów molekularnych w hodowli, 50 jubileuszowa konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka”, Dźwirzyno, 7–9.06.2017, Streszczenia: 70.

Milczarek D., Przetakiewicz A., Flis B. 2018. Wykorzystanie technik molekularnych w hodowli odmian ziemniaka odpornych na mątwika agresywnego. 51 Konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka”, 6–8.06.2018, Dźwirzyno, Streszczenia: 49–51.

Publikacje

Milczarek, D., Tatarowska, B., Plich, J., Podlewska-Przetakiewicz, A., Flis, B. (2020). *Solanum gourlayi* – a source of cyst nematode resistance in potato breeding. *Potato Research* 63: 589–595.

Milczarek, D., Podlewska-Przetakiewicz A., Plich, J., Tatarowska, B., Flis, B. The relations of broad nematode resistance to quality characteristics as a consequence of marker-assisted selection in potato breeding programmes. *Breeding Science* (złożone)

Milczarek, D., Podlewska-Przetakiewicz A., Tatarowska, B., Plich, J., Flis, B. Early selection of potato clones with the *GpaV_{vrn}* resistance gene – the relation of nematode resistance to quality characteristics. *Agronomy Journal* (złożone)

Literatura

Gebhardt, C., Bellin D., Henselewski H., Lehmann W., Schwarzfischer J., Valkonen J. P. T. (2006). Marker-assisted combination of major genes for pathogen resistance in potato. *Theoretical and Applied Genetics* 112: 1458–1464.

OEPP/EPPO (2006). Phytosanitary procedures: Testing of potato varieties to assess resistance to *Globodera rostochiensis* and *Globodera pallida*. *OEPP/EPPO Bulletin* 36, 419–420.

Finkers-Tomczak A., Bakker E., de Boer J., van der Vossen E., Achenbach U., Golas T., Sattarzadeh, A., Achenbach U., Lübeck J., Strahwald J., Tacke E., Hofferbert H. R., Rothsteyn T., Gebhardt C. (2006). Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping as bases for developing a PCR-based marker highly diagnostic for potato varieties with high resistance to *Globodera pallida* pathotype Pa2/3. *Mol. Breed.* 18: 301–312.

Przetakiewicz, J., Plich, J. (2017). Assessment of potato resistance to *Synchytrium endobioticum*. *Plant Breeding and Seed Science*, 76 (1), 37–43.

Suryaningrat S., Smant G., Bakker J., Goverse A. (2011). Comparative sequence analysis of the potato cyst nematode resistance locus *H1* reveals a major lack of co-linearity between three haplotypes in potato (*Solanum tuberosum* ssp.). *Theoretical and Applied Genetics*, 122: 595–608

Witek K., Strzelczyk-Żyta D., Hennig J., Marczewski, W. (2006). A multiplex PCR approach to simultaneously genotype potato towards the resistance alleles *Ry-f_{sto}* and *Ns*. *Molecular Breeding* 18: 273–275.

Wyróżnianie i charakterystyka tetraploidalnych form ziemniaka odpornych na wirusy M i S ziemniaka z wykorzystaniem selekcji metodami konwencjonalnymi i markerami molekularnymi

Distinguished and characterization of tetraploid forms of potato resistant on PVM and PVS viruses by using conventional methods and marker assisted selection

Beata Tatarowska✉, Bogdan Flis, Iwona Wasilewicz Flis, Katarzyna Szajko

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: b.tatarowska@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: HR – reakcja nadwrażliwości, odporność, PVM, PVS, *Solanum tuberosum*

Cele prowadzonych badań

- Określenie reakcji form z genem *Rm* lub *Gm* na nowe warianty wirusa M ziemniaka oraz poznanie dodatkowych czynników warunkujących tę odporność w różnych warunkach środowiskowych (temperatura) przy zastosowaniu ilościowych metod molekularnych. W przypadku odporności warunkowanej genem *Rm* określona zostanie zależność między odpornością, a występowaniem reakcji nekrotycznej. Badania te pozwolą na usprawnienie metodyki wyróżniania form odpornych na PVM.
- Ocena wpływu dawki genu *Ns* warunkującego odporność na wirusa S ziemniaka, a w szczególności ocena odporności form typu multipleks pod względem genu *Ns*.
- Wyróżnianie form odpornych na PVM lub PVS z częściowym wykorzystaniem markerów molekularnych.

Materiały i Metody

Wirus M ziemniaka (*Potato virus M*)

Materiał badawczy stanowiły rody tetraploidalne wyselekcjonowane z wcześniej przygotowanych potomstw pod kątem odporności na wirus M ziemniaka. Rody wysadzano w szklarniach i kamerach fitotronowych. Do zakażeń używano izolaty PVM (M-55_a, M-U) pochodzące z kolekcji wirusów ziemniaka w ZGiMWZ w Młochowie. Do oceny odporności stosowano dwie metody inokulacji: mechaniczną i przez szczepienie (Wasilewicz – Flis 2001). Po zakażeniu rośliny

przewożono do kamer fitotronowych z kontrolowaną temperaturą 20°C i 28°C i prowadzono szczegółowe obserwacje fenotypowe testowanego materiału (reakcja HR). Ocena zawartości wirusa w zakażonym materiale oceniano na podstawie zawartość PVM w próbce soku z liści badanych roślin na podstawie odczytów wartości A₄₀₅ w teście Elisa oraz w reakcji real – time PCR dla roślin inokulowanych i ich potomstwa bulwowego. W celu potwierdzenia obecności w badanym materiale form z genem odporności stosowano markery molekularne sprzężone z genami *Rm* (markery GP 283 i GP 250) i *Gm* (marker SC878). Formy z genem *Rm* i *Gm* oraz wzorce prowadzono w warunkach pola doświadczalnego w doświadczeniach ścisłych w celu określenia poziomu cech użytkowych.

Wirus S ziemniaka (*Potato virus S*)

Materiał badawczy stanowiły rody tetraploidalne z genem *Ns*, wyselekcjonowane z wcześniej przygotowanych potomstw pod kątem odporności na wirus S ziemniaka. W celu oceny ekspresji odporności w zależności od dawki genu uzyskano formy tetraploidalne (1) po zastosowaniu kolchicyny na diploidalne formy *Ns* (2) z krzyżowań 4x x 4x (obie formy rodzicielskie odporne na PVS). W celu identyfikacji form odpornych na wirus S ziemniaka przeprowadzono testy fenotypowe (inokulacji mechaniczna i przez szczepienie) oraz analizy molekularne. Do zakażeń używano szczepy PVS (PVS-966 i PVS-Leon) pochodzące z kolekcji wirusów ziemniaka



w ZGiMWZ w Młochowie. Po zakażeniu rośliny przewożono do kamer fitotronowych z kontrolowaną temperaturą 20°C i 28°C. W 6 tygodniu od inokulacji określono zawartość PVS w próbce soku z liści badanych roślin na podstawie odczytów wartości A_{405} w teście ELISA. Siła ekspresji reakcji nekrotycznej w zależności od dawki genu *Ns* oceniano również w reakcji real – time PCR. Selekcję form odpornych na PVS w potomstwie z krzyżowania 4x × 4x prowadzono z użyciem markera molekularnego sprzężonego z genem *Ns* (UBC811). Formy z genem *Ns* oraz wzorce prowadzono w warunkach pola doświadczalnego w doświadczeniach ścisłych w celu określenia poziomu cech użytkowych.

Ustalania dawki genu *Ns* na poziomie DNA przeprowadzono w oparciu o genomową sekwencję markera genu *Ns* o nr akcesyjnym w bazie GeneBank DQ415915.1 w reakcji real time PCR (Witek i in. 2006, Szajko i in. 2008). Badania wykonane zostały na genomowym DNA, które wyizolowano z młodych liści z użyciem gotowych zestawów do izolacji roślinnego DNA opartych na grawitacyjnych membranach jonowymiennych (Genomic Mini AX Plant; A&A Biotechnology, Polska). Stężenie i jakość otrzymanego DNA określono na spektrofotometrze NanoDrop Lite (Thermo Scientific) oraz na 1% żelu agarozowym barwionym bromkiem etydyny. We wszystkich przypadkach otrzymano dobrej jakości, niezdegradowane DNA w ilości ok. 4,8 µg. Próby następnie rozcieńczono i wyrównano do stężenia 0,1 µg/µl. Dla badanego markera DNA allele dominującego genu *Ns* zastosowano startery o sekwencjach: F (5'– 3'): GCAATACATGTATTCTTACTCGG i R (5'– 3'): GACCTATATCAGTCCCTTCTAATCCACTAT. Amplifikują one produkt o długości 489 pz (par zasad).

Wyniki i Wnioski

W ramach projektu poddano szczegółowej ocenie odpornościowej na wirus M ziemniaka 12 rodów należących do 4 populacji potomnych, w których segregował gen *Rm* i 2 populacji, w których segregował gen *Gm*. Porównywano wpływ genotypu, szczepu wirusa i temperatury na poziom porażenia wirusem roślin po zakażeniu mechanicznym i po szczepieniu. Po zakażeniu wykonano ocenę porażenia pierwotnego i wtórnego. Obecność wirusa w roślinach oceniano w testach ELISA i metodą real-time PCR. Uzyskane wyniki dla rodów z populacji z segregującym genem odporności *Rm* z *Solanum megistacrolobum* pozwoliły wyróżnić dwie grupy genotypów:

- Grupa rodów temperaturo zależnych, dla których temperatura inkubacji roślin po sztucznej inokulacji PVM miała istotny wpływ na reakcję odpornościową testowanych roślin.
- Grupa temperaturo niezależnych rodów, dla których nie stwierdzono wpływu temperatury inkubacji roślin po zakażeniu, na reakcję odpornościową testowanych roślin.

Bazując na wynikach dla tych dwóch grup wyciągnięto następujące wnioski:

- W temperaturze 20°C dla części rodów ocenianych w doświadczeniach szczegółowych obserwowano namnażanie się wirusa w komórkach roślinnych, potwierdzone zarówno testami serologicznymi ELISA jak i testem z użyciem real-time PCR. W roślinach tych rodów inkubowanych w temperaturze 28°C obserwowano pełną odporność (brak wirusa w roślinach).
- Stwierdzono, że reakcja nadwrażliwości (HR) nie jest szczepowo specyficzna i nie jest związana z odpornością (namnażaniem wirusa).
- Reakcję nadwrażliwości w postaci top-nekrozy (nekrotyzacja całego nowego pędu podszczepionego), obserwowano tylko w przypadku rodów odpornych, zaklasyfikowanych do grupy rodów temperaturo niezależnych po inokulacji roślin przez szczepienie.

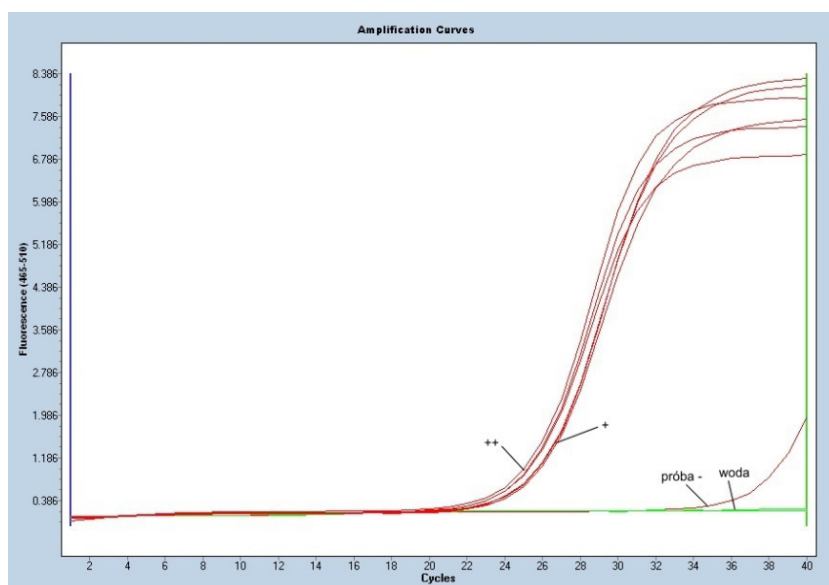
Odporność na PVM pochodząca od *Solanum gourlayi* przejawiała się w szerokiej skali temperatur, nie zależała od szczepu wirusa użytego do zakażeń oraz związana była ze zjawiskiem tolerancji (brak objawów fenotypowych na roślinach i brak spadku wigoru roślin).

W ramach projektu stworzona została kolekcja obejmująca 268 rodów wysoko odpornych na wirus M ziemniaka, pochodzących z sześciu populacji tetraploidalnych z segregującym genem *Rm* i *Gm*. Genotypy te zostały szczegółowo przebadane pod kątem odporności na PVM w testach laboratoryjnych. Ocena tych rodów obejmowała ocenę porażenia pierwotnego i wtórnego. Dodatkowo rody te zostały scharakteryzowane pod kątem cech morfologicznych i wad zewnętrznych bulw. Dla potwierdzenia obecności genu *Rm* w rodach odpornych wykorzystano markery selekcyjne *GP* – 250 i *GP* – 283 (Marczewski i in. 2006). Rody znajdujące się w kolekcji posiadają jeden lub oba markery. Kolekcja rodów odpornych na wirus M ziemniaka stanowi doskonały zestaw genotypów, który może zostać wykorzystany w kolejnych latach przez hodowców w ich programach hodowlanych. Powstała również kolekcja obejmująca 125 rodów odpornych na wirus S ziemniaka, pochodzących z dwóch populacji tetraploidalnych

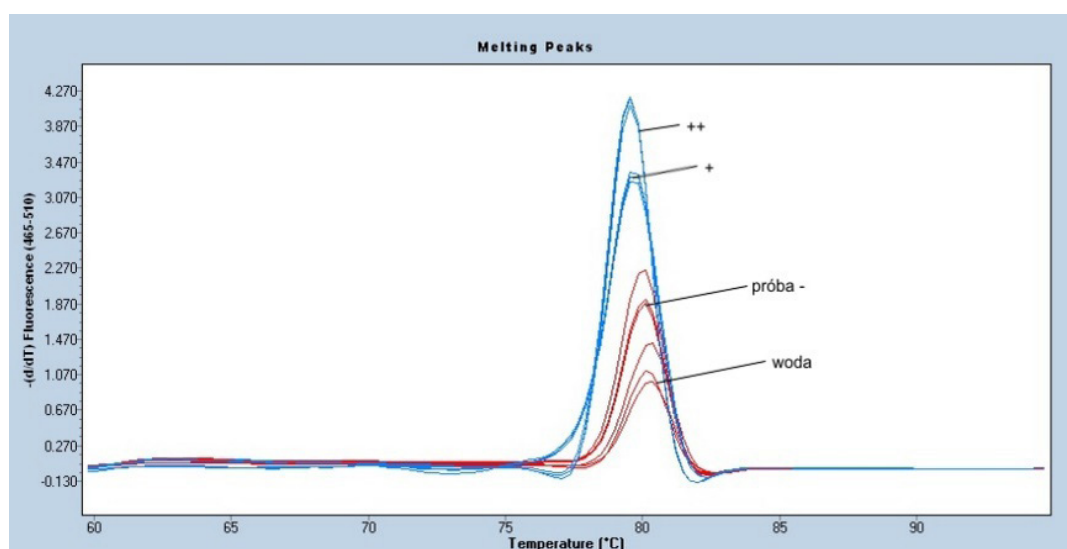
z segregującym genem *Ns* z uprawnego gatunku *S. tuberosum* subsp. *andigena*. Ocena tych rodów obejmowała ocenę porażenia pierwotnego i wtórnego. Dodatkowo rody te zostały scharakteryzowane pod kątem cech morfologicznych i wad zewnętrznych bulw. Dla potwierdzenia obecności genu *Ns* w rodach odpornych wykorzystano marker selekcyjny UBC 811 (Marczewski 2001).

W ramach projektu oceniono pod kątem odporności na wirus PVS rody z nieselekcjonowanej populacji *Ns*-II, pochodzące z krzyżowań mających na celu uzyskanie w potomstwach form o zwiększonej dawce genu *Ns*. Obserwowana w populacji *Ns*-II segregacja odporności rodów (3 : 1) wskazywała,

że formy rodzicielskie są heterozygotami typu simpleks pod względem genu *Ns*. Do oceny rodów pod względem dawki genu *Ns* zastosowano technikę real – time PCR, z wykorzystaniem barwnika EvaGreen® (rys. 1 i 2). Wśród ocenianych odpornych na PVS rodów potomnych wyróżniono 42 formy typu dupleks i 8 form typu simpleks. Fenotypowa ocena ich odporności nie pozwoliła stwierdzić, że istnieją różnice w poziomie odporności na PVS pomiędzy formami simpleks i dupleks. Zatem nie jest uzasadnione identyfikowanie form typu dupleks (lub multipleks) pod względem genu *Ns*, gdyż rody odporne typu simpleks charakteryzują się pełną odpornością na PVS.



Rys. 1. Krzywa amplifikacji produktów reakcji real – time PCR, z wykorzystaniem barwnika EvaGreen®: (+) forma typu simpleks, (++) forma typu dupleks, (próba –) forma podatna.



Rys. 2. Krzywa topnienia produktów reakcji real – time PCR, z wykorzystaniem barwnika EvaGreen®: – niebieskie linie odpowiadają temperaturze topnienia badanego produktu PCR w próbie, – czerwone linie obrazują krzywą topnienia produktu niespecyficznego dla rodu podatnego (próba –) i wody.

Osiągnięcia projektu

1. Stworzenie kolekcji obejmującej 268 rodów 4x wysoko odpornych na wirus M ziemniaka, pochodzących z sześciu populacji tetraploidalnych z segregującym genem *Rm* z *Solanum megistacrolobum* i *Gm* z *Solanum gourlayi*.
2. Wyróżnienie rodów 4x temperaturo zależnych, dla których temperatura inkubacji roślin po sztucznej inokulacji PVM miała istotny wpływ na reakcję odpornościową testowanych roślin.
3. Stworzenie kolekcji obejmującej 125 rodów odpornych na wirus S ziemniaka, pochodzących z dwóch populacji tetraploidalnych z segregującym genem *Ns* z uprawnego gatunku *S. tuberosum subsp. andigena*.
4. Zidentyfikowanie form typu dupleks i multipleks pod względem genu *Ns* i uzyskanie informacji, iż nie jest uzasadnione tworzenie form typu dupleks (lub multipleks) pod względem genu *Ns*, gdyż rody odporne typu simpleks charakteryzują się już pełną odpornością na PVS.

Wykaz publikacji**Publikacje**

Tatarowska B., Milczarek D., Plich J., Flis B. 2016. Reakcja na wirus M ziemniaka (PVM) tetraploidalnych rodów ziemniaka. *Biuletyn IHAR* nr. 280, 23–33

Tatarowska, B., Plich, J., Milczarek, D., Flis, B. 2020. Temperature-dependent resistance to potato virus M in potato (*Solanum tuberosum*). *Plant Pathology*, 69(8), 1445–1452.

Wykłady, seminaria, doniesienia konferencyjne, szkolenia dla rolników

Konferencja naukowa w Zakopanem „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” – poster 2x

Konferencja naukowo – szkoleniowa w Dźwirzynie k. Kołobrzegu – „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” – poster 3x, 1x referat

Szkolenia dla rolników – 2x

Streszczenia z konferencji, szkolenia

Tatarowska B. 2015. Źródła odporności na wirus M ziemniaka w tetraploidalnych rodach ziemniaka. 48 konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka”, 13–15.05.2015, Dźwirzyno, Streszczenia: 94–96 (poster)

Tatarowska B., Flis B., Wasilewicz-Flis I. 2015. Odporność na wirus M ziemniaka (PVM) pochodząca od *Solanum megistacrolobum* w tetraploidalnych rodach ziemniaka. XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, 2–6.02.2015,

Zakopane, Streszczenia: 362–363 (poster)

Tatarowska B., Flis B., Wasilewicz-Flis I. 2017. Wykorzystanie metody Real-Time PCR do identyfikacji wirusa M ziemniaka w roślinie. 50 jubileuszowa konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i Ochrona Ziemniaka”, Dźwirzyno, 7–9.06.2017, Streszczenia: 61 (poster)

Tatarowska B., Flis B., Wasilewicz-Flis I. 2018. Wpływ genotypu, szczepu wirusa i temperatury na reakcje odpornościową roślin zakażonych wirusem M ziemniaka. 51 Konferencja naukowo-szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka”, 6–8.06.2018, Dźwirzyno, Streszczenia: 22–23 (referat)

Tatarowska B., Flis B., Wasilewicz-Flis I. 2019. Ocena wpływu różnych źródeł zmienności na reakcję odpornościową rodów ziemniaka mających w swym pochodzeniu odporność na PVM pochodzącą z dzikiego gatunku *Solanum megistacrolobum* Konferencja Naukowa w Zakopanem „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych” 5 – 8.02.2019, Streszczenia 339–341. (poster)

Tatarowska B., Flis B., Wasilewicz-Flis I. 2019. *Solanum gourlayi* jako źródło odporności na PVM w tetraploidalnych rodach ziemniaka. Udział w 52 Konferencji naukowo-szkoleniowej: „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka”, Dźwirzyno, 22–24.05.2019, Streszczenie 339–341. (poster)

B. Tatarowska 30.06.2017, szkolenie dla pracowników WIORiN Poznań i Lublin „Wirus M ziemniaka” Młochów (17 osób)

B. Tatarowska 06.2018, dla pracowników WIORiN Poznań i Lublin „Wirus M ziemniaka” Młochów (20 osób)

Literatura

Baerecke M. L. (1967). Überempfindlichkeit gegen das S-Virus der Kartoffel in einem bolivianischen Andigena-Klon. *Züchter* 37: 281–286.

Brunt A. (2001). Potato virus S (PVS; Genus Carlavirus). [W]: Loebenstein G., Berger P. H., Brunt A.A., Lawson R.H. (eds). *Virus and virus like diseases of potatoes and production of seed-potatoes*. Kluwer Acad. Publ.: 109–112.

Chrzanowska M. (2000). Krańcowa odporność na wirusy Y i X ziemniaka oraz polowa odporność na wirus S ziemniaka w polskich odmianach ziemniaka. *Biul. IHAR* 214: 231–238.

Dziewońska M. A., Wawrzyczek M. (1991). Synteza ziemniaków odpornych na wirusy – dorobek i perspektywa. [W]: *Synteza materiałów wyjściowych dla hodowli ziemniaka – dorobek i perspektywa*. Mater. z Konf. Inst. Ziemn. Bonin: 17–27.

Kostiw M. (2011). Ocena zagrożenia plantacji nasiennych ziemniaka przez choroby wirusowe. *Więś Jutra* 150/151: 27–29.

Marczewski W. (2001). Inter-simple sequence repeat (ISSR) markers for the *Ns* resistance gene in potato (*Solanum tuberosum* L.). *Journal of applied genetics*, 42(2), 139–144.

- Marczewski W., Strzelczyk-Żyta D., Hennig J., Witek K., Gebhardt C. (2006). Potato chromosomes IX and XI carry genes for resistance to potato virus M. *Theoretical and applied genetics*, 112(7), 1232–1238.
- Miętkiewska E. (1999). Współdziałanie dwóch typów odporności na wirus M ziemniaka (PVM), pochodzący od *Solanum gourlayi* i *S. megistacrolobum* w ziemniakach tetraploidalnych. *Biul. IHAR* 209: 125–135.
- Świeżyński K. M., Dziewońska M. A., Ostrowska K. (1981). Inheritance of the resistance to Potato Virus M found in *Solanum gourlayi* Haw. *Genet. Pol.* 22:1–8.
- Treder K. (2015). Metody wykrywania obecności wirusów ziemniaka. *Ziemniak Polski* 4: 18 – 23.
- Waś M., Dziewońska M.A., Ostrowska K., Kowalska A. (1980). Reaction of *Solanum gourlayi* and its hybrids with *S. tuberosum* to Potato Virus M(PVM). *Phytopath. Z.* 97: 186–191.

Analiza interakcji genotypowo-środowiskowej w odniesieniu do wybranych cech użytkowych ziemniaka jadalnego w różnych systemach uprawy

Analysis of genotype by environment interaction for selected traits of table potato in various cultivation systems

Bogdan Flis✉, Beata Tatarowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: b.flis@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: cechy kulinarne, interakcja genotypowo-środowiskowa, plon bulw, stabilność, zawartość skrobi, ziemniak

Cel

Celem badań była ocena wpływu interakcji genotypowo-środowiskowej na kształtowanie zmienności, która powstaje w odpowiedzi na zmieniające się środowisko uprawy. Ocena dotyczyła wybranych cech jakości istotnych dla ziemniaka jadalnego (smak, wady bulw, ciemnienie miąższu bulw) oraz cech związanych z kształtowaniem się plonu. Analiza interakcji genotypowo-środowiskowej pozwoli na: (a) ocenę udziału czynników genetycznych, środowiskowych i interakcyjnych w kształtowaniu poszczególnych cech oraz (b) oszacowanie stopnia stabilności ekspresji cech kulinarnych w ziemniaku jadalnym o zróżnicowanym pochodzeniu.

Material i Metody

Przeprowadzono dwie serie doświadczeń polowych, w których oceniano wybrane cechy łącznie dla 60 rodów ziemniaka i 14 odmian. W każdej serii doświadczenia prowadzono przez trzy lata w dwóch lokalizacjach z uprawą tradycyjną (środowisko tradycyjne) oraz w jednej lokalizacji z uprawą ekologiczną (środowisko ekologiczne). Doświadczenia prowadzono w układzie bloków losowanych (trzy bloki) z 7 krzakowymi poletkami. Oceny rodów/odmian prowadzono pod kątem plonu bulw (w kg/krzak), procentowej zawartości skrobi w bulwach oraz cech ocenianych w skali tj. smaku i ciemnienia miąższu bulw gotowanych oraz nasilenia wad zewnętrznych.

Analizy statystyczne obejmowały analizę wariancji, w której oceniano wpływ rodów/

odmian (G), miejscowości i lat (te efekty i ich interakcje są dalej opisywane jako E) oraz interakcji genotypowo środowiskowej GE na poziom badanych cech. W prezentowanym komunikacie przez środowisko rozumie się każdą kombinację miejscowości i roku badań. Oceny zmienności badanych cech prowadzono łącznie dla wszystkich środowisk, natomiast analizy stabilności prowadzono oddzielnie dla środowisk z uprawą tradycyjną i ekologiczną. W przypadku plonu stabilność badanych genotypów określano stosując wariancję środowiskową i współczynnik zmienności (Francis i Kanenberg 1978), wariancję stabilności (Shukla 1972), współczynnik stabilności AMMI (ASV) (Gauch 20006, Purchase i in. 2000) oraz statystyki F dla efektu interakcji GE wg modelu Scheffe-Calińskiego (Fgxe) (Mądry i Kang 2005). Związki pomiędzy miarami stabilności oceniono stosując korelację porządkową.

Do oceny wpływu systemu uprawy (środowiska) na liczebność genotypów stabilnych pod względem cech jakościowych stosowano test Fishera.

Wyniki

Plon bulw

Zmienność plonu podlegała głównie efektem środowiskowym (E = miejscowość i rok i ich interakcja). Natomiast efekt interakcji GE, podobnie jak efekt G, miały znacznie mniejsze znaczenie w kształtowaniu zmienności plonu.

Do wyróżniania genotypów stabilnych użyto pięciu miar. Miary te wyróżniały genotypy stabilnie plonujące ze zróżnicowaną częstością. Miary związane ze stabilnością rolniczą (tj. ASV,



wariancja stabilności, statystyka F_{gxe}), opisujące z reguły udział poszczególnych genotypów w interakcji GE, pozwalały identyfikować genotypy stabilne z większą częstością w warunkach środowisk z uprawą tradycyjną w porównaniu do środowisk ekologicznych. W tych ostatnich częstość ta wynosiła 0,43 – 0,68 w przypadku rodów oraz 0 – 0,22 w przypadku odmian, a w środowiskach tradycyjnych częstości te wynosiły 0,54 – 0,93 dla rodów i 0,22 – 0,67 dla odmian.

Związki między parametrami opisano za pomocą współczynników korelacji porządkowej oraz jako procent genotypów, którym porównywane pary parametrów (miar) przypisywały tę samą ocenę, tj. stabilność lub jej brak. Współczynniki korelacji porządkowej pomiędzy wartościami użytych parametrów dla jednego typu środowiska wahały się w szerokim zakresie: od braku korelacji do bardzo silnego związku. Podobnie zmienny charakter miała zgodność w typowaniu genotypów stabilnych przez różne miary wyrażona jako procent zgodnie ocenionych form. Zgodność ta była z reguły umiarkowana (spośród wszystkich dziesięciu porównań w każdym rodzaju środowisk, w pięciu zgodność wyniosła 60–80%), a w trzech porównaniach można było uznać zgodność za znaczną (wynosiła 81–90%). Zgodność w typowaniu genotypów stabilnych w obu rodzajach środowisk z użyciem tej samej miary wahała się od braku zgodności (mniej niż 50% genotypów zgodnie ocenionych) do umiarkowanej zgodności (ok. 80% zgodnie ocenionych genotypów).

Zarówno współczynniki korelacji jak i procent zgodnie ocenionych genotypów wahały się w szerokim zakresie. Trudno jest w związku z tym wybrać parametr statystyczny, który najsukcesyjniej identyfikuje genotypy stabilnie plonujące. Dlatego często proponuje się typowanie stabilnych genotypów na podstawie jednoczesnego użycia kilku miar (Ukalska i in. 2011), uznając za najbardziej stabilne te formy, dla których stabilność była wskazywana przez jak największą liczbę miar. Stosując takie podejście stwierdzono, że w obu rodzajach środowisk genotypy, których stabilność jest wskazywana przez 3–5 miar, charakteryzują się istotnie niższym plonem niż genotypy uznane za mniej stabilne lub niestabilne, tj. takie dla, których liczba miar wskazujących stabilność wahała się w zakresie 0–2.

Stwierdzono wyraźny związek pomiędzy plonem uzyskiwanym przez badane rody w środowiskach z uprawą tradycyjną a plonem uzyskiwanym w środowiskach z uprawą ekologiczną. Otrzymane współczynniki regresji wskazują, że średni plon

uzyskiwany w warunkach ekologicznych był w przybliżeniu o ponad połowę niższy od średniego plonu w uprawie tradycyjnej. Jednocześnie dość wysokie współczynniki determinacji $R^2 \approx 0,7 - 0,8$ (w zależności od serii doświadczeń) wskazują, że na podstawie wysokości plonu w warunkach tradycyjnych można dość dokładnie przewidzieć wysokość plonu ekologicznego.

Zawartość skrobi

Na podstawie łącznej analizy wariancji dla zawartości skrobi stwierdzono, że efekt interakcji GE był równie niewielki jak w przypadku plonu, natomiast dominującym był efekt G (w przeciwieństwie do plonu).

Do oceny stabilności zastosowano dwie miary związane ze stabilnością biologiczną (statyczną), tj. wariancję środowiskową i współczynnik zmienności środowiskowej. Ten ostatni parametr identyfikował jako stabilne nieco ponad połowę badanych genotypów, a użycie wariancji środowiskowej pozwoliło wyróżnić 58–67% badanych genotypów, przy czym więcej genotypów stabilnych wyróżniano w środowiskach ekologicznych. Zgodność w wyborze genotypów stabilnych w obu środowiskach była zadawalająca (50–70% genotypów uznano za stabilne wg obydwu parametrów w obydwu środowiskach), ale współczynnik korelacji porządkowej pomiędzy wartościami parametrów z dwóch rodzajów środowisk był niski i nieistotny statystycznie. Obydwa te wskaźniki (tj. procent genotypów i współczynniki korelacji) wskazują, że identyfikacja genotypu stabilnego pod względem zawartości skrobi silnie zależy od rodzaju uprawy, a małe wahania skrobi stwierdzone w konkretnym rodzie w jednym środowisku nie oznaczają, że w innym będą również niewielkie. W warunkach uprawy ekologicznej stwierdzono, że genotypy z małymi wahaniami w zawartości skrobi (nieprzekraczającymi 1% zawartości) obserwowano częściej, niż w warunkach środowisk z uprawą tradycyjną, gdzie przeważały genotypy z wahaniami skrobi w zakresie 1–3% oraz powyżej 3%.

Cechy jakości bulw

W przypadku cech jakościowych stwierdzono, że ich zmienność podlegała przede wszystkim znacznym wpływom genotypu (znacznie większym niż w przypadku plonu bulw) oraz dużemu wpływowi interakcji GE. Efekt interakcji był znacznie większy niż w przypadku plonu bulw i zawartości skrobi (choć w przypadku smaku nie był statystycznie istotny). Zmienność cech jakościowych

w znacznie mniejszym stopniu niż w przypadku plonu bulw była warunkowana łącznym wpływem miejscowości, lat i ich interakcji.

Porównanie średnich wartości tych cech wskazuje, że w warunkach środowisk ekologicznych oceny były wyższe (lepsze) od ocen otrzymanych dla bulw ze środowisk z uprawą tradycyjną, zwłaszcza dla ciemnienia bulw gotowanych i nasilenia wad (różnice pomiędzy ocenami tych cech ze środowisk ekologicznych i tradycyjnych były istotne statystycznie).

Stabilność cech jakościowych oceniono stosując określone kryteria podziału na formy stabilne i niestabilne. Przyjęto, że dla rodzaju/odmiany stabilnej zarówno najniższa średnia ocena uzyskana w konkretnym środowisku (miejscowości i roku) oraz średnia ze wszystkich środowisk powinna przekraczać określone wartości. Wyróżnianie form stabilnych przeprowadzono oddzielnie dla rodzajów i odmian. Stwierdzono, że rodzajów stabilnych pod względem małej intensywności wad bulw, słabego ciemnienia i dobrego smaku można wyselekcjonować istotnie więcej w warunkach uprawy ekologicznej. W przypadku odmian (grupa o znacznie mniejszej liczebności w stosunku do rodzajów) takich różnic nie obserwowano, choć w środowiskach ekologicznych częściej przyznawano badanym odmianom oceny wyższe (lepsze). Uwidacznia się to szczególnie w przypadku wad bulw – liczba odmian stabilnie niewykazujących wad w środowiskach ekologicznych była „prawie” istotnie wyższa ($p=0,06$) od tej stwierdzonej w środowiskach tradycyjnych.

Wnioski

1. Uprawa ekologiczna tworzy środowisko, w którym interakcja GE wpływa na poziom badanych cech w sposób odmienny od wpływu w warunkach upraw tradycyjnych.
2. Doświadczenia w wielu środowiskach mogą mieć większe znaczenie dla selekcji prowadzonej pod kątem wysokiego i stabilnego poziomu cech jakościowych, niż dla selekcji rodzajów pod kątem wysokiego plonu.
3. Zastosowane parametry stabilności wykazują niewielką przydatność w selekcji form plennych – identyfikują jako stabilne głównie genotypy plonujące słabiej niż genotypy niestabilne.

4. Odmianę przydatną do upraw ekologicznych można wyselekcjonować w warunkach uprawy tradycyjnej (biorąc pod uwagę badane cechy). Natomiast selekcjonowanie rodzajów w warunkach hodowli ekologicznej może prowadzić do otrzymania odmian przeznaczonych tylko do upraw ekologicznych.

Osiągnięcia projektu

Praktycznym osiągnięciem projektu jest otrzymanie rodzajów ziemniaka, które pod względem właściwości kulinarnych oraz morfologii bulw nie ustępują odmianom. Plon wybranych rodzajów jest nieco niższy od plonu odmian stosowanych w zadaniu.

Wykaz publikacji

Publikacje

Publikacja pt. „Effect of cultivation system on selection of potatoes breeding lines for yield and quality traits” (złożona do Potato Research).

W przygotowaniu publikacja nt. wykorzystania różnych parametrów do identyfikacji stabilnie plonujących rodzajów ziemniaka (Biuletyn IHAR).

Literatura

- Francis T. R., Kannenberg L. W. (1978). Yield stability studies in short-season maize. I. A descriptive methods for grouping genotypes. *Canadian Journal of Plant Sciences* 58: 1029 – 1034.
- Gauch H. G. (2006). Statistical analysis of yield trials by AMMI and GGE. *Crop Science* 46 (4): 1488–1500.
- Mądry W., Kang M.S. (2005). Scheffé-Caliński and Shukla models: Their interpretation and usefulness in stability and adaptation analyses. *Journal of Crop Improvement* 14 (1-2): 325–369.
- Purchase J. L., Hatting H., Van Deventer C.S. (2000). Genotype \times environment interaction of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in South Africa: II. Stability analysis of yield performance. *South African Journal of Plant and Soil* 17 (3): 101–107.
- Shukla G. K. (1972). Some statistical aspects of partitioning genotype-environmental components of variability. *Heredity* 29: 237 – 245.
- Ukalska J., Śmiałowski T., Ukalski T. (2011). Porównanie parametrycznych i nieparametrycznych miar stabilności na podstawie wyników doświadczeń wstępnych z żytem ozimym. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 260/261: 263 – 272.

Eliminacja patogenów niekwwarantannowych (bakterie endogenne i wirusy) oraz kontrola zdrowotności roślin ziemniaka w banku *in vitro*

Elimination of non-quarantine pathogens (viruses and endophytic bacteria) and control of Potato plantlets healthiness in the *in vitro* bank

Dorota Michałowska✉, Danuta Sekrecka, Włodzimierz Przewodowski, Sławomir Wróbel, Anna Krzewińska, J. Downar-Zapolska, Tomasz Erlichowski, J. Piskorz, Agnieszka Przewodowska, Paulina Buryło, Oksana Olejnik, Paulina Gierszewska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Oddział w Boninie
✉ e-mail d.michalowska@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: bakterie endogenne, biocydy, chemioterapia, *in vitro*, termoterapia, ziemniak.

W latach 2014–2020 w ramach zadania 63 prace realizowano w postaci dwóch tematów badawczych: (I) Opracowanie metod skutecznego uwalniania od wirusów genotypów wprowadzanych do Banku Genów *in vitro* ziemniaka oraz (II) Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka.

Cele prowadzonych badań, które zostały osiągnięte:

- Uwolnienie wybranych genotypów ziemniaka od wirusa PVS, PVM i PVY przy zastosowaniu termoterapii i izolacji merystemów;
- Przebadanie skuteczności kilku substancji antywirusowych w uwalnianiu roślin *in vitro* ziemniaka od wirusów PVS, PVM i PVY przy zastosowaniu chemioterapii;
- Przebadanie skuteczności kilku preparatów bakteriobójczych w zwalczaniu zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* wybranych genotypów ziemniaka;
- Przebadanie trwałości efektu bakteriobójczego PPM™, ProClin 300® w kolejnych pasażach roślin *in vitro*;
- Sprawdzenie wpływu preparatów bakteriobójczych na tworzenie mikrobulw w procesie mikrotuberyzacji wybranych genotypów ziemniaka.

Material i Metody

Termoterapia (I)

Bulwy odmian ziemniaka porażone wirusem PVS, PVM i PVY wysadzono do doniczek z substratem torfowym i po wschodach umieszczono w komorze termoterapijnej. Przez okres 6–8 tygodni rośliny poddane zostały działaniu wysokiej temperatury: 37°C w dzień i 33°C w nocy, przy oświetleniu ok. 10 W·m² z zachowaniem fotoperiodu 16/8h. W 5 tygodniu trwania termoterapii pobrano z roślin pąki kątowe i szczytowe, z których następnie izolowano merystemy (0,1–0,4 mm). Proces regeneracji merystemów jest długotrwały, dlatego pierwsze rośliny *in vitro* uzyskano po ok. 6 miesiącach. Wysadzono je do doniczek z substratem torfowym, a następnie, po ok. 4 tygodniach, badano testem DAS ELISA na obecność wirusów.

Chemioterapia (I)

Rośliny *in vitro*, u których testem DAS ELISA stwierdzono wysokie porażenie wirusami PVS, PVM i PVY poddano działaniu substancji antywirusowych: rybawiryny, zieleni malachitowej, azacytydyny i tiouracylu. Jednowęzłowe fragmenty roślin *in vitro* umieszczono pojedynczo w probówkach zawierających 2–3 ml pożywki MS (Murashige, Skoog) zestalonej agarem (0,4%) z dodatkiem substancji antywirusowych. Co 7 dni analizowano wzrost i rozwój roślin



in vitro, a następnie wysadzono je do doniczek z substratem torfowym. Po 3–4 tygodniach wyrosłe sadzonki przebadano testem DAS ELISA na obecność wirusów.

Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka (II)

Materiał badawczy stanowiły rośliny in vitro odmian pozyskane z banku genów in vitro ziemniaka, w których stwierdzono zanieczyszczenia bakteryjne. Z preparatów dostępnych na rynku wybrano: Plant Preservative Mixture™ (PPM™), ProClin300®, Nitrofurazone, Citrosept, azotan srebra (Ag NO₃) oraz podchloryn sodu NaClO. Preparaty te są stosowane z powodzeniem w kulturach in vitro innych gatunków roślin, brakuje jednak informacji na temat stosowania ich w kulturach in vitro ziemniaka. Jednowęzłowe eksplantaty przeszczepiano do pojemników na pożywkę MS (Murashige, Skoog) z dodatkiem wybranych preparatów bakteriobójczych. Następnie prowadzono obserwację kultur – sygnałem świadczącym o obecności bakterii w kulturach in vitro jest nieznaczne zmętnienie pożywki pod wyszczepionym eksplantatem oraz pojawiające się wodniste „halo” wokół eksplantatu.

Wyniki

Termoterapia (I)

Przez lata wielu badaczy próbowało znaleźć sposób na wyeliminowanie wirusów z roślin. Już w 1952 r. ukazały się w literaturze pierwsze informacje o tym, że wirusy mogą w mniejszym stopniu infekować wierzchołki, a wyizolowane z nich merystemy mogą być od nich wolne (Morel, Martin 1952). Zjawisko eliminacji wirusów w całych roślinach pod wpływem wysokiej temperatury po raz pierwszy zostało opisane przez amerykańskiego badacza L. O. Kunkela (1936). Kolejne badania wykazały, że liczba roślin wolnych od wirusa wzrasta proporcjonalnie wraz z temperaturą oraz czasem trwania termoterapii (Biniam, Tedesse 2008). Jednocześnie zmniejsza się liczba eksplantatów, które po zakończeniu terapii są zdolne do regeneracji (Zaklukiewicz 1982, Ali i in. 2013). Nasze badania wykazały, że termoterapia roślin wyrosłych z porażonych wirusami bulw pozwala na izolację silniejszych merystemów i w rezultacie wyższy procent (o 20–40%) uzyskanych roślin in vitro niż izolacja z porażonych wirusami roślin in vitro. Najkorzystniejszym terminem przeprowadzenia procesu jest maj-wrzesień (styczeń 1,85%, luty 4,22%, maj 15%, wrzesień 30% zregenerowanych roślin). Łatwiej

uzyskać rośliny z merystemów większych mających większą liczbę zawiązków liści (2 – 4), niż z małych (tylko kopuła merystematyczna). Jednak z większych eksplantatów trudniej uzyskać rośliny wolne od wirusów. Izolowanie z 2–4 zawiązkami liści zalecane jest jedynie w przypadku wprowadzenia do banku zdrowego i sprawdzonego testem genotypu. Na uzyskanie roślin wolnych od wirusa PVS, PVM i PVY poddanych termoterapii i izolacji merystemów duży wpływ ma czynnik osobowy (w zależności od wykonawcy uzyskano od 24% do 34% roślin wolnych od PVS, od 43% do 52% roślin wolnych od PVM i od 78% do 85% roślin wolnych od PVY). Duży problem w uwalnianiu stwarzają wirusy PVS i PVM, z kolei PVY jest wirusem, który łatwo uwalnia się pod wpływem działania wysokiej temperatury. Duże znaczenie ma precyzyjne cięcie eksplantatów, szybkie umieszczenie ich na pożywkę w taki sposób, aby powierzchnia ciecica przylegała do podłoża.

Chemioterapia (I)

Antymetabolity stosowane w chemioterapii są to analogi nukleotydów, o wysokiej aktywności przeciwwirusowej, włączające się w metabolizm wirusów i wywołujące zmiany w kodzie genetycznym, hamując tym samym ich namnażanie (Malepszy 2001). Dodanie do pożywek substancji antywirusowych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych, dlatego konieczne było eksperymentalne wybranie odpowiedniego antymetabolitu i ustalenie jego stężenia w odniesieniu do roślin in vitro ziemniaka. Wraz ze zwiększeniem ich stężenia w pożywkę następuje proporcjonalny wzrost liczby roślin wolnych od wirusów po zakończeniu terapii, ale zmniejsza się liczba roślin zdolnych do regeneracji (Nasir i in. 2010, Mahmoud i in. 2009). W naszych badaniach w zależności od zastosowanego biocydu eliminacja bakterii endogennych była zróżnicowana.

1. Rybaviryna
 - zastosowana dawka 50 mg/l działa fitotoksycznie na wyszczepione eksplantaty ziemniaka;
 - dawki 30 – 40 mg/l zmniejszają koncentrację wirusa PVS wprost proporcjonalnie do stężenia antymetabolitu;
 - zastosowane dawki 20 – 40 mg/l nie mają wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVM;
 - dawki 30 – 40 mg/l znacząco eliminują cząstki wirusa PVY (o 30%).
2. Zieleń malachitowa
 - dawki 0,02 – 0,04 mg/l nie eliminowały cząstek

- wirusów PVS i PVM z roślin *in vitro* ziemniaka;
- zastosowane dawki 0,02 – 0,04 mg/l spowodowały zamieranie wyłożonych merystemów.
3. Azacytydyna
- dawki 20–40 mg/l nie mają wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusów PVS i PVM;
 - przy zastosowaniu dawki 30 mg/l uzyskano 20% roślin wolnych od wirusa PVY;
 - dawka 40 mg/l wpłynęła negatywnie na rośliny *in vitro*, większość wyszczepionych fragmentów nie korzeniła się i nie rosła, tworzyły się mikrobulwy.
4. Tiouracyl
- dawki 0,005 – 0,015 mg/l nie eliminowały cząstek wirusów PVS, PVM i PVY z roślin *in vitro* ziemniaka;
 - dawki 0,5 – 1,5 mg/l nieznacznie zmniejszyły stężenia wirusa PVS w roślinach *in vitro* ziemniaka;
 - dawki 0,5 – 1,5 mg/l nie zmniejszyły stężenia wirusa PVM w roślinach *in vitro* ziemniaka;
 - dawki 0,5 – 1,5 mg/l obniżyły poziom ekstynkcji wirusa PVY wprost proporcjonalnie do stężenia antymetabolitu, nawet o 50%.

Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* ziemniaka (II)

Po raz pierwszy bakterie endogenne zostały zdefiniowane przez Wilsona (1995) jako mikroorganizmy żyjące wewnątrz rośliny. Z kolei Strobel (2004) dodał, że każda roślina jest gospodarzem dla kilku gatunków bakterii i grzybów, jednak na ogół jeden lub dwa są dominujące. Zanieczyszczenia endofitami są dużym problemem w rozmnażaniu *in vitro* wszystkich gatunków roślin, w tym i ziemniaka. Szczególnie ważne jest to w kulturach wieloletnich, które stanowią podstawę w bankach genów *in vitro*. Włączenie do pożywek związków bakterioobójczych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych, dlatego konieczne było eksperymentalne wybranie odpowiedniego biocydu i ustalenie jego stężenia w odniesieniu do konkretnego gatunku rośliny. W naszych badaniach wykazaliśmy zróżnicowany wpływ substancji bakterioobójczych na eliminację bakterii endogennych z kultur *in vitro* ziemniaka.

1. Plant Preservative Mixture™ (PPM™)
- najniższa dawka 0,3% w dużym stopniu eliminowała bakterie endogenne – 93% czystych kultur;
 - wyższe dawki 0,4 i 0,5% to 100% kultur

- wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych.
2. ProClin300®
- dawki 0,01 – 0,02% eliminowały bakterie endogenne w średnio 75 – 85% proporcjonalnie do stężenia;
 - dawka 0,05% eliminowała bakterie endogenne w 100%. Przy wyższej dawce rośliny słabiej korzeniły się i rosły niższe w stosunku do kontroli.
3. Nitrofurazone
- dawki 0,4 – 0,6% nie miały wpływu na eliminację zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro*.
4. Citrosept
- dawka 0,2% to 40% czystych kultur;
 - dawki 0,3 – 0,4% działały fitotoksycznie na wyszczepione eksplantaty.
5. Azotan srebra (AgNO₃)
- dawki 0,05 – 0,15% nie miały wpływu na eliminację zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach *in vitro*, jednocześnie szkodliwie działały na wyszczepione eksplantaty.
6. Podchloryn sodu NaClO
- najniższe dawki 0,0002 – 0,001% w ok 50% eliminował zanieczyszczenia bakteryjne;
 - wyższe dawki 0,01 – 0,05% to 100% czystych kultur *in vitro* ziemniaka.

Sprawdzając trwałość efektu zastosowanych we wcześniejszych latach biocydów PPM™ i ProClin 300® na dalszych etapach mikro-rozmnażania zaobserwowano, że tylko fragmenty szczytowe były wizualnie czyste, tzn. nie zaobserwowano zmętnienia podłoża. Pozostałe fragmenty były zanieczyszczone bakteriami endogennymi. Jednak pasażując roślinę wyrosłą ze szczytowego fragmentu na podłoże bez biocydu po kilku dniach wokół eksplantatu pojawiało się wodniste „halo” wskazujące na obecność bakterii endogennych. Trwałość działania PPM™ i ProClin 300® dla roślin *in vitro* ziemniaka to maksymalnie 2 pasaże.

Przeprowadzone badania wykazały pozytywny wpływ PPM™, ProClin 300® i podchlorynu sodu na zanieczyszczenia bakteryjne w roślinach *in vitro* ziemniaka, dlatego kolejnym krokiem było sprawdzenie tych biocydów pod kątem ich wpływu na tworzenie mikrobulw. Mikrobulwy to bulwy ziemniaka uzyskane w procesie mikrotuberyzacji w warunkach *in vitro*. Są na ogół bardzo małe, ich średnica nie przekracza 10 mm i ważą średnio 0,7g (Struik, Wiersema 1999). Do ich produkcji stosuje się kulturę wyprowadzoną z jednowęzłowych fragmentów roślin, którą

poddaje się działaniu chemicznych i fizycznych czynników indukujących tuberyzację. Współczynnik rozmnażania jest stosunkowo niski, gdyż z 1 eksplantatu po 3 miesiącach prowadzenia kultur otrzymuje się jedną lub niekiedy dwie mikrobulwy (Sekrecka, Michałowska 2014). Z przeprowadzonych w 2020 roku badań wynika, że zastosowane preparaty bakteriobójcze nie miały istotnego wpływu na wzrost i rozwój mikrobulw. Decydującym czynnikiem o mikrotuberyzacji ziemniaka jest przede wszystkim odmiana.

Wnioski

1. Na uzyskanie roślin wolnych od wirusa PVS, PVM i PVY poddanych termoterapii i izolacji merystemów wpływ ma: temperatura i termin procesu oraz czynnik osobowy, na co składa się precyzja i wielkość izolowanego merystemu.
2. Rybawiryna w badanych dawkach dodana do pożywki zmniejsza koncentrację wirusa PVS i PVY wprost proporcjonalnie do stężenia. Jednak dawka >50 mg/l działa fitotoksycznie na rośliny in vitro ziemniaka.
3. W celu eliminacji zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka można z powodzeniem zastosować PPM w dawce 0,4–0,5%, ProClin 300® 0,05% i podchloryn sodu NaClO w dawce 0,01 – 0,05%.
4. Trwałość działania PPM™ i ProClin 300® dla roślin in vitro ziemniaka to maksymalnie 2 pasáže.
5. W procesie mikrotuberyzacji dodatek zastosowanych substancji bakteriobójczych nie ma istotnego wpływu na tworzenie mikrobulw ziemniaka.

Osiągnięcia projektu

1. Termoterapia – opracowano warunki termoterapii zoptymalizowano temperaturę i czas trwania, wielkość izolowanego merystemu oraz uwolniono wybrane genotypy ziemniaka od wirusa PVS, PVM i PVY, które są dostępne w banku genów in vitro ziemniaka.
2. Chemioterapia – określono skuteczność rybawiryny, zieleni malachitowej, azacytydyny i tiouracylu w usuwaniu wirusów PVS, PVM i PVY z materiału roślinnego w formie roślin in vitro oraz ustalono poziom fitotoksyczności zastosowanych substancji antywirusowych na rośliny in vitro ziemniaka.
3. Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro

ziemniaka – określono skuteczność PPM, ProClin 300®, Nitrofurazone, Citroseptu, azotanu srebra (AgNO₃), podchlorynu sodu NaClO w eliminacji zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro, ustalono poziom fitotoksyczności zastosowanych biocydów na rośliny in vitro ziemniaka oraz ustalono trwałość działania PPM™ i ProClin 300® dla roślin in vitro ziemniaka.

Wykaz publikacji

Publikacje

- Sekrecka D., Michałowska D., Krzewińska A. 2014. Zdrowotność zasobów genowych zgromadzonych i udostępnianych z Banku Genów in vitro ziemniaka w Boninie. *Ziemniak Polski* 2: 16–19;
- Sekrecka D., Michałowska D. 2015. Mikrorozmnażanie technologia wykorzystywana w produkcji zdrowych sadzoniaków ziemniaka. *Ziemniak Polski* 3: 3–7;
- Sekrecka D., Michałowska D., Piskorz J. 2016. Termoterapia i chemioterapia porównanie skuteczności metod w eliminacji wirusów S i M ziemniaka. *Ziemniak Polski* 4: 10–15;
- Downar Zapolska J., Sekrecka D. 2017. Metody eliminowania wirusów z roślin ziemniaka przegląd literatury. *Ziemniak Polski* 3; 24–31;
- Michałowska D., Sekrecka D., Przewodowska A., Piskorz J. 2018. Zwalczanie zakażeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka za pomocą preparatów PPM i ProClin. *Ziemniak Polski* 3: 43–47;
- Michałowska D., Olejnik O., Salamońska K., Sekrecka D. 2019. Termoterapia jako metoda eliminowania wirusów S i M z roślin ziemniaka w kulturach in vitro. *Ziemniak Polski* 4:11–14;
- Michałowska D. 2020. Wpływ preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych na rośliny ziemniaka w kulturach in vitro. *Ziemniak Polski* 3: 10–16.

Doniesienia konferencyjne

- Sekrecka D., Michałowska D. 2015. Eliminacja zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka. Materiały konferencyjne 48. Konferencji naukowo – szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 13 – 15. 05. 2015: 88 – 89;
- Sekrecka D., Michałowska D., Piskorz J. 2016. Termoterapia i chemioterapia skuteczność metod w eliminacji wirusów S i M ziemniaka. Materiały konferencyjne 49. Konferencji naukowo – szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 11 – 13. 05. 2016: 53 – 54;
- Sekrecka D., Michałowska D. 2017. Badanie preparatów do zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych w kulturach in vitro ziemniaka. Materiały konferencyjne 50. Konferencji naukowo – szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 7 – 9. 06. 2017; 65;
- Sekrecka D., Michałowska D. 2017. Termoterapia skutecz-

- ność metody w uwalnianiu roślin od wirusa S ziemniaka. Materiały konferencyjne 50. Konferencji naukowo – szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 7 – 9. 06. 2017: 63 – 64;
- Michałowska D., Przewodowska A., Buryło P. 2018. Skuteczność stosowania rybaviryny w uwalnianiu roślin od wirusów S i M ziemniaka. Materiały konferencyjne 51. Konferencji naukowo – szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 6 – 8. 06. 2018: 39 – 40;
- Michałowska D., Przewodowska A., Piskorz J., Olejnik O. 2019. Efektywność termoterapii i chemioterapii w uwalnianiu roślin ziemniaka od wirusa S. Materiały konferencyjne 52. Konferencji naukowo – szkoleniowej „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 22 – 24. 05. 2019: 36 – 37;
- Michałowska D., Przewodowska A., Piskorz J., Olejnik O. 2019. Bakteriobójcze działanie preparatu PPM w kulturach in vitro ziemniaka. Materiały konferencyjne 52. Konferencja naukowo – szkoleniowa „Nasiennictwo i ochrona ziemniaka” Dźwirzyno 22 – 24. 05. 2019: 54 – 55.
- Literatura**
- Ali M. A., Nasiruddin K. M., Haque M.S., Faisal S. M. (2013). Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. SAARA J. Agri 11 (1): 71–80;
- Biniam T., Tedesse M. (2008). A survey of Vidal status on potatoes grown in Eritrea and in vitro elimination of local variety Tsaeda embaba. Afr. J. Biotech. 7 (4): 397–403;
- Kunkel L. O. (1936). Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of Peach. – Phytopathology 26: 809–830;
- Mahmound S. Y. M., Hosseney M. H., Abdel-Ghaffar M. H. (2009). Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. Int. J. Virol.5 (2): 64–76;
- Malepszy S. (2001). Biotechnologia roślin. PWN. Warszawa. 36;
- Morel G., Martin C. (1952). Cure of dahlias attacked by a virus disease. C.R. Hebd Seances Acad.Sci.235 (21): 1324–5;
- Nasir I. A., Tabassum B., Latif Z., Javed M. A., Haider M. S., Husnain T. (2010). Strategies to control potato virus Y under in vitro conditions. Pak. J. Phytopatol. 22b (1): 63–70;
- Sekrecka D., Michałowska D. (2014). Wpływ wybranych składników pożywki na produkcję mikrobulw. Ziemn. Pol. 1: 4–7;
- Struik P. C., Wiersema S. G. (1999). Produktion of pre-basic seed. [In:] Seed Potato Technology. Wageningen Pers.: 173–216;
- Wilson D. (1995). Endophyte – the evolution of a term and clarification of its use and definition. – Oikos 73: 274–276.
- Zaklukiewicz K. (1982). Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. Ziemiak 1981/82: 137-160.

Badania nad regulatorową funkcją cząsteczek miRNA w przebiegu infekcji wirusami ziemniaka PVY i TRV

Research on the regulatory function of miRNA in the course of infection with potato viruses PVY and TRV

Zhimin Yin¹✉, Renata Lebecka¹, Zofia Murawska¹, Krystyna Michalak¹, Fuliang Xie², Baohong Zhang², Magdalena Pawełkowicz³

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy

²East Carolina University, USA

³Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego

✉ e-mail: z.yin@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: tytoń, miRNA, wirus Y ziemniaka

Cel podjętego tematu i prowadzonych badań w latach 2015–2017

PVY jest najważniejszym wirusem ziemniaka w Polsce. Celem zadania było zdobycie wiedzy podstawowej na temat, które cząsteczki miRNA mogą być zaangażowane w reakcję roślin tytoniu na zakażenie wirusem PVY. Tytoń jest podatną na zakażenie wirusem Y ziemniaka, rośliną modelową i testową. Wyniki badań przyczynią się do postępu wiedzy o roli miRNA w interakcji ziemniak – wirusy ziemniaka.

Cel główny realizowano poprzez:

- wybranie izolatów PVY różniących się między sobą serologicznie, biologicznie i molekularnie do badań miRNA,
- wybranie najlepszego genu referencyjnego w stosowanych warunkach eksperymentalnych badania interakcji PVY-tytoń, do badań ekspresji genów celowych i miRNA,
- zbadanie związku pomiędzy poziomem ekspresji PVY-HC-Pro w roślinach tytoniu po zakażeniu różnymi szczepami wirusa Y ziemniaka z poziomem ekspresji miRNA,
- wybranie miRNA oraz genów kontrolowanych przez miRNA, które podlegają ekspresji w tytoniu po zakażeniu różnymi szczepami wirusa Y ziemniaka.

Materiały i metody

Materiały

- Odmiany ziemniaka: King Edward, Desiree, Pentland Ivory, Etola i Nicola. Odmianę Nicola użyto w celu sprawdzenia zdolności

wywoływania choroby PTNRD (ang. potato tuber necrotic ringspot disease) przez badane izolaty,

- Odmiana tytoniu (*Nicotiana tabacum*) Samsun,
- Izolaty PVY: PVY 12/94 = PVY-3202, numer w bazie KX356068; PVY Gr99 = PVY-3303, numer w bazie KX356070; PVY 34/01 = PVY-3411, numer w bazie KX356069; Wi, Ditta, LW, Ny z kolekcji własnej,
- Geny referencyjne: *PP2A*, *eIF5C*, *SfU2*, *Gamma-TUB*, *EBQ3*, *EF1a (D)*, *F-box*, *Nad5*, *GAPDH*, *SUII*, *EF1a (S)*, *EF1a (AB)*, *Actin*, *GTP*, *Alpha-TUB*,
- microRNA i ich geny docelowe (Bukhari i in. 2005; Tang i in. 2012): miR162, *DCL1*; miR168, *AGO1*; miR530, pectin methylesterase; miR159, *TCP3*; miR319, *MYB*; miR166, *HD-ZIPIII*; miR847, *VAMP*; miR164, SA induced protein 19; miR172, *AP2*; miR395, *AP2*; miR396, *NAM*; miR479, *GRAS*; miR156, *SPL*; miR167, *PP2C*; miR393, *F-box3*; miR160, *ARF*; miR169, CCAAT-binding transcription factor subunit B; miR171, Transcription initiator for nodulation miR397, heat shock protein; miR398, *CDS*; miR408, Basic blue copper protein; miR5303, *ARF*; miR6144, DEAD-box ATP-dependent RNA helicase 47; miR6147, Pyruvate kinase; miR6154, *SPL*; miR6161, *AGO1*; miR6164, Vacuolar protein sorting-associated protein vps13; miR390, *LRR*; miR6020, N-like protein; miR482, N-like protein; miR6019, N-like



protein; miR6025, *NBS-LRR*; Novel-miR38, nematode resistance-like protein; Novel-miR4, Putative late blight resistance protein homolog *RIB*; miR1435, *NBS-LRR*; Novel-miR10 *Avr9/Cf-9* rapidly elicited protein 4; miR6021, *Avr9/cf9* rapidly elicited protein 275.

Metody:

- Serologiczne: testem ELISA z wykorzystaniem przeciwciał poliklonalnych i monoklonalnych Y^N (Bioreba) rozpoznające PVY^{NTN} i Y^O (SASA) rozpoznające PVY^O.
- Biologiczne: zakażenie mechaniczne roślin tytoniu i ziemniaka w fazie 4–6 liści i utrzymywano w fitotronie w temperaturze 22°C i 14-godzinnym dniu.
- Molekularne: testem RT-PCR (ang. reverse transcription PCR) po ok. trzech tygodniach od zakażenia roślin. Po wyizolowaniu wirusowego RNA prowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji, a następnie reakcję PCR przy użyciu specyficznych starterów wg. Lorenzena, 2006 lub Chikh Ali, 2010; testem RT-qPCR w czasie rzeczywistym przy użyciu techniki SYBR Green, badanie ekspresji genów referencyjnych i miRNA (Frazier i in. 2010). Całkowite RNA izolowano przy użyciu zestawu do izolacji mirVana miRNA z roślin niezakażanych, traktowanych wodą, zakażanych trzema izolatami w dwóch terminach po 3 lub 7 i 14 dniach po inokulacji.
- Statystyczne: wybór genów referencyjnych na podstawie pięciu programów: Delta CT, Best keeper, Normfinder, Genorm, Recommended comprehensive ranking.

Wyniki

Na podstawie objawów na odmianach referencyjnych i roślinach tytoniu do dalszych badań wybrano trzy izolaty: 12/94, Gr99 i 34/01. Charakteryzują się różną patogenicznością w stosunku do odmiany Etola i Nicola. Izolat 12/94 nie poraża odmiany Etola, powoduje nekrozy PTNRD w odmianie Nicola, nekrozy nerwów na liściach tytoniu odmiany Samsun. Izolat Gr99 powoduje PTNRD w Nicola, nie powoduje PTNRD na bulwach odmiany Etola, powoduje rozjaśnienie nerwów w tytoniu. Izolat 34/01 powoduje symptomy na liściach odmiany Etola, nie powoduje PTNRD w bulwach tej odmiany. Izolaty 12/94 i Gr99 są serotypu N, natomiast izolat 34/01 – serotypu O.

Do badania ekspresji miRNA w interakcji tytoń – szczepy wirusa Y ziemniaka wybrano gen fosfatazy 2, *PP2A*.

Poziom wirusowego RNA kodującego białko *HC-Pro* nie różnił się po 7 dniach od inokulacji roślin tytoniu trzema różnymi izolatami wirusa Y ziemniaka. Różnice wykryto po 14 dniach od inokulacji, wyższą ekspresję obserwowano po użyciu dwóch szczepów wirusa Y – NTN i N-Wi, niższą po użyciu szczepu Z-NTN. Różnice pomiędzy dwoma szczepami NTN i N-Wi chociaż nie były statystycznie istotne to szczep N-Wi charakteryzował się większą akumulacją RNA białka *HC-Pro* od szczepu NTN.

Testowano ekspresję 37 rodzin miRNA zawierających 66 form miRNA, spośród których 45 form miRNA z 27 rodzin ulegało zmianom po inokulacji tytoniu wirusem Y ziemniaka.

Zbadano ekspresję 40 transkryptów genów celowych odpowiadających 33 rodzinom miRNA. U 8 zaobserwowano obniżenie ekspresji genu; u trzech genów – wzrost ekspresji; u 9 – brak ekspresji. Dla pozostałych 20 genów nie obserwowano zmian w poziomie ekspresji po zakażeniu roślin tytoniu wirusem Y ziemniaka. Zmiany poziomu ekspresji genów obserwowano głównie w przypadku dwóch silnych izolatów NTN i N-Wi, natomiast łagodny szczep Z-NTN powodował zmiany 4 genów celowych. Niektóre z genów celowych należące do tej samej rodziny miRNA uległy ekspresji po zakażeniu wirusem, niektóre pozostały bez zmian. Wiele niewykrytych bądź niezmiennych poziomu ekspresji genów celowych było związanych z odpornością, na przykład miR482, miR390. Silne szczepy wirusa, NTN i N-Wi powodowały zmiany większej ilości genów celowych niż szczep łagodny Z-NTN. W tytoniu, gatunku podatnym na PVY transkrypty związane z odpornością nie były wykrywane. Szczegółowe wyniki publikowano w czasopiśmie „Virus Research” (DOI: 10.1016/j.virusres.2018.11.002)

Wnioski

Zakażenie różnymi szczepami wirusa Y ziemniaka może prowadzić do zmiany ekspresji miRNA i niektórych genów celowych komplementarnych do miRNA w roślinach tytoniu (podatnych na PVY). Dwa szczepy wirusa, PVY^{NTN} i PVY^{N-Wi}, powodowały silniejsze symptomy od trzeciego szczepu, PVY^{Z-NTN}, dwa tygodnie po inokulacji, w górnych, nieinokulowanych liściach roślin. Wykryto istotne zmiany w ekspresji 18 miRNA po inokulacji silniejszymi szczepami wirusa. Zwiększoną ekspresję wraz ze zwiększoną ekspresją związanych z nimi transkryptów wykryto dla dwóch miRNA, nta-miR6020a-5p i nta-miR6164a/b, których celowymi transkryptami są geny odporności typu TIR-NBS-LRR zaangażowane w transdukcji sygnałów. Geny

te mogą być związane z indukcją nekroz nerwów przez PVY^{NTN} i PVY^{N-WI}. Podobnie zmniejszona ekspresja mRNAs, na przykład *RAP2-7* i *TOE3*, *PXC3*, *LRR-RLK*, *ATHB-14* i *TCP4* odpowiadających nta-miR172, nta-miR390, nta-miR482, nta-miR166 i nta-miR319/159 odpowiednio, była związana z regulacją transkrypcji, fosforylacją białek i różnicowaniem komórek. Obserwowane zmiany w ekspresji miRNA i ich docelowych genów zależały od szczepu i gospodarza, zależały od nasilenia objawów oraz poziomu wirusowego RNA białka *HC-Pro*.

Osiągnięcia projektu

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

Yin, Z., Murawska, Z., Xie, F., Pawelkiewicz, M., Michalak, K., Zhang, B., Lebecka, R. (2019). MicroRNA response in potato virus Y infected tobacco shows strain-specificity depending on host and symptom severity. *Virus Research*, 260: 20–32.

Doniesienia konferencyjne

Yin Z., Wójcik Z., Xie F., Michalak K., Zhang B., Lebecka R. 2016. Host miRNA response in leaves of PVY infected tobacco plants. "16th triennial meeting of the Virology Section of the European Association of Potato Research

(EAPR) & 8th annual meeting of PVYwide organization", Ljubljana, Słowenia, 31.05–03.06.2016, Abstracts: 27.

Literatura

- Bukhari, S. A., Shang, S., Zhang, M., Zheng, W., Zhang, G., Wang, T. Z., Shamsi I. H., Wu F. (2015). Genome-wide identification of chromium stress-responsive micro RNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*) roots. *Environmental Toxicology and Chemistry* 34 (11): 2573–82.
- Chikh-Ali, M., Maoka, T., Natsuaki, K. T., Natsuaki, T. (2010). The simultaneous differentiation of *Potato virus Y* strains including the newly described strain PVY^{NTN-NW} by multiplex PCR assay. *Journal of Virological Methods*. 2010 165 (1): 15–20.
- Frazier, T. P., Xie, F., Freistaedter, A., Burklew, C. E., Zhang, B. (2010). Identification and characterization of microRNAs and their target genes in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *Planta*. 232:1289–1308.
- Lorenzen, J. H., Piche, L. M., Gudmestad, N. C., Meacham, T., Shiel, P. (2006). A multiplex PCR assay to characterize *Potato virus Y* isolates and identify strain mixtures. *Plant Disease* 90: 935–940.
- Tang, S., Wang, Y., Li, Z., Gui, Y., Xiao, B., Xie, J., Zhu, Q.H., Fan, L. (2012). Identification of wounding and topping responsive small RNAs in tobacco (*Nicotiana tabacum*). *BMC Plant Biology* 12:28.

Identyfikacja i zastosowanie fenotypowych i molekularnych markerów tolerancji na stres suszy u buraka cukrowego

Identification and application of phenotypic and molecular markers of drought stress tolerance in sugar beet

Anita Wiśniewska✉, Chrystian Chomontowski, Joanna Dąbrowska-Bronk, Sławomir Podlaski, Danuta Chołuj

Katedra Fizjologii Roślin, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie
✉ e-mail: anita_wisniewska@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe w porządku alfabetycznym: *Beta vulgaris* L., burak cukrowy, markery fizjologiczne, polimorfizm DNA, ekspresja genów, susza

Cele prowadzonych badań

Susza jest jednym z głównych stresów ograniczających produktywność roślin uprawnych, w tym buraka cukrowego na całym świecie, ale także w warunkach klimatycznych Polski. Plony buraka cukrowego obniżają się w Europie w warunkach tego stresu od 15 do 30% (Pidgeon i in., 2001). Nawadnianie plantacji buraków jest nieekonomicznie z powodu zmniejszających się zasobów dostępnej wody. Podwyższenie plonowania buraków cukrowych w warunkach okresowych niedoborów wody można uzyskać poprzez wprowadzenie do uprawy odmian o podwyższonej tolerancji na ten stres. Uzyskanie takich odmian metodami tradycyjnej hodowli jest pracochłonne i długotrwałe poprzez fakt, że odpowiedź roślin na deficyt wody jest regulowana przez wiele genów, co wiąże się ze zmianami wielu cech biochemicznych czy fizjologicznych (Ober i Rajabi, 2010). Dlatego poznanie cech morfologiczno-fizjologicznych, które są powiązane z tolerancją buraka na niedobór wody może pozwolić na użycie ich jako kryteriów selekcji w programach hodowlanych. Dotychczas opisano różne mechanizmy tolerancji na suszę u kilku gatunków roślin uprawnych. Jednakże, w literaturze naukowej brak jest informacji dotyczących różnic pomiędzy genotypami bardziej i mniej tolerancyjnymi na suszę u buraka cukrowego na poziomie fizjologicznym i molekularnym.

Dlatego też celem zaplanowanych badań było wyselekcjonowanie genotypów buraka cukrowego skrajnie różniących się odpowiedzią na stres suszy, a następnie powiązanie reakcji

fizjologicznej z tłem genetycznym, oszacowanie polimorfizmu DNA i cech fenotypowych, a także wytypowanie genów ulegających zróżnicowanej ekspresji w wybranych genotypach buraka cukrowego. Wszystkie założone cele zadania na lata 2014–2016 zostały osiągnięte.

Materiały i metody

Badania prowadzono na 11 genotypach buraka cukrowego będących homozygotycznymi liniami męskopłodnych zapyłaczy (linie podwojonych haploidów – DH) oraz 1 męskopłodnej linii dopełniającej typu O będącej niepełną homozygotą. Nasiona 12 genotypów uzyskano dzięki uprzejmości Kutnowskiej Hodowli Buraka Cukrowego Sp. z o. o. w Straszku. Badania polowe przeprowadzono dwukrotnie dla wybranych genotypów.

Uprawę buraków cukrowych prowadzono pod osłonami (w odpowiednio przygotowanych namiotach foliowych) w warunkach polowych w KHBC w Straszku, z kontrolowanym, automatycznym nawadnianiem oraz w szklarni SGGW w wazonach Wagnera. W szklarni rośliny traktowane suszą podlewano do 30% KPW (kapilarnej pojemności wodnej), a kontrolne do 60% KPW. Pomiar cech morfologiczno-fizjologicznych wykonano dwukrotnie po 30 i 45 dniach od momentu traktowania roślin suszą. Rośliny traktowane suszą w warunkach polowych początkowo nawadniano tak samo jak rośliny kontrolne, a następnie po dwóch miesiącach od wschodów całkowicie wyłączano nawadnianie na okres trzech miesięcy. W czasie indukowanej



suszy glebowej trzykrotnie, co miesiąc, wykonano na roślinach obu kombinacji pomiary cech morfologicznych i fizjologicznych.

Analizowano cechy morfologiczne i fizjologiczne takie jak: stopień wędnięcia liści, względną zawartość wody w liściach (RWC), specyficzną masę liści, współczynnik „sukulentności”, względną zawartość chlorofilu i flawonoidów, wskaźnik długości powierzchni liści łanu (LAI), stopień absorpcji światła z zakresu fotosyntetycznie aktywnej radiacji (PAR), parametry fluorescencji chlorofilu *a* w liściach adaptowanych w ciemności i zaadaptowanych do aktualnego natężenia napromieniowania z zastosowaniem testu JIP, pomiar potencjału osmotycznego liści. Na podstawie średnich ze wszystkich terminów pomiarów wyliczono wskaźnik tolerancji poszczególnych genotypów na suszę (DTI – ang. *drought tolerance index*) oddzielnie dla każdej z badanych cech stosując wzór: $DTI = (Y_s/Y_k) / (\text{średnia } X_s / \text{średnia } X_k)$; Y_s – średnia wartość cechy dla danego genotypu w warunkach suszy; Y_k – średnia wartość cechy dla danego genotypu w warunkach optymalnego nawadniania; średnia X_s oraz średnia X_k – średnia wartość cechy dla wszystkich genotypów w warunkach suszy (średnia X_s) lub optymalnego nawadniania (średnia X_k).

Analizę polimorfizmu DNA dla wybranych 5 genotypów buraka cukrowego różniących się skrajnie reakcją na suszę przeprowadzono przy użyciu techniki RAPD (za Chołuj i in. 2014). Produkty RAPD były analizowane w oparciu o ich obecność (1) lub brak (0) u poszczególnych genotypów. Do oszacowania dystansu genetycznego wykorzystano program POPGENE (Nei 1972, Nei 1978). Analizę transkryptomów dwóch podwojonych haploidów skrajnie różniących się tolerancją na suszę i rosnących w warunkach optymalnych lub z deficytem wody przeprowadzono metodą sekwencjonowania bibliotek cDNA – RNAseq (usługa obca).

Wyniki

U roślin traktowanych suszą wartości współczynników wędnięcia wskazywały na utratę turgoru liści najstarszych i części wyrosniętych. Współczynnik wędnięcia zmieniał się pod wpływem suszy w sposób zależny od rodzaju genotypów buraka cukrowego, a genotypy charakteryzujące się większą tolerancją na ten stres wolniej traciły turgor liści, wskaźnik ten był ujemnie skorelowany z suchą masą korzeni i całej rośliny oraz z plonem korzeni. Wraz ze znacznym podwyższeniem stopnia wędnięcia liści względna zawartość wody w liściach

wyrosniętych w mniejszym stopniu obniżała się pod wpływem suszy, ale wartości współczynników korelacji wyliczone dla RWC i suchej masy roślin lub plonu korzeni były istotne statystycznie. W obu doświadczeniach (szklarniowym i polowym) obserwowano znaczne zmniejszenie potencjału osmotycznego liści pod wpływem suszy. Stopień obniżenia potencjału osmotycznego w reakcji na niedobór wody był zróżnicowany genotypowo, ale gdy rośliny uprawiano pod namiotami foliowymi nie stwierdzono korelacji pomiędzy tą cechą a plonem korzeni. Stwierdzono również ujemną korelację pomiędzy SLW i współczynnikiem sukulentności a plonem korzeni. U roślin traktowanych suszą obserwowano wyraźne zmniejszenie akumulacji suchej masy, powierzchni blaszek liściowych i wskaźnika stopnia ulistnienia (LAI). Dodatkowo reakcja genotypów na niedobór wody w przypadku tych cech fizjologicznych była znacznie zróżnicowana. Stwierdzono również istotną statystycznie dodatnią korelację pomiędzy powierzchnią aparatu fotosyntetycznego, a wzrostem roślin czy plonem korzeni. Rośliny optymalnie nawadniane charakteryzowały się średnimi wartościami LAI około 3, a rosnące w warunkach suszy w granicach 2, co negatywnie wpływało na absorpcję PAR przez aparat fotosyntetyczny. Maksymalna kwantowa wydajność PSII w bardzo niewielkim stopniu obniżała się pod wpływem niedoboru wody u roślin uprawianych w namiotach foliowych, ale wyraźne negatywne zmiany obserwowano, gdy suszą traktowano młodsze rośliny uprawiane w szklarni. Obserwowano również podwyższenie wartości fluorescencji minimalnej w wyniku oddziaływania suszy, zmniejszenie F_m , a także znaczne zmniejszenie wartości pola powierzchni nad krzywą fluorescencji oraz zmniejszenie wartości parametru F_v/F_0 .

U roślin traktowanych suszą plon korzeni był obniżony o około 40% w porównaniu do kontroli. Ponadto stwierdzono bardzo duże zróżnicowanie genotypowe plonu korzeni w reakcji na suszę. Zawartość sacharozy w korzeniach spichrzowych była tylko nieznacznie podwyższona w reakcji na niedobór wody, a zawartość sodu i potasu zbliżona u roślin traktowanych suszą i optymalnie nawadnianych. Pod wpływem suszy obserwowano natomiast znaczne podwyższenie zawartości azotu α -aminowego. Cecha ta charakteryzowała się dużym zróżnicowaniem genotypowym oraz była ujemnie skorelowana z plonem korzeni.

Analiza różnic pomiędzy maksymalną i minimalną wartością współczynników tolerancji na suszę (DTI) wskazuje, że największe zróżnicowanie genotypowe w reakcji na suszę obserwowano

dla LAI, absorpcji PAR, potencjału osmotycznego, NBI (współczynnik metabolizmu azotu), ETR (szybkość transportu elektronów), czasu pomiędzy F_0 i F_m , współczynnika wydajności PSII, plonu korzeni oraz zawartości sodu i azotu α -aminowego w korzeniach (tab. 1). Analiza wartości współczynników tolerancji na suszę wyliczonych dla wszystkich cech morfologicznych i fizjologicznych wskazała, że potencjalnie najwyższą tolerancją na suszę charakteryzują się genotypy 9 i 10, a niższą genotypy 11 i 12.

Do wstępnego oszacowania polimorfizmu na poziomie DNA pomiędzy 5 genotypami (różniącymi się skrajnie reakcją na suszę oraz linią O) wykorzystano technikę RAPD (ang. Randomly Amplified Polymorphic DNA). Spośród 158 użytych starterów, pomimo że były wybrane na podstawie wcześniejszych badań z innymi genotypami buraka, tylko 55 generowało produkty polimorficzne, 7 – produkty monomorficzne, 7 nie dało żadnych produktów oraz 89 dało produkty niestabilne lub nieostre. W reakcjach ze starterami generującymi produkty polimorficzne pomiędzy genotypami uzyskiwano od 1 do 11 produktów. Długość amplifikowanych produktów wynosiła od ok. 400 do 3000 pz. Ogółem przy użyciu 55 starterów generujących fragmenty DNA polimorficzne zidentyfikowano dla 5 genotypów 274 *loci* (łącznie 948 produktów PCR), z których 196 stanowi *loci* polimorficzne (71,53%). Na podstawie uzyskanych danych obliczono wartość genetycznego dystansu, która wahała się od 31,98 do 51,33%. Podobieństwo genetyczne dla dwóch skrajnie różniących się reakcją na suszę genotypów 9 i 12 wyniosło 65%. Wartość dystansu genetycznego pomiędzy badanymi formami buraka zawiera się w przedziale wartości uzyskiwanych wcześniej w innych badaniach (Chołuj i in., 2014).

Łącznie w trakcie trzy letnich badań przeanalizowano produkty PCR generowane przez 311 starterów RAPD. Spośród nich udało się wyselekcjonować 30 starterów, które generowały produkty jednocześnie u obu form tolerancyjnych albo u obu form wrażliwych (wybranych we wcześniejszych badaniach na podstawie cech fizjologicznych i morfologicznych). Głównym kryterium wyboru 30 starterów z 311 było pojawienie się produktu polimorficznego jednocześnie i tylko u obu form tolerancyjnych, natomiast u obu form wrażliwych nie lub odwrotnie. Wśród 30 analizowanych starterów 26 zachowało swoje cechy tj generowało produkty PCR w sposób powtarzalny. Wśród 26 starterów generujących produkty polimorficzne możemy wyróżnić 2 grupy: GRUPA

1 – startery, które generują produkty PCR u form tolerancyjnych a u wrażliwych nie lub odwrotnie (układ 1/0), GRUPA 2 – startery, które generują produkty PCR u wszystkich genotypów, ale różniące się ilością danego produktu PCR pomiędzy formami tolerancyjnymi i wrażliwymi. W sumie 26 starterów wygenerowało 31 różnic pomiędzy badanymi formami.

Do analizy sekwencjonowania transkryptomów (RNAseq) wybrano dwa genotypy 9 i 12 buraka cukrowego spośród badanych form na podstawie ich reakcji w warunkach suszy w uprawie polowej. Wybrano genotypy najbardziej i najmniej tolerancyjne na suszę. Geny, których \log_2 krotności zmiany (ang. \log_2 fold change) poziomu ekspresji pomiędzy dwoma genotypami w danych warunkach wynosił co najmniej 1,5 a współczynnik FDR (ang. False Discovery Rate) był poniżej 0,05 (FDR < 0,05) zostały uznane za ulegające istotnej różnicowej ekspresji. Najwięcej genów ulegało zróżnicowanej ekspresji w genotypie wrażliwym (12) pomiędzy warunkami kontrolnymi i suszy (1905+1206), najmniej genów (981+232) o zróżnicowanej ekspresji stwierdzono porównując warunki kontrolne i suszy dla genotypu tolerancyjnego (9). Zidentyfikowano geny, które charakteryzowały się największym podwyższonym poziomem ekspresji tylko w liściach buraków tolerancyjnych rosnących w warunkach suszy. Geny te potencjalnie mogą być związane z podwyższoną tolerancją genotypu 9 na suszę. Wśród tych genów specyficznych dla genotypu 9 znalazły się między innymi geny o nieznannej funkcji (4), gen związany z przekazywaniem sygnału etylenowego, gen związany z transportem hormonów, w tym ABA oraz gen związany z katabolizmem ABA. Kwas abscysynowy jest hormonem indukowanym między innymi podczas stresu suszy i jego czasowe podwyższone stężenie pozytywnie wpływa na obronę rośliny przed tym stresem.

Zidentyfikowano również geny o obniżonym poziomie ekspresji tylko w genotypie tolerancyjnym w warunkach suszy względem genotypu wrażliwego. Geny te potencjalnie mogą być związane z podwyższoną tolerancją genotypu 9 na suszę. Wśród tych genów znalazły się między innymi geny kodujące ekspansyny lub białka podobne do ekspansyn, a także kodujące enzymy związane z reorganizacją ścian komórkowych. Inną grupę genów stanowią geny kodujące czynniki transkrypcyjne. Czynniki transkrypcyjne to białka mające zdolność wiązania się do obszarów regulatorowych genów i w ten sposób mogące wpływać na zmianę ekspresji innych genów, hamować ją lub

aktywować. Wśród tej grupy genów zidentyfikowano również gen kodujący S-transferazę glutationu (GST), która jest enzymem związanym z utrzymaniem homeostazy redoks i chroni komórki przed stresem oksydacyjnym.

Szczegółowa funkcja wymienionych genów jak i pozostałych zidentyfikowanych (znanych i nieznanych) dzięki sekwencjonowaniu transkryptomów dwóch form buraka cukrowego powinna być potwierdzona/poznana w odpowiedzi buraka cukrowego na stres suszy.

Wnioski

1. Najlepszymi wskaźnikami fenotypowymi tolerancji buraka cukrowego na suszę wydają się być przede wszystkim stopień obniżenia LAI, absorpcji PAR oraz plon korzeni. Tendencje zmian cech morfologicznych i fizjologicznych w reakcji na suszę były w doświadczeniach polowym i szklarniowym zbliżone, choć stopień obniżenia czy podwyższenia danej cechy był zróżnicowany.
2. Aparat fotosyntetyczny buraka cukrowego jest stosunkowo odporny na samą dehydratację, dopiero gdy dodatkowo jest narażony na oddziaływanie wysokiego natężenia napromieniowania i temperatury dochodzi do jego fotoinhibicji, dlatego maksymalna wydajność kwantowa PSII nie jest użytecznym parametrem oceny jego tolerancji na suszę.
3. Wartość podobieństwa genetycznego pomiędzy skrajnie różniącymi się reakcją na suszę formami wyniosła 65% i jest to wysokie pokrewieństwo w obrębie genotypów buraka cukrowego, ale typowe w odniesieniu do danych literaturowych.
4. Geny zidentyfikowane jako te, które ulegają specyficznemu zmniejszeniu ekspresji charakterystycznej dla genotypu tolerancyjnego w warunkach suszy stanowią swoisty wzór mogący ułatwić selekcjonowanie genotypów tolerancyjnych buraka cukrowego na suszę, jednakże dalsze szczegółowe badania są niezbędne w tym zakresie.

Osiągnięcia projektu

1. Na podstawie trzyletnich badań dotyczących wpływu suszy na kształtowanie się

cech morfologiczno-fizjologicznych buraków cukrowych wytypowano dwa genotypy rodzicielskie (podwojone haploidy) o podwyższonej tolerancji na suszę (nr 9 i 10) oraz dwa charakteryzujące się (nr 11 i 12) większą podatnością na ten stres. Genotypy o podwyższonej tolerancji buraka cukrowego mogą być włączone do programów hodowlanych przez KHBC, natomiast wszystkie wskazane genotypy są cennym materiałem do badań nad tolerancją na suszę.

2. Wytypowano cechy fenotypowe, za pomocą których można selekcjonować genotypy buraka cukrowego o podwyższonej tolerancji na suszę.
3. Wytypowano 26 starterów RAPD, które mogą posłużyć w przyszłości do selekcji genotypów buraka cukrowego tolerancyjnych na suszę.

Wykaz publikacji wyników

- Wiśniewska A, Andryka-Dudek P, Czerwiński M, Chołuj D (2019) Fodder beet is a reservoir of drought tolerance alleles for sugar beet breeding, *Plant Physiology and Biochemistry* 145: 120–131, <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2019.10.031>; (IF= 3,404; 70 pkt)
- Chołuj D, Wiśniewska A, Chomontowski Ch, Wagner D, Podlaski S. The morphological and physiological responses of sugar beet to drought. 10th International Conference “Plant Functioning Under Environmental Stress”. 16-19 September 16-19, 2015, Cracow, Poland

Literatura

- Chołuj, D. Wiśniewska, A. Szafranski, K. M. Cebula, J. Gozdowski, D. Podlaski, S. (2014). Assessment of the physiological responses to drought in different sugar beet genotypes in connection with their genetic distance. *Journal of Plant Physiology*, 171, 1221-1230.
- Nei, M. (1972). Genetic distance between population. *American Naturalist*, 106, 283-292.
- Nei, M. (1978). Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics*, 89, 583-590.
- Ober, E. S. Rajabi, A. (2010). Abiotic Stress in Sugar Beet. *Sugar Tech*, 12, 294-298.
- Pidgeon, J. D. Werker, A. R, Jaggard, K. W. Richter, G. M. Lister, D. H. Jones, P. D. (2001). Climatic impact on the productivity of sugar beet in Europe, 1961-1995. *Agricultural and Forest Meteorology*, 109 (1), 27–37.

Tabela 1

Wybrane wskaźniki tolerancji na suszę (DTI) wyliczone dla badanych cech morfologiczno-fizjologicznych, parametrów fluorescencji na podstawie średnich dla poszczególnych genotypów z 2 terminów pomiarów oraz parametrów plonu na podstawie średnich z 4 powtórzeń.

Genotyp	LAI	PAR	Pot. osm	NBI	ETR	Czas do F_m	PI	Plon korzeni	Zawartość Na	Zawartość N
1	0,92	0,88	0,95	1,06	1,07	1,07	1,14	1,00	1,95	1,49
2	0,79	0,82	0,93	1,1	1,07	0,99	1,09	1,09	2,46	0,92
3	0,72	0,79	0,97	1,05	1,12	1,19	0,84	0,52	0,70	1,14
4	1,03	0,98	0,97	1,26	1,31	0,95	0,94	0,92	0,50	0,83
5	0,88	1,03	0,91	0,87	1,16	1,18	0,78	0,93	1,23	0,93
6	0,84	1,02	0,91	0,83	1,00	1,00	1,41	0,92	1,06	1,01
7	1,09	1,09	1,10	0,94	1,13	1,13	0,97	1,19	0,96	1,12
8	1,18	1,18	1,17	0,85	1,19	1,26	0,94	0,89	1,01	1,17
9	1,37	1,23	1,31	1,17	1,08	0,73	1,01	1,73	0,54	0,80
10	1,53	1,24	1,18	1,14	0,99	1,00	1,35	1,36	0,52	0,47
11	0,72	0,75	0,83	0,83	0,49	1,00	0,96	0,83	1,20	1,14
12	0,85	0,91	0,83	1,07	0,82	0,81	0,81	0,67	0,91	1,36
Max-min	0,81	0,49	0,48	0,43	0,82	0,53	0,63	1,21	1,96	1,02

Opracowanie metod globalnej analizy polimorfizmów w genomie buraka cukrowego

Development of methods for global analysis of polymorphisms in the genome of sugar beet

Gabriela Machaj, Wojciech Wesołowski, Alicja Macko-Podgórn, Rafał Barański, Marek Szklarczyk, Dariusz Grzebelus✉

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
✉ e-mail: d.grzebelus@urk.edu.pl

Słowa kluczowe: BNYVV, cytoplazmatyczna męska sterylność, ekspresja genów, genotypowanie, markery molekularne, rizomania

Cele prowadzonych badań

Przygotowanie populacji hodowlanych segregujących pod względem odporności na rizomanię i męskiej płodności oraz fenotypowanie roślin w ich obrębie; cel został osiągnięty.

Poznanie sekwencji całkowitej puli cząsteczek RNA u obiektów różniących się składem allelicznym loci warunkujących cechę odporności na rizomanię oraz męskiej płodności; cel został osiągnięty.

Wytypowanie puli polimorfizmów sekwencyjnych, sprzężonych z cechami odporności na rizomanię i męskiej płodności, przeznaczonych do konwersji w markery PCR; cel został osiągnięty.

Konwersja wytypowanych polimorfizmów do markerów miejscowo-specyficznych, walidacja opracowanych markerów pod względem ich przydatności do identyfikacji roślin z allelami warunkującymi odporność na rizomanię i przywracanie płodności; cel został osiągnięty.

Materiał i Metody

Do detekcji wirusa BNYVV została wykorzystana technika DAS-ELISA. Sekwencjonowanie transkryptomów pięciu roślin wrażliwych na rizomanię i pięciu roślin określonych jako odporne w szklarniowym teście odpornościowym przeprowadzono przy wykorzystaniu technologii RNA-seq na platformie Illumina. Wszystkie rośliny poddane sekwencjonowaniu transkryptomów pochodziły z populacji F2 2SRhF114–5 segregującej pod względem odporności na BNYVV w locus *Rz1*.

Do sekwencjonowania transkryptomów wyselekcjonowano pięć odpornych oraz pięć wrażliwych roślin buraka cukrowego. Ponadto, sekwencjonowaniu poddano rejon genomu obejmującego gen *Rz1*. Matryce do sekwencjonowania stanowiły produkty long-PCR na matrycy genomowego DNA jednej rośliny homozygotycznie odpornej i jednej homozygotycznie wrażliwej, pochodzących z populacji 2SRhF114–5. Uzyskane odczyty zostały poddane kompleksowej analizie bioinformatycznej. Ponadto badano ogółem ponad 100 populacji buraka cukrowego o różnym pochodzeniu i reakcji na BNYVV, które zostały wykorzystane do weryfikacji przydatności opracowanych markerów molekularnych.

W części poświęconej genom restorerowym realizacja tego tematu badawczego polegała na wyprowadzaniu populacji, których segregacja fenotypowa na rośliny męskosterylne i męskopłodne odzwierciedlała odpowiednio brak lub obecność allelu przywracającego płodność. Pierwotnym źródłem takich populacji były krzyżowania typu roślina męskosterylna x roślina potencjalnie dopełniająca (utrzymująca męską sterylność). Wykorzystywano uzyskiwane z tych krzyżowań pokolenia F1 oraz pokolenia z krzyżowań wstecznych do formy męskosterylnej (BC). Ogółem wyprowadzono 42 takie populacje. Rośliny były fenotypowane poprzez wizualną inspekcję obecności pyłku i poprzez mikroskopową ocenę żywotności pyłku. Masowe sekwencjonowanie transkryptomów (RNA-seq) z roślin męskosterylnych oraz roślin z przywróconą płodnością przeprowadzono w dwóch



eksperymentach. W pierwszym przeanalizowano po jednej roślinie z obydwu klas fenotypowych (męskosterylne i męskopłodne), w drugim każda z tych klas była reprezentowana przez pięć roślin. W obydwu eksperymentach badane klasy fenotypowe różniły się składem allelicznym locus *Z/z* (*Rf2/rf2*). W obydwu eksperymentach sekwencjonowanie bazowało na wykorzystaniu platformy firmy Illumina, wykonano je w wariancie PE100.

Opis wyników

Identyfikacja genu kandydującego *Rz1* i opracowanie markerów molekularnych przydatnych do selekcji roślin odpornych na rizomanię:

Odczyty ekstynkcji dla roślin z linii segregującej wahały się w szerokich granicach, wskazując na ich zróżnicowaną reakcję oznaczającą obecność roślin odpornych i wrażliwych na BNYVV. Rośliny o skrajnych wartościach pomiarów zostały wytypowane do dalszych prac.

Analizy transkryptomyczne umożliwiły identyfikację 171 genów, które istotnie różnicowały rośliny wrażliwe i odporne na rizomanię. Spośród nich 64 geny przyporządkowano do 10 funkcjonalnie powiązanych klastrów. Większość genów o różnicowej ekspresji zostało przyporządkowanych do klastra związanego z transportem jonów i strukturą błony komórkowej. Drugi największy klaster związany był z fotosyntezą. Funkcje kolejnych klastrów związane były z metabolizmem węglowodanów, reakcjami redox, organizacją ściany komórkowej, aktywnością katalityczną, wiązaniem białek, regulacją aktywności białek, fosforylacją białek i wiązaniem nukleotydów. Ponadto analiza genów ulegających różnicowej ekspresji pozwoliła na przyporządkowanie 38 genów do reakcji na stres biotyczny. Trzy z przypisanych genów są związane z bezpośrednią reakcją na atak patogenu (stres biotyczny – białka PR). Pozostałe 35 genów zostało sklasyfikowanych jako biorące udział w procesach metabolicznych związanych z reakcją komórki na stres biotyczny. Analizy polimorfizmów pojedynczych nukleotydów w sekwencjonowanych próbach ujawniły rejon genomu różnicujący populację odporną od wrażliwej, obejmujący większą część złożenia referencyjnego (RefBeet) chromosomu 3 buraka cukrowego, zgodnie z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi o przyporządkowaniu genu *Rz1* na mapach genetycznych buraka cukrowego do tego chromosomu. Analiza różnic ekspresji oraz polimorfizmu sekwencji w tym rejonie pozwoliła na wytypowanie genu kandydującego (LOC104888806) adnotowanego jako białko RPP13-like, o strukturze typowej dla

roślinnych genów odporności, tj. CC-NBS-LRR. Różnicowa ekspresja genu LOC104888806 została potwierdzona w reakcji qPCR, przy czym stwierdzono, że gen ten ulega silniejszej ekspresji u roślin odpornych niż u wrażliwych, zarówno w warunkach infekcji BNYVV, jak i u roślin zdrowych (kontrola), jednak jego ekspresja jeszcze wzrasta u roślin odpornych w reakcji na infekcję, czego nie obserwowano u roślin wrażliwych. Analiza struktury genu LOC104888806 w oparciu o wyniki sekwencjonowania genomowego DNA wykazała, że u roślin wrażliwych posiada on insercję o długości ok. 350 pz w egzonie, co wskazuje na trwałe unieczynnienie (*knock-out*) tego genu u roślin wrażliwych.

Do opracowania markerów molekularnych typu CAPS, sprzężonych z odpornością na rizomanię, wyselekcjonowano polimorfizmy pojedynczego nukleotydu, które występowały w genach ulegających różnicowej ekspresji zmapowanych do chromosomu 3. Walidacja opracowanych markerów na populacji segregującej potwierdziła sprzężenie przynajmniej sześciu z nich z genem odporności. Wyniki genotypowania nie pokrywały się jednak całkowicie z wynikami testu ELISA. Wynikało to z obecności heterozygot zarówno w puli roślin odpornych, jak i wrażliwych (według testu ELISA), a także z faktu, że część roślin określonych jako odporne metodą immunodetekcji posiadała warianty alleliczne markerów CAPS wskazujące na ich wrażliwość. Dalsza walidacja markerów molekularnych obejmowała genotypowanie 450 roślin należących do ponad 100 populacji buraka cukrowego o różnym pochodzeniu i reakcji na wirusa BNYVV. Całościowa analiza populacji pod względem zgodności wyników genotypowania markerami CAPS opracowanymi w ramach niniejszego projektu z wynikami genotypowania komercyjnym markerem SNP wykazała, że dla większości roślin otrzymano zasadniczo zgodne wyniki, a różnice nie miały losowego charakteru, ale pojawiały się częściej dla pewnej niewielkiej grupy obiektów. Dla dwóch SNP zlokalizowanych w pierwszym egzonie genu LOC104888806 opracowano wysokowydajny system genotypowania wykorzystujący technologię TaqMan. Oba te markery (*Rz1.9.1* i *Rz1.9.2*) charakteryzowały się wysoką skutecznością i jakością wyników genotypowania. Uzyskane wyniki pozwalają stwierdzić, że markery te są przydatnym narzędziem dla selekcji wspomaganą markerami (*marker-assisted selection*, MAS) materiałów hodowlanych buraka cukrowego w kierunku odporności na rizomanię warunkowaną genem *Rz1*.

Identyfikacja genów kandydujących przywracających płodność roślin buraka cukrowego ze sterylizującą cytoplazmą oraz opracowanie markerów przydatnych do selekcji:

Spośród poddanych fenotypowaniu populacji u 27 wystąpiła segregacja 1:1 (męskosterylne: męskopłodne), co wskazywało na monogeniczny charakter przywracania płodności. Tego typu populacje były przydatne do analiz molekularnych zmierzających do charakterystyki obecnych w nich genów restorerowych.

W pierwszym eksperymencie sekwencjonowania transkryptomów dla każdej analizowanej próby (rośliny) uzyskano ponad 40 mln odczytów sekwencyjnych, w drugim – średnio 34 mln. Na bazie otrzymanych danych sekwencyjnych poszukiwano transkrypty, których poziom różnicował rośliny męskosterylne i męskopłodne. Z kolei wśród tego typu transkryptów poszukiwano takich, które pochodzą z chromosomu IV, w obrębie którego mapuje się restorer *Z* (*Rf2*). W pierwszym eksperymencie znaleziono 231 transkryptów różnicujących z chromosomu IV, w tym 15 kierowanych do mitochondriów, a w drugim eksperymencie znaleziono 33 transkrypty tego typu, w tym cztery kierowane do mitochondriów. Większość różnicujących transkryptów cechowała podwyższona bądź wyłączna akumulacja u roślin męskopłodnych.

Ze względu na fakt, iż funkcje restorerowe często pełnią geny kodujące białka z powtórzonymi motywami pentatrikopeptydowymi (PPR), odczyty sekwencyjne z drugiego eksperymentu RNAseq zostały zmapowane do wyekstrahowanych z chromosomu IV 82 genów kodujących białka PPR. Wśród genów cechujących się silniejszą ekspresją u roślin męskopłodnych najwyraźniejsze różnice odnotowano dla LOC104890821 i LOC104890879. Analiza sekwencji sygnałowych wskazuje, iż produkt pierwszego z tych genów jest kierowany do mitochondriów, natomiast produkt drugiego – do plastydów. Odczyty RNAseq mapowano także do genomów organellowych. Minimalne średnie pokrycie genomu mitochondrialnego wyniosło 84x, natomiast genomu plastydowego – 146x. U roślin męskosterylnych poziom mRNA mitochondrialnych genów *atp9* i *orf25* był wyższy niż u roślin z przywróconą płodnością. Analogiczną różnicę zaobserwowano dla trzech genów plastydowych *trnG*, *rps7* oraz *yef3*.

Markery dla genu *Z* (*Rf2*) testowano na populacjach S04 766 i S04 786. Opracowano dwie pule takich markerów. Pierwsza bazowała na sekwencji trzech genów z chromosomu IV, których różnicową transkrypcję obserwowano w pierwszym

eksperymentie RNAseq. W populacji S04 766 markery te kosegregowały z fenotypem w zakresie od 67 do 79%. Z kolei w przypadku populacji S04 786 zakres ten wynosił od 68 do 82%. Drugą pulę markerów opracowano na bazie genów z chromosomu IV kodujących białka PPR. W populacji S04 766 jeden z tych markerów kosegregował z fenotypem na poziomie 84%. Kosegregacja w populacji S04 786 wynosiła od 83 do 85%.

Identyfikacja genu restorerowego w kolekcji fenotypowo segregujących populacji bazowała na kosegregacji profili markerowych z fenotypem roślin. Spośród 16 przebadanych populacji w 14 stwierdzono występowanie restorera *X/Rf1*. U dwóch populacji występującego w nich restorera nie udało się zidentyfikować – zastosowane markery nie różnicowały czytelnie roślin męskosterylnych i męskopłodnych. W toku tych badań zaprojektowano i wykorzystano nowy marker dla locus *X/x* (*Rf1/rf1*) – Rf1-Mors bazujący na polimorfizmie długości otwartych ramek odczytu tego locus. Jeden z profili markera Rf1-Mors obserwowano głównie u roślin męskosterylnych. Marker ten może znaleźć zastosowanie w selekcji form dopełniających (linii O).

Wnioski z prowadzonych badań

1. Potwierdzono różną reakcję roślin buraka cukrowego na porażenie wirusem BNYVV, warunkowaną segregacją w locus *Rz1*.
1. Zidentyfikowano 171 genów różnicujących rośliny odporne i wrażliwe pod względem poziomu ekspresji, w tym 39 na chromosomie 3 buraka cukrowego, zawierającym locus warunkujący odporność na rizomanię.
2. Gen kandydujący warunkujący odporność na rizomanię koduje białko RPP13-like o strukturze CC-NBS-LRR. Jest on zlokalizowany na chromosomie 3, a jego ekspresja jest znacząco wyższa u roślin odpornych i dodatkowo wzrasta w odpowiedzi na infekcję BNYVV. Gen ten posiada odmienną budowę u roślin wrażliwych i odpornych na rizomanię.
3. Wykazano niemal pełną zgodność wyników genotypowania markerami oraz reakcji roślin na BNYVV w odniesieniu do osobników sklasyfikowanych jako homozygoty w teście ELISA.
4. Potwierdzono rozszczepienie 1:1 na rośliny męskosterylne i męskopłodne, wskazując na przywracanie płodności jest warunkowane przez pojedynczy gen dominujący.
5. Wykazano, iż większość transkryptów różnicujących rośliny męskopłodne i męskosterylne

cechuje podwyższona bądź wyłączna akumulacja u roślin męskopłodnych. Część z tych transkryptów mapuje się do chromosomu IV, co wskazuje, iż wśród nich może być reprezentowany restorer *Z (Rf2)*.

6. Wytypowano geny z chromosomu IV, wśród których może znajdować się restorer *Z (Rf2)* – wskazuje na to ich zwiększona transkrypcja u roślin z przywróconą płodnością oraz kierowanie do mitochondriów odpowiednich produktów białkowych. Jeden z tych genów (LOC104890821) koduje białko PPR przypominające białko RPF5 rzodkiewnika, które bierze udział w obróbce transkryptów genu *atp9*.
7. Zidentyfikowano geny organellowe – dwa mitochondrialne i trzy plastydowe, których transkrypcja spada przy obecności restorera *Z (Rf2)*. Wśród nich jest mitochondrialny gen *atp9*, którego powiązania z ekspresją CMS były notowane już wcześniej.
8. Markery najsilniej sprzężone z restorerem *Z (Rf2)* opracowano na bazie zlokalizowanych w chromosomie IV genów kodujących białka PPR. Rzeczywiste sprzężenie tych markerów z genem *Z/Rf2* jest prawdopodobnie wyższe niż obserwowane – wynika to z niedoskonałości użytych do mapowania segregujących populacji.
9. U prawie 90% testowanych populacji za przywracanie płodności odpowiadał gen *X/Rf1* z chromosomu III. Dla tego restorera opracowano marker ułatwiający selekcję genotypów dopełniających, utrzymujących sterylność.

Osiągnięcia projektu

Wskazanie genów kandydujących warunkujących odporność na rizomanię oraz przywracanie płodności roślin buraka cukrowego, opracowanie metodyki identyfikacji markerów molekularnych przydatnych w procesie selekcji materiałów hodowlanych buraka cukrowego.

Opracowane markery molekularne sprzężone z genem *Rz1* zostały wdrożone przez Kutnowską Hodowlę Buraka Cukrowego w Straszkwie, sp. z o.o. Zastosowana strategia stała się podstawą do przygotowania projektu finansowanego przez NCBiR, realizowanego w latach 2018–2023, którego koordynatorem jest Kutnowska Hodowla Buraka

Cukrowego w Straszkwie, sp. z o.o.

Wykaz publikacji wyników Konferencje

- Machaj G., Grzebelus D., Macko-Podgórn A., Szklarczyk M. 2016. Transcriptomics of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) resistance to Beet necrotic yellow vein virus. 17th European Congress in Biotechnology, Kraków
- Machaj G., Stelmach K., Herda A., Grzebelus D. 2017. Opracowanie i walidacja markerów molekularnych weryfikujących odporność buraka cukrowego na rizomanię. III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN, Łódź
- Machaj G., Macko-Podgórn A., Grzebelus D. 2017. Transcriptome sequencing of sugar beet (*Beta vulgaris*) provides insights into the mechanism of resistance to BNYVV. „Green4Good IV” Biotechnology of Plant Products Conference, Ołomuniec, Rep. Czeska
- Wesółowski W., Herda A., Grzebelus D., Szklarczyk M. 2017. The use of RNA-seq for identification of genes associated with fertility restoration in sugar beet. 8th Conference of the Polish Society of Experimental Plant Biology, Białystok
- Machaj G., Grzebelus D. 2018. Genotypowanie populacji buraka cukrowego markerami sprzężonymi z odpornością na rizomanię. IV Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN, Łódź
- Szklarczyk M. 2018. Molecular aspects of fertility restoration in beet. ECP/GR BETANET meeting: Improving a cooperation between actors involved in conservation and utilization of Beta genetic resources, Wenecja, Włochy
- Machaj G., Grzebelus D. 2018. Differential expression of genes involved in resistance to rhizomania. ECP/GR BETANET meeting: Improving a cooperation between actors involved in conservation and utilization of Beta genetic resources, Wenecja, Włochy
- Machaj G., Macko-Podgórn A., Stelmach K., Kozak-Stankiewicz K., Sitarski A., Grzebelus D. 2019. Odporność buraka cukrowego na rizomanię warunkowana genem *Rz1*: różnicowa ekspresja genów i możliwości prowadzenia selekcji wspomaganą markerami. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane
- Stelmach K., Machaj G., Grzebelus D. 2019. Opracowanie markerów molekularnych wspomagających selekcję roślin buraka cukrowego w kierunku odporności na rizomanię warunkowaną genem *Rz1*. IV Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i Genomika w Doskonaleniu Roślin Uprawnych”, Poznań

Badania nad mechanizmami warunkującymi proces embriogenezy gametycznej u buraka cukrowego

The research on the mechanisms responsible for gynogenic embryogenesis in sugar beet

Sandra Cichorz✉, Małgorzata Malicka, Maria Gośka

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Bydgoszczy
✉ e-mail: s.cichorz@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: *Beta vulgaris*, gynogenez, proteoglikany AGP, burak cukrowy

W procesie doskonalenia odmian i tworzenia nowych materiałów wyjściowych dla hodowli buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) istotne znaczenie ma wykorzystanie kultur *in vitro*, a w szczególności pozyskanie linii haploidalnych (H) oraz podwojonych haploidów (DH) na drodze embriogenezy gametycznej. Do najczęściej stosowanych technik otrzymywania haploidów w warunkach *in vitro* należą kultury pylników oraz izolowanych mikrospor, które w przypadku: żyta, pszenicy czy rzepaku są wykorzystywane na szeroką skalę w programach hodowlanych. Powyższa metoda, stosowana wśród wymienionych roślin, jak i wielu innych, daje satysfakcjonujące efekty (Germanà, 2011; Hallahan, i in, 2018).

Jednakże, w przypadku buraka cukrowego pozyskanie haploidów *Beta vulgaris* na drodze indukowanej androgenezy nie powiodło się, mimo licznych prób wykonanych na wielu genotypach oraz pożywkach o różnorodnym składzie. Otrzymanie linii haploidalnych buraka stało się możliwe dopiero w latach 80-tych z wykorzystaniem kultur *in vitro* niezapłodnionych zalążków i zalążni, podczas których dochodzi do regeneracji haploidalnych pędów z komórek jajowych woreczka zalążkowego. Rośliny haploidalne są nieplodne, z tego względu niezbędna jest ich diploidyzacja dla uzyskania stabilnych genetycznie i cytologicznie linii podwojonych haploidów (Rogozińska, Gośka, 1976; Rogozińska, i in, 1977; Gośka, 1997).

Dotychczasowe wyniki badań prowadzonych w bydgoskim oddziale IHAR-PIB poświęcone gynogenezie linii hodowlanych buraka cukrowego wskazały na silną zależność zdolności regeneracyjnych od genotypu rośliny matecznej (Gośka,

1997). Fakt ten, po pierwsze wpływa limitująco na postęp dalszych prac hodowlanych, a po drugie, jest zjawiskiem ciekawym z punktu widzenia badań podstawowych. Interesującą wydaje się być odpowiedź na pytanie skąd wynika odmienny potencjał embriogenetyczny roślin należących do tego samego gatunku lecz o odmiennych genotypach? Pomimo znacznego postępu w zakresie pozyskania podwojonych haploidów, obecnie niewiele wiadomo na temat mechanizmów molekularnych związanych z indukcją gynogenezy. Przy czym warto podkreślić, iż metoda identyfikacji genotypów o wysokim i niskim potencjale gynogenetycznym byłaby wysoce pożądana podczas wyboru komponentów do krzyżowań.

Zgodnie z danymi literaturowymi, obecność i przestrzenna organizacja poszczególnych komponentów ściany komórkowej są potencjalnymi czynnikami odzwierciedlającymi lub w pewnym stopniu warunkującymi właściwości morfogenetyczne komórek i tkanek. Badania prowadzone na 3 liniach kalusa buraka cukrowego różniących się potencjałem morfogenetycznym wykazały, iż w toku prowadzenia kultur dochodzi do zróżnicowanej ekspresji peroksydaz, chitynaz, esteraz pektynowych. Powyższe enzymy uczestniczą w modyfikowaniu właściwości komponentów ściany komórkowej, przy czym chitynazy biorą udział w szlaku przemian części białkowej arabinogalaktanów, zawierających N-acetylo-D-glukozamię (GlcNAc) oraz glukozaminę (GlcN), co prowadzi do uwolnienia oligosacharydowych cząsteczek sygnałnych (Pavoković, i in, 2012). Obecny stan wiedzy pozwala stwierdzić istotną rolę komponentów ściany komórkowej jakimi są proteoglikany AGP (ang. *arabinogalactan proteins*) w procesach różnicowania komórek,



a także regulacji somatycznej embriogenezy (Filipović, i in, 2021; Silva, i in, 2021).

Wyniki badań prowadzonych w IHAR-PIB potwierdzają istotną rolę proteoglikanów AGP w procesach morfogenezy roślin. Wykazano, że egzogenne AGP dodawane do pożywek w początkowym okresie kultury protoplastów szparkowych buraka cukrowego mają istotny wpływ na efektywność organogenezy kalusa w kolejnych etapach rozwoju. Wydajność organogenezy istotnie wzrosła z 6,82% (kontrola) do 47,22% (dodatek AGP). AGP przejawiające pozytywny efekt biologiczny zostały zanalizowane pod względem biochemicznym i molekularnym. Ujawniono, że są one szczególnie bogate w epitopy oligosacharydowe rozpoznawane przez przeciwciała JIM13, MAC207 i LM2 (Wiśniewska, Majewska-Sawka, 2007; 2008).

Dlatego też uznano za celowe porównanie struktury ścian komórkowych syntetyzowanych przez trudno i łatwo regenerujące na drodze gynogenezy genotypy buraka cukrowego, ze szczególnym uwzględnieniem lokalizacji i rearanżacji proteoglikanów. Ponadto, podjęto próbę znalezienia różnic molekularnych na poszczególnych etapach rozwoju niezaplodnionych zalążków buraka cukrowego w obrębie danego genotypu oraz pomiędzy genotypami o odmiennym potencjale embriogenetycznym. W tym celu wykorzystano metodę różnicowego profilowania ekspresji genów (ang. *differential display*) bazującej na analizach PCR (Liang, Pardee, 1992). Powyższą technikę stosowano w przypadku identyfikacji genów uczestniczących w odpowiedzi na suszę u bawełny, jak również podczas analizy zmian ekspresji genów u osobników pochodzących z indukowanej mutagenyzy (Phanchaisri, i in, 2012; Selvam, i in, 2009).

Z powyższych względów celem niniejszego projektu było poszerzenie wiedzy na temat przebiegu embriogenezy gametycznej na poziomie cytologicznym i molekularnym między wyselekcjonowanymi genotypami o wysokim i niskim potencjale gynogenetycznym. Punktem wyjścia prowadzonych analiz był wybór wielonasiennych diploidalnych zapyłaczy buraka cukrowego, udostępnionych przez Kutnowską Hodowlę Buraka Cukrowego Sp. z o.o. – Stację Hodowli Roślin w Straszku. Prace badawcze poświęcono lokalizacji, analizie biologicznej roli egzogennej i endogennej proteoglikanów AGP oraz pektyn, jak również różnicowemu profilowaniu ekspresji genów podczas rozwoju niezaplodnionych zalążków buraka cukrowego. Badania prowadzono z wykorzystaniem metod biochemicznych, immunocytochemicznych i molekularnych.

Literatura

- Filipović, B. K., Trifunović-Momčilov, M. M., Simonović, A. D., Jevremović, S. B., Milošević, S. M., Subotić, A. R. (2021). Immunolocalization of some arabinogalactan protein epitopes during indirect somatic embryogenesis and shoot organogenesis in leaf culture of centaury (*Centaureum erythraea* Rafn). *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 1-11.
- Germanà, M. A. (2011). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep*, 30, 839–857.
- Goška, M. (1997). Haploidy i podwojone haploidy buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) oraz możliwości ich wykorzystania w hodowli. Monografie i rozprawy naukowe IHAR, 2, 1–81.
- Hallahan, B. F., Fernandez-Tendero, E., Fort, A., Ryder, P., Dupowy, G., Deletre, M., Curylye, E., Brychkova, G., Schulz, B., Spillane, C. (2018). Hybridity has a greater effect than paternal genome dosage on heterosis in sugar beet (*Beta vulgaris*). *BMC Plant Biology*, 18, 1-16.
- Liang, P., Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science*, 257, 967-971.
- Pavoković, D., Poljuha, D., Horvatić, A., Ljubešić, N., Hagège, D., Krsnik-Rasol, M. (2012). Morphological and proteomic analysis of sugar beet cultures and identifying putative markers for cell differentiation. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 108, 111-119.
- Phanchaisri, B., Samsang, N., Yu, L., Singkarat, S., Anuntalabhojai, S. (2012). Expression of OsSPY and 14-3-3 genes involved in plant height variations of ion-beam-induced KDML 105 rice mutants. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen*, 734, 56–61.
- Rogozińska, J., Goška, M. (1976). Growth and differentiation of sugar beet anthers and callus. *Bull Acad Pol Sci*, 24, 57-60.
- Rogozińska, J., Goška, M., Kuźdowicz, A. (1977). Induction of plants from anthers of *Beta vulgaris* cultured in vitro. *Acta Soc Bot Pol*, 46, 471-479.
- Selvam, J. N., Kumaravadivel, N., Gopikrishnan, A., Kumar, B. K., Ravikesavan, R., Boopathi, M. N. (2009). Identification of a novel drought tolerance gene in *Gossypium hirsutum* L. cv KC3. *Commun Biometry Crop Sci*, 4, 9-13.
- Silva, J., Ferraz, R., Dupree, P., Showalter, A. M., Coimbra, S. (2020). Three Decades of Advances in Arabinogalactan-Protein. *Biosynthesis Front Plant Sci*, 11, 1–18.
- Wiśniewska, E., Majewska-Sawka, A. (2007). Arabinogalactan-proteins stimulate the organogenesis of guard cell protoplasts-derived callus in sugar beet. *Plant Cell Rep*, 26, 1457-1467.
- Wiśniewska, E., Majewska-Sawka, A. (2008). The differences in cell wall composition in leaves and regenerating protoplasts of *Beta vulgaris* and *Nicotiana tabacum*. *Biol Plant*, 52, 634-641.

Wykaz publikacji wyników**Doniesienia konferencyjne**

- Cichorz, S., Malicka, M., Goška, M. (2014). Immunolocalization of pectin and arabinogalactan protein epitopes in unpollinated ovules of *Beta vulgaris* L. genotypes. III Ogólnopolska Konferencja IGR PAN „Genetyka i genomika w doskonaleniu roślin uprawnych – od rośliny modelowej do nowej odmiany, Poznań, 5–7.11.2014, Streszczenia: 102.
- Cichorz, S., Malicka, M., Goška, M. (2015). The study on possible mechanisms involved in gametic embryogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). XIV Ogólnopolska Konferencja Kultur *In Vitro* i Biotechnologii Roślin, Poznań, 14–17.09.2015, *BioTechnologia* 96 (1): 57.
- Cichorz, S., Malicka, M., Goška, M. (2016). Preliminary investigation of molecular changes during ovule embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Międzynarodowa Konferencja “Plants In Vitro: Theory and Practice”, Wiedeń, 8–9.02.2016, Streszczenia: 37.
- Cichorz, S., Malicka, M., Goška, M. (2017). Preliminary detection of pectins and arabinogalactan proteins during ovule embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Międzynarodowa Konferencja “Plant Science and Molecular Biology”, Walencja, 11–13.09.2017, Streszczenia: 75.
- Cichorz, S., Malicka, M., Goška, M. (2018). Current Insights into Gametic Embryogenesis of Sugar Beet (*Beta vulgaris* L.). Międzynarodowa Konferencja “14th Quadrennial Congress of the IAPB”, Dublin, 19–24.08.2018, *In Vitro Cellular & Developmental Biology* 54: 563.
- Cichorz, S., Malicka, M., Goška, M. (2019). Preliminary analysis of endogenous pectins and arabinogalactan proteins during ovule embryogenesis in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Międzynarodowa Konferencja “7th Global Summit on Plant Science, Theme: Sustainable Plant and Agricultural Technologies to Eliminate Global Food Shortage”, Madryt, 07-08 października 2019, *Journal of Plant Physiology & Pathology* 7: 30.

Otrzymanie populacji homozygotycznych roślin buraka ćwikłowego z zastosowaniem embriogenezy gametycznej

Obtaining a population of homozygous plants of red beet using gametic embryogenesis

Krystyna Górecka, Waldemar Kiszczak✉, Małgorzata Podwyszyńska, Urszula Kowalska, Agata Kapuścińska, Maria Burian, Lidia Fornal, Anna Bakalarska, Danuta Prochaska, Agnieszka Rojek

Instytut Ogrodnictwa - Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: waldemar.kiszczak@inhort.pl

Słowa kluczowe: androgeniza, gynogeneza, haploidy, izoenzymy, sekwencjonowanie

Cel(e)

Celem projektu było badanie procesów embriogenezy gametycznej: gynogenezy i androgenyzy u buraka ćwikłowego. Podjęto próbę wyznaczenia optymalnych parametrów dla wszystkich etapów obu procesów: indukcji powstawania zarodków w kulturach załączków, pylników i izolowanych mikrospor, regeneracji roślin z tych zarodków i ich adaptacji do warunków zewnętrznych (*in vivo*) oraz ocena otrzymanych roślin. Oceniano ploidalność i homozygotyczność oraz cechy użytkowe otrzymanych linii podwojonych haploidów buraka. Wszystkie założone cele osiągnięto.

Materiały i Metody

Każdego roku prowadzono badania wpływu czynników mających znaczenie dla indukcji powstawania zarodków w kulturach załączków, pylników i izolowanych mikrospor takich jak: stadium rozwoju załączka i mikrospory i ich zewnętrzne wskaźniki, genotyp, pożywka indukcyjna, szok termiczny i etiolacja (dla androgenyzy).

Materiałem do badań były linie hodowlane wybrane przez hodowców, zawierające cechy specjalnie ważne w aktualnie prowadzonej hodowli i odmiany komercyjne. Rośliny te wysadzano do podłoża w szklarni i fitotronie w kontrolowanych warunkach wzrostu roślin. Badano wpływ niskich temperatur i etiolacji na rośliny donorowe w odniesieniu do wydajności indukcji andro- i gynogenezy. Z pędów kwiatostanowych

pobierano pąki i przy pomocy technik mikroskopowych prowadzono obserwację faz rozwojowych mikrospor. Następnie pylniki wykładano na pożywki i w zależności od rodzaju kultury umieszczano w odpowiednich warunkach. Po upływie około 4 tygodni rozpoczęto obserwacje kultur. Do indukcji androgenyzy w kulturach pylnikowych zastosowano pożywkę na bazie N_6 oraz B_5 . W pożywkach tych modyfikowano stężenia hormonów oraz zawartość sacharozy. Przebadano 18 kombinacji pożywek. Do indukcji gynogenezy zastosowano pożywkę na bazie B_5 . Powstałe zarodki w kulturach załączków i pylnikowych przenoszono na pożywki na bazie N_6 lub B_5 zawierające w swoim składzie poliaminy (putrescyna, spermidyna). W ostatnim roku doświadczeń zarodki wykładano na pożywkę MS na której przetestowano wpływ 3 stężeń makroelementów oraz dwóch stężeń kwasu giberelinowego (GA_3) na wydajność procesu regeneracji. Probówki z zarodkami umieszczano w fitotronie, w kontrolowanych warunkach, zapewniając optymalną temperaturę i oświetlenie. Obserwację prowadzono po 4 tygodniach, a po 8 tygodniach obserwację i pasaż. Na tym etapie oznaczano cytometrycznie ploidalność namnożonego materiału roślinnego. Rośliny o garniturze chromosomowym poddano podwojeniu liczby chromosomów antymitotykami: APM, tryfluraliną, kolchicyną oraz oryzaliną. Otrzymane rośliny aklimatyzowano do warunków zewnętrznych *in vivo* w podłożu glebowym. Na tym etapie prowadzono badania wpływu



poszczególnych składników podłoża na ten proces. Po zaaklimatyzowaniu roślin do warunków *in vivo*, przeprowadzono ocenę ich ploidalności poprzez określenie metodą cytometryczną ilości DNA. U roślin o podwojonej liczbie chromosomów badano homozygotyczność przy użyciu 2 systemów izoenzymatycznych PGI i AAT. Dla potwierdzenia statusu ich homozygotyczności po raz pierwszy na świecie wykonano badania z użyciem Sekwencjonowania Nowej Generacji (NSG).

Rośliny homozygotyczne o podwojonej liczbie chromosomów przekazywano współpracującym spółkom hodowlanym, które przeprowadzały ich ocenę przede wszystkim pod kątem najbardziej pożądanых cech użytkowych.

Opis wyników

W wyniku przeprowadzonych badań określono optymalne parametry poszczególnych czynników wpływających na wydajność gametycznej embriogenezy u buraka ćwikłowego.

Wykazano, że długość pąka jest dobrym wskaźnikiem dla określania optymalnych faz rozwojowych mikrospor w celu uzyskania maksymalnej wydajności androgenozy. Korelacja długości pąka w stosunku do faz rozwojowych mikrospor uzależniona jest od genotypu i sezonu wegetacyjnego. Pobierając do indukcji androgenozy pąki o długości 1,2–1,9 mm uzyskano najwyższą liczbę zarodków. W tym przedziale długości w pylniku ponad 50% stanowiły mikrospory w stadium późno-jednojądrowym lub wczesno-dwujądrowym, które są optymalnymi dla indukcji androgenozy. Głównym czynnikiem decydującym o wydajności embriogenezy gametycznej jest genotyp. W kulturach pylnikowych uzyskano w zależności od genotypu od 0 do 1615 zarodków na 100 wyłożonych pylników, a w kulturach izolowanych zalążków od 0 do 58,3 gynogenetycznych struktur na 100 wyłożonych zalążków.

Więcej androgenetycznych zarodków i gynogenetycznych struktur uzyskiwano z roślin uprawianych w kontrolowanych warunkach fitotronu. Liczbę uzyskanych zarodków zwiększono poddając rośliny donorowe etiolacji w ciemności przez 14 dni uzyskując 13 razy więcej zarodków w stosunku do roślin kontrolnych nie etiolowanych. W innym doświadczeniu wykazano, że chłodzenie roślin w temp $+3^{\circ}\text{C}$ przez 3 dni zwiększyło liczbę androgenetycznych zarodków dziesięciokrotnie w stosunku do kontroli. Zakładając kultury izolowanych mikrospor, zarodki uzyskiwano z podobną częstotliwością na obu użytych w doświadczeniach pożywkach tj. B_5 i N_6 , podczas gdy w kulturach pylnikowych

więcej zarodków uzyskano na pożywce B_5 .

Z uzyskanych zarodków regenerowano rośliny. Zaobserwowano wpływ badanych pożywek na przeżywalność zarodków, która zależała od rodzaju embriogenezy gametycznej. Najwięcej zarodków uzyskanych na drodze gynogenezy przeżywało na pożywce N_6 ze 145 mg/l spermidyny (46,9%), podczas gdy zarodki uzyskane na drodze androgenozy przeżywały w najwyższym procencie (55,6%) na pożywce B_5 z 160 mg/l putrescyny. W innym doświadczeniu spośród trzech badanych stężeń makroelementów w pożywce MS, do regeneracji zarodków andro- i gynogenetycznych najlepszą okazała się pożywka zawierająca standardowe stężenie 100% z 30 g L^{-1} sacharozy. Najwięcej bo ponad 80% zarodków podjęło organogenezę na pożywce MS z 3 mg L^{-1} GA_3 . Haploidalne pędy poddane w *in vitro* podwojeniu chromosomów przy zastosowaniu APM, tryfluraliny, kolchicyny zamierały lub efektywność procesu była bardzo niska. Przy zastosowaniu oryzaliny u 80% roślin udało się podwoić liczbę chromosomów. Zregenerowane rośliny o podwojonej gametycznej liczbie chromosomów poddano adaptacji do warunków *in vivo*. Najwyższy procent zaadaptowanych roślin uzyskano w podłożu z dodatkiem 1,5g NSi i 1,6g $CaSiO_3$ na 1dm³ torfu. Zaaklimatyzowane do warunków standardowych w szklarni rośliny poddano badaniu w celu potwierdzenia ich homozygotyczności. Badanie wykonano z wykorzystaniem analizy transkryptomu, odczytanego metodą sekwencjonowania wysokoprzepustowego (HTS, NGS) i stwierdzono bardzo wysoki stopień homozygotyczności. W wyniku analizy zidentyfikowano do 172 710 potencjalnych wariantów różnicujących referencyjny transkryptom buraka cukrowego i badanych linii buraka ćwikłowego, co oznacza do 86 355 potencjalnych miejsc występowania zróżnicowania. W ponad 95% tych miejsc nie stwierdzano heterozygotyczności badanych roślin. Każdy chromosom był reprezentowany w analizie wariantów przez co najmniej 400 transkryptomów (genów lub ich fragmentów). Dla każdego z 9 chromosomów przeanalizowano co najmniej 4 000 wariantów (SNV, MSV lub ins/del) pod względem homozygotyczności w badanej linii buraka ćwikłowego.

Przebadane rośliny, które przekazano hodowcom, różniły się cechami pędów kwiatostanowych i nasiennych, okresem wchodzenia w kwitnienie, zdolnością wiązania nasion. Stwierdzono bardzo duży procent roślin męskosterylnych. Otrzymane nasiona, pozwoliły na kontynuowanie prac hodowlanych. Ocena cech użytkowych roślin uzyskanych na drodze gynogenezy przeprowadzona metodami

hodowlanymi wykazała ich przydatność do programów hodowlanych.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Długość pąka jest dobrym wskaźnikiem dla określania optymalnych faz rozwojowych mikrospor dla uzyskania maksymalnej wydajności androgenezy.
2. Korelacja długości pąka w stosunku do faz rozwojowych mikrospor uzależniona jest od genotypu i sezonu wegetacyjnego.
3. Najważniejszym czynnikiem wpływającym na wydajność procesu jest genotyp.
4. Kontrolowane warunki uprawy roślin donorowych podnoszą wydajność embriogenezy gametycznej.
5. Chłodzenie i etiolacja roślin donorowych podnosi wydajność procesu.
6. Optymalną pożywką dla indukcji androgenezy w kulturach pylnikowych jest pożywka B₅.
7. W kulturach izolowanych mikrospor androgeneza zachodzi z podobną intensywnością na pożywce B₅ i N₆.
8. Do regeneracji andro- i gynogenetycznych zarodków najodpowiedniejsza jest pożywka MS z 30 g L⁻¹ sacharozy oraz 3 mg L⁻¹ GA₃.
9. Zastosowanie oryzaliny jest skuteczną metodą podwojenia haploidalnej liczby chromosomów u roślin buraka ćwikłowego uzyskanych na drodze andro- i gynogenezy.
10. Sekwencjonowanie wysokoprzepustowe (HTS, NGS) jest dobrą metodą do badania homozygotyczności andro- i gynogenetycznych roślin buraka ćwikłowego.

Osiągnięcia projektu

1. Zwiększenie efektywności embriogenezy w kulturach pylnikowych i kulturach zalążków,
2. Otrzymanie zarodków w kulturach izolowanych mikrospor,
3. Wywołanie organogenezy z zarodków androgenetycznych,
4. Identyfikacja skutecznej procedury podwojenia liczby chromosomów bez uszkodzenia rozet buraka ćwikłowego,
5. Wykorzystanie, po raz pierwszy na świecie, do oceny stopnia homozygotyczności buraka ćwikłowego analizy transkryptomu,

odczytanego metodą sekwencjonowania wysokoprzepustowego (HTS, NGS). Uzyskano bardzo precyzyjną i obszerną informację o wariantach sekwencji ok. 62% potencjalnych genów buraka ulegających ekspresji w badanych roślinach i profilu ich ekspresji,

6. Na podstawie oceny uzyskanych roślin potwierdzono skuteczność zastosowanej metody do wytwarzania linii podwojonych haploidów oraz ich przydatność do programów hodowlanych buraka ćwikłowego.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Górecka K., Kiszczak W., Kowalska U., Kapuścińska A. 2016. Wpływ egzogennych poliamin na wydajność gynogenezy buraka czerwonego (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*). Zjazd katedr Jednoimiennych „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin” Międzyzdroje 8–7.06.2016: 33 (poster).

Górecka K., Kiszczak W., Kowalska U., Kapuścińska A., Podwyszyńska M., 2016. Podwajanie liczby chromosomów u haploidnych roślin buraka czerwonego (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*) uzyskanych na drodze gynogenezy. 57 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego, „Botanika – tradycja i nowoczesność” Lublin 27.06–03.07.2016: 182 (poster).

Górecka K., Kiszczak W., Kowalska U., Kapuścińska A., Podwyszyńska M. 2016. Badanie ploidalności i homozygotyczności gynogenetycznych roślin buraka czerwonego (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*). 57 Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego, „Botanika – tradycja i nowoczesność” Lublin 27.06–03.07.2016: 185 (poster).

Kiszczak W., Górecka K., Kowalska U., Kapuścińska A. 2016. Wpływ różnych czynników na efektywność androgenezy u buraka czerwonego (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*). Zjazd katedr Jednoimiennych, „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin”, Międzyzdroje 8–7.06.2016: 37.

Publikacje oryginalne

Górecka K., Krzyżanowska D., Kowalska U., Kiszczak W., Podwyszyńska M. 2017. Development of embryoids by microspore and anther cultures of red beet (*Beta vulgaris* L. subsp. *vulgaris*). Journal of Central Europe Agriculture 18(1): 196-213.

Analiza czynników genetycznych związanych z przywracaniem płodności roślin buraka ćwikłowego

Analysis of genetic factors linked to fertility restoration in table beet

Wojciech Wesołowski, Stefan Stojalowski, Hieronim Golczyk,
Przemysław Gierski, Anna Szlachowska, Beata Domnicz, Marcelina
Wajdzik, Anna Burda, Marek Szklarczyk✉

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
✉ e-mail: marek.szklarczyk@urk.edu.pl

Słowa kluczowe: burak ćwikłowy, cytoplazmatyczna męska sterility (CMS), geny restorerowe, markery molekularne

Cele projektu

1. Określenie, czy geny *X* i *Z* Owena przywracają płodność w materiałach buraka ćwikłowego (osiągnięto).
2. Masowa identyfikacja polimorfizmów sekwencyjnych buraka ćwikłowego (osiągnięto).
3. Określenie zarówno fizycznej jak i genetycznej lokalizacji znalezionych polimorfizmów (osiągnięto).
4. Identyfikacja jądrowych genów zaangażowanych w kontrolę ekspresji cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS) u buraka ćwikłowego, ustalenie ich liczby oraz chromosomowej lokalizacji (osiągnięto).
5. Opracowanie zestawu markerów molekularnych pozwalających na wnioskowanie o fenotypie płodności/sterility roślin buraka ćwikłowego (osiągnięto).

Materiały i Metody

1. Materiał roślinny: potomstwa z krzyżowań typu *roślina męskosterylna (MS) x kandydat na linię dopełniającą (B)*, populacje BC1 uzyskane na bazie wyżej wymienionych krzyżowań.
2. Fenotypowanie roślin: wizualna inspekcja obecności pyłku oraz mikroskopowa analiza żywotności pyłku.
3. Hybrydyzacja northern: RNA z pąków kwiatowych, sondy – *atp9* (gen badany) i *atp1* (gen referencyjny).
4. Genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS): usługa zewnętrzna, platforma firmy Illumina, wariant PE 100 lub PE150.

5. Bioinformatyka (analiza danych GBS): BWA, SAMtools, Platypus, VCFtools, MS Excel 2007, JoinMap v.4.
6. Markery PCR (w tym mikrosatelitarne): amplifikacja DNA (ewentualne trawienie restrykcyjne produktów amplifikacji), elektroforeza w agarozie lub poliakrylamidzie.

Opis wyników

Bazą dla realizacji niniejszego projektu były potomstwa uzyskiwane po zapyleniu rośliny męskosterylnej pyłkiem rośliny typowanej do wyprowadzenia linii dopełniającej (tzw. linii B). Ogółem do kwitnienia doprowadzono 79 takich potomstw (F1). Spośród nich 70 wykazywało segregację fenotypową. Podczas wizualnej inspekcji pylników wyróżniano trzy klasy fenotypowe – rośliny męskosterylne, męskopłodne i częściowo-męskopłodne. Wybrane rośliny męskopłodne z segregujących potomstw F1 użyto do produkcji nasion BC1. Ogółem do kwitnienia doprowadzono 8 populacji BC1. Wszystkie te populacje wykazywały segregację pod względem fenotypu płodności. Dla wybranych roślin z uzyskanych potomstw F1 wykonano identyfikację typu cytoplazmy. Wykorzystano do tego opracowane w jednostce wykonawcy markery mitochondrialnego DNA. U 88% badanych roślin stwierdzono obecność cytoplazmy sterylizującej S. U pozostałych 12% roślin wykryto cytoplazmę normalną N – potomstwa z takimi roślinami zostały wykluczone z dalszych prac.

W kontekście potencjalnego związku pomiędzy ekspresją mitochondrialnego genu *atp9* i ekspresją CMS u buraka (Wesołowski i in. 2015),



dla wybranych segregujących potomstw przeprowadzono hybrydizacyjną analizę akumulacji transkryptu tego genu (tzw. *northern blotting*). U ośmiu spośród dziesięciu analizowanych potomstw nie stwierdzono znaczących różnic w akumulacji mRNA *atp9* pomiędzy roślinami męskosterylnymi i roślinami z przywróconą płodnością. W dwóch potomstwach różnice takie wystąpiły, ale miały przeciwstawny charakter.

Genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS) przeprowadzono dla sześciu populacji segregujących. Analizy wykonano w trzech rundach – w każdej z nich genotypowano dwie populacje. Średnia liczba odczytywanych nukleotydów (dla pojedynczej rośliny) wyniosła 235, 380 oraz 362 mln – odpowiednio w pierwszej, drugiej i trzeciej rundzie GBS. Uśredniony parametr jakości sekwencjonowania Q20 wahał się od 98,7% w rundzie pierwszej do 97% w rundzie trzeciej (odpowiednie wartości Q30 wyniosły 95,5 oraz 92,3%). Uzyskane odczyty sekwencyjne były mapowane do genomu referencyjnego (AYZS00000000.2). Dla poszczególnych roślin odsetek zmapowanych odczytów wynosił średnio od 70,7% w rundzie pierwszej do 96,4% w rundzie trzeciej. Prawdopodobnie niezmapowane odczyty miały pochodzenie organellowe. Liczba polimorfizmów sekwencyjnych wykrytych w pojedynczej populacji wahała się od ok. 122 tys. do 1,6 mln. Dla każdej populacji wyjściową pulę polimorfizmów poddawano kilkustopniowej filtracji w celu wyselekcjonowania markerów GBS do konstrukcji mapy genetycznej. Wybierano markery: cechujące się wysoką jakością i biallelicznością, o genotypach odpowiadających charakterowi badanej populacji i z maksymalnie pięcioma nieokreślonymi genotypami, wykazujące oczekiwaną segregację i oddalone od siebie (w sekwencji referencyjnej) o więcej niż 10 kb. W ten sposób pulę markerów GBS dla pojedynczej populacji zredukowano do liczby z przedziału 981 – 2000. Wyselekcjonowane markery wraz z danymi o segregacji fenotypowej wykorzystano do konstrukcji map genetycznych. Utworzone grupy sprzężeń odpowiadały chromosomom buraka. Gen przywracający płodność udało się zmapować dla czterech segregujących populacji. Wszystkie te populacje wykazywały obecność restorera na chromosomie III, co wskazuje, iż odpowiada on genowi *X (Rf1)* zidentyfikowanemu przez Owena (1945). U dwóch spośród tych czterech populacji po dwa markery GBS kolokalizowały się z locus restorera.

Przywracanie płodności przez restorer *X (Rf1)* wykazano także przy użyciu markerów tego genu opracowanych wcześniej dla buraka cukrowego.

W zależności od wykorzystywanego markera i analizowanego potomstwa kosegregacja genotypów markerowych z fenotypem wynosiła od 72 do 96%. Choć u części materiałów nie obserwowano kosegregacji markerów genu *X (Rf1)* z przywracaniem płodności, w materiałach tych nie wykazano również obecności restorera *Z (Rf2)*. Do testowania ewentualnej obecności genu *Z (Rf2)* wykorzystywano markery SSR, CAPS i SCAR z chromosomu IV, w obrębie którego jest zlokalizowany ten restorer.

Na bazie uzyskanych danych sekwencyjnych zaprojektowano zestaw nowych markerów do wnioskowania o statusie allelicznym locus *X/x (Rf1/rf1)*. Największą wartość diagnostyczną miał marker *Rf1-Mors* – jego kosegregacja z fenotypem przywracania płodności sięgała 98,1%. Genotypowanie linii męskosterylnych wykazało znaczącą nierównowagę sprzężeń pomiędzy allelami tego markera i allelami restorera.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Uzyskano materiały roślinne, które segregowały pod względem cechy przywracania płodności – była to seria potomstw po krzyżowaniach typu *roślina MS x kandydat na linię dopełniająca* oraz zestaw populacji typu *backcross*. Materiały te posiadały cytoplazmę sterylizującą S, dzięki czemu na podstawie fenotypu roślin można było wnioskować o obecności bądź braku genu restorerowego.
2. W uzyskanych materiałach roślinnych cecha cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS) nie była związana ze zmianą poziomu akumulacji mRNA genu *atp9*.
3. Zastosowanie genotypowania poprzez sekwencjonowanie (GBS) dla wszystkich badanych populacji wygenerowało zadowalającą ilość danych sekwencyjnych – przeciętne pokrycie sekwencji unikalnych u pojedynczej rośliny wyniosło ok. 1,7 – 1,8 \times . Osiągnięte wartości współczynników jakości Q20 i Q30 gwarantowały przydatność otrzymanych danych sekwencyjnych dla analiz bioinformatycznych ukierunkowanych na identyfikację polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz insercji i delecji.
4. Na bazie markerów GBS oraz danych o segregacji fenotypowej wygenerowano mapy genetyczne analizowanych populacji. Gen restorerowy udało się zmapować u czterech populacji – był on zlokalizowany w chromosomie III, co wskazuje, iż jest on tożsamy z restorerem *X (Rf1)* buraka cukrowego. Na uzyskanych mapach

- sprzężeń cztery markery GBS wykazywały kolokalizację z locus restorera.
- Zastosowanie markerów DNA dla genów restorerowych buraka cukrowego wykazało, iż w badanych materiałach buraka ćwikłowego występuje restorer *X (Rf1)*. Dla żadnego segregującego obiektu nie uzyskano danych wskazujących na obecność restorera *Z (Rf2)*. Wynik ten potwierdzono, przy użyciu nowo opracowanych markerów DNA.
 - Opracowano nowe markery do diagnozowania składu allelicznego locus *X/x (Rf1/rf1)*. Jeden z tych markerów nadaje się do wykorzystania w praktyce hodowlanej.

Literatura

- Owen, F. V. (1945). Cytoplasmically inherited male sterility in sugar beets. *J. Agr. Res.*, 71, 423–440
- Wesołowski, W., Szklarczyk, M., Szalonek, M., Słowińska, J. (2015). Analysis of the mitochondrial proteome in cytoplasmic male-sterile and male-fertile beets. *J. Prot.*, 119, 61–74.

Osiągnięcia projektu

- Uzyskano kolekcję materiałów (pokolenia F1 i BC1) wykazujących segregację pod względem cechy przywracania płodności.
- Ustalono, iż za przywracanie płodności w badanych materiałach buraka ćwikłowego odpowiada restorer *X (Rf1)* z chromosomu III.
- W obrębie uzyskanych grup sprzężeń zmapowano polimorfizmy (markery GBS) pochodzące spoza aktualnego złożenia genomu buraka. Dane te będą pomocne w określaniu chromosomowej lokalizacji skafoldów i kontigów, z których pochodziły wspomniane polimorfizmy (w toku ewentualnej aktualizacji złożenia genomu).
- W toku prac z danymi GBS opracowano program – VCF2CAPS – umożliwiający masowe projektowanie markerów typu CAPS na bazie danych z sekwencjonowania DNA następnej generacji (NGS).

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- Wesołowski W, Szalonek M, Słowińska J, Kwolek D, Domnicz B, Szklarczyk M; Insights into expression of cytoplasmic male sterility in beets. 9th International Conference for Plant Mitochondrial Biology, 17 – 22 maj 2015, Wrocław; poster
- Wesołowski W, Herda A, Domnicz B, Gierski P, Szklarczyk M; Mapping of fertility restorer genes with the use of genotyping by sequencing. 5th Plant Genomics and Gene Editing Congress, 16 – 17 Marzec 2017, Amsterdam, Holandia; poster

Artykuł naukowy

- Wesołowski, W., Domnicz, B., Augustynowicz, J., Szklarczyk, M.; VCF2CAPS – a high-throughput CAPS marker design from VCF files and its test-use on a genotyping-by-sequencing (GBS) dataset (w recenzji).

Doskonalenie ogórka (*Cucumis sativus* L.) pod względem odporności na kanciastą plamistość

Improvement of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in terms of angular leaf spot resistance

Renata Słomnicka, Helena Olczak-Woltman, Aleksandra Korzeniewska, Teresa Gałęcka, Karolina Kaźmińska, Katarzyna Niemirowicz-Szczytt, Grzegorz Bartoszewski✉

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

✉ e-mail: grzegorz_bartoszewski@sggw.edu.pl

Słowa kluczowe: *C. sativus* L., molecular markers, *P. syringae* pv. *lachrymans*, resistance

Cele prowadzonych badań.

Głównym celem badań było skonstruowanie mapy genetycznej i zlokalizowanie na niej *loci* odporności na bakteryjną kanciastą plamistość ogórka. Następnie dążono do opracowania markerów molekularnych sprzężonych ze zidentyfikowanymi *loci* odporności. Kolejnym celem było poznanie odpowiedzi ogórka na poziomie transkryptomycznym na porażenie przez *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* i identyfikacja genów ulegających zróżnicowanej ekspresji po infekcji. Ważnym celem od strony poznania patogenu było zsekwencjonowanie genomu wysoce wirulentnego szczepu *P. syringae* pv. *lachrymans*, wykonanie jego adnotacji funkcjonalnej i porównawczej oraz identyfikacja plazmidów i czynników wirulencji tego patogenu. Wszystkie cele zostały osiągnięte.

Materiały i Metody.

W pierwszym roku badań wykonano izolację bakteryjnego DNA ze szczepu *P. syringae* pv. *lachrymans* 814/98 (*Psl* 814/98). Po dokładnym sprawdzeniu jakości wyizolowanego DNA skonstruowano dwie biblioteki, które następnie zostały poddane sekwencjonowaniu metodą Illumina HiSeq2000. Uzyskaną sekwencję genomu wykorzystano m.in. do identyfikacji powtórzeń bezpośrednich DNA, które posłużyły do zaprojektowania par starterów do identyfikacji szczepów patowaru *lachrymans*. Aby stwierdzić ich przydatność diagnostyczną, pary starterów testowano wykorzystując reakcje multipleks PCR.

Realizując cel główny, czyli konstrukcję

mapy genetycznej i umiejscowienie *loci* odporności na bakteryjną kanciastą plamistość na mapie, wykorzystano 546 polimorficznych markerów DNA, dla których testem χ^2 stwierdzono segregację 1:1 w populacji mapującej Gyl4 × B10. Zastosowano cztery typy markerów: SSR, SNP, *in silico* DArT oraz markery morfologiczne (barwę kolców, żeńskość i chlorotyczne halo związane z objawami kancistej plamistości). W kolejnym roku badań, dzięki analizom bioinformatycznym, znaleziono nowe markery SSR, z których ostatecznie 49 wykorzystano do zagęszczania rejonów mapy związanych z odpornością ogórka na kanciastą plamistość.

Badając interakcję patogen-roślina analizowano dynamikę transkryptomów roślin po zainokulowaniu *P. syringae* pv. *lachrymans*. W wyniku analizy RNA-seq uzyskano profile transkrypcyjne dla linii Gyl4 i B10 w trzech punktach czasowych: przed inokulacją (0 dpi), jeden (1 dpi) i trzy dni po inokulacji (3 dpi).

W aspekcie wdrożeniowym duże znaczenie miało poszukiwanie markerów molekularnych sprzężonych z *loci* odporności na bakteryjną kanciastą plamistość na potrzeby hodowli.

Opis wyników.

W wyniku sekwencjonowania szczepu *Psl* 814/98 uzyskano odczyty o długości 100 pz, które opracowano bioinformatycznie. Łącznie uzyskano odczyty dobrej jakości dla około 1056 Mpz. Po złożeniu odczytów otrzymano sekwencję genomu reprezentowaną przez 102 kontigi sekwencyjne, które utworzyły 35 scaffoldów.



Wielkość genomu szczepu *Psl* 814/98 oszacowano na 6.58 Mb, a zawartość zasad GC na 57.97%. W genomie stwierdzono trzy klasy powtórzeń bezpośrednich DNA: długie powtórzenia, minisatellity i mikrosatellity. Łączna długość bezpośrednich powtórzeń to 50 kbp (poniżej 1% genomu). Zidentyfikowano 6024 geny kodujące białka, a średnia długość genu wynosiła 934 pz, przy czym około 400 genów było dłuższych niż 2000 pz. Genów kodujących RNA było 92, z czego 62 kodowały tRNA, 16 rRNA i 14 sRNA. Zatem łącznie zidentyfikowano 6116 genów, co pozwoliło stwierdzić, że rejony kodujące genomu *Psl* 814/98 stanowią około 86%, zaś niekodujące 14% genomu. Adnotacja funkcjonalna wykazała, że w genomie *Psl* 814/98 można zidentyfikować ponad 20 klas genów, spośród których najliczniejsze są geny związane z transportem błonowym, metabolizmem aminokwasów i węglowodanów. W rejonach unikalnych genomu zidentyfikowano różne typy transpozaz, co potwierdza obecność ruchomych elementów genetycznych u *Psl* 814/98. W genomie *Psl* 814/98 zidentyfikowano liczne efekторы wirulencji, m.in. *hopW1*, *hopZ4*, *hopAR1* i *avrD1*. Nie zidentyfikowano powtórzeń palindromowych typu CRISPR związanych z odpowiedzią komórek bakteryjnych na wirusy. Stwierdzono, że skafoldy 8 i 9 reprezentują plazmidy. Na obu tych skafoldach znaleziono miejsca inicjacji replikacji (*rep*). Na skafoldzie 8 zidentyfikowano szereg genów *tra*, związanych z procesem koniugacji, gen efektorowy *hopAW1* i gen *pilT*. Na skafoldzie 9 zidentyfikowano kilka genów *virB*, związanych z systemem sekrecji typu IV (Słomnicka i in. 2018a).

Skonstruowano mapę genetyczną ogórka dla populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania linii Gy14, odpornej na kanciastą plamistość, z linią podatną B10. Opracowana mapa składała się z siedmiu grup sprzężeń o całkowitej długości 707,1 cM i średniej odległości między markerami 1,3 cM. Długość poszczególnych grup sprzężeń wahała się od 70,5 cM (LG_7) do 140,1 cM (LG_3), a odległość między markerami od 0,76 (LG_7) do 1,77 (LG_6). Liczba markerów tworzących poszczególne grupy sprzężeń wahała się od 50 dla grupy 2 do 105 dla grupy 3. Liczba grup sprzężeń odpowiadała siedmiu chromosomom ogórka. Grupy sprzężeń przypisano do chromosomów w oparciu o markery SSR, dla których znana była lokalizacja chromosomowa. Stwierdzono, że gen *psl*, oznaczający obecność (cecha dominująca) lub brak (cecha recesywna) halo wokół nekrotycznej plamy na liściu po infekcji *Psl* oraz cechy ilościowe (QTL) oznaczone *psl5.1* i *psl5.2*,

związane z nasileniem objawów kanciastej plamistości, zlokalizowane są na chromosomie 5. Gen *psl* zmapowano pomiędzy markerami flankującymi 16326275 i 16326048, w pozycji 31,1 cM. Główny QTL *psl5.1*, wyjaśniający 79,9% zmienności fenotypowej (LOD=32,6), zlokalizowano w tym samym rejonie co gen *psl*. Drugi QTL *psl 5.2* zidentyfikowano pomiędzy markerami SSR00398 (5,1 cM) i 16327512 (27,6 cM). Ten QTL wyjaśniał od 24,1% do 44,7% zmienności fenotypowej, przy wartości parametru LOD między 5,6 a 12. Skonstruowana mapa jest pierwszą tak zaawansowaną mapą genetyczną dla linii ogórka przystosowanych do uprawy w klimacie środkowoeuropejskim. Co więcej, jest to pierwsza mapa lokalizująca geny warunkujące odporność na bakteryjną kanciastą plamistość ogórka (Słomnicka i in., 2018b).

W kolejnym roku badań, dzięki nowym, polimorficznym markerom SSR, zagęszczono rejonowy mapy związane z odpornością na kanciastą plamistość. W genomie podatnej linii B10 zidentyfikowano rejon chromosomu 5, o długości 895 kbp, odpowiadający locus *psl5.1*. Dla linii odpornej Gy14 zidentyfikowano kontigi sekwencyjne reprezentujące ten rejon. Po ich przyrównaniu *in silico* wskazano indel różnicujące linie rodzicielskie populacji mapującej. Spośród zidentyfikowanych różnic, 19 indeli wykorzystano do dalszego zagęszczania mapy i w efekcie skonstruowano ulepszoną, bardziej zagęszczoną w obrębie *loci* odporności na kanciastą plamistość mapę genetyczną dla populacji mapującej Gy14 × B10. Całkowita długość nowej mapy wyniosła 599,9 cM. Łącznie na mapę naniesiono 717 markerów SSR i DaTseq, z czego 123 markery na chromosomie 5 ogórka, a średnia odległością między markerami wyniosła 0,84 cM. Na podstawie oceny obecności chlorotycznego halo wokół uszkodzeń chorobowych na liściach zmapowano gen *psl* na piątym chromosomie w pozycji 2,0 cM i dwa *loci* QTL związane z ilościowym nasileniem objawów, tj. *psl 5.1* i *psl5.2*. Gen *psl* ułożył się w obrębie *locus psl5.1* (Słomnicka i in. 2018b).

Wykonano profilowanie transkryptomyczne linii Gy14 i B10 oraz podjęto próbę identyfikacji genów ogórka ulegających zróżnicowanej ekspresji w 1 i 3 dniu po zainfekowaniu roślin. Metodami bioinformatycznymi stwierdzono, że w badanych tkankach ogórka około 19 tys. genów ulega ekspresji. Odpowiedź linii Gy14 na porażenie przez *Psl* 814/98 była bardziej kompleksowa w porównaniu z linią B10 – obserwowano istotnie większą liczbę genów ulegających zmienionej ekspresji zarówno jeden, jak i trzy dni po inokulacji. U odpornej linii

Gy14 zidentyfikowano 4268 genów ulegających zmienionej ekspresji jeden dzień po inokulacji oraz 4654 geny trzy dni po inokulacji, z czego 1511 genów było wspólnych dla obu punktów czasowych. U linii B10 zidentyfikowano o 40% mniej genów o zmienionej ekspresji w 1 dniu i o 15% mniej w 3 dni po infekcji. Sugeruje to bardziej złożoną, pełniejszą odpowiedź obronną linii odpornej Gy14. Największy wzrost poziomu ekspresji stwierdzono dla genu kodującego białko dehydrynę DHN19 (1 dpi) oraz dla genów kodujących białka związane z patogenezą PR-1 i PR-4 (3 dpi). Dla genów o zróżnicowanej ekspresji wykonano analizy funkcjonalne. Stwierdzono, że największą grupę stanowią geny związane z procesami metabolicznymi i komórkowymi, kodujące białka o właściwościach katalitycznych oraz posiadających zdolność wiązania kofaktorów (Olczak-Woltman i in. 2018).

Ostatnim celem prac było opracowanie markerów molekularnych przydatnych do selekcji materiałów hodowlanych odpornych na bakteryjną kanciastą plamistość. Przy założeniu, że linie o indeksie podatności na chorobę DSI > 5,5 są odporne, dla trzech testowanych markerów (P073, P095 i CAPS SGR) stwierdzono zgodność fenotypu z genotypem na poziomie 83–87%. Wszystkie trzy markery były zlokalizowane w obrębie *locus psl5.2*. Mniejszą zgodność fenotypu z genotypem uzyskano dla markerów *locus psl5.1*, chociaż w populacji mapującej Gy14 × B10 obserwowano większy efekt tego *locus* (Słomnicka i in., 2018b). Markery P073 i P095 są oparte o reakcję PCR i miały charakter kodominujący. Marker CAPS SGR zaprojektowano na bazie polimorfizmu SNP A/G w genie *CsSGR* i uzyskany w reakcji PCR amplikon jest trawiony enzymem Bsp119I. Marker ten charakteryzował się zgodnością fenotypu z genotypem na poziomie 87%, jednak nie posiadał charakteru kodominującego.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Uzyskano dobrej jakości sekwencję genomu wirulentnego szczepu *Psl* 814/98.
2. Oceniono przydatność diagnostyczną trzech *loci* mikrosatelitarnych patogena.
3. Wykonano adnotację funkcjonalną genomu *Psl* 814/98, która pokazała, że w genomie tym występuje 6116 genów i należą one do ponad 20 różnych klas funkcjonalnych, spośród których najliczniej reprezentowane są klasy genów kodujących białka związane z transportem błonowym oraz metabolizmem aminokwasów i węglowodanów.
4. Zidentyfikowano skafoldy genomu *Psl* 814/98

reprezentujące dwa plazmidy tego szczepu.

5. W genomie *Psl* 814/98 zidentyfikowano geny kodujące 24 efekторы wirulencji, z których 8 wydaje się być efektorami charakterystycznymi dla parowaru *lachrymans*.
6. Wyprowadzono i oceniono populację mapującą Gy14 × B10 pod względem cechy odporności na bakteryjną kanciastą plamistość. Wykazano, że populacja ta jest wyrównana genetycznie i może posłużyć do mapowania genów odporności na kanciastą plamistość ogórka.
7. Skonstruowano dobrej jakości mapę genetyczną ogórka, składającą się z siedmiu grup sprzężeń o całkowitej długości 707,1 cM i średniej odległości 1,3 cM pomiędzy markerami oraz jej zagęszczoną wersję o długości 599,9 cM i średniej odległości 0,84 cM pomiędzy markerami.
8. Zmapowano gen *psl* oraz dwa QTL związane z odpornością na kanciastą plamistość w piątej grupie sprzężeń, która odpowiada piątemu chromosomowi ogórka.
9. Uzyskano dobrej jakości odczyty sekwencyjne RNA-seq dla linii Gy14 i B10, które umożliwiły identyfikację genów ogórka ulegających zróżnicowanej ekspresji w po zainfekowaniu roślin *P. syringae* pv. *lachrymans*.
10. Wykazano, że we wczesnych etapach przebiegu kanciastej plamistości szereg genów ogórka ulega zmienionej ekspresji, a najliczniejszą grupę stanowią geny kodujące białka związane z procesami metabolicznymi i komórkowymi o właściwościach katalitycznych.
11. Zidentyfikowano geny, które mogą być markerami ekspresyjnymi stresu u ogórka, kodujące dehydrynę o masie 19kDa i białka związane z patogenezą PR-1 i PR-4.
12. Opracowano zestaw trzech markerów sprzężonych z *loci* odporności na kanciastą plamistość: dwa kodominujące markery typu PCR-Indel: P073 i P095 oraz marker CAPS SGR, który nie posiada charakteru kodominującego.

Osiągnięcia projektu

1. Poznano genom wirulentnego szczepu *Pseudomonas syringae* należącego do parowaru *lachrymans* i wywołującego kanciastą plamistość ogórka.
2. Opracowano zaawansowaną mapę genetyczną ogórka dla populacji RIL, uzyskanej z krzyżowania linii różniących się podatnością na kanciastą plamistość i przystosowanych do uprawy w klimacie środkowo-europejskim, na której zlokalizowano *loci*

warunkujące odporność na bakteryjną kanciąstą plamistość.

3. Opracowano trzy markery oparte o PCR sprzężone z *loci* odporności na kanciąstą plamistość ogórka.

Wykaz publikacji wyników.

Słomnicka R, Olczak-Woltman H, Oskiera M, Schollenberger M, Niemirowicz-Szczytt K, Bartoszewski G. (2018a) Genome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 814/98 indicates diversity within the pathovar. *Eur J Plant Pathol*, 151:663–676.

Słomnicka R, Olczak-Woltman H, Korzeniewska A, Gozdowski D, Niemirowicz-Szczytt K, Bartoszewski G (2018b). Genetic mapping of *psl* locus and quantitative trait loci for angular leaf spot resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Mol Breed* 38:111.

Słomnicka R, Pietluch A, Łęczycka J, Doraczyńska A, Korzeniewska A, Olczak-Woltman H, Niemirowicz-Szczytt K,

Bartoszewski G (2015). Identyfikacja markerów SSR przydatnych do konstrukcji mapy genetycznej i mapowania genów odporności na kanciąstą plamistość liści ogórka (*Cucumis sativus* L.). *Biuletyn IHAR*, 276:93-103.

Doniesienia konferencyjne

Słomnicka R, Olczak-Woltman H, Korzeniewska A, Niemirowicz-Szczytt K, Bartoszewski G (2016). Evaluation of a cucumber RILs population for resistance to angular leaf spot. *Proceedings of XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae*, July 24-28, Warsaw, Poland, 231-233.

Olczak-Woltman H, Słomnicka R, Bartoszewski G (2018). Transcriptomic response of resistant and susceptible cucumber lines to *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* infection. *Proc XIX Diagnostics Conference on Molecular biology in diagnostics of infectious diseases and biotechnology*, WULS, November 17, 2018, Warsaw, Poland, 90-93.

Opracowanie genetycznych, fizjologicznych i biochemicznych podstaw tolerancji ogórka na stres niedoboru wody

Development of genetic, physiological and biochemical basis of cucumber tolerance to water deficiency

Urszula Kłosińska✉, Marzena Nowakowska, Wojciech Szczechura, Katarzyna Nowak, Waldemar Treder, Krzysztof Klamkowski, Katarzyna Wójcik, Elżbieta U. Kozik

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: urszula.klosinska@inhort.pl

Słowa kluczowe: *Cucumis sativus* L., mechanizm dziedziczenia, parametry fizjologiczne i biochemiczne, susza, transkrypty

Cel badań

Celem zadania było wyjaśnienie genetycznych, fizjologicznych i biochemicznych mechanizmów odpowiedzialnych za tolerancję ogórka na niedobór wody oraz analiza porównawcza zmian w ekspresji genów pod wpływem stresu suszy w liniach ogórka zróżnicowanych pod względem badanej cechy.

Materiały i Metody

W pierwszym etapie badań optymalizowano metodę testowania tolerancji ogórka na niedobór wody w pięciu fazach wzrostu: kiełkowanie nasion, stadium siewek, faza rozsady, kwitnienia i owocowania. W warunkach laboratoryjnych (faza kiełkowania nasion i faza siewek) stres suszy indukowano poprzez użycie poliglikolu etylenowego (PEG) w czterech stężeniach: 0, 15, 18 i 25%. Natomiast w warunkach szklarniowych (faza rozsady, kwitnienia, owocowania) zastosowano cztery poziomy wilgotności podłoża: 100, 75, 50 i 25% pojemnikowej pojemności wody (PPW).

W kolejnym etapie badań oceniono pod względem tolerancji na niedobór wody 30 linii ogórka pochodzących z kolekcji Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach oraz z Banku Genów (Plant Introduction, Ames, Iowa, USA), stosując 18% PEG w fazie kiełkowania nasion i w fazie siewek oraz 50% PPW w fazie rozsady, kwitnienia i owocowania. Oceny zmienności

fenotypowej w warunkach laboratoryjnych dokonano na podstawie następujących parametrów: energia kiełkowania nasion, świeża masa siewek, długość korzeni i liścieni siewek. W roślinach rosnących w warunkach suszy glebowej oznaczano parametry: (i) morfologiczne (dynamika wzrostu systemu korzeniowego, wysokość i masa części nadziemnej, wielkość liści, masa korzenia), (ii) fizjologiczne (natężenie fotosyntezy i transpiracji, fluorescencja i zawartość chlorofilu w liściach, przewodność szparkowa) oraz (iii) biochemiczne (zawartość aktywnych form tlenu, poliamin, aktywność enzymów roślinnego układu antyoksydacyjnego).

Tolerancyjną na stres suszy linię B3 oraz wrażliwą linię SU6 poddano wyskoprzepustowemu sekwencjonowaniu transkryptomów (RNAseq), które przeprowadzono w ramach usług obcych.

Wyniki

Obserwowano duże zróżnicowanie pomiędzy badanymi liniami pod względem większości analizowanych parametrów morfologicznych, fizjologicznych i biochemicznych, co potwierdziło wybór najbardziej różnicującego oceniany materiał czynnika stresowego. Zdolność kiełkowania nasion oraz długość korzeni i hypokotyła były wyraźnie skorelowane z tolerancją/wrażliwością na stres suszy fizjologicznej w fazie kiełkowania oraz w siewek ogórka. Stwierdzono, że czynnik stresujący na poziomie PEG 18%



ograniczył w większym stopniu wzrost korzenia niż wzrost hypokotylu u siewek ogórka. Najlepszymi parametrami kiełkowania oraz wzrostu siewek w warunkach suszy charakteryzowały się trzy linie: B3, B8 i SU12, natomiast najbardziej wrażliwe były SU1, SU3, SU4 i SU6, których nasiona nie kiełkowały. Na podstawie badanych cech morfologicznych i niektórych cech fizjologiczno-biochemicznych do linii tolerancyjnych na stres niedoboru wody zaklasyfikowano trzy linie SU1, SU2 i B3. Do linii wrażliwych zaliczono dwie linie SU8 i SU9, które pomimo najmniejszej redukcji wielkości parametrów morfologicznych w warunkach stresowych wykazywały silne wędnięcie i znaczne obniżenie parametrów fizjologicznych (natężenie fotosyntezy, transpiracji i przewodności szparkowej), co świadczy o niskiej zdolności aklimatyzacyjnej ich aparatu fotosyntetycznego do warunków stresu wodnego.

Stres suszy spowodował zmianę wielu parametrów biochemicznych. U wszystkich linii we wszystkich fazach wzrostu obserwowano obniżenie zawartości wody w liściach (RWC) oraz zwiększenie poziomu reaktywnych form tlenu (ROS): anionorodnika ponadtlenkowego oraz rodnika hydroksylowego. W odpowiedzi na wzrost zawartości ROS doszło do zmian aktywności enzymów antyoksydacyjnych oraz zwiększonej kumulacji poliamin. Największy wzrost w warunkach stresu wodnego zanotowano dla kadaweryny (KAD) we wszystkich fazach wzrostu oraz dla sperminy (SPM) w fazie rozsady i w fazie kwitnienia. Natomiast w przypadku enzymów antyoksydacyjnych nie obserwowano wyraźnego spadku lub wzrostu ich aktywności dla poszczególnych linii w zależności od fazy wzrostu.

Porównawcze analizy parametrów fizjologicznych wykazały, że stres suszy glebowej (50% PPW) miał istotnie większy wpływ na obniżenie przewodności szparkowej oraz zmniejszenie natężenia fotosyntezy i transpiracji w fazie kwitnienia i owocowania, aniżeli w fazie rozsady. Natomiast we wszystkich fazach wzrostu u wszystkich badanych linii obserwowano najmniejszą redukcję pod wpływem deficytu wody dla wskaźnika fluorescencji i zawartości chlorofilu w liściach, co może wskazywać, że parametry te nie są wskaźnikiem wrażliwości na stres suszy u ogórka.

Mechanizm dziedziczenia zdolności kiełkowania nasion ogórka w stresie suszy przeprowadzono na populacjach mieszańcowych otrzymanych ze skrzyżowania tolerancyjnej linii B3 (P_1) i wrażliwej SU6 (P_2). Analiza populacji F_2 z zastosowaniem testu c^2 wykazała istnienie epistazy podwójnie

dominującej z segregacją osobników 15: 1 dla wartości $c^2=0,27$ przy $P=0,61$. Stosunek segregujących osobników w populacji Bc_1P_2 do rodzica wrażliwego SU6 wynosił 3: 1 dla wartości $c^2=0,03$ przy $P=0,87$ i potwierdził, że zdolność kiełkowania nasion w stresie suszy warunkowana jest współdziałaniem dwóch genów o charakterze epistazy podwójnie dominującej.

Badania nad określeniem allelicznego charakteru czynników tolerancji ogórka na stres suszy w fazie kiełkowania nasion przeprowadzono w oparciu o rozkład fenotypów w populacjach mieszańcowych otrzymanych ze skrzyżowania dwóch tolerancyjnych linii B3 i B8. Nie obserwowano segregantów w pokoleniu F_2 , a rozkład cechy w analizowanych populacjach był bardzo zbliżony do tolerancyjnych komponentów rodzicielskich, co sugeruje iż obie linie rodzicielskie posiadają podobne uwarunkowania genetyczne zdolności kiełkowania nasion w warunkach niedoboru wody.

Na podstawie uzyskanych wyników RNAseq zidentyfikowano 944 genów ulegających istotnie zróżnicowanej ekspresji (DEGs, differentially expressed genes). Geny wykazujące podobne tendencje w profilach ekspresji, pogrupowano w 9 klastrow z wykorzystaniem hierarchicznego klastrowania i aglomeracyjnej metody grupowania Warda. Na podstawie otrzymanych wyników profili ekspresji z analizy RNAseq oraz danych literaturowych, dotyczących genów odgrywających znaczącą rolę w mechanizmach tolerancji ogórka, wybrano 18 genów, których ekspresję weryfikowano metodą qPCR. U 11 z 18 walidowanych genów odnotowano wyższy poziom ekspresji po 8 godzinach od momentu zadania czynnika stresowego u tolerancyjnej linii B3 w porównaniu do wrażliwej SU6. Wraz z upływem czasu (poddawanie roślin stresowi niedoboru wody) poziom ekspresji tych genów ulegał obniżeniu u linii B3. Natomiast w przypadku wrażliwej linii SU6 ilość ww. transkryptów kształtowała się na relatywnie niskim i dość wyrównanym poziomie przez cały okres zadawania stresu. Analizowano również względny poziom ekspresji badanych genów po trzech tygodniach trwania eksperymentu u czterech linii różniących się reakcją na stres niedoboru wody (wrażliwa linia SU6, trzy linie o różnym poziomie tolerancji: B3, SU2 i SU5). W przypadku 11 genów poziom względnej ekspresji był największy u wrażliwej linii SU6, przewyższając znacznie pod tym względem wszystkie trzy tolerancyjne linie.

U badanych linii ogórka – o różnym stopniu tolerancji na niedobór wody – wykazano pod

wpływem stresu suszy zróżnicowany wzór ekspresji genów kodujących: czynniki transkrypcyjne z rodziny NAC, białka biorące udział w szlakach metabolicznych związanych ze stresem zależnym od ABA, transportery cukrów, białka z rodziny LEA oraz akwaporyny, co jest również zgodne z doniesieniami literaturowymi. Wyróżniono trzy geny: *CsGy6G005230*, *CsGy4G012200* i *CsGy7G015300*, kodujące odpowiednio białka: ERD6-like 16 związane z transportem cukrów, białko argonaute 5 oraz białko związane z wczesną odpowiedzią na odwodnienie. Ich poziom ekspresji w pierwszych 8 godzinach od momentu zadania stresu niedoboru wody był kilkukrotnie wyższy u tolerancyjnej linii B3 w porównaniu do wrażliwej SU6.

Wnioski

1. Badane genotypy ogórka charakteryzowały się dużą zmiennością fenotypową pod względem reakcji na stres niedoboru wody w różnych fazach wzrostu i rozwoju. Dzięki temu stanowiły cenny materiał do określenia fizjologicznych, biochemicznych i genetycznych podstaw tolerancji ogórka na stres suszy.
2. Wykazano, że takie parametry, jak energia kiełkowania nasion, świeża masa siewek, długość korzeni i liścieni siewek mogą być używane do szybkiej selekcji genotypów ogórka tolerancyjnych na stres suszy we wczesnej fazie wzrostu.
3. Stwierdzono brak korelacji pomiędzy długością hypokotyli a sumaryczną długością korzeni siewki w warunkach kontrolnych, natomiast zależność ta występuje w warunkach stresu ($r=0,69$), co potwierdza, że susza wpływa na wzrost całej siewki.
4. Stres suszy spowodował znaczne obniżenie fotosyntezy, transpiracji i przewodności szparkowej u wszystkich linii ogórka. Największą redukcję tych parametrów zanotowano u B3, SU6 i SU9, co może być związane z wrażliwością tych linii na niedobór wody. Natomiast najmniejszą redukcję natężenia fotosyntezy i transpiracji stwierdzono u B8, SU1 i SU2, co może wskazywać na niewielkie uszkodzenie aparatu fotosyntetycznego wywołane niedoborem wody i dzięki temu na wyższy poziom tolerancji w linii na suszę.
5. Najdłuższym systemem korzeniowym oraz najbardziej dynamicznym jego wzrostem, warunkach deficytu wody charakteryzowała się linia SU 9. Długość korzenia tej linii była znacznie dłuższa w suszy w porównaniu do kontroli, co może być związane z jej lepszą adaptacją do warunków niedoboru wody.

6. Wyróżniono trzy geny *CsGy6G005230*, *CsGy4G012200* i *CsGy7G015300* kodujące odpowiednio: białko EDR6 związane z transportem cukrów, białko argonaute 5 i białko związane z wczesną odpowiedzią na odwodnienie. Geny te cechowały się zwiększoną względną ekspresją u tolerancyjnej linii B3 i z tego względu mogą być potencjalnie wykorzystane do identyfikacji markerów związanych z tolerancją roślin ogórka na stres niedoboru wody. Ze względu na duży wpływ warunków środowiskowych na fenotypową ocenę roślin ogórka traktowanych stresem suszy, otrzymane wyniki wymagają dodatkowej weryfikacji.

Osiągnięcia

1. Opracowano metodę testowania ogórka na stres niedoboru wody w warunkach laboratoryjnych (faza kiełkowania nasion i faza siewek) oraz w warunkach szklarniowych (faza rozsady, kwitnienia i owocowania), która umożliwiła efektywną selekcję genotypów tolerancyjnych i wrażliwych.
2. Określono parametry morfologiczne, fizjologiczne i biochemiczne, które mogą być wskaźnikami tolerancji ogórka na deficyt wody.
3. Wyjaśniono mechanizm dziedziczenia zdolności kiełkowania nasion ogórka w warunkach deficytu wody u tolerancyjnej linii B3 oraz wykazano podobne uwarunkowania genetyczne tej cechy u dwóch linii tolerancyjnych B3 i B8, co umożliwi wybór odpowiedniej metody introdukcji tolerancji na stres suszy w fazie kiełkowania do wrażliwych odmian/linii ogórka.
4. Wytypowano linie ogórka, które mogą być cennym materiałem wyjściowym do wykorzystania w programach hodowli twórczej nowych odmian tolerancyjnych na stres suszy.
5. Na podstawie analizy transkryptomów zidentyfikowano trzy geny, które cechowały się zwiększoną względną ekspresją u tolerancyjnej linii B3, i z tego względu mogą być potencjalnie wykorzystane do identyfikacji markerów związanych z tolerancją roślin ogórka na stres niedoboru wody.
6. Otrzymane wyniki stały się podstawą do przygotowania nowego projektu w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej zatwierdzonego do realizacji w latach 2021–2025: Zadanie 34 pt. „Badanie molekularnych mechanizmów

odporności ogórka na najważniejsze czynniki biotyczne i abiotyczne”.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

Kłosińska U., Kozik E.U., Treder W., Klamkowski K. 2016. Differential effects of drought stress on germination and seedling growth of cucumber accessions. In: Kozik E.U., Paris H.S. (eds) Proceedings of Cucurbitaceae XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding. Warsaw, 24–28 lipca 2016: 217–221.

Kłosińska U., Nowakowska M., Szczechura W., Nowak K., Treder W., Klamkowski K., Wójcik K. 2019. Opracowanie genetycznych, fizjologicznych i biochemicznych podstaw tolerancji ogórka na stres niedoboru wody. Biuletyn IHAR 286, 291–294. (*komunikat*).

Doniesienia konferencyjne

Kłosińska U., Kozik E.U., Treder W., Klamkowski K. 2016. Optimization of testing methods of cucumber for drought tolerance. In: Kozik E.U., Paris H.S. (eds) Abstracts of Cucurbitaceae XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding, Warszawa, 24–28 lipca 2016: 50 (abstract

i poster).

Kłosińska U., Kozik E.U., Treder W., Klamkowski K. 2016. Differential effects of drought stress on germination and seedling growth of cucumber accessions. XIth Eucarpia Meeting on Genetics and Breeding of Cucurbitaceae 2016, Warszawa, 24–28 lipca 2016 (*poster*).

Kłosińska U., Kozik E.U., Treder W., Klamkowski K. 2017. Genotypic differences in some morphological traits of cucumber seedlings under drought stress. SOLCUC2017: The XIV Solanaceae and III Cucurbitaceae Genomics Joint Conference, Walencja, Hiszpania, 3–6 września 2017 (*poster*).

Kłosińska U., Kozik E.U., Treder W., Klamkowski K. 2017. Physiological responses of cucumber plants to water deficit. SOLCUC2017: The XIV Solanaceae and III Cucurbitaceae Genomics Joint Conference, Walencja, Hiszpania, 3–6 września 2017 (*poster*).

Kubiś J., Kłosińska U., Klamkowski K., Korbas A., Kozik E.U., Rybus-Zajac M., Zielezińska M., Treder W., Wójcik K. 2017. The potential acclimation of cucumber lines to water deficit. VIII International Agriculture Symposium „AGROSYM 2017”, Jahorina, 5–8 października 2017, Bośnia i Hercegowina (*poster*).

Badania nad opracowaniem molekularnej metody identyfikacji genów warunkujących ważne cechy użytkowe pomidora

Studies on the development of molecular methods for identifying genes responsible for important traits of tomato

Marzena Nowakowska✉, Urszula Kłosińska, Katarzyna Nowak,
Wojciech Szczechura

Instytut Ogrodnictwa - Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: marzena.nowakowska@inhort.pl

Słowa kluczowe: bakteryjna plamistość, funkcjonalna męska sterylność, fuzaryjne wędniecie, selekcja wspomagana markerami

Cel badań

Celem badań było opracowanie molekularnej procedury umożliwiającej identyfikację genów warunkujących następujące cechy użytkowe pomidora: odporność na bakteryjną plamistość [*Xanthomonas vesicatoria* (Xv), rasa T2] oraz fuzaryjne wędniecie [*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol), rasa 1], a także funkcjonalną męską sterylność uwarunkowaną zarówno genem *ps* (ang. *positional sterility*), jak i *ps-2* (ang. *positional sterility 2*). W przypadku funkcjonalnej męskiej sterylności oraz odporności pomidora na fuzaryjne wędniecie założone cele zostały zrealizowane w 100%.

Materiały i metody

W przypadku bakteryjnej plamistości pomidora badania rozpoczęto od określenia czynników genetycznych warunkujących odporność linii PI 114490 (*S. lycopersicum* var. *cerasiformae*) na *X. vesicatoria*. Mechanizm dziedziczenia opracowano na podstawie oceny porażenia przez rasę T2 roślin populacji mieszańcowych: F₁, RF₁, F₂, Bc₁P₁, Bc₁P₂ pochodzących ze skrzyżowania linii PI 114490 (P₁) z podatną odmianą Rumba (P₂). Z kolei do badań nad identyfikacją polimorfizmu DNA formy odpornej i podatnej na *X. vesicatoria* wykorzystano zarówno markery o określonej lokalizacji chromosomowej (650 markerów SSR, 50 COSII), jak i systemy markerów niezdefiniowanych sekwencyjnie (20 serii starterów RAPD). Markery różnicujące linie rodzicielskie wykorzystano do konstrukcji szkieletowej mapy genetycznej populacji mapującej F₂

(‘Rumba’ x PI 114490) liczącej 114 roślin. Analizę sprzężeń przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego JoinMap 4.1 (Van Ooijen 2011), stosując wartość minimalną LOD = 3,0 dla grupowania markerów oraz funkcję Kosambi do ustalenia dystansu genetycznego pomiędzy markerami. Pozycję markerów na mapie weryfikowano dostępnymi mapami genetycznymi dla pomidora (Sol Genomics Network, <http://solgenomics.net>). W następnym etapie mapę genetyczną oraz dane fenotypowe dotyczące poziomu odporności/podatności poszczególnych roślin F₂ analizowano przy pomocy programu MapQTL 6.0 (www.kyazma.nl/index.php/MapQTL) celem zlokalizowania regionów determinujących cechę odporności u linii PI 114490.

W przypadku fuzaryjnego wędnięcia, materiał badawczy stanowiły: linia odporna (LA 3475) i podatna (A 100) na rasę 1 *Fol* oraz populacje mieszańcowe (F₂, F₃) pochodzące ze skrzyżowania ww. linii. Ocenę stopnia porażenia roślin przez rasę 1 *Fol* przeprowadzono zgodnie z wytycznymi CPVO-TP/044/3 wykorzystując do inokulacji izolat PRI 20698 charakteryzujący się wysoką agresywnością oraz stabilnością i powtarzalnością w wywoływaniu objawów chorobowych. Do analizy polimorfizmu DNA linii rodzicielskich wykorzystano 50 par starterów zaprojektowanych do czterech genów (*Solyc11g011080*, *Solyc11g011180*, *Solyc11g011190*, *Solyc11g011880*) zlokalizowanych na krótkim ramieniu chromosomu 11, na którym to zmapowano gen *I*. Sprzężenie wyróżnionych markerów polimorficznych z genem *I* oceniano na podstawie



porównania oceny fenotypowej i molekularnej populacji $F_{2,3}$ przy pomocy metody BSA. Specyficzność markerów polimorficznych sprawdzano na 35 populacjach referencyjnych cechujących się odpornością na fuzaryjne wędnięcie, wynikającą z obecności dominującego genu *I*.

Badania związane z funkcjonalną męską sterylnością miały na celu identyfikację markerów sprzężonych zarówno z genem *ps*, jak i *ps-2*. Biorąc pod uwagę to, że mutanty *ps* wykazują fenotypowe podobieństwo zarówno pod względem budowy kwiatu, jak i sterylności do mutantów *slcer6* (Smirnova i in. 2013), na podstawie sekwencji genu *SICER6* opracowano dwa markery CAPS (T1535/*MboI*, Cer6–3/*TaqI*). Ich przydatność do selekcji roślin *ps* weryfikowano poprzez analizę porównawczą wyników genotypowania i oceny fenotypowej: (i) 21 linii *ps* o zróżnicowanym pochodzeniu, (ii) dwóch populacji F_2 (segregujących pod względem genu *ps*) oraz (iii) 84 roślin z cechą markerową kwiatu *ps* wyselekcjonowanych z kolekcji PlantiCo Zielonki. Dla wybranych linii (*ps* vs płodne) przeprowadzono także porównawcze analizy ekspresji genu *SICER6* w różnych organach tj.: w liściach, łodydze, kwiatach (osobno dla poszczególnych jego części: działkach kielicha, płatkach, słupku i pręcikach) oraz w owocach (skórka owocu czerwonego w pełni dojrzałego, skórka i miąższ w pełni wykształconego owocu zielonego). Natomiast w przypadku genu *ps-2* weryfikowano użyteczność dwóch markerów CAPS: *ps-2ABL* (Gourget i in. 2009) i C4–30 (Staniaszek i in. 2012) na materiale obejmującym: 6 linii pomidora *ps-2* o różnym pochodzeniu, 2 linie cechujące się sterylnością, ale o kwiatach typowych dla roślin płodnych, 2 komercyjnie dostępne odmiany heterozyjne z genem *ps-2*, 10 linii płodnych, 2 populacje F_2 segregujące pod względem genu *ps-2*.

Opis wyników

Analiza wyników oceny odporności roślin pomidora na *X. vesicatoria* (rasa T2) wykazała, iż linia PI 114490 (P_1) charakteryzowała się wysokim poziomem odporności na rasę T2 (DSI = 1,6). Wszystkie rośliny drugiego komponenta rodzicielskiego ('Rumba') zaklasyfikowano jako podatne (klasy 6 do 8), a wartość wskaźnika porażenia wynosiła 7,5. Pokolenie F_1 i RF_1 wykazało średni poziom odporności (DSI odpowiednio 5,2 i 5,4) z zakresem zmienności w trzech klasach porażenia (5 do 7). Zbliżone wartości DSI oraz podobny rozkład roślin w klasach porażenia dla populacji F_1 oraz RF_1 świadczą o tym, że cecha odporności na *X. vesicatoria* nie jest uwarunkowana czynnikiem macecznym. Pokolenie F_2 (DSI = 5,4) pod

względem porażenia było zbliżone do populacji F_1/RF_1 , ale charakteryzowało się większym rozrzutem roślin w klasach porażenia (1 do 8). Rozkład roślin w poszczególnych klasach wyraźnie odbiegał od rozkładu normalnego, a najliczniejszą grupę w pokoleniu F_2 stanowiły rośliny o najwyższym stopniu podatności (59%). Klasyczna analiza genetyczna wykazała, że segregacja roślin w pokoleniu F_2 we wszystkich testach znacznie odbiegała od założeń teoretycznych dla modelu dziedziczenia jedno-, dwu- oraz trzy-genowego. Nie stwierdzono również nieallelicznych interakcji dla dwóch genów. W związku z powyższym, analizę cechy odporności na *X. vesicatoria* u PI 114490, rozpoczęto od zbadania modelu dziedziczenia addytywno-dominującego testami skali Mather'a parametrów A, B, C (Mather i Jinks, 1982). Odrzucono model addytywno-dominujący dziedziczenia cechy odporności, ponieważ wartość przynajmniej jednego parametru była istotnie różna od zera. Z kolei analiza według sześcioparametrowego modelu dziedziczenia Jinks'a i Jones'a (1958) wykazała istotność efektu addytywnego (d). O addytywnym współdziałaniu genów świadczą również wysokie wartości współczynnika aA (efekt addytywny = 3,0), przewyższające wartość współczynnika dA (efekt dominacji = 0,9). W następnym etapie badań, w oparciu o markery różnicujące linie rodzicielskie (41 markerów SSR, 22 markery RAPD, 4 markery CAPS) skonstruowano szkieletową mapę genetyczną dla populacji mapującej F_2 (A 100 x PI 114490). Wyodrębniono jedną grupę sprzężeń, którą następnie przypisano do chromosomu 11. Jednak w jej obrębie nie udało się zidentyfikować regionów odpowiedzialnych za odporność linii PI 114490 na *X. vesicatoria*.

W badaniach nad poszukiwaniem markerów sprzężonych z genem *I*, warunkującym odporność pomidora na fuzaryjne wędnięcie wywołane przez rasę 1 *Fol*, zidentyfikowano 19 markerów CAPS, dla których obserwowano różnice w wielkościach produktów trawienia analitycznego między odporną na *Fol* linią LA 3475 i podatną A 100. W wyniku testów fitopatologicznych, w pokoleniu $F_{2,3}$ zidentyfikowano 92 rośliny odporne (w tym 30 homozygoty dominujące i 62 heterozygoty pod względem locus *I*) oraz 8 roślin podatnych (homozygoty recesywne). Analizy z użyciem 19 markerów różnicujących formy rodzicielskie na wyselekcjonowanych próbach DNA z populacji mapującej F_2 o skrajnych fenotypach, umożliwiły wytypowanie 10 markerów potencjalnie sprzężonych z genem *I*. Porównując dane fenotypowe (klasyfikacja roślin na odporne i podatne, niezależnie od statusu homozygotyczności locus) oraz wyniki genotypowania pojedynków

populacji F_2 , dla siedmiu markerów stwierdzono całkowitą zgodność oceny fenotypowej z oceną molekularną (współczynnik korelacji – 100%). W przypadku analizy zgodności oceny fenotypowej i molekularnej w zakresie statusu locus *I*, współczynniki korelacji były nieco niższe (85% do 87%, w zależności od użytego markera), co wynikało z różnic w klasyfikowaniu roślin odpornych jako homozygoty dominujące lub heterozygoty w teście fitopatologicznym i analizie molekularnej. Celem weryfikacji przydatności zidentyfikowanych 7 markerów do selekcji roślin odpornych na rasę 1 *Fol*, przeprowadzono dodatkową analizę z wykorzystaniem 35 linii/odmian referencyjnych z genem *I*. Niezależnie od zastosowanego markera, u wszystkich linii za wyjątkiem jednej (LA 0276), uzyskano profil charakterystyczny dla allelu *I*. Warto jednak dodać, że pomimo informacji z banku genów o odporności linii LA 0276 na rasę 1 *Fol*, jej rośliny w teście fitopatologicznym były podatne.

W ramach realizacji niniejszego projektu opracowywano również molekularną metodę identyfikacji genów warunkujących funkcjonalną męską sterylność (*ps*, *ps-2*) pomidora. W przypadku genu *ps*, niezależnie od użytego markera (T1535/*MboI*, Cer6–3/*TaqI*), analiza produktów restrykcyjnych wykazała obecność produktów charakterystycznych dla allelu *ps* u 19 spośród 21 badanych funkcjonalnie męskosterylnych linii. W profilach pozostałych dwóch linii *ps* stwierdzono obecność produktów specyficznych dla roślin płodnych, pomimo iż u wszystkich roślin tych linii obserwowano charakterystyczną dla genu *ps* budowę kwiatu. U wszystkich 84 roślin określonych przez PlantiCo Zielonki jako genotypy homozygotycznie sterylne (*ps*), uzyskano profil restrykcyjny amplitonu charakterystyczny dla genotypu *ps/ps*, co oznacza całkowitą zgodność oceny fenotypowej i molekularnej. Również w przypadku analizy dwóch populacji F_2 odnotowano wysoką zgodność ocen fenotypowej i molekularnej w identyfikacji genu *ps* (współczynnik korelacji – 96 do 98%, w zależności od pochodzenia F_2), co świadczy o wysokiej wartości diagnostycznej wyróżnionych markerów do identyfikacji genu *ps*. Wniosek ten znajduje również potwierdzenie w wynikach analiz względnej ekspresji genu *SICER6*, wskazujących na obniżony poziom jego ekspresji u linii *ps* w porównaniu z liniami płodnymi, niezależnie od badanego organu. Uzyskane przez nasz zespół wyniki pozostają jednak w sprzeczności z konkluzją Leide i in. (2011), według których mutacja *ps* nie jest tożsama z mutacją *slcer6*, i z tego względu wymagają dodatkowych badań mających na

celu zbadanie zależności między obiema mutacjami. W przypadku genu *ps-2* wykazano wyższą informatywność markera *ps-2ABL* opracowanego na podstawie sekwencji sklonowanego genu *ps-2* w porównaniu z markerem C4–30.

Wnioski z prowadzonych badań

- Odporność PI 114490 na *X. vesicatoria* uwarunkowana jest poligenicznie. Zbyt mała liczba markerów generujących polimorfizm DNA odpornej linii PI 114490 i podatnej 'Rumba' wskazują na potrzebę kontynuowania badań nad poszukiwaniem nowych markerów, które pozwoliłyby na identyfikację loci odpowiedzialnych za odporność roślin pomidora na rasę T2. Niezwykle pomocne w przypadku badanej cechy byłoby albo wykorzystanie wysokoprzepustowych metod genotypowania populacji mapującej generujących mapy o wysokim zagęszczeniu.
- Markery o wysokim sprzężeniu z genem *I* zidentyfikowane w trakcie realizacji niniejszego zadania mogą być rutynowo stosowane w diagnostyce molekularnej do selekcji roślin odpornych na rasę 1 *Fol*.
- Wyższa efektywność markera *ps-2ABL*, opracowanego na podstawie sekwencji sklonowanego genu *ps-2*, w porównaniu z markerem C4–30 wskazuje na większą jego przydatność w identyfikacji genu *ps-2*.
- Markery opracowane na podstawie sekwencji genu *CER6* (T1535/*MboI*, Cer6–3/*TaqI*) mogą być rutynowo stosowane w diagnostyce molekularnej do identyfikacji roślin *ps*.
- Obniżony poziom ekspresji genu *SLCER6* we wszystkich analizowanych organach linii męskosterylnych może sugerować iż mutacje *slcer6* oraz *ps* są tożsame.

Osiągnięcia projektu

Opracowanie molekularnej procedury identyfikacji genów: *I*, *ps* i *ps-2* warunkujących odpowiednio: odporność pomidora na fuzaryjne wędniecie (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, rasa 1), funkcjonalną męską sterylność *ps* (ang. *positional sterility*), oraz *ps-2* (ang. *positional sterility 2*).

Wykaz publikacji wyników

Nowakowska M., Szezechura W., Nowicki M., Nowak K., Kozik E. 2017: Comparisons of *slcer6* and *ps* mutants suggest identical mutation underlying the positional sterility in tomato. SOLCUC 2017, Walencja, 3–6 września 2017, Hiszpania. Materiały konferencyjne s. 192.

Badania cytologicznych i biochemicznych mechanizmów odporności roślin w patosystemach pomidor-*Phytophthora infestans* oraz ogórek-*Pseudoperonospora cubensis*

Studies of cytological and biochemical mechanisms of plant resistance in the pathosystems tomato - *Phytophthora infestans* and cucumber-*Pseudoperonospora cubensis*

Wojciech Szczechura✉, Marzena Nowakowska, Urszula Kłosińska, Katarzyna Nowak, Krzysztof Rutkowski

Instytut Ogrodnictwa - Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: wojciech.szczechura@inhort.pl

Słowa kluczowe: enzymy antyoksydacyjne, fitohormony, inhibitory biosyntezy etylenu, mączniak rzekomy, reaktywne formy tlenu, zaraza ziemniaka

Celem podjętego tematu było wyjaśnienie biochemicznych i molekularnych podstaw odporności pomidora na *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary i ogórka – *Pseudoperonospora cubensis* [(Berk. et Curt.) Rostov.], sprawcy – odpowiednio – zarazy ziemniaka oraz mączniaka rzekomego.

Material badawczy i Metody

Material badawczy stanowiło 5 linii dzikich gatunków pomidora różnicowanych pod względem reakcji na porażenie przez *P. infestans*: *S. pimpinellifolium* (LA 1604, L 3708, WV 700), *S. habrochaites* (LA 1033) oraz *S. pennellii* (LA 716) o różnicowanym poziomie odporności na *P. infestans*. Jako standard podatności wykorzystano populacje: *S. lycopersicum* ‘Rumba’, *S. pimpinellifolium* LA 722, *S. habrochaites* LA 2650. W przypadku ogórka, badano trzy populacje odporne (‘Ames 2354’, PI 197088, PI 330628) oraz dwie podatne (PI 175695, ‘Coolgreen’) na *P. cubensis*.

W projekcie zbadano biochemiczne mechanizmy odporności na wnikanie patogenów. Przeprowadzono analizy ilościowe najważniejszych biochemicznych markerów odporności w komórkach przed oraz w różnych odstępach czasu po inokulacji *P. infestans* i *P. cubensis* (od 2 do 72 godzin po inokulacji); oznaczenia spektrofotometryczne reaktywnych form tlenu (ROS): rodnika nadtlenkowego oraz hydroksylowego, dynamiki zmian aktywności enzymów

układu antyoksydacyjnego: dysmutazy ponadtlenkowej, katalazy, peroksydazy gwajakolowej, oksydazy polifenolowej oraz obronnego: poligalakturonazy, a także poziomu substancji ochronnych: wolne fenole, lignina, kaloza, w tkankach roślin.

Zbadano dynamikę ekspresji genów kodujących enzymy uczestniczące w mechanizmach obronnych: amoniakoliazę fenyloalaninową; lipoksygenazę i syntazę kalozy; geny będące przedstawicielami rodzin PR (ang. pathogenesis-related; np. *PR1b*: basic *PR1*; *PR2a*: acidic glucanase; *PR2b*: basic glucanase; *PR3*: Acidic Chitinase 3 oraz Basic Chitinase 9; *PR5*: Osmotin like *PR5*; *PR7*: *P69A* oraz subtulinin-like; *MT2bL*: Metallothionein 2b-like), oraz markery udziału szlaków biosyntezy kwasu jasmonowego (*LOX2*, *AOS*, *AOC2*, *OPR3*) i salicylowego (*AD4*, *cpr1*, *NahG*), znormalizowane w odniesieniu do podlegającego konstytutywnej ekspresji genu *M2* jako odniesienia metodą Real-Time-RT-PCR (łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym) przed i po inokulacji patogenem w różnych odstępach czasowych (od 2 do 72 godzin po inokulacji). Przeprowadzono również analizę ekspresji genu kodującego wakuolarną endoproteazę (*VPE*) w odpowiedzi na infekcję; enzym ten bierze udział w degradacji białek podczas programowanej śmierci komórki, a jego podwyższona ekspresja sugeruje odporność bazującą na nadwrażliwości.



W celu wyjaśnienia roli etylenu w regulacji reakcji odpornościowych w przedmiotowych patosystemach, zbadano tempo biosyntezy tego regulatora wzrostu w zdrowej i zainfekowanej tkance metodą chromatografii gazowej oraz wpływ na przebieg infekcji inhibitorów jego biosyntezy: aminoetoksywinyloglicyny (AVG) i tiosiarczanu srebra (STS) na podstawie aktywność oksydazy ACC. Ponadto, sprawdzono wpływ egzogennych fitohormonów: jasmonianu metylu (Me-JA), kwasu salicylowego (SA) i kwasu DL- β -aminomasłowego na przebieg infekcji i indukcję mechanizmów obronnych.

Analizy związane z oznaczeniem: wolnych rodników, aktywności enzymatycznych, związków ochronnych, zmian poziomu ekspresji genów związanych z patogenezą, roli inhibitorów biosyntezy i działania etylenu w procesie patogenezy, oraz fitohormonów na przebieg infekcji zostały wykonane w Pracowni Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych oraz Pracowni Przechowalnictwa i Fizjologii Pozbiorczej Owoców i Warzyw Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach.

Wyniki

Zidentyfikowana wcześniej przez Nowakowską i in. (2014) zależność odporności pomidora na *P. infestans* od wieku roślin została potwierdzona badaniami biochemicznymi aktywności enzymatycznych, kumulacji substancji obronnych oraz poziomu generowanych wolnych rodników w 4- i 8- tygodniowych roślinach pomidora. Badane patosystemy charakteryzują się odmiennymi mechanizmami obrony biochemicznej, wynikającymi z systemów troficznych patogenów. *Pseudoperonospora cubensis* jako patogen obligatoryjny wymusza inne odpowiedzi w podatnych/odpornych roślinach ogórka, niż hemibiotroficzny *Phytophthora infestans* w pomidorze. Linie odporne pomidora i ogórka reagowały szybszymi i bardziej dynamicznymi zmianami aktywności enzymów red-ox w odpowiedzi na atak przedmiotowymi patogenami niż linie podatne. W patosystemie ogórek – *P. cubensis* najważniejsze zaobserwowane trendy to wzrost aktywności oksydazy polifenolowej w czasie, wyższy w roślinach podatnych aniżeli w roślinach odpornych, oraz wyraźny wzrost aktywności poligalakturonazy w czasie w roślinach odpornych. Należy również zwrócić uwagę na tendencje wzrostowe aktywności dysmutazy ponadtlenkowej w czasie, w tym szczególnie wysoką aktywność tego enzymu w roślinach ‘Ames 2354’. Badane linie ogórka wykazały nieznaczne wahania zawartości wolnych fenoli z tendencją spadku ich zawartości w miarę

wydłużania infekcji *P. cubensis*. U linii odpornej PI 330628 oraz podatnej ‘Coolgreen’ wykazano wzrost zawartości kalozy w odpowiedzi na atak patogena. U podatnych obiektów: ‘Coolgreen’ i PI 175695 na skutek inokulacji roślin *P. cubensis* obserwowano również wzmożoną syntezę lignin. Natomiast w patosystemie pomidor – *P. infestans* zaobserwowano wyższą zawartość wolnych fenoli w roślinach 8-tygodniowych w porównaniu z 4-tygodniowymi, co więcej, rośliny w fazie 8-tygodni, niezależnie od wykazywanej przez daną linię odporności na *P. infestans*, cechowały się wyraźną tendencją wzrostową zawartości wolnych fenoli wraz z rozwojem choroby. Podobne zależności obserwowano również dla zawartości kalozy (faza 8 tygodni). Rośliny 4-tygodniowe szybko metabolizowały kalozę, z początkowego dosyć wysokiego poziomu na początku eksperymentu (0 dpi, inokulacja patogenem), do jej zmiennych zawartości w późniejszych etapach eksperymentu.

W przypadku reaktywnych form tlenu: rodnika nadtlenkowego oraz hydroksylogowego, zaobserwowano ich gromadzenie w komórkach roślin linii odpornych ogórka od 2 dnia po infekcji *P. cubensis*. W przypadku pomidora do wzrostu poziomu obu badanych rodników dochodziło wraz z wiekiem roślin, niezależnie od poziomu odporności badanych linii. W fazie 4-tygodniowej, rośliny wszystkich badanych linii nie wykazywały wyraźnych trendów w zawartości rodnika nadtlenkowego oraz hydroksylogowego. Obserwacja takich trendów dopiero w roślinach 8-tygodniowych wydaje się potwierdzać obserwowaną zależność między wiekiem roślin, a odpornością na patogena, z drugiej strony, potwierdza to udział aktywnych form tlenu w odpowiedzi na stres biotyczny.

Analizy cytologiczne badanych patosystemów wykazały polaryzację aktyn wokół miejsc infekcji patogenów, skutkując wzmocnieniem ściany komórkowej, co jest powszechnym mechanizmem obrony powierzchniowej. Udział aktyn w mechanizmach obronnych stwierdzono w obu patosystemach, niezależnie od poziomu odporności poszczególnych linii oraz fazy rozwojowej w przypadku roślin pomidora.

Analiza porównawcza ekspresji wybranych genów kodujących białka zaangażowane w indukcję mechanizmów obronnych w komórkach liści obu gatunków w różnych fazach infekcji.

Dla każdego z badanych patosystemów, poziom ekspresji, wybranych do badań genów kodujących białka zaangażowane w indukcję mechanizmów

obronnych, był zależny od poziomu odporności testowanych linii/odmian. Generalnie u ogórka w odpowiedzi na inokulację *P. cubensis* aktywacja transkryptów: *PR1*, *PR3*, *PR5*, *cpr1*, *pad4*, *VPE* następowała szybciej w liniach/odmianach odpornych niż w podatnych. Wzrost ekspresji transkryptu *VPE* obserwowany u 'Ames 2354' i PI 175695 w odpowiedzi na inokulację roślin *P. cubensis* może wskazywać na występowanie u tych linii odporności typu HR. U pomidora wykazano indukowanie różnych mechanizmów obronnych w zależności od gatunku/odporności testowanych linii. W linii LA 1033 (*S. habrochaites*) obserwowano aktywację odpowiedzi systemicznej SAR (ang. Systemic Acquired Resistance) po infekcji *P. infestans* zależnej od kwasu salicylowego i jasmonowego, o czym może świadczyć aktywacja genów z kilku grup PR oraz CPR1, PAL i PAD4. Natomiast brak wyraźnych tendencji w aktywacji genów kodujących białka związane z patogenezą u linii odpornych *S. pimpinellifolium* (WV 700, L 3708, LA 1604) może wskazywać na występowanie u nich raczej reakcji obronnej typu ETI (ang. Effector-Triggered Immunity) wynikającej z obecności białek odporności R (kodowanych przez geny odporności).

Analiza udziału wybranych regulatorów wzrostu u ogórka i pomidora w procesie patogenezы i generowaniu reakcji odpornościowych.

Potraktowanie roślin pomidora i ogórka, przed inokulacją patogenami, roztworem tiosiarczanu srebra spowodowało indukowanie odporności u odmian podatnych. Znaczny wzrost produkcji etylenu pomimo potraktowania roślin roztworem STS sugeruje, iż etylen może uczestniczyć w mechanizmach odpornościowych. Ani jasmonian metylu ani kwas salicylowy nie indukowały odporności pomidora na *P. infestans* i ogórka na *P. cubensis*. Zastosowanie roztworu kwasu DL-β-aminomasłowego miało korzystny efekt na ograniczenie objawów mączniaka rzekomego u ogórka.

Wnioski

1. Wykazano zależność między poziomem odporności roślin pomidora na infekcję *P. infestans* a wiekiem roślin
2. Niezależnie od badanego patosystemu linie odporne reagowały szybszymi i bardziej dynamicznymi zmianami aktywności enzymów red-ox w odpowiedzi na atak patogena niż linie podatne oraz wykazywały tendencję wzrostową zawartości wolnych fenoli, lignin i kalozy (za wyjątkiem poziomu kalozy w ogórku – tendencja spadkowa). Zaobserwowano

tendencję wzrostową w koncentracji rodnika nadtlenkowego i hydroksylowego zarówno w ogórku, jak i w 4- i 8-tygodniowych roślinach pomidora

3. Wykazano wyższy poziom ekspresji genów związanych z patogenezą w odpornych genotypach pomidora i ogórka po infekcji odpowiednio *P. infestans* i *P. cubensis*. Generalnie aktywacja genów kodujących białka zaangażowane w mechanizmy obronne u pomidora i ogórka takich jak: *PR1*, *PR3*, *PR5*, *cpr1*, *pad4*, w odpowiedzi na infekcję patogenami następowała szybciej w liniach/odmianach odpornych niż w podatnych. Wzrost poziomu reaktywnych form tlenu oraz wzrost ekspresji transkryptu *VPE* obserwowany u 'Ames 2354' i PI 175695 w odpowiedzi na inokulację roślin *P. cubensis* może wskazywać na występowanie u tych linii odporności typu HR. Szybka aktywacja (4 godziny po inokulacji) oraz nadekspresja transkryptu *VPE* w WV 700, L 3708, LA 1604 może świadczyć o reakcji nadwrażliwości w badanych liniach pomidora.
4. Traktowanie podatnych roślin pomidora i ogórka roztworem tiosiarczanu srebra powoduje indukcję odporności na przedmiotowe patogeny.
5. Zastosowanie kwasu DL-β-aminomasłowego ogranicza objawy mączniaka rzekomego na roślinach ogórka.

Osiągnięcia projektu

Możliwość wykorzystania tiosiarczanu srebra (STS) w hodowli pomidora i ogórka oraz kwasu DL-β-aminomasłowego (BABA) w hodowli ogórka jako induktorów odporności na infekcje przez *P. infestans* i *P. cubensis*.

Wykaz publikacji wyników

Komunikaty

Szczuchura W., Nowakowska M., Kłosińska U., Nowak K., Rutkowski K. 2019. Badania cytologicznych i biochemicznych mechanizmów odporności roślin w patosystemach pomidor-*Phytophthora infestans* oraz ogórek-*Pseudoperonospora cubensis*. Studies of cytological and biochemical mechanisms of plant resistance in the pathosystems tomato-*Phytophthora infestans* and cucumber-*Pseudoperonospora cubensis*. Biuletyn IHAR 286, 299–302.

Prezentacja wyników na konferencjach międzynarodowych

Szczuchura W., Kłosińska U., Nowakowska M., Markiewicz M., Niezgoda A., Nowak K., Nowicki M. 2018. Biochem-

ical and molecular events underlying cucumber resistance to downy mildew (*Pseudoperonospora cubensis*). ASHS Annual Conference 31 lipca-3 sierpnia, 2018, Washington DC, DOI: 10.13140/RG.2.2.14469.45283.
Szczechura W., Nowakowska M., Sowik I., Markiewicz M.,

Nowicki M., Nowak K., Kozik E.U. 2017. Cellular and biochemical mechanisms of tomato resistance against *Phytophthora infestans*. XIV Solanaceae and 3rd Cucurbitaceae Joint Conference, 3-6 września 2017 Valencja, Hiszpania, p 193.

Analiza wpływu hipoksji na zwiększenie tolerancji na stresy u pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.) i ogórka (*Cucumis sativus* L.)

Analysis of the effects of exposure to hypoxia on increase stress tolerance at tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Małgorzata Czernicka¹✉, Kinga Kęska¹, Anna Kołton², Marek Szklarczyk¹, Sylwester Smoleń¹, Małgorzata Kapusta³, Michał Dziurka⁴, Iwona Kamińska²

¹Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii

²Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31–425 Kraków

³Katedra Cytologii Roślin i Embriologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Gdański, ul. Wita Stwosza 59, 80–308 Gdańsk

⁴Instytut Fizjologii Roślin im Franciszka Górskiego PAN w Krakowie, ul. Niezapominajek 21, 30–239 Kraków

✉ e-meil: Malgorzata.Czernicka@urk.edu.pl

Słowa kluczowe: hipoksja, ogórek, pomidor, stres, zalanie

Cel prowadzonych badań

Ze względu na zmiany klimatyczne, jednym z priorytetów w hodowli roślin jest poznanie mechanizmów związanych z nabywaniem tolerancji na stresy abiotyczne. Indukcja tolerancji na stres może odbywać się poprzez długotrwały proces selekcji i hodowli nowych odmian, ale także poprzez m.in. działanie na rośliny krótkotrwałym stresem w fazie rozsady.

Celem projektu było zastosowanie stresu obniżonego stężenia tlenu (hipoksji) w glebie, w fazie juwenilnej roślin, do uaktywnienia mechanizmów tolerancji na czynniki środowiskowe u pomidora i ogórka. Badania mechanizmów odpowiedzi na stres hipoksji badane były na poziomie molekularnym, biochemicznym i z uwzględnieniem badań fizjologicznych, które w kompleksowej ocenie stanowiły podstawę do określenia mechanizmów adaptacji pomidora i ogórka do warunków obniżonego stężenia tlenu w glebie. Dodatkowo w projekcie opracowano procedurę selekcji genotypów pomidora i ogórka o zwiększonej tolerancji na stres hipoksji przez zalanie. Celem badań była również ocena wpływu stresu hipoksji w początkowym etapie rozwoju roślin na plonowanie i jakość uzyskanego plonu pomidora i ogórka. Powyższe cele projektu zostały w różnym stopniu zrealizowane.

Materiały i metody

W pierwszym roku badań (2015 rok) wyselekcjonowano po 2 obiekty tolerancyjne i wrażliwe na stres hipoksji u pomidora i ogórka (Kołton i in. 2020). W latach 2016–2020 prowadzono doświadczenie według opisanego poniżej schematu. Uprawę dwóch obiektów pomidora (PZ 215 i POL 7/15) i ogórka (DH2 i DH4) prowadzono od stycznia do lipca w warunkach szklarniowych. Rośliny po osiągnięciu stadium 2–4 liści właściwych podzielono na 3 grupy roślin tj. pierwsza grupa (ctrl) uprawiana była bez zastosowania warunków stresowych, druga grupa (oznaczona jako 1xH) została potraktowana stresem obniżonej zawartości tlenu w obrębie systemu korzeniowego poprzez zalanie wielodoniczek wodą przez okres 7 dni, trzecia grupa (oznaczona jako 2xH) została potraktowana stresem hipoksji przez zalanie przez okres 7 dni, po czym po 14 dniach od ustania warunków stresowych rośliny z tej grupy ponownie poddane zostały hipoksji przez kolejne 7 dni. Przed zastosowaniem stresu przeprowadzono analizy morfologiczne i pobrano materiał do analiz laboratoryjnych. W tym samym dniu rośliny z grupy (2) i (3) umieszczono w pojemnikach i zalano wodą w ten sposób, żeby znajdowała się ona do 5–8 cm powyżej podłoża przez okres 7 dni. Poziom wody był na bieżąco kontrolowany i uzupełniany. Monitorowany był



także poziom tlenu nad podłożem za pomocą zestawu tlenomierzy Edge. Po jedno- i dwukrotnym stresie hipoksji, rośliny odpowiednio z grupy (1), (2) i (3), zostały przesadzone do wazonów i ich uprawę kontynuowano w warunkach szklarniowych. W celu weryfikacji nabytej odporności, w fazie kwitnienia i zawiązywania owoców połowa roślin pomidora i ogórka była ponownie zalewana wodą przez okres 5 dni. Rośliny oceniano pod kątem dynamiki wzrostu roślin i wielkość plonu całkowitego i handlowego oraz oceniano cechy jakościowe plonu.

Projekt obejmował realizację dwóch zadań badawczych tj.:

(1) Analizę genetycznych, biochemicznych i fizjologicznych podstaw odpowiedzi różnych genotypów pomidora i ogórka na hipoksję,

(2) Ocenę efektywności działania stresu hipoksji na zwiększenie odporności roślin na stres obniżonego stężenia tlenu w glebie.

W zadaniu 1. przeprowadzono analizy morfologiczne, analizy porównawcze transkryptomów mRNA, ncRNA i wybranych transkryptów (RNA-seq, real-time qPCR), immunodetekcję białek (Western-blot, immunobarwienie *in situ*), analizy zawartości fitohormonów roślinnych (UHPLC-MS/MS, LC-MS/MS), analizy aktywności systemu antyoksydacyjnego (peroksydazy, katalazy, dysmutazy ponadtlenkowej, związków fenolowych, kwasu askorbinowego, karotenoidów, glutationu, proliny) oraz aktywności fotosyntetycznej (analyzer wymiany gazowej Lci, fluorymetr Handy Pea). W zadaniu 2. dla uprawy wazonowej wykonywano analizy porównawcze dynamiki wzrostu roślin oraz wielkości i jakości plonu pomidora i ogórka (analizy zawartości suchej masy, kwasu askorbinowego, likopenu, cukrów).

Opis wyników i wnioski z prowadzonych badań

Zadanie 1.

Wyniki analiz morfologicznych i fizjologicznych

Stres hipoksji przez zalanie systemu korzeniowego u pomidora i ogórka wpłynął na zahamowanie wzrostu i rozwoju (szczególnie obiektów wrażliwych), jednakże drugie traktowanie stresem nie spowodowało dalszego zahamowanie wzrostu roślin. Stres hipoksji wpłynął na zmiany w układzie fotosyntetycznym (w większym stopniu u wrażliwych obiektów). Obniżenie intensywności fotosyntezy prawdopodobnie było związane z przemykaniem aparatów szparkowych, a nie destrukcją układu fotosyntetycznego. Stres hipoksji miał wpływ na zmiany aktywności

enzymów o właściwościach antyoksydacyjnych roślin pomidora i ogórka, co więcej stwierdzono różnice zależnie od genotypu. Wykazano różnice w aktywności enzymów antyoksydacyjnych pomiędzy pierwszym i drugim stresem m.in. dla peroksydazy u pomidora czy katalazy i dysmutazy ponadtlenkowej u ogórka. W przypadku związków o właściwościach antyoksydacyjnych tj. związków fenolowych, karotenoidów, kwasu askorbinowego glutationu, czy proliny również potwierdzono różnice w koncentracji tych związków w zależności o czasu trwania stresu, traktowania jedno- lub dwukrotnie stresem oraz genotypu.

Wyniki profilu fitohormonów w odpowiedzi na hipoksję

U pomidora stwierdzono różnice w poziomie fitohormonów zależnie od genotypu, tkanki oraz czasu trwania stresu oraz traktowania jedno- i dwukrotnie stresem. Zawartość auksyny (IAA) pod wpływem jednokrotnej hipoksji u wrażliwego obiektu obniżała się wraz z czasem trwania stresu. Pod wpływem drugiego traktowania stresem, w 72 godz., nastąpił gwałtowny wzrost koncentracji IAA. Indukcja stresu hipoksji spowodowała stopniowe obniżanie zawartości ABA w korzeniach, a wzrost zawartości ABA w liściach. Obiekt wrażliwy charakteryzował się niższą zawartością ABA w kolejnych dniach stresu hipoksji. W efekcie drugiego zalania po 48 godz. stwierdzono najniższą zawartość ABA, ale tylko u obiektu tolerancyjnego. Wzrost poziomu ACC w korzeniach stwierdzono pod wpływem dwukrotnego stresu.

U ogórka markerem stresu hipoksji w liściach, po pierwszym stresie roślin, okazał się ABA. Największe nagromadzenie się ABA w liściach u obiektu wrażliwego (DH4) może świadczyć o tym, że obiekt ten wykazał silniejszą reakcję dostosowawczą na niedotlenienie systemu korzeniowego niż DH2. Stres pierwszej hipoksji indukował długotrwałą pamięć DH4 pod względem utrzymywania obniżonej zawartości kwasu salicylowego w liściach. W przypadku DH2 fitohormonalna reakcja roślin nie była wzmacniana przez drugi stres hipoksji.

Wyniki odpowiedzi na hipoksję na poziomie molekularnym

W wyniku analizy transkryptomów (RNA-Seq) stwierdzono różną odpowiedź na stres dla obiektów określonych jako wrażliwe i tolerancyjne na hipoksję zarówno u pomidora i ogórka oraz różną reakcję na stres po jedno- i dwukrotnej indukcji stresu, co sugeruje, że priming poprzez stres hipoksji może

mieć wpływ na nabywanie tolerancji na stres.

Zidentyfikowano geny, które mogą stanowić markery tolerancji na stres hipoksji, wśród których między innymi były geny związane z metabolizmem lipidów (GDSL esteraza/lipaza), metabolizmem cukrów i procesem oddychania (dehydrogenaza alkoholowa, syntaza sacharozy), z modyfikacją ściany komórkowej (ekspansyny) (Kęska i in. 2021).

1. Analiza porównawcza transkryptomów niekodujących RNA pozwoliła na zidentyfikowanie specyficznych miRNA zaangażowanych w regulację transkrypcji pod wpływem stresu hipoksji u obydwu gatunków warzyw, genotypów o skrajnej reakcji na stres, oraz zaangażowanych w proces nabywania tolerancji na stres poprzez proces priming-u.
2. Wśród transkryptów regulowanych przez zidentyfikowane cząsteczki miRNA zidentyfikowano transkrypty kodujące białka związane z mechanizmami odpowiedzi na stres hipoksji m.in. dehydrogenazę alkoholową, ale także szereg czynników transkrypcyjnych.
3. W proces nabywania tolerancji na stres nadmiaru wody w obrębie strefy korzeniowej zaangażowane są zmiany epigenetyczne, w tym metylacja, które w konsekwencji wpływają na zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów. W 2020 roku przeprowadzono identyfikację zmetylowanych genów w powiązaniu z ich aktywnością transkrypcyjną jedynie u pomidora tolerancyjnego (PZ 215). Uzasadnionym byłoby przeprowadzenie takiej analizy dla obiektu wrażliwego pomidora i ogórka, ponieważ są to pionierskie badania w tym zakresie.

Wyniki odpowiedzi na hipoksję na poziomie białek

Immunodetekcję białek przeprowadzono jedynie u pomidora. Ze względu na zróżnicowanie odpowiedzi na stres hipoksji na poziomie transkryptomu zasadnym jest przeprowadzanie analizy białek u ogórka.

Immunodetekcja białek metodą Western-blot wykazała obecność dehydrogenazy alkoholowej wyłącznie u roślin traktowanych stresem hipoksji. Wyższą akumulację ADH zarejestrowano u wrażliwego na stres hipoksji obiektu PZ 215. Powtórna hipoksja nie intensyfikowała akumulacji ADH. Immunohistochemiczna analiza wykazała, że w korzeniach stwierdzono największą akumulację białka ADH w komórkach tkanki miększej i tkanki przewodzącej u pomidora PZ 215

w porównaniu do obiektu tolerancyjnego (POL 7/15), co potwierdza rolę białka ADH w tolerancji na stres hipoksji.

Zadanie 2.

Wyniki efektywności działania stresu hipoksji w stadium rozsady na zwiększenie odporności roślin na stres zalania

Traktowanie pojedynczym stresem hipoksji (1xH) w fazie rozsady wpłynęło na szybsze tempo wzrostu roślin i poprawę jakości plonu pomidora i ogórka. Stres hipoksji w stadium juvenilnym wpłynął na wzrost wielkości plonu u wrażliwego obiektu pomidora (PZ 215), oraz obydwu obiektów ogórka (DH2 i DH4). Hipoksja w stadium rozsady wpłynęła na wzrost zawartości kwasu askorbinowego, likopenu oraz suchej masy w owocach pomidora oraz na wzrost zawartości cukrów oraz jędrności owoców ogórka.

Osiągnięcia projektu

1. Opracowano metodę pozyskiwania rozsady pomidora i ogórka charakteryzującej się zwiększoną tolerancją na stres nadmiaru wody w obrębie strefy korzeniowej (przed wdrożeniem metodyka wymaga dopracowania m.in. konieczna jest weryfikacja tolerancji roślin na inne stresy środowiskowe oraz dla innych gatunków warzyw.
2. Opracowano efektywną metodykę selekcji genotypów wrażliwych i tolerancyjnych na stres hipoksji (Kołton i in. 2020).
3. Uzyskano wstępne informacje wyjaśniające mechanizmy nabywania tolerancji na stres poprzez priming wywołany działaniem krótkotrwałym zalaniem roślin.
4. Wskazano geny, których określony profil ekspresji może świadczyć o nabyciu tolerancji; podobnie fitohormony oraz związki o aktywności antyoksydacyjnej związane z tym zjawiskiem. Zasadnym byłaby kontynuacja badań związanych z mechanizmami dziedziczenia epigenetycznego (badania metylomów).

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

- Kęska K., Szcześniak M.W., Makołowska I., Czernicka M. 2021. Long-term hypoxia stress-induced priming enhance tolerance to waterlogging in cucumber. *Genes* 12(2),189. (MEiN = 100 pkt, IF=3,76)
- Kołton A., Kęska K., Czernicka M. 2020. Selection of Tomato and Cucumber Accessions for Waterlogging Sensitivity through Morpho-Physiological Assessment at an Early Vegetative Stage. *Agronomy*10(10), 1490. (MEiN = 100

pkt, IF=2,60)

Doniesienia konferencyjne

Czernicka M., Kołton A. (2016) Differential effects of O₂ depletion (hypoxia) in the root environment on tomato (*Solanum lycopersicum* L.) accessions. Plant Biology Europe Congres, 26-30 June 2016, Praga, Czechy: 759.

Czernicka M., Kołton A. (2016) Differential response of cucumber genotypes to the hypoxia stress. Polski Kongres Genetyki, 19-22 wrzesień 2016, Łódź: 303.

Czernicka M, Keska K, Scholz U, Bräutigam A (2017) Hypoxia stress memory in tomato (*Solanum lycopersicon* L.): Whole-genome transcriptome analysis. XIV Solanaceae and 3rd Cucurbitaceae Joint Conference, Valencia, 3-6 September 2017. C-0172.

Kołton A, Czernicka M, Kęska K, Wiszniewska A (2017) Root hypoxia induced changes in leaves of tomato and cucumber seedlings. SEB Gothenburg 2017, 3–6 July 2017: 201.

Czernicka M, Keska K, Szcześniak M, Makołowska I (2018) Hypoxia stress as activator of a primed state in cucumber (*Cucumis sativus* L.): Transcriptome profiling. In: Abstract Book for the Plant Biology Europe Conference Plant, 18-21 June 2018, Copenhagen, Dania, p 255. ISBN 978-87-996274-1-7

Kęska K, Czernicka M, Bräutigam A, Scholz U, Renaut J, Planchon S, Wesołowski W, Szklarczyk M (2018) Altered glycolysis and ethylene synthesis as different responses to hypoxia in tomato genotypes with various tolerance to oxygen limitation. 12th Congress of the International Plant Molecular Biology, 5-10 August 2018, Montpellier, Francja, poster S204.

Czernicka M, Keska K (2019) Genome-wide identification of novel and conserved microRNA in tomato roots (*Solanum lycopersicon* L.) as component of response to hypoxia stress induced by waterlogging In: Abstract Book for the Climate Change-Linked Stress Tolerance in Plants Conference, 13-16 May 2019, Hannover, Niemcy

Opracowanie i wykorzystanie wysokowydajnych technik selekcji genomowej w doskonaleniu warzyw

Development and application of high-throughput techniques of genomic selection in vegetable crop improvement

Alicja Macko-Podgórn, Katarzyna Stelmach, Kornelia Kwolek, Gabriela Machaj, Rafał Barański, Dariusz Grzebelus✉

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
✉ e-mail: d.grzebelus@urk.edu.pl

Słowa kluczowe: carrot, genome wide association mapping, genotyping-by-sequencing, insertional polymorphisms, molecular markers, single nucleotide polymorphisms, transposable elements

Cele prowadzonych badań

Wykorzystanie możliwości, jakie oferują nowe wysokowydajne technologie genotypowania, w połączeniu z precyzyjnym fenotypowaniem, do stworzenia platformy pozwalającej na identyfikację genów odpowiadających za ważne cechy użytkowe oraz sprzężonych z nimi markerów molekularnych, w tym: opracowanie technologii wysokowydajnego genotypowania dla marchwi (cel został osiągnięty); analiza zmienności genetycznej istniejącej u marchwi oraz jej powiązanie z różnorodnością fenotypową w odniesieniu do cech istotnych z użytkowego punktu widzenia (cel został osiągnięty); Opracowanie strategii wspomagania selekcji roślin wspomaganą markerami – cel został częściowo osiągnięty (pomimo wskazania rejonów genomu zasocjowanych z kształtem korzenia, poligeniczny charakter tej cechy, a co za tym idzie, niski efekt pojedynczych QTLi na parametry morfologiczne korzenia, nie pozwala na prostą implementację opracowanej metodyki genotypowania).

Material i Metody

Material roślinny do badań stanowiła kolekcja 110 odmian marchwi obejmująca różne typy użytkowe i morfologię korzeni spichrzowych, a także rozmnożenia tych odmian oraz potomstwa krzyżowań. Odmiany zostały ocenione w wieloletnim doświadczeniu polowym, przeprowadzono fenotypowanie korzeni pod względem cech mierzalnych, tj. długości korzenia, szerokości ramion, szerokości głowy oraz szerokości nasady korzenia. Na podstawie pomiarów wyliczono

współczynniki kształtu i zbieżności korzenia.

W badaniach wykorzystano następujące techniki i procedury badawcze: wysokowydajne genotypowanie przy wykorzystaniu metody GBS (genotyping-by-sequencing), genotypowanie w oparciu o polimorfizm insercji ruchomych elementów genetycznych *DcSto* w intronach genów marchwi, genomowe mapowanie asocjacyjne (GWAS; *genome-wide association mapping*), genotypowanie polimorfizmów pojedynczego nukleotydu w systemie TaqMan, analiza ekspresji genów kandydujących (RT-qPCR). Uzyskane wyniki poddano analizie statystycznej.

Opis wyników

Analiza zmienności morfologicznej korzeni marchwi w obrębie grup użytkowych przeprowadzona w wieloletnim doświadczeniu polowym w trzech lokalizacjach wskazała na wpływ środowiska na wielkość korzenia. Z kolei kształt korzenia nie zależał od warunków środowiska oraz interakcji genotypowo-środowiskowej. Najbardziej stabilne pod względem kształtu były odmiany o korzeniach kulistych lub owalnych typu Paris Market, Oxheart i Chantenay. Typami najbardziej wrażliwymi były St. Valery i Flakkee o korzeniach klinowatych i silnie zwężających się.

W toku projektu pracowano platformę genotypowania (DcS-ILP) wykorzystującą polimorficzne insercje ruchomych elementów genetycznych *DcSto* w intronach genów marchwi. Szczegółowy opis tej platformy genotypowania przedstawiono w publikacjach Stelmach i in. (2017) oraz Macko-Podgórn i in. (2019). 93 markery DcS-ILP



i 2354 SNP wykorzystano do precyzyjnej charakterystyki struktury zmienności genetycznej marchwi uprawnej typu zachodniego. Etap ten jest niezbędny dla skutecznej identyfikacji asocjacji pomiędzy markerami a cechami, pozwala bowiem skorygować uzyskane wyniki w kontekście struktury zmienności genetycznej. Wyniki genotypowania pozwoliły na wyodrębnienie typów użytkowych marchwi zachodniej, wskazując na obecność ustrukturyzowanej zmienności genetycznej w badanej kolekcji odmian. Jednocześnie dzięki genotypowaniu pięciu roślin z odmiany udowodniono bardzo wysoki poziom zmienności wewnątrzodmianowej charakterystyczny dla odmian konwencjonalnych, które były przedmiotem badań. Różne grupowania uzyskane dla metody GBS i DcS-ILP wskazują, że o ile substytucje nukleotydowe prawdopodobnie odzwierciedlają dłuższy okres historii ewolucyjnej badanego gatunku, o tyle większość polimorficznych insercji *DcSto* jest prawdopodobnie wynikiem niedawnej aktywności tej grupy transpozonów DNA i reprezentują znacznie krótszy okres czasu.

Wyniki genotypowania GBS i DcS-ILP wykorzystano do identyfikacji rejonów genomu warunkujących cechy ilościowe związane z morfologią korzeni marchwi, w szczególności z grubieniem korzeni spichrzowych, przy wykorzystaniu strategii GWAS. Asocjacje określano dla 75525 markerów SNP i 93 DcS-ILP. Pierwotnym założeniem było wykorzystanie uśrednionych pomiarów dla odmian w kolejnych środowiskach w powiązaniu z genotypami roślin reprezentujących te odmiany, ale to podejście nie pozwoliło na identyfikację istotnych asocjacji. Było to spowodowane opisanym powyżej wysokim poziomem zmienności wewnątrzodmianowej na poziomie molekularnym (od 30 do 90% wszystkich SNP segregowało w obrębie odmiany, a w oparciu o AMOVA ok. 68% całkowitej zmienności przypisano zmienności wewnątrzodmianowej), pomimo ustabilizowanych fenotypów w obrębie odmian. Z tego względu analizę GWAS przeprowadzono dla fenotypów i genotypów pojedynczych roślin, przy czym odmiany mogły być reprezentowane przez kilka roślin, traktowanych niezależnie. W takim układzie doświadczalnym zidentyfikowano QTL zasocjowane z szerokością ramion (6 QTLi, dwa na chromosomie 1, 3 na chromosomie 2 oraz jeden na chromosomie 8) i głowy korzenia (5 QTLi na chromosomach 2, 4, 5, 6 i 7) oraz z długością korzenia (trzy QTLi na chromosomach 1, 4 i 7). Najsilniejsza asocjacja została potwierdzona dla rejonu chromosomu 1 warunkującego przyrost korzenia na grubość (szerokość

ramion). Rejon ten, o wielkości ok. 180 Kbp, obejmujący 20 genów, poddano szczegółowej analizie, co umożliwiło wskazanie dwóch genów kandydujących, *DCAF1* (*DDB1-CUL4 Associated Factor 1*) i *BTAF1* (*TATA-binding protein-associated factor 1*) warunkujących grubienie korzeni spichrzowych marchwi. Potwierdzono różne poziomy ekspresji tych genów u roślin posiadających przeciwstawne warianty alleliczne polimorfizmów diagnostycznych oraz korelację pomiędzy genotypem w rejonie QTL i grubością korzenia w materiałach roślinnych innych niż wykorzystanie do GWAS. Funkcje obu białek kodowanych przez te geny mogą wskazywać na ich związek z rozwojem korzenia spichrzowego. *DCAF1* należy do rodziny białek WD40 i pełni funkcję receptora w kompleksie ubikwitynującym określone białka, a *BTAF1* to białko z rodziny SWI2/SNF2 wiążące się z TATA-box i regulujące procesy rozwojowe u roślin. Wyniki analizy GWAS w tym zakresie szczegółowo omówiono w publikacji Macko-Podgórn i in. (2020). Dla pozostałych QTLi wspomnianych powyżej również wskazano na podobne zależności, jednak z uwagi na poligeniczny charakter badanych cech związku te pozostawały na ogół poniżej progu istotności statystycznej.

Wnioski z prowadzonych badań

Stwierdzono decydujący udział czynnika genetycznego w determinacji kształtu korzeni marchwi. Środowiska w których uprawiano obiekty znacząco modyfikowały wielkość korzenia, natomiast kształt korzenia był jedynie nieznacznie modyfikowany przez środowisko i bardzo słabo uzależniony od interakcji genotypowo-środowiskowej.

Markery oparte o polimorfizm insercji elementów *DcSto* w genomie marchwi pozwalają na szybkie i wiarygodne genotypowanie w układzie kodominującym wielu loci równomiernie dystrybuowanych w genomie i związanych z rejonami kodującymi

Struktura zmienności genetycznej populacji marchwi typu zachodniego odzwierciedla podział odmian marchwi na typy użytkowe oraz morfologię korzenia spichrzowego. Nie jest ona jednak całkowicie tożsama ze strukturą wynikającą z analizy polimorfizmów pojedynczego nukleotydu. Zaobserwowane różnice wynikają prawdopodobnie z niedawnej aktywności transpozycyjnej elementów *DcSto* w kontraście do substytucji nukleotydowych. Oba typy polimorfizmu pozwalają jednak na wyodrębnienie podstawowych typów korzeni ze względu na ich morfologię oraz prawdopodobną historię hodowli.

Kształt korzenia marchwi jest determinowany poligenicznie, poprzez wiele loci

charakteryzujących się małymi efektami. Przy wykorzystaniu strategii mapowania asocjacyjnego (GWAS) zidentyfikowano rejon na chromosomie 1 marchwi, obejmujący ok 180 Kbp, szczególnie silnie zasocjowany z determinacją przyrostu korzenia marchwi na grubość.

Zaobserwowano statystycznie istotną różnicę pod względem grubienia korzenia pomiędzy roślinami homozygotycznymi o przeciwstawnych wariantach allelicznych markera SNP chr1_26632616. Geny *DCAFI* i/lub *BTAF1*, zlokalizowane w rejonie QTL na chromosomie 1 marchwi, są potencjalnymi genami kandydującymi zaangażowanymi w przyrost korzenia spichrzowego marchwi na grubość, mający miejsce około 10–11 tygodnia od kiełkowania.

Osiągnięcia projektu

Analiza zmienności morfologicznej korzeni marchwi w obrębie grup użytkowych w trzyletnim doświadczeniu polowym; opracowanie platformy genotypowania wykorzystującej polimorficzne insercje ruchomych elementów genetycznych *DcSto*; precyzyjna charakterystyka struktury zmienności genetycznej marchwi uprawnej typu zachodniego w oparciu o dwa systemy genotypowania; identyfikacja rejonów genomu warunkujących cechy ilościowe związane z morfologią korzeni marchwi, w szczególności z grubieniem korzeni spichrzowych, przy wykorzystaniu strategii GWAS; identyfikacja genów kandydujących warunkujących morfologię korzeni spichrzowych marchwi oraz wskazanie na różnice poziomów ekspresji tych genów u roślin posiadających przeciwstawne warianty alleliczne polimorfizmów diagnostycznych.

Wyniki były podstawą do przygotowania trzech oryginalnych publikacji naukowych w renomowanych czasopismach z zakresu nauk biologicznych i rolniczych, opublikowanych w latach 2017–2020.

Wykaz publikacji wyników

Oryginalne prace badawcze

- Stelmach K., Macko-Podgórn A., Machaj G., Grzebelus D. 2017. Miniature inverted repeat transposable element insertions provide a source of intron length polymorphism markers in the carrot (*Daucus carota* L.). *Front. Plant Sci.* 8: 725. (IF2017=3,677, punkty MEiN=100)
- Macko-Podgórn A., Stelmach K., Kwolek K., Grzebelus D. 2019. *Stowaway* miniature inverted repeat transposable elements are important agents driving recent genomic diversity in wild and cultivated carrot. *Mobile DNA* 10: 47. (IF2019=3,161, punkty MEiN=140)

- Macko-Podgórn A., Stelmach K., Kwolek K., Machaj G., Ellison S., Senalik D.A., Simon P.W., Grzebelus D. 2020. Mining for candidate genes controlling secondary growth of the carrot storage root. *Int. J. Mol. Sci.* 21: 4263. (IF2019=4,556, punkty MEiN=140)

Publikacje pokonferencyjne

- Stelmach K., Macko-Podgórn A., Barański R., Grzebelus D. 2017. Zastosowanie technik genotypowania TaqMan® oraz tetra-primer ARMS-PCR do identyfikacji polimorfizmów punktowych zasocjowanych z genetycznymi determinantami kształtu korzenia marchwi. *Biuletyn IHAR* 282: 99–121.
- Macko-Podgórn A., Stelmach K., Kwolek K., Senalik D., Simon P.W., Grzebelus D. 2019. A genome-wide association study reveals a genomic region associated with the carrot root shape. *Acta Horticulturae* 1264: 129–134.

Doniesienia konferencyjne

- Macko-Podgórn A., Machaj G., Senalik D., Simon P.W., Grzebelus D., 2014. Development of a carrot genotyping panel based on *DcSto* insertion polymorphisms. *Proceedings of the ISHS International Symposium: Carrot and Other Apiaceae*, Angers, Francja
- Macko-Podgórn A., Stelmach K., Szlachetowski J., Grzebelus D., 2014. Development of a carrot genotyping panel based on *DcSto* insertion polymorphisms. *Materiały III Ogólnopolskiej Konferencji "Genetyka i Genomika w Doskonaleniu Roślin Uprawnych – od Rośliny Modelowej do Nowej Odmiany"*, Poznań
- Macko-Podgórn A., Barański R., Grzebelus D. 2016. Genotyping-by-sequencing (GBS) based genome wide association study of carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus*) root shape. 4th Plant Genomics Congress, Londyn, Wielka Brytania
- Grzebelus D., Stelmach K., Macko-Podgórn A., Machaj G., Kwolek K. 2016. Carrot (*Daucus carota* L.) genotyping panel based on intronic *DcSto* transposon insertion polymorphisms – Development and validation. 17th European Congress in Biotechnology, Kraków
- Stelmach K., Kwolek K., Macko-Podgórn A., Barański R., Grzebelus D. 2017. Opracowanie Markerów Molekularnych Zasocjowanych z Genetycznymi Determinantami Kształtu Korzenia Marchwi. XIII Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, Zakopane
- Stelmach K., Machaj G., Grzebelus D. 2017. Charakterystyka rearanzacji w intronach zawierających insercje ruchomych elementów genetycznych *DcSto* u marchwi (*Daucus carota* L.). III Ogólnopolska Konferencja Doktorantów Nauk o Życiu BLOOPEN, Łódź
- Stelmach K., Macko-Podgórn A., Grzebelus D. 2017. Genetic diversity structure in western cultivated carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus* var. *sativus*). *Plant Genome Evolution*

- tion – A Current Opinion in Plant Biology Conference, Sitges, Hiszpania
- Stelmach K., Grzebelus D. 2018. Struktura zmienności genetycznej populacji marchwi typu zachodniego (*Daucus carota* subsp. *sativus* var. *sativus*). Mat. IV Ogólnopolskiej Konferencji Doktorantów Nauk o Życiu BIOOPEN, Łódź
- Grzebelus D., Macko-Podgórní A., Stelmach K., Kwolek K., Senalik D., Simon P. 2018. A genome-wide association study reveals a candidate gene associated with the carrot root shape. 2nd Carrot and other Apiaceae ISHS symposium, Kraków
- Kwolek K., Klimek-Chodaćka M., Macko-Podgórní A., Grzebelus D. 2018. Identification and analysis of genes associated with carrot response to salinity stress. 2nd Carrot and other Apiaceae ISHS symposium, Kraków
- Stelmach K., Barański R., Grzebelus D. 2018. Genotype x environment interaction and stability of root shape assessed in carrot genetic resources. 2nd Carrot and other Apiaceae ISHS symposium, Kraków
- Stelmach K., Grzebelus D. 2018. The structure of genetic diversity of the population of western-type carrot (*Daucus carota* subsp. *sativus* var. *sativus*). 2nd Carrot and other Apiaceae ISHS symposium, Kraków
- Macko-Podgórní A., Stelmach K., Kwolek K., Grzebelus D. 2019. Analiza ekspresji genu kandydującego *DCAF1*, związanego z kształtem korzenia marchwi. Mat. XIV Ogólnopolskiej Konferencji Naukowej „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane
- Macko-Podgórní A., Stelmach K., Kwolek K., Grzebelus D. 2019. The dynamics of *Stowaway* MITEs in carrot (*Daucus carota* L.) coincides with the recent history of the host species. 5th Conference on Plant Genome Evolution, Sitges, Hiszpania

Identyfikacja genów odpowiedzialnych za przywracanie płodności i samozgodność u wybranych roślin warzywnych

Identification of genes responsible for fertility restoration and self-compatibility in selected vegetable species

Wojciech Wesołowski, Stefan Stojalowski, Wojciech Bieniek, Dagmara Kwolek, Anna Szlachowska, Anna Burda, Marek Szklarczyk✉

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
✉ e-mail: marek.szklarczyk@urk.edu.pl

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność (CMS), geny restorerowe, samoniezgodność, samozgodność

Cele projektu

1. Identyfikacja jądrowych genów zaangażowanych w kontrolę ekspresji cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS) u marchwi i cebuli (osiągnięto częściowo – ustalono odpowiednie rejony chromosomowe z genami kandydującymi).
2. Opracowanie markerów molekularnych wykazujących sprzężenie z tymi genami (osiągnięto).
3. Identyfikacja loci, których mutacje odpowiadają za wystąpienie cechy samozgodności u kapusty (osiągnięto).
4. Opracowanie markerów molekularnych cechy samozgodności u kapusty (osiągnięto).

Materiały i Metody

1. Materiał roślinny: populacje typu *backcross* po krzyżowaniach roślin męskosterylnych i męskopłodnych (w kontekście cytoplazmy sterylizującej, marchew i cebula) oraz samozgodnych i samoniezgodnych (kapusta).
2. Fenotypowanie roślin: wizualna inspekcja obecności pyłku oraz mikroskopowa analiza żywotności pyłku (marchew i cebula), samozapylenie w otwartym kwiecie i ocena wiązania nasion (kapusta).
3. Genotypowanie poprzez sekwencjonowanie (GBS): usługa zewnętrzna, platforma firmy Illumina, wariant PE150.
4. RNA-Seq: RNA z pąków kwiatowych cebuli, platforma Illumina, wariant PE100.
5. Bioinformatyka: analiza danych GBS – BWA, SAMtools, Platypus, VCFtools, MS Excel 2007; mapowanie genetyczne i QTL

– JoinMap v.4, R/qtl, MS Excel 2007; analiza danych RNA-Seq – FASTQC, Trimmomatic, Bowtie2, STAR, StringTie, Cufflinks, CummeRbund, Blast2GO.

6. Markery PCR (w tym mikrosatelitarne): amplifikacja DNA (ewentualne trawienie restrykcyjne produktów amplifikacji), elektroforeza w agarozie lub poliakrylamidzie.
7. Analizy transkrypcyjne: hybrydyzacja northern (z sondami dla genów mitochondrialnych), RT-PCR (ze starterami dla genów mitochondrialnych).

Opis wyników

Wybrane populacje typu *backcross* marchwi oraz cebuli poddawano fenotypowaniu określając proporcję roślin męskosterylnych do męskopłodnych. Łącznie przetestowano 6 populacji marchwi oraz 13 populacji cebuli. Typową dla tego rodzaju populacji segregację 1: 1 otrzymano dla 3 populacji marchwi oraz 8 populacji cebuli. Fenotypowanie roślin kapusty polegało na wykonaniu samozapylenia w otwartym kwiecie i określeniu liczby nasion przypadających na jedną łuszczykę. Jeżeli proporcja ta była większa niż 1 – roślinę klasyfikowano jako samozgodną, przy wartości 1 lub mniejszej roślinę klasyfikowano jako samoniezgodną. Fenotypowaniu poddano łącznie 4 populacje. Wartość wyżej opisanego współczynnika samoniezgodności wahała się od 0 do 32.

Genotypowanie metodą GBS wykonano dla dwóch populacji marchwi: 170 (32–12) i 300, trzech populacji cebuli: AI/10, 10 i 601 oraz dla czterech populacji kapusty: 651, C1, C2 i C6.



Najwięcej danych sekwencyjnych wygenerowano dla roślin cebuli – w zależności od analizowanej populacji średnia liczba nukleotydów w czystych (pozostałych po filtracji) odczytach wahała się od 1 296,1 do 2 146,6 mln. Analogiczne zakresy uzyskane dla populacji marchwi i kapusty to odpowiednio 342,1 – 654,3 mln oraz 322,3 – 468,0 mln. W przypadku roślin marchwi i kapusty do genu referencyjnego (marchew – LNRQ00000000.1, kapusta – JJMF00000000.1) mapowało się nieco ponad 96% czystych odczytów. U cebuli odsetek ten był mniejszy i wynosił ok. 93% (sekwencję referencyjną tego gatunku spreparowano na bazie dostępnych danych transkryptomicznych). Na bazie mapowania odczytów typowo identyfikowano kilkaset tysięcy polimorfizmów sekwencyjnych. Wyjątek stanowiły trzy populacje kapusty (C1, C2 i C6), u których średnia liczba takich polimorfizmów wynosiła od 1,5 do 1,7 mln. Wyjściowe pule zidentyfikowanych polimorfizmów poddawano filtracji selekcyjnej wysokiej jakości markery bialleliczne o genotypach odpowiadających charakterowi badanej populacji, z maksymalnie pięcioma nieokreślonymi genotypami i oczekiwaną segregacją, znajdujące się w odległości nie mniejszej od 10 kb. W ten sposób dostępne w poszczególnych populacjach pule polimorfizmów sekwencyjnych zredukowano do zakresu 676 – 2 890. Wyselekcjonowane markery GBS wraz z danymi fenotypowymi wykorzystano do konstrukcji map genetycznych. W przypadku marchwi i cebuli zidentyfikowane grupy sprzężeń odpowiadały poszczególnym chromosomom. U cebuli przynależność chromosomową ustalono tylko dla dwóch grup sprzężeń (na bazie segregacji chromosomowo-specyficznych markerów mikrosatelitarnych – SSR, p. niżej). W przypadku marchwi utworzone grupy sprzężeń zawierały od 19 do 88 loci przy gęstości 0,5 – 3,9 loci/cM. Dla populacji kapusty zakresy te wynosiły odpowiednio 27 – 96 loci oraz 0,1 – 3 loci/cM. U cebuli najliczniejsze grupy sprzężeń miały od 9 do 58 loci przy gęstości 2,1 – 13 loci/cM. Markery GBS wykazujące najściślejsze sprzężenie z restorerami (marchew, cebula) i QTL samozgodności poddano konwersji w markery bazujące na metodzie PCR. Zaprojektowane markery testowano na populacjach, dla których uprzednio wykonano GBS.

Pięć roślin męskosterylnych i męskopłodnych z trzech populacji cebuli – AI/10, 10 i 601 – poddano genotypowaniu przy wykorzystaniu 14 chromosomowo-specyficznych markerów mikrosatelitarnych dostępnych w domenie publicznej. Polimorficzny charakter stwierdzono dla 3 lub 4 markerów

na populację. Dwa segregujące markery udało się zmapować do grup sprzężeń markerów GBS – były to markery mikrosatelitarne z chromosomu 2 i 3.

U cebuli w celu poznania różnic transkrypcyjnych wynikających z aktywności genu restorerowego, cztery rośliny męskosterylne (MS, cytoplazma S, allel dopełniający w układzie homozygotycznym) i cztery rośliny męskopłodne (MP, cytoplazma S, allel restorerowy w układzie heterozygotycznym) poddano analizom RNA-Seq. W wyniku sekwencjonowania dla pojedynczej próbki otrzymano średnio 55,2 mln par odczytów. Analiza przeprowadzona programem FASTQC wykazała wysoką jakość uzyskanych odczytów sekwencyjnych. Średnia wartość wskaźnika jakości Phred dla poszczególnych nukleotydów tworzących odczyty wynosiła 36. W uzyskanych sekwencjach zawartość G+C wynosiła średnio 43%. Dodatkową filtrację jakościową przeprowadzoną programem Trimmomatic przeszło około 93,1% odczytów. W tej puli frakcja sekwencji rRNA wahała się w granicach od 0,31 do 0,65%. Otrzymane w wyniku sekwencjonowania i filtracji jakościowej odczyty sekwencyjne poddano mapowaniu do transkryptomu cebuli. Procent zmapowanych par odczytów wynosił 100%. Zidentyfikowano łącznie 1096 genów, których poziom ekspresji różnicował rośliny męskosterylne i męskopłodne. Geny te podzielono na trzy kategorie:

- kategoria 1 – ulegające ekspresji zarówno u roślin męskosterylnych jak i u roślin męskopłodnych – 371 genów,
- kategoria 2 – ulegające ekspresji wyłącznie u roślin męskopłodnych – 436 genów,
- kategoria 3 – ulegające ekspresji wyłącznie u roślin męskosterylnych – 289 genów.

Wyniki analizy RNA-seq dla genów organellowych były weryfikowane przy zastosowaniu hybrydyzacji northern. Różnice w poziomie ekspresji udało się potwierdzić dla dwóch spośród sześciu testowanych genów: *atp6* oraz *ccmFNI*. Sygnały hybrydyzacyjne otrzymane dla pozostałych genów nie wykazywały znaczących różnic lub nie zgadzały się z wynikami otrzymanymi metodą RNA-seq. Może być to związane z faktem, iż jednym z etapów metodyki RNA-seq jest amplifikacja biblioteki, która może wprowadzać artefakty w obserwowanym poziomie transkrypcji wskutek zmiennej wydajności powielania poszczególnych fragmentów cDNA. Jedyńm genem, dla którego została potwierdzona różnica w poziomie transkrypcji pomiędzy roślinami męskosterylnymi i z przywróconą płodnością, oraz którego proporcje w ekspresji są zgodne z wartościami oczekiwanymi dla procesu

przywracania płodności, jest gen *ccmFNI*.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Uzyskano serię populacji typu *backcross* z segregacją pod względem badanych cech. Populacje marchwi i cebuli posiadały cytoplazmę sterylizującą – na podstawie fenotypu roślin można było wnioskować o obecności bądź braku genu restorerowego. Liczebność populacji zawierała się w przedziale 69 – 183.
2. Początkowo, podstawą rozróżnienia pomiędzy roślinami samozgodnymi i samoniezgodnymi kapusty była graniczna wartość współczynnika samoniezgodności równa 1 (gdy była większa niż 1 rośliny uznawano za samozgodne). Dla celów mapowania genetycznego zrezygnowano z tego rozróżnienia i cechę samozgodności/samoniezgodności uznano za ilościową wyrażając ją wartością współczynnika samoniezgodności.
3. W wyniku genotypowania metodą GBS dla wszystkich przebadanych populacji otrzymano zadowalającą ilość danych sekwencyjnych. Przeciętne pokrycie sekwencji unikalnych wynosiło: dla marchwi – 1,8x, dla cebuli – 0,13x, dla kapusty – 0,96x. Wysoka jakość otrzymanych odczytów potwierdzona wskaźnikami jakościowymi Q20 i Q30, gwarantowała przydatność otrzymanych danych sekwencyjnych dla analiz bioinformatycznych zmierzających do identyfikacji polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP) oraz insercji i delecji.
4. Na skonstruowanych grupach sprzężeń udało się zmapować restorery dwóch populacji marchwi, dwóch populacji cebuli oraz QTL samozgodności dwóch populacji kapusty. Najbliższe markery znajdowały się w odległości 0,1 – 2,7 cM od loci restorerowych. W przypadku obydwu populacji kapusty QTL zmapował się do tego samego rejonu chromosomu 6.
5. U cebuli na podstawie genotypowania markerami mikrosatelitarnymi określono lokalizację chromosomową dwóch grup sprzężeń dla populacji 601 – grupa z markerem AMS-10 reprezentuje chromosom 2, a grupa sprzężeń z markerem AMS-23 – chromosom 3.
6. Przeprowadzona dla cebuli analiza ekspresji (RNA-seq) umożliwiła identyfikację 1096 genów, które istotnie różnicowały badane klasy fenotypowe. Wśród tych 1096 genów, 804 miały wyższą ekspresję u roślin męskopłodnych – dla 436 z nich ekspresję stwierdzono wyłącznie u roślin MP. Analiza

ontologii genów wykazała, iż większość genów ulegających podwyższonej ekspresji u roślin męskopłodnych, koduje białka związane z procesami oksydoredukcyjnymi, z interakcją z kwasami nukleinowymi oraz z aktywnością kinazową.

7. Analizy northern potwierdziły różnice w poziomie ekspresji dla mitochondrialnych genów *atp6* oraz *ccmFNI*. Spośród nich jedynie gen *ccmFNI* wykazywał charakterystyczny dla potencjalnej determinanty CMS, wyższy poziom ekspresji u roślin męskosterylnych. Możliwy mechanizm sterylizującego działania tego genu może mieć charakter podobny jak w przypadku genu *atp9* u marchwi i buraka (Szklarczyk i in. 2014, Wesołowski i in. 2015).
8. U marchwi najbliższe sprzężone z restorerem markery PCR wykazują 96% kosegregację z fenotypem sterility/płodności. U cebuli najbliższe sprzężone z restorerem markery PCR wykazują 67% kosegregację z fenotypem sterility/płodności. Lokalizacja QTL samozgodności u kapusty wskazuje, iż cecha ta jest uwarunkowana mutacją *S*-locus, najprawdopodobniej genu *SRK*. W związku z tym do wnioskowania o fenotypie samozgodności/samoniezgodności można wykorzystać dostępne markery służące do identyfikacji *S*-haplotypów. Typowo rośliny posiadające allel *S*-locus sprzężony z samozgodnością miały współczynnik samoniezgodności kilkukrotnie większy niż rośliny pozbawione tego allelu.

Osiągnięcia projektu

1. Uzyskano kolekcję populacji segregujących pod względem cechy przywracania płodności (marchew, cebula) i samozgodności/samoniezgodności (kapusta).
2. Określono pulę genów kandydujących na restorery płodności u marchwi i cebuli. Restorery marchwi zostały zmapowane w obrębie chromosomów 3 i 9.
3. Wskazano, iż za występowanie samozgodności u kapusty odpowiada mutacja bądź rearanżacja w obrębie *S*-locus (z chromosomu 6).
4. Opracowano markery pozwalające wnioskować o genotypie loci kontrolujących cytoplazmatyczną męską sterility u marchwi i cebuli oraz samozgodność u kapusty.

Literatura

Szklarczyk, M., Szymański, M., Wójcik-Jagła, M., Simon, P.W., Weihe, A., Börner, T. (2014). Mitochondrial *atp9* genes from petaloid male-sterile and male-fertile carrots

differ in their status of heteroplasmy, recombination involvement, post-transcriptional processing as well as accumulation of RNA and protein product. *Theor. Appl. Genet.*, 127, 1689–1701.

Wesołowski, W., Szklarczyk, M., Szalonek, M., Słowińska, J. (2015). Analysis of the mitochondrial proteome in cytoplasmic male-sterile and male-fertile beets. *J. Prot.*, 119, 61–74.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Wesołowski W, Herda A, Domnicz B, Gierski P, Szklarczyk M; Mapping of fertility restorer genes with the use of genotyping by sequencing. 5th Plant Genomics and Gene Editing Congress, 16 – 17 Marzec 2017, Amsterdam (Holandia); poster

Wesołowski W, Szklarczyk M, Szlachtowska A, Domnicz B, Stelmach K, Kocjan W, Tabisz D, Snaczke Z; Identification of genetic factors responsible for the control of CMS in carrots. 2nd ISHS Carrot and other Apiaceae Symposium, 19 – 22 wrzesień 2018, Kraków; referat

Szklarczyk M, Wesołowski W, Szlachtowska A, Domnicz B, Wajdzik M, Burda A; Conversion of GBS polymorphisms into CAPS markers for a fertility restoring gene in carrots. 5th Edition of International Conference on Plant Genomics, 13 – 14 czerwiec 2019, Berlin (Niemcy); poster

Artykuł naukowy

Wesołowski, W., Szlachtowska, A., Domnicz, B., Burda, A., Mossakowska, M., Zawiślak, E., Szklarczyk, M.; Tagging of self-compatibility determinants in *Brassica oleracea* with the use of GBS markers (w przygotowaniu).

Analiza genetycznych i biochemicznych podstaw tolerancji cebuli (*Allium cepa* L.) na stres niedoboru wody

Analysis of genetic and biochemical basis of onion (*Allium cepa* L.) tolerance to water deficit stress

Urszula Kłosińska✉, Marzena Nowakowska, Katarzyna Nowak, Wojciech Szczechura, Waldemar Treder, Krzysztof Klamkowski, Katarzyna Wójcik, Mariusz Chojnowski

Instytut Ogrodnictwa – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: urszula.klosinska@inhort.pl

Słowa kluczowe: *Allium cepa* L., mapowanie asocjacyjne, markery DArTseq, susza, tolerancja

Cel badań

Celem badań była ocena zmienności fenotypowej i genetycznej 300 linii/odmian cebuli pod względem reakcji na niedobór wody w różnych fazach wzrostu i rozwoju, określenie parametrów morfologicznych i fizjologicznych związanych z tolerancją cebuli na suszę oraz identyfikacja regionów genomu *Allium cepa* odpowiedzialnych za tolerancję tego gatunku na deficyt wody z wykorzystaniem mapowania asocjacyjnego.

Materiały i Metody

Badania rozpoczęto od optymalizacji metody testowania tolerancji cebuli na niedobór wody, której głównym celem było wytypowanie najbardziej różnicującego badany materiał natężenia stresu niedoboru wody. W warunkach laboratoryjnych (faza kiełkowania nasion i faza siewek) stres suszy indukowano poprzez użycie – obniżającego potencjał wody – poliglikolu etylenowego (PEG) w czterech stężeniach: 0, 10, 15 i 20%. Natomiast w warunkach szklarniowych (faza wiązania cebul) zastosowano cztery poziomy wilgotności podłoża: 100, 75, 50 i 25% pojemnikowej pojemności wody (PPW).

W kolejnym etapie badań oceniono pod względem tolerancji na niedobór wody 300 odmian/linii cebuli pochodzących z polskich i zagranicznych firm hodowlano-nasiennych oraz z Banku Genów Instytutu Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach, stosując 18% PEG w fazie kiełkowania nasion, 10% PEG w fazie siewek oraz 50% PPW w fazie wiązania cebul. Oceny zmienności fenotypowej

dokonano w latach 2018–2020 na podstawie następujących parametrów: energia kiełkowania nasion, świeża masa siewek, długość korzeni i liścieni siewek oraz masa cebul. Oddzielnie dla każdej linii/odmiany przeprowadzono analizę wpływu deficytu wody na wielkość badanych cech wyrażoną w procentach względem kontroli oraz obliczono współczynnik zmienności (CV) i współczynnik korelacji (r). W fazie wiązania cebul wytypowano 11 obiektów różniących się krańcowo pod względem stopnia zasychania szczyptur w odpowiedzi na niedobór wody. W roślinach tych linii poddanych stresowi suszy oraz nawadnianych optymalnie dokonano pomiarów następujących parametrów fizjologicznych: natężenie fotosyntezy, natężenie transpiracji, przewodność szparkowa, fluorescencja i zawartość względna chlorofilu w liściach.

Spośród fenotypowanych 300 linii/odmian cebuli, do analizy asocjacji (GWAS) wyznaczono 188 obiektów o zróżnicowanej tolerancji na niedobór wody oraz charakteryzujących się największym poziomem wyrównania pod względem ocenianych parametrów morfologicznych. Populacje te poddano genotypowaniu przy pomocy technologii DArTseq w ramach usług obcych w firmie Diversity Arrays Technology (Bruce, Australia) celem identyfikacji markerów SNP i silico-DArT. Uzyskane dane genotypowe po połączeniu z wynikami fenotypowymi wykorzystano do badań asocjacji w programie Tassel 5. Wykrywanie istotnych statystycznie asocjacji marker-cecha (MTA) wykonano w oparciu



o ogólny model liniowy (GLM). W analizach GWAS uwzględniano tylko te markery, które charakteryzowały się asocjacjami na poziomie $p \leq 0.01$.

Wyniki

Badane obiekty cebuli istotnie różniły pod względem tolerancji na suszę, co potwierdzają wysokie wartości współczynnika zmienności (CV%) dla ocenianych parametrów: maksymalny procent skielkowanych nasion (53,3%), długość korzeni siewek (56,5%), długość liścieni siewek (47,0%), świeża masa siewek (39,9%) i masa cebul (22%). W celu poznania zależności pomiędzy badanymi cechami w warunkach stresu suszy obliczono współczynnik korelacji (r). Stwierdzono silną korelację między świeżą masą siewek a długością ich liścieni i korzeni, o czym świadczą wartości wynoszące odpowiednio 0,9354 i 0,7835. Zanotowano także istotny związek liścieni z długością korzeni (0,6631). Natomiast zależność pomiędzy kiełkowaniem a parametrami opisującymi wzrost siewek (świeża masa, długość liścieni i korzeni) oraz masą cebul w stresie deficytu wody okazała się nieistotna. Nie stwierdzono także korelacji pomiędzy masą cebul a cechami określającymi stadium siewek. Na podstawie średnich wartości z wszystkich linii cebuli stwierdzono, że stres niedoboru wody najmniej ograniczył masę cebul – o 27%, następnie długość korzeni i kiełkowanie nasion – odpowiednio o 36 i 38%, natomiast świeża masa siewek i długość liścieni były zahamowane odpowiednio o 52 i 54%. Stwierdzono, że u większości ocenianych linii/odmian niedobór wody obniżył sprawność aparatu fotosyntetycznego. Wyjątek stanowiła linia ZS140, u której pod wpływem stresu suszy obserwowano wzrost czterech z pięciu badanych parametrów fizjologicznych: natężenia fotosyntezy i transpiracji, wskaźnika fluorescencji Fv/Fm oraz wzrost natężenia zielonej barwy liści, natomiast przewodność szparkowa była na poziomie kombinacji kontrolnej.

Genotypowanie 188 linii/odmian cebuli przy pomocy technologii DArTseq pozwoliło na otrzymanie 19 711 markerów silico-DArT oraz 11 353 markerów SNP, z czego do analiz asocjacyjnych wykorzystano 10 892 markerów silico-DArTseq oraz 6 454 markerów SNP. W wyniku analizy GWAS zidentyfikowano 70 markerów silico-DArT ($p < 0.001$), w tym: 27 markerów, które były związane z% kiełkujących nasion, 20 – z świeżą masą siewek, 18 – z długością korzenia siewek, oraz 5 – z długością liścieni siewek. Sześć markerów: 9338284, 57819108, 57819143, 100003634, 100006175, 100097152 było istotnie zasocjowanych

z kilkoma cechami równocześnie. Markery te wyjaśniały od 7.0 do 12.5% obserwowanego zróżnicowania badanych linii/odmian cebuli we wczesnej fazie wzrostu. W przypadku testów przeprowadzonych w warunkach szklarniowych metodami GLM i MLM uzyskano 54 markery silico-DArT istotnie związane z masą cebul, w tym 11 przy poziomie $p < 0.0001$. Markery te odpowiadały za 1.5 do 2.5% obserwowanej zmienności fenotypowej.

W przypadku markerów SNP zastosowanie modelu GLM pozwoliło zidentyfikować 36 markerów ($p < 0.001$), w tym: 11 – dla świeżej masy siewek, 17 – dla długości korzenia, 5 – dla długości liścieni oraz 3 markery związane z kiełkowaniem nasion. Markery te uzasadniały stosunkowo wysokie% obserwowanej zmienności fenotypowej dla badanych cech od 7.9 do 18.8%. Otrzymano także 11 markerów SNP wykazujących istotną asocjację z masą cebul, które wyjaśniały od 9.5 do 41.2% zmienności fenotypowej.

Wnioski

1. Badane linie/odmiany cebuli charakteryzowały się dużą zmiennością fenotypową pod względem tolerancji na stres suszy w różnych fazach wzrostu i rozwoju wegetatywnego. Dzięki temu stanowiły cenny materiał do badań polimorfizmu genomowego cebuli przy wykorzystaniu platformy DArTseq.
2. Na podstawie średnich wartości z wszystkich obiektów cebuli stwierdzono, że stres niedoboru wody najmniej obniżył masę cebul – o 27%, następnie długość korzeni i kiełkowanie nasion – odpowiednio o 36 i 38%, natomiast świeża masa siewek i długość liścieni były zahamowane odpowiednio o 52 i 54%.
3. Stwierdzono silną korelację między świeżą masą siewek a długością ich liścieni i korzeni w warunkach niedoboru wody. Natomiast zależności pomiędzy kiełkowaniem a parametrami opisującymi wzrost siewek (świeża masa, długość liścieni i korzeni) oraz masą cebul w stresie suszy okazały się nieistotne. Nie stwierdzono także korelacji pomiędzy masą cebul a cechami określającymi stadium siewek. Może to wskazywać na zupełnie inne mechanizmy warunkujące tolerancję cebuli w poszczególnych fazach wzrostu.
4. Wykazano, że takie parametry, jak energia kiełkowania nasion, świeża masa siewek, długość korzeni i liścieni siewek mogą być używane do szybkiej selekcji genotypów cebuli tolerancyjnych na stres suszy we wczesnej fazie wzrostu.

5. Stwierdzono, że spośród pięciu analizowanych parametrów fizjologicznych, natężenie fotosyntezy najbardziej różnicowało oceniane obiekty cebuli w warunkach deficytu wody.
6. U większości badanych linii obserwowano najmniejszą redukcję pod wpływem niedoboru wody dla natężenia transpiracji, co może wskazywać, że parametr ten nie jest wskaźnikiem wrażliwości na stres suszy u cebuli.
7. Analiza asocjacyjna umożliwiła identyfikację 124 markerów silico-DArT oraz 47 markerów SNP związanych z cechami fenotypowymi w trzech fazach rozwojowych cebuli. Sześć markerów DArTseq było istotnie zasocjowanych równocześnie z kilkoma parametrami określającymi wzrost siewek cebuli, co może sugerować ich istotny związek z tolerancją na suszę w fazie siewek. Zidentyfikowane sekwencje skorelowane z badanymi cechami fenotypowymi wymagają zaprojektowania markerów specyficznych celem weryfikacji ich przydatności w selekcji roślin cebuli tolerancyjnych na deficyt wody.

Osiągnięcia

1. Opracowano metodę testowania cebuli na stres niedoboru wody w warunkach laboratoryjnych (faza kiełkowania nasion i faza siewek) oraz w warunkach szklarniowych (faza wiązania cebul), która umożliwiła efektywną selekcję genotypów tolerancyjnych i wrażliwych.
2. Wytypowano obiekty cebuli, które mogą być cennym materiałem wyjściowym do wykorzystania w programach hodowli cebuli z tolerancją na stres suszy.
3. Uzyskano markery DArTseq, które można wykorzystać do bezpośredniej selekcji roślin tolerancyjnych na niedobór wody, lub można je konwertować w celu opracowania prostych oznaczeń bazujących na reakcji PCR do selekcji wspieranej markerami (MAS).

Wykaz publikacji wyników

- Kłosińska U., Nowakowska M., Szczechura W., Nowak K., Treder W., Klamkowski K., Wójcik K. 2019. Analiza genetycznych i biochemicznych podstaw tolerancji cebuli (*Allium cepa* L.) na stres niedoboru wody. Biuletyn IHAR 286: 309–312 (komunikat).
- Kłosińska U., Nowakowska M., Szczechura W., Nowak K. 2020. Analiza genetycznych i biochemicznych podstaw tolerancji cebuli (*Allium cepa* L.) na stres niedoboru wody. Biuletyn IHAR 291 (1): 149–150 (komunikat).
- Kłosińska U. 2020. Zróżnicowanie reakcji obiektów cebuli (*Allium cepa* L.) na stres suszy w fazie kiełkowania i wzrostu siewek. Biuletyn IHAR, 291: 93–99 (publikacja oryginalna).

Transfer cytoplazmatycznej męskiej sterility poprzez somatyczną hybrydyzację u marchwi

Transfer of cytoplasmic male sterility through somatic hybridization in carrot

Ewa Grzebelus[✉], Marek Szklarczyk, Rafał Barański, Magdalena Klimek-Chodacka, Miron Gieniec, Katarzyna Maćkowska, Aneta Malec-Pala, Tomasz Oleszkiewicz, Dariusz Kadłuczka

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
[✉] e-mail: ewa.grzebelus@urk.edu.pl

Słowa kluczowe: białka fluorescencyjne, cytoplazma sterylizująca, elektrofuzja protoplastów, gatunki pokrewne, inaktywatory genomów organellowych i jądrowego, wczesna selekcja cybryd, utrwalenie wariantów allelicznych

Cel prowadzonych badań

Określenie przydatności somatycznej hybrydyzacji do transferu cechy CMS u marchwi poprzez:

- analizę skuteczności czynników blokujących aktywność mitochondrialną dawcy genomu jądrowego (osiągnięto)
- opracowanie modelowego systemu monitorowania elektrofuzji z wykorzystaniem ekspresji białek fluorescencyjnych (osiągnięto)
- ustalenie skutecznego systemu wczesnej selekcji produktów fuzji (osiągnięto)
- opracowanie metod weryfikacji komponentu jądrowego u zregenerowanych roślin (osiągnięto)
- wykorzystanie form pokrewnych jako alternatywnych źródeł sterility (osiągnięto)

Materiały i metody

Materiał roślinny

- linie męskosterylne typu płatkowego (cytoplazma S_p)
- wyselekcjonowane linie męskopłodne
- pietruszka, kolendra i kmin (jako alternatywne źródła cytoplazmy sterylizującej)

Metody

- indukcja kultur kalusowych i zawiesinowych wybranych obiektów marchwi
- transformacja linii komórkowych marchwi genami białek fluorescencyjnych
- dezaktywacja genomu jądrowego (UV) i cytoplazmatycznych (IOA, IOAA)
- różnicowe barwienie protoplastów komponentów rodzicielskich fluorochromami

- przyżyciowymi (FDA, RBITC, skopoletyna)
- komplementarna elektrofuzja protoplastów
- manualna selekcja komórek cybrydowych bezpośrednio po fuzji
- genotypowanie markerami typu SCAR
- analiza fenotypowa regenerantów

Opis wyników

Zadanie 1 Opracowanie markerów DNA przydatnych do identyfikacji form cybrydowych oraz stabilizacja genetyczna i selekcja form donorowych

Do poszukiwania form donorowych wykorzystano 1 linię CMS oraz 7 linii męskopłodnych. Rośliny tych linii zgenotypowano 6 markerami jądrowymi i 4 markerami organellowymi (cytoplazmatycznymi). Większość markerów jądrowych wykazywała segregację wewnątrzliniową. Markery organellowe zwykle nie różnicowały badanych roślin i potwierdzały oczekiwany plazmotyp.

Na podstawie przeprowadzonych analiz markerowych wytypowano rośliny, których nasiona przeznaczono do wysiewu. Rośliny te były homozygotami w obrębie części analizowanych loci markerowych. W przypadku linii CMS były to nasiona uzyskane w wyniku zapylenia wytypowanych roślin pyłkiem wytypowanych roślin z linii dopełniającej. W przypadku linii męskopłodnych były to nasiona uzyskane w wyniku samozapylenia wytypowanych roślin. Ogółem do wysiewu przeznaczono 5 potomstw CMS i 47 potomstw męskopłodnych. Uzyskane z wysiewu korzenie posłużyły do otrzymania



kwitających roślin, na bazie których produkowano nasiona do eksperymentów fuzji. W przypadku materiałów męskosterylnych nasiona te otrzymywano z przepylecia w parach złożonych z rośliny CMS i dopełniającej. W przypadku materiałów męskopłodnych nasiona te uzyskiwano w wyniku zapylenia siostrzanego w obrębie danego potomstwa lub w wyniku samozapylenia. Wyprodukowane nasiona reprezentowały 14 sublinii linii CMS i 9 sublinii z linii męskopłodnych.

Sublinie mające stanowić komponenty fuzji były testowane pod kątem utrwalenia pożądanych wariantów allelicznych wybranych markerów jądrowych. Za utrwalenie uznawano stan, w którym wszystkie badane rośliny danej sublinii były homozygotami tego samego typu. Do konkretnego eksperymentu fuzji wykorzystywano sublinie CMS i męskopłodną o utrwalonych przeciwstawnych wariantach allelicznych przynajmniej jednego markera.

Zadanie 2 Opracowanie modelowego systemu monitorowania fuzji protoplastów z wykorzystaniem białek fluorescencyjnych

Uzyskano linie transgeniczne kalusa marchwi, które zawierały wprowadzone konstrukty genowe, w tym geny kodujące białka fluorescencyjne CFP, GFP, YFP i mCherry z mitochondrialną lokalizacją sygnałną. Komórki i protoplasty linii transgenicznych kalusów wykazywały fluorescencję w różnym stopniu, ale niektóre z nich fluoryzowały intensywnie i posiadały wysoki procent fluoryzujących komórek. Linie takie zostały wybrane do optymalizacji parametrów elektrofuzji. Dobór parametrów elektrofuzji był kluczowy dla przeżywalności protoplastów i ich fuzji, przy czym linie różnie reagowały na zadane parametry. Możliwe było jednak wskazanie warunków, w których większość fuzji była skuteczna. Wykorzystanie białek fluorescencyjnych pozwoliło na bezpośrednią obserwację procesu fuzji protoplastów i następnie potwierdzenie czy była ona skuteczna. Pozwoliło to także na identyfikację komórek mieszańcowych oraz określenie efektywności ich tworzenia. Opracowano optymalne warunki heterofuzji dla różnych par komponentów rodzicielskich.

Zadanie 3 Opracowanie różnicującego barwienia fluorescencyjnego protoplastów do wczesnej selekcji komórek cybrydowych

Zastosowano skopoletynę, diocyan fluoresceiny (FDA) i izotiocjanian rodaminu (RBITC) testując odpowiednio pięć, dwa i dwa różne stężenia tych związków. Skopoletyna w stężeniach 100

i 125 $\mu\text{g/ml}$ pozwoliła na uzyskanie intensywnej niebieskiej fluorescencji. W przypadku FDA i RBITC optymalne stężenia to odpowiednio 75 i 2,5 $\mu\text{g/ml}$.

Ponadto sprawdzono wpływ mocy i czasu trwania impulsu prądu stałego (DC) na przepuszczalność błony i wypływanie barwników. Najmniejszy wyciek z komórek obserwowano dla rodaminu. Największe różnice w intensywności fluorescencji po zastosowaniu DC obserwowano dla skopoletyny. Niezależnie od zastosowanego barwnika największy wyciek zaobserwowano po zastosowaniu DC o wartości 2,5 kV/cm i czasie trwania 60 μs . Natomiast dla DC o wartości 2,5 oraz 3,0 kV/cm trwających 50 μs stopień wycieku barwników był podobny ale znacznie mniejszy niż przy dłuższym impulsie.

Zadanie 4 Regeneracja protoplastów gatunków pokrewnych i określenie parametrów inaktywacji ich genomów jądrowych

Regeneracja protoplastów gatunków pokrewnych

Testowano zdolność regeneracyjną kolendry siewnej (*Coriandrum sativum* L.) oraz kminu rzymskiego (*Cuminum cyminum* L.). Plon uwolnionych komórek z grama świeżej tkanki był wysoki i średnio wynosił $3,5 \times 10^6$ protoplastów ml^{-1} . Protoplasty charakteryzowały się także stosunkowo dobrą jakością – średnia żywotność komórek wynosiła 78%. Odnotowano różnice w aktywności podziałowej pomiędzy badanymi obiektami. Wyższą aktywnością podziałową charakteryzował się kmin, niższą kolendra siewna. Ponadto pożywka CPP wzbogacona o fitosulfokinę i putrescynę znacząco lepiej stymulowała aktywność mitotyczną komórek niż pożywka CPP zawierająca tylko putrescynę.

Badane obiekty we wszystkich zastosowanych wariantach pożywkowych wykazały zdolność do tworzenia tkanki kalusowej. U kolendry siewnej zaobserwowano większą ilość tkanki kalusowej na pożywce z dodatkiem fitosulfokiny oraz fitosulfokiny z putrescyną, podczas gdy u kminu intensywny wzrost tkanki kalusowej obserwowano dla wszystkich wariantów pożywkowych. Na pożywce regeneracyjnej odnotowano pojawienie się pojedynczych zarodków somatycznych jedynie dla kminu rzymskiego.

Określenie parametrów inaktywacji genomu jądrowego

Inaktywacja genomu jądrowego została przeprowadzona z wykorzystaniem promieniowania ultrafioletowego (UV) w zakresie 0–3000 J m^{-2} . Po zastosowaniu promieniowania UV, komórki obu obiektów reagowały podobną, obniżoną zdolnością

do formowania agregatów komórkowych. Dawka UV o wartości 2000 J m^{-2} była dawką letalną dla protoplastów kolendry a dawka 2500 J m^{-2} dla protoplastów kminu.

Zadanie 5 i 6 Elektrofuzja protoplastów oraz Selekcja, regeneracja i wzrost roślin cybrydowych

Wyniki wygenerowane w ramach tych dwóch zadań zestawiono w tab.1.

Zadanie 7 Ocena molekularna i fenotypowa roślin cybrydowych

Ocena molekularna

Fuzja typu marchew (+) marchew: zgenotypowano w sumie 60 regenerantów, markery jądrowe wykazały, że 6 było mieszańcami, markery cytoplazmatyczne wykazały, iż 1 z roślin mieszańcowych miała charakter cybrydowy.

Fuzja typu kmin (+) marchew: zgenotypowano 10 regenerantów, marker jądrowy wykazał, iż 7 było mieszańcami, markery cytoplazmatyczne wykazały, iż rośliny mieszańcowe miały cytoplazmę marchwi.

Fuzja typu pietruszka (+) marchew: zgenotypowano 10 regenerantów, marker jądrowy wykazał, iż miały one genom jądrowy marchwi, marker mitochondrialny wykazał, iż 4 rośliny miały charakter cybrydowy.

Ocena fenotypowa

Ocena obejmowała analizę morfologii liści regenerantów po fuzji z gatunkami pokrewnymi. Wszystkie regeneranty z fuzji typu pietruszka (+) marchew oraz kmin (+) marchew wytwarzały blaszki liściowe o kształcie charakterystycznym dla marchwi.

Zadanie 8 Reprodukacja form cybrydowych

Przyrost korzenia spichrzowego regenerantów przeznaczonych do reprodukcji w 2020 roku do końca lutego 2020 r był słaby. W obawie przed indukcją kwiatostanów słabej jakości z tak małych korzeni spichrzowych i niemożliwością właściwego rozmnożenia cennych pojedynków, zdecydowano kontynuować przez rok 2020 wzrost wegetatywny dla zwiększenia masy korzenia spichrzowego. Po wernalizacji, w połowie stycznia 2021 rośliny zostaną przeniesione do szklarni dla wybiicia w pędy kwiatostanowe, a następnie zapyłone pyłkiem odpowiedniej linii męskopłodnej.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Opracowano zestaw markerów DNA (jądrowych i organellowych) różnicujących obiekty akceptorowe i donorowe.

2. Na ich podstawie dokonano selekcji roślin o przeciwstawnych wariantach allelicznych u obiektów akceptorowych i donorowego a następnie utrwalono wybrane markerowe warianty alleliczne poprzez reprodukcję wyselekcjonowanych roślin.
3. Wykorzystanie białek fluorescencyjnych umożliwiło bezpośrednią obserwację procesu fuzji protoplastów, dzięki czemu opracowano optymalne warunki heterofuzji dla różnych par komponentów rodzicielskich.
4. Trwałą fluorescencją protoplastów, pozwalającą na wczesną selekcję komórek o podwójnej fluorescencji, bezpośrednio po fuzji protoplastów, uzyskano po barwieniu RBITC i FDA.
5. Pożywka z fitosulfokiną i putrescyną najefektywniej stymulowała aktywność podziałową w kulturach protoplastów kminu rzymskiego.
6. Ustalono skuteczne dawki inaktywacji genomu jądrowego dla kolendry i kminu.
7. System do mikromanipulacji komórek zintegrowany z mikroskopem odwróconym był skutecznym narzędziem do wczesnej selekcji cybryd tj. bezpośrednio po komplementarnej elektrofuzji protoplastów.
8. System niańki oraz suplementacja pożywki w fitosulfokinę i putrescynę skutecznie wspomagały regenerację wyselekcjonowanych komórek.
9. Lepszą regenerację wyselekcjonowanych komórek obserwowano gdy do inaktywacji genomu organellowego zastosowano amid kwasu jodoctowego.
10. Wyniki genotypowania uzyskane dla regenerantów z fuzji marchew (+) marchew wskazują, iż rośliny te w większości nie mają charakteru mieszańcowego.
11. W przypadku fuzji międzyrodzajowych jedynie regeneraty po fuzji typu pietruszka (+) marchew miały charakter cybrydowy.
12. Ze względu na przedłużający się etap regeneracji roślin po komplementarnej fuzji protoplastów, okres wzrostu wegetatywnego został zakończony później niż wstępnie planowano; tym samym etap reprodukcji wytypowanych form cybrydowych został przesunięty na rok 2021.

Osiągnięcia projektu

1. Opracowano schemat procedur hodowlano-markerowych do wyprowadzania komponentów fuzji somatycznej i określania statusu mieszańcowości otrzymanych regenerantów.

2. Opracowano modelowy system monitorowania elektrofuzji z wykorzystaniem ekspresji białek fluorescencyjnych.
3. Opracowano schemat procedur laboratoryjnych do przeprowadzenia komplementarnej fuzji protoplastów marchwi i regeneracji komórek mieszańcowych.
4. Wytypowano markery jądrowe różnicujące marchew i kmin oraz marchew i pietruszkę. Opracowano markery mitochondrialnego i plastydowego DNA odróżniające cytoplazmę marchwi od cytoplazm kminu i pietruszki.
5. Wskazano, które z analizowanych regenerantów mają charakter mieszańcowy i/lub cybrydowy.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- Florek E, Maćkowska K, Grzebelus E (2017) Ocena przydatności barwników fluorescencyjnych do monitorowania fuzji protoplastów. BioOpen – III Ogólnopolska konferencja Doktorantów Nauk o Życiu, 11–12 maja, Łódź, 48 (poster)
- Morańska E, Grzebelus E (2018) Effect of phytosulfokine and putrescine on regeneration capacity in protoplast cultures of coriander (*Coriandrum sativum* L.) and cumin (*Cuminum cyminum* L.). XXXIII Konferencja Embriologiczna: Rośliny·Zwierzęta·Człowiek. 23-26 maja, Olsztyn, 67 (poster)
- Oleszkiewicz T, Siwek J, Gieniec M, Klimek-Chodacka M, Maćkowska K, Grzebelus E, Barański R (2018) Optymalizacja parametrów fuzji protoplastów marchwi z wykorzystaniem białek fluorescencyjnych. XV Ogólnopolska Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin, 17–20 września, Rogów, 281 (poster)
- Maćkowska K, Florek E, Grzebelus E (2018) Selekcja znaczników fluorescencyjnych do monitorowania fuzji protoplastów. XV Ogólnopolska Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin, 17–20 września, Rogów, 286 (poster)
- Grzebelus E, Maćkowska K, Malec A, Stelmach K, Machaj G, Szklarczyk M, Grzebelus D (2019) Wczesna selekcja mieszańców somatycznych marchwi – obiecujące narzędzie dla gatunków o wysokim potencjale regeneracyjnym. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych”, 5–8.02, Zakopane, 45–46 (wykład)
- Grzebelus E, Morańska E, Malec A, Oleszkiewicz T, Maćkowska K (2019) Wpływ fitosulfokiny, putrescyny i hemoglobiny na zdolność regeneracyjną protoplastów uprawnych gatunków Apiaceae. 58. Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego “Botanika bez granic”, 1–7 lipca, Kraków, 150–151 (wykład)
- Malec A, Morańska E, Grzebelus E (2019) Inactivation of nuclear genomes in selected species of the Apiaceae family. 9th PSEPB Conference “New trends in plant reproduction and growth regulation”, 9-12 September, Toruń, 212 (poster)

Publikacje naukowe opublikowane

- Gieniec M, Siwek J, Oleszkiewicz T, Maćkowska K, Klimek-Chodacka M, Grzebelus E, Barański R (2020) Real-time detection of somatic hybrid cells during electrofusion of carrot protoplasts with stably labelled mitochondria. *Scientific Reports* 10:18811 (pkt_{MEIN} = 140, IF₂₀₁₉ = 3.998)

Tabela 1
Przeprowadzone eksperymenty fuzji komplementarnej, liczba wyselekcjonowanych komórek z podwójną fluorescencją oraz liczba zregenerowanych roślin.

Donor CMS	Akceptor CMS		Liczba wyselekcjonowanych komórek*	Liczba zregenerowanych roślin
	linia	sublinia/dezaktywator		
sublinia 2163A				
279-20	B14	176-12/IOA	50	
p6 4494/6 x 4501/3v8v9		174-10/IOAA	50	71
279-20		189-5/IOA	50	
279-25	B1	188-7/IOAA	50	
p6 4503/4 x 4501/5	B14	174-9/IOA	170	
p6 4503/4 x 4501/5		174-9/IOAA	170	
p6 4505/4 x 4501/2	B1	188-7/IOA	170	
p6 4505/4 x 4501/2		188-7/IOAA	170	102
p6 4503/4 x 4501/5	B14	189-5/IOA	170	
p6 4503/4 x 4501/5		189-5/IOAA	150	
pietruszka	B14	174-9/IOAA	350	
	B1	188-7/IOAA	150	
kmin	B14	174-9/IOAA	400	153
	B1	188-7/IOAA	300	

* z podwójną fluorescencją; IOA – kwas jodoctowy; IOAA – amid kwasu jodoctowego

Wykorzystanie metod biotechnologicznych do poszerzenia zmienności genetycznej warzyw kapustnych

Biotechnological methods for broadening of the genetic diversity in brassica vegetables

Agnieszka Kiełkowska✉, Adela Adamus, Marek Szklarczyk

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie
Al. 29 Listopada 54, 31–425 Kraków
✉ e-mail: a.kielkowska@urk.edu.pl

Słowa kluczowe: androgeniza, elektrofuzja, linie DH, markery molekularne, protoplasty

Cele badań

Zad. 1. Opracowanie metody otrzymania mieszańców somatycznych kapusty głowiastej (*Brassica oleracea* var. *capitata*) z nowymi, wartościowymi cechami – cel osiągnięto

Zad. 2. Opracowanie markerów molekularnych do oceny statusu mieszańcowości regenerantów otrzymanych w wyniku eksperymentów fuzji – cel osiągnięto

Zad. 3. Otrzymywanie i charakterystyka podwojonych haploidów kapusty pekińskiej (*Brassica rapa* L. subsp. *pekinensis*) – cel osiągnięto

Materiał i Metody

Zad.1. Weryfikacja odporności na kiłę różnych obiektów kapusty w porównaniu do wzorców wrażliwości i odporności na polu kiłowym, ocena indeksu wrażliwości (IW). Wyprowadzenie donorów o różnej ploidalności oraz z odpornością na kiłę i cms, izolacja protoplastów, analizy mikroskopowe (FDA, kalkofluor), pożywki (hormony, PSK) do optymalizacji metodyki kultur protoplastów kapusty i regeneracji roślin, histologia (technovit), mikroskopowa skaningowa, cytometria przepływowa do charakterystyki produktów fuzji. Elektrofuzja protoplastów (bufory, parametry prądu), degradacja genomów (UV i jodoacetamid), barwienie różnicowe (mikroskopowa fluorescencyjna) w celu prowadzenia fuzji symetrycznej i asymetrycznej.

Zad. 2. Izolacja DNA, PCR, trawienie restrykcyjne, elektroforeza, sekwencjonowanie DNA mitochondrialnego i plastydowego kapusty w celu generacji markerów do identyfikacji

produktów fuzji. Opracowanie markerów sprzężonych z loci związanymi z odpornością na kiłę: markery typu CAPS, wyprowadzenie populacji mapującej (kontrolowane zapylenia Oregon 123xHTM, jarowizacja, wyprowadzenie pokoleń od F1 do F3 przez samozapylenia); fenotypowanie F3 na polu kiłowym (ocena IW), usługowe sekwencjonowanie GBS pokolenia F2.

Zad. 3. Wyprowadzenie materiałów donorych (ocena odporności na polu kiłowym, IW). Androgeniza (jaryzacja donorów, ustalenie wielkości pąka do androgenyzy (preparaty rozgniotowe, DAPI), izolacja mikrospor, szok termiczny, pożywki (hormony), identyfikacja pochodzenia regenerantów (analiza DNA). Otrzymanie roślin i linii DH (samozapylenia), ocena wyrównania linii DH (analiza żywotności pyłku, kontrolowane zapylenia, ocena biometryczna cech morfologicznych (wyrównanie wewnątrz liniowe, długość okresu wegetacji, średnia masa, współczynnik kształtu, zwięzłość, barwa liści okrywających, nalot woskowy oraz zdrowotność roślin).

Wyniki i Wnioski

Zad.1. W latach 2014–2016 na polu kiłowym testowano polskie materiały hodowlane kapusty głowiastej białej pod kątem odporności na *Plasmodiophora brassicae*. Z 45 badanych obiektów 20% charakteryzowało się pełną odpornością na patogena (IW = 0,0–0,8). Odporność wykazywały linie wyprowadzone z odpornej na kiłę kapusty odmiany Oregon 123 lub mieszańce oparte na tych liniach.

Badania nad optymalizacją kultur protoplastów i regeneracją roślin (2014–2017) pozwoliły



ustalić metodykę izolacji i prowadzenia kultur protoplastów kapusty głowiastej. Do prowadzenia kultur wytypowano pożywkę CPPO z dodatkiem 2,4-D i NAA, na której żywotność protoplastów była wysoka, podziały komórkowe sięgały 50% i tworzyła się znaczna liczba minikalusów. Protoplasty izolowane z roślin haploidalnych wykazywały większy potencjał regeneracyjny w porównaniu z protoplastami o diploidalnym genomie. Opisano proces odtwarzania ściany komórkowej w pierwszych dniach kultury i wykonano ocenę histologiczną otrzymanych kalusów. Z powodu niskiej wydajności regeneracyjnej kalusów przetestowano 7 pożywek o zróżnicowanym składzie. Najlepsze efekty osiągnięto na pożywce na bazie MS z dodatkiem NAA, 2iP i GA_3 . Otrzymano ok. 400 regenerantów, większość o ploidalności odpowiadającej roślinom wyjściowym, ale także grupę roślin ocenionych jako formy miksoploidalne, co świadczy o zmianach mutacyjnych podczas przejścia kultur *in vitro* przez fazę kalusa. W badaniach nad elektrofuzją protoplastów (2015–2018) w celu otrzymania mieszańców somatycznych ustalono parametry odpowiednie do łączenia protoplastów diploidalnych i haploidalnych. Dotyczyły one gęstości zawiesiny, stężenia roztworu fuzyjnego, natężenia prądu stałego i zmiennego oraz czasu trwania impulsów. Ustalono optymalne stężenie barwników fluorescencyjnych (diocjan fluoresceiny (FDA) oraz rodamina B) do obserwacji i rozróżnienia produktów fuzji. Efektywność fuzji zależała od ploidalności łączonych ze sobą protoplastów. Działanie polem elektrycznym nie wpływało negatywnie na proces regeneracji ściany komórkowej ani na żywotność protoplastów, ale obniżało aktywność mitotyczną w porównaniu z kontrolą. W badaniach nad otrzymaniem cybryd (2018–2020) ustalono parametry inaktywacji jądra komórkowego za pomocą promieniowania UV, a genomu cytoplazmatycznego za pomocą jodoacetamidu (IOA). Najlepsze efekty osiągnięto, gdy genom cytoplazmatyczny inaktywowano 1 mM IOA przez 15, a inaktywację jądra komórkowego za pomocą promieniowania UV o natężeniu 2500 J/m². Frekwencja fuzji protoplastów poddanych inaktywacji i pochodzących z różnych obiektów zachodziła z częstotliwością ok. 6%, co jest zgodne z danymi literaturowymi. W latach 2019 i 2020, w wyniku fuzji asymetrycznej, po raz pierwszy, uzyskano mikrokalus, który poddano regeneracji. W efekcie otrzymano 80 pędów. Analiza markerowa wskazała, że w tej populacji były pojedyncze regeneranty z jądrem jednego i cytoplazmą drugiego komponenta. Wynik ten wskazuje, że opracowana

metodyka otrzymywania mieszańców somatycznych asymetrycznych pomiędzy zróżnicowanymi genetycznie obiektami kapusty głowiastej jest skuteczna. Ta nowoczesna metoda biotechnologiczna może stać się narzędziem do manipulowania genomami jądrowym i cytoplazmatycznym dla potrzeb hodowli i tworzenia nowych kreacji genetycznych.

Zad. 2. W badaniach (2014–2018) oceniano przydatność markerów mikrosatelitarnych (SSR) dostępnych w domenie publicznej markerów mikrosatelitarnych. Zidentyfikowano 14, które różnicowały formy rodzicielskie wytypowane do eksperymentów fuzji. Kolejne 3 markery różnicujące (typ CAPS) opracowano na podstawie wyników analizy GBS (rok 2015) przeprowadzonej dla wybranych form rodzicielskich. Markery te wykorzystano w kolejnych latach (2017–2018) do oceny statusu mieszańcowości odpowiednich potomstw otrzymanych w wyniku somatycznej hybrydyzacji. W latach 2016–2017 przeprowadzono także badania molekularne w celu uzyskania markerów DNA mitochondrialnego i plastydowego, różnicujących cytoplazmę sterylizującą i normalną kapusty głowiastej. Zsekwencjonowano DNA mitochondrialne i plastydowe 2 linii CMS z cytoplazmą Ogura i 2 linii męskopłodnych z cytoplazmą normalną. Na bazie uzyskanych danych opracowano zestaw 4 markerów CAPS/SCAR do rozróżniania tych cytoplazm. Zastosowanie markerów cytoplazmatycznych wykazało obecność cytoplazmy normalnej (N) lub sterylizującej Ogura u badanych regenerantów, zależnie od jej obecności w komponentach fuzji. Analiza roślin uzyskanych w wyniku fuzji symetrycznej w kolejnych latach badań (2017–2020) wykazała, że frekwencja tworzenia mieszańców somatycznych w różnych układach (diploid+diploid i haploid+haploid) wynosiła ok 2%.

Drugą pulę markerów wykorzystaną w badaniach 2014–2018 stanowiły markery CAPS dostępne w literaturze wykazujące sprzężenie z loci QTL warunkującymi odporność na kiłę kapusty. Stwierdzono, że markery sprzężone z odpornością na kiłę u *Brassica rapa*, nie wykazują wartości diagnostycznej dla materiałów *Brassica oleracea*. Było to przesłanką dla rozpoczęcia szczegółowych prac nad genetycznym mapowaniem determinant odporności na kiłę u *Brassica oleracea*. W 2015 rozpoczęto prace nad uzyskaniem populacji segregującej pod względem odporności na kiłę – otrzymano nasiona pokolenia F1 ze skrzyżowania formy odpornej (Oregon 123) i wrażliwej (HTM). W kolejnych etapach tych wyprowadzono

pokolenia F2 i F3. W 2019 roku, wykonano fenotypowanie 80 potomstw pokolenia F3 na polu śmierci porażonym przez kiłę kapusty. Fenotypowanie przy zastosowaniu 4-stopniowej skali porażenia kiłę kapusty wykazało rozszczepienie cechy odporności w badanych populacjach. Odnotowano ogółem 3% roślin z korzeniami bez objawów porażenia przez kiłę, 46% roślin o średnim porażeniu korzeni oraz a 51% roślin silnie porażonych. W roku 2020 rośliny segregującego pokolenia F2 poddano wysokoprzepustowemu genotypowaniu na skalę genomową (GBS) a następnie skonstruowano mapę sprzężeń markerów GBS i określono lokalizację QTL indeksu wrażliwości. W obrębie chromosomu 3 uzyskanej mapy zlokalizowano QTL związany z odpornością na kiłę.

Zad. 3. W latach 2014–2015 na polu kiłowym testowano 11 obiektów kapusty pekińskiej o różnym pochodzeniu. Odmiany opisane w literaturze jako odporne, w naszych badaniach sklasyfikowano jako średnio wrażliwe lub wrażliwe. Tylko odmiana Suprin F1 była odporna w obu latach badań. Wzorcem wrażliwości była odm. Granaat. Wyselekcjonowano i do dalszych prac hodowlanych przekazano 21 roślin o zdrowym systemie korzeniowym. Rośliny odmian, które wykazywały tolerancję na patogena użyto jako materiał donorowy do indukcji androgenyzy. Badania nad opracowaniem i optymalizacją metod haploidyzyacji, podwajania genomu i potwierdzania gametycznego pochodzenia regenerantów (2014–2016) wykazały, że z 21 obiektów kapusty pekińskiej pozytywną odpowiedź uzyskano u 10 (48%). Efektywność tego procesu zależała od warunków uprawy roślin donorowych, długości pąków, składu pożywki indukcyjnej oraz gęstości kultury i wahała się od 0 do 32 zarodków/100 pąków. Opracowano metodę prowadzenia kultur izolowanych mikrospor dla kapusty pekińskiej. Ustalono, że rozsada wymaga 4 tyg. jarowizacji w temp. 4°C, aby rośliny zakwitły a rośliny donorowe powinny rosnać w fitotronie (temp. 20°C). Kultury mikrospor należy zakładać z pąków o długości 1,5–2,3 mm, gęstość kultury ustalić na poziomie 40 tys. mikrospor/1 ml pożywki i prowadzić na pożywce zawierającej NAA i BA. Należy zastosować szok termiczny (34°C/24 h) zmieniający drogę rozwoju mikrospor. Rozwój zarodków androgenicznych obserwowano po 14 dniach od założenia kultury. Z uzyskanych ok. 300 androgenicznych zarodków dalszy rozwój w rośliny podjęło ok. 50%. Ogółem otrzymano ponad 600 roślin. Analiza ploidalności wykazała, że większość regenerantów była diploidami (64%), haploidy stanowiły 9%, tetraploidów było 23%

a miksploidów 1% populacji. Podwojenie genomu haploidów było procesem mało efektywnym i wiązało się z utratą dużej liczby roślin poddanych diploidyzyacji. Na podstawie analiz molekularnych, spośród 22 markerów SSR wytypowano dwa, które różnicowały rośliny kapusty pekińskiej na heterozygoty i homozygoty. Posłużyły one następnie do potwierdzenia gametycznego pochodzenia regenerantów i genetycznego wyrównania otrzymanych linii DH.

Ogółem otrzymano 447 roślin DH, które charakteryzowały się prawidłową morfologią i w większości wysoką żywotnością pyłku. U małej grupy (ok.6%) roślin o obniżonej żywotności pyłku obserwowano zaburzenia w tworzeniu tetrad. Po zapyleniu wsobnym z 291 roślin DH (65%) pochodzących z 7 obiektów zebrano ok. 22 tys. nasion DHR1. Analiza biometryczna wykonana na 129 populacjach DHR1 wykazała bardzo duże wyrównanie cech wewnątrz linii i zróżnicowanie pomiędzy liniami DHR1. Analiza molekularna 48 linii DHR1 i DHR2 za pomocą markerów SSR wykazała, że w 43 przypadkach profil markerowy pokrywał się z profilem rośliny DH, z której pochodziły i rośliny tych linii były homozygotami. Jedynie wśród roślin 3 linii obserwowano obraz świadczący o braku wyrównania genetycznego. Do dalszych badań (rozmnożenie, ocena cech morfologicznych i wyrównania genetycznego oraz dalsza selekcja) wytypowano 31 pokoleń DHR1, z których w ostatnim roku badań (2018) po rozmnożeniu zebrano ponad 6 tys. nasion DHR2 i oceniono 14 linii DHR2. Powyższe badania nad indukcją androgenyzy wykazały, że jest możliwe otrzymanie u kapusty pekińskiej płodnych roślin DH, a następnie linii DHR1 zróżnicowanych genetycznie i w liczbie zadawalającej do dalszych prac hodowlanych. Co najważniejsze, czas od założenia kultur mikrospor do oceny polowej i selekcji linii DHR1 to tylko 2–3 lat. Zastosowanie tej metody biotechnologicznej może u kapusty pekińskiej skrócić czas potrzebny do wyprowadzenia homozygotycznych materiałów wyjściowych dla hodowli odmian mieszańcowych.

Osiągnięcia projektu

W oparciu o obiekty wzorcowe odporności (Oregon123 i jarmuż Verheul) i wrażliwości (HTM i Kamienna Głowa) na kiłę kapusty, na polu kiłowym zawierającym mieszaninę patotypów występujących na terenie Polski przeprowadzono selekcję odmian i materiałów hodowlanych. Wyselekcjonowano i przekazano do dalszej hodowli 114 roślin o zdrowych korzeniach i dobrych cechach

użytkowych główek.

Opracowano metodykę izolacji i prowadzenia kultur protoplastów dla obiektów kapusty głowiastej o różnej ploidalności.

Opracowano metodykę elektrofuzji pozwalającą na prowadzenie fuzji w układzie symetrycznym (umożliwia otrzymanie hybryd jądrowych) oraz w układzie asymetrycznym (po inaktywacji genomów jądrowego/i lub cytoplazmatycznego) w celu otrzymania cybryd.

Opracowano zestaw markerów molekularnych do oceny statusu mieszańcowości regenerantów otrzymanych w wyniku somatycznej hybrydyzacji. Markery te bazują na polimorfizmach genomu jądrowego i genomów organellowych.

Na podstawie genotypowania poprzez sekwencjonowanie (GBS) opracowano mapę genetyczną kapusty głowiastej. W obrębie chromosomu 3 tej mapy zlokalizowano QTL związany z odpornością na kiłę.

Opracowano metodykę indukcji haploidów a następnie podwojonych haploidów u kapusty pekińskiej. Ocena cech morfologicznych roślin pokolenia DHR1 wykazała bardzo duże wyrównanie cech wewnątrz linii i zróżnicowanie pomiędzy liniami DHR1, co potwierdza skuteczność metody i jest niezwykle cenne z punktu widzenia hodowli nowych odmian tego gatunku.

Wykaz publikacji

Wyniki były prezentowane w formie 17 doniesień na konferencjach krajowych i zagranicznych oraz dwóch publikacji.

Doniesienia konferencyjne

- Adamus A., Samek L., Solarz M., Kiełkowska A. (2015). Badania nad kulturami protoplastów kapusty głowiastej (*Brassica oleracea* L.). XII Ogólnopolska konferencja naukowa. 'Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych'. Zakopane 2–6 II, pp 169
- Chuda A., Chachłowska D., Adamus A. (2015). Badania nad otrzymywaniem roślin haploidalnych kapusty pekińskiej. 2015. IV Zjazd Polskiego Tow. Nauk Ogrodniczych „Postęp w ogrodnictwie dla poprawy jakości życia i ochrony środowiska”, Wrocław 14–16 IX, pp. 222
- Mrzygłód A., Adamus A. (2015). Protoplast culture of *Brassica* vegetables. XIV Overall Polish *in vitro* Culture and Plant Biotechnology Conference, Poznań 14–17 IX, BioTechnologia 96 (1), pp. 125
- Adamus A., Kiełkowska A., Samek L., Solarz M., Mrzygłód A. (2016). Kultury protoplastów z haploidalnych roślin kapusty głowiastej. Konferencja naukowa 'Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie

genetyki, hodowli i biotechnologii roślin'. Międzyzdroje 8–10 VI, pp. 24

- Mrzygłód A., Kiełkowska A., Adamus A., Maćkowska K. (2016). Preliminary study on electrofusion in *Brassica oleracea* var. *capitata*. 17 Central European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH, Kraków 3–6 VII, New Biotechnology 33S (2016) S1–S213, P18–8, pp 156
- Mrzygłód A., Początek E., Kiełkowska A., Adamus A. (2016) Cell wall regeneration in cultured protoplasts of *Brassica oleracea* var. *capitata*. X Konferencja pt. „Kultury *in vitro* w fizjologii roślin”, Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie, Kraków 7- 9 XII, pp 70
- Chuda A., Adamus A., Chachłowska D., Ślęczek S., Samek L., Pieniżek U. (2016). Ocena roślin podwojonych haploidów kapusty pekińskiej. V Kongres Genetyki, Łódź, 19–22 IX, pp 45
- Kiełkowska A., Mrzygłód A., Adamus A. (2017). Badania nad elektrofuzją protoplastów kapusty głowiastej. Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych. Zakopane, 30.01.2017 do 03.02.2017, pp. 127
- Kiełkowska A., Mrzygłód A., Adamus A. (2017). Haploid protoplasts of *Brassica oleracea* var. *capitata* – culture and fusion. III International Conference of Cell Biology UJ. Kraków 26–27 V, pp 46
- Mrzygłód A., Kiełkowska A., Adamus A. (2017). Diploid protoplasts of white cabbage – effectiveness of electrofusion. International Conference “Plant *in vitro*: Fundamentals and applications II: Wiedeń 26–27 VI, pp.33
- Adamus A., Chachłowska D., Domnicz B., Zawisłak E. (2017). Ocena pokolenia DHR1 podwojonych haploidów kapusty pekińskiej. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa: Ziemia, Roślina, Człowiek. Kraków 20–21 IX, pp. 136
- Adamus A, Chuda A, Chachłowska D, Zawisłak E, Domnicz B, Samek L, Szklarczyk M, Kiełkowska A. (2018). Od mikrospor do linii podwojonych haploidów kapusty pekińskiej (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Ogólnopolska Konferencja Naukowa 'Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy', Lublin 25–27 VI, pp. 31
- Adamus A, Chachłowska D, Samek L, Kiełkowska A, Pieniżek U. (2018). Ocena morfologiczna i płodność podwojonych haploidów kapusty pekińskiej (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). Ogólnopolska Konferencja Naukowa 'Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy', Lublin 25–27 VI, pp. 32
- Kiełkowska A, Szklarczyk M, Adamu A, Solarz M, Wajdzik M, Domnicz B, Szlachtowska A. (2018). Protoplast fusion in cabbage – characterization of culture and molecular evaluation of fusion products. XV Ogólnopolska Konferencja Kultur *In vitro* i Biotechnologii Roślin, Rogów 17–20 IX, pp.274

Kielkowska A, Adamus A, Solarz M. (2018). Protoplast cultures of cabbage (*Brassica oleracea* L.) – histological evaluation of callus and regenerants. XXXIII Konferencja Embriologiczna Rośliny, Zwierzęta, Człowiek, Olsztyn 23 -26 V, Acta Biol Crac ser Bot 60 suppl 1 pp. 61

Adamus A., Kielkowska A., Solarz M. (2019). Fuzja protoplastów kapusty – wydajność procesu i ocena kultury. 58. Zjazd Polskiego Towarzystwa Botanicznego „Botanika bez granic” Kraków 1–7 VII, pp. 149

Kielkowska A., Adamus A. (2020). Protoplast fusion of selected accessions of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. – effectiveness of the process and culture evaluation.

XXXIV Konferencja Embriologiczna, Zakopane 20–23 V, Acta Biologica Cracoviensia vol. 62 suppl. 1 pp. 69

Publikacje

Adamus A, Kielkowska A, Szklarczyk M. 2019. Wykorzystanie metod biotechnologicznych do poszerzenia zmienności genetycznej warzyw kapustnych. Biuletyn IHAR 286: 327–329, pkt MNiSW 20

Adamus A, Szklarczyk M, Kielkowska A. 2020. Haploid and DH line production in *Brassica rapa* ssp. *pekinensis* via microspore culture. Doubled Haploid Technology, Springer, przyjęta do druku

Otrzymanie nowej zmienności genetycznej warzyw kapustowatych przy wykorzystaniu krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica*

Development of the new genetic diversity of vegetable brassicas by the use of distant hybridization

Piotr Kamiński¹, Małgorzata Podwyszyńska², Agnieszka Marasek-Ciołakowska², Michał Starzycki³, Elżbieta Starzycka-Korbas³, Barbara Dyki⁴, Katarzyna Nowak¹

¹Instytut Ogrodnictwa - PIB, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych

²Instytut Ogrodnictwa - PIB, Z-d Biologii Stosowanej

³Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Oddział w Poznaniu, Pracownia Metod Hodowli Odpornościowej

⁴Instytut Ogrodnictwa - PIB, Samodzielna Pracownia Mikroskopii

Słowa kluczowe: *B. oleracea* x *B. napus*; *B. oleracea* x *B. rapa*, cechy morfologiczne, cytometria przepływowa FCM, fluorescencyjna hybrydyzacja in situ FISH, krzyżowania międzygatunkowe, kultury izolowanych zarodków

Celem badań prowadzonych było

1) wygenerowanie nowej zmienności genetycznej w wyniku prowadzenia zamierzonych i celowych krzyżowań pomiędzy uprawnymi formami z rodzaju *Brassica oleracea* oraz *Brassica rapa* a genotypami oddalonymi i dzikimi zarówno w obrębie tych gatunków, jak również w obrębie innych gatunków z rodzaju *Brassica*, (cel został osiągnięty),

2) przeprowadzenie analizy nowo wytworzonych form mieszańcowych kolejnych pokoleń generatywnych z uwzględnieniem cech anatomicznych, cytogenetycznych i morfologicznych oraz ich rozmnożenie generatywne w warunkach kontrolowanych, (cel został osiągnięty),

3) ocena przydatności kolejnych pokoleń generatywnych form mieszańcowych jako źródła cennych gospodarczo cech jakościowych oraz odporności na stropy biotyczne i abiotyczne dla hodowli warzyw kapustowatych (cel został osiągnięty).

Materiały i Metody

Materiałem do badań było osiem linii wsobnych kapusty głowiastej białej, które odznaczały się wysoką wartością hodowlaną, częściową odpornością na czerń krzyżowych i kiłę kapusty oraz dobrym wyrównaniem. Cztery z nich posiadały sterylizującą cytoplazmę typu *Ogu-INRA* a pozostałe były formami płodnymi. Do krzyżowań oddalonych wykorzystano również dwie

formy użytkowe jarmużu, jedną odmianę kapusty czarnej, formy dzikie *B. taurica* (1), *B. cretica* (1), cztery płodne linie kapusty pekińskiej i dwie linie rzepaku (płodna i CMS).

Metodyka badań obejmowała zarówno techniki wytwarzania form mieszańcowych jak również ich ocenę:

- wytwarzanie mieszańców międzygatunkowych *B. oleracea* x *B. napus*, *B. rapa* x *B. napus*, przy wykorzystaniu gatunków dzikich lub oddalonych (krzyżowania w pąku i na otwartym kwiecie, wypierające, wsobne, ocena zdolności do wiązania nasion form mieszańcowych),
- izolowanie zarodków mieszańcowych, kultury in vitro, klonowanie, hodowla hydroponiczna, ukorzenie eksplantatów, regeneracja, wernalizacja,
- ocena zawartości jądrowego DNA metodą cytometrii przepływowej FCM (Podwyszyńska i in. 2016),
- cytogenetyczna identyfikacja mieszańców *Brassica oleracea* x *Brassica napus* FISH,
- analiza cech morfologicznych form mieszańcowych w fazie wegetatywnej i generatywnej,
- ocena cech morfologicznych, wartości użytkowej oraz poziomu odporności międzygatunkowych mieszańców z rodzaju *Brassica* w doświadczeniu polowym.



Opis wyników

Zastosowanie kultur izolowanych zarodków pozwoliło na uzyskanie żywotnych zarodków a następnie na ich regenerację *in vitro* i adaptację do warunków uprawy w glebie międzygatunkowych mieszańców *B. oleracea* x *B. napus* pokolenia F_1 , BC_1 i BC_2

(łącznie 407 zarodków i 280 roślin mieszańcowych). Uzyskanie tych mieszańców metodami hodowli tradycyjnej (zapylenia krzyżowe w paku i na otwartym kwiecie) było praktycznie niemożliwe ze względu na silną niezgodność krzyżową i wczesne zamieranie zawiązków nasion. Uzyskanie *in vitro* żywotnych zarodków pokoleń BC_1 i BC_2 było trudniejsze niż pokolenia F_1 ze względu na pojawiające się dysfunkcje związane z chlorozą i ich zamieraniem w trakcie regeneracji.

Wytwarzanie mieszańców alloplazmatycznych oraz krzyżowania wypierające technikami konwencjonalnymi były efektywne dla mieszańców *B. napus* x *B. rapa* (jako forma wypierająca), dzięki czemu uzyskano nowe 24 międzygatunkowe mieszańce pokolenia BC_2 i dalsze pokolenia wypierające. Dzięki tej technice możliwe było wprowadzenie cechy CMS do płodnych linii kapusty pekińskiej i wykorzystanie ich w hodowli twórczej. Krzyżowania tradycyjne prowadzone w trakcie siedmiu lat badań pozwoliły także na uzyskanie około 200 cennych genotypów mieszańców międzygatunkowych pokolenia F_2 , F_1 x F_2 , F_1 x BC_1 , BC_1 x F_1 x F_2 , *B. napus* x *B. oleracea* (*B. oleracea* jako forma wypierająca). Wydajność tworzenia nasion tych mieszańców była zróżnicowana, jednak zaobserwowano prawidłowość, że pokolenia wyższego rzędu wytwarzały nasiona zdecydowanie lepiej niż pokolenia pierwsze. Świadczy to o stabilizacji genetycznej w kolejnych pokoleniach na skutek selekcji i rearanżacji chromosomów. Krzyżowania międzygatunkowe *B. napus* x *B. oleracea* oraz wypierające (BC_1 , BC_2) z liniami wsobnymi *B. oleracea* metodami hodowli konwencjonalnej były całkowicie nieefektywne.

Ocena zawartości jądrowego DNA metodą cytometrii przepływowej (FCM) była prowadzona przy zastosowaniu standardu wewnętrznego *Zea mays* ($2C=5,43$ pg). Analiza FCM pozwoliła określić wielkość genomów jądrowych oraz dokonać identyfikacji różnic pod względem średniej zawartości jądrowego DNA (pg.) mieszańców międzygatunkowych różnych pokoleń oraz form rodzicielskich oraz na określenie w przybliżeniu ich konstytucji genomowej. Na podstawie tej analizy określono zawartość jądrowego DNA następujących genotypów: *B. oleracea*, *B. taurica*, *B. cretica*:

1,49–1,51 pg., *B. rapa*: 1,08 pg., *B. napus*: 2,47 pg., mieszańce *B. oleracea* x *B. napus* pokolenia F_1 : 1,98 pg., mieszańce *B. oleracea* x *B. napus* pokolenia F_2 : 3,98 pg., mieszańce *B. oleracea* x *B. napus* pokolenia BC_1 x $F_{1/2}$ i BC_2 x F_1 , BC_2 : od 2,01 pg. do 4,08 pg., mieszańce *B. rapa* x *B. napus*: 1,79 pg.

Cytogenetyczna identyfikacja mieszańców *Brassica oleracea* x *Brassica napus* (FISH) Materiał do badań cytologicznych stanowiły formy rodzicielskie oraz mieszańce międzygatunkowe *B. oleracea* x *B. napus* pokolenia F_1 , F_2 , F_1 x F_2 , F_1 x BC_1 , BC_1 x F_1 x F_2 otrzymane w latach 2015 – 2020. Dla analizowanych genotypów określono liczbę chromosomów w komórkach somatycznych, liczbę loci rDNA oraz liczbę chromosomów markerowych dla genomów A i C. Obserwowano zróżnicowaną liczbę chromosomów od 34 do 59 w pokoleniu BC_1 x $F_{1/2}$ i od 28 do 66 w pokoleniu BC_2 . Zastosowanie sekwencji rDNA pozwoliło zaobserwować zmienność w liczbie i dystrybucji loci 5S i 35S rDNA oraz identyfikację chromosomów markerowych dla genomu C i A. Różnice w liczbie i wzorze loci rDNA w analizowanych mieszańcach wskazujące na liczne reorganizacje zachodzące w genomach poliploidalnych.

Analiza cech morfologicznych form mieszańcowych w fazie wegetatywnej i generatywnej wykazała, że mieszańce pokolenia F_1 *B. oleracea* x *B. napus* oraz *B. rapa* x *B. napus* posiadają cechy pośrednie obu form rodzicielskich zarówno w fazie wegetatywnej i generatywnej oraz charakteryzują się bardzo niską żywotnością pyłku, która może ograniczać ich zdolność do rozmnażania generatywnego. Mieszańce kolejnych pokoleń wstecznych w kierunku *B. oleracea* i *B. rapa* posiadają większą liczbę cech typowych dla form wypierających. Mieszańce *B. oleracea* i *B. napus* pokolenia F_2 posiadały cechy anatomiczno-morfologiczne wskazujące na podwojenie wielkości genomu, wytwarzały obfity pyłek oraz wykształcały nasiona w wyniku samozapylenia. Mieszańce międzygatunkowe *B. napus* x *B. oleracea* pokolenia BC_1 , F_1 x F_2 , BC_1 x $F_{1/2}$ i BC_2 x F_1 x F_2 były silnie zróżnicowane pod względem cech anatomiczno-morfologicznych zarówno w fazie wegetatywnej i generatywnej. Trzy mieszańce pokolenia BC_1 x F_1 / F_2 wytwarzały kwiaty męskopłodne co świadczy o aktywności genów przywracających płodność wprowadzonych z linii restorującej *B. napus*.

Cechy morfologiczne, wartość użytkowa oraz poziom odporności międzygatunkowych mieszańców z rodzaju *Brassica* została oceniana w warunkach polowych dla 145 genotypów w latach 2014–2020. Genotypy uzyskane w wyniku

krzyżowań oddalonych charakteryzowały się szeregiem cech nietypowych dla form uprawnych, co mogło być spowodowane występowaniem cech gatunków dzikich, wysoką ploidalnością i brakiem genetycznej stabilności w otrzymanych pokoleniach. Formy mieszańcowe *B. oleracea* x *B. napus* uzyskane w wyniku krzyżowań oddalonych będą wymagały dalszej hodowli wsobnej lub krzyżowań wstecznych z uprawnymi gatunkami *B. oleracea* jako źródła odporności na czerń krzyżowych, mączniaka prawdziwego, kiłę kapusty a także poddane selekcji, która pozwoli wykorzystać je jako nowe warzywa liściowe. Nowo otrzymany mieszańiec kapusty czarnej i jarmużu odznaczał się wysoką zdrowotnością oraz walorami smakowymi i wigorem. Mieszańce międzygatunkowe *B. rapa* x *B. napus* kolejnych pokoleń wstecznych odznaczały się w warunkach polowych cechami typowymi dla formy wypierającej (*B. rapa*) i zostały wykorzystane w hodowli twórczej nowych mieszańców heterozyjnych kapusty pekińskiej.

Wnioski z prowadzonych badań

Prowadzone badania pozwoliły na wytworzenie po raz pierwszy w Polsce nowej zmienności genetycznej warzyw kapustowatych dzięki zastosowaniu specjalistycznych technik umożliwiających krzyżowanie międzygatunkowe oraz na kompleksowym zbadaniu form hybrydowych i ich krzyżowań w kolejnych pokoleniach generatywnych. Nowe formy mieszańcowe w ramach gatunku *B. oleracea* oraz *B. oleracea* x *B. napus* oraz *B. rapa* x *B. napus* otrzymane w wyniku krzyżowań oddalonych wzbogaciły możliwości hodowlane o nowe niespotykane i cenne cechy użytkowe, wartości odżywcze, zdrowotnościowe oraz odporność na najważniejsze w warunkach Polski choroby. Krzyżowania linii CMS *B. oleracea* i płodnych form *B. napus* z genem *Rf* pozwoliły na przywrócenie płodności w mieszańcach międzygatunkowych *B. oleracea* x *B. napus* pokolenia F_1 , F_2 i BC_1 x $F_{1/2}$.

Osiągnięcia projektu

1. Otrzymanie międzygatunkowych mieszańców *B. oleracea* x *B. napus* pokolenia F_1 , F_2 , BC_1 , F_1 x F_2 , BC_1 x $F_{1/2}$, BC_2 i BC_2 x $F_{1/2}$ oraz mieszańców *B. rapa* x *B. napus* pokolenia F_1 , BC_1 , BC_2 .
2. Charakterystyka otrzymanych form mieszańcowych pod względem cech morfologicznych

w fazie wegetatywnej i generatywnej, zawartości jądrowego DNA, identyfikacja konstrukcji genomowej metoda FISH (Kamiński i in. 2020)

3. Ocena cech użytkowych oraz poziomu odporności na najważniejsze patogeny międzygatunkowych mieszańców
4. Identyfikacja stabilnych genetycznie form allopoliploidalnych form mieszańcowych *B. oleracea* x *B. napus* o wysokiej zdolności do rozmnażania generatywnego
5. Przywrócenie płodności mieszańców *B. oleracea* x *B. napus* z cechą CMS dzięki przeniesieniu genów przywracających płodność na poziomie pokolenia F_1 , F_2 oraz BC_1 x $F_{1/2}$
6. Wprowadzenie cechy CMS do męskosterylnych genotypów *B. rapa* z *B. napus* i wytworzenie linii CMS kapusty pekińskiej do wykorzystania w hodowli twórczej (Kamiński i in. 2016)

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Kamiński P., Podwyszyńska M., Ciołakowska-Marasek A., Nowak K., Starzycki M., Starzycka-Korbas E. 2019. Diversity of *B. napus* L. x *B. oleracea* L. interspecific hybrids of F_1 and F_2 generations. World Congress on Plant Science and Molecular Biology. Sept17–19, Valencia, Spain. p.22 (poster, prezentacja ustna)

Publikacje

Kamiński P., Podwyszyńska M., Starzycki M., Starzycka-Korbas E. 2016. Interspecific hybridization of cytoplasmic male-sterile rapeseed with *Ogura* cytoplasm and *Brassica rapa* var. *pekinensis* as a method to obtain male-sterile Chinese cabbage inbred lines. *Euphytica*, 208 (3), 519–534. DOI: 10.1007/s10681–015–1595–9. (35 pkt. MNiSW, IF 1,81)

Kamiński P., Podwyszyńska M., Ciołakowska-Marasek A., Nowak K., Starzycki M., Starzycka-Korbas E. 2019. Otrzymanie nowej zmienności genetycznej warzyw kapustowatych przy wykorzystaniu krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica*. Development of the new genetic diversity of vegetable brassicas by the use of distant hybridization. *Biuletyn IHAR* 286, 331–333.

Kamiński P., Podwyszyńska M., Ciołakowska-Marasek A., Starzycki M., Starzycka-Korbas E., Nowak K. 2020. Development and characteristics of interspecific hybrids between *Brassica oleracea* L. and *B. napus* L. *Agronomy* (2020) 10 (9). DOI: 10.3390/agronomy10091339. (100 pkt. MNiSW, IF 2,603)

Badanie molekularnego mechanizmu odporności na kiłę kapusty (*Plasmodiophora brassicae*) u roślin z rodzaju *Brassica*

Studies on molecular mechanism of clubroot resistance (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica* plants

Monika Markiewicz✉, Lech Michalczyk, Beata Kowalska, Urszula Smolińska, Agnieszka Czajka, Józef Robak, Anna Czubatka-Bieńkowska, Piotr Kamiński, Małgorzata Podwyszyńska

Instytut Ogrodnictwa - PIB
✉ e-mail: monika.markiewicz@inhort.pl

Słowa kluczowe: kiła kapusty; molekularne markery; odporność roślin; *Plasmodiophora brassicae*; rośliny kapustne

Cele prowadzonych badań

Celem badań było poznanie molekularnego i komórkowego mechanizmu odporności na kiłę kapusty u roślin z rodzaju *Brassica*. Cele realizowano w ramach poszczególnych tematów badawczych: 1) Ocena podatności na porażenie różnymi patotypami *P. brassicae* wybranych genotypów z rodzaju *Brassica* (2015–2018); 2) Analiza transkryptomów genotypów *Brassica* porażonych *P. brassicae* Pb2 (2016–2018); 3) Walidacja genów kandydackich na markery odporności na kiłę kapusty u wybranych genotypów (2019–2020); 4) Analiza ekspresji genów odpornościowych u wybranych genotypów podczas infekcji różnymi patotypami patogena (2017–2018). Cele badań wykonywanych w ramach zadania 99 zostały zrealizowane.

Materiały i Metody

Badania prowadzono na genotypach o zróżnicowanym poziomie i typie odporności na kiłę: *B. rapa* var. *capitata* ECD03 (rzepa), *B. napus* var. *rapifera* cv. Wilhelmsburger (brukiew), *B. oleracea* var. *capitata* cv. Bindsachsener (kapusta głowiasta), *B. oleracea* var. *acephala* subvar. *lacinata* cv. Verheul (jarmuż), *B. oleracea* var. *capitata* cv. Kilaton F₁ (kapusta głowiasta), *B. rapa* subsp. *pekinensis* cv. Bilko F₁ (kapusta pekińska), *B. napus* var. *napus* cv. Mendel F₁ (rzepak). Jako kontrolę negatywną wykorzystano genotyp wrażliwy na wszystkie patotypy *P. brassicae*: *B. rapa* ssp. *pekinensis* cv. Granaat (kapusta pekińska).

Do badań wykorzystano trzy patotypy *P. brassicae* – Pb2, Pb3 oraz Pb9. Inokulum zarodników uzyskano z porażonych korzeni kapusty głowiastej ‘Kamienna głowa’. Próby roślinne (korzenie) do analiz pobierano w 10, 20 oraz 35 dniu wzrostu roślin w podłożu zakażonym oraz wolnym od patogena (kontrola). Próby gleby pobierano przed wysiewem nasion do podłoża oraz po zakończeniu doświadczenia. Do oceny podatności genotypów na porażenie wykonano obserwacje makroskopowe (określano stopień oraz indeks porażenia – DI) i mikroskopowe (liczba plazmodiów we włósnikach oraz analiza cytochemiczna obecności ROS) korzeni roślin. Wykonano analizy molekularne na obecność zarodników patogena w korzeniach. Do identyfikacji genów związanych z reakcją roślin na porażenie zastosowano technikę cDNA-AFLP z wykorzystaniem 256 par starterów różnicujących. Profile ekspresji porównywano a różnicujące je produkty (ulegające nadekspresji lub wyciszeniu) sekwencjonowano oraz poddano analizie homologii BLAST i anotowano na genom kapusty. Wytypowano geny kandydackie związane z reakcjami odpornościowymi i przeprowadzono ich walidację metodą real-time PCR określając względny poziom ekspresji genów normalizowany w stosunku do genu referencyjnego *ACTIN*. Dodatkowo przeprowadzono analizę ekspresji genów kodujących białka: G (rozpoznanie patogena), NPR1 (aktywacja genów PR), RbohG (oksydaza NADPH) oraz dysmutazę SOD (metabolizm ROS).



Opis wyników

Oceniono podatność na porażenie różnymi patotypami *P. brassicae* genotypów z rodzaju *Brassica* (Czajka, i in. 2020). W ocenie makroskopowej, symptomy infekcji na korzeniach obserwowano w 20 dniu od wysiania nasion u brukwi ‘Wilhelmsburger’ (Pb9), jarmużu ‘Verheul’ (Pb9) oraz kapusty pekińskiej ‘Bilko F₁’ (Pb9 oraz Pb3). W 35 dniu od siewu, symptomy obserwowano u wszystkich genotypów – najsilniejsze u kapusty głowiastej ‘Bindsachsener’ (Pb2), jarmużu ‘Verheul’ (Pb2), brukwi ‘Wilhelmsburger’ (Pb9), rzepaku ‘Mendel F₁’ (Pb9) oraz kapusty pekińskiej ‘Bilko F₁’ (Pb3). Objawów nie obserwowano jedynie u brukwi ‘Wilhelmsburger’ oraz kapusty głowiastej ‘Kilaton F₁’ infekowanych Pb2. Wykazano, że najwyższą odporność w stosunku do badanych patotypów wykazuje rzepa ECD03 (DI_{Pb2}=3, DI_{Pb3}=1 oraz DI_{Pb9}=4), a najniższą – kapusta głowiasta ‘Bindsachsener’ (DI_{Pb2}=80, DI_{Pb3}=66 oraz DI_{Pb9}=66). Wyniki testów molekularnych wykazały obecność materiału genetycznego patogena w korzeniach wszystkich infekowanych genotypów. W przypadku infekcji Pb3, obserwowano wzrost ilości materiału genetycznego patogena w korzeniach większości genotypów, co było powodowane infekcją wtórną. U brukwi ‘Wilhelmsburger’ oraz rzepy ECD03 infekowanych Pb2 oraz Pb3, a także kapusty głowiastej ‘Kilaton F₁’ infekowanej Pb2, ilość patogena w korzeniach malała – nie dochodziło do infekcji wtórnej. Wyniki analiz molekularnych na obecność materiału genetycznego patogena w podłożu (inokulowanego Pb2 oraz Pb9), w których rosła większość z badanych genotypów wykazały wzrost ilości patogena w podłożu podczas wzrostu roślin. W ocenie mikroskopowej obecność plazmodiów obserwowano we włosnikach korzeni wszystkich genotypów, a ich liczba była zależna od genotypu i patotypu. Najwięcej dojrzałych plazmodiów pojawiało się około 11–15 dnia od wysiewu nasion do inokulowanego podłoża. Najsilniej porażone były włosniki kapusty pekińskiej ‘Bilko F₁’ (Pb2, Pb3), kapusty głowiastej ‘Kilaton F₁’ (Pb2), jarmużu ‘Verheul’ (Pb3), rzepaku ‘Mendel F₁’ (Pb9) oraz rzepy ECD03 (Pb9); najmniej – brukwi ‘Wilhelmsburger’ (Pb2, Pb3) oraz jarmużu ‘Verheul’ (Pb9).

Analiza transkryptomów wykazała, że u roślin infekowanych 41.9% transkryptów ulegało nadekspresji a 38.5% było wyciszonych, w porównaniu do kontroli. Zidentyfikowano i określono analizę homologii dla 150 transkryptów o zróżnicowanej ekspresji (Markiewicz, i in., 2021). Wykazano, że fragmenty ulegające nadekspresji wykazywały podobieństwo do sekwencji kodujących białka

zaangażowane w reakcje odpornościowe (27.6%), regulację ekspresji genów (25.0%), budowę cytoszkieletu (7.9%), transport komórkowy i transdukcję sygnału (po 5.3%), regulację cyklu komórkowego i potranslacyjne modyfikacje białek (po 2.6%) oraz inne procesy komórkowe (13.2%). Zidentyfikowano także transkrypty prawdopodobnie pochodzące od patogena (6.5%). Fragmenty ulegające wyciszeniu wykazywały homologię do sekwencji kodujących białka związane z regulacją ekspresji genów (32.5%), transportem komórkowym (12.5%), budową cytoszkieletu (7.5%), transdukcją sygnału (5.0%), regulacją cyklu komórkowego i potranslacyjnymi modyfikacjami białek (po 2.5%) oraz innymi procesami komórkowymi (27.5%). Średnio dla 10.0% fragmentów ulegających zarówno nadekspresji, jak i wyciszeniu, wykazano homologię do sekwencji kodujących białka o nieznannej funkcji. 79.6% zidentyfikowanych sekwencji wykazywało wysokie podobieństwo do referencyjnych sekwencji genomowych. Największa ilość sekwencji (84.0%) mapowała się na genomie *B. napus*, a najmniejsza (76.0%) na genomie *B. oleracea*.

Do walidacji wytypowano 45 genów kandydackich związanych z odpornością roślin. Określono korelację pomiędzy wartościami względnych ekspresji analizowanych genów u genotypów porażonych *P. brassicae* Pb2 a ich indeksem porażenia (DI). Na markery molekularne wytypowano tzw. markery funkcjonalne – 28 ESTs bardzo wysoko skorelowanych z odpornością roślin, w tym 26 ESTs skorelowanych negatywnie (ekspresja genu wzrastała wraz ze spadkiem wskaźnika DI, czyli wzrostem odporności) oraz 2 ESTs skorelowane dodatnio (ekspresja genu wzrastała wraz ze wzrostem wskaźnika DI, czyli spadkiem odporności). Wśród markerów funkcjonalnych wytypowano geny kodujące m. in. białka: opornościowe (N, PDCD1; kinazy At5g24010 i cdc7; proteazę SBT3.3; dehydrogenazę B7; hydrolazę Sgpp; dioksygenazę PcbC; syntazę germakrenu D; białka z domeną *snare* oraz wiążące rybosomy), związane z transdukcją sygnału (błonowy receptor KCTD8; fosfataza PP1R26), transportem komórkowym (transporter 4 i NRT1/PTR), regulacją ekspresji genów (metylotransferazy PMT24 i ATX5; czynniki transkrypcyjne bHLH118 oraz ERF109; białka PPR i ZAT5), regulacją cyklu komórkowego (cyklina Y) oraz budową cytoszkieletu (formina 3 i białko związane z mikrotubulami).

Poziom ekspresji genów kodujących białka odpornościowe w roślinach infekowanych był zależny od genotypu oraz patotypu patogena. Obserwowano różne profile ekspresyjne: ekspresja genów *G* oraz *NPR1* wzrastała w 20 dniu od wysiania

nasion, dla *RbohG* obserwowano spadek, a dla *SOD* – wzrost ekspresji w czasie trwania doświadczenia. Najwyższy poziom względnej ekspresji tych genów obserwowano u brukwi ‘Wilhelmsburger’, jarmużu ‘Verheul’ oraz kapusty głowiastej ‘Kilaton F₁’, a najniższy u rzepy ECD03, kapusty głowiastej ‘Bindsachsener’, kapusty pekińskiej ‘Bilko F₁’ oraz rzepaku ‘Mendel F₁’. Dla genów *G protein*, *NPRI*, *RbohG* obserwowano dodatnią, natomiast dla *SOD* negatywną korelację pomiędzy ekspresją a odpornością roślin (DI). Wyniki badań dotyczących ekspresji genów związanych z odpornością roślin z rodzaju *Brassica* na kiłę kapusty zostaną opublikowane w najbliższym czasie (Markiewicz, Michalczuk, 2021).

Wnioski z prowadzonych badań

1. Wystąpienie symptomów choroby oraz obecność spor w korzeniach roślin wskazuje, że odporność badanych genotypów została przełamana. Najwyższą odporność w stosunku do badanych patotypów wykazała rzepa ECD03, najniższą – kapusta głowiasta ‘Bindsachsener’.
2. Brak objawów choroby w początkowym okresie wzrostu roślin wymaga zastosowania metod molekularnych lub oceny mikroskopowej włóśników korzeni roślin do wykrywania patogena.
3. Wzrost ilości zarodników *P. brassicae* w podłożu, w którym rosły badane genotypy wskazuje, że rośliny *Brassica* mogą przyczynić się do zwiększenia zakażenia gleby.
4. Wystąpienie objawów choroby u wszystkich badanych genotypów *Brassica* świadczy o dużej agresywności patotypów Pb9 oraz Pb3.
5. Podczas infekcji zróżnicowanej ekspresji ulegają roślinne geny kodujące białka odpornościowe (kinazy, hydrolazy, dehydrogenazy, enzymy syntezy metabolitów wtórnych), regulujące ekspresję genów (czynniki transkrypcyjne, metylazy), związane z transportem komórkowym (transportery ABC, NRT1/PTR), transdukcją sygnału (receptory błonowe), potranslacyjną modyfikacją białek (ligaaza ubikwityny), regulacją cyklu komórkowego (cykliny) oraz budową cytoszkieletu (forminy), a także geny związane z reakcją nadwrażliwości (HR) i programowaną śmiercią komórki (PCD) (białka N, Pid3, TAO1, PDCD1, ERF109, białka z domeną MA3 oraz bHLH).

Osiągnięcia projektu

1. Wykazano, że odporność badanych genotypów

została przełamana przez wybrane patotypy, nie są odporne, ale tolerancyjne w stosunku do testowanych patotypów patogena.

2. Określono skuteczne metody oceny podatności genotypów *Brassica* na porażenie przez różne patotypy *P. brassicae* w warunkach laboratoryjnych oraz szklarniowych, z zastosowaniem metod molekularnych oraz oceny mikroskopowej.
3. Wykazano, że rośliny *Brassica* będąc gospodarzami dla *P. brassicae* (niezależnie od ich odporności czy tolerancyjności) mogą przyczynić się do zwiększenia zakażenia gleby patogenem.
4. Wykazano, że patotypy Pb9 oraz Pb3 charakteryzują się większą agresywnością względem roślin *Brassica* niż powszechny w Polsce patotyp Pb2.
5. Zidentyfikowano 150 genów związanych z reakcją roślin z rodzaju *Brassica* na porażenie *P. brassicae*.
6. Wytypowano 45 genów kandydackich i określono ich potencjał na markery odporności.
7. Zaproponowano molekularny i komórkowy mechanizm odporności na kiłę kapusty roślin *Brassica* związany z odpornością systemiczną nabytą (SAR) oraz z reakcją nadwrażliwości (HR) i programowaną śmiercią komórki (PCD).
8. Wytypowano 28 funkcjonalnych markerów odporności do wykorzystania w dalszych pracach hodowlanych do wczesnej selekcji genotypów odpornych.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Wystąpienia ustne

Markiewicz, M., Michalczuk, L., Czajka, A. (2019). Analiza ekspresji wybranych genów związanych z reakcjami odpornościowymi roślin z rodzaju *Brassica* infekowanych różnymi patotypami *Plasmodiophora brassicae*. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa ‘Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych’, Zakopane 5–8.02.2019, Mat. konferencyjne: 89–90.

Postery

Markiewicz, M., Michalczuk, L., Robak, J., Smolińska, U., Kowalska, B., Czubatka-Bieńkowska, A., Czajka, A. (2016). Studies on the molecular mechanisms of resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae*) in plants of genera *Brassica*. V Polski Kongres Genetyki, Łódź 19–22.09.2016, Mat. konferencyjne: 304.

Markiewicz, M., Michalczuk, L., Czajka, A. (2017). Poszukiwanie molekularnych markerów odporności na kiłę

- kapusty (*Plasmodiophora brassicae*) u roślin z rodzaju *Brassica*. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa 'Ziemia – Roślina – Człowiek', Kraków 20–21.09.2017, Mat. konferencyjne: 163.
- Markiewicz, M., Czajka, A., Kowalska, B., Smolińska, U. (2018). Susceptibility of *Brassica* genotype differing in the level and type of clubroot resistance to infection by *Plasmodiophora brassicae*. The Integrative Plant Biology Conference IPG PAS, Poznań 7–9.11.2018, Mat. konferencyjne: 74.
- Markiewicz, M., Michalczuk, L. (2018). Changes in gene expression and identification of potential molecular markers of resistance to clubroot disease (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassica* plants. *Congress BIO 2018*, 14th Conference of the Polish Society for Cell Biology, Gdańsk 18–21.09.2018. *Acta Biochimica Polonica* 65 (2): 112.
- Kowalska, B., Smolińska, U., Czajka, A., Markiewicz, M. (2018). Podatność roślin *Brassica* na porażenie przez *Plasmodiophora brassicae* na podstawie obserwacji mikro- i makroskopowych korzeni. III Ogólnopolskie Sympozjum Mikrobiologiczne 'Metagenomy różnych środowisk', Lublin 28–29.09.2018, Mat. konferencyjne: 113.
- Markiewicz, M., Czajka, A., Podwyszyńska, M. (2019). Interactions in the *Brassica* sp. – *Plasmodiophora brassicae* pathosystem. Reaction to various *P. brassicae* pathotypes in different *Brassica* genotypes and selection of candidate genes for molecular markers of clubroot. 9th PSEPB Conference, Toruń 9–12.09.2019, Mat. konferencyjne: 88: S4-PO06.
- Markiewicz, M., Podwyszyńska, M. (2019). Geny związane z odpowiedzią roślin z rodzaju *Brassica* na porażenie *Plasmodiophora brassicae* patotyp 2. *Botanika bez granic* – 58. Zjazd PTB, Kraków 1–7.07.2019, Streszczenia Referatów i Plakatów (red. L. Frey): 61.
- Markiewicz, M., Podwyszyńska, M. (2019). Studies on the potential of molecular markers for resistance to clubroot disease in *Brassica* plants. EUROBIOTECH 2019, Kraków 23–25.09.2019, Mat. konferencyjne: 59: P11.20.

Publikacje naukowe

- Czajka, A., Markiewicz, M., Kowalska, B., Smolińska, U. (2020). Reaction of clubroot-resistant genotypes of *Brassica rapa*, *Brassica napus* and *Brassica oleracea* to Polish *Plasmodiophora brassicae* pathotypes in laboratory tests. *European Journal of Plant Pathology* 158 (2), 533–544. DOI: 10.1007/s10658–020–02100-y.
- Markiewicz, M., Czajka, A., Michalczuk, L. (2021). Reaction of clubroot-resistant genotypes of *Brassica rapa*, *Brassica napus* and *Brassica oleracea* to *Plasmodiophora brassicae* pathotype 2: changes in gene expression and identification of potential molecular markers. *Scientia Horticulturae* (w recenzji).
- Markiewicz, M., Michalczuk, L. (2021). Studies of genes expression related to the response to *P. brassicae* infection and selection of the potential molecular markers for resistance to clubroot disease in *Brassica* plants. *European Journal of Plant Pathology* (w przygotowaniu).

Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stropy abiotyczne

Identification of pea genome regions in the determining of the selected parameters of the physiological effectiveness as an important factor of the resistance to abiotic stresses

Wojciech Świącicki✉, Magdalena Gawłowska, Andrzej Górny, Dominika Ratajczak, Katarzyna Beczek, Alicja Niewiadomska, Lech Boros, Anna Wawer

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
✉ e-mail: wswi@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: efektywność wykorzystania azotu, groch, mapowanie QTL, selekcja z wykorzystaniem markerów, sprawność aparatu fotosyntetycznego, wyleganie, zawartość lignin.

Cele prowadzonych badań

1. Ocena parametrów efektywności wykorzystania azotu i fosforu w wybranych liniach grochu w warunkach optymalnych i niedoboru azotu w warunkach kontrolowanych i polowych. Określenie korelacji plonu w wybranych liniach z pozostałymi cechami. Ocena reakcji na stropy abiotyczne w wybranych liniach. Ustalenie loci konserwatywnych w latach, warunkujących badane cechy ilościowe oraz wskazanie w liniach markerów sprzężonych – cel zrealizowany.
2. Ocena parametrów sprawności i aktywności aparatu fotosyntetycznego w liniach grochu w warunkach optymalnych i niedoboru azotu w warunkach kontrolowanych. Określenie korelacji z pozostałymi cechami – cel zrealizowany.
3. Określenie korelacji wylegania w wybranych liniach grochu z zawartością lignin w łodydze – cel zrealizowany.
4. Wyznaczenie QTL efektywności wykorzystania azotu, fosforu, sprawności fotosyntetycznej, wylegania, zawartości lignin. Wytypowanie markerów bliskosprzężonych z badanymi cechami użytkowymi i przetestowanie w wybranych, innych niż potomstwo populacji mapującej, liniach grochu. – cel zrealizowany.

Materialy i Metody

Populacja mapująca grochu [Carneval×MP1401].

Populacja mapująca grochu [Wt10245×Wt11238].

Wybrane linie grochu: 1. Wt10269 (trad), 2. Astronaute (*afila*), 3. Wt2033 (trad), 4. Starski (*afila*), 5. Wt3805 (trad), 6. Wt11145 (trad), 7. Wt9013 (trad), 8. Wt404 (trad), 9. Wt10270 (*afila*), 10. Wt2815 (trad), 11. Wt12368 (trad), 12. Wt15237 (trad), 13. Tarchalska (*afila*), 14. Mecenas (*afila*), 15. Carneval (*afila*), 16. MP1401 (*afila*), 17. Wt11238 (*accacia*), 18. Wt10245 (trad).

Szklarnia fitotronowa, warunki optymalne i stresowe, 2 powtórzenia, 3 lokalizacje polowe (Wiatrowo, 2 lokalizacje (optymalna i niedobór); Przebędowo, 1 lokalizacja (stresowa); w każdej lokalizacji 2 powtórzenia).

1. Czynniki: doświadczenie wazonowe (azot, fosfor, woda, fotosynteza); czynniki: zmienny poziom nawożenia azotowego; szklarnia fitotronowa; wazony 8dm³; podłoże glebowe o optymalnej zawartości składników pokarmowych (95 mg azotu dm⁻³ gleby) i stałej, optymalnej wilgotności (75–80% ppw) utrzymywanej wagowo przez cały okres wegetacji oraz stresowej – optymalna wilgotność i obniżona zawartość azotu (39 mg N dm⁻³ gleby),



2. Doświadczenia polowe w zróżnicowanych warunkach klimatyczno – glebowych (w każdym roku analiza stanowisk na zawartość mikro i makroelementów, np. Wiatrowo optymalne, Wiatrowo słabe: niedobór azotu, deficyt B, nadmiar Fe, Przebędowo: niedobór azotu, deficyt Mg, niedobór siarki, nadmiar Fe, niskie pH.
3. pomiary i obserwacje:
 - Azot – zawartość azotu w materiale roślinnym (nasiona + słoma) mierzona przy pomocy analizatora elementarnego VarioMax (Elementar GmbH, Hanau, D) – metoda Dumas’a,
 - Fosfor – zawartość fosforu w materiale roślinnym (nasiona + słoma) mierzona przy pomocy metody spektrometrycznej P N - I S O 6491:2000 Laboratorium Analityczne Lublin,
 - NA – Aktywność nitrogenazy określona metodą acetylenową na chromatografii gazowym CHROM5, na podstawie ilości acetylenu zredukowanego do etylenu i wyrażonego w nMC₂H₂ (Niewiadomska, 2013),
 - zbiór i omłoty; waga (sucha masa) części wegetatywnych i nasion (ZIA, VEG), indeks plonu (HI%),
- *komponenty efektywności wykorzystania wody:
 - WUse, ilość wytranspirowanej wody/roślinę w ciągu całego sezonu wegetacyjnego (dm³ lub mole),
 - WUEveg, WUEgen, WUEb współczynnik efektywności wykorzystania wody (współczynnik efektywności transpiracji) w formowaniu masy wegetatywnej, masy nasion i biomasy,
- * komponenty efektywności wykorzystania azotu N:
 - % N veg i % N ziarna,
 - NAC – ilość pobranego azotu/wazon
 - GwNg, ilość wyprod. suchej masy nasion na jednostkę N zakumulowanego w nasionach,
 - NHI, azotowy indeks plonu; % całkowitej ilości azotu N translokowanego do nasion,
 - NERveg, NERgen, fizjologiczny współczynnik efektywności wykorzystania azotu w formowaniu masy wegetatywnej (veg), nasion (gen)
- * komponenty efektywności wykorzystania fosforu:
 - % zawartość fosforu P w słomie i % zawartość P w nasionach,
 - PHI, fosforowy indeks plonu; % całkowitej ilości P translokowanego do nasion,
 - PERveg, PERgen, fizjologiczny współczynnik efektywności wykorzystania fosforu w formowaniu masy wegetatywnej (veg) i nasion (gen)

Wyznaczono indeks tolerancji (T) dla wybranych linii T= (plon st/plon opt)/śred plon str/śred plon opt (Górny et al., 2011).

G.C.V. – genotypowy współczynnik zmienności = $[(\sqrt{\sigma_g^2})/\text{średnia og.}]$; w %

h_{BS}^2 – odziedziczalność cechy w szerokim sensie. = $\sigma_g^2 / \sigma_{ph}^2$.

Pomiary fotosyntezy zostały wykonane w fazie wegetatywnej wzrostu, przy pomocy: przenośnego systemu pomiarowego LI-COR 6400XT (firmy LiCor Ltd., USA).

Pn – intensywność fotosyntezy (netto), $\mu\text{mol CO}_2 \text{ m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (także jako A),

Tr – intensywność transpiracji, $\text{mmol H}_2\text{O m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ (także jako E); zwykle silnie (pozytywnie) skorelowana z przewodnictwem szparkowym (gs) i/lub (negatywnie) z opornością szparek na dyfuzję (1/gS); uzależniona także od systemu korzeniowego, transportu wody z korzenia do pędu (np tzw. *hydraulic conductance*); kutikuli, itd.,

Cond – przewodnictwo szparkowe; miara dyfuzji CO₂; $\text{mmol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$; zwykle oznaczana symbolem g_s; stosowana jednostka: zwykle $\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$,

C_i – międzykomórkowe (sub-stomatal) stężenie CO₂, ppm lub $\mu\text{moli CO}_2/\text{mol powietrza}$; przydatny do oceny zmienności w ruchu dyfuzyjnym (przewodnictwo szparkowe),

Pn/Tr (A/E) – liściowy miernik efektywności transpiracji; opisywany także jako „*instantaneous*” miernik efektywności wykorzystania wody (WUE) na poziomie liści; $\mu\text{mol CO}_2/\text{mmol H}_2\text{O}$ lub $\text{mmol CO}_2/\text{mol H}_2\text{O}$,

Pn/C_i (A/Ci) – miernik sprawności procesu karboksylacji RuBP (1,5-bisfosforybulozy) w fotosyntetycznym cyklu Calvina-Bensona; uczestniczy enzym RuBisCo; nmol ppm^{-1} .

Ocenę wylegania prowadzono według metodyki COBORU w trzech terminach tj. początek kwitnienia, koniec kwitnienia i przed zbiorem. Ligniny oznaczono metodą Klasona (Theander et al., 1995).

4. Do konstruowania mapy wykorzystany został program JoinMap v.3.0 (Van Ooijen & Voorrips, 2001).

5. Do lokalizacji QTL został wykorzystany QTL Cartographer 2.0 (Wang et al., 2012) [opcja composite interval mapping (CIM)], niezależnie dla każdej cechy.

Opis wyników

1. Warunki kontrolowane, linie populacji [Carneval×MP1401]: Stwierdzono korelację pomiędzy plonem z rośliny, a ilością pobranego azotu/wazon (NAC) ($r=0,90$) oraz ilością związanego azotu na g biomasy (0,81).

- W warunkach stresu zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami malały.
2. Stwierdzono silną korelację pomiędzy plonem z rośliny, a ilością wytranspirowanej wody i efektywnością wykorzystania wody w warunkach optymalnych ($r=0,74$). W warunkach stresu zależności pomiędzy poszczególnymi parametrami fotosyntezy malały (plon i WUEbio $r=0,52$).
 3. Warunki kontrolowane: najsilniejsze korelacje między plonem, a poszczególnymi parametrami sprawności aparatu fotosyntetycznego wystąpiły pomiędzy plonem ZIA, a powierzchnią liścia LA i efektywnością karboksylacji Pn/Ci. Były silniejsze w warunkach optymalnych niż przy niedoboru azotu.
 4. W warunkach niedoboru azotu (pole) rosła korelacja plonu z efektywnością wykorzystania azotu w formowaniu nasion NERg ($r=0,31$, $r=0,50$, $r=0,64$) i pozostałymi parametrami gospodarki azotowej.
 5. Stwierdzono istotne korelacje (warunki polowe optymalne) pomiędzy plonem z rośliny, a% całkowitej ilości fosforu translokowanego do nasion (PHI, $r=0,51$) oraz ilości pobranego fosforu (0,88), jak również pomiędzy indeksem plonu i fosforowym indeksem plonu (0,78) i efektywnością wykorzystania fosforu w formowaniu masy wegetatywnej (-0,85).
 6. Przeanalizowano zależność pomiędzy wyleganiem, a zawartością lignin w łodydze. Wystąpiła niewysoka, ale istotna korelacja w populacji [Carneval×MP1401] (*afila*×*afila*) pomiędzy wyleganiem w pełni dojrzałości, a zawartością lignin w łodydze (0,37).
- W populacji [Wt10245×Wt11238] (*trad*×*accacia*) wystąpiła istotna, negatywna korelacja pomiędzy wyleganiem w pełni dojrzałości, a zawartością lignin w łodydze (-0,55).
7. Wskazano rejon w genomie warunkujące parametry gospodarki azotowej i fosforowej, w warunkach kontrolowanych i polowych, w dwóch populacjach mapujących. Porównywalnym rejonem w obu populacjach wydaje się być grupa Chr3LG5, w rejonie markera PsGAPA (Rys.1). Na mapie Wt10245×Wt11238 wydaje się to być rejon markera Pis-Gen_9_3.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Coroczne monitorowanie stanu gleby w trzech lokalizacjach wykazało niedobór azotu i siarki zarówno na stanowiskach Wiatrowie, jak i w Przebądowie.
2. Warunki kontrolowane, w których jedynym czynnikiem stresowym był brak azotu, zmniejszyły wpływ badanych parametrów fizjologicznych na wysokość plonu.
3. Warunki polowe, w których czynnikiem stresowym był nie tylko brak azotu, ale również nadmiar lub niedobór pozostałych mikro i makroelementów, zaostrzały znaczenie badanych parametrów fizjologicznych.
4. Odniesienie sekwencji markera PsGAPA (mapa Carneval×MP1401) do sekwencji fizycznej genomu grochu wykazało bliższą jego lokalizację względem markera AB83 (obie mapy) i PsCam962 (mapa Wt10245×Wt11238) niż do markera Pis_Gen_9_3 (mapa Wt10245×Wt11238).

Tabela 1

marker	grupa sprzężeń	pozycja początkowa markera w sekwencji fizycznej grochu	pozycja końcowa markera w sekwencji fizycznej grochu
PSGAPA	Chr3LG5	187 855 780	187 855 876 pz
AB83	Chr3LG5	200 728 460	200 728 691 pz
PSGAPA-AB83 — 13 Mpz odległość fizyczna pomiędzy markerami			
Pscam962	Chr3LG5	201 344 852	201 344 907 pz
PSGAPA- Pscam962 — 13,5 Mpz odległość fizyczna pomiędzy markerami			
PisGEN9_3	Chr3LG5	261 832 144	261 832 600 pz
PSGAPA- PisGEN9_3 — 74 Mpz odległość fizyczna pomiędzy markerami			

Osiągnięcia projektu

1. Wykazano możliwość zwiększenia plonu u grochu poprzez selekcję linii o zwiększonym parametrze NAC i NHI (szklarnia, warunki optymalne NAC Wt15237 2,5 g/wazon, Astronaute 1,7, NHI Astronaute 90%, Mecenas 89%, NERgen Carneval 27 g/g, Astronaute 22,5 g/g, warunki polowe optymalne NAC Astronaute 9,6 g, Starski 9,3, NHI Astronaute 57,9 %, NERgen Wt3805 15 g/g).

2. Przeanalizowano wyżej wymienione zależności w warunkach stresowych, zarówno w warunkach kontrolowanych, jak i polowych (szklarnia, warunki stresowe NAC Wt15237 3,2 g/wazon, Astronaute 2g/wazon, NHI; Starski 89% NHI, Astronaute 87%, NERgen Starski 25 g/g, Astronaute 21 g/g, warunki polowe, stresowe NAC Starski 6,3, NHI Mecenaz 69%, NERgen WT3805 15 g/g. Nie potwierdzono korelacji plonu z aktywnością bakterii korzeniowych. Potwierdzono korelację plonu z parametrem Nfix (wiązańia azotu).
3. Wskazano markery sprzężone z wyżej wymienionymi cechami: aktywność nitrogenazy, dCAPS PisGen57; zawartość azotu w nasionach % Nzia, marker SSR AD21; % Nfix, marker SSR PsGAPA; międzykomórkowe stężenie CO₂C_i i efektywność transpiracji A/Tr, marker PsGAPA; intensywność transpiracji Tr, marker SSR AC74; efektywność wykorzystania fosforu w formowaniu masy nasion i wegetatywnej, AD21, AA473, Mtic16, Leg404.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

- W. Świącicki, M. Gawłowska, A. Górny, K. Beczek, A. Niewiadomska, L. Boros (2020), Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stresy abiotyczne Biuletyn IHAR, 289: 135–136. MEiN 20 pkt.
- W. Świącicki, M. Gawłowska, A. Górny, D. Ratajczak, A. Niewiadomska, L. Boros (2019), Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stresy abiotyczne Biuletyn IHAR, 286: 335–337. MEiN 20 pkt.
- M. Gawłowska, M. Knopkiewicz, W. Świącicki, L. Boros and A. Wawer (2020) Quantitative trait loci for stem strength properties and lodging in two pea bi-parental mapping populations (*Pisum sativum* L.). Crop Science, DOI: 10.1002/csc2.20395 – publikacja z poprzedniej transzy Postępu Biologicznego, MEiN 100 pkt.

Plakaty

- Gawłowska M., Górny A., Ratajczak D., Niewiadomska A., Świącicki W. (2014). Photosynthetic capacity and components of water and nitrogen efficiency in chosen recombinant *afila* lines of a mapping population of field pea (*Pisum sativum* L.). PhenoDays²⁰¹⁴ w Beaune / Dijon, Francja 29-31.10.2014. Abstract Book: 66-67.
- Gawłowska M., Górny A., Ratajczak D., Niewiadomska A., Świącicki W., Beczek K., Tomaszewska M., (2015). A response to nitrogen shortages in recombinant *afila* lines

of the mapping population of field pea (*Pisum sativum* L.). Plant Abiotic Stress Tolerance III, Wiedeń, Austria, 29.06 – 1.07.2015.

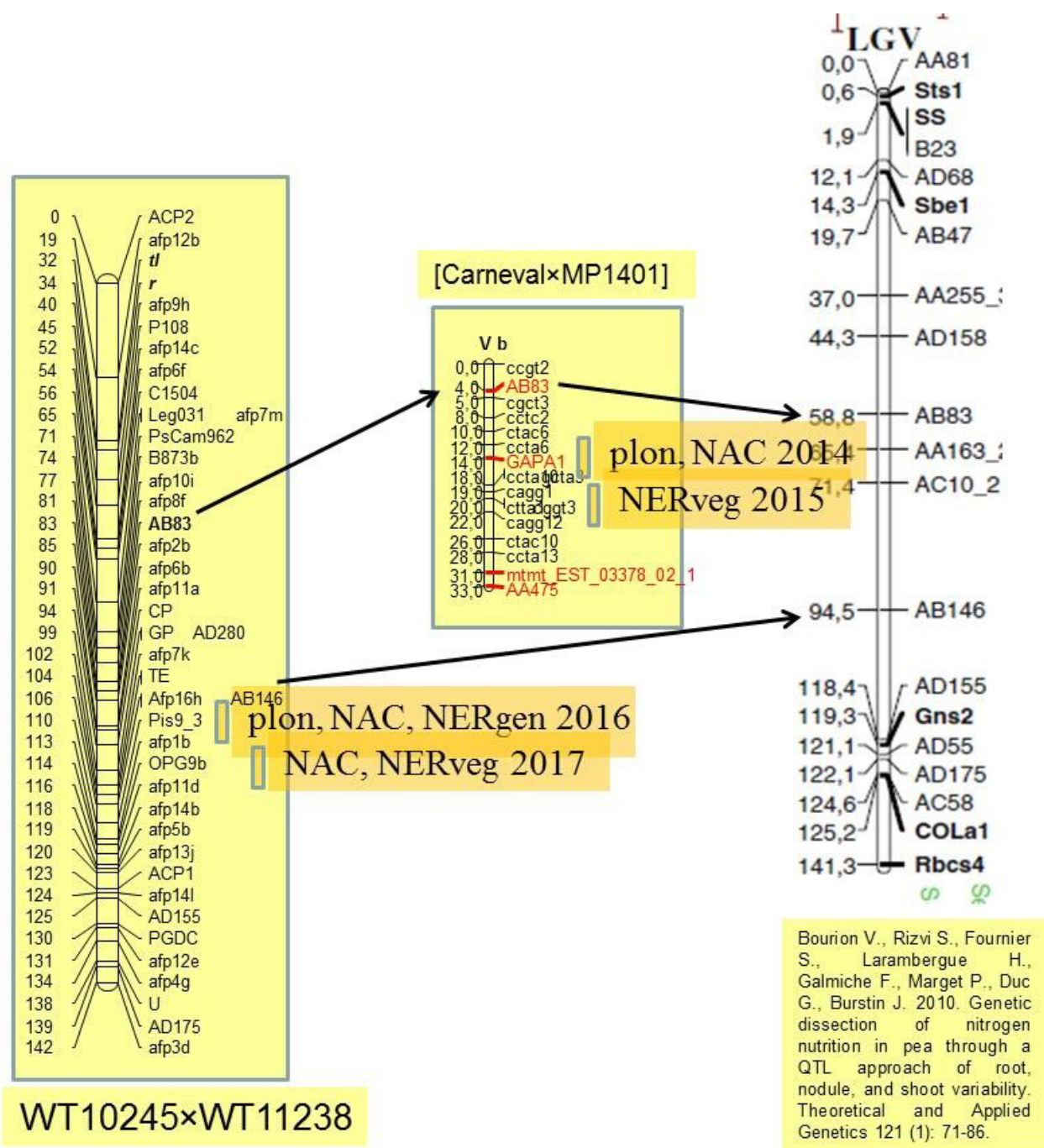
- Gawłowska M., Górny A., Ratajczak D., Niewiadomska A., Świącicki W., Beczek K., Knopkiewicz M. (2016). Nitrogen and phosphorus utilization efficiency in the recombinant *afila* lines of a mapping population of field pea (*Pisum sativum* L.). ILS2 Conference at Troia, Portugal, October 2016 (12-14.10.2016). Abstract Book, 297.
- Gawłowska M., Górny A., Ratajczak D., Niewiadomska A., Świącicki W., Beczek K., Durska A., Knopkiewicz M. Quantitative trait locus for nitrogen utilization efficiency in the recombinant *afila* lines of a mapping population of field pea (*Pisum sativum* L.). 20th International Congress on Nitrogen Fixation, Granada, Hiszpania (3 – 7.09.2017). Proceedings 20thICNF-Granada 2017, PAS8-P07, 277.
- Gawłowska M., Górny A., Ratajczak D., Niewiadomska A., Świącicki W., Beczek K., Kroc M., Knopkiewicz M. The assignment of nitrogen utilization efficiency QTL in the mapping populations of field pea (*Pisum sativum* L.) 4th International Conference “Plant Genetics & Breeding Technologies” Wiedeń, Austria 12 – 13.07.2018. Abstract Book, 36.
- Gawłowska M., Górny A., Ratajczak D., Niewiadomska A., Świącicki W., Beczek K. Phosphorus use efficiency in the recombinant [*accacia*×normal leaf] lines of the field pea (*Pisum sativum* L.) mapping population. 3rd International Legume Society Conference (ILS3) (21-24.05.2019) Poznań, Book of Abstracts, str. 78.
- Gawłowska M., Górny A., Ratajczak D., Niewiadomska A., Świącicki W., Beczek K. (2019) Nitrogen and phosphorus use efficiency in the recombinant [*accacia*×normal leaf] lines of a mapping population of field pea (*Pisum sativum* L.) European Conference on Crop Diversification 2019, 18-21.09.2019, Budapeszt, Węgry, Book of Abstracts, p.200.

Literatura

- Górny, A., Banaszak, Z., Ługowska, B., Ratajczak, D. (2011). Inheritance of the efficiency of nitrogen uptake and utilization in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) under diverse nutrition levels. Euphytica, 177(2), 191-206.
- Niewiadomska, A. (2013). *Ocena wpływu nawozu PRP SOL i koinokulacji bakteriami naproces diazotrofii, aktywność biologiczną i właściwości fizykochemiczne gleby oraz kondycję i plon koniczyny i lucerny.*, (462). Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, Poznań.
- Theander, O., Åman, P., Westerlund, E., Andersson, R., Pettersson, D. (1995). Total dietary fiber determined as neutral sugar and uronic acid residues, and lignin (The Uppsala method): Collaborative study. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 78, 1030-1044.

Van Ooijen, J., Voorrips, R. (2001). JoinMap Version 3.0. Software for the calculation of genetic linkage maps. Wageningen, The Netherlands: Plant Research International B.V.

Wang, S., Basten, C. J., Zeng, Z. B. (2012). Windows QTL Cartographer 2.5. North Carolina State University, Raleigh, NC.: Department of Statistics. Retrieved from <http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>



Rys.1. Lokalizacja rejonów warunkujących QTL parametrów gospodarki fosforowej i azotowej na mapach obu populacji mapujących [Wt10245xWt11238] i [CarnevalxMP1401].

Analiza bioróżnorodności zasobów genowych soi przydatnej do hodowli w warunkach klimatycznych Polski i opracowanie metodyki krzyżowania międzygatunkowego *Glycine max* x *Glycine soja*

Analysis of biodiversity of soybean gene resources useful for breeding in climatic conditions of Poland and development of interspecific *Glycine max* x *Glycine soja* crossing methodology

Jerzy Nawracała¹✉, Danuta Kurasiak-Popowska¹, Agnieszka Katańska-Kaczmarek²

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, ul. Dojazd 11, 60–632 Poznań

²DANKO Hodowla Roślin Sp. z o. o. Choryń 27, 64–000 Kościan

✉ e-mail: jerzy.nawracała@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: banki genów, *Glycine max*, *Glycine soja*, kolekcje, krzyżowanie międzygatunkowe, materiały wyjściowe

Cel badań

W ramach zadania realizowano dwa tematy badawcze.

W pierwszym głównym celem było zgromadzenie genotypów soi (*Glycine max* i *Glycine soja*) z banków genów, kolekcji i innych źródeł oraz charakterystyka ich cech fenologicznych, morfologicznych oraz cech komponentów plonu. Istotnym celem była również ocena otrzymanych w latach 2014 – 2018 genotypów pod kątem ich przydatności do hodowli w warunkach klimatycznych Polski.

W drugim temacie celem głównym było opracowanie metodyki krzyżowania międzygatunkowego *G. max* x *G. soja*. Celami szczegółowymi, prowadzącymi do osiągnięcia celu głównego, było przeprowadzenie obserwacji kwitnienia wybranych genotypów *G. soja* w warunkach szklarniowych i polowych (w tym pęknięcia pyłków i kiełkowania łagiewek pyłkowych), wykonanie krzyżowania pomiędzy *G. max* i *G. soja* różnymi metodami, ocena mieszańcowości roślin otrzymanych z krzyżowania oraz analiza zmienności otrzymanych mieszańców w pokoleniach F_2 – F_5 .

Cele zostały osiągnięte.

Materiał i Metody

Materiał

W temacie pierwszym materiał do badań stanowiło 499 genotypów soi zgromadzonych

w KG i HR w latach 2014 – 2018, a otrzymanych z:

- Soybean Germplasm Collection, Urbana, USDA, ARS (USA)
- Japanese Soybean Core Collection, NIAS (Japonia)
- Gene Resources of Canada, Agriculture and Agri-Food Canada, Saskatoon (Kanada)
- Leguminous Crops Genetic Resources Department z N. I. Vavilov Research Institut of Plant Industry w St. Petersburgu w Rosji
- z państw europejskich: Czech, Austrii, Szwajcarii, Niemiec, Ukrainy i innych,
- z Krajowego Centrum Roślinnych Zasobów Genowych w Radzikowie

oraz odmiany i linie wyhodowane w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin

W drugim temacie badawczym materiał roślinny stanowiło:

- 5 genotypów dzikiego gatunku *G. soja*: PI 522184, PI 538411A, PI 538411B, PI 507825 i PI 464870 rosnących w północnych Chinach i w Rosji nad Amurem
- Mieszańce międzygatunkowe *G. max* x *G. soja* pokolenia F_1 – F_5
- Odmiany uprawiane w Polsce: Augusta, Aldana, Aligator, Annushka, Mavka, Merlin,

Metody

Podczas realizacji zadania w latach 2014 – 2020 przeprowadzono łącznie 34 doświadczenia,



w których oceniano zgromadzone genotypy: 25 doświadczeń w Rolniczym Gospodarstwie Doświadczalnym Dłoń, 3 doświadczenia w Ogrodzie Doświadczalnym KG i HR w Poznaniu, oraz 6 doświadczeń w Szelejewie – Hodowla Roślin Danko Sp. z o.o. (jako druga lokalizacja). Doświadczenia zakładano, w zależności od liczby posiadanych nasion jako jednopowtórzeniowe lub w układzie bloków losowanych w dwóch powtórzeniach. Powierzchnia poletka wynosiła 1 lub 2 m². Rozstaw – 50 cm. Przeprowadzono obserwacje faz fenologicznych oraz opracowywano biometryczne 5 typowych roślin z każdego poletka. Oceniano następujące cechy: wysokość roślin, liczba pędów bocznych, wysokość osadzenia I strąka, liczba strąków z rośliny, liczba nasion z rośliny, liczba nasion w strąku, masa nasion z rośliny i MTN.

Doświadczenia z oceną potencjału plonowania wybranych genotypów przeprowadzono w RGD Dłoń w latach 2017 – 2020. Razem w siedmiu doświadczeniach oceniono 33 genotypy. Układ doświadczeń – bloki losowane w 3 powtórzeniach, powierzchnia poletka – 9 m².

Każdy genotyp oceniono w 3-letnim cyklu badań.

W ramach tematu drugiego przeprowadzono następujące badania:

- obserwacje przebiegu kwitnienia w warunkach szklarniowych i polowych – 3 terminy siewu,
- obserwacje pęknięcia pylników oraz kiełkowania łagiewek pyłkowych w zależności od pory dnia
- krzyżowanie roślin *G. max* x *G. soja* z kastracją kwiatów i bez kastracji
- obserwacje, fenologiczne, morfologiczne i cech komponentów plonu roślin mieszańcowych pokoleń F₁ – F₅

Opis wyników

W ramach realizacji zadania w KG i HR zgromadzono olbrzymią, największą w Polsce, kolekcję genotypów soi pochodzących z różnych rejonów świata – razem 499 genotypów z następujących gatunków.

- 437 genotypów *Glycine max*
- 35 genotypów *Glycine soja*
- 3 genotypy jako *Glycine gracillis*
- 1 genotyp jako *Glycine ussuriensis*
- 23 takie same genotypy otrzymano z różnych banków genów, traktowano je jako różne genotypy

Każdy ze zgromadzonych genotypów był oceniany w 3-letnich cyklach doświadczeń. Doświadczenia były prowadzone w latach 2014

– 2020, w których warunki pogodowe były bardzo zmienne. Generalnie wszystkie lata były bardzo ciepłe, ze średnią temperaturą w okresie wegetacji znacznie powyżej średniej z wielolecia. Odnotowano w tym okresie szereg ekstremalnych zjawisk pogodowych: najwyższa w historii średnia temperatura w sierpniu 2015 (23,7 °C) i w czerwcu 2019 r. (23,7 °C), najchłodniejszy od 30 lat maj w 2020 r. (11,8 °C), drastyczna susza w 2015 r. – tylko 202,3 mm opadów w całym okresie wegetacji. Zjawiska te utrudniały ocenę badanych genotypów.

Wszystkie genotypy różniły się znacznie pod względem przebiegu kwitnienia, długości okresu wegetacji oraz analizowanych cech morfologicznych i cech komponentów plonu. Przykładowy, olbrzymi zakres zmienności obserwowany w doświadczeniach w RGD Dłoń przedstawiono w tabeli 1. Jak widać w każdym roku doświadczeń szereg genotypów miało długość okresu wegetacji powyżej 190 dni tj. były zbierane w końcu października lub na początku listopada praktycznie nie dojrzałe, pomimo tego, że z zagranicznych banków genów i kolekcji sprowadzono genotypy najwcześniejsze (starano się o genotypy z „000” grupy dojrzałości). W największym stopniu reakcją taką obserwowano u genotypów otrzymanych z banku genów z Japonii (21 genotypów nie dojrzało). Ponieważ w latach doświadczeń w okresie wegetacji soi temperatury powietrza były wysokie można przypuszczać, że wydłużenie wegetacji było wynikiem przede wszystkim reakcji fotoperiodycznej sprowadzonych genotypów na warunki długiego dnia. Genotypy o tak długim okresie wegetacji nie są przydatne do prac hodowlanych w warunkach Polski.

Ocena cech morfologicznych i komponentów plonu zgromadzonych genotypów również wykazała bardzo duże ich zróżnicowanie (tab.1). Wartości maksymalne poszczególnych cech komponentów plonu dowodzą (tab. 1), że wśród ocenianych genotypów można wyselekcjonować genotypy o różnych, korzystnych z punktu widzenia hodowli cechach jak genotypy: wysokie jednocześnie o zdeterminowanym typie wzrostu, zawiązujące wysoko pierwszy strąk, o dużej liczbie pędów bocznych, dużej liczbie nasion z rośliny, oraz dużej masie nasion z rośliny i MTN. Małymi nasionami charakteryzowały się genotypy z gatunku *G. soja* (tab. 1). Powtarzające się w ostatnich latach wysokie temperatury powietrza oraz susze mogą również umożliwić wyselekcjonowanie ze zgromadzonej kolekcji genotypy w większym stopniu tolerancyjne na niedobory wody. Spośród analizowanych genotypów *G. max* sprowadzonych z USA i Kanady obserwowano największą liczbę genotypów

wczesnych, mających jednocześnie inne korzystne cechy i mogące stanowić cenny materiał wyjściowy do hodowli soi w Polsce: PI 372411, PI 194644, PI 194633, PI 546050, PI 546046, PI445791 i PI257430. Z 35 genotypów *G. soja* 19 charakteryzowało się krótkim okresem wegetacji wynoszącym do 130 dni, a 3 z nich miały wysoką liczbą nasion z rośliny (ponad 300) oraz masę nasion z rośliny wynoszącą ponad 40g. Z tych genotypów wybrano 5 do obserwacji kwitnienia, a z jednym (PI507825) otrzymano mieszańce międzygatunkowe.

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń kolekcyjnych do oceny potencjału plonowania wybrano 33 genotypy soi charakteryzujące się korzystnymi cechami morfologicznymi i cechami komponentów plonu. Łącznie wykonano 7 doświadczeń. Zdecydowana większość genotypów analizowanych w doświadczeniu charakteryzowała się średnim potencjałem plonowania i miała zbyt długi okres wegetacji. Jedynie 2 genotypy charakteryzowały się wyższym potencjałem plonowania od późnej odmiany kontrolnej Aligator: genotypy K9922 i K10539 pochodzące z Rosji. Wyniki te są potwierdzeniem faktu, że bardzo trudno jest znaleźć w zagranicznych bankach genów i kolekcjach genotypy soi nadające się bezpośrednio do uprawy w warunkach klimatycznych Polski.

Drugi temat badawczy składał się z kilku etapów. W pierwszym przeprowadzono obserwacje przebiegu kwitnienia roślin genotypów wybranych z gatunku *G. max* i *G. soja* w warunkach szklarniowych i polowych. Sprawdzono 3 terminy siewu w celu zapewnienia podaży kwiatów do krzyżowania i stwierdzono, że dla realizacji tego celu konieczny jest ciągły (co tydzień) wysiew genotypów rodzicielskich. W drugim etapie obserwacje przebiegu kwitnienia w kwiatach soi, zarówno makroskopowe pęknięcia pylników jak i mikroskopowe kiełkowania łagiewek pyłkowych wykazały, że kastrowanie kwiatów soi najlepiej przeprowadzać w godzinach rannych od 6:00 do 9:00. Równolegle w latach 2015 – 2017 przeprowadzono krzyżowanie międzygatunkowe, którego efektywność krzyżowania okazała się większa w warunkach polowych i w przypadku kastrowania kwiatów oraz zapylania ich pyłkiem z kwiatów pobranych uprzednio do eksykatora, jednak była bardzo niska – 3,6%. W wyniku krzyżowania rośliny mieszańcowe otrzymano w dwóch kombinacjach krzyżowania Annushka x PI507825 i Mavka x PI507825. W pokoleniach mieszańcowych F_2 – F_5 obserwowano silną segregację pod względem wszystkich obserwowanych cech.

Większość roślin charakteryzowała się cechami dzikiego rodzica *G. soja*: niezdeterminowanym typem wzrostu, bardzo długim okresem wegetacji i małymi nasionami. Ponieważ zakres zmienności cech roślin mieszańcowych był większy niż zakres zmienności cech u zgromadzonych genotypów kolekcyjnych, wyselekcjonowano jednak segreganty korzystne z punktu widzenia celów hodowli soi w Polsce: rośliny wysokie, wysoko zawiązujące I strąk, zawiązujące dużą liczbę strąków i nasion z rośliny, rośliny, z których zebrano dużą masę nasion i rośliny o dużej MTN. Duża liczba segregantów z potomstw z kombinacji krzyżowania Mavka x PI507825, może stanowić cenny materiał wyjściowy do dalszej hodowli.

Osiągnięcia projektu

1. Zgromadzono największą w Polsce kolekcję genotypów soi – 499 genotypów
2. Wyselekcjonowano genotypy, które w warunkach klimatycznych Polski mogą stanowić materiał wyjściowy do hodowli nowych odmian
3. Wybrane genotypy zostały włączone do programu krzyżowania w Hodowli Roślin DANKO Sp. z o. o.
4. Opracowano metodykę krzyżowania międzygatunkowego dzięki której otrzymano mieszańce międzygatunkowe *G. max* x *G. soja*, które znacznie poszerzyły zmienność materiałów wyjściowych do hodowli

Kontynuacja badań

1. Dzięki zgromadzonym w zadaniu nr 43 latach 2014–2017 genotypom (250), było realizowane od 2018 r. zadanie nr 105 pt. „Identyfikacja układów allelicznych genów fotoneutralności i wczesności oraz opracowanie metodyki otrzymywania roślin homozygotycznych u soi”
2. Wybranych 300 genotypów (ze zgromadzonych 499) będzie stanowiło materiał roślinny do badań w nowym zadaniu na lata 2021–2027, zakwalifikowanym do finansowania „Analiza molekularna układów allelicznych genów wczesności oraz opracowanie i identyfikacja markerów funkcjonalnych dla genów determinacji pędu, pęknięcia strąków, cech plonotwórczych i jakościowych nasion soi”

Prezentacja wyników badań na konferencjach krajowych i międzynarodowych Wygłoszone referaty

Nawracała J., Kurasiak-Popowska D., Siatkowski I., Szabelska A. 2016. Analiza zmienności genotypów

kolekcyjnych soi pod kątem ich przydatności do hodowli w warunkach Polski. Konferencja „Nowe osiągnięcia polskich zespołów badawczych w dziedzinie genetyki, hodowli i biotechnologii roślin” Międzyzdroje 8–10.06.2016

Nawracała J. Kurasiak-Popowska D. Gromadzenie zasobów genowych soi przydatnych do hodowli w warunkach środowiskowych Polski. 2018. Konferencja Naukowa „Charakterystyka zasobów genowych dla hodowli roślin” Karpacz 18–21 września 2018 r. Biuletyn IHAR Nr 283/2018: 27–28.

Nawracała J. Kurasiak-Popowska D. 2018. Problemy krzyżowania międzygatunkowego soi *Glycine max* × *G. soja*. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Genetyka, hodowla i biotechnologia roślin – osiągnięcia, wyzwania, perspektywy” Lublin, 25 – 27 czerwiec 2018.

Poster

Nawracała J. Kurasiak-Popowska D. 2019. Broadening soybeans variability by interspecies *Glycine max* × *Glycine soja* hybridization. Third International Legume Society Conference ILS3 LEGUMES FOR HUMAN AND PLANET HEALTH, Poznań 21-24.05.2019 Book of abstracts:84

Publikacja

Nawracała, J., Kurasiak-Popowska, D., & Kaczmarek, A. (2019). Analiza bioróżnorodności zasobów genowych soi przydatnej do hodowli w warunkach klimatycznych Polski i opracowanie metodyki krzyżowania międzygatunkowego *Glycine max* × *Glycine soja*. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (286), 339–341. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0076>

Tabela 1

Zakres zmienności cech fenologicznych, morfologicznych i cech komponentów plony genotypów soi zgromadzonych w latach 2014 – 2018 w 12 doświadczeniach polowych przeprowadzonych w RGD Dłóż.

Rok liczba doświadczeń/genotypów	Zakres	Liczba dni od siewu do kwitnienia (dni)	Długość okresu wegetacji (dni)	Wysokość roślin (cm)	Wysokość osadzenia I strąka (cm)	Liczba pędów bocznych	Liczba strąków z rośliny	Liczba nasion z rośliny	Liczba nasion w strąku	Masa nasion z rośliny (g)	MTN (g)
2016	Min	51	109	19,5	2,7	0,0	9,6	13,8	1,0	1,5	43,8
3/265	Max	115	190	144,0	23,1	14,0	106,7	171,3	2,5	28,1	333,2
2017	Min	54	112	22,0	3,0	0,0	9,0	11,4	0,9	0,7	31,3
4/287	Max	98	198	133,0	26,8	12,0	350,5	503,0	2,8	96,9	419,1
2018	Min	45	107	19,0	3,2	0,0	5,2	5,2	1,0	0,4	74,1
3/269	Max	95	190	151,0	28,2	7,0	116,0	225,0	2,9	45,9	369,9
2019	Min	50	111	16,4	3,4	0,0	16,0	16,6	1,1	0,9	32,6
3/258	Max	109	194	115,8	30,0	11,2	314,2	575,8	2,7	64,4	406,4

Identyfikacja układów allelicznych genów fotoneutralności i wczesności oraz opracowanie metodyki otrzymywania roślin homozygotycznych u soi

Identification of alleles arrangement of photoneutrality and earliness genes and developing method of obtaining soybean homozygous plants

Jerzy Nawracała¹✉, Janetta Niemann¹, Agnieszka Tomkowiak¹,
Dorota Weigt¹, Danuta Kurasiak-Popowska¹, Michał Książkiewicz²,
Sandra Rychel-Bielska², Wojciech Bielski², Bogdan Wolko², Agnieszka
Kaczmarek³

¹Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, ul. Dojazd 11, 60–632 Poznań

²Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60–479 Poznań

³DANKO Hodowla Roślin Sp. z o. o. Choryń 27, 64–000 Kościan

✉ e-mail: jerzy.nawracala@up.poznan.pl

Słowa kluczowe: geny wczesności, markery molekularne, soja, SSD

Cel badań

W ramach zadania były realizowane trzy tematy badawcze.

Głównym celem pierwszego tematu była identyfikacja układów allelicznych siedmiu genów wczesności (*E*) i dwóch genów zdeterminowania wzrostu (*Dt*) w 246 genotypach kolekcyjnych soi. Szczegółowym celem była optymalizacja procedur diagnostycznych dla 36 markerów na 20 genotypach referencyjnych.

Celem tematu drugiego było przeprowadzenie w warunkach polowych obserwacji 246 genotypów kolekcyjnych (w tym 20 referencyjnych) pod względem cech fenotypowych: terminu kwitnienia i dojrzewania, typu determinacji pędu oraz innych cech morfologicznych i cech komponentów plonu.

Celem tematu trzeciego było opracowanie metodyki dostosowania metody pojedynczych nasion (SSD) do otrzymania dwóch pokoleń soi rocznie (w warunkach szklarniowych) oraz ocena roślin pokolenia F_7 soi wyprowadzonych tą metodą.

Cele zostały osiągnięte.

Materiał i Metody

Materiał

Materiał do analiz molekularnych i obserwacji polowych (temat 1 i 2) stanowiło 246 genotypów

zgrupowanych w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin (KGiHR) w latach 2014 – 2018, a otrzymanych z banków genów i kolekcji z USA, Kanady, Japonii, Rosji, z państw europejskich oraz odmiany i linie wyhodowane w KGiHR.

W trzecim temacie badawczym materiałem do doświadczeń były 4 pokolenia mieszańcowe ($F_3 - F_6$): 2 kombinacje krzyżowania międzyodmianowego soi otrzymane w Danko Hodowla Roślin Sp. z o. o. i 2 kombinacje krzyżowania międzygatunkowego *G. max* x *G. soja* otrzymane w KGiHR, oraz 740 roślin i 200 linii pokolenia F_7 pochodzących z tych kombinacji krzyżowania.

Metody

Analizy molekularne były przeprowadzane w dwóch laboratoriach – w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk (IGR) i w KGiHR. Do detekcji polimorfizmu zostały wykorzystane następujące metody: PCR, CAPS, dCAPS oraz sekwencjonowanie metodą Sangera – w zależności od rodzaju polimorfizmu. Analizowano łącznie 36 markerów: 12 typu CAPS, 7 dCAPS, 14 PCR i 3 metodą sekwencjonowania. Liczby markerów analizowanych do poszczególnych genów podano poniżej:

do analizy genów wczesności: *E1* – gen czynnika transkrypcyjnego *Glyma06g23040.1* – 3 markery, *E2* – gen *GIGANTEA*, *GmGla*



– 4 markery, *E3* – gen fitochromu *GmPhyA3*
 – 4 markery, *E4* – gen fitochromu *GmPhyA2* –
 5 markerów, *E7* – gen nieznanym – 1 marker, *E9*
 – gen *FLOWERING LOCUS T*, *GmFT2a* – 5 marke-
 rów, *E10* – gen *FLOWERING LOCUS T*, *GmFT4*
 – 3 markery;

do analizy loci kontrolujących zdeterminowanie
 wzrostu: *Dt1* – *TERMINAL FLOWER1*, *GmTFL1b* –
 6 markerów i *Dt2* – gen Glyma18g50910 – 5 marke-
 rów.

Doświadczenia polowe w latach 2018 – 2020
 przeprowadzono w RGD Dłoń (51°41'35; 17°04'13).
 Układ doświadczeń bloki losowane w 2 powtórze-
 niach lub jednopowtórzeniowe. Rozstaw rzędów
 50 cm, wielkość poletka 2 m². Przeprowadzo-
 no następujące obserwacje: początek kwitnienia
 roślin, długości okresu wegetacji, typ kończenia
 wzrostu pędu oraz cech morfologicznych i kompo-
 nentów plonu.

W ramach tematu trzeciego przeprowadzono
 w 2018 i 2019 r. osiem doświadczeń w szklarniach
 KGiHR oraz w Szelejewie. W dwóch terminach
 siewu każdego roku (wiosenny i jesienny) bada-
 no wpływ 3 obsad roślin (156, 363 i 630 na 1 m²)
 na zawiązanie strąków i nasion. W 2020 r. wysia-
 no w polu linie pokolenia F₇ otrzymane w wyniku
 realizacji metody SSD.

Opis wyników

Optymalizację procedur diagnostycznych dla
 wszystkich opublikowanych 36 markerów przepro-
 wadzono na 20 genotypach referencyjnych i pozwo-
 liło to na wybranie 31 markerów do dalszych analiz
 wszystkich genotypów.

Badana kolekcja soi była bardzo zróżnicowana
 genetycznie pod względem obecności alleli genów
 wczesności oraz determinacji pędu. W analizowa-
 nych 246 genotypach soi zidentyfikowano następu-
 jące allele:

- Dominujące: *E1*, *E2-in*, *E2-dl*, *E3-Mi*, *E3-Ha*,
E3-Mo, *E4*, *E7*, *E9*, *E10*, *Dt1*;
- Recesywne: *e1-as*, *e1-fs*, *e1-nl*, *e2*, *e3-ns*, *e3-fs*,
e3-tr, *e4-kes*, *e4-SORE-1*, *e4-kam*, *e7*, *e9*, *e10*,
dt1-ab, *dt1-b*, *dt1-tb*.

Obserwowane zróżnicowanie dotyczy-
 ło przede wszystkim układów alleli czterech
 głównych genów wczesności *E1* – *E4* (tab.
 1 i 2). Prawie wcale nie stwierdzono zróżnico-
 wania alleli genów *E9* i *E10* – tylko 1 genotyp
 z recesywnym allelem *e9* i 3 genotypy z rece-
 sywnym allelem *e10*. Większość genotypów –
 69,9% miała recesywny allel *e7* genu *E7*, jednak
 należy wziąć pod uwagę fakt, że zastosowany
 marker nie jest zakotwiczony w sekwencji genu

kandydującego, więc istnieje możliwość rekombi-
 nacji między markerem, a mutacją warunkują-
 jącą allel *e7*.

Analiza składu allelicznego genów deter-
 minacji pędu nie dawała tak jednoznacznych wyni-
 ków jak analiza genów wczesności. W przypadku
 genu *Dt1* z 246 genotypów w 95 zidentyfikowa-
 no allel dominujący *Dt1*, a allele recesywne *dt1-b*
 w 101 genotypach, układ *dt1-b* + *dt1-ab* w 20 geno-
 typach, układ *dt1-b* + *dt1-tb* w 29, a jeden geno-
 typ o układzie *Dt1* + *dt1-b*. Badanie alleli genu
Dt2 dało niejednoznaczne wyniki, które wskazują
 na konieczność znalezienia nowego markera lepiej
 sprzężonego z genem *Dt2*.

W doświadczeniach polowych przeprowadzo-
 nych w latach 2018 – 2020 w RGD Dłoń obser-
 wowano najpierw 150, a następnie wszystkie
 246 genotypów, które były analizowane molekular-
 nanie. Warunki pogodowe były zróżnicowane.
 Rok 2018 i 2019 były latami wysokich tempera-
 tur w całym okresie wegetacji np. w czerwcu
 2019 r. odnotowano najwyższą w historii średnią
 temperaturę miesiąca – 23,7 °C. Z kolei 2020 r. był
 najchłodniejszy z średnią temperaturą maja najniż-
 szą od 30 lat (11,8 °C).

Zróżnicowanie w początku kwitnienia jak
 i w długości okresu wegetacji pomiędzy latami
 doświadczenie było wynikiem różnego przebiegu
 warunków pogodowych, a pomiędzy genotypami
 było konsekwencją celowego wyboru do doświad-
 czeń genotypów posiadających różne kombinacje
 alleliczne głównych genów wczesności kwitnie-
 nia *E1-E4*. W 2018 i 2019 r. najwcześniejsze geno-
 typy zakwitły na początku czerwca po 47 i 50
 dniach od siewu, a najpóźniejsze po 91 i 109
 dniach od siewu odpowiednio. Z kolei w 2020 r.
 najwcześniejsze genotypy zakwitły po 59 dniach,
 a najpóźniejsze po 127 dnia od siewu tj. dopie-
 ro w sierpniu. Podobnie długość okresu wegetacji
 najkrótsza była w 2018 r., a najdłuższa w 2020 r.,
 w którym najpóźniejsze genotypy nie dojrzały.
 Należy mieć jednak na uwadze zimny maj 2020 r.,
 który cechował się ujemną anomalią termicz-
 ną; odchylenie temperatury od normy osiągało
 w niektóre dni -7°C. Najwcześniejsza odmiana
 Fiskeby V, która w 2018 r. dojrzała 16 sierp-
 nia, w 2020 r. została zebrana 3 tygodnie później
 tj. 7 września, a np. rośliny odmiany Immertinskaja
 (4 allele dominujące genów *E1-E4*) zebrano niedoj-
 rzałe z pola 25 listopada.

Obserwowano wyraźną zależność długo-
 ści okresu wegetacji soi od układu alleli genów
 wczesności. Wszystkie najwcześniejsze genotypy
 miały przeważnie 4 allele recesywne 4 głównych

genów *E*. Taki układ zidentyfikowano u 62 genotypów. Różne allele poszczególnych genów występowały jednak w 8 różnych kombinacjach (tab. 1). Większość genotypów (41) dojrzała do połowy września (tab. 1), jednak 10 genotypów miało długość okresu wegetacji powyżej 150 dni, w tym jeden nawet 187,7 dnia. Kombinacji alleli zawierających przynajmniej jeden allel dominujący genów wczesności (opóźniają dojrzwianie) było znacznie więcej (tab. 2). Najpóźniejsza w doświadczeniu odmiana Immertinskaja (nie dojrzała) miała wszystkie 4 allele dominujące, a inne odmiany bardzo późne miały różne układy 3 alleli dominujących (tab. 2). Obecność pojedynczego allelu dominującego *E1* opóźniała dojrzwianie roślin soi. W najmniejszym stopniu zwiększała długość okresu wegetacji obecność allelu *E3* lub *E4* oraz obydwu alleli łącznie. Takim genotypem charakteryzowała się większość odmian europejskich i pochodzących z Kanady, a uprawianych aktualnie w Europie. Jeżeli dodatkowo weźmiemy pod uwagę w analizowanych genotypach zróżnicowanie alleli genu *E7* i genu *Dt1*, to w badanej puli genotypów zidentyfikowaliśmy kilkadziesiąt kombinacji układu alleli. W większości genotypów zależność długości okresu wegetacji od obecności określonego układu była zgodna z tendencją – im więcej alleli dominujących tym dłuższy okres wegetacji. Jednak w wielu przypadkach nie ma tak prostego i jednoznacznego powiązania np. taki sam układ alleli u odmiany Złotka i Dongnong 52, a różnica w długości okresu wegetacji wyniosła 36 dni (tab. 2). Dlatego tak ważna jest analiza dużej liczby genotypów i na tej podstawie identyfikacja specyficznego układu alleli najkorzystniejszego w naszych warunkach środowiskowych. W warunkach ocieplającego się klimatu okazało się, że genotypy wczesne, mające 4 allele recesywne charakteryzują się zbyt małym plonem. Istotna jest więc analiza, który z alleli dominujących należy wprowadzić do genotypu, ażeby podnieść plon jednocześnie nie opóźniając zbyt późno dojrzwiania.

W 2018 i 2019 r. przeprowadzono doświadczenia z zastosowaniem metody SSD do przyspieszenia hodowli soi. Doświadczenia z pokoleniem F_3 zakładano w szklarni w Szelejewie i KGiHR w maju 2018 r., nasiona zebrano w sierpniu i z roślin pokolenia F_4 nasiona zbierano w listopadzie i grudniu. Pokolenie F_5 wysiano w marcu, a pokolenie F_6 we wrześniu, z którego nasiona zebrano w grudniu i styczniu. W ten sposób w obydwu szklarniach otrzymano 2 pokolenia soi w jednym roku. W rezultacie w 2020 r. wysiano pokolenie F_7 , które było wystarczająco stopniu homozygotyczne

do przeprowadzenia ostatecznej selekcji i wypróbowania linii, o dwa lata wcześniej niż to jest w metodzie rodowodowej. Stwierdzono również, że największa obsada roślin 630/m² zapewniała otrzymanie z rośliny średnio kilku nasion, wystarczająco dla metody SSD. Po przeprowadzonej w 2020 r. ocenie roślin pokolenia F_7 w RGD Dłoń, wybrano rośliny z 79 potomstw, a w Szelejewie wybrano 96 roślin. Wszystkie wybrane rośliny charakteryzowały się bardzo dobrymi cechami plonotwórczymi i stanowią bardzo cenny materiał hodowlany.

Osiągnięcia projektu

1. Zoptymalizowano metodykę dla 25 markerów molekularnych do 7 genów wczesności i dla 11 markerów do 2 genów determinacji pędu;
2. Po raz pierwszy w Polsce wykonano szeroką (246 genotypów) analizę układów alleli genów wczesności soi. Wiedza ta pozwoli na identyfikację układów dających najlepszą adaptację soi do warunków klimatycznych Polski i pozwoli na dokładny wybór komponentów rodzicielskich do krzyżowania;
3. Opracowano metodykę SSD do otrzymywania 2 pokoleń soi w jednym roku, skracając czas dochodzenia do homozygotyczności o 2 lata.

Kontynuacja badań

Opracowanie metodyki dla 36 markerów do genów wczesności i determinacji pędu pozwoliło na przygotowanie nowego projektu badań na lata 2021–2027: „Analiza molekularna układów allelicznych genów wczesności oraz opracowanie i identyfikacja markerów funkcjonalnych dla genów determinacji pędu, pęknięcia strąków, cech plonotwórczych i jakościowych nasion soi”. Projekt uzyskał pozytywną ocenę i został zakwalifikowany do finansowania.

Prezentacja wyników badań na konferencjach

Nawracała J., Rychel S., Tomkowiak A., Kurasiak-Popowska D., Weigt D., Niemann J., Książkiewicz M., Wolko B. 2019. Ocena zależności terminu kwitnienia od układu alleli genów wczesności (*E*) u odmian soi o zróżnicowanym pochodzeniu. IV Ogólnopolska Konferencja „Genetyka i Genomika w Doskonaleniu Roślin Uprawnych – Od rośliny modelowej do nowej odmiany” IGR-PAN 5–7.11.2019. Poznań. Abstrakty: 34.

Publikacja

Nawracała, J., Książkiewicz, M., Kurasiak-Popowska, D., Niemann, J., Rychel, S., Tomkowiak, A., Weigt, D., &

Wolko, B. (2019). Identyfikacja układów allelicznych genów fotoneutralności i wczesności oraz opracowanie metodyki otrzymywania roślin homozygotycznych

u soi. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, (286), 343–346. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0077>

Tabela 1

Układy alleli recesywnych w czterech głównych genach wczesności E1 – E4 zidentyfikowane w 246 genotypach soi.

Genotyp	E1	E2	E3	E4	Długość okresu wegetacji (dni) *
Fiskeby V	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4-SORE-1</i>	126,7
Nawiko	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>e3-fs</i>	<i>e4-SORE-1</i>	133,7
Augusta	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>e3-ns</i>	<i>e4-SORE-1</i>	135,0
84/2011	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>e3-fs</i>	<i>e4-SORE-1</i>	135,0
X879-1-B	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4-SORE-1</i>	137,7
Severnaja	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>e3-fs</i>	<i>e4-kes</i>	137,7
Zeja 2	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4-kes</i>	140,7
45/2011	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4-kam</i>	154,7

*- średnia z 3 lat

Tabela 2

Układy alleli dominujących genów wczesności zidentyfikowane w 246 genotypach soi.

Genotyp	E1	E2	E3	E4	E7	E9	E10	Długość okresu wegetacji (dni) *
Early Kachino	<i>E1</i>	<i>e2</i>	<i>e3-ns</i>	<i>e4-kam</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	182,3
Harosoy TE1e3	<i>E1</i>	<i>e2</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4-SORE-1</i>	<i>E7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	180,3
Ooyachi	<i>E1</i>	<i>e2</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4-SORE-1</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	173,7
Habarovskaja 53	<i>E1</i>	<i>e2</i>	<i>e3-tr</i>	<i>e4-SORE-1</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	165,0
OAC Vision	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>e4-SORE-1</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	133,7
Merlin	<i>e1-nl</i>	<i>e2</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>e4-SORE-1</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	141,7
Złotka	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>	<i>E7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	137,7
Dongnong 52	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>	<i>E7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	173,7
Povodovskaja	<i>E1</i>	<i>e2</i>	<i>e3-ns</i>	<i>E4</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	165,7
ES Governor	<i>e1-fs</i>	<i>E2-in</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>e4-SORE-1</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	151,0
Mailand China	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>E3-Mi</i>	<i>E4</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	159,5
Amurska 41	<i>e1-as</i>	<i>e2</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	<i>E7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	171,7
Corsoy	<i>e1-as</i>	<i>E2-in</i>	<i>e3-tr</i>	<i>E4</i>	<i>E7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	190,0
Salut 216	<i>e1-as</i>	<i>E2-in</i>	<i>e3-fs</i>	<i>E4</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	164,7
Jilin 12	<i>E1</i>	<i>e2</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	179,3
Athow	<i>e1-as</i>	<i>E2-in</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	<i>E7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	188,7
Immertinskaja	<i>E1</i>	<i>E2-in</i>	<i>E3-Ha</i>	<i>E4</i>	<i>e7</i>	<i>E9</i>	<i>E10</i>	199,3

*- średnia z 3 lat

Cecha wczesności kwitnienia u łąbinu białego i łąbinu żółtego – podstawy genetyczne i molekularne

Early flowering traits of white lupin and yellow lupin – genetic and molecular backgrounds

Michał Książkiewicz¹✉, Piotr Plewiński¹, Sandra Rychel-Bielska¹,
Wojciech Bielski¹, Magdalena Tomaszewska¹, Barbara Naganowska¹,
Bogdan Wolko¹

¹Institut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60–479 Poznań

Słowa kluczowe: fenotypowanie, mapowanie genetyczne, sekwencjonowanie DNA, sekwencjonowanie RNA, termin kwitnienia, wernalizacja

Cele badań

Otrzymanie populacji mapującej łąbinu żółtego dla kombinacji linii rodzicielskich ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14;

Poznanie zmienności ważnej cechy użytkowej, terminu kwitnienia, a także ocena wymagań wernalizacyjnych linii z kolekcji nasiennej;

Poznanie sekwencji homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia oraz identyfikacja loci polimorficznych różnicujących linie rodzicielskie populacji mapujących;

Mapowanie loci cech ilościowych (QTL) terminu kwitnienia w populacjach mapujących;

Opracowanie markerów molekularnych na poznane loci polimorficzne genów indukcji kwitnienia, poznanie segregacji tych markerów w liniach wsobnych populacji mapujących i ich lokalizacja na mapach genetycznych;

Ocena sprzężenia tych markerów z cechą wczesności kwitnienia w populacjach mapujących;

Przekształcenie uzyskanych markerów sekwencyjnych sprzężonych z loci QTL wczesności kwitnienia w markery do selekcji molekularnej, genotypowanie linii z kolekcji nasiennej przy użyciu tych markerów, a następnie ocena asocjacji rozkładu markerów z terminem kwitnienia;

Profilowanie ekspresji genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia w odpowiedzi na fotoperiod i wernalizację.

Wszystkie cele za wyjątkiem pierwszego

dotyczyły obu badanych gatunków. Wszystkie cele zostały zrealizowane.

Materiał roślinny

W badaniach wykorzystano następujący materiał roślinny: populację mapującą łąbinu białego uzyskaną z kombinacji krzyżówkowej linii rodzicielskich Kiev Mutant × P27174 (196 linii), populację mapującą łąbinu żółtego uzyskaną z kombinacji krzyżówkowej linii rodzicielskich Wodjil × P28213 (97 linii), kolekcję nasienną łąbinu białego (137 linii) oraz kolekcję nasienną łąbinu żółtego (113 linii). Dostęp do nasion populacji mapujących uzyskano na drodze współpracy z Western Australian Agriculture Authority (South Perth, Australia), zaś dostęp do nasion linii kolekcyjnych zapewniła Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Oddział w Wiatrowie.

Metody badawcze

Obserwacje terminu od wysiania do wiązania pąków, indukcji kwitnienia oraz dojrzałości strąków (w warunkach szklarniowych, w dwóch wariantach – z wernalizacją i bez wernalizacji);

Homogenizacja materiału roślinnego przy użyciu urządzenia TissueLyser II (Qiagen);

Izolacja DNA i RNA z liści przy użyciu komercyjnie dostępnych zestawów: DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) i SV Total RNA Isolation System (Promega);

Projektowanie starterów przy użyciu programu Primer3Plus;



Amplifikacja PCR i rozdział produktów na drodze elektroforezy w żelu agarozowym z wizualizacją przy użyciu barwnika SYBR i systemu do detekcji żeli z transiluminatorem UV (Uvitec);

Sekwencjonowanie DNA produktów PCR metodą Sangera (Genomed);

Przyrównanie sekwencji (alignment) w programie Geneious (przy użyciu algorytmów BLAST, MAFFT i in.) oraz identyfikacja indeli (polimorfizm insercji/delecji) i loci SNP (polimorfizm substytucji pojedynczego nukleotydu);

Opracowanie markerów PCR dla indeli oraz markerów CAPS (trawienie restrykcyjne i rozdział produktów na drodze elektroforezy w żelu agarozowym o odpowiednim stężeniu) i dCAPS (wprowadzenie miejsca restrykcyjnego metodą PCR za pomocą odpowiednio zaprojektowanego startera, a następnie trawienie enzymatyczne i elektroforeza w żelu agarozowym) dla loci SNP;

Mapowanie genetyczne przy użyciu programu Joinmap;

Złożone mapowanie interwałowe (ang. composite interval mapping) przy użyciu programu Windows QTL Cartographer V2.5 oraz złożone mapowanie interwałowe w skali genomu (ang. genome-wide composite interval mapping) przy użyciu programu mrMLM;

Adnotacja funkcjonalna sekwencji genów metodą mapowania porównawczego do sekwencji genów i białek zdeponowanych w publicznych bazach danych (NCBI, DDBJ, EMBL);

Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie końców 3' cDNA (ang. massive analysis of cDNA ends) MACE dla wybranych linii łubinu białego uprawianych w fotoperiodzie 16 h (GenXPro GmbH);

Wysokoprzepustowe sekwencjonowanie przez syntezę, RNA-seq (Illumina, Macrogen);

Profilowanie ekspresji genów metodą PCR z detekcją w czasie rzeczywistym przy użyciu termocyklera CFX Connect Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad Polska).

Wyniki

Łubin biały (*Lupinus albus L.*)

Poznano termin kwitnienia i wymagania wernalizacyjne dla 137 linii z kolekcji nasiennej;

Poznano sekwencje i określono liczbę kopii dla 20 homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia, w tym głównych integratorów szlaku fotoperiodycznego i wernalizacyjnego;

Wykonano mapowanie porównawcze sekwencji tych genów w genomach 11 gatunków roślin

strączkowych (*Arachis duranensis*, *A. ipaensis*, *Cicer arietinum*, *Cajanus cajan*, *Glycine max*, *L. albus*, *L. angustifolius*, *Lotus japonicus*, *Medicago truncatula*, *Phaseolus vulgaris* i *Vigna radiata*) oraz przeprowadzono analizy filogenetyczne, w wyniku których poznano wzorzec duplikacji, zarówno liniowo-specyficznych, jak i obejmujących całe klady;

Opracowano 33 markery molekularne typu PCR, CAPS i dCAPS, zakotwiczone w sekwencjach 26 homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia;

Zlokalizowano 29 markerów (reprezentujących 24 geny) na mapie genetycznej;

Zidentyfikowano 4 główne loci QTL wczesności kwitnienia na mapie genetycznej, które wykazały w populacji mapującej ko-segregację z opracowanymi markerami PCR zakotwiczonymi w sekwencjach genów *GIGANTEA*, *FLOWERING LOCUS T*, *SEPALLATA3* i *FRIGIDA*;

Na matrycy sekwencji markerów SNP z mapy genetycznej opracowano markery molekularne flankujące główne loci QTL wczesności kwitnienia (typu CAPS i dCAPS, po 5 na locus);

Wykonano genotypowanie linii z kolekcji nasiennej przy użyciu 20 markerów na loci QTL oraz 32 markerów na geny indukcji kwitnienia;

Dla 21 markerów reprezentujących 15 genów indukcji kwitnienia oraz wszystkie 4 główne loci QTL zidentyfikowano istotną statycznie korelację z terminem kwitnienia linii z kolekcji nasiennej dla co najmniej 1 roku, a w przypadku 7 markerów dla 3 lat;

Określono profil ekspresji 5 genów ze szlaków indukcji kwitnienia w liniach różniących się terminem kwitnienia i wymaganiami wernalizacyjnymi, wykazując istotne różnice w poziomie ekspresji pomiędzy poszczególnymi genotypami.

Łubin żółty (*Lupinus luteus L.*)

Poznano sekwencje, dla linii rodzicielskich obu populacji mapujących, 110 fragmentów reprezentujących 26 homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia, przy czym 11 sekwencji było polimorficznych pomiędzy liniami rodzicielskimi PRH444/14 i Parys, a 34 pomiędzy liniami rodzicielskimi Wodjil i P28213;

Dla polskiej populacji mapującej (PRH444/14 × Parys) opracowano 10 markerów zakotwiczonych w sekwencjach 9 genów indukcji kwitnienia, zaś dla australijskiej populacji mapującej (Wodjil × P28213) opracowano 19 markerów zakotwiczonych w sekwencjach 16 genów;

Na mapie genetycznej zlokalizowano 12 markerów (po jednym na gen);

W populacji mapującej zidentyfikowano 5 loci QTL terminu kwitnienia;

Określono pełną sekwencję dla 5 genów indukcji kwitnienia: czterech homologów genu *FLOWERING LOCUS T* i genu *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1*;

Zidentyfikowano insercje/delecje (indele) w regionach regulatorowych czterech homologów genu *FLOWERING LOCUS T*;

Poznano termin kwitnienia i wymagania wernalizacyjne 113 linii z kolekcji nasiennej;

Analiza rozkładu indeli homologów genu *FLOWERING LOCUS T* w kolekcji nasiennej wykazała istotną statystycznie korelację z terminem kwitnienia dla kilku z nich;

Wykazano istotne różnice w profilach ekspresji homologów genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia, w zależności od zastosowanego fotoperiodu i wernalizacji, pomiędzy liniami rodzicielskimi obu populacji mapujących.

Część badań wykonano we współpracy międzynarodowej z zespołami z Australii (M. N. Nelson i M. M. Iqbal, University of Western Australia, Perth) i Włoch (P. Annicchiarico i N. Nazzicari, Council for Agricultural Research and Economics, Research Centre for Fodder Crops and Dairy Production, Lodi). Dostęp do sekwencji genomu łubinu żółtego uzyskano na drodze współpracy naukowej z J. A. Udall z USA (U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Southern Plains Agricultural Research Center, College Station, Teksas).

Wnioski

- Pomimo dużego poziomu kolinearności pomiędzy genomami łubinu wąskolistnego i białego, cecha wczesności kwitnienia u tych gatunków warunkowana jest przez różne geny, zlokalizowane na innych chromosomach.
- Cecha wczesności kwitnienia łubinu białego jest kontrolowana w kolekcji nasiennej przez wiele genów, z których każdy wyjaśnia relatywnie niewielki procent obserwowanej wariacji fenotypowej, co w praktyce uniemożliwia klasyczną selekcję w kierunku wczesności kwitnienia przy użyciu markerów molekularnych.
- Występowanie statystycznie istotnej korelacji między rozkładem terminu kwitnienia łubinu białego i polimorfizmem niektórych markerów w kolekcji nasiennej wskazuje na możliwość opracowania modelu selekcji genomowej.
- Wymaga to jednak genotypowania de facto całej kolekcji metodą wysokoprzepustowego sekwencjonowania, a następnie prowadzenia kilkuletnich obserwacji fenotypowych w zróżnicowanych warunkach środowiskowych.
- Cecha wczesności kwitnienia łubinu żółtego jest warunkowana przez kilka głównych loci związanych m.in. z polimorfizmem w obrębie sekwencji homologów *FLOWERING LOCUS T*.
- Polimorfizm występujący w obrębie jednej z kopii tego genu różnicuje linie łubinu żółtego wczesne termoneutralne od linii wymagających wernalizacji, natomiast pozostałe loci polimorficzne odróżniają linie bardzo późne od reszty linii w kolekcji nasiennej.
- Główny gen wczesności kwitnienia u łubinu żółtego jest położony w regionie kolinearnym do regionu genomu łubinu wąskolistnego zawierającego allele *Ku*, *Julius* i *Pal* warunkujące częściową bądź całkowitą termoneutralność u tego gatunku.

Osiągnięcia projektu

- Scharakteryzowano molekularne podstawy wczesności kwitnienia łubinu białego, w postaci wpływu wielu genów na ekspresję tej cechy, z których każdy wyjaśnia zaledwie niewielki procent obserwowanej wariacji fenotypowej.
- Opracowano markerów molekularne typu PCR, CAPS i dCAPS, które mogą być przydatne do monitorowania wybranych alleli wczesności i termoneutralności w liniach łubinu białego uzyskanych w wyniku krzyżowania z materiałami nieudomowionymi.
- Wyniki uzyskane w toku prac nad molekularnym podłożem wczesności kwitnienia łubinu białego stały się podstawą do złożenia wniosku o finansowanie badań podstawowych w ramach konkursu SONATINA Narodowego Centrum Nauki, projekt został przyznany i jest realizowany (kierownik Sandra Rychel-Bielska).
- Wyjaśniono molekularny mechanizm warunkujący termoneutralność łubinu żółtego i opracowano markery PCR umożliwiające selekcję linii termoneutralnych (100% korelacji z cechą).
- Wyniki uzyskane dla łubinu żółtego stały się podstawą do złożenia wniosku o finansowanie badań podstawowych w ramach bieżącego konkursu OPUS Narodowego Centrum Nauki (kierownik Michał Książkiewicz).

Wykaz publikacji wyników**Doniesienia konferencyjne**

- Rychel S., Książkiewicz M., Nelson M., Wolko B., Molecular control of flowering time and vernalization in lupins. III National Conference Genetics and Genomics in Improving Plants – From Model Plant To New Variety, Poznań, 05-07.11.2014.
- Książkiewicz M., Rychel S., Wyrwa K., Szczepaniak A., Zieleziński A., Karłowski W., Wolko B., Naganowska B., Od roślin modelowych do uprawnych: poszukiwanie genów cech użytkowych łubinu wąskolistnego. Łubin we współczesnym rolnictwie, Kudowa Zdrój, 08–10.09.2014.
- Rychel S., Książkiewicz M., Nelson M., Wyrwa K., Naganowska B., Wolko B., Markery selekcyjne do genotypowania termoneutralnych linii łubinu wąskolistnego w nowoczesnych programach hodowlanych. Łubin we współczesnym rolnictwie, Kudowa Zdrój, 08–10.09.2014.
- Książkiewicz M., Wyrwa K., Rychel S., Szczepaniak A., Susek K., Zieleziński A., Bielski W., Karłowski W., Naganowska B., Wolko B. Comparative genomics of *Lupinus angustifolius* gene-rich regions. XIV International Lupin Conference, Mediolan, Włochy, 21-26.06.2015.
- Rychel S., Książkiewicz M., Rudy E., Nelson M., Naganowska B., Wolko B. Genotyping by sequencing of white and narrow-leaved lupins. XIV International Lupin Conference, Mediolan, Włochy, 21-26.06.2015.
- Książkiewicz M., Rychel S., Tomaszewska M., Nelson, M., Naganowska B., Wolko B. Genes involved in flowering time regulation in white lupin (*Lupinus albus* L.): transcriptome profiling, linkage mapping and phylogenetic inference. Second International Legume Society Conference, Troia, Portugalia, 11-14.10.2016.
- Książkiewicz M., Nazzicari N., Yang H., Nelson M.N., Renshaw D., Rychel S., Ferrari B., Carelli M., Tomaszewska M., Stawiński S., Naganowska B., Wolko B., Annicchiarico P. A new high-density consensus linkage map of white lupin. International Conference: Advances in grain legume breeding, cultivation and uses for a more competitive value-chain, Nowy Sad, Serbia, 27-28.09. 2017.
- Plewiński P., Książkiewicz M., Rychel S., Bielski W., Tomaszewska M. Cecha wczesności kwitnienia u łubinu białego i łubinu żółtego – podstawy genetyczne i molekularne. I Konferencja szkoleniowa w ramach Programu Wieloletniego: Zwiększenie wykorzystania krajowego białka paszowego dla produkcji wysokiej jakości produktów zwierzęcych w warunkach zrównoważonego rozwoju, Prusim, 15–16.11.2018.

Plewiński P., Rychel S., Książkiewicz M., Tomaszewska M., Bielski W., Nelson M.N., Naganowska B., Wolko B. Genes underlying early flowering trait in white lupin (*Lupinus albus* L.) and yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). Third International Legume Society Conference, Poznań, 21-24.05.2019.

Plewiński P., Książkiewicz M., Krajewski P., Tomaszewska M., Nelson M.N., Wolko B. (2019). Phenotyping of yellow lupin (*Lupinus luteus*) germplasm collection and differential gene expression profiling in response to vernalization highlight candidate domestication genes for early flowering. 9th International Conference on Legume Genetics and Genomics, Dijon, Francja, 13-17.05.2019.

Publikacje

- Książkiewicz M., Rychel S., Nelson M. N., Wyrwa K., Naganowska B., Wolko B. (2016). Expansion of the phosphatidylethanolamine binding protein family in legumes: a case study of *Lupinus angustifolius* L. *FLOWERING LOCUS T* homologs, *LanFTc1* and *LanFTc2*. *BMC Genomics*, 17(1), 820.
- Książkiewicz M., Nazzicari N., Yang H., Nelson M. N., Renshaw D., Rychel S., Ferrari B., Carelli M., Tomaszewska M., Stawiński S., Naganowska B., Wolko B., Annicchiarico P. (2017). A high-density consensus linkage map of white lupin highlights synteny with narrow-leaved lupin and provides markers tagging key agronomic traits. *Scientific Reports*, 7, 15335.
- Nelson M. N., Książkiewicz M., Rychel S., Besharat N., Taylor C. M., Wyrwa K., Jost R., Erskine W., Cowling W. A., Berger J. D., Batley J., Weller J. L., Naganowska B., Wolko B. (2017). The loss of vernalization requirement in narrow-leaved lupin is associated with a deletion in the promoter and de-repressed expression of a *Flowering Locus T (FT)* homologue. *New Phytologist*, 213, 220–232.
- Rychel S., Książkiewicz M., Tomaszewska M., Bielski W., Wolko B. (2019). *FLOWERING LOCUS T*, *GIGANTEA*, *SEPALLATA* and *FRIGIDA* homologs are candidate genes involved in white lupin (*Lupinus albus* L.) early flowering. *Molecular Breeding*, 39, 43.
- Książkiewicz M., Plewiński P., Rychel S., Tomaszewska M., Sawikowska A., Bielski W., Naganowska B., Wolko B. (2019). Cecha wczesności kwitnienia u łubinu białego i łubinu żółtego-podstawy genetyczne i molekularne. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 286, 357–360.

Identyfikacja i sposób dziedziczenia genów warunkujących odporność na choroby grzybowe i niską zawartość alkaloidów w doskonaleniu wartości użytkowej łubinów, ze szczególnym uwzględnieniem łubinu żółtego

Identification and mode of inheritance of genes underlying fungal disease resistance and low alkaloid content in lupins improvement, with particular attention to yellow lupin

Wojciech Święcicki¹✉, Magdalena Kroc¹, Paweł Barzyk², Katarzyna Czepiel¹, Paulina Wilczura/Aleksandra Burdzińska

¹Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

²Poznańska Hodowla Roślin Tulce

✉ e-mail: wswi@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: łubin żółty, łubin wąskolistny, alkaloidy, *Fusarium*, antraknoza

Cel

1. Identyfikacja genów zaangażowanych w odporność na fuzariozę u łubinu żółtego oraz analiza wybranych genów kandydackich w genomie łubinu wąskolistnego, u którego obserwowana odporność na fuzariozę jest znacznie niższa (cel został osiągnięty).
2. Połączenie niskiej zawartości alkaloidów z odpornością na patogeny grzybowe (*Colletotrichum lupini* i *Fusarium sp.*) w zróżnicowanym podłożu genotypowym o dużej wartości użytkowej (cel został osiągnięty).

Materiały i Metody

1. Geny kandydackie zaangażowane w odporność na wędnięcie fuzaryjne u łubinu żółtego wytypowano na podstawie sekwencjonowania transkryptomu (2 linie podatne i 2 linie odporne; 2 powtórzenia biologiczne; Illumina 100 pz, PE) oraz analizy ekspresji różnicowej;
2. Analizy ekspresji genów kandydackich prowadzono metodą qPCR (łubin żółty i wąskolistny);
3. Wytypowane geny kandydackie zlokalizowano w genomie łubinu wąskolistnego (mapowanie genetyczne, wykorzystanie sekwencji DNA genomu).

4. Zawartość alkaloidów ogółem oraz skład jakościowy oznaczono za pomocą chromatografii gazowej.
5. Krzyżowania wykonano tradycyjną metodą, polegającą na ręcznej kastracji kwiatów i przeniesieniu pyłku.
6. Odporność na *Fusarium* spp. testowano na „polu prowokacyjnym” na którym przez minimum 10 lat uprawiano łubin, nie stosując żadnej przerwy w płodozmianie. Poziom odporności obiektów/linii oceniono i wyrażono jako odsetek roślin, które przeżyły (łubin wąskolistny – 1 strąk/roślinę, łubin żółty – 1 okółek ze strąkami/roślinę).
7. Odporność na porażenie antraknozą testowano w osobnych doświadczeniach polowych i szklarniowych. Test polowy polegał na ocenie porażenia łodyg i strąków w trakcie wegetacji w polu, przy zastosowaniu agrotechniki typowej dla gatunku, z wyjątkiem ochrony fungicydowej. Źródłem infekcji *C. lupini* był obsiew z nasion roślin porażonych w poprzednim sezonie wegetacyjnym oraz dodatkowo inokulacja zawiesiną zarodników grzyba *C. lupini*, wyhodowanego *in vitro*, wykonana w stadium początku kwitnienia. Na początku stadium dojrzewania obserwowano objawy antraknozy, z wyszczególnieniem porażenia łodyg pędów głównych, łodyg pędów bocznych i strąków.



Test szklarniowy wykonano według wystandaryzowanej procedury w klimatyzowanej szklarni. Rośliny uprawiano w doniczkach (10 roślin x 3 powtórzenia) z ziemią oczyszczoną z pasożytów do stadium rozwoju 4–6 liści. Następnie wykonywano inokulację, opryskując części nadziemne roślin wodną zawiesiną zarodników konidialnych *C. lupini* o stężeniu 2×10^6 /ml. Po inokulacji przez 2 doby rośliny trzymane bez dostępu światła w temperaturze 25°C, przy wilgotności względnej 100%, później z dostępem światła w temperaturze 22°C w dzień, 19–20°C w nocy, przy wilgotności względnej 60–65%. Po 10 dniach od inokulacji dokonywano oceny porażenia w skali 0–9, gdzie „zero” oznacza brak objawów porażenia (*minimum*), „dziewięć” całkowite porażenie (*maximum*).

Opis wyników

Na podstawie wyników analizy ekspresji różnicowej, adnotacji funkcjonalnej genów i dostępnej literatury wybrano geny kandydackie, potencjalnie zaangażowane w odporność na fuzariozę łubinu żółtego, których ekspresję badano z zastosowaniem techniki qPCR. U łubinu żółtego zmiany ekspresji przeanalizowano łącznie dla 18 genów kandydackich. Ponadto ekspresję 5 genów wytypowanych dla łubinu żółtego analizowano także w liniach łubinu wąskolistnego porażonych *Fusarium* spp. Do analiz wybrano geny, których adnotacja funkcjonalna sugerowała bezpośredni udział w procesach odpornościowych, geny pełniące funkcje regulatorowe, mające związek z organizacją/modyfikacją ściany komórkowej, a także geny których podwyższona ekspresja może wpływać na zwiększoną podatność roślin. Uzyskane wyniki w większości przypadków wskazują na zaangażowanie wybranych genów w procesy odpornościowe rośliny po porażeniu *Fusarium* spp. np. przyczyniają się do zwiększonej przeżywalności roślin poprzez ograniczenie wzrostu i rozwoju patogena, albo też podwyższenie podatności na infekcję *Fusarium* spp. Ponadto do analiz włączono również geny związane z biosyntezą alkaloidów, przy czym nie zaobserwowano wzrostu ich ekspresji po porażeniu *Fusarium* spp.

Wykorzystanie populacji mapującej i sekwencji genomu pozwoliło na zlokalizowanie położenia wybranych genów kandydackich w genomie łubinu wąskolistnego. Szczególnie interesująca jest identyfikacja położenia na mapie genetycznej markerów/genów, którym nie została przypisana jednoznaczna pozycja w obecnej, niepełnej wersji genomu (nieprzypisane scaffolds). Identyfikacja

markerów/genów w sąsiedztwie genu *Lanr1* (NLL-11), warunkującego odporność na antraknozę, może potwierdzać zaangażowanie tego regionu genomu w procesy odpornościowe rośliny.

Oceniono dużą ilość materiałów hodowlanych pod względem poziomu odporności na wędnięcie fuzaryjne, umożliwiając skuteczną selekcję (tab. 1). Zidentyfikowano obiekty podatne, odporne, oraz wyodrębniono źródła genetycznej odporności na *Fusarium* sp. (12 w łubinie wąskolistnym, 23 w łubinie żółtym) (tab. 1).

Zbadano kompleksowo odporność na antraknozę (*Colletotrichum lupini*) dostępnych materiałów łubinu żółtego – w warunkach polowych i szklarniowych (tab. 2). Porażenie w polu było głównie skupione na łodygach bocznych oraz strąkach, i miało zmienne natężenie. Porażenie w szklarni miało bardzo szeroki zakres – od roślin całkiem zdrowych (stopień porażenia 0,0) do całkowicie martwych (stopień porażenia 9,0). Stan obiektów wzorcowych potwierdził prawidłowy przebiegu testów. Wyniki obserwacji umożliwiły wykonanie selekcji na obiekty podatne i odporne, oraz wskazanie 20 najwartościowszych obiektów, mogących posłużyć za źródło genetycznej odporności (tab. 2). Przy użyciu takich obiektów wytworzono nowe kombinacje krzyżówkowe (np. Z-731, Z-723, Z-686E, Z-736, Z-744, uzyskane z krzyżowań w latach 2015–2016), których potomstwo wykazało się najwyższym poziomem odporności w ponownych testach (rys. 1).

Uzyskano 67 nowych kombinacji mieszańcowych – 32 łubinu wąskolistnego i 35 łubinu żółtego, łączących genotypy odmian uprawnych ze źródłami odporności przeciwko wędnięciu fuzaryjnemu i antraknozie. Źródła odporności wyselekcjonowano za pomocą testów, badających odporność na *Fusarium* sp. i *Colletotrichum lupini*. Drugim komponentem do krzyżowań były aktualnie najlepsze odmiany łubinów.

Wnioski z prowadzonych badań

Zaobserwowane zmiany ekspresji genów badanych przemawiają za zaangażowaniem większości wytypowanych genów kandydackich w odpowiedź rośliny na porażenie *Fusarium* spp. Zaangażowanie genów uczestniczących w różnych mechanizmach odpornościowych może wskazywać, że odporność na wędnięcie fuzaryjne u łubinu żółtego warunkowana jest wielogenowo.

W testach polowych łubinu wąskolistnego i żółtego na *Fusarium* sp. presja selekcyjna była bardzo silna i pomimo tego liczba obiektów o wysokiej odporności była duża. Najlepsze obiekty

w obu gatunkach były porażone podobnie jak wzorce odporności (odmiany Lord, Kalif), a niektóre nawet słabiej niż wzorce. Takie obiekty są cennym materiałem i bardzo dobrym źródłem genetycznej odporności dla hodowli. Oznacza to również, że możliwe jest utrzymanie wysokiego poziomu odporności, a nawet jego ulepszenie względem dotychczasowych wzorców.

Znalezienie genetycznej odporności na antraknozę jest trudne i wymaga zbadania materiałów w różnych warunkach i stadiach wegetacji. Kompleksowa ocena za pomocą testów polowych i szklarniowych pozwala na odróżnienie obiektów o niskiej i wysokiej odporności. Wysoka zgodność wyników polowych i szklarniowych u wybranych obiektów pozwala również wyodrębnić potencjalne źródła genetycznej odporności przeciwko antraknozie. Ponowny test potomstwa nowych kombinacji krzyżówkowych, wytworzonych z udziałem genotypów wyselekcjonowanych według takiej procedury, świadczy o tym, że jest ona skuteczna i pozwala na uzyskaniu postępu w zakresie odporności łubinu żółtego na antraknozę (*C. lupini*).

Uzyskanie stabilnych genotypów, łączących odporność na *Fusarium sp.*, *Colletotrichum lupini* i niską zawartość alkaloidów, wymaga dalszych testów i selekcji potomstwa wybranych kombinacji mieszańcowych. Przeprowadzone eksperymenty wykazały jednak, że możliwa jest skuteczna selekcja pod względem poszczególnych cech oraz połączenie ich, dzięki czemu możliwy jest postęp w hodowli łubinu żółtego i wąskolistnego.

Osiągnięcia projektu:

1. Zmiany ekspresji genów kandydackich, których adnotacja funkcjonalna sugerowała bezpośredni udział w procesach odpornościowych i/lub związek z organizacją/modyfikacją ściany komórkowej może wskazywać, że wybrane geny mogą przyczyniać się do zwiększonej przeżywalności roślin w czasie porażenia *Fusarium sp.* wpływając m in. na zdolność rośliny do ograniczenia wzrostu i rozwoju patogena. Prezentowane wyniki mogą stanowić punkt wyjściowy do dalszego zrozumienia interakcji patogen grzybowy – ściana komórkowa rośliny.
2. Znaczny wzrost ekspresji genów związanych z podatnością wykazany w liniach podatnych może wpływać na podwyższenie podatności na infekcję *Fusarium spp.*
3. Wykazany brak wzrostu ekspresji genów biosyntezy alkaloidów po porażeniu grzybami z rodzaju *Fusarium ssp.* wskazuje, że odporność

roślin na fuzariozę nie jest równoznaczna z podwyższeniem zawartości alkaloidów, co jest ważnym wnioskiem z punktu widzenia zastosowania nasion łubinu w żywieniu.

4. W odmianach hodowlanych łubinu wąskolistnego i żółtego wykazano możliwość obniżenia poziomu alkaloidów w nasionach do poziomu < 0,001% s.m, tj. znacznie poniżej wymaganej bezpiecznej zawartości 0,02% s.m.
5. Testy fitopatologiczne wykazały podniesienie ogólnego poziomu odporności testowanych materiałów hodowlanych oraz wyselekcjonowanie nowych źródeł odporności, lepszych niż dotychczasowe odmiany wzorcowe.
6. Wyniki projektu dotyczące odporności na choroby grzybowe i niskiej zawartości alkaloidów wykorzystano w opracowaniu projektu NCBiR „INTRON”, realizowanego w latach 2019–2021 w Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje

- Czepiel K., Krajewski P., Wilczura P., Bielecka P., Świącicki W., Kroc M. Expression Profiles of Alkaloid-Related Genes across the Organs of Narrow-Leafed Lupin (*Lupinus angustifolius* L.) and in Response to Anthracnose Infection. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 2676.
- Kamel K.A., Świącicki W., Kaczmarek Z., Barzyk P. Quantitative and qualitative content of alkaloids in seeds of a narrow-leafed lupin (*Lupinus angustifolius* L.) collection. *Genet Resour Crop Evol*, 2016, 63 (4): 711–719 (IF 1.294, MEiN 70).
- Świącicki W., Kroc M., Barzyk P., Czepiel K., Wilczura P. Identyfikacja i sposób dziedziczenia genów warunkujących odporność na choroby grzybowe i niską zawartość alkaloidów w doskonaleniu wartości użytkowej łubinów, ze szczególnym uwzględnieniem łubinu żółtego. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 2019, Nr 286: 365–369 (MEiN 20).

Doniesienia konferencyjne

- Kamel K., Kroc M., Kwaśniewski M., Świącicki W. Yellow lupin transcriptome sequencing towards identification of genes associated with resistance to *Fusarium sp.* Joint 7th conference of the Polish Society for Experimental Plant Biology and the Intercollegiate Faculty of Biotechnology UG & MUG, Gdańsk, 8-11 września 2015 (plakat, książka streszczeń str. 21)
- Kroc M., Kamel K., Świącicki W. Selection of reliable reference genes for expression analyzes in yellow lupin subjected to *Fusarium spp.* Konferencja krajowa 2nd Congress of Polish Biochemistry, Cell biology, Biotechnology and Bioinformatics “Bio2016”, 13–16 wrze-

- śnia 2016, Wrocław (plakat P7.8, książka streszczeń str 63).
- Barzyk P., Święcicki W. Ocena odporności na antraknozę (*Colletotrichum lupini*) wybranych kombinacji krzyżówkowych łubinu żółtego. Konferencja krajowa „Zasoby Genowe Roślin Użytkowych na Rzecz Hodowli”, 6–8 listopad 2017, Kazimierz Dolny (plakat, książka streszczeń str. 63).
- Czepiel K., Kroc M., Koczyk G., Święcicki W. Identification of genes involved in resistance to fusarium wilt in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.). Konferencja „Integrative plant biology conference”, 7-9 listopad 2018, Poznań (Plakat nr 8).
- Czepiel K., Kroc M., Koczyk G., Święcicki W. Candidate genes involved in resistance to fusarium wilt in yellow lupin (*Lupinus luteus* L.)”. Third International Legume Society Conference, ILS 3, 21-24 maj 2019 Poznań, Poland (plakat, książka streszczeń str. 191).

Tabela 1

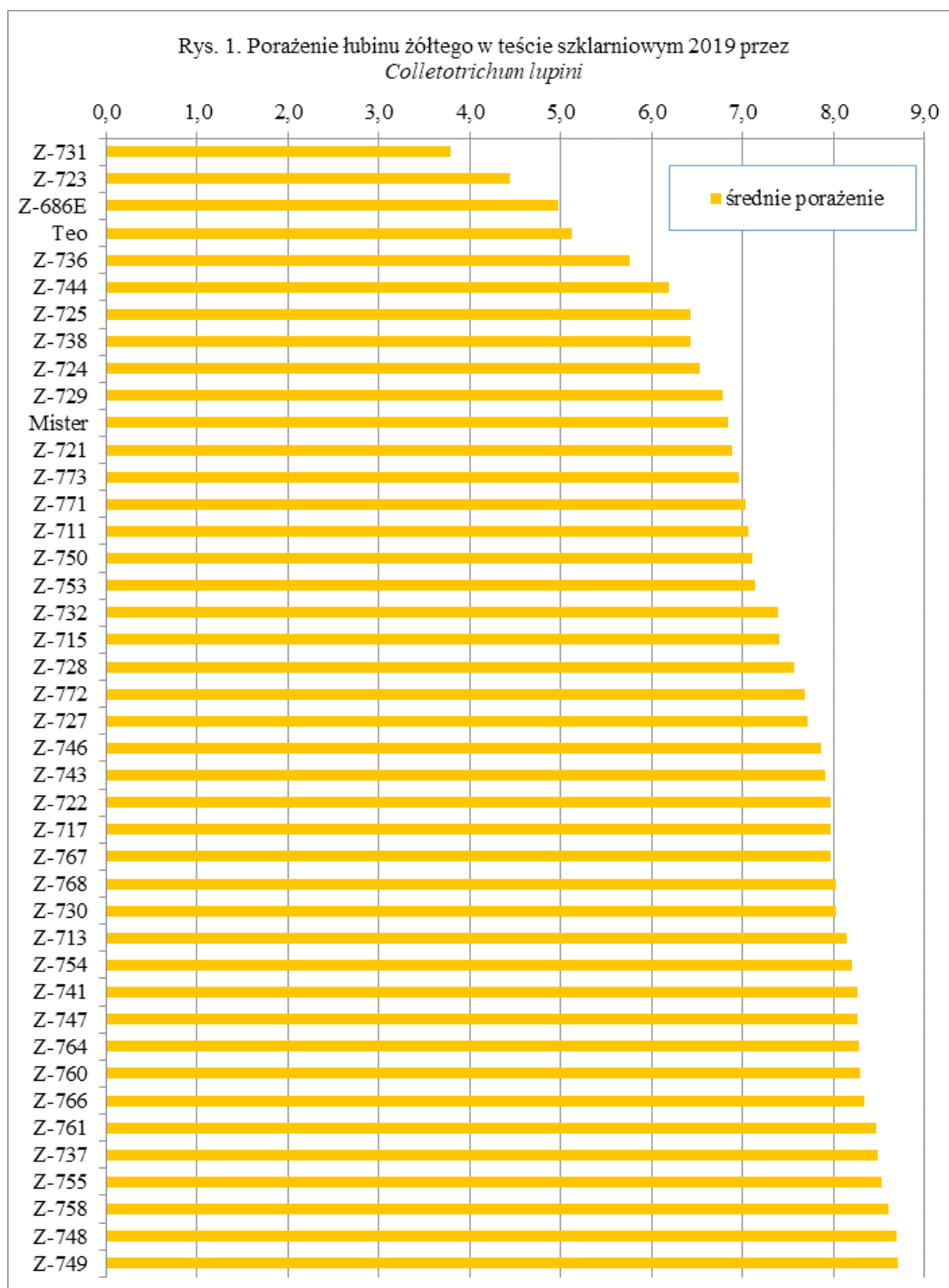
Testy łubinu wąskolistnego i żółtego na polu fuzarialnym 2015–2020.

rok	gatunek	liczba obiektów		
		badanych	o wysokiej odporności	źródła odporności
2014	<i>L. angustifolius</i>	20	2	1
2014	<i>L. luteus</i>	40	18	
2015	<i>L. angustifolius</i>	20	8	1
2015	<i>L. luteus</i>	40	21	2
2016	<i>L. angustifolius</i>	20	8	2
2016	<i>L. luteus</i>	40	20	1
2017	<i>L. angustifolius</i>	20	7	4
2017	<i>L. luteus</i>	40	18	3
2018	<i>L. angustifolius</i>	20	9	1
2018	<i>L. luteus</i>	40	8	3
2019	<i>L. angustifolius</i>	20	8	1
2019	<i>L. luteus</i>	40	21	5
2020	<i>L. angustifolius</i>	20	13	2
2020	<i>L. luteus</i>	40	15	9

Tabela 2

Testy łubinu żółtego na antraknozę 2014–2020.

rok	rodzaj testu	liczba obiektów		
		badanych	o wysokiej odporności	źródła odporności
2014	polowy	40	27	
2014	szklarniowy	40	17	2
2015	polowy	40	7	
2015	szklarniowy	40	35	5
2016	polowy	40	6	
2016	szklarniowy	40	16	2
2017	polowy	40	10	
2017	szklarniowy	40	13	2
2018	polowy	40	10	
2018	szklarniowy	40	15	3
2019	polowy	40	11	
2019	szklarniowy	40	15	1
2020	polowy	40	12	
2020	szklarniowy	40	17	5



Analiza zmienności genetycznej i piramidyzacja genów warunkujących cechy użytkowe łubinu białego

Estimation of genetic variability and pyramiding of genes controlling agricultural traits of white lupin

Wojciech Rybiński¹✉, Wojciech Święcicki¹, Paweł Barzyk²

¹Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

²Poznańska Hodowla Roślin, Oddział w Wiatrowie

✉ e-mail: wryb@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: alkaloidy, antraknoza, łubin biały, krzyżowania zbliżające, mutageneza, tłuszcz, wczesność

Łubin biały jest potencjalnie jedną z najbardziej wartościowych roślin strączkowych (wysoki plon, 34–36% białka i 9% tłuszczu w nasionach). Ma jednak istotne wady (późne dojrzewanie, podatność na antraknozę i inne) wpływające na ograniczone zainteresowanie rolników. Według danych PIORIN za rok 2020 ocena połowa plantacji nasiennych obejmowała odpowiednio 27 i 10 odmian łubinu wąskolistnego i żółtego oraz dwie odmiany łubinu białego oceniane na 202 ha (4798 ha i 661 ha dla łubinu wąskolistnego i żółtego) stanowiących zaledwie 3,5% łącznej powierzchni plantacji łubinowych. Ta wyjątkowo niekorzystna proporcja nie ulegnie zmianie dopóki nie zintensyfikuje się prac genetyczno-hodowlanych w kierunku poszerzenia puli genowej o korzystne warianty cech użytkowych (prezentowanych w projekcie) oraz poznania właściwego dla ich pełnej ekspresji podłoża genetycznego. Analiza zmienności i uzyskanie populacji mieszańcowych z kombinacją kilku ulepszonych cech stanowią kolejne etapy badań. Z kolei wyprowadzona populacja mapująca jest niezbędna dla badań genetyczno-molekularnych, w tym konstrukcji mapy genetycznej z markerami cech użytkowych. Uzyskane wyniki projektu w istotnym zakresie poszerzą wiedzę z zakresu genetyki gatunku, stworzą podstawy do dalszych badań genetyczno-hodowlanych, ale także będą miały znaczenie aplikacyjne.

Celem proponowanych badań było

- zidentyfikowanie i selekcja pożądanych cech w światowych zbiorach kolekcyjnych lub wśród mutacji indukowanych, ocena

dziedziczenia,

- introdukcja cech do genotypów o wysokiej wartości użytkowej,
- opracowanie populacji mapującej jako punktu wyjścia do pogłębionych badań genetyczno-molekularnych.

Powyższe cele obejmowały

- opracowanie zmienności analizowanych materiałów oraz wyodrębnienie korzystnych wariantów cech takich, jak: odporność na antraknozę, wczesność, niska zawartość alkaloidów i wysoka zawartość tłuszczu o pożądanym profilu kwasów tłuszczowych,
- wyselekcjonowanie z segregującej populacji cech determinujących wczesność i korzystny układ elementów struktury plonu,
- uzyskanie materiałów zawierających kombinacje cech niezbędnych dla postępu biologicznego w zróżnicowanym podłożu genotypowym,
- wyprowadzenie populacji mapującej dla badań genetyczno-molekularnych, lokalizacji genów dla cech użytkowych i ich markerów.

Założone i wymienione powyżej cele zrealizowano w okresie trwania realizacji projektu

Materiały i Metody

Materiały stanowiły światowe zasoby genowe łubinu białego analizowane na podstawie dostępnej bazy danych i testów polowo-laboratoryjnych, populacje mutacyjne oraz wytworzone populacje mieszańcowe i populacja mapująca.



Metody

- analiza zmienności i selekcja genotypów o niskiej zawartości alkaloidów, sposób dziedziczenia – analizy biochemiczne, krzyżowanie, analizy statystyczno-genetyczne,
- analiza zmienności i selekcja genotypów o podwyższonej zawartości tłuszczu, w tym o korzystnym profilu kwasów tłuszczowych, zwłaszcza wielonienasyconych kwasów tłuszczowych: omega 3 i omega 6 – analizy biochemiczne,
- identyfikacja i selekcja genotypów odpornych na antraknozę (*Colletotrichum lupini*) – inokulacyjne testy szklarniowe w kolejnych pokoleniach u wybranych kombinacji krzyżówkowych w porównaniu do odmian wzorcowych,
- analiza zmienności w zbiorach kolekcyjnych oraz indukowanie nowej zmienności dla wyselekcjonowania genotypów o skróconym okresie wegetacji w połączeniu z genem *rb* (*restricted branching*) – mutageneza: w tym optymalizacja dawek chemomutagenu MNU, ich wybór, traktowanie nasion, analiza i selekcja pokoleń mutacyjnych: M_1 - M_4 ,
- krzyżowania zbliżające i analiza segregujących populacji mieszańcowych oraz wytworzenie populacji mapującej.

Opis wyników i wnioski

Postęp w hodowli łubinu białego jest niemożliwy bez poszerzenia puli genowej o korzystne warianty cech użytkowych. Stąd na pierwszym etapie realizacji projektu przed wyborem najwartościowszych obiektów dla realizacji projektu, dokonano oceny zawartości w nasionach alkaloidów i tłuszczu oraz odporności roślin na antraknozę w materiałach pochodzących ze światowych zasobów genowych łubinu białego, a zgromadzonych (ponad 300 akcesów) w krajowym banku genów w Wiatrowie.

Wnioski

- analizy zawartości alkaloidów jak i tłuszczu w nasionach obiektów kolekcyjnych z ponad 40 krajów świata wykazały szeroki zakres zmienności obydwu cech w zakresie odpowiednio od 0,001 do 7% i od 7% do 14%,
- w zasobach genowych reprezentujących 300 obiektów kolekcyjnych inokulacyjne testy szklarniowe wykazały brak form o pełnej odporności na antraknozę, a szeroki zakres zmienności stopnia porażenia oceniany w skali 1–9 umożliwił wybór obiektów o największej

tolerancji w zakresie od 1 do 4.

Drugi etap realizacji projektu obejmował krzyżowanie zbliżające z uwzględnieniem czterech cech (zawartość alkaloidów, tłuszczu, odporność na antraknozę i wczesność dojrzewania) i zróżnicowanego podłoża genetycznego (odmiany uprawne) oraz ocenę wartości użytkowej wyselekcjonowanych rekombinantów:

Alkaloidy

- średnia zawartość alkaloidów dla wszystkich ocenianych mieszańców wynosiła 0,0069%, przy zawartości na poziomie 0,024% i 0,035% w nasionach wzorcowych odmian uprawnych: Butan i Boros,
- w finalnym pokoleniu F_6 średnia zawartość alkaloidów w trzech kombinacjach (B15, B16 i B17) wynosiła odpowiednio 0,0011%; 0,0190% i 0,00088% przy zakresach zmienności odpowiednio: od 0,0001% do 0,0039%; od 0,0034 do 0,0321% i od 0,002% do 0,00061%,
- wykazano różnice w zdolności kombinacyjnej poszczególnych kombinacji w kierunku uzyskiwania najbardziej niskoalkaloidowych rekombinantów. Najbardziej efektywna okazała się kombinacja B17: Amiga x Pikador
- profil alkaloidowy wyrażony obecnością lub brakiem poszczególnych alkaloidów był specyficzny w odniesieniu do poszczególnych kombinacji krzyżówkowych i mieszańców, przy czym największą odrębnością w tym względzie wyróżniała się w kolejnych latach kombinacja B17 przy całkowitej absencji ammodendryny, albiny, 11,12- secodidehydro-multifloryny i multifloryny,
- analizując linie rodzicielskie oraz pokolenia F_1 i F_2 zaobserwowano złożony sposób dziedziczenia alkaloidów. Dla większości z nich istotne było zarówno addytywne i nieaddytywne działanie genów z przewagą działania dominującego. W F_1 występowała naddominacja, a w F_2 częściowa lub całkowita dominacja genów dla większości alkaloidów. Udział nieaddytywnego działania genów i zmniejszenia stopnia dominacji w pokoleniu F_2 sugeruje stopniowe uwalnianie addytywności w kolejnych pokoleniach.

Antraknoza

- zarówno w przeglądzie kolekcji łubinu białego jak i w uzyskanych materiałach mieszańcowych, nie zidentyfikowano form w pełni odpornych na antraknozę,
- obserwowano szeroki zakres stopnia porażenia

roślin przez antraknozę. W zastosowanej skali porażenia (1–9) zidentyfikowano szereg mieszańców o wyraźnie większej tolerancji (1–4) w porównaniu z silnie podatną, rodzicielską odmianą uprawną Butan (8 w przyjętej skali ocen),

- wykazano wysoką zdolność kombinacyjną dla B19 (Wt 95673 x Boros) wyrażającą się identyfikacją najliczniejszej grupy segregantów o zwiększonej tolerancji na antraknozę.

Wczesność

- prowadzenie oceny dojrzewania segregantów w kolejnych pokoleniach (do pokolenia F₄) umożliwiło wybór trzech, o najlepszych zdolnościach kombinacyjnych w kierunku selekcji najwcześniejszych mieszańców,
- zidentyfikowano najwcześniejsze mieszańce, dojrzewające kilka dni wcześniej niż ich formy rodzicielskie. Reprezentowały one dwie kombinacje krzyżówkowe obejmujące wczesną lokalną formę kolekcyjną Damascus (Wt 95517) oraz odmiany uprawne Boros i Pikador,
- dawki mutagenu NMU poszerzyły zakres terminu kwitnienia i dojrzewania w ocenianych populacjach umożliwiając wybór najwcześniej dojrzewających obiektów, średnio o cztery dni w porównaniu z kontrolną odmianą wyjściową Butan. Najbardziej efektywną dawką mutagenu w kierunku izolacji form najwcześniejszych o korzystnej strukturze plonowania okazała się 0,8 mM.

Tłuszcz i kwasy tłuszczowe

- potwierdzono trafność wyboru do badań w roku 2017 kombinacji krzyżówkowej AL 22 (Wt 95149) x Kalina o najlepszej zdolności kombinacyjnej, a w konsekwencji zidentyfikowano mieszańce o najwyższej zawartości tłuszczu (powyżej 13 i 14%) w porównaniu ze średnią zawartością tłuszczu form rodzicielskich (10% _ 12%),
- w profilu kwasów tłuszczowych nasion u ocenianych mieszańców dominującym jest kwas oleinowy oraz linolowy. Mniejsza jest zawartość kwasu linolenowego, palmitynowego, stearynowego, eikozenowego oraz erukowego,
- wykazano korzystny stosunek kwasów omega-3 do omega-6, to jest kwasu linolenowego do linolowego na poziomie 1:2. Według danych literaturowych stosunek obydwu wielonienasyconych kwasów tłuszczowych uważany jest za prawie idealny w diecie ludzi jak i żywnieniu

zwierząt.

Krzyżowania zbliżające – piramidyzacja genów

Identyfikacja mieszańców niskoalkaloidowych, o zwiększonej tolerancji na porażenie antraknozą, poprawionej wczesności dojrzewania oraz o wysokiej zawartości tłuszczu umożliwiły wykonanie krzyżowań zbliżających wiążących w jednym genotypie mieszańcowym niską zawartość alkaloidów z tolerancją na antraknozę i w drugiej parze cech, wysoką zawartość tłuszczu z wczesnością dojrzewania. Materiał do krzyżowań stanowiły uzyskane mieszańce o najkorzystniejszych wariantach wspomnianych cech i właściwym dla łubinu białego ideotypie.

Wyniki i wnioski

- w kombinacjach krzyżówkowych obejmujących obiekty o niskiej zawartości alkaloidów x obiekty o największej tolerancji na antraknozę, niskoalkaloidowa forma pochodziła z kombinacji Amiga x Boros, a obiekty o zwiększonej tolerancji na antraknozę z potomstwa mieszańcowego (mutant cienkościenny x odmiana Butan). Uzyskane mieszańce są aktualnie rozmnażane dla analiz biochemicznych,
- w odniesieniu do drugiej pary cech, wczesności i zawartości tłuszczu, wyniki uzyskane w tegorocznym pokoleniu F₄ wykazały trafny dobór mieszańców jako komponentów rodzicielskich, a efektem finalnym piramidyzacji genów związanych z ocenianymi cechami jest uzyskanie mieszańców o zarówno poprawionej wczesności jak i zawartości tłuszczu.

Populacja mapująca

Dla uwzględnienia możliwie szerokiego polimorfizmu wybór form rodzicielskich oparto na dużej liczbie przeciwstawnych alleli genów warunkujących badane cechy użytkowe (linia dzika x odmiana uprawna). Warunki te spełnia linia z krajowej kolekcji łubinu białego AL 22 charakteryzująca się tradycyjnym typem wzrostu, wysoką zawartością alkaloidów i tłuszczu oraz odmiana uprawna Boros o samokończącym typie wzrostu oraz niskiej zawartości alkaloidów i tłuszczu. W tegoroczny pokoleniu F₅ populacje mapującą reprezentowało ponad 150 roślin.

Osiągnięcia projektu

Aspekt użytkarny

1. Uzyskano rekombinanty które charakteryzowały się:
 - zwiększoną tolerancją na porażenie przez

- antraknozę i obniżoną zawartością alkaloidów
 - poprawioną zawartością tłuszczu i wczesnością dojrzewania.
2. Analizy z badań profilu kwasów tłuszczowych wykazały jego wysoce zbalansowany charakter wyrażający się z żywieniowego punktu widzenia idealnym stosunkiem (1:2) wielonienasyconych kwasów: linolenowego (omega 3) do linolowego (omega 6).

Aspekt metodyczny

- wyprowadzono populację mapującą z możliwością jej wykorzystania dla badań genetyczno-molekularnych, w tym konstrukcji mapy genetycznej z markerami cech użytkowych,
- opracowano metodykę indukowania mutacji dla łąbinu białego (gatunek o wąskiej zmienności naturalnej) w oparciu o testy optymalizacji dawek. Za optymalną dla nasion łąbinu białego uznano dawkę 0,8 mM MNU,
- zmodyfikowano metodykę inokulacyjnego testu szklarniowego dla oceny stopnia porażenia roślin łąbinu białego przez antraknozę i identyfikacji form odpornych.

Wyjaśnienie mechanizmu

- wykazano złożony charakter dziedziczenia alkaloidów. Istotne było zarówno addytywne i nieaddytywne działanie genów z przewagą działania dominującego (w F_1 naddominacja, w F_2 częściowa lub całkowita dominacja genów).

Wykaz publikacji

Publikacje

- Rybiński W., Kroc M., Świącicki W., Wilczura P., Kamel K., Barzyk P., Mikulski W. 2018. Preliminary Estimation of Variation of Alkaloids Content in White Lupin (*Lupinus albus* L.) Collection. In: *Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics*, Brazauskas et al. (Eds.) Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, p. 131–136.
- Rybiński W., Świącicki W., Bocianowski J., Börner A., Starzycka-Korbas E., Starzycki M. 2018. Variability of fat content and fatty acids profiles in seeds of a Polish white lupin (*Lupinus albus* L.) collection. *Genetic Resources and Crop Evolution* 65: 417–431. (IF- 1,25)

Konferencje naukowe

- Rybiński W., Świącicki W., Nawrot Cz., Barzyk P., Starzycki M., Starzycka E., Wilczura M. 2014. Zawartość alkaloidów i tłuszczu w nasionach oraz odporność na antraknozę w krajowej kolekcji łąbinu białego. Krajowa konferencja „Łubin we współczesnym rolnictwie”, 8–10 września 2014, Kudowa Zdrój; Materiały Konferencyjne s. 49–50.
- Rybiński W., Świącicki W., Barzyk P., Starzycki M. 2015. Zmienność zawartości tłuszczu i profilu kwasów tłuszczowych dla części obiektów kolekcyjnych łąbinu białego w 2015 r. Konferencja Naukowa Polskiego Towarzystwa Agrofizycznego, Malinówka k. Ełku, 9–11 września 2015; PTA, Lublin 2015.
- Rybiński W., Świącicki W., Bocianowski J., Boerner A., Starzycki E., Starzycka M. 2016. Variability of fat and fatty acids profiles in seed of white lupin (*Lupinus albus* L.) collection., Second International Legume Society Conference (ILS2) 2016: Legumes for Sustainable World, Troia, Portugal, 12–14 October 2016; Book of Abstracts p. 98.
- Rybiński W., Kroc M., Świącicki W., Wilczura P., Kamel K., Barzyk P., Mikulski W. 2017. Variability of fat content and fatty acids profiles in seeds of a Polish white lupin. *Eucarpia „Breeding grasses and protein crops in the era of genomics”*, Vilnius, Lithuania, September 11–14, 2017; (udział P. Barzyk), Book of Abstracts p. 63.
- Rybiński W., Świącicki W., Starzycka-Korbas E., Starzycki M., Barzyk P. 2018. Seeds of white lupin (*Lupinus albus* L.) as a valuable source of fat and fatty acids. *International Congress On Oil and Protein Crops – Chisinau, Republic of Moldova, May 20–24, 2018; Abstract Book p. 89.*
- Rybiński W., Świącicki W., Barzyk P., Nawrot Cz., Starzycki M., Starzycka-Korbas E., Wilczura M. 2019. Ocena zmienności zawartości alkaloidów i tłuszczu w nasionach oraz odporność na antraknozę w krajowej kolekcji łąbinu białego. *Ogólnopolska konferencja IGR PAN: „Od rośliny modelowej do odmiany”*, 5–7 listopad 2019; Poznań; Materiały Konferencyjne s. 74.
- Rybiński W., Świącicki W., Starzycki M., Wilczura P., Starzycka-Korbas E., Barzyk P., Górniewicz B. 2019. White lupin (*Lupinus albus* L.) with increased fat and reduced alkaloids content. *European Conference on Crop Diversification*, September 18–21.2019. Budapest, Hungary; Book of Abstracts p.198–199.

Fenotypowanie i genotypowanie łubinu wąskolistnego pod względem wybranych cech morfologicznych, plonotwórczych i parametrów technologicznych nasion

Phenotyping and genotyping of in terms of selected morphological, yield elements and technological parameters of narrow-leafed lupin seeds

Renata Galek✉, Bartosz Kozak, Dariusz Zalewski

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa
✉ e-mail: renata.galek@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: cechy morfologiczne, elementy struktury plonu, skład chemiczny nasion, łubin wąskolistny

Celem badań było:

1. scharakteryzowanie materiałów kolekcyjnych pod względem parametrów jakościowych nasion i wybranych elementów struktury plonu; analizy szczegółowe dla wybranych genotypów składu nasion – poszczególne frakcje białka, skład aminokwasowy, węglowodany rozpuszczalne
2. ocena grubości okrywy nasiennej i ścian strąka dla dwóch populacji F_2 wyznaczonych na osobnikach F_3 (R004x R001; R001x R004) oraz wyprowadzenie pokolenia F_4 (R004x R001; R001x R004; R009xR005; R005xR009)
3. przeprowadzenie mapowania asocjacyjnego dla kolekcji 47 genotypów łubinu wąskolistnego oraz sporządzenie mapy genetycznej dla populacji mapujących, w tym wytypowanie obszarów QTL związanych z elementami struktury plonu oraz grubością okrywy nasiennej

Doświadczenie polowe zostało założone na terenie stacji Hodowli Roślin Smolice sp. z o.o. Oddział Przebędowo, metodą pasów prostokątnych w trzech powtórzeniach, na poletkach o powierzchni 3,9 m². Określono wybrane elementy struktury plonu (na 10 roślinach z każdego powtórzenia), takie jak: długość kwiatostanu pędu głównego i bocznego, liczba okółków, liczba zawiązanych strąków na kwiatostanie pędu głównego i bocznego, liczba rozgałęzień bocznych I-rzędu oraz wysokość całej rośliny i pędu głównego. Określono również wysokość roślin i pędu głównego. Po zbiorze oceniono takie elementy jak: masa 1000 nasion oraz plon

z poletka. Dla zweryfikowania hipotezy zerowej o braku zróżnicowania badanych obiektów pod względem analizowanych cech przeprowadzono analizę wariancji. W przypadku wykazania istotnych różnic obliczono wartość NIR, podano wartość minimalną i maksymalną oraz współczynnik zmienności. Poszczególne parametry jakościowe ziarna dla 50 genotypów oznaczono następującymi metodami: – białko na podstawie polskiej normy PN-EN ISO 5983–2 lipiec 2006, metoda Kjeldahla – zawartość włókna surowego oznaczono metodą wendeńską, podwójnej hydrolizy kwasowej – tłuszcz na podstawie normy PN-76/R-64753, metoda ekstrakcyjna Soxhleta, w przeliczeniu na suchą masę – alkaloidy zostały oznaczone na podstawie metody udostępnionej COBORU przez Instytut Chemii Bioorganicznej PAN w Poznaniu, i stosowanej rutynowo przez COBORU. Dla wybranych 7 genotypów – (wytypowanych pod względem grubości okrywy nasiennej, zawartości białka i alkaloidów) z 50, które wzięto pod uwagę do programu krzyżowań przeprowadzono dodatkowe analizy. Obejmowały one określenie profilu elektroforetycznego SDS-PAGE wyizolowanych białek. Poszczególne grupy białek zostały rozdzielane za pomocą elektroforezy jednokierunkowej SDS-PAGE prowadzonej według metody opisanej przez Laemmli (1970), stosując 12% (w/v) i 5% (w/v) żele poliakrylamidowe. Supernatant zawierający wszystkie białka rozpuszczalne był analizowany ilościowo za pomocą metody Lowry i in. (1951). Ponadto określono udział poszczególnych aminokwasów oraz węglowodanów rozpuszczalnych. Zawartość aminokwasów określono po kwaśnej



hydrolizie 6M HCl w 110°C przez 24 h przy użyciu automatycznego analizatora aminokwasów AAA (company INGOS, Czech Republic). Zawartość węglowodanów rozpuszczalnych w nasionach wykonano przy użyciu wysokosprawnej chromatografii gazowej (HRGC), zgodnie z metodyką Piotrowicz-Cieślak (2005)

W roku 2017 wystąpiło istotne zróżnicowanie analizowanych obiektów pod względem cech jakościowych – zawartości białka, tłuszczu, sumy alkaloidów oraz włókna. W porównaniu do poprzednich lat zawartość białka w nasionach była najniższa a tłuszczu najwyższa. Zakresy zawartości sumy alkaloidów były zbliżone do roku 2015. Przeprowadzona analiza wariancji dla trzech lat badań wykazała istotne zróżnicowanie analizowanych obiektów, wpływ roku badań oraz istotną interakcję – genotyp x rok badań. Najbardziej stabilne okazały się pod względem zawartości białka trzy genotypy: R008, R022, R035 a najmniej stabilne R007, R023, R031 i R044 biorąc pod uwagę odchylenie standardowe (SD) obliczone biorąc pod uwagę wartości średnie. Pod względem zawartości tłuszczu dwa genotypy wykazały najmniejszą interakcję ze środowiskiem (R010 i R038) a największą trzy (R007, R044, R048) biorąc pod uwagę wartości SD. Pod względem zawartości sumy alkaloidów można zauważyć, że wysokoalkaloidowe genotypy (R002, R005, R006 i R007) i charakteryzowały się największymi wahaniami zawartości sumy alkaloidów w nasionach w poszczególnych sezonach wegetacyjnych. W roku 2017 nasiona zawierały średnio: 65,49% lupaniny, 27,7% 13OHlupaniny, 11% angustifoliny, 6,8% izolupaniny, 3,8% hydroxylupaniny oraz 0,3% isoangustifoliny. W latach 2015, 2016 i 2017 lupanina wystąpiła u wszystkich badanych genotypów (100%), 13OH lupanina (98% – 100%). Natomiast pozostałe alkaloidy nie były charakterystyczne dla wszystkich genotypów, a najrzadziej wystąpiły we wszystkich latach badań takie alkaloidy jak hydroxylupanina i isoangustifolina. W poszczególnych latach odnotowano różny procentowy udział alkaloidów w przypadku poszczególnych genotypów. Najbardziej stabilnym genotypem pod względem zawartości włókna okazał się R035 – wartość SD poniżej 0,3. U dziewięciu genotypów stwierdzono silne wahania tej cechy w zależności od roku – SD 1–1,42.

Uzyskane wyniki fenotypowania na podstawie elementów struktury plonu wskazują na istotne zróżnicowanie analizowanych obiektów pod względem wszystkich analizowanych cech w roku 2017. Różnice nieistotne wystąpiły tylko w przypadku liczby rozgałęzień produktywnych I rzędu

i liczby okółków na pędzie bocznym. Wartości współczynników zmienności uwidaczniają dużą zmienność w obrębie poszczególnych cech. Największe zróżnicowanie występuje, podobnie jak w latach wcześniejszych, w przypadku długości kwiatostanu pędu bocznego (współczynnik zmienności V- 30,6%) gdzie zakres zmienności mieści się w zakresie od 1,42 do 6,56 cm. Badane genotypy różnią się też w dużym stopniu plonem (V – 26,7%). Najniższy plon uzyskał genotyp R007 – 0,22 kg, a najwyższy R047 – 1,01 kg z poletka o pow. 3,6 m². Najmniejsze zróżnicowanie stwierdzono podobnie jak w latach ubiegłych dla MTN (7,1%) oraz wysokości całej rośliny – 7,9%.

Uzyskane wyniki fenotypowania w trzech latach badań pozwoliły na przeprowadzenie analizy wariancji z możliwością oceny interakcji genotyp x lata. Interakcja okazała się nieistotna dla czterech cech: wysokości całej rośliny, długości kwiatostanu pędu bocznego i liczby okółków na pędzie głównym i bocznym. W przypadku pozostałych właściwości reakcja badanych genotypów na zmieniające się warunki pogodowe była odmienna. Nieistotne zróżnicowanie średnich badanych obiektów stwierdzono tylko dla wysokości do I produktywnego rozgałęzienia. Nieistotne były też różnice średnich w latach badań dla wysokości do I produktywnego rozgałęzienia. Podobnie jak dla wyników z roku 2017 w analizie na średnich z trzech lat badań największą zmiennością badane genotypy charakteryzowały się pod względem długości kwiatostanu pędu bocznego (29,6%) i wysokości plonu (26,5%). Niskie plonowanie potwierdził genotyp R004 (0,30 kg), ale w badanym trzyleciu średnio najniżej plonował genotyp R008 bo 0,28 kg. Najwyższy wynik, podobnie jak w roku 2017 uzyskał obiekt R048 – 1,19 kg. Obliczone współczynniki korelacji, dla średnich z roku 2017, wskazały na istotną dodatnią zależność między wysokością do I produktywnego rozgałęzienia a wysokością pędu głównego i całej rośliny, natomiast ujemną z liczbą rozgałęzień produktywnych I rzędu. Dodatnie korelacje stwierdzono między: wysokością pędu głównego a wysokością całej rośliny PG, wysokością całej rośliny, długością kwiatostanu PG, liczbą okółków na PG, MTN a wysokością całej rośliny, liczbą okółków na PG. Istotna dodatnia zależność wystąpiła pomiędzy długością kwiatostanu a liczbą okółków i liczbą zawiązanych strąków na pędzie głównym. Ponadto zależne były liczba rozgałęzień z liczbą zawiązanych strąków oraz liczba okółków na PG z liczbą okółków na PB. Korelacja oceniana na podstawie wyników z trzylecia okazała się istotna w przypadku większej ilości par cech. I tak

stwierdzono dodatnią pomiędzy MTN a wysokością pędu głównego i całej rośliny. Ponadto dodatnie zależności stwierdzono pomiędzy wysokością pędu głównego a wysokością do I produktywnego rozgałęzienia, wysokością całej rośliny wysokością całej do I rozgałęzienia i wysokością pędu głównego. Dodatnia zależność wystąpiła pomiędzy liczbą okółków a wysokością PG i całej rośliny oraz długością kwiatostanu PB i liczbą okółków na PG. Liczba zawiązanych strąków korelowała z liczbą okółków i strąków na PG. Stwierdzono ponadto ujemną zależność pomiędzy długością kwiatostanu pędu bocznego a plonem a dodatnią z długością kwiatostanu PB. Analiza skupień przeprowadzona na podstawie średnich z roku 2017 pozwoliła na porównanie analizowanych obiektów pod względem ich podobieństwa fenotypowego. Powstały 3 skupienia. Do najliczniejszego zakwalifikowano aż 29 genotypów. Wyraźnie różniące się od pozostałych skupienie utworzyły 3 genotypy o zdeteminowanym typie wzrostu: R008, R011 i R024. Ta sama analiza, ale przeprowadzona na średnich z trzech lat potwierdziła w znacznym stopniu uzyskane wyniki, rozkład grup był w dużym stopniu podobny. Przeprowadzona analiza składowych głównych pozwoliła na redukcję badanych 12 cech do 4 składowych które wnosily 75,03% zmienności ogólnej, a kolejno poszczególne składowe 33,47%, 19,45%, 12,65% i 9,47%. Największy udział w kształtowaniu zmienności poszczególnych cech to w pierwszej składowej: wysokość do I produktywnego rozgałęzienia, długość kwiatostanu PB, liczba rozgałęzień produktywnych I rzędu, liczba okółków na PB oraz Liczba zawiązanych strąków na PB. W drugiej: wysokość pędu głównego i całej rośliny. W trzeciej liczba zawiązanych strąków na kwiatostanie PG a w czwartej plon. Zastosowanie tej samej metody analizy na wynikach średnich z trzylecia 2015–2017 doprowadziło do redukcji badanej przestrzeni wielowymiarowej do 3 składowych, które wnosily 74,06% zmienności. Pierwsza składowa wnosila 42,52% ogółu zmienności, druga 20,95% a trzecia 10,59%. Największy udział w kształtowaniu zmienności pierwszej składowej miały następujące cechy: wysokość do I produktywnego rozgałęzienia, długość kwiatostanu pędu głównego i bocznego, liczba rozgałęzień produktywnych I rzędu, liczba okółków na pędzie głównym i na bocznym oraz liczba zawiązanych strąków na pędzie głównym. W drugiej składowej największy udział miały wysokość pędu głównego i całej rośliny. W przypadku czynnika 3 żadna z cech nie miała znaczącego udziału (powyżej 0,70) co wynika z faktu, że udział tej składowej wynosił tylko

10,59%.

Szczegółowe wyniki wielkości produktów białkowych z roku 2017 oraz z poprzednich dwóch lat wskazują, że w roku 2017 liczba produktów była największa – 127, a ich wielkość mieściła się w zakresie 25,7 do 106,1 kDA. W roku 2016 rozpiętość wyników była największa, gdyż otrzymane produkty charakteryzowały się masą od 6,5 do 200,0 kDA, a ich liczba wyniosła 121. W roku 2015 zakres wielkości otrzymanych produktów wyniósł od 6,5 do 97 kDA a ich liczba była najmniejsza 75. W celu porównania podobieństwa poszczególnych genotypów w latach zastosowano dystans Nei. W poszczególnych latach widać zróżnicowanie analizowanych genotypów pod względem występowania poszczególnych produktów białkowych. Najbliższe podobieństwo między analizowanymi latami na podstawie współczynników korelacji można zaobserwować w latach 2015 i 2016. Najmniejszy dystans można zaobserwować między Emir (R001) i Oskar (R006) oraz Karo (R005) i Oskar (R006), Au11257–19–1 (R004) i Sonet (R008). Uzyskane diagramy wyraźnie wskazują na oddalenie form użytych do krzyżowań (zadanie 2) –zwłaszcza R004x R001 (AU x Emir) oraz R005xR009 (Karo x Graf), co potwierdza zmienność wybranych obiektów na poziomie molekularnym. W ciągu najbliższych dwóch lat będzie można wygenerować linie RILs przydatne do mapowania na poziomie F6.

Przeprowadzona jednoczynnikowa (dla roku 2017) oraz dwuczynnikowa analiza wariancji (rok, genotyp) wykazała istotne zróżnicowanie badanych obiektów pod względem zawartości poszczególnych aminokwasów, a zastosowany test Tukey'a pogrupował średnie w grupy jednorodne (Tabela 15). Największą zmienność biorąc pod uwagę współczynnik zmienności ($V\%$) pod względem zawartości poszczególnych aminokwasów w roku 2017 odnotowano dla tyrozyny – 6,39%. W roku 2016 ten parametr był na poziomie 10%. Treonina należała też do parametrów o średnio najwyższym współczynniku zmienności biorąc pod uwagę średnie zakresy wartości tej cechy z trzech lat. Zróżnicowanie średnich zawartości pozostałych aminokwasów były niższe – współczynnik zmienności 1–4,5%. Pod względem zawartości waliny i histydyny można stwierdzić najsłabsze zróżnicowanie analizowanych obiektów. Różnice genotypowe w zawartości poszczególnych aminokwasów w nasionach biorąc pod uwagę wartości minimalne i maksymalne były niezbyt wielkie, co znajduje też odzwierciedlenie w wartościach współczynników zmienności. Na uwagę

zasługuje genotyp R001, gdyż uzyskał najwięcej korzystnych not (przynależność wartości średnich do grupy a) biorąc pod uwagę zawartość lizyny, metioniny, cystyny czy też fenyloalaniny nie ustępując zasadniczo w porównaniu do innych genotypów pod względem zawartości treoniny, waliny czy leucyny.

Przeprowadzona jednoczynnikowa analiza wariancji dla roku 2017 oraz dwuczynnikowa dla wyników z trzech lat (rok, genotyp) wykazała istotne statystycznie zróżnicowanie analizowanych siedmiu genotypów pod względem zawartości poszczególnych oligosacharydów z wyjątkiem zawartości glukozy. Również dla wszystkich cech, z wyjątkiem zawartości glukozy stwierdzono istotność interakcji Genotyp x rok badań. Zawartość glukozy i galaktozy była znikoma i tylko trzy genotypy zawierały te oligosacharydy. Znaczną część węglowodanów nasion łubinu wąskolistnego stanowiły oligosacharydy, w tym głównie α -galaktozydy: rafinoza, stachioza, werbaskoza, pełniące funkcje materiału zapasowego. Stwierdzono średnią znaczną zawartość stachiozy, a następnie sacharozy. Pod względem zawartości węglowodanów rozpuszczalnych w wodzie stwierdzono znaczne zakresy zmienności ich zawartości. Największą zmienność obserwowano dla D-chiro-inozytolu podobnie jak w poprzednich latach oraz fruktozy, D-pinitolu, *myo*-inozytolu i galaktinolu. Najmniej zróżnicowane genotypy były pod względem zawartości rafinozy a także werbaskozy, stachiozy, ciceritolu rozpatrując wyniki z 2017 roku oraz z wielolecia.

II. W 2015 roku zostały skrzyżowane dwa genotypy o skrajnej grubości okrywy nasiennej w dwóch kierunkach (R004 x R001, R001 x R004) oraz o zróżnicowanej zawartości alkaloidów i białka (R009xR005; R005xR009). Uzyskano nasiona mieszańcowe F₁, które wysiano w szklarni 2015/2016, uzyskując nasiona pokolenia F₂. Z uzyskanych pojedynków F₂ zebrano nasiona dla wyprowadzenia linii F₃ (R004x R001; R001x R004; R009xR005; R005xR009) – 2016 rok. W 2017 roku wysiano we Wrocławiu w rozstawie 10x20 nasiona F₃ dwóch populacji uzyskanych ze skrzyżowania o skrajnej grubości okrywy nasiennej oraz zawartości alkaloidów. W przypadku dwóch pierwszych populacji w celu wyznaczenia grubości okrywy nasiennej oraz ścian strąka przeprowadzono analizę zgodnie z metodyką opracowaną wg Clements i in. 2002. Dla wygenerowania populacji F₄ dla materiałów zróżnicowanych pod względem alkaloidów zebrano nasiona z roślin F₃, określono liczbę nasion i masę nasion z rośliny oraz

masę tysiąca nasion z 400 pojedynków populacji R009xR005; R005xR009.

Przeprowadzona jednoczynnikowa analiza wariancji wykazała istotne zróżnicowanie analizowanych linii pod względem% udziału ścian strąka, okrywy nasiennej i masy 1000 nasion. Wygenerowane populacje mapujące charakteryzowały się zróżnicowanym zakresem udziału ścian strąka w strąku i okrywy nasiennej w nasieniu oraz masy 1000 nasion. W populacji R004xR001 współczynnik zmienności dla pierwszej ocenianej cechy był najwyższy. Największa frekwencja osobników charakteryzowały się klasy o udziale ścian strąka na poziomie 30–32–35–36% u obu populacji mapujących. Również pod względem udziału okrywy nasiennej można zaobserwować, że populacja R004xR001 odznaczyła się większym zakresem tej cechy niż R001xR004. W obu populacjach liczebność osobników o skrajnych wartościach analizowanych cech była niewielka, aczkolwiek w populacji R001xR004 liczba linii o% udziale okrywy nasiennej między 18 a 19 była wyższa (10 linii) niż w odwrotnym układzie krzyżowania (4 linie). Pod względem masy 1000 nasion analizowane populacje pod względem wybranych parametrów statystycznych nie odbiegały od siebie. Ujemny współczynnik korelacji (-0,42 – R001xR004; -0,38 R004xR001) istotny statystycznie został obliczony dla masy 1000 nasion i udziału okrywy nasiennej. Nie stwierdzono żadnej istotnej statystycznie zależności między udziałem ścian strąka w strąku a okrywy nasiennej czy MTN.

III. Materiał badawczy stanowiło genomowe DNA wyizolowane z roślin pokolenia F₂ populacji mapujących R004xR001 oraz R001xR004. Genomowe DNA, wyizolowane zostało metodą CTAB, z 220 roślin (po 110 dla każdej populacji, łącznie 220 izolacji). Do genotypowania wykorzystywano 100 markerów SNP wytypowanych na podstawie wyników z roku 2015. Markery wybrane do genotypowania charakteryzują się polimorfizmem pomiędzy formami rodzicielskimi (R001, R004). Dodatkowo markery wybrano tak, aby były równomiernie rozmieszczone na mapie ExL (markery SNP pochodzą z tej mapy). Na podstawie rozmieszczenia markerów na genetycznej mapie sprzężeń wytypowano markery reprezentujące 19 z 20 grup sprzężeń. Genotypowanie przeprowadzono na urządzeniu Illumina Eco według protokołu opracowanego w roku 2015. Reakcje przeprowadzono w 48 dołkowych płytkach do PCR (45 badanych genotypów + 2 kontrole – Emir i LAE-1) oraz każda płytka zawiera kontrolę negatywną (NTC). Do identyfikacji loci dla genotypu w każdej próbce i dla

każdego analizowanego locus wykorzystano oprogramowanie Illumina Eco Study. W oprogramowaniu wygenerowano z raporty z genotypem każdej próbki. Następnie raporty dla wszystkich analizowanych locii zostały wyeksportowane do specjalnie przygotowanego programu komputerowego (napisanego z wykorzystaniem języka Python oraz Bash). Program ten pozwolił na stworzenie matrycy z genotypem każdej próbki dla każdego locus. Otrzymana w ten sposób matryca została wyeksportowana do programu R, w którym wykonane zostały analizy statystyczne i konstrukcja mapy. Sprawdzone zostały rozkłady każdego markera z oczekiwanym rozkładem 1:2:1 przy pomocy testu χ^2 . Skonstruowano następnie genetyczną mapę sprzężeń. Do konstrukcji mapy genetycznej wykorzystano informacje o lokalizacji poszczególnych markerów na opracowanej już mapie ExL oraz genom referencyjny łubinu wąskolistnego [Hane i in. 2016]. Do konstrukcji mapy wykorzystano pakiet ASmap oraz R/qtl [Broman i in 2003, Taylor i Butler 2017]. Odległości pomiędzy markerami obliczono używając algorytmu Kosambi. Otrzymane grupy przyrównano do genomu referencyjnego stosując program BLAST. Pozwoliło to na odpowiednie opisanie i orientację otrzymanych grup. Wyniki z fenotypowania (określenie grubości ściany strąków oraz okrywy nasiennej) zostały wyeksportowane do programu R. Przy wykorzystaniu pakietu Rqtl [Broman i in 2003] na podstawie wyników z fenotypowania populacji mapującej oraz genotypowania populacji mapującej (mapa genetyczna) wyznaczone zostały obszary QTL związane z cechą grubości okrywy nasiennej i grubości ścian strąków. Do wyznaczania obszarów QTL wykorzystany został algorytm calc.genoprob oraz scanone z parametrem „hk”, skok 0,5 cM. Poszukiwanie obszarów QTL z użyciem modelu jedno cechowego i regresji Haley–Knott [Broman i in 2003]. Wyniki uzyskane dla populacji R001xR004 zostały porównane z wynikami dla populacji odwrotnej R004xR001.

Równolegle przeprowadzone zostało mapowanie asocjacyjne dla cech morfologicznych i plonotwórczych. Wyniki z genotypowania dla 47 linii zebrane w roku 2016 zostały połączone z wynikami z fenotypowania zebranymi w latach 2015 – 2017. Uzyskane wyniki zostały wprowadzone do programu R. Po przeprowadzeniu analizy statystycznej wyników fenotypowania przeprowadzono analizę korelacji pomiędzy poszczególnymi markerami, a cechami morfologicznymi i plonotwórczymi (mapowanie asocjacyjne). Do mapowania asocjacyjnego wykorzystane zostały następujące

algorytmy: GLM, SA, ML.

Otrzymana mapa została utworzona w oparciu o 87 markerów ze stu zastosowanych i składała się z 16 grup sprzężeń odpowiadających 16 chromosomom łubinu wąskolistnego. Były to odpowiednio grupy: ExAU_LG02, ExAU_LG03, ExAU_LG04, ExAU_LG05, ExAU_LG06, ExAU_LG07, ExAU_LG08, ExAU_LG09, ExAU_LG10, ExAU_LG12, ExAU_LG13, ExAU_LG15, ExAU_LG16, ExAU_LG18 oraz ExAU_LG19 (Rysunek 1). Łączna długość otrzymanej mapy to 1240,91 cM. Najdłuższą otrzymaną grupą okazała się ExAU_LG03 – 251.7 cM. Podjęta próba wyznaczenia obszarów QTL nie jest satysfakcjonująca. Dla żadnej z badanych populacji nie udało się znaleźć obszaru QTL, który posiadałby wartość LOD choćby zbliżoną do 3 zarówno dla cechy „Udział ścian strąka” jak i „Udział okrywy nasiennej w nasieniu”. Zagęszczenie markerów na mapie nie było wystarczające, a otrzymana mapa reprezentowała jedynie niewielki wycinek genomu łubinu wąskolistnego. Otrzymane wyniki fenotypowania są cennym zasobem wiedzy, który może zostać w przyszłości wykorzystany do zintensyfikowania poszukiwania obszarów QTL. Otrzymane wyniki wskazują na konieczność przeprowadzenia szerszego genotypowania, w celu uzyskania mapy o dużym zagęszczeniu markerów molekularnych i większym pokryciu genomu. Ponowna próba wyznaczenia obszarów QTL na ulepszonej wersji mapy powinna przynieść lepsze rezultaty i pozwolić na wskazanie markerów SNP przydatnych do selekcji cechy grubości okrywy nasiennej czy ścian strąka.

Przeprowadzono analizy mapowania asocjacyjnego dla 16 cech. Dla 4 cech udało się uzyskać wartości korelacji pomiędzy wartościami przewidzianymi modelem a wartościami uzyskanymi w pomiarach. Oznacza to że dla tych cech markery molekularne pozwalają z co najmniej 80% prawdopodobieństwem przewidzieć wartość cechy. Cechami tymi były: plon, masa tysiąca nasion, wysokość pędu głównego oraz zawartość tłuszczu. Do selekcji wymienionych cech w programach hodowlanych markery molekularne mogą zostać z powodzeniem zastosowane. Dla pozostałych analizowanych cech markery molekularne również mogą zostać wykorzystane do selekcji, należy mieć jednak na uwadze, iż skuteczność tych markerów w tym przypadku jest niższa (prawdopodobieństwo poniżej 80%). Wartości LOD score powyżej 3 dla pojedynczego markera uzyskano jedynie dla cechy masy 1000 nasion. Oznacza to, że do selekcji analizowanych cech należy wziąć cały zestaw markerów a nie pojedynczy marker. Cały zestaw pozwala bowiem

z dość wysokim prawdopodobieństwem przewidzieć wartość cechy. Pomimo konieczności użycia całego zestawu markerów do genotypowania wyniki uzyskane w projekcie mogą być z powodzeniem wykorzystane w praktyce hodowlanej. Zaproponowana metoda genotypowania w oparciu o markery SNP oznaczane metodą KASP jest szybka, tania i wydajna. Pozwala na określenie genotypu dla dużej liczby obiektów hodowlanych (rzędu kilku tysięcy pojedynków) w krótkim okresie czasu (kilka tygodni) przy niskim nakładzie kosztów (genotypowanie jednego SNP to koszt kilkunastu groszy). Wspomniane koszty możliwe są od osiągnięcia jedynie przy zastosowaniu masowej skali analiz rzędu analizy kilku tysięcy markerów SNP. Mając powyższe na uwadze opracowany w czasie trwania projektu zestaw markerów SNP może z powodzeniem zostać wykorzystany w przyszłych pracach hodowlanych. Opracowany zestaw składa się łącznie z 78 markerów SNP rozmieszczonych w 14 chromosomach łubinu wąskolistnego (tab 20). Niektóre z chromosomów są wystarczająco pokryte markerami (LG2 – 12 markerów, LG9 – 12 markerów) nie mniej jednak niektóre chromosomy jak LG1 lub LG20 nie mają ani jednego markera w opracowanym zestawie, inne jak chromosom LG5, LG19 reprezentowane są przez 1–2 markery. Zwiększenie liczby markerów w opracowanym zestawie do genotypowania wiązać się będzie z zwiększeniem wiarygodności uzyskiwanych wyników. Należy zwrócić uwagę, iż w projekcie opracowano i przetestowano na wybranych genotypach łącznie 400 markerów SNP. Wszystkie te markery mogą zostać włączone do potencjalnej puli markerów używanych w genotypowaniu i selekcji cech morfologicznych oraz plonotwórczych. Będzie się to wiązało z lepszym pokryciem genomu i lepszą jego reprezentacją, a przez to przyczyni się do uzyskania większej wiarygodności wyników i lepszej predykcji analizowanych cech.

Podsumowanie

1. W trzecim roku badań stwierdzono znaczne zróżnicowanie badanych genotypów pod względem cech jakościowych i struktury plonu. Analiza z trzech lat pozwoliła na wskazanie cech, które są zależne od wpływu środowiska na podstawie istniejącej interakcji genotypowo-środowiskowej.
2. Interesujący jest fakt znacznego zróżnicowania w zawartości frakcji białek, co daje podstawę do zintensyfikowania prac z wykorzystaniem elektroforezy 2D dla ich precyzyjnej ich identyfikacji, aczkolwiek należy wziąć pod uwagę

zróżnicowaną ekspresję genów, gdyż nie wszystkie białka wystąpiły w trzech latach badań.

3. Przeprowadzony program krzyżowań dał podstawę do wyprowadzenia pokolenia F_2 a następnie $F_{3,4}$ RILs, niezbędnych do podjęcia w przyszłości szeroko zakrojonego genotypowania i mapowania u *L. angustifolius*.
4. Uzyskane rekombinanty o zróżnicowanym udziale ścian strąka oraz okrywy nasiennej oraz zróżnicowanych cechach jakościowych mogą być wykorzystane w praktycznej hodowli roślin.
5. Szczegółowa ocena materiałów kolekcyjnych okazała się przydatna do mapowania asocjacyjnego.
6. W wyniku przeprowadzonego mapowania asocjacyjnego wytypowano markery sprzężone z poszczególnymi cechami.
7. Konieczne jest kontynuowanie badań pod kątem rozszerzenia puli markerów molekularnych, w celu uzyskania lepszego rozpoznania – powiązania genotypu z fenotypem.
8. Utworzono szkielet kolejnej mapy genetycznej, która po zagęszczeniu dodatkowymi markerami może zostać wykorzystana w analizach QTL cech związanych z grubością okrywy nasiennej.
9. Możliwe jest wykorzystanie markerów SNP do predykcji cech w materiałach hodowlanych.
10. Genotypowanie markerami SNP w oparciu o technikę KASP może być z powodzeniem wykorzystywane w programach hodowlanych łubinu wąskolistnego.

Literatura

- Lowry O. H., Rosebrough N. J., Farr A. L., Randall R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry*, 193, 265-275.
- Piotrowicz-Cieślak A. I. (2005). Changes in soluble carbohydrates in yellow lupin seed under prolonged storage. *Seed Science and Technology*, 33.1: 141-145.
- Hane J. K., Ming Y., Kamphuis L. G., Nelson M. N. Garg, G. Atkins, C. A., Singh, K. B. (2017). A comprehensive draft genome sequence for lupin (*Lupinus angustifolius*), an emerging health food: insights into plant-microbe interactions and legume evolution *Plant Biotechnology Journal*, 15(3), 318-330.
- Broman K. W. Wu H., Sen Ś., Churchill G. A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19(7), 889-890.
- Taylor J., Butler D. (2017). R package ASMap: efficient genetic linkage map construction and diagnosis. *arXiv preprint arXiv:1705.06916*.

Badania nad gametyczną embriogenezą u *Lupinus angustifolius* L. – indukcja haploidów i analiza genetycznego podłoża tego procesu

Research on gametic embryogenesis in *Lupinus angustifolius* L. - haploid induction and analysis of the genetic basis of this process

Renata Galek¹✉, Bartosz Kozak¹, Dariusz Zalewski¹, Adela Adamus²,
Agnieszka Kiełkowska²

¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

²Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

✉ e-mail: renata.galek@upwr.edu.pl

Słowa kluczowe: androgeniza, gynogeniza, haploidy, identyfikacja haploidów, krzyżowanie oddalone, łubin wąskolistny

Cele badań

- Analiza wpływu pyłku obcego gatunku oraz indukcji gynogenyzy na rozwój komórek woreczka zalążkowego – zrealizowano
- Charakterystyka procesu androgenyzy u wybranych genotypów *L. angustifolius* – zrealizowano
- Analiza zmian ekspresji genów odpowiedzialnych za morfogenezę w trakcie proliferacji kalusa – zrealizowano

Analiza wpływu pyłku obcego gatunku oraz indukcji gynogenyzy na rozwój komórek woreczka zalążkowego

Materiałem badawczym były zebrane i utrwalone słupki po wykonaniu przepylecia wybranych genotypów *L. angustifolius* z wybranymi donorami pyłku *L. mutabilis* oraz *L. luteus*. Do obserwacji zalążków po 48, 96 oraz 168 h od momentu przepylecia przygotowano preparaty po zastosowaniu metody parafinowej (Filutowicz i Kuźdowicz 1951). Obserwacje mikroskopowe wykonano przy użyciu mikroskopu NIKONEclipse 400.

Do badań nad optymalizacją doboru pożywki były analizowane zalążki 4 genotypów łubinu wąskolistnego (Karo, Emir, Graf oraz LAE) zarówno do indukcji zalążków na drodze gynogenyzy jak i krzyżowania oddalonego. Zalążki nie poddane traktowaniu obcym pyłkiem (gynogeniza) oraz po traktowaniu obcym pyłkiem – *L. mutabilis* oraz *L. luteus* sukcesywnie izolowano do kultur *in vitro*. W przypadku wykorzystania krzyżowania oddalonego starano się

jak najdłużej utrzymać strąki na roślinie. Po 2 – 3 dniach od naniesienia pyłku na znamiona wykonywano oprysk 2,4D. Zawiązane strąki pobierano sukcesywnie po 7–14 dniach od momentu przepylecia. Dezynfekcję powierzchniową przeprowadzano dwufazowo: sublimatem (0,1%) oraz po wypłukaniu w sterylnej wodzie strąki zanurzono w H₂O₂ (7%). Słupki zawierające zalążki do indukcji gynogenyzy odkażano w H₂O₂ (7%). Zastosowano pożywki podstawowe B5 lub MS z modyfikacjami. Łącznie przetestowano 9 zasadniczych wariantów pożywek dla krzyżowania oddalonego oraz 15 dla indukcji gynogenyzy, z uwzględnieniem hodowli pulsacyjnej (przemienne pasażę na pożywkę z regulatorami i następnie bez).

Wykorzystanie krzyżowania oddalonych gatunków nie tylko dla pozyskiwania nowej zmienności genetycznej w postaci mieszańców, ale i indukcji haploidów (metoda bulbosowa, indukowana partogeneza (za pomocą pyłku obcego gatunku) wymaga poznania możliwości zapylenia czy zapłodnienia (metoda bulbosowa), a potem eliminacji chromosomów, co jest istotne z uwagi na często występujące bariery krzyżowności pre- i post zygotyczne (Buschman-Loock i in. 1992; Faluyi i Williams 1980; Galek 2010; Przyborowski i in. 1996; Przyborowski 2003; Williams i in. 1980). W ramach realizowanego projektu w roku 2018 oceniono zachowanie się pyłku oddalonych gatunków – *L. luteus* i *L. mutabilis* na znamieniu czterech różnych genotypów *L. angustifolius* pod kątem możliwości indukcji



haploidów. Stwierdzono, że pyłek kielkował stosunkowo intensywnie bez względu na rodzaj zapylacza, za to docieranie łagiewki pyłkowej do zalążków było najskuteczniejsze, gdzie do zapylenia użyto pyłku *L. luteus* 500. Również obserwowano największą skuteczność indukcji rozwoju kalusa przy użyciu pyłku *L. luteus* – 500. Wykorzystanie krzyżowania oddalonego odniosło zdecydowanie pozytywny wpływ na rozwój tkanki kalusowej (3 typy morfologiczne) z zalążków, w tym haploidalnej. Obie zastosowane w roku 2018 pożywki różnicowały efektywność (%) regeneracji tkanki kalusowej w zależności od obiektu (30–98%). Jednolity kalus haploidalny uzyskano po zastosowaniu pyłku *L. luteus* 500 oraz *L. mutabilis* LM.13. Analiza rozwoju woreczka zalążkowego przeprowadzona w roku 2019 oraz 2020 dla analizowanych układów krzyżowania *L. angustifolius* (4 genotypy) po przepyleniu *L. mutabilis* (1 genotyp) oraz *L. luteus* (dwa genotypy) pokazała inny przebieg w porównaniu do procesu samozapylenia, gdzie obserwowano zapłodnienie w okresie pełni pylenia, rozwój zarodka kilkukomórkowego w ciągu tygodnia oraz w stadium globularnym z wykształconym suspensorem po dwóch tygodniach. Po 48 h od przepylenia pyłkiem obcego gatunku odnotowywano obecność struktur kilkukomórkowych. Po 96 h można było zaobserwować kilkunastokomórkowe struktury, w tym widoczne struktury o dużych jadrach komórkowych czy drobniejsze, uorganizowane a po 168 h zdecydowanie bardziej rozbudowane. Ich położenie może wskazywać, że mamy do czynienia z partenogenezą. Odnotowywano też degenerujące woreczki zalążkowe w zalążku. Sam proces embriogenezy u łubinu w początkowym jego okresie jest nietypowy i trudno dokonać klasyfikacji w konkretnym systemie embriogenezy, co jest związane z asynchronicznymi podziałami zarodka (Jaranowski 1962; Davies i Williams 1985). Zasadniczo odpowiada typowi Caryophyllad, odmianie *Medicago*. Jaranowski stwierdził (1962), iż w warunkach szklarniowych u *L. albus* zapłodnienie następuje po 20 – 24h. Davies i Williams (1985) badali przebieg powstawania zarodków również u *L. mutabilis*, u którego przebieg embriogenezy zarodka był szybszy niż u *L. albus*. Przy krzyżowaniach bardzo istotnym elementem technicznym jest właściwy moment dokonania zapylenia. Przeprowadzona analiza w pierwszej części zadania pokazała, że w czasie pełni pylenia dochodzi do zapłodnienia a potem do dwóch tygodni rozwoju zarodków w stadium globularnym, co potwierdzają wyniki uzyskane przez Wilson i wsp. (2008) przy realizacji krzyżowań z *L. angustifolius*. Wilson i wsp.

również wykazali, że u *L. albus* oraz *L. mutabilis* proces przebiegu osadzania się pyłku, jego kielkowania oraz docierania do zalążka w procesie samozapylenia w porównaniu do takich gatunków, jak *L. angustifolius*, *L. luteus* jest wolniejszy.

Przyjęta w niniejszym projekcie procedura pobierania zalążków ze strąków po maksymalnie możliwym czasie pozostawienia ich na roślinie (7–10–14 dni, potem strąki zaczynają opadać) wydaje się być słuszna, w kontekście otrzymanych kalusów w warunkach *in vitro*. Problemem do rozwiązania pozostaje odpowiedni dobór pożywki nieodzowny do konwersji szlaku komórek w kierunku morfo i organogenezy. Wyniki uzyskane przez Nadolską-Orczyk (1992) nad somatyczną embriogenezą potwierdzają konieczność prowadzenia wieloetapowej kultury w kontekście uzyskanych wyników w roku 2019. Potwierdziły to wyniki otrzymane w roku 2020, gdzie po zastosowaniu pulsacyjnej hodowli otrzymano zadawalający efekt, jeśli chodzi o regenerację tkanki kalusowej. Niestety nie udało się przekierować komórek na drogę różnicowania się i nie otrzymano roślin. Udało się ustabilizować tkanki kalusowe dla odmiany Emir. Zastosowanie prowadzenia hodowli pulsacyjnej odniosło pozytywny efekt w utrzymaniu w dobrej kondycji uzyskanych kalusów, zwłaszcza przy wykorzystaniu: B5+ 1NAA+ 2BA, B5 + 0,2 2,4D, B5+ 0,1 NAA+2BA +1mg TDZ naprzemiennie z B5.

Kluczową rolę w procesie gynogenezy mogą odgrywać zawarte w podłożu regulatory wzrostu, tak jak to miało miejsce, np. w przypadku *Psoralea corylifolia* L. MS (Chand i Sahrawat 2007) oraz przy prowadzeniu niniejszych badań nad *Lupinus angustifolius* L., gdzie po zmianie podłoża w 2019 w stosunku do 2018 roku uzyskano znacząco lepsze rezultaty. W roku 2020, gdzie materiał pochodził z pola do założenia doświadczenia, udało się zaindukować tworzenie kalusa, ale tempo zmian było dużo wolniejsze, a zalążki wyraźnie wykazywały się słabszą zdolnością do tworzenia tkanki kalusowej. Jak do tej pory u łubinu nie prowadzono badań nad skutecznością procesu gynogenezy. Natomiast proces gynogenezy wykorzystano skutecznie do indukcji haploidów u *Psoralea corylifolia* L. innego przedstawiciela z rodziny bobowatych. W obu doświadczeniach używano regulatorów wzrostu takich jak: 2,4-D, NAA, BA, GA3 – tylko nieco w innych połączeniach, oraz takich samych cukrów: sacharoza i maltoza. Różne było podłoże podstawowe, w przypadku *Psoralea corylifolia* L. używano pożywki MS (Chand i Sahrawat 2007) a w naszych badaniach głównie

B5 oraz MS z modyfikacjami. W doświadczeniu *Psoralea corylifolia* L. najlepsze efekty zaobserwowano na pożywce MS, która zawierała dodatek NAA, 2,4-D oraz BA, najslabsze wyniki uzyskano natomiast na pożywce MS z 2,4-D i BA. Można wnioskować, że dodatek NAA spowodował lepszą indukcję kalusa niż jego brak (Chand i Sahrawat, 2007). W doświadczeniu stwierdzono również, że dodanie BA i/lub ABA do pożywek, które zawierają niskie stężenie auksyn czyli NAA bądź 2,4-D sprzyja dojrzewaniu zarodków, przechodzą one bowiem ze stadium kulistego do liścienia (Chand i Sahrawat 2007). Zauważono także zależność między dodatkiem GA₃, a zwiększającą się częstotliwością kiełkowania zarodków, natomiast nie zaobserwowano tego w przypadku analizowanych obiektów łubinu wąskolistnego w niniejszym doświadczeniu. Podobne działanie do GA₃ miał wzmocnić dodatek maltozy, ale tak jak w poprzednim przypadku zależność ta nie została potwierdzona na przykładzie analizowanych genotypów łubinu.

Sam proces gynogenezy w przypadku łubinu wąskolistnego nie przyniósł jeszcze oczekiwanych wyników w postaci haploidalnych roślin. Gynogeneza może być przydatna do produkcji roślin haploidalnych u takich gatunków, u których nie sprawdza się androgeneza.

Zarówno materiał biologiczny w postaci kalusa wyprowadzony na drodze krzyżowania oddalonego jak i gynogenezy wymaga szeregu pasaży, zwłaszcza częstych w pierwszych 4 tygodniach. W obu technikach w zależności od roku badań podjęcie rozwoju tkanki kalusowej miało miejsce od dwóch do czterech tygodni, w kolejnych obserwacjach prowadzonych co tydzień kolejnych załączków ze zmianami nie przybywało. Zmiany częste podłoży są konieczne, ponieważ zaobserwowano szybkie przechodzenie komórek na szlak apoptozy i nie zawsze dawało się ten proces zahamować czy całkowicie odwrócić. Wykorzystanie pyłku obcego gatunku jest efektywniejsze w indukcji i rozwoju kalusa w porównaniu do wykorzystania samych załączków – gynogeneza. Analiza ekspresji genów z kalusa otrzymanego z krzyżowania oddalonego (Zadanie 3) niestety pokazała stosunkowo niską ekspresję genów odpowiedzialnych za embriogenezę, a dodatek regulatorów inhibował jej poziom. Indukcja haploidów u łubinu jest sprawą na pewno niełatwą, ale uzyskane wyniki zaczynają ukierunkowywać zakres i etapy dalszych w przyszłości badań.

Buschman-Loock A., Dambroth M., Menge-Hartmann U. (1992). Historical observation on interspecific crosses in the genus *Lupinus*. *Plant Breeding* 109: 82-95.

Chand S., Sahrawat A. K. (2007). Embryogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary culture of *Psoralea corylifolia*. *Biologia Plantarum* 51 (2): 223-228.

Davies S., Williams W. (1985). The rate of morphogenesis of embryos and seeds in four species of grain legumes. *Annals of Botany*, vol. 56, (4): 429-435.

Faluyi M. A., Williams W. (1981). Studies on the breeding system in lupin species a) self and cross compatibility in the three European lupin species b) percentage of out-crossing in *Lupinus albus*. *Z. Pflanzenzüchtung*: 233–239.

Filutowicz A., Kuźdowicz A. (1951). Mikrotechnika roślinna. PWRiL, Warszawa.

Galek R. (2010). Studies on the variability of some morphological and functional characters of *Lupinus* with particular consideration intra and interspecific hybrids. Monografie (Poland).

Jaranowski J. (1962). Fertilization and embryo development in the genus *Lupinus* Tourn. Part II. Fertilization and embryo development following reciprocal species hybridization. *Gen. Pol.* 3: 333–363.

Nadolska-Orczyk A. (1992). Somatic embryogenesis of agriculturally important lupin species (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. mutabilis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 28: 19-25'

Przyborowski A. J., Samborska – Ciana, Wiwart M. (1996). Intra- and interspecific pollination between *Lupinus albus* L., *Lupinus mutabilis* Sweet. and *Lupinus angustifolius* L. *J. Appl. Genet.* 37 (3): 261–275.

Przyborowski J. A. (2003). Pre- i postzygotyczne bariery przy krzyżowaniu wybranych gatunków z rodzaju *Lupinus*. *Rozprawy i Monografie.* 78: 1–53.

Williams W., Akhtar M. A., Faluyi M. (1980). Cross compatibility between European and American Lupin species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 81: 225-232.

Wilson, J. G., Clements, J. C., Quealy, J., Yang, H. (2008). Development of an interspecific hybridisation protocol for *Lupinus*. In *Lupins for health and wealth proceedings of the 12th International Lupin Conference*:14-18.

Charakterystyka procesu androgenezy u wybranych genotypów *L. angustifolius*

Materiałem roślinnym do badań nad indukcją androgenezy były dwie odmiany *L. angustifolius*: Karo (lata 2018–2019) i Graf (lata 2018–2020). Nasiona obu odmian wysiewano systematycznie w okresie od kwietnia do sierpnia, co 2–3 tygodnie bezpośrednio do gruntu. Odkażone pąki rozgniatano w sterylnych warunkach w niewielkiej ilości płynnej pożywki, a następnie przesączano przez nylonowy filtr o wielkości oczek 44 µm i trzykrotnie oczyszczano przez wirowanie. Analizy mikroskopowe wykonano (żywołność, obs. kultury) przy

wykorzystaniu mikroskopu mikroskopu odwróconego pola. W pąkach oceniono stadium rozwoju pyłku i jego barwność poprzez obserwację preparatów rozgniotowych i obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym.

W pierwszym roku badań (2018) w celu ustalenia optymalnego stadium rozwojowego mikrospor z kwiatostanów obydwu obiektów pobrano pąki kwiatowe o różnej długości w celu wytypowania takich, w których występują mikrospory Zebrane wyniki dotyczące analizy mikrosporogenezy wskazują że u łubinu wąskolistnego czynnikiem bardziej skorelowanym ze stadium rozwojowym mikrospory jest barwa pylnika, nie jak u innych gatunków, u których indukowano androgenezę – wielkość pąka kwiatowego (Dujis i in. 1992). Ponadto badania wykazały, że rozwój mikrospor w indywidualnym pąku jest niesynchroniczny. W pylnikach pobranych z indywidualnego pąka obserwowano różne stadia rozwojowe np. tetrazy, mikrospory i dojrzałe ziarna pyłku. Badania dotyczące wpływu szoku termicznego aplikowanego zarówno na kwiatostany (1 lub 3 dni w temperaturze 4°C) jak i mikrospory w kulturze (32°C lub 4°C na 1 lub 3 dni) wykazały, że pomimo zastosowania zróżnicowanych kombinacji doświadczenia (szoki temperaturowe, pożywki) w większości kultur obserwowano brak rozwoju mikrospor. Kalus uzyskano u odm Graf w kombinacji bez traktowania wstępnego kwiatostanów, gdzie kultura prowadzona była w pożywce MS i umieszczona na 3 dni w 4°C.

Dane literaturowe wskazują, że jedną z przyczyn trudności w indukcji androgenozy u strączkowych może być bardzo gruba egzyzna, uniemożliwiająca dalszy rozwój mikrospory (Bayliss i in. 2004). W roku 2019 przeprowadzono wstępne badania dotyczące osłabienia egzyny mikrospor poprzez trawienie enzymatyczne mieszaninami zawierającymi enzymy trawiące hemicelulozę i pektyny. Zastosowane mieszaniny w znacznym stopniu wpłynęły na zwiększenie liczby komórek splazmolizowanych (ok. 50%), w porównaniu z kontrolą (30%). Analizowano również wpływ składu pożywki (trichostatyna A, 2,4-D, kinetyna) oraz temperatury na indukcję androgenozy. W niniejszych badaniach zastosowanie 0,1 µM trichostatyny nie przyniosło pożądanego efektu. Podziały odnotowano najliczniej (0,9%) na pożywce 190/2 (1 mg/l 2,4D i 1 mg/l kinetyny) prowadzonej w stałej temperaturze 26°C. Wynik ten potwierdza wcześniejsze obserwacje u łubinu, gdyż na pożywce zawierającej 2,4-D i kinetynę obserwowano wytwarzanie nielicznych struktur prozarodkowych (proembryo) (Simioniuc i in. 2010). Zastosowanie

długotrwałego szoku termicznego (4°C/14 dni), na mikrospory w kulturze nie przyniosło pożądanego efektów, gdyż większość mikrospor nie wykazywała zmian morfologicznych nawet do 28 dnia kultury. Traktowanie mikrospor niską temperaturą najprawdopodobniej nie wpływa negatywnie na żywotność, gdyż jak pokazały nasze wyniki, spadek ten obserwowano również w nietraktowanej szokiem termicznym kontroli. Literatura z zakresu haploidyzacji roślin jasno wskazuje, że w prawidłowej kulturze, w tym czasie obserwuje się już występowanie wielokomórkowych agregatów (Custers 2003), czego w przeprowadzonym doświadczeniu praktycznie nie obserwowano. Analiza żywotności mikrospor w kulturze wykazała bardzo niski odsetek żywych komórek nieprzekraczającą 14% w pierwszej dobie kultury, a wynoszącą poniżej 7% w siódmej dobie kultury. Co nasuwa wniosek, że być może jedną z przyczyn oporności łubinu na indukcję androgenozy w kulturach mikrospor jest ich niska żywotność, której konsekwencją jest obserwowany bardzo niski odsetek podziałów. Przeprowadzona analiza histologiczna tkanki kalusowej uzyskanej z doświadczenia w roku 2018 ujawniła różnice na poziomie morfologii komórek oraz elementów wiązek przewodzących między kalusem żywym i zamierającym.

Artykuły dotyczące analizy żywotności pyłku u łubinu wąskolistnego i innych przedstawicieli gatunku (Conterato i in. 2006, Clements i in. 2012) wskazują na przydatność do tego celu acetokarminu oraz barwnika Aleksandra. Badania te były jednak prowadzone na pyłku pobranym z otwartych kwiatów, a więc pyłku dojrzałym. Analiza danych literaturowych z zakresu indukcji androgenozy w kulturach mikrospor u *Lupinus* spp. (Ormerod i Caligari 1994; Bayliss i in. 2004; Croser i in. 2006; Simioniuc i in. 2010) wskazała, że żywotność mikrospor w tych pracach nie była monitorowana. W związku z powyższym brak jest doniesień o metodach oceny żywotności pyłku u łubinu wąskolistnego szczególnie na wczesnych etapach jego rozwoju tj. podczas mikrogametogenezy. W celu opracowania takiej metody w roku 2020 z pąków kwiatowych z dwóch grup wielkości, które odpowiadały stadium rozwoju pyłku (t.j. 4–6 mm przewaga mikrospor, 8–10 mm przewaga dojrzałego pyłku) wykonano preparaty rozgniotowe, które barwiono pięcioma zróżnicowanymi barwnikami (acetokarmin, barwnik Alexandra, FDA), tetrazolina i błękit Evansa). Badania wykazały, że mikrospory łubinu przed ich przekształceniem się w dojrzały pyłek charakteryzują się etapem braku barwności przy użyciu

tradycyjnych barwników oceny żywotności pyłku. Wyjątek stanowił barwnik fluorescencyjny FDA, po zastosowaniu, którego można było dokonać właściwego rozróżnienia. Natomiast w przypadku komórek pobranych z pylników znajdujących się w pąkach z drugiej klasy wielkości wszystkie zastosowane barwniki umożliwiały rozróżnienie pyłku żywego i martwego. Na podstawie tych wyników do dalszych badań żywotności mikrospor wytypowano FDA. Analiza żywotności mikrospor badanej odmiany łubinu barwnikiem FDA wykazała zaskakująco niską ich żywotność, która po izolacji i umieszczeniu w pożywce wynosiła kilka do kilkunastu%. W porównaniu do żywotności mikrospor innych gat. są to wartości dość niskie, np. u kapusty żywotność mikrospor po izolacji wynosiła 45–48% (Winarto i Teixeira da Silva 2011), 30–60% u kalafiora (Bhatia i in. 2016), czy 20–60% u pszenżyta (Żur i in. 2018). W roku 2019 po raz pierwszy przeprowadzono obserwacje żywotności mikrospor w kulturze. Uzyskane wyniki wskazały bardzo niski odsetek żywych mikrospor (poniżej 10%), już dobę po ich izolacji i zawieszeniu w pożywkach indukujących androgenezę. Postawiono więc hipotezę, że potencjalną przyczyną niskiej żywotności może być stres związany z odkażaniem materiału roślinnego. W związku z tym w bieżącym roku założono doświadczenia, w których część pąków przeznaczonych do założenia kultury została odkażana wg standardowej procedury stosowanej dotychczas t.j pąki otwierano poprzez odchylenie okwiatu, ze względu na konieczność oceny stadium rozwoju pylników i w takiej formie poddawano procedurze odkażania. Druga część pąków pozostała poddana odkażaniu w formie nienaruszonej. Uzyskane wyniki wskazały, że otwieranie pąków podczas odkażania wpływa negatywnie na kondycję mikrospor, gdyż żywotność w pierwszej dobie kultury była ponad trzykrotnie niższa w porównaniu do żywotności mikrospor izolowanych z pąków nienaruszonych. W związku z tym tegoroczne badania skupione były na dalszych poszukiwaniach odpowiedniego sposobu prowadzenia kultury umożliwiającego indukcję podziałów mikrospor. Analizowano wpływ pożywki dwuwarstwowej na rozwój mikrospor uwolnionych z pylników jak i całych pylników. System pożywki dwuwarstwowej nie był do tej pory testowany do indukcji androgenozy u łubinu. Obecność węgla aktywowanego w dolnej warstwie pożywki dwuwarstwowej nie wpłynęła znacząco na mikrospory w kulturze. Uzyskane wyniki wskazują, że mikrospory prowadzone w systemie dwuwarstwowym w pierwszej dobie kultury

zachowują żywotność na poziomie ok. 11–16% w zależności od pożywki, co nie różni się znacznie od wyników uzyskanych w roku 2019 w klasycznej kulturze zawieszinowej. Obserwacje kultury wykazały, że większość mikrospor, niezależnie od zastosowanej pożywki nie wykazywała zmian morfologicznych nawet do 21 dnia kultury. Odnotowano pojedyncze podziały komórkowe, które tylko w jednym przypadku postępowały dalej doprowadzając do otrzymania kalusa. Kultura całych pylników w systemie dwuwarstwowym zaowocowała otrzymaniem kalusa. Rozwój kalusa obserwowano po zastosowaniu obu badanych pożywek. Otrzymane wyniki wskazują, że powodem braku pozytywnej odpowiedzi androgenicznej u łubinu wąskolistnego może być niska żywotność mikrospor od samego początku założonej kultury. Należy szukać czynników, które na etapie stresów odkażania, izolacji i tworzenia kultury nie wpłyną negatywnie na izolowane mikrospory i pozwolą zachować ich żywotność. Otrzymane wyniki potwierdzają doniesienia literaturowe, że indukcja androgenozy u łubinu wąskolistnego w kulturach mikrospor jest niezwykle trudna. Problem ten nie dotyczy jednak tylko tego gatunku, ale całej rodziny. Pomimo licznych prób, wyniki wskazują na otrzymanie pojedynczych agregatów lub prozarodków u gatunków z rodziny *Fabaceae* (Ormerod i Caligari 1994; Bayliss i in. 2004; Croser i in. 2006). Jedynie Ochatt i wsp. (2009) donosi o otrzymaniu 3 roślin z 23 badanych gatunków w rodzinie *Fabaceae* tj. u *Pisum sativum*, *Lathyrus sativus* i *Medicago truncatula*.

- Bayliss K. L., Wroth J. M., Cowling W. A. (2004) Pro-embryos of *Lupinus* spp. produced from isolated microspore culture. *Aust J Agric Res* 55:589–593.
- Bhatia R., Dey S. S., Sood S. (2016). Optimizing protocol for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid development in different maturity groups of cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis* L.) in India. *Euphytica* 212, 439–454.
- Clements J. C., Wilson J., Sweetingham M. W., Quealy J., Francis G. (2012). Male sterility in three crop *Lupinus* species. *Plant breeding* 131:155–163.
- Conterato I. F., Schifino-Wittmann M. T. (2006). New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (*Leguminosae*): contributions to taxonomic and evolutionary studies. *Bot J Linn Soc* 150:229–240.
- Croser J. S., Lulsdorf M. M., Davies P. A., Clarke H. J., Bayliss K. L., Mallikarjuna N., Siddique K. H. M. (2006). Toward doubled haploid production in *Fabaceae*: progress, constraints, and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25/2:139–157.

- Custers, J. B. M. (2003). Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds) Doubled haploid production in crop plants. Springer, Dordrecht, 2003: 185-193. 27.
- Duijjs J. M. G. J., Voorrips R. E., Visser D., Custers, J. B. M. (1992). Microspore culture is successful in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 60:45–55.
- Ochatt S., Pech C., Grewal R., Conreux C., Lulsdorf M., Jacas L. (2009). Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (*Fabaceae*). *J Plant Physiol* 166:1314–1328.
- Ormerod A. J., Caligari P. D. S. (1994). Anther and microspore culture of *Lupinus albus* in liquid culture medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 36: 227–236.
- Simioniu D., Burlacu-Arsene M. C., Morariu A., Lipşa F. D. (2010). Induction of the embryogenesis process in anther and microspores cultures at the *Lupinus albus* species. *Lucrări Ştiinţifice ser Agronomie* 53 (1): 60–63
- Winarto B., Teixeira da Silva J. A. (2011). Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107: 305–315.

Charakterystyka genów morfogenicznych w kalusach *L. angustifolius*

W roku 2018 do testowania markerów SNP wykorzystano 20 rekombinowanych linii wsobnych – RIL powstałych przez skrzyżowanie odmiany ‘Emir’ oraz linii LAE-1. Zastosowano genotypowanie markerami SNP techniką KASP (Kompetitive allele specific PCR). W kolejnym roku 2019 wykonano analizę porównawczą ekspresji (transkryptomów) techniką RNAseq dla kalusa ‘Graf’. W roku 2020 badano zmiany ekspresji kluczowych genów morfogenicznych na różnych pożywkach na których inkubowane były eksplantaty kalusów ‘Graf’ oraz ‘Emir’.

Pierwszym etapem prac realizowanym w roku 2018 było opracowanie zestawu markerów SNP, który pozwoliłby w jednoznaczny sposób identyfikować rośliny haploidalne. W tym celu przetestowano 80 markerów SNP, które wykazywały wysoką heterozygotyczność w kolekcji łubinu wąskolistnego KGHRiN. Następnie przetestowano wybrane markery na 20 liniach RILs. Otrzymane wyniki pozwoliły na ocenę stopnia homozygotyczności wybranych linii. Na 20 analizowanych linii 18 wykazało pełną homozygotyczność w 80 badanych locii. Dwie analizowane linie wykazały heterozygotyczność w trzech (linia EL/02/1/53) oraz pięciu (linia EL/02/1/7) analizowanych locci. Dalsze analizy bioinformatyczne pozwoliły na wytypowanie 46 z wstępnie wybranych 80 markerów w taki sposób aby lokalizowały się w odpowiednich fragmentach chromosomów. Najwięcej markerów

zlokalizowanych było na chromosomie NLL-16 – 9 markerów. Na ośmiu chromosomach zlokalizowano po jednym markerze (NLL-01, NLL-02, NLL-03, NLL-04, NLL-07, NLL-09, NLL-10, NLL-18). Kolejnym krokiem było zaprojektowanie sond FISH, które obejmowały swoją sekwencją pozycje wytypowanych markerów SNP. Ostatnim etapem prac w roku 2018 była izolacja całkowitego RNA z kalusa odmiany Graf pochodzącego z mikrospor oraz generowanych z tkanek somatycznych (kontrola) metodą *in vitro*. W roku 2019 wykonano sekwencjonowanie transkryptomów wyizolowanych w poprzednim roku techniką RNAseq na platformie HiSeq PE150. Następnie wykorzystując potoki analityczne i narzędzia bioinformatyczne przeprowadzono ekspresję porównawczą, w celu wskazania genów różniących transkrypty kalusa pochodzącego z mikrospor i kalusa z tkanek somatycznych. Uzyskane wyniki sekwencjonowania transkryptomu wskazują na ekspresję genów wskazywanych w literaturze, jako związane z procesem somatycznej embriogenezy (Ouakfaoui i in. 2010; Magnani i in. 2017). Uzyskane wyniki wskazują, iż w tkankach kalusa uzyskanego z mikrospor z czterech głównych czynników transkrypcyjnych regulujących proces somatycznej embriogenezy określanych wspólnie mianem LAFL (Jia i in. 2014) ekspresji ulega jedynie LEC1. Jest to także jedyny gen z opisywanych w literaturze, jako zaangażowany w procesy somatycznej embriogenezy, u którego stwierdzono istotną różnicę między kalusem kontrolnym a kalusem pochodzącym z kultur mikrospor. Pozostałe czynniki transkrypcyjne z grupy LAFL (LEC2, FUSCA3, ABI3) nie miały ekspresji w badanym materiale. Jednakże stwierdzono ekspresję dla genu AGL15, który jest bezpośrednio kontrolowany przez LEC2 (Braybrook i Harada 2008). Wynik ten może sugerować, iż w badanych tkankach na wcześniejszym etapie (kilka lub kilkadziesiąt godzin) przed pobraniem materiału do izolacji RNA geny LEC2 oraz potencjalnie pozostałe geny z grupy LAFL wykazywały ekspresję. Uzyskane wyniki analizy ekspresji różnicowej (DE) wykazały różny poziom ekspresji w analizowanym materiale jedynie dla 407 genów. W porównaniu do wyników podobnych eksperymentów u innych roślin (Yang i in. 2012; Elbl i in. 2015; Wu i in. 2015) uzyskana liczba genów z istotnie statystycznie różną ekspresją jest bardzo mała. Wskazuje to na bardzo podobny poziom ekspresji genów w badanym materiale. Podobne wnioski można wyciągnąć analizując współczynniki korelacji pomiędzy badanymi próbkami. Tak wysokie podobieństwo ekspresji genów pomiędzy

kalusem z mikrospor, a kontrolą (kalusem uzyskanym klasycznie) wskazuje, iż na wczesnych etapach rozwoju kalus uzyskany z mikrospor nie różni się od kalusa uzyskanego klasycznie. Uzyskane wyniki wskazują, iż konieczne jest dokładniejsze zbadanie w kilku punktach czasowych kalusa uzyskanego z mikrospor. We wczesnym etapie kalus ten nie wykazuje istotnych różnic w stosunku do kalusa kontrolnego. Możemy zaobserwować w nim ekspresję genów inicjujących organogenezę np. genów STM, ANT, AS1, KAN2 (Magnani i in. 2017) na poziomie zbliżonym do kalusa kontrolnego. Obserwowane na późniejszym etapie zamieranie musi być spowodowane włączeniem jakiegoś nieznanego do tej pory mechanizmu hamującego ekspresję genów związanych z embrio i morfogenezą i prowadzącego do śmierci komórek. W przyszłości powinna zostać także zbadana dynamika zmian ekspresji genów związanych z embriogenezą takich jak LEC1, BBM, AS1, KAN2 w czasie proliferacji kalusa z mikrospor. Analizy takie powinny pomóc we wskazaniu punktu czasowego w którym ekspresja zaczyna spadać i jakieś nieznane mechanizmy komórkowe uruchamiają procesy związane z śmiercią komórkową. Przeprowadzone analizy GO wskazały łącznie 8 numerów GO nadreprezentowanych w zbiorze genów z różną ekspresją w tkankach kalusa z mikrospor i tkankach kontrolnych. Na temat żadnego z zidentyfikowanych numerów GO w literaturze nie ma doniesień, aby był związany z procesami somatycznej embriogenezy, organogenezy lub procesami zamierania komórek. Na podstawie wyników RNAseq oraz danych literaturowych w roku 2020 wybranych zostało 14 ortologów genów kluczowych w procesie morfogenezy. Zbadany został wpływ składu pożywki na poziome ekspresji tych genów u dwóch kalusów łubinu wąskolistnego. Pierwszy kalus został otrzymany w wyniku krzyżowania oddalonego (odmiana Emir), a drugi w wyniku androogenezy (Graf). Ekspresja genów zaangażowanych w procesy embriogenezy została dotychczas dość dobrze poznana u roślin modelowych (Hecht i in. 2001). Brak jest jednak doniesień na temat ekspresji genów z tej grupy w kalusach, a także wpływu składników pożywki i wieku eksplantatów. W związku z tym zaproponowane badania są pierwszym tego typu opracowaniem określającym wpływ wieku eksplantatów oraz składu pożywki. Większość opracowań skupia się na zmianach i wzajemnych interakcjach poszczególnych genów w trakcie procesu somatycznej embriogenezy (Yang i Zhang 2010). Dość dobrze poznany został indukujący wpływ roślinnych hormonów wzrostu takich

jak auksyny czy kwas abscysynowy na ekspresję kluczowych genów – inicjatorów procesu somatycznej embriogenezy: ANT, STM, AGL15, SERK, LEC czy LEA (Chugh i Khurana 2002). Brak jest jednak opracowań na temat wpływu składu pożywki (np. stężenie regulatorów) na poziom ekspresji tych genów. Niewiele prac było dotąd prowadzonych na tkankach kalusa. Prace prowadzone na tkankach kalusa dobrze proliferującej linii kukurydzy Hi II prowadzone techniką mikromacieżową wykazały zmiany w ekspresji ponad 12 000 genów. W procesie inicjacji somatycznej embriogenezy zmianę ekspresji wykazało ponad 1 000 genów, w tym największą pulę stanowiły geny o nieznannej funkcji, a także geny scharakteryzowane jako związane z podstawowym metabolizmem (Che i in. 2006). Wyniki te nie odnoszą się jednak do składów pożywek czy stężenia zastosowanych regulatorów wzrostu na poziom ekspresji badanych genów. W naszych dotychczasowych badaniach nie udało się zainicjować z sukcesem procesu embriogenezy i tworzenia zarodków haploidalnych. Uzyskane wyniki wskazują, iż istnieją przeszkody uniemożliwiające przejście kalusa z proliferacji w proces embriogenezy. Wszystkie badane geny, kluczowe dla inicjacji procesu somatycznej embriogenezy, wykazały spadek ekspresji po dłuższej inkubacji kalusów (Emir, Graf) na zastosowanych pożywkach. Wyniki te sugerują, iż w zastosowanych pożywkach obecne były jakieś składniki, które inhibowały ekspresję tychże genów. Inną możliwą przyczyną może być niewłaściwy dobór regulatorów wzrostu lub ich niewłaściwe stężenie. Takie wyniki niestety nie pozwalają na wybór lub choćby wskazanie kierunku, w którym można byłoby udoskonalać wykorzystane pożywki. Nie mniej jednak, na podstawie uzyskanych wyników udało się pogrupować badane geny w dwie grupy. Ekspresja genów w każdej z grup jest ze sobą skorelowana. Ponieważ geny w każdej grupie reagują podobnie na badane pożywki w dalszych badaniach przesiewowych możliwe będzie przeanalizowanie przedstawicieli każdej z grup. Dzięki temu możliwe będzie przetestowanie większej ilości wariantów pożywek, co z kolei podniesie szanse na opracowanie w przyszłości pożywki, która nie będzie wpływała hamująco na ekspresję genów związanych z inicjacją procesu embriogenezy.

Braybrook S. A., Harada, J. J. (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends in plant science*, 13(12), 624-630.

Chugh A., Khurana P. (2002). Gene expression during somatic embryogenesis. *Curr Sci*, 83(6), 715-730.

Elbl P., Lira B. S., Andrade S. C. S., Jo, L., dos Santos A. L. W., Coutinho L. L., Rossi, M. (2015). Comparative

- transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 903-915.
- El Ouakfaoui S., Schnell J., Abdeen A., Colville A., Labbé H., Han, S. Miki, B. (2010). Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant molecular biology*, 74(4-5), 313-326.
- Hecht V., Vielle-Calzada J. P., Hartog M. V., Schmidt E. D., Boutilier K., Grossniklaus, U., de Vries S. C. (2001). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127 (3), 803–816.
- Jia H., Suzuki, M., McCarty D. R. (2014). Regulation of the seed to seedling developmental phase transition by the LAFL and VAL transcription factor networks. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(1), 135-145.
- Magnani E., Jiménez-Gómez J. M., Soubigou-Taconnat L., Lepiniec L., Fiume E. (2017). Profiling the onset of somatic embryogenesis in Arabidopsis. *BMC genomics*, 18(1), 1-12.
- Wu X. M., Kou, S. J., Liu Y. L., Fang Y. N., Xu Q., Guo W. W. (2015). Genomewide analysis of small RNA s in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: micro RNA-and si RNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. *Plant Biotechnology Journal*, 13(3), 383-394.
- Yang X., Zhang X., Yuan D., Jin F., Zhang Y., Xu J. (2012). Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC plant biology*, 12(1), 110.
- Yang X., Zhang X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29 (1), 36–57.

Występowanie dotychczas niemonitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce

The occurrence of previously unmonitored viruses (HpLV, ArMV) and viroids (HpSVd, AFCVd, CBCVd) in hop gardens in Poland

Marcin Przybyś✉, Urszula Skomra, Grażyna Korbecka-Glinka

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: mprzybys@iung.pulawy.pl

Słowa kluczowe: AFCVd, ArMV, CBCVd, chmiel, HpLV, HpSVd, wirusy

Cel prowadzonych badań

W roku 2018 podjęto badania dotyczące występowania dotychczas niemonitorowanych wirusów i wiroidów na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce. Celem badań było gromadzenie próbek chmielu z różnych rejonów uprawy chmielu, opracowanie metod molekularnych opartych o odwrotną transkrypcję i reakcję amplifikacji DNA do niezależnego wykrywania badanych patogenów oraz ocena występowania na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce: wirusa utajonego chmielu (HpLV), wirusa mozaiki gęsiówki (ArMV), wiroida karłowatości chmielu (HSVd), wiroida wyboistości jabłek (AFCVd) oraz wiroida pęknięcia kory cytrusowych (CBCVd). W kolejnych latach opracowano metody diagnostyczne do jednoczesnego wykrywania wirusów HpLV i ArMV oraz trzech wiroidów: HSVd, AFCVd, CBCVd. W celu badania wiromu chmielu przygotowano dziesięć bibliotek DNA do sekwencjonowania NGS, przeprowadzono ich sekwencjonowanie oraz przeprowadzono analizę bioinformatyczną uzyskanych sekwencji. Wszystkie założone cele zostały osiągnięte.

Materiały i Metody

Próbki chmielu gromadzono z plantacji produkcyjnych zlokalizowanych we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce: lubelskim, wielkopolskim, dolnośląskim. Próbki pobierano zarówno z odmian typu goryczkowego jak i aromatycznego. Dodatkowo gromadzono próbki z kolekcji odmian chmielu utrzymywanej w IUNG-PIB w Puławach. Próbki gromadzono 3-krotnie w trakcie sezonu wegetacyjnego,

co wynikało z faktu, iż niektóre patogeny są możliwe do wykrycia tylko w określonych stadiach rozwojowych rośliny (Tsai i in., 2012; Wetzel i in., 2002; Ziegler i in., 2014). Pierwszy termin obejmował okres naprowadzania roślin chmielu na przewodniki, kolejny obejmował fazę kwitnienia, a ostatni fazę dojrzałości. Ogółem zgromadzono 1809 próbek chmielu pochodzących z 33 plantacji o łącznej powierzchni 55 ha.

Z próbek chmielu izolowano RNA z wykorzystaniem zestawów do izolacji RNA – RNeasy PowerPlant Kit (Qiagen), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Wyizolowane RNA doczyszczano z pozostałości DNA za pomocą zestawu DNase Max (Qiagen). Opracowane molekularne metody detekcji poszczególnych patogenów, oparte były o reakcję odwrotnej transkrypcji i amplifikację DNA (RT-PCR). W celu detekcji HpLV amplifikowano 5'-koniec genomu wirusa i gen kodujący metylotransferazę, który jest silnie konserwowany ewolucyjnie (Schuman, 2002). W celu wykrycia ArMV amplifikowano wysoce konserwatywny region kodujący białko płaszczka (CP), a w przypadku detekcji wiroidów amplifikowano pełne genomy patogenów. Dodatkowo opracowano i zoptymalizowano warunki reakcji multiplex PCR dla jednoczesnego wykrywania wiroidów HSVd, CBCVd, AFCVd z kontrolą wewnętrzną RNA roślinnego oraz jednoczesnego wykrywania wirusów HpLV i ArMV z kontrolą wewnętrzną. Do detekcji wszystkich wiroidów: HSVd, CBCVd, AFCVd wykorzystano startery, które amplifikowały pełne genomy patogenów (Sano i in., 2001, Bernad i Duran-Vila, 2006, Sano i in., 2008). W efekcie



uzyskano amplikony o długościach odpowiednio: 303 pz, 284 pz i 382 pz. Do detekcji HpLV wykorzystano startery, które amplifikowały 5'-koniec genomu tego wirusa (1116 pz) (Ziegler i in. 2014), zaś do wykrywania ArMV amplifikowano region kodujący białko płaszczka (CP). W efekcie uzyskano amplikony o długości 213 pz.

W celu przygotowania bibliotek DNA do sekwencjonowania izolowano RNA z próbek chmielu. Następnie na drodze elektroforezy kapilarnej z wykorzystaniem Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies) wyznaczano RIN (RNA Integrity Number). Do kolejnych etapów wykorzystywano próbki o $RIN \geq 7$. W celu pozbycia się z próbek rybosomalnego RNA (rRNA) przeprowadzono deplecję rRNA z wykorzystaniem zestawu TruSeq (Illumina). Próbki po deplecji rRNA oczyszczano za pomocą kulek magnetycznych RNAClean XP (Beckman Coulter). Następnie prowadzono fragmentację enzymatyczną cząsteczek. Kolejnym krokiem była synteza pierwszej nici cDNA z wykorzystaniem odwrotnej transkryptazy SuperScript III oraz synteza drugiej nici cDNA w celu uzyskania dwuniciowego cDNA (ds cDNA). Uzyskane ds cDNA posiadające tępe końce poddawano 3' adenyacji, w celu wytworzenia lepkich końców. Następnie prowadzono ligację adapterów, które zawierały sekwencje nukleotydowe znakujące poszczególne próbki DNA oraz umożliwiające im przyłączenie się do płytki (flow cell) podczas procesu sekwencjonowania. Aby reakcja sekwencjonowania przebiegała w sposób wydajny DNA z przyłączonymi adapterami wzbogacano w ograniczonej reakcji PCR. W celu oczyszczenia produktów PCR i jednocześnie normalizacji ich stężeń wykorzystano kulki magnetyczne AMPure XP. Uzyskane biblioteki przed sekwencjonowaniem poddano ocenie jakościowej i ilościowej. Ocenę jakościową prowadzono metodą elektroforezy kapilarnej (Bioanalyzer 2100 Agilent Technologies). Uzyskane wyniki umożliwiły ocenę rozkładu wielkości fragmentów DNA w przygotowanych bibliotekach. Pomiar stężenia uzyskanych bibliotek określano fluorymetrycznie (Quantus (Promega)). Ogółem przygotowano 10 bibliotek DNA. Biblioteki po walidacji jakościowej i ilościowej poddawano normalizacji stężeń i poddawano denaturacji. Tak uzyskane biblioteki z 5% dodatkiem kontroli wewnętrznej PhiX (Illumina) sekwencjonowano. Proces sekwencjonowania ustalano w programie Illumina Experiment Manager. Wykorzystywano pojedyncze indeksowanie próbek. Parametry odczytu ustalono na 2 x 76 cykli + 6 cykli dla odczytu indeksów. Uzyskane surowe dane w postaci plików fastq były

wstępnie filtrowane w programie Trimmomatic ver. 0.39. Oczyszczone odczyty były przeszukiwane pod kątem występowania sekwencji wirusowych i wiroidowych z wykorzystaniem programu VirusDetect ver. 1.7. Składanie kontigów przez program VirusDetect łączy ze sobą etap składania kontigów *de novo* wykorzystując do tego celu pakiet Velvet oraz mapowania do sekwencji referencyjnych pochodzących z GenBanku – pakiet bwa. Głębokość sekwencjonowania określano za pomocą pakietu SAMtools.

Wyniki

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono występowanie na terenie Polski przypadków porażenia roślin chmielu przez utajony wirus chmielu (*Hop latent virus*, HpLV) oraz wiroid karłowatości chmielu (*Hop stunt viroid*, HSVd). Występowanie wirusa HpLV stwierdzono we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce (tab. 1). Na terenie lubelskiego i wielkopolskiego rejonu uprawy chmielu występowanie HpLV stwierdzono na odmianach Marynka, a w rejonie dolnośląskim na odmianach Hallertau Tradition i Magnum. HpLV wykryto w próbkach gromadzonych w drugim i trzecim terminie. Występowanie HSVd stwierdzono, tylko w wielkopolskim rejonie uprawy chmielu, na jednej plantacji produkcyjnej na odmianie Magnum. Podobnie jak w przypadku HpLV, HSVd wykryto w próbkach gromadzonych w drugim i trzecim terminie. Ogółem HpLV wykryto w jedenastu badanych próbkach, co stanowiło 0,6% wszystkich próbek, a obecność HSVd w dwóch próbkach. W żadnej z badanych próbek nie stwierdzono obecności ArMV, AFCVd i CBCVd.

W trakcie prowadzonych badań przygotowano 10 bibliotek DNA do sekwencjonowania wiromu chmielu. Biblioteki 1_2019, 2_2019, 3_2019 oraz 1_2020, 2_2020, 3_2020 obejmowały próbki chmielu, w których w latach 2018–2019 potwierdzono obecność wirusa lub wiroida. Biblioteki 4_2019, 5_2019 oraz 4_2020, 5_2020 obejmowały próbki, w których nie wykryto żadnego z badanych patogenów metodą RT-PCR, ale wykazujących nietypowe objawy chorobowe. W efekcie przeprowadzonych analiz bioinformatycznych jedynie w bibliotekach z potwierdzoną metodą RT-PCR obecnością badanych patogenów, wykryto poprzez sekwencjonowanie NGS obecność sekwencji wirusowych HpLV lub HSVd (tab. 2). Nie stwierdzono infekcji mieszanych. W żadnej z bibliotek nie stwierdzono sekwencji pochodzących od ArMV, AFCVd, CBCVd. Na podstawie porównania stopnia homologii sekwencji HpLV w stosunku do sekwencji

referencyjnej oraz do siebie nawzajem stwierdzono, że izolaty HpLV pochodzące z różnych rejonów kraju wykazują duże podobieństwo do siebie oraz do sekwencji referencyjnej. Chociaż kilka badań opartych na NGS wykazało identyfikację znanych lub nowych wirusów u wielu gatunków roślin (Barba i in., 2014; AlRwahnih i in., 2015; Roossinck, 2016) przeprowadzone badania nie wykazały występowania innych wirusów i wiroidów.

Wnioski

1. Opracowane w ramach zadania metody diagnostyczne pozwalają na szybkie i wydajne testowanie materiału roślinnego zarówno na każdy z badanych patogenów osobno jak i jednocześnie oznaczanie dwóch wirusów lub trzech wiroidów z kontrolą wewnętrzną (multiplex PCR)
2. Występowanie HpLV na plantacjach produkcyjnych stwierdzono we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce
3. HSVd wykryto na jednej plantacji produkcyjnej w rejonie wielkopolskim
4. Nie stwierdzono występowania ArMV, AFCVd i CBCVd na polskich plantacjach chmielu
5. Uzyskane wyniki wskazują, że największym zagrożeniem upraw chmielu w Polsce są HpLV i HSVd
6. Zastosowanie zoptymalizowanego protokołu umożliwi uzyskanie bibliotek do sekwencjonowania NGS
7. Patogeny pochodzące z różnych rejonów polski różniły się w nieznacznym stopniu od siebie
8. Podczas analizy bioinformatycznej wiromu chmielu nie stwierdzono obecności innych, nie objętych badaniami sekwencji wirusowych, bądź wiroidowych.

Osiągnięcia projektu

W ramach realizacji zadania określono występowanie w Polsce wirusów (HpLV i ArMV) oraz wiroidów (CBCVd, HSVd, AFCVd). Opracowano protokoły niezależnego wykrywania badanych patogenów oraz protokoły multiplex RT-PCR dla jednoczesnego wykrywania wiroidów (CBCVd, HSVd, AFCVd) oraz jednoczesnego wykrywania wirusów (HpLV i ArMV). Opracowane metody multiplex-RT-PCR zostały wdrożone do rutynowego wykorzystania podczas prac badawczych prowadzonych w IUNG-PIB. Ponadto uzyskano i przeprowadzono analizy bioinformatyczne wiromu chmielu.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

- Przybyś M., Skomra U., Korbecka-Glinka G. 2019. Wiroidy HSVd, CBCVd, AFCVd – nowe zagrożenia dla uprawy chmielu w Polsce. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”, Zakopane, 5–8.02.2019 r. – poster
- Przybyś M. Występowanie dotychczas niemonitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce. Konferencja sprawozdawcza z realizacji zadań na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, Skierniewice, 12.12.2019 r. – poster
- Przybyś M. Nowe patogeny wirusowe – zagrożenie dla uprawy chmielu w Polsce? Konferencja naukowa „Innowacyjne rozwiązania wspierające produkcję chmielu zgodnie z zasadami integrowanej ochrony roślin” Puławy, 2018 – referat
- Przybyś M. Występowanie dotychczas niemonitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce. Konferencja sprawozdawcza z realizacji zadań na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej. Skierniewice, 18.12.2018 r. – referat

Publikacje

- Przybyś M. Incidence of viruses and viroids in Polish hop garden. 2020. Polish Journal of Agronomy 43
- Przybyś M., Skomra U., Korbecka-Glinka G. 2019. Występowanie dotychczas niemonitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce. Biuletyn IHAR; 286:371–374.
- Przybyś M., Skomra U., Korbecka-Glinka G. 2019. Wiroidy HSVd, CBCVd, AFCVd – nowe zagrożenia dla uprawy chmielu w Polsce. Biuletyn IHAR. 285: 319–320.

Literatura

- AlRwahnih, M., Daubert, S., Golino, D., Islas, C., Rowhani, A. (2015). Comparison of next-generation sequencing versus biological indexing for the optimal detection of viral pathogens in grapevine. *Phytopathology* 105, 758–763.
- Barba, M., Czosnek, H., Hadidi, A. (2014). Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses* 6, 106–136.
- Bolger, A. M., Lohse, M., Usadel, B. (2014). Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina Sequence Data. *Bioinformatics*, btu170.
- Bernad, L., Duran-Vila, N. (2006). A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular Cellular Probes*, 20 (2): 105–113
- Roossinck, M. J. (2016). Deep sequencing for discovery and

evolutionary analysis of plant viruses. *Virus Res.*

Sano, T., Isono, S., Matsuki, K., Kawaguchi-Ito, Y., Tanaka, K., Kondo, K.-i., i in., (2008). Vegetative propagation and its possible role as a genetic bottleneck in the shaping of the apple fruit crinkle viroid populations in apple and hop plants. *Virus Genes*, 37: 298-303

Sano T., Mimura R., Ohshima K. (2001). Phylogenetic analysis of hop and grapevine isolates of hop stunt viroid supports a grapevine origin for hop stunt disease. *Virus Genes*. 22(1):53-59.

Shuman, S. (2002). What messenger RNA capping tells us about eukaryotic evolution. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3:619–625.

Tsai, C. W., Daugherty, M. P., Almeida, R. P. P. (2012). Seasonal dynamics and virus translocation

Wetzel, T., Jardak, R., Meuniera, L., Ghorbel, A., Reustle, G. M., Krczal, G. (2002). Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*, 101(1-2):63-69.

Ziegler, A., Kawka, M., Przybys, M., Doroszewska, T., Skomra, U., Kastirr, U., Matoušek, J., Schubert, J. (2014). Detection and molecular analysis of Hop latent virus and Hop latent viroid in hop samples from Poland, *Journal für Kulturpflanzen*, 66 (7). S. 248–254.

Tabela 1

Występowanie wirusów i wiroidów na plantacjach chmielu.

Region	Patogen					
	HpLV			HSVd		
	Odmiana	WNP	próbki	Odmiana	WNP	próbki
Lubelski	Marynka	1	3		0	0
Wielkopolski	Marynka	1	2	Magnum	1	2
Dolnośląski	Hallertau Tradition	1	2		0	0
	Magnum	1	2			
	Razem	4	9		1	2

WNP – liczba plantacji na jakiej stwierdzono występowanie patogenu.

Tabela 2

Wirom chmielu.

Biblioteka	HpLV				HSVd			
	Pokrycie (%)	Liczba kontigów	Głębokość	Homologia (%)	Pokrycie (%)	Liczba kontigów	Głębokość	Homologia (%)
1_2019	95,4	24	9,8	99,32	-	-	-	-
2_2019	79,3	30	4,5	99,44	-	-	-	-
3_2019	96,2	17	12	98,87	-	-	-	-
4_2019	-	-	-	-	-	-	-	-
5_2019	-	-	-	-	-	-	-	-
1_2020	80,1	6	14	99,56	-	-	-	-
2_2020	69,73	21	15	99,54	-	-	-	-
3_2020					98,4	23	38	99,23
4_2020	-	-	-	-	-	-	-	-
5_2020	-	-	-	-	-	-	-	-

„- „ – brak wykrytych sekwencji badanych patogenów, pokrycie – procent sekwencji referencyjnej z GenBanku, która jest pokryta przez złożone i wyrównane kontigi, liczba kontigów – liczba kontigów złożonych w odniesieniu do próbki, które będą wyrównywane do sekwencji referencyjnej, głębokość – średnia ogólna liczba opisująca ile razy każdy nukleotyd sekwencji referencyjnej jest pokryty przez sekwencje zidentyfikowane w próbce, homologia – średni procent identycznych nukleotydów jak w sekwencji referencyjnej wszystkich kontigów dopasowanych do tej sekwencji.

Identyfikacja genów związanych z ekspresją zimotrwałości i tolerancji suszy u form introgresywnych *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea*

Identification of genes associated with winter-hardiness and drought tolerance in the introgression forms of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea*

Arkadiusz Kosmala¹✉, Adam Augustyniak¹, Dawid Perlikowski¹, Izabela Pawłowicz¹, Katarzyna Lechowicz¹, Włodzimierz Zwierzykowski¹, Zbigniew Zwierzykowski¹, Marcin Rapacz², Agnieszka Płażek², Ewa Pociecha², Eugeniusz Paszkowski³

¹Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

²Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

³DANKO Hodowla Roślin

✉ e-mail: akos@igr.poznan.pl

Słowa kluczowe: fizjologiczne i molekularne markery tolerancji stresów, mrozoodporność, odporność na choroby, tolerancja suszy, trawy, zimotrwałość

Cel prowadzonych badań

Nadrzędne cele badań wieloletnich obejmowały:

- uzyskanie i selekcję form introgresywnych traw pastewnych *Lolium multiflorum* (życica wielokwiatowa)/*Festuca arundinacea* (kostrzewa trzcinowa), tolerujących stresy środowiskowe (suszę i stresy związane z zimą, w tym niską temperaturę) oraz sekwencję tych stresów w układzie susza/zima,
- uzyskanie i selekcję form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea* odpornych na porażenie patogenami,
- charakterystykę fizjologicznych markerów tolerancji suszy i zimotrwałości (z uwzględnieniem mrozoodporności i odporności na *Microdochium nivale*) u wyselekcjonowanych form introgresywnych,
- charakterystykę molekularnych markerów tolerancji suszy i mrozoodporności w oparciu o analizę ekspresji wybranych genów u wyselekcjonowanych form introgresywnych.

Wszystkie cele projektu zostały osiągnięte.

Materiały i Metody

Badania prowadzono głównie w oparciu o tetraploidalne ($2n=4x=28$) formy introgresywne

L. multiflorum/*F. arundinacea* (pokolenie BC₅ i BC₆) oraz rośliny kontrolne m.in. odmiany *L. multiflorum* (2x i 4x), odmianę *F. arundinacea* (6x) oraz tetraploidalne formy rodzicielskie BC₄. Prace badawcze obejmowały:

1. selekcję form introgresywnych o stosunkowo wysokim poziomie zimotrwałości, mrozoodporności i tolerancji suszy w oparciu o wyniki testów polowych i fitotronowych.
2. wizualną ocenę podatności badanych form introgresywnych na porażenie patogenami.
3. analizę markerów fizjologicznych i molekularnych związanych z mrozoodpornością, w tym analizę zdolności roślin do odrostu po mrożeniu, wycieku elektrolitów (EL, ang. electrolyte leakage), poziomu akumulacji transkryptu (klonowanie cDNA i RT-qPCR) oraz białka (produkcję przeciwciał i Western blot) dla genów *Wcor80* i *Cor14b*.
4. analizę markerów fizjologicznych i molekularnych związanych z tolerancją suszy, w tym analizę zawartości wody (WC, ang. water content), relatywnej zawartości wody (RWC, ang. relative water content), wymiany gazowej, wycieku elektrolitów, fluorescencji chlorofilu, poziomu akumulacji transkryptu i białka dla wybranych genów akwaporyn tonoplastowych: *tip1-1* i *tip1-2*.



5. analizę markerów fizjologicznych związanych z odpornością na *M. nivale* (zawartość cukrów rozpuszczalnych, kwasu abscysynowego i związków fenolowych).
6. krzyżowanie wsteczne i przekrzyżowania form introgressywnych o pożądanych cechach użytkowych.

Parametry fizjologiczne analizowano zgodnie z metodami podanymi przez Kosmalę i in. (2006, 2007, 2009 i 2012) oraz Augustyniaka i in. (2018). Analizę ekspresji genów i akumulacji białek prowadzono według metod opisanych przez Kosmalę i in. (2012) oraz Pawłowicz i in. (2017).

Opis wyników

Spośród 250 form introgressywnych pokolenia BC₅, testowanych 'pod daszkami' (cztery daszki x 250 form = 1000 roślin), wyselekcjonowano 10 form o stosunkowo wysokim potencjale odrostu po nawodnieniu* i/lub o wysokim potencjale tolerancji suszy: 180/30/2*, 3*, 19*, 32, 48*, 71, 73, 74*, 75* i 108. Spośród badanych roślin populacji form introgressywnych BC₅ 180/30, wyselekcjonowano również 15 form, które nie wykazywały objawów porażenia mączniakiem prawdziwym traw, rdzą koronową oraz patogenami powodującymi plamistość liści: 5, 15, 19, 26, 29, 32, 37, 38, 71, 74, 75, 76, 114, 117 i 138.

Spośród 234 roślin analizowanych w czterech namiotach, na podstawie analizy potencjału odrostu, suchej i zielonej masy po zimie, wyselekcjonowano cztery formy introgressywne, które różniły się poziomem zimotrwałości. Formy 180/30/19 i 180/30/75 charakteryzowały się najwyższym stopniem zimotrwałości, natomiast formy 180/30/138 i 180/30/84 (nie przezimowały) – najniższym stopniem zimotrwałości. Wyselekcjonowane formy introgressywne poddano testom mrozoodporności (badano potencjał odrostu roślin po mrożeniu), które wykazały, że forma 180/30/138 charakteryzowała się stosunkowo wysokim stopniem mrozoodporności, natomiast forma 180/30/19 – stosunkowo niskim stopniem. Dynamikę hartowania na mróz i poziom stabilności błon komórkowych tych dwóch form zbadano przy użyciu pomiaru wycieku elektrolitów. Oszacowano temperaturę, w której dochodzi do 50% wycieku (T_{EL50}). Forma mrozoodporna 180/30/138 po trzech tygodniach hartowania miała bardziej stabilne błony komórkowe po mrożeniu (niższą wartość T_{EL50}) niż forma 180/30/19 (Augustyniak i in. 2018). Analizowano również poziom akumulacji transkrypty i białka dla genów *Wcor80* i *Cor14b* w warunkach hartowania na mróz. Zaobserwowano istotne różnice pomiędzy formami

introgressywnymi 180/30/19 i 180/30/138. Szczególnie ważny był gen *Cor14b*, dla którego w każdym badanym punkcie czasowym procesu hartowania obserwowano wyższy poziom akumulacji transkrypty i białka u formy o wyższym poziomie mrozoodporności (180/30/138).

Analizowano 20 form introgressywnych pokolenia BC₅ pod kątem ich odporności na *M. nivale*. Do dalszych prac fizjologicznych wybrano cztery formy – dwie odporne (180/30/19 i 180/30/75) i dwie nieodporne (180/30/84 i 180/30/138). Formy introgressywne odporne na *M. nivale* charakteryzowały się wyższą zawartością rozpuszczalnych cukrów zarówno w liściach, jak i w węzłach krzewienia. Mimo ogólnej tendencji zużycia tych cukrów w trakcie trwania infekcji u badanych roślin, ich zawartość u form odpornych w siódmym dniu infekcji była wyższa niż u form wrażliwych. Formy odporne wykazały także wyższą zawartość ogólnej puli fenoli niż formy wrażliwe, aczkolwiek ta różnica nie była tak duża, jak w przypadku cukrów. W liściach i węzłach krzewienia form odpornych odnotowano większe ilości kwasu abscysynowego w pierwszym dniu infekcji niż w siódmym dniu, w odniesieniu do form wrażliwych (Płażek i in. 2018).

Analiza fizjologicznych wskaźników tolerancji suszy prowadzona była w symulowanych warunkach laboratoryjnych u czterech form introgressywnych: 180/30/19, 75, 84 i 138. Rośliny poddano działaniu krótkotrwałej suszy w doniczkach w fitotronie. Analizowano WC, RWC, EL i parametry fluorescencji chlorofilu, w warunkach kontrolnych, w trzecim, szóstym i 11 dniu suszy oraz 10 dni po rozpoczęciu nawadniania. Analizowane formy nie różniły się istotnie WC w trakcie trwania całego eksperymentu. Forma 180/30/138 charakteryzowała się w 11 dniu suszy statystycznie wyższą wartością RWC w stosunku do formy 180/30/84. Forma 180/30/138 nie wykazywała uszkodzenia błon biologicznych w trakcie całego eksperymentu. Z kolei, forma 180/30/84 wykazała najwyższy stopień uszkodzenia błon w 11 dniu suszy oraz zdolność do ich regeneracji po ustąpieniu warunków stresowych. Parametry fluorescencji chlorofilu w większości przypadków nie wykazały statystycznie istotnych, kluczowych różnic pomiędzy badanymi formami. Na podstawie wartości RWC i EL wybrano dwie formy introgressywne o skrajnie różnym potencjale tolerancji suszy. Formę 180/30/138 o wysokim potencjale tolerancji i formę 180/30/84 o niskim poziomie tolerancji (Masajada i in. 2018). Analizowano poziom akumulacji transkrypty i białka dla genów *tip 1-1* i *tip 1-2* w kontroli, w suszy

i po nawodnieniu. Poziom akumulacji transkryptów był równy u obu form introgresywnych lub wyższy u formy 180/30/84, w niektórych punktach czasowych eksperymentu. Natomiast poziom akumulacji obu białek był w każdym punkcie czasowym eksperymentu wyższy u formy o wyższym poziomie tolerancji suszy (180/30/138).

Formy introgresywne BC₅ 180/30/19, 75 i 138 krzyżowano wstecznie z tetraploidalnymi odmianami *L. multiflorum* uzyskując dla poszczególnych kombinacji krzyżowań odpowiednio 67 (populacja 185/4), 76 (populacja 185/10) i 76 (populacja 185/12) roślin pokolenia BC₆. Testy tolerancji suszy i zdolności roślin do regeneracji po nawodnieniu wykazały, że rośliny populacji BC₆ 185/4 charakteryzowały się najwyższym potencjałem tolerancji i regeneracji. Ponadto, rośliny tej populacji cechowały się również najwyższym poziomem zimotrwałości, w odniesieniu do roślin pozostałych badanych populacji. Do dalszych prac fizjologiczno-molekularnych wybrano dwie formy introgresywne pokolenia BC₆ z najlepszej populacji, różniące się poziomem tolerancji sekwencji stresów środowiskowych w układzie susza/zima – formę 185/4/28 (najwyższy potencjał tolerancji i brak objawów porażenia patogenami) oraz formę 185/4/49 (najniższy potencjał tolerancji). Forma introgresywna 185/4/49 wykazała wyższy poziom EL, czyli mniejszą stabilność błon komórkowych oraz niższy poziom uwodnienia tkanek (RWC) w 11 dniu suszy. Badane formy introgresywne różniły się również wielkością parametrów fluorescencji chlorofilu w warunkach suszy. Ponadto, forma 185/4/28 w trakcie hartowania w niskiej temperaturze miała również bardziej stabilne błony komórkowe po mrożeniu (niższą wartość T_{EL50}). Poziom akumulacji akwaporyn tip 1–1 i 1–2 wzrastał w warunkach suszy u obu analizowanych form. Jednakże, poziom tip 1–2 był wyższy w każdym punkcie eksperymentalnym, natomiast tip 1–1 w kontroli i w 11 dniu suszy, u formy 185/4/28. Z kolei, poziom akumulacji białka Cor14b wzrósł w 21 dniu hartowania u formy 185/4/28. Poziom ten był istotnie wyższy u tej formy introgresywnej we wszystkich punktach czasowych eksperymentu. Z drugiej strony, poziom akumulacji białka Wcor80 wzrósł w 14 dniu hartowania u formy 185/4/49 i był u niej istotnie wyższy w tym punkcie czasowym, w odniesieniu do formy 185/4/28.

Przekrzyżowano (zestawiono w polikrosy) 20 form introgresywnych BC₆ o najwyższym poziomie tolerancji stresów środowiskowych, celem uzyskania materiałów roślinnych do dalszych prac hodowlanych.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Wykazano możliwość połączenia w jednym genotypie traw takich cech jak: mrozoodporność, tolerancja suszy i odporność na porażenie niektórymi patogenami.
2. Wykazano, że poziom mrozoodporności nie był głównym komponentem zimotrwałości w przypadku wyselekcjonowanych form introgresywnych.
3. Wykazano, że formy introgresywne o wysokim potencjale przezimowania charakteryzowały się również stosunkowo wysokim stopniem odporności na *M. nivale*.
4. Wykazano, że poziom wycieku elektrolitów i parametr T_{EL50}, mogą być wskaźnikami fizjologicznymi, odpowiednio – poziomu tolerancji suszy i mrozoodporności u traw.
5. Wykazano, że poziom akumulacji akwaporyn tonoplastowych tip 1–1 i tip 1–2 w warunkach suszy może być wskaźnikiem stopnia tolerancji suszy u traw.
6. Wykazano, że poziom akumulacji transkryptu i białka dla genu *Cor14b* może być wskaźnikiem stopnia mrozoodporności u traw.

Osiągnięcia projektu

1. Uzyskano i wyselekcjonowano tetraploidalne formy introgresywne *L. multiflorum*/*F. arundinacea* o wysokim poziomie zimotrwałości, mrozoodporności, tolerancji suszy i regeneracji po nawodnieniu oraz odporności na porażenie patogenami.
2. Materiał roślinny uzyskany z przekrzyżowania 20 form introgresywnych pokolenia BC₆ o stosunkowo najwyższym poziomie tolerancji stresów środowiskowych zostanie wykorzystany do badań w projekcie MRiRW w latach 2021–2026. Na podstawie wyników uzyskanych w latach 2014–2020 postawiono hipotezy badawcze w nowym projekcie.
3. Formy introgresywne pokolenia BC₅ o różnym poziomie mrozoodporności, uzyskane i scharakteryzowane w projekcie MRiRW w latach 2014–2020, będą materiałem badawczym w przygotowywanym na 2021 r. projekcie NCN (OPUS) (badania będą obejmowały m.in. analizę proteomu, metabolomu i lipidomu liści i węzłów krzewienia traw w zmiennych warunkach temperaturowych).

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Augustyniak A., Perlikowski D., Pocięcha E., Dziurka M., Płażek A., Rapacz M., Kosmala A. (2015). Performance

of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms under abiotic and biotic stress conditions. 10th International Conference “*Plant Functioning under Environmental Stress*”, 16–19 September 2015, Cracow, Poland. Abstracts: 39.

Augustyniak A., Masajada K., Płażek A., Pocięcha E., Dziurka M., Kosmala A. (2016). Molecular indicators of resistance to *Microdochium nivale* in *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms. 20th General Congress of Eucarpia, 29 August–1 September 2016, Zurich, Switzerland. Abstracts: 246.

Masajada K., Augustyniak A., Perlikowski D., Ratajczak D., Zwierzykowski W., Pawłowicz I., Kosmala A. (2017). Physiological indicators of tolerance to soil water deficit in *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms. Joint Meeting of Eucarpia Forage Crops and Amenity Grasses Section and Protein Crops Working Group of Oil and Protein Crops Section „*Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics*”, 11–14 September 2017, Vilnius, Lithuania. Abstracts: 46.

Augustyniak A., Perlikowski D., Masajada K., Pawłowicz I., Kosmala A. (2018). Expression of *cor* genes in *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms under cold acclimation conditions. 11th International Conference “*Plant Functioning under Environmental Stress*”, 12–15 September 2018, Cracow, Poland. Abstracts: 99.

Augustyniak A., Perlikowski D., Masajada K., Pawłowicz I., Kosmala A. (2019). Accumulation profiles of COR proteins during cold acclimation of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms. EGF-EUCARPIA Joint Symposium, 24–27 June 2019, Zurich, Switzerland. Abstracts: 273.

Publikacje

Kosmala A., Augustyniak A., Perlikowski D., Pawłowicz I., Zwierzykowski W., Płażek A., Paszkowski E. (2019). Identyfikacja genów związanych z ekspresją zimotrwałości i tolerancji suszy u form introgresywnych *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea*. *Biuletyn IHAR* 286: 379–382. MNiSW=20.

Augustyniak A., Perlikowski D., Rapacz M., Kościelniak J., Kosmala A. (2018). Insight into cellular proteome of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms to decipher crucial mechanisms of cold acclimation in forage grasses. *Plant Science* 272: 22–31. IF₂₀₁₈=3,785; MNiSW₂₀₁₈=35 (obecnie 100).

Płażek A., Pocięcha E., Augustyniak A., Masajada K., Dziurka M., Majka J., Perlikowski D., Pawłowicz I., Kosmala A. (2018). Dissection of resistance to *Microdochium nivale* in *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms. *Plant Physiology and Biochemistry* 123: 43–53. IF₂₀₁₈=3,404; MNiSW=20 (obecnie 70).

Masajada K., Augustyniak A., Perlikowski D., Ratajczak D.,

Zwierzykowski W., Pawłowicz I., Kosmala A. (2018). Physiological Indicators of Tolerance to Soil Water Deficit in *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* Introgression Forms. In: G. Brazauskas, K. Janovičienė, G. Statkevičiūtė (eds.), *Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics*. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, pp. 176–180. doi: 10.1007/978-3-319-89578-9_32 (monografia w j. angielskim).

Literatura

Augustyniak A., Perlikowski D., Rapacz M., Kościelniak J., Kosmala A. (2018). Insight into cellular proteome of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms to decipher crucial mechanisms of cold acclimation in forage grasses. *Plant Sci.* 272: 22–31.

Kosmala A., Bocian A., Rapacz M., Jurczyk B., Zwierzykowski Z. (2009). Identification of leaf proteins differentially accumulated during cold acclimation between *Festuca pratensis* plants with distinct levels of frost tolerance. *J. Exp. Bot.* 60: 3595–3609.

Kosmala A., Perlikowski D., Pawłowicz I., Rapacz M. (2012). Changes in the chloroplast proteome following water deficit and subsequent watering in a high and a low drought tolerant genotype of *Festuca arundinacea*. *J. Exp. Bot.* 63: 6161–6172.

Kosmala A., Zwierzykowski Z., Gąsior D., Rapacz M., Zwierzykowska E., Humphreys M. W. (2006). GISH/FISH mapping of genes for freezing tolerance transferred from *Festuca pratensis* to *Lolium multiflorum*. *Heredity* 96: 243–251.

Kosmala A., Zwierzykowski Z., Zwierzykowska E., Łuczak M., Rapacz M., Gąsior D., Humphreys M. W. (2007). Introgression-mapping of the genes for winter hardiness and frost tolerance transferred from *Festuca arundinacea* into *Lolium multiflorum*. *J. Hered.* 98: 311–316.

Masajada K., Augustyniak A., Perlikowski D., Ratajczak D., Zwierzykowski W., Pawłowicz I., Kosmala A. (2018). Physiological Indicators of Tolerance to Soil Water Deficit in *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* Introgression Forms. In: G. Brazauskas, K. Janovičienė, G. Statkevičiūtė (eds.), *Breeding Grasses and Protein Crops in the Era of Genomics*. Springer International Publishing AG, Cham, Switzerland, pp. 176–180. doi: 10.1007/978-3-319-89578-9_32.

Pawłowicz I., Rapacz M., Perlikowski D., Gondek K., Kosmala A. (2017). Abiotic stresses influence the transcript abundance of PIP and TIP aquaporins in *Festuca* species. *J. Appl. Genet.* 58: 421–435.

Płażek A., Pocięcha E., Augustyniak A., Masajada K., Dziurka M., Majka J., Perlikowski D., Pawłowicz I., Kosmala A. (2018). Dissection of resistance to *Microdochium nivale* in *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms. *Plant Physiol. Biochem.* 123: 43–53.

Gromadzenie i ocena kolekcji ekotypów traw wieloletnich z uwzględnieniem cech warunkujących ich wykorzystanie na cele alternatywne

Collection and assessment the collection of perennial grasses ecotypes, taking into account traits which determine their usage for alternative purposes

Elżbieta Czembor✉, Wojciech Majtkowski, Jan Schmidt, Seweryn Frasiński

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin -Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: e.czembor@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: tolerancja na deficyt wody, tolerancja na pH gleby, tolerancja na rodzaj podłoża, trawy wieloletnie, użytkowanie kośne, użytkowanie nasienne

Trawy wieloletnie spełniają wiele funkcji w przyrodzie i otoczeniu człowieka. Obecnie dużą uwagę przywiązuje się również do ich funkcji nieprodukcyjnych. Intensyfikacja rolnictwa spowodowała istotne zawężenie zmienności wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie wszystkich gatunków roślin uprawnych, a szczególnie w obrębie traw wieloletnich, ponieważ w programach hodowlanych nowych odmian główną rolę odgrywa plon nasion, przy utracie innych ważnych cech jakimi są odporność na czynniki stresowe. Uzasadnia to stworzenie kolekcji ekotypów, które będą mogły być wykorzystywane zarówno do zagospodarowania terenów ekologicznych czy porolnych, parków, terenów rekreacyjnych czy zurbanizowanych jako formy gazonowe lub do celów pastewnych.

Osiągniętym celem zadania było opracowanie kolekcji ekotypów śmiałka darniowego (*Deschampsia cespitosa*), kostrzewy trzcinowej (*Festuca arundinacea*), kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis*), kostrzewy czerwonej (*Festuca rubra*), życicy trwałej (*Lolium perenne*), tymotki łąkowej (*Phleum pratense*), wiechliny łąkowej (*Poa pratensis*) rekomendowanej do wykorzystania na cele alternatywne lub na cele pastewne. Stabilność biologiczną wewnątrz- i międzygatunkową określono uwzględniając:

— zróżnicowanie w obrębie kolekcji w warunkach polowych uwzględniając: plon nasion i zielonej masy, składowe plonu, cechy fizjologiczne i morfologiczne oraz odporność na stresy biotyczne i abiotyczne,

— zróżnicowanie w obrębie kolekcji w warunkach kontrolowanych: dla stopnia odporności na niedobór wody w glebie, różne podłoża i różne pH gleby,
— rodzaj siedlisk sprzyjających rozwojowi badanych gatunków

Materiały i Metody

W badaniach uwzględniono 250 ekotypów należących do 7 gatunków: śmiałek darniowy kostrzewy (trzcinowa, łąkowa, czerwona), życica trwała, tymotka łąkowa, wiechlina łąkowa. W I etapie badań w latach 2014 – 2016 ekotypy były waloryzowane w szkołach w użytkowaniu kośnym i nasiennym oraz w warunkach kontrolowanych pod względem tolerancji na deficyt wody, rodzaj podłoża (podłoże wapienne, 2 -podłoże „bezglebie”, 3 – podłoże kontrolne) i zróżnicowane pH gleby (odczyn kwaśny, obojętny i zasadowy). Doświadczenia polowe prowadzono wielośrodowiskowo w 3 lokalizacjach uwzględniając 2 typach użytkowania (kośny i nasienny). W użytkowaniu kośnym uwzględniono corocznie 12 cech świadczących o ich wartości gospodarczej a w użytkowaniu nasiennym 15 cech. W obu rypwach użytkowania opisano odporność na ważne gospodarczo choroby i cechy fenologiczne. Dodatkowo o potencjale plonowania w użytkowaniu kośnym świadczyły morfologia liści, potencjał plonowania zielonej i suchej masy a o potencjale plonowania w użytkowaniu nasiennym wyleganie, wysokość, morfologia liści a flagowego i kwiatostanu, składowe plonu (waga ziarniaków z kłosa / wiechy, MTZ, potencjał

plonowania).

W badaniach tolerancji na deficyt wody – 2 warianty (susza glebowa i kontrolny) po 3 powtórzenia w wariancie. Pomiar wilgotności podłoża prowadzono za pomocą zestawu pomiarowego AT Theta Kit a pomiary odrostu trzykrotnie w odstępie 7 dni tj. do momentu, gdy zaobserwowano, że niektóre obiekty zaczynają zupełnie zasychać (wilgotność gleby spadła do 5 – 7%). Wówczas rośliny rozpoczęło badanie zdolności roślin do regeneracji. Badania reakcji na różne pH gleby prowadzono dla 3 wariantów: podłoże o odczynie kwaśnym pH 4,4 – 5,0, drugi – podłoże poddane alkalizacji do odczynu pH 7,5 – 8,0 natomiast trzeci – próba kontrolna (ziemia kompostowa) o odczynie pH 6,5 – 7,0.

Reakcja roślin na rodzaj podłoża obejmowały 3 warianty: podłoże wapienne (>30), podłoże gleb (<30 cm) oraz 3 podłoże kontrolne (kompost).

Wyniki I etapu badań były podstawą wytypowania ekotypów do II etapu badań - 20 obiektów dla każdego gatunku, które zostały włączone do doświadczeń poletkowych w użytkowaniu kośnym i nasiennym prowadzonych w latach 2017-2020.

Wyniki

Wyniki czterotygodniowych testów reakcji roślin na deficyt wody (poniżej 10% PPW) a następnie dwutygodniowej na oceny zdolności do regeneracji wykazały, że: (1) tymotka łąkowa, kostrzewa łąkowa i życica trwała charakteryzują się największym spadkiem tempa odrastania przy deficycie wody, (2) kostrzewa łąkowa charakteryzuje się niską zdolnością do regeneracji, (3) kostrzewa trzciniowa i śmiełek darniowy to gatunki najszybciej regenerujące się po okresie deficytu wody, (4) wiechlina łąkowa była najmniej wrażliwa na okresowe przesuszenie gleby, (5) wśród ocenianych obiektów znajdują się ekotypy dorównujące odmianom wzorcowym pod względem odporności na suszę.

Wyniki czterotygodniowych testów reakcji roślin na rodzaj podłoża (bezglebie oraz wapienne) wykazały, że: (1) najslabszy rozwój roślin na podłożu wapiennym spowodowany był bardzo niską zasobnością w składniki pokarmowe (P, K, Mg), (2) śmiełek darniowy oraz kostrzewa trzciniowa były gatunkami tolerancyjnymi na rodzaj podłoża (bezglebie i wapienne) ponieważ różnice w odroście na podłożu kontrolnym oraz na podłożu stresowym były najmniejsze, (3) wiechlina łąkowa była gatunkiem, którego wigor roślin na podłożu „bezglebie” został oceniony najwyżej.

Wyniki czterotygodniowych testów reakcji roślin na pH gleby wykazały, że: (1) najmniej podatnymi na niskie pH były gatunki z „*Lolium/Festuca* kompleks” (kostrzewa trzciniowa, życica trwała i kostrzewa łąkowa), (2) wysokie pH w porównaniu do niskiego pH miało znacznie mniejszy wpływ na rozwój roślin wszystkich gatunków.

Doświadczenia polowe w formie szkótek wykazały, że: (1) w grupie cech świadczących o odporności roślin na stropy biotyczne i abiotyczne oceny wigoru roślin w okresie zimowym i po zimie oraz oceny stopnia odporności na rdze w okresie jesiennym w sposób istotny różnicowały badany materiał roślinny, (2) stopień odporności na rdze w okresie jesiennym w sposób istotny wpływał na stan roślin przed zimą, (3) gatunkami najbardziej podatnymi na rdze były wiechlina łąkowa, i śmiełek darniowy. Zakres zmienności dla tej cechy był największy w obrębie kostrzewy łąkowej i pozwalał wyodrębnić genotypy średnio odporne., (4) w obrębie uwzględnionych w badaniach gatunków, można było wskazać ekotypy nie odbiegające pod względem stopnia odporności na rdze, plamistości liści i stanu roślin przed zimą od wzorcowych odmian uprawnych, nawet w obrębie wiechliny łąkowej, dla której zakres zmienności na rdze był niski, (5) odporność roślin na stropy biotyczne i abiotyczne w istotny sposób wpływa na ich potencjał plonowania w użytkowaniu nasiennym i kośnym. Współzależności pomiędzy długością drugiego, w pełni wykształconego liścia oraz plonem zielonej i suchej masy były dodatnie i statystycznie istotne natomiast współzależności pomiędzy długością drugiego, w pełni wykształconego liścia a zawartością suchej masy w zielonej masie są ujemne (i statystycznie istotne). Dodatkowo, w ramach doświadczeń poletkowych wykazano, że okresie wiosennym do gatunków plonujących najwyżej w użytkowaniu kośnym była tymotka łąkowa (średnio 0,688 g / m² przy zakresie 0,548 – 0,906 kg / m²) oraz kostrzewa trzciniowa (średnio 0,506 kg/m² przy zakresie 0,362 – 0,728 kg/m²).

W użytkowaniu nasiennym najwcześniej kłosiły się obiekty wiechliny łąkowej, a najpóźniej tymotki. Największą zmiennością tej cechy charakteryzowały się obiekty śmiełka darniowego (różnica między pierwszym kłoszącym się obiektem a najpóźniejszym wyniosła prawie miesiąc. Były dodatnie współzależności pomiędzy: wysokością roślin a plonem nasion z kwiatostanu, długością liścia flagowego a długością kwiatostanu, długością liścia flagowego a MTZ, długością kwiatostanu a MTZ. Współzależności pomiędzy długością kwiatostanu a potencjałem plonowania były ujemne.

Największą zdolnością do reprodukcji nasion (uwzględniając potencjał plonowania, plon nasion z kwiatostanu i masę tysiąca ziarniaków) charakteryzowały się obiekty wiechliny łąkowej i tymotki łąkowej, a najniższą - ekotypy i odmiany kostrzewy łąkowej.

Współzależności pomiędzy wczesnością a wysokością roślin, szerokością liścia flagowego, liczbą nasion z rośliny i ich wagą były dodatnie i statystycznie istotne. Rośliny wysokie, o długim i wąskim kwiatostanie charakteryzowały się wyższą MTZ. Natomiast współzależność pomiędzy liczbą nasion a długością kwiatostanu była ujemna. Współzależności pomiędzy długością kwiatostanu a potencjałem plonowania były ujemne. Plon nasion (szt.) – zróżnicowanie pomiędzy gatunkami i w obrębie gatunku (tymotka łąkowa - średnio 817,1 szt., zakres 434,0 -1282,0 szt.). MTZ: najwyższa – kostrzewy trzcinowej (średnio 2,94g), najniższa – wiechliny łąkowej (średnio 0,31g). Długość kwiatostanu: zakres zmienności największy był dla kostrzewy trzcinowej (od 9,7 do 19,7 cm) oraz życicy trwałej (od 18,3 do 27,4 cm).

Wnioski

1. Ekotypy śmiałka darniowego i kostrzewy łąkowej nie powinny być rekomendowane do zagospodarowywania terenów specjalnych ponieważ w trakcie ekspedycji i gromadzenia kolekcji do badań na terenach składowania odpadów przemysłowych nie stwierdzono występowania tych gatunków.
2. Kostrzewa czerwona występowała w najbardziej zróżnicowanych warunkach ekogeograficznych – co świadczy o dużym potencjale adaptacyjnym tego gatunku i rekomendacji do zagospodarowywania terenów specjalnych
3. Uzyskane zróżnicowanie reakcji badanych obiektów na różne warunki glebowe wskazuje na możliwość wyboru z nich ekotypów i odmian najbardziej przystosowanych do skrajnych warunków (niskie i wysokie pH, mała zasobność w składniki pokarmowe, deficyt wody).

Osiągnięcia projektu

1. Analiza siedlisk zbioru ekotypów traw w trakcie ekspedycji umożliwiła określenie wpływu działalności człowieka na różnorodność

biologiczną wybranych siedlisk (sprostanie założeniom UE, że obszary naturalne powinny stanowić 30% terytorium UE do 2030 r., a zdegradowane ekosystemy powinny zostać odtworzone)

2. Badania empiryczne zapewniły poszerzenie kolekcji traw wieloletnich dostępnych w Banku Genów IHAR-PIB o obiekty scharakteryzowane w warunkach polowych w użytkowaniu kośnym i nasiennym, wskazane do zagospodarowywania terenów alternatywnych.
3. Badania empiryczne zapewniły opisanie reakcji podstawowych gatunków traw wieloletnich na deficyt wody, pH i skład chemiczny i strukturę podłoża.

Materiały konferencyjne

- Czembor E., Frasiński S., Golimowski R., Schmidt J., Majtkowski W. 2017. Abiotic stress tolerance in perennial grasses – recommended for the management of dry and degraded areas. Global Conference on Plant Science and Molecular Biology (GPMB 2017), Walencja, Hiszpania.
- Golimowski R., Schmidt J., Majtkowski W., Czembor E. 2017. Zróżnicowanie potencjału nasiennego wybranych ekotypów traw przeznaczonych na cele alternatywne. Nauka dla hodowli roślin” Zakopane, 30.01-3.02.2017.
- Golimowski R., Schmidt J., W. Majtkowski, E. Czembor. 2016. Ekogeograficzne zróżnicowanie ekotypów traw wieloletnich warunkujące ich wykorzystanie na cele alternatywne. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Kolekcje roślin użytkowych w świetle globalnej ochrony świata roślin 2020”, w ramach XLVI Zjazdu Polskich Ogrodów Botanicznych i Arboretów w Polsce, Koryciny, 13-16.06.2016.
- Golimowski R., Schmidt J., Majtkowski W., Czembor E. 2016. Tolerancja ekotypów traw na zróżnicowane pH gleby. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Aktualne i perspektywiczne możliwości uprawy oraz wykorzystania roślin pastewnych”, Puławy, 19-20.05.2016 r.
- Czembor E., Frasiński S., Golimowski R., Schmidt J., Majtkowski W. 2016. Identification of forage grass germplasm for water-limited environments and different soil types. EUCARPIA, 20th General Congress, Zurich, Szwajcaria, 29.08 - 1.09.2016.
- Golimowski R., Schmidt J., Majtkowski W., Czembor E. 2015. Ekogeograficzne zróżnicowanie ekotypów traw wieloletnich warunkujące ich wykorzystanie na cele alternatywne. (W:) XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych”. Zakopane,

Badanie cech warunkujących zawiązywanie nasion, ich jakość oraz plon w wybranych gatunkach traw wieloletnich

The examination of traits affecting seed formation as well as seed quality and yield in selected perennial grass species.

Grzegorz Żurek¹✉, Danuta Martyniak¹, Kamil Prokopiuk¹, Agnieszka Rachwalska², Eugenisz Paszkowski³, Maciej Jurkowski⁴

¹Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Traw, Roślin Motylkowatych i Energetycznych

²Zakład Doświadczalny Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Grodkowice

³DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.,

⁴Małopolska Hodowla Roślin, Sp. z o.o.

✉ e-mail: g.zurek@ihar.edu.pl

Słowa kluczowe: *Festuca arundinacea*, *Festuca pratensis*, *Festuca rubra*, *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, produktywność generatywna, zmienność

Optymalizacja reprodukcji generatywnej traw powinna skupiać się na dwóch głównych elementach: potencjale nasiennym roślin (tzn. wielkości elementów składowych reprodukcji generatywnej) oraz zdolności do wykorzystania tego potencjału (tzn. stopniu w jakim poszczególne kwiatki wykształcają żywotne nasiona). Wykształcanie nasion żywotnych, o pożądanej wielkości u traw wieloletnich jest bezpośrednio związane z ich jakością oraz plonem. Cechy decydujące o zdolności reprodukcyjnej traw wieloletnich są ze sobą wzajemnie powiązane i zaburzenie jakiegokolwiek elementu tego złożonego procesu powoduje zachwianie potencjału reprodukcyjnego. W zależności od gatunku oraz typu użytkowania różny może być charakter wzajemnych zależności pomiędzy cechami. Oprócz cech związanych z ilością nasion produkowanych przez rośliny istnieją również cechy, decydujące o zdolności do wykorzystania tego potencjału, a których wpływ nie do końca został opisany i zweryfikowany. Są to cechy takie jak np.: równomierne dojrzewanie nasion w kwiatostanach (wyrównanie) oraz struktura plonu nasion (udział nasion pełnych, niewykształconych, plew itp.) i jej wpływ na zdolność kiełkowania. Bardzo istotne są również dwie wzajemnie przeciwstawne cechy tj. osypywanie nasion oraz zdolność do wymłacania nasion. Aby właściwie ocenić wpływ tych cech na efektywność reprodukcji

generatywnej traw niezbędne jest po pierwsze określenie ich wewnątrz- oraz międzyobiektowej zmienności a następnie zidentyfikowanie kierunku oraz siły zależności pomiędzy tymi cechami a parametrami fizjologicznymi roślin w różnych fazach rozwoju roślin jak np. zawartość azotu w roślinach, mierzona pośrednio za pomocą pomiaru zawartości chlorofilu. Współczynnik korelacji pomiędzy tymi cechami wynosi ponad 0.83 (Gaborčík, 2003). Zawartość azotu w roślinach przekłada się z kolei na efektywność syntezy substancji pokarmowych i dalej na plon biomasy. Istnieją zatem przesłanki dla poszukiwania zależności pomiędzy zawartością azotu w liściach mierzoną pośrednio za pomocą pomiaru zawartości chlorofilu a plonowaniem nasiennym i jego cechami składowymi. Uzyskanie informacji o wyżej wymienionych cechach w zakresie ich zmienności oraz wzajemnych zależności przyczyni się do poszerzenia wiedzy o czynnikach determinujących efektywność reprodukcji generatywnej u traw wieloletnich.

Badania, realizowane od roku 2014 miały na celu określenie zróżnicowania wewnątrz- i międzyobiektowego badanych form traw wieloletnich (kostrzewy czerwonej, kostrzewy trzcinowej, kostrzewy łąkowej, życicy trwałej oraz wiechliny łąkowej) w obrębie zestawu cech związanych z plonowaniem generatywnym, jak również wybranych cech fizjologicznych



mierzonych w różnych fazach dojrzałości jak np. zawartość azotu w liściach, określana pośrednio za pomocą pomiaru zawartości chlorofilu. W badaniach przyjęto hipotezę że istnieje korelacja pomiędzy tą cechą a cechami składowymi plonu nasion, ich jakością oraz samym plonem. Korelacja ta może być ograniczona do konkretnych genotypów bądź dotyczyć całych gatunków. Założone powyżej cele realizacji zadania zostały osiągnięte.

Material i Metoda

Doświadczenia polowe zrealizowane w 5 miejscowościach w kraju. W latach 2014 – 2017 badano 15 odmian i rodów z trzech gatunków traw z rodzaju kostrzewa: k. trzciniowa (odm. RAHELA, rody 121 – 2/8, 124 – 1/8, 127 – 1/1, 128 – 1/6; k. łąkowa (odm. PASJA, rody POBS – 84, POBS – 89, POBS – 91, ekotyp 49–8b; k. czerwona (odm. ARETA, rody NIB-289, NIB-231, NIB-304, ekotyp 109–2/1) w Radzikowie, Szelejewie, Lesznie i Nieznanicach. W latach 2017 – 2020 badano 14 rodów i odmian wiechliny łąkowej (odm. ALICJA, BILA, BALIN, COMPACT, LIMAGIE, rody NI – 400, NI – 401) oraz życicy trwałej (odm. AMARANT 4n, BAJKA 2n, BRAWA 4n, NIRA 2n, rody DS – 117, NI – 402, NI – 403) w Radzikowie, Szelejewie, Nieznanicach i Grodkowicach. Rośliny oceniano pod względem 18 cech: przezimowania, pokroju, początku kłoszenia i kwitnienia, szacunkowego plonu zielonej masy w pełni kłoszenia, wysokości roślin w pełni kwitnienia, długości i szerokość liścia podflagowego, względnej zawartość chlorofilu, zawartości azotu w roślinach, liczby pędów generatywnych na roślinie, plonu nasion z kwiatostanu, z rośliny oraz z poletka, długości kwiatostanu, osypywania nasion, ciężaru 1000 nasion oraz zdolności kiełkowania.

Analizy statystyczne wyników uzyskanych przeprowadzono za pomocą pakietu STATISTICA 12.5. Do oceny efektu czynników doświadczenia oraz do analizy interakcji genotypów i środowiska (G×E) wykorzystano model AMMI. W podejściu tym lata/lokalizacje oraz składnik interakcyjny traktowano jako czynniki losowe, a genotypy jako czynnik stały. W analizie uwzględniono następujące komponenty zmienności ogólnej badanych form: warunki klimatyczno-glebowe realizacji doświadczenia (kombinacja lokalizacji oraz roku), odmiana, powtórzenie, odmiana x warunki (interakcja), składowe interakcji oraz błąd losowy.

Kolejnym elementem przeprowadzonej analizy była ocena badanych genotypów (odmian) pod względem tzw. miar szerokiej adaptacji w kontekście plonowania nasiennego. Wyznaczone zostały

trzy takie miary dla cechy ‘plon nasion z rośliny’: miary nadrzędności plonowania odmiany, miara niezawodności przewagi plonowania oraz miara Kanga stabilności YSi.

Wyniki i Dyskusja

Zróznicowanie badanych obiektów 5 gatunków traw było modyfikowane głównie przez warunki, w jakich realizowano doświadczenia. Specyfika lokalizacji (gleba, mikroklimat, agrotechnika) oraz warunki pogodowe w sezonie wegetacyjnym decydowały o zmienności większości (od 50 do 89%) badanych cech. Gatunkiem o cechach najsilniej kształtowanych przez warunki realizacji doświadczeń była kostrzewa łąkowa. Średni udział warunków w zmienności 18 cech tego gatunku uwzględnionych w analizie stanowił 62% zmienności ogólnej, z kolei udział genotypu – zaledwie 13,6%. W przypadku kostrzewy trzciniowej udział warunków realizacji doświadczeń w ogólnej zmienności stanowił 43,8%, podczas gdy genotypu – 29,8%. Udział warunków realizacji doświadczenia jest zatem odwrotnie proporcjonalny do udziału genotypu w kształtowaniu zmienności cech 5 badanych gatunków traw (**ryc. 1**). Udział interakcji warunków z genotypem (G×E) jest w wypadku 4 gatunków bardzo podobny (od 16,3 do 17,2%) jedynie w przypadku kostrzewy łąkowej wynosi 10,7%.

Obserwowany w niniejszych badaniach mniejszy udział zmienności pochodzenia genotypowego diploidalnej kostrzewy łąkowej, może być pochodną ograniczonej zmienności chloroplastowego DNA, które reprezentowane jest w tym gatunku jedynie przez 3 haplotypy (Rognli i wsp. 2010). Dla porównania, u diploidalnej życicy trwałej zidentyfikowano 12 haplotypów. Mniejsza zmienność kostrzewy łąkowej w porównaniu do poliploidalnych kostrzew jak np. trzciniowej i czerwonej, może wynikać z przypuszczalnej migracji przedstawicieli tego gatunku w okresie przed ostatnim zlodowaczeniem, która wiodła z regionów górskich półwyspu Iberyjskiego, Alp oraz Kaukazu. W trakcie migracji gatunek ten podlegał selekcji w warunkach silnego ograniczenia obszarów dostępnych dla wegetacji, co z kolei mogło doprowadzić do ograniczenia liczby haplotypów w gatunku (Fjellheim i wsp. 2006).

Porównanie zmienności międzyobiektowej (zmo) ze zmiennością wewnątrzobiektową (zwo) wykazało iż w obrębie badanych cech, w zależności od gatunku – od 24% (kostrzewa czerwona) do 39% (wiechlina łąkowa) badanych obiektów charakteryzuje się większymi wartościami zwo od zmo.

Znacząco to równocześnie że zmienność międzyobiektoowa badanych 5 gatunków traw jest większa od zmienności wewnątrzobiektoowej dla większości badanych odmian, rodów i ekotypów.

Przeprowadzona analiza miar adaptacji cechy kluczowej w niniejszych badaniach (plonu nasion z rośliny) pozwoliła na wyodrębnienie form oznaczających się względnie najwyższą stabilnością tej cechy. Dla kostrzewy trzcinowej jest ród 124–1/8, dla kostrzewy łąkowej – 49/86, dla kostrzewy czerwonej – NIB 289. Dla wiechliny – odmiana Compact a dla życicy – odmiana Amarant. Wyodrębnione formy osiągnęły również najwyższe wartości cechy plonu nasion z rośliny, aczkolwiek nie można było w każdym z badanych gatunków wskazać ich jako najlepsze w oparciu o standardową analizę istotności różnic.

Miara niezawodności przewagi plonowania równa 1 wskazuje iż odmiany: Amarant życicy trwałej oraz Compact wiechliny łąkowej zawsze plonowały powyżej średnich dla danych warunków doświadczenia (lata + lokalizacje). Wśród kostrzew wysokimi wartościami tego wskaźnika charakteryzowały się rody 124–1/8 (k. trzcinowa), 49/86 (k. łąkowa) oraz NIB 289 (k. czerwona). Wymienione powyżej odmiany Amarant oraz Compact charakteryzowały się również największą zdolnością do adaptacji w zróżnicowanych warunkach realizacji doświadczeń.

Szeroka adaptacja genotypu do zmiennych warunków środowiska jest bardzo pożądana w hodowli roślin. Głównym celem hodowli roślin rolniczych jest tworzenie nowych odmian o szerokiej zdolności adaptacyjnej do zmiennych środowisk w rozpatrywanym rejonie uprawy, a więc odmian, które jednocześnie plonują średnio wysoko w stosunku do innych odmian oraz ich plonowanie jest stabilne (Rajfura i Mądry, 2001; Mądry, 2002). Co ciekawe, wyodrębnionymi w trakcie niniejszych badań formami nie zawsze były odmiany. Świadczy to o zdecydowanej przewadze tych form i ich potencjalnej przydatności w dalszym cyklu hodowlanym.

Analiza korelacji zawartości azotu i pozostałych badanych cech

Zawartość azotu w roślinach była w różnym stopniu związana z badanymi cechami (Tab.1). Stwierdzono dodatnie, istotne statystycznie wartości współczynników korelacji zawartości azotu z plonem nasion z kwiatostanu dla kostrzew: trzcinowej oraz czerwonej. Plon nasion z rośliny był związany ujemną korelacją z zawartością azotu dla kostrzewy łąkowej oraz wiechliny łąkowej.

Pomiędzy zawartością azotu a szerokością liścia

stwierdzono istotne statystycznie, wysokie, dodatnie wartości współczynnika korelacji. Zawartość azotu miała również pozytywny wpływ na wysokość roślin oraz długość liścia i długość kwiatostanu kostrzew i życicy trwałej.

W odniesieniu do poszczególnych obiektów w badanych gatunkach, również stwierdzono zróżnicowanie. Dla wszystkich obiektów kostrzewy łąkowej stwierdzono istotne wartości współczynników korelacji zawartości azotu z plonem nasion z kwiatostanu, rośliny oraz poletka. Ostatnie dwie cechy charakteryzowały się ujemnymi wartościami współczynników korelacji, co można tłumaczyć istnieniem ujemnej korelacji pomiędzy plonem nasion z kwiatostanu i z poletka. Większa zawartość azotu przekłada się na zdolność do lepszego wypełniania nasion i wykształcania dłuższych kwiatostanów. To jednak stymuluje również rozwój części wegetatywnych (liście) co nie przekłada się na zwiększenie liczby pędów generatywnych i ich końcową wielkość. W pozostałych gatunkach kostrzewy stwierdzono istotne statystycznie wartości współczynników korelacji zawartości azotu tylko dla plonu nasion z kwiatostanu dla 5 z łącznie 10 obiektów. Podobnie do opisanych dla obiektów kostrzewy łąkowej zależności stwierdzono dla odmian Alicja oraz Limagie wiechliny łąkowej oraz Bajka życicy trwałej.

Zawartość azotu w roślinach jest zatem dobrym wskaźnikiem plonu nasion z kwiatostanu, aczkolwiek nie we wszystkich przypadkach jest to wiarygodny wskaźnik potencjalnego plonu z rośliny.

Wnioski

1. Zróżnicowanie badanych obiektów 5 gatunków traw było modyfikowane głównie przez warunki, w jakich realizowano doświadczenia. Specyfika lokalizacji (np. gleba, agrotechnika) oraz warunki pogodowe w sezonie wegetacyjnym decydowały o zmienności większości badanych cech.
2. Gatunkiem o cechach najsilniej kształtowanych przez warunki realizacji doświadczeń była kostrzewa łąkowa. Średni udział warunków w zmienności cech tego gatunku uwzględnionych w analizie stanowił 62% zmienności ogólnej, z kolei udział genotypu – zaledwie 13,6%.
3. Z kolei w przypadku gatunków, których zmienność była relatywnie najbardziej zależna od genotypów (kostrzewa trzcinowa i życica trwała) udział warunków realizacji doświadczeń w ogólnej zmienności stanowił

- odpowiednio 43,8 oraz 45,2%, podczas gdy genotypu – 29,8 i 29,3%.
4. Stwierdzone zależności pomiędzy zawartością azotu a plonem nasion wskazują na istnienie możliwości w zakresie wykorzystania tej relacji do prognozowania efektywności reprodukcji generatywnej (plon nasion) w oparciu o pomiary wykonane jeszcze w fazie wegetatywnej (zawartość N roślinach).
 5. Zależności powyższe są jednak silnie zdeterminowane genotypowo i ich praktyczne zastosowanie wymaga dodatkowych badań oraz opracowania odrębnych algorytmów.
 6. Rody wyodrębnione w obrębie badanych gatunków kostrzew posiadają duży potencjał w zakresie dalszego ich doskonalenia w pracach hodowlanych.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje naukowe

Żurek G., Martyniak D., Prokopiuk K., Woźna – Pawlak U., E. Paszkowski, M. Jurkowski (2017). „Seed yield and its components in three *Festuca* species”. *Plant Breeding & Seed Science*, 75: 10 - 27 (6 pkt. MNiSW).

Doniesienia konferencyjne

Żurek G., Martyniak D. (2014). „Czynniki determinujące efektywność produkcji nasiennej traw” – poster. konferencja krajowa, „Rozwój badań nad biologią i hodowlą traw”, SGGW Warszawa, 22.09.2014 (2 osoby).

Martyniak D., Żurek G. (2014). „Kierunki rozwoju nasiennictwa traw w świetle potrzeb zazieleniania proekologicznego” – poster. konferencja krajowa, „Rozwój badań nad biologią i hodowlą traw”, SGGW Warszawa, 22.09.2014 (2 osoby).

Żurek G., Martyniak D., Prokopiuk K., Woźna – Pawlak U., E. Paszkowski, M. Jurkowski (2015). „Interakcja genotypowo-środowiskowa cech związanych z początkowym wzrostem i rozwojem traw z rodzaju kostrzewa” referat + streszczenie w materiałach pokonferencyjnych. Konferencja krajowa, Poznań – Baranowo, 13–15 maja 2015.

Żurek G., Martyniak D., Prokopiuk K., Woźna – Pawlak U., E. Paszkowski, M. Jurkowski (2016). „Analiza zroźnicowania wewnątrz- i międzyobiektowego cech determinujących zdolności reprodukcyjne traw wieloletnich w trzech gatunkach z rodzaju *Festuca*” poster + streszczenie w materiałach pokonferencyjnych. Ogólnopolska Konferencja Naukowa pt. „Aktualne i perspektywiczne możliwości uprawy oraz wykorzystania roślin pastewnych”, Puławy, 19 – 20 maja, 2016.

Żurek G., Martyniak D., Prokopiuk K., Woźna – Pawlak U., E. Paszkowski, M. Jurkowski (2017). *Relations between seed yield and plant nitrogen contents in three *Festuca* species*’ poster + streszczenie w materiałach pokonferencyjnych. Konferencja krajowa pt. „Inżynieria produkcji rolniczej i leśnej” SGGW, Warszawa, 08 – 09 czerwca 2017.

Żurek G., Martyniak D., Prokopiuk K., Woźna – Pawlak U., E. Paszkowski, M. Jurkowski (2017). „Factor affecting seed yield in selected *Festuca* species” – poster + streszczenie w materiałach pokonferencyjnych. Konferencja Międzynarodowa EUROBIOTECH (6th Central European Congress of Life Sciences), Kraków, 11 – 14 września 2017.

Żurek G., Wiewióra B., Prokopiuk K., Martyniak D., Woźna – Pawlak U., E. Paszkowski, M. Jurkowski (2018). „Identification of main factors determining seed production of three *Festuca* species and its relation to potential endophyte propagation” poster + streszczenie w materiałach pokonferencyjnych. Konferencja międzynarodowa, 10th Int. Symposium on Fungal Endophytes of Grasses, Salamanca, Hiszpania, 18 – 21 czerwca 2018.

Żurek G., Martyniak D., Prokopiuk K., Woźna – Pawlak U., E. Paszkowski, M. Jurkowski (2019). „Macronutrients in grass plants and its effect on seed yield” poster + streszczenie w materiałach pokonferencyjnych. Konferencja Międzynarodowa EUROBIOTECH (7th Central European Congress of Life Sciences), Kraków, 23 – 25.09.2019.

Literatura

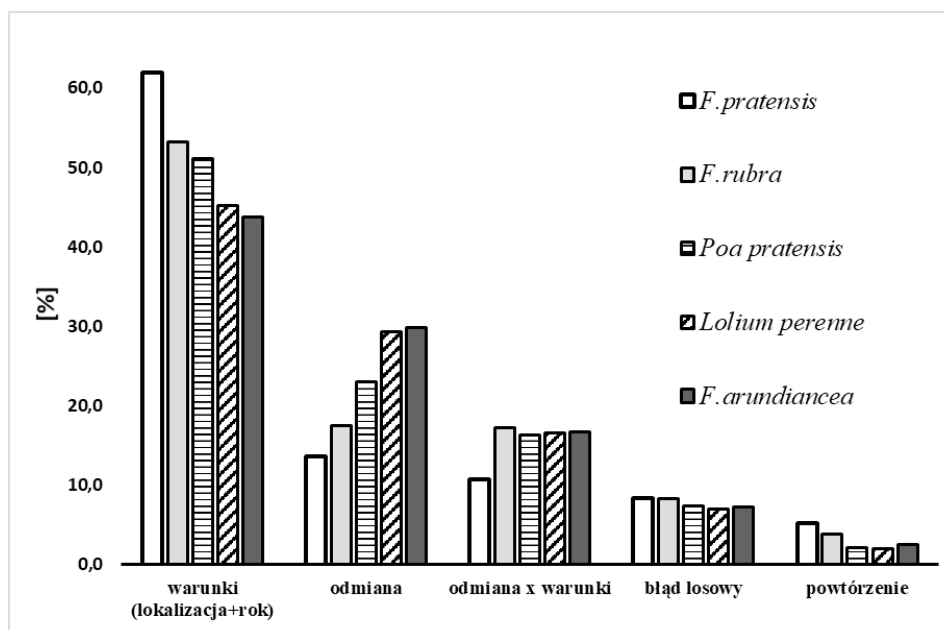
Fjellheim S., Rognli O. A., Fosnes K., Brochman C. (2006). Phylogeographical history of the widespread meadow fescue (*Festuca pratensis* Huds.) inferred from chloroplast DNA sequences. *J. Biogeography*, 33: 1470 – 1478.

Gaborcik N. (2003). Relationship between contents of chlorophyll (a+b) (SPAD values) and nitrogen of some temperate grasses. *Photosynthetica*, 41 (2): 285 – 287.

Mądry W. (2002). Skuteczność kryterium YS Kanga, opartego na średniej i stabilności plonu w wyborze genotypów zbóż o szerokiej adaptacji w rejonie uprawnym. *Roczn. Nauk Roln. Seria A*. 116: 11 – 24.

Rajfura A., Mądry W. (2001). Metoda wyboru genotypów o szerokiej adaptacji wykorzystująca zarówno ich średnie w rejonie jak i stabilność plonowania. *Coll. Biom.*: 169 – 182.

Rognli O.A., Saha M. C., Bhamidimarri S., van der Heijden S. (2010). *Fescues*. W: B. Boller i wsp. (wyd.) *Fodder Crops and Amenity Grasses, Handbook of Plant Breeding 5*, Springer Science+Business Media, 261 – 292.



Rys. 1. Średni udział czynników zmienności w kształtowaniu zróżnicowania obiektów badanych w doświadczeniu.

Tabela 1

Współczynniki korelacji zawartości azotu z badanymi cechami.

Cecha	<i>Festuca:</i>			<i>Poa pratensis</i>	<i>Lolium perenne</i>					
	<i>arundinacea</i>	<i>pratensis</i>	<i>rubra</i>							
przezimowanie	-0,11	n.i.	-0,84	***	0,49	n.i.	-0,12	n.i.	0,14	n.i.
pokrój	0,35	n.i.	0,75	***	0,19	n.i.	-0,26	n.i.	0,52	**
liczba dni do kłoszenia	0,50	n.i.	-0,32	n.i.	-0,30	n.i.	0,40	n.i.	-0,39	n.i.
liczba dni do kwitnienia	0,24	n.i.	-0,46	n.i.	0,28	n.i.	0,37	n.i.	-0,49	**
plon zielonej masy	0,52	**	-0,77	***	-0,26	n.i.	-0,55	**	0,40	n.i.
osypywanie	0,57	n.i.	-0,15	n.i.	0,41	n.i.	-0,16	n.i.	0,25	n.i.
wysokość roślin	0,82	***	0,39	n.i.	0,62	**	-0,37	n.i.	0,76	***
długość liścia podflagowego	0,89	***	0,79	***	0,58	**	-0,06	n.i.	0,67	**
szerokość liścia podflagowego	0,91	***	0,85	***	0,63	**	0,80	***	0,87	***
liczba pędów generatywnych	-0,82	***	-0,76	***	-0,45	n.i.	-0,41	n.i.	-0,62	***
plon nasion z kwiatostanu	0,92	***	0,45	n.i.	0,63	**	0,42	***	0,19	n.i.
plon nasion z rośliny	-0,29	n.i.	-0,59	**	0,24	n.i.	-0,33	***	0,28	n.i.
plon nasion z poletka	-0,36	n.i.	-0,26	n.i.	0,35	n.i.	-0,30	***	0,21	n.i.
długość kwiatostanu	0,95	***	0,66	**	0,55	**	-0,06	n.i.	0,70	***

Objaśnienie: istotność statystyczna współczynnika korelacji: P=95% – **, P=99% – ***, brak istotności – n.i.

Badania nad saturacją mapy genetycznej ‘Elsanta’ x ‘Senga Sengana’ pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria* × *ananassa*)

Research on saturation of the genetic map of ‘Elsanta Senga’ × ‘Sengana’ for locating genes linked to important traits of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*)

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz✉, Agnieszka Masny, Bogusława Idczak, Krystyna Strączyńska, Małgorzata Korbin

Instytut Ogrodnictwa-Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice

✉ e-mail: Sylwia.Keller@inhort.pl

Słowa kluczowe: jakość owoców, korelacja fenotypowo-genotypowa, mapa genetyczna, QTL, truskawka

Cel prowadzonych badań

Celem badań było pozyskanie dużej populacji segregującej ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’ i ocena genotypowo – fenotypowa roślin mieszańcowych pod kątem tolerancji na czynniki biotyczne i abiotyczne, a także ocena wybranych parametrów jakości owoców pojedynków należących do przygotowanej do tego celu sub-populacji (A), utrzymywanej w kwaterze polowej.

Materiały i Metody

Dla wszystkich roślin przeznaczonych do badań genotypowo-fenotypowych przeprowadzono weryfikację tożsamości genetycznej. Na tej podstawie wyeliminowano pojedyncze genotypy (łącznie 5) pochodzące z niekontrolowanego zapylenia odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’.

Pojedynki z sub-populacji B – I (2014–2020) po ocenie czystości genetycznej włączono do populacji bazowej (sub-populacja A) dla zagęszczenia mapy genetycznej (analizy molekularne), na bazie której przeprowadzono ocenę korelacji fenotypowo-genotypowych oraz analizę terminalną wytypowanych grup sprzężeń (MapQTL 6.0).

W wyniku krzyżowań form rodzicielskich ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’, zróżnicowanych pod kątem cech użytkowych, uzyskano łącznie 1 146 roślin. Uzyskane sub-populacje (B – I), w każdym odrębnym sezonie badawczym, traktowano izolatami patogenów chrobotwórczych jak: *Verticilium dahliae* (C, 2014) – sprawca

werticiliozy, *Colletotrichum acutatum* (D, 2015) – sprawca antraknozy, *Micosphaerella fragariae* (E, 2016) – sprawca białej plamistości, *Sphaero-teca macularis* (F, 2017) – sprawca mączniaka prawdziwego, *Phytophthora cactorum* (G, 2019) – sprawca zgnilizny korony korzeni oraz poddano działaniu czynników abiotycznych jak: stres mrozu (B, 2014), deficyt wody (H, 2018), stres zasolenia podłoża (I, 2020). Ocenę roślin wszystkich sub-populacji przeprowadzono w warunkach kontrolowanych (szklarnia). Równolegle dla roślin z sub-populacji A (wysadzone i utrzymywane w warunkach polowych) corocznie prowadzono ocenę skolekjonowanych owoców pod kątem jędrności oraz zawartości ekstraktu i witaminy C.

Dla wszystkich badanych cech oraz alleli markerów SSR (700 par oligonukleotydów) oceniono rozkład w badanej populacji (sporządzenie mapy genetycznej, JoinMap 3.0), który wskazał na wystąpienie zjawiska segregacji w puli genotypów mieszańcowych.

Opis wyników

W ramach zadania zweryfikowano przydatność populacji dla przeprowadzenia szeroko zakrojonych badań genetycznych. Dane skolekjonowane z analiz genotypowych i fenotypowych roślin przygotowanych sub-populacji przeznaczono do procedury mapowania genetycznego oraz analizy regionów QTL cech ilościowych, wyodrębnionych z map genomów odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’.



Uzyskano odrębne mapy genetyczne dla genotypów obu odmian. Łącznie przetestowano 650 markerów SSR wykazujących wysoki stopień heterozygotyczności, wytypowanych do badań form rodzicielskich (Sargent, 2008; 2009; 2012; Zorri-la-Fontanesi, 2011).

Dla markerów tych zidentyfikowano łącznie 989 alleli polimorficznych, segregujących w populacji mapującej, które wykorzystano od sporządzenia map genetycznych. W genomie odmiany 'Elsanta' zidentyfikowano 120 grup sprzężeń pokrytych 536 allelami markerów SSR. Łącznie zmapowano 2 362 cM genomu tej odmiany. Na mapie odmiany 'Senga Sengana' natomiast zidentyfikowano łącznie 87 grup sprzężeń pokrytych 453 allelami SSR, a wielkość jej zmapowanego genomu wyniosła 2 061 cM. Uzyskana mapa posłużyła jako baza do analizy regionów QTL regulujących badane cechy gatunku *Fragaria*.

Ocenę korelacji fenotypowo-genotypowych w sub-populacjach badanych w latach 2014 – 2020 (A – I), przeprowadzono po potwierdzeniu statusu mieszańców (analiza polimorfizmu DNA po amplifikacji z 5 oligonuleotydami mikrosatelitarnymi).

Zestawienie danych mapowych oraz danych z oceny fenotypowej pozwoliło na wyodrębnienie w obu genomach regionów odpowiedzialnych za regulację cech tolerancji na patogeny *Verticillium dahliae*, *Colletotrichum acutatum*, *Micosphaerella fragariae*, *Sphaeroteca macularis*, *Phytophthora cactorum* oraz tolerancji na stres mrozu, suszy i zasolenia podłoża. (Jęcz i wsp. 2015, Korbin i wsp. 2019, Keller-Przybyłkiewicz i wsp. 2020 a, b, Keller-Przybyłkiewicz i Abdel-Rahman Moustafa Abdel-Wahab Mohamed 2020 – in press)

W genomach obu odmian zidentyfikowano regiony QTL sprzężone ze wszystkimi badanymi cechami. Niemniej jednak stopień korelacji pomiędzy wartością cechy a loci zmapowanych markerów w zidentyfikowanej grupie sprzężeń był zróżnicowany. W przypadku cechy jędrności istotną korelację odnotowano w LG 2 genomu odmiany 'Elsanta', LG 5 genomu odmiany 'Senga Sengana' oraz w LG 4 genomów obu odmian. W przypadku zawartości kwasu askorbinowego w owocach obu odmian największy stopień korelacji odnotowano w LG 3, 4 oraz 7. Dodatkowe regiony zawierające stosunkowo niski, ale istotny stopień korelacji zidentyfikowano w LG 1 i 2 genomu odmiany 'Senga Sengana'. Ponadto dla cechy zawartości ekstraktu w homogenacie z owoców truskawki oszacowano wysoki stopień korelacji w LG 6 i 7 genomów obu badanych odmian (Rys. 1).

Dawcą alleli skorelowanych z cechą tolerancji

na stres niskich temperatur i deficyt wody okazała się odmiana 'Elsanta', a markery regulujące stopień reakcji roślin truskawki na ww. czynniki zidentyfikowano w LG 2, 5 i 7. Niski ale istotny stopień korelacji dla tych samych cech oszacowano dla markerów zlokalizowanych w LG 2 i 5 genomu odmiany 'Senga Sengana'. Natomiast dla cechy tolerancji na wysoki stopień zasolenia gleby zidentyfikowano istotną zależność pomiędzy markerami zlokalizowanymi w LG 2 i 7 genomu odmiany 'Elsanta', a wartością ocenianą w populacji reakcji na zastosowanie wysokiej dawki nawozu.

W przypadku ocenianej cechy tolerancji na porażenie *Sphaeroteca macularis* (sprawca mączniaka prawdziwego) istotny stopień korelacji odnotowano dla markerów zmapowanych w LG 3 genomu odmiany 'Elsanta' oraz LG 1 genomu odmiany 'Senga Sengana'. Markery zlokalizowane w LG 1 genomów obu badanych odmian wykazały natomiast wysoki stopień korelacji z tolerancją na porażenie *Colletotrichum acutatum* (sprawca antraknozy), a zmapowane na LG 4 były istotnie powiązane z wartością cechy tolerancji na *Micosphaerella fragariae* (sprawca białej plamistości). Dość istotnie skorelowane z odpornością na ten patogen okazały się również markery zlokalizowane w LG 2 genomu odmiany 'Elsanta'. Regiony o wysokim współczynniku korelacji z cechą tolerancji na werciliozę oraz zgniliznę korony truskawki zidentyfikowano w LG 3 genomów obu odmian, natomiast dodatkowe fragmenty QTL sprzężone z regulacją tolerancji na porażenie przez *V.dahliae* oraz *P. cactorum* zidentyfikowano również w LG 1, 2, 6 i 7 u odmiany 'Sengan Sengana' oraz w LG 4 i 5 u odmiany 'Elsanta'.

Na podstawie przeprowadzonej wielosezonowej oceny jakości owoców zidentyfikowano potencjalne markery (FVH4040, FVH4010, DY676211, EX662245, EX66240, CX662065, CHFv2013, CHFam129) (Tab. 1) regulujące parametry jakości owoców (dane z sezonów 2016–2019), dla których odnotowano sezonowo – stabilną wartość współczynnika korelacji. Markery te mogą stanowić bazę dla selekcji nowych genotypów produkujących wysokiej jakości owoce truskawki, uzyskanych w programach hodowlanych.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Rozkład cech tolerancji na badane stesy biotyczne i abiotyczne w ocenianej populacji wskazał na wystąpienie zjawiska segregacji w puli genotypów mieszańcowych, a więc jest to właściwa dla badań genetycznych populacja mapująca.

2. Rozkład alleli pochodzących z form rodzicielskich wskazał, że genotypy wykorzystane dla celów zagęszczania mapy genomów truskawki mają status mieszańców z planowanego zapylenia.
3. Zagęszczona mapa genetyczna 'Elsanta' × 'Senga Sengana' stanowi bazę loci genów przydatną do badań nad identyfikacją regionów QTL sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki.
4. Analiza regionów QTL w grupach sprzężeń LG 2, 4, 6 i 7 genomów badanych odmian truskawki wskazuje na najwyższy stopień korelacji markerów na nich zlokalizowanych z badanymi cechami użytkowymi tego gatunku.

Osiągnięcia projektu

Programy krzyżowań dwóch odmian truskawki 'Elsanta' i 'Senga Sengana', przeprowadzone w ramach prac genetyczno – hodowlanych, pozwoliły na wykazanie zróżnicowania stopnia dziedziczenia szerokiego spektrum cech użytkowych gatunku *Fragaria*. W obrębie wszystkich sub-populacji obserwowano segregację ocenianych parametrów fenotypowych. Badania pozwoliły też na określenie, która z wytypowanych form rodzicielskich jest nośnikiem największej liczby przydatnych alleli genów regulujących pożądane cechy. Z przeprowadzonych badań zaobserwowano, że nośnikiem cech tolerancji na choroby jest odmiana 'Elsanta', natomiast pulą cennych alleli skorelowanych z jakością owoców dysponuje odmiana 'Senga Sengana'. Wiedza ta jest przydatna do ukierunkowywania badań hodowlanych z użyciem obu odmian.

Przeprowadzone badania znacznie poszerzyły wiedzę dotyczącą struktury genomów obu badanych odmian. Sporządzone mapy genetyczne i wytypowane na podstawie ich analizy regiony QTL pozwoliły na zbudowanie cennej bazy sekwencji markerów przydatnych do szybkiej selekcji (MAS, Marker Assisted Selection), zarówno genotypów mieszańcowych uzyskanych w wyniku planowanych programów krzyżowań z udziałem obu odmian, jak również do wczesnej charakterystyki nowo wytworzonego materiału hodowlanego tego gatunku.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje naukowe

Korbin M, Keller-Przybyłkiewicz S, Masny A., Idczak B,

Strączyńska K. 2019. Badania nad saturacją mapy genetycznej 'Elsanta' × 'Senga Sengana' pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria* × *ananassa*). Biuletyn IHAR 286: 389-392

Keller-Przybyłkiewicz S, Masny A, Idczak B, Strączyńska K. 2020. Badania nad saturacją mapy genetycznej 'Elsanta' x 'Senga Sengana' pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria* x *ananassa*). Biuletyn IHAR 291(1): 205-207.

Keller-Przybyłkiewicz S., Abdel-Rahman Moustafa Abdel-Wahab Mohamed. (2020). Trait inheritance potential of 'Elsanta' and 'Senga Sengana', revealed by QTL evaluation. 137_2020 HortiSci. (publikacja w recenzji)

Keller-Przybyłkiewicz S., Masny A., Idczak B., Strączyńska K., Abdel-Rahman Moustafa Abdel-Wahab Mohamed. (2020). Przygotowanie populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana' dla analizy regionów QTL sprzężonych z wybranymi cechami użytkowymi gatunku *Fragaria*. Biuletyn IHAR 291: 3–19, DOI: 10.37317/biul-2020-PB80

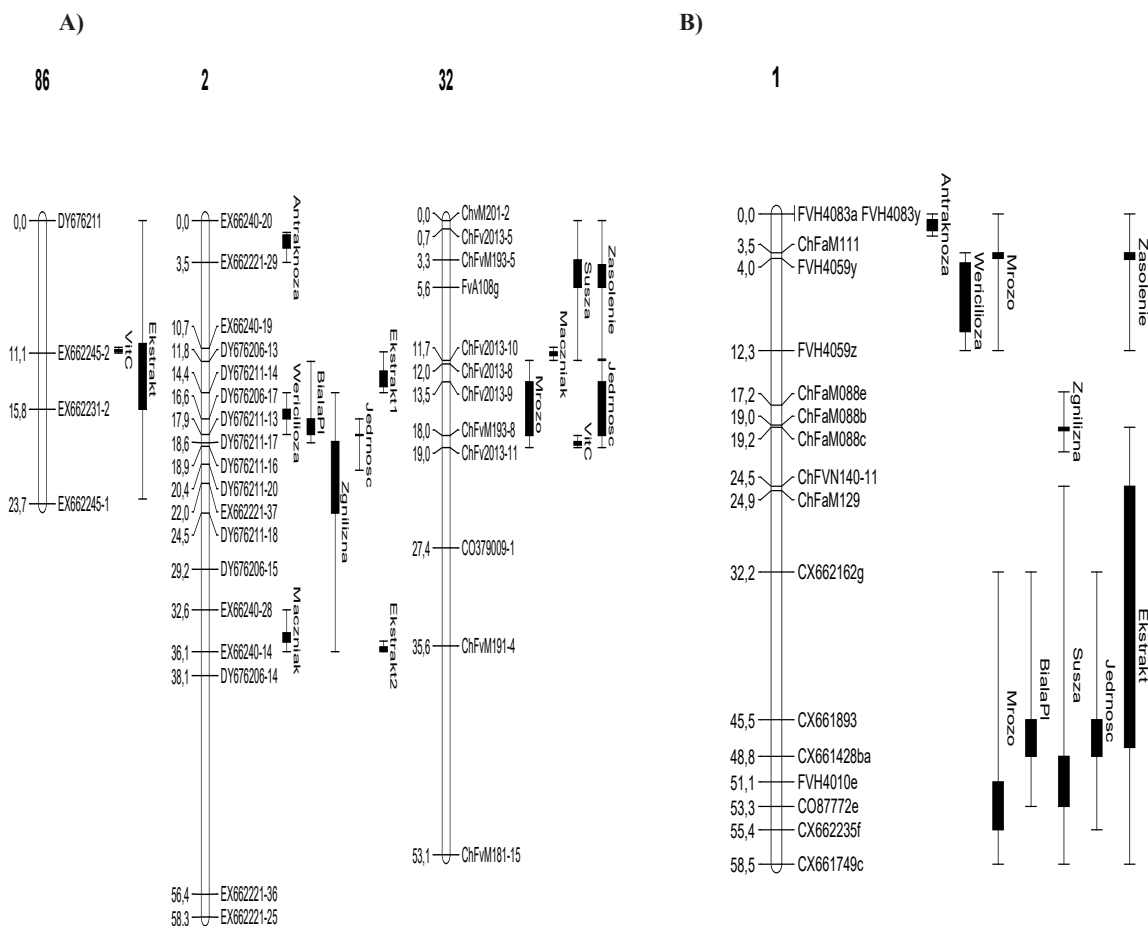
Doniesienia na konferencjach (abstrakty)

Jęcz T., Strączyńska K., Korbin M. (2015). Ocena populacji truskawki 'Elsanta' x 'Senga Sengana' pod względem podatności na porażenie przez *Verticillium dahliae*. IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, 14–16 września 2015, Wrocław.

Keller-Przybyłkiewicz S., Napiórkowska B., Jęcz T., Korbin M. (2015). Ocena stopnia konserwatywności markerów SSR użytych do mapowania genomu truskawki 'Elsanta' x 'Senga Sengana'. IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, 14–16 września 2015, Wrocław.

Keller-Przybyłkiewicz S., Napiórkowska B., Strączyńska K., Masny A, Jęcz T., Abdel-Rahman Moustafa Abdel-Wahab Mohamed, Korbin M, (2017). Korelacja genotypowo-fenotypowa dla wybranych cech użytkowych truskawki odmian 'Elsanta' i 'Senga Sengana'. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa pt. 'Ziemia, Roślina, Człowiek' z okazji 30-lecia Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Kraków, 20–21 września 2017. Materiały Konferencyjne, str. 98

Keller-Przybyłkiewicz S., Masny A., Abdel-Rahman Moustafa Abdel-Wahab Mohamed, Napiórkowska B., Strączyńska K., Korbin M. (2018). Identification of genetic regions of 'Elsanta' and 'Senga Sengana' genomes correlated with quantitative loci of selected agronomic traits. Eucarpia-Biometrics 2018. Streszczenia str. 96



Rys. 1. Przykładowe regiony QTL zidentyfikowane w LG 6 na mapach genetycznych odmian: A) ‘Elsanta’, B) ‘Senga Sengana’).

Tabela 1

Markery przydatne do zastosowania w selekcji Marker Assisted Selection, MAS.

Nazwa Markera	Regulowana cecha
EX66240	Jędrność owoców
CX662065	Zaw. Wit. C
EX662245	Zaw. Ekstraktu
CHFv2013	Zaw. Wit. C
DY676211	Zaw. Ekstraktu
FvH4040	Zaw. Ekstraktu, Zaw. Wit. C
FvH4010	Jędrność owoców, Zaw. Ekstraktu
CHFam129	Zaw. Ekstraktu Jędrność owoców

Badania nad możliwością zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w owocach truskawki na drodze hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*

Studies on possibilities of increasing of bioactive compounds in strawberry fruits through intra- and interspecific hybridization within *Fragaria* genus

Agnieszka Masny✉, Monika Mieszczakowska-Frać, Anita Kuras, Edward Żurawicz

Instytut Ogrodnictwa - Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice
✉ e-mail: Agnieszka.Masny@inhort.pl

Słowa kluczowe: antocyjany, jakość owoców, kwas L-askorbinowy, polifenole, truskawka

Cel badań

Prace badawcze nad poszerzaniem zmienności genetycznej u truskawki w Instytucie Ogrodnictwa - PIB w Skierniewicach obecnie ukierunkowane są głównie na poprawę zewnętrznej i wewnętrznej jakości owoców. Celem badań było określenie możliwości zwiększenia właściwości odżywczych i prozdrowotnych owoców truskawki poprzez zwiększenie w nich zawartości substancji bioaktywnych (przede wszystkim polifenoli, antocyjanów oraz kwasów organicznych) metodą hodowli konwencjonalnej z wykorzystaniem hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*. Cel ten został osiągnięty.

Material i Metody

Przedmiotem badań były mieszańce pokolenia F_1 , uzyskane z programu krzyżowań z udziałem genotypów z rodzaju *Fragaria* o wysokiej zawartości związków antyoksydacyjnych w owocach: odmian uprawnych z gatunku $F. \times ananassa$, a także form dzikich z gatunków oktoploidalnych: *F. chiloensis* i *F. virginiana* oraz diploidalnych: *F. vesca*, *F. iinumae* i *F. nubicola*. W latach 2014–2015 wykonano 163 kombinacje krzyżowań z użyciem 38 genotypów z rodzaju *Fragaria* (w tym 9 form dzikich) jako formy mateczne oraz 5 odmian należących do gatunku $F. \times ananassa$ jako formy ojcowskie. Łącznie uzyskano 12 451 siewek, które posadzono w doświadczeniu polowym w dwóch seriach (6 354 siewki w serii I oraz 6 097 w serii

II). Przez dwa sezony (2015–2016 i 2016–2017) prowadzono ich ocenę bonitacyjną pod względem plonu, wielkości, atrakcyjności i jędrności owoców, a także podatności roślin na białą i czerwoną plamistość liści oraz mączniaka prawdziwego truskawki. W latach 2016–2017 wyselekcjonowano i rozmnożono 180 najbardziej wartościowych genotypów i posadzono je w dwóch doświadczeniach porównawczych (po 15 roślin każdego genotypu). Przez kolejne trzy sezony (2017–2019 i 2018–2020) oceniano ich plon, liczbę i masę owoców, procentowy udział owoców chorych w ogólnej liczbie zebranych owoców, wielkość, atrakcyjność, kształt, barwę i jędrność owoców, a także stopień porażenia roślin przez białą i czerwoną plamistość liści oraz mączniaka prawdziwego truskawki. W dwóch sezonach (2017–2018 i 2018–2019) wykonano analizę zawartości substancji rozpuszczalnych, kwasowości miareczkowej i czynnej, zawartości związków fenolowych ogółem oraz barwników antocyjanowych, zawartości kwasu askorbinowego, jabłkowego i cytrynowego w owocach. Owoce 60 genotypów, odznaczających się najwyższym poziomem składników bioaktywnych w owocach, w latach 2018–2019 i 2019–2020 poddano analizie profili i analizie ilościowej antocyjanów i monomerycznych polifenoli oraz ocenie zawartości procyanidyn i kwasu elagowego. Ponadto, dla odmian rodzicielskich w latach 2014–2015 wykonano ocenę polimorfizmu DNA, zaś dla 60 najlepszych mieszańców przeprowadzono w latach



2018–2020 weryfikację statusu mieszańca.

Wyniki

W latach 2014–2015 wykonano ocenę polimorfizmu 39 odmian rodzicielskich przed włączeniem ich do programu krzyżowań. Łącznie na matrycach DNA wydzielonych z badanych genotypów rodzicielskich truskawki przeprowadzono 4 050 reakcji amplifikacji. W reakcjach z wytypowanymi starterami mikrosatelitarnymi uzyskano polimorficzne amplikony, różnicujące wszystkie analizowane genotypy. Analizowane genotypy truskawki scharakteryzowano na podstawie 11-25 fragmentów DNA, w pełni odróżniających ich DNA od materiału genetycznego pozostałych badanych genotypów (Kuras, i in., 2016). Zgromadzona biblioteka amplikonów DNA posłużyła do określenia pokrewieństwa badanych form rodzicielskich.

Oceniono możliwość skrzyżowania 38 genotypów truskawki, będących formami matecznymi (w tym 9 form dzikich z rodzaju *Fragaria*) z 5 genotypami ojcowskimi, będącymi źródłem pyłku (*F. × ananassa*). Łącznie wykonano 163 kombinacje krzyżowań, w tym 117 krzyżowań wewnątrzgatunkowych i 46 krzyżowań międzygatunkowych. Jednak w przypadku 3 kombinacji krzyżowań wewnątrzgatunkowych, a także 24 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych z zapylnych kwiatów nie uzyskano żadnego owocu. Zaobserwowano także brak kiełkowania nasion w przypadku 11 innych kombinacji krzyżowań wewnątrzgatunkowych oraz 5 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych. Łącznie otrzymano siewki (w liczbie 12 451) tylko w przypadku 120 kombinacji krzyżowań, z czego 1 619 siewek to mieszańce międzygatunkowe, uzyskane z 17 kombinacji krzyżowań międzygatunkowych. Prawie wszystkie otrzymane mieszańce międzygatunkowe pochodziły z krzyżowania dwóch gatunków oktoploidalnych (*F. chiloensis* × *F. × ananassa*). Z krzyżowania formy diploidalnej z oktoploidalną otrzymano zaledwie 25 mieszańców, pochodzących od *F. vesca ssp. vesca* Korsica, ale status mieszańca potwierdzono tylko dla 12 z nich. Jednocześnie wykazano, że uzyskanie mieszańców w obrębie rodzaju *Fragaria* na drodze hybrydyzacji oddalonej, wykonanej w szklarni jest bardziej efektywne, niż w polu, gdzie obserwowano zamieranie kwiatów w krótkim czasie po ich zapyleniu.

Wyniki oceny fenotypowej 12 451 siewek (6 354 siewki w serii I oraz 6 097 w serii II) wykazały, że badane siewki w większości plonowały słabo; zaledwie około 5% siewek uznano za bardzo plenne. Dużymi i bardzo dużymi owocami wyróżniało

się około 30% siewek. Większość siewek posiadała owoce atrakcyjne lub bardzo atrakcyjne w wyglądzie. Ponad 60% mieszańców wytwarzało owoce jędrne lub bardzo jędrne (Masny, Żurawicz, 2016; 2017). Około 97% mieszańców nie wykazywało porażenia roślin przez białą plamistość liści, u około 2% mieszańców nie zaobserwowano objawów czerwonej plamistości liści, zaś ponad 75% mieszańców nie wykazywało objawów mączniaka (Masny, Żurawicz, 2015; 2016; 2017).

W oparciu o uzyskane wyniki oceny siewek, wyselekcjonowano i rozmnożono (przez sadzonki rozłogowe lub podział roślin matecznych) do dalszych badań 180 najbardziej wartościowych pojedynków. Wyselekcjonowane genotypy w większości pochodziły ze skrzyżowania odmian uprawnych *F. × ananassa*. Jedynie dla 9 genotypów formą mateczną była jedna z oktoploidalnych form z gatunku *F. chiloensis*. W latach 2016 i 2017 (jesienią) założono dwa odrębne doświadczenia; w każdym z nich posadzono 90 genotypów. W wyniku przeprowadzonej oceny wykazano, że niektóre z wyselekcjonowanych klonów odznaczały się nie tylko wysoką plennością i jakością zewnętrzną owoców (wielkością, atrakcyjnością i jędrnością), ale również ponadprzeciętną zawartością fenoli, antocyjanów i kwasu askorbinowego w owocach. Były to klony o następujących numerach: T-201444-01 ('Roxana' × 'Pink Rosa'), T-201458-08 i T-201458-10 ('Pink Rosa' × 'Elsanta'), T-201514-02 ('Candiss' × 'Panvik') oraz T-201567-04 ('Patty' × 'Panvik'). Ponadto, wysoką zawartością w owocach co najmniej dwóch, spośród trzech wymienionych składników bioaktywnych charakteryzowało się innych 76 klonów (Masny, i in., 2020b, 2019a, 2019b; Masny, Mieszczakowska-Frać, 2020a).

Dla 60 genotypów truskawki przeprowadzono szczegółową analizę pod względem zawartości procyjanidyn i kwasu elagowego oraz wykonano profile i analizę ilościową antocyjanów i monomerycznych polifenoli w owocach. Najwyższą zawartość większości badanych związków bioaktywnych (antocyjany, kwas elagowy, katechina i procyjanidyny) stwierdzono w owocach genotypów: T-201457-03 ('Grandarosa' × 'Elsanta'), T-201458-01 i T-201458-06 ('Pink Rosa' × 'Elsanta'), a także T-201512-04 i T-201512-05 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201513-02 ('Candiss' × 'Matis'), T-201514-02 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201517-04 ('Chandler' × 'Matis') oraz T-201525-01 ('Cifrance' × 'Panvik'). Najuboższe w związki bioaktywne były natomiast owoce klonów T-201486-05 ('Camarosa' × 'Matis') i T-201536-06

(‘Clery’× ‘Grandarosa’). Wykazano także, że badane klony różniły się profilem antocyjanów, jednak zawsze dominującym związkiem był glukozyd pelargonidyny, którego udział procentowy mieścił się w przedziale 10,7,0% do 91,1%, a następnie malonyloglikozyd pelargonidyny (0,1% - 34,1%). Pozostałe antocyjany: glukozyd cyjanidyny, rutozyd pelargonidyny i malonyloglikozyd cyjanidyny stanowiły maksymalnie 16,9; 10,2 i 10,8% wszystkich antocyjanów. Najwyższy procentowy udział w grupie monomerycznych związków fenolowych miała katechina, której zawartość w owocach mieściła się w zakresie od 1,7 do 39,3 mg/100 g. Oprócz katechiny, w owocach odnotowano również śladowe ilości innych monomerów flawanoli takich jak: epikatechina, afzelechina i epiafzelechina. Zawartość procyanidyn w owocach badanych klonów wahała się od 75,5 do 721,3 mg/100 g.

Dla 60 genotypów o najwyższych zawartościach związków bioaktywnych w owocach przeprowadzono 5 778 reakcji amplifikacji, w których wygenerowano 1 364 amplikony, w tym 1 183 polimorficzne. Długość amplikonów wahała się od 170 do 450 pz. Analizowane genotypy truskawki scharakteryzowano na podstawie 8–18 polimorficznych fragmentów DNA. Dla wszystkich testowanych genotypów oszacowano procentowy udział amplikonów pochodzących od formy matecznej i ojcowskiej. Status mieszańca z planowanego zapylenia potwierdzono dla 59 z 60 testowanych genotypów.

Wnioski

1. Uzyskanie nasion (i siewek) w wyniku hybrydyzacji oddalanej w obrębie rodzaju *Fragaria* w polu jest trudniejsze niż w warunkach szklarniowych, gdyż często dochodzi do zamierania kwiatów w krótkim czasie po ich zapyleniu, co uniemożliwia rozwój owoców i uzyskanie nasion.
2. Hybrydyzacja oddalona z użyciem gatunków oktoploidalnych jest bardziej efektywna, niż hybrydyzacja gatunków o różnym stopniu ploidalności.
3. Użycie do krzyżowań badanych form rodzicielskich z rodzaju *Fragaria* pozwala na uzyskanie licznych mieszańców o jędrnych i atrakcyjnych owocach (duże, wyrównane w kształcie, jasno- lub intensywnie czerwone, o silnym połysku), tolerancyjnych na choroby grzybowe liści (biała i czerwona plamistość liści, mączniak prawdziwy truskawki).
4. Obecność odmian ‘Grandarosa’ i ‘Pink Rosa’ w rodowodach większości mieszańców, wytwarzających duże, jędrne i atrakcyjne

w wyglądzie owoce, wskazuje na wysoką przydatność tych odmian do hodowli ukierunkowanej na uzyskanie nowych odmian deserowych.

5. Klony T-201430-01 (rodowód ‘Madeleine’× ‘Pink Rosa’), T-201436-04 (‘Onda’× ‘Grandarosa’), T-201444-01 (‘Roxana’× ‘Pink Rosa’), T-201457-11 (‘Grandarosa’× ‘Elsanta’), T-201458-01, T-201458-08, T-201458-10 i T-201458-17 (‘Pink Rosa’× ‘Elsanta’), T-201488-07 (‘Vibrant’× ‘Matis’), T-201514-01 (‘Candiss’× ‘Panvik’) i T-201560-07 (‘Onda’× ‘Panvik’), ze względu na wysoką jakość owoców, są genotypami perspektywicznymi do uprawy towarowej, spełniającymi oczekiwania konsumentów i plantatorów.
6. Klony T-201407-04 (rodowód ‘Camarosa’× ‘Pink Rosa’), T-201458-07 i T-201458-09 (‘Pink Rosa’× ‘Elsanta’), T-201488-07 (‘Vibrant’× ‘Matis’), T-201513-02 (‘Candiss’× ‘Matis’), T-201514-02 i T-201514-08 (‘Candiss’× ‘Panvik’), T-201526-04 (‘Cigaline’× ‘Grandarosa’), T-201567-04 (‘Patty’× ‘Panvik’) oraz T-201571-02 (‘Sophie’× ‘Pink Rosa’), ze względu na wysoką zawartość w owocach takich związków bioaktywnych, jak związki polifenolowe, antocyjany oraz kwas askorbinowy, są szczególnie cenne dla diety człowieka.

Osiągnięcia projektu

Wykonane badania pozwoliły na uzyskanie, na drodze hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*, nowych innowacyjnych genotypów, łączących w sobie różne, pożądane cechy biologiczne, w tym zwłaszcza zwiększoną zawartość składników bioaktywnych w owocach (fenole, antocyjany, kwas askorbinowy i elagowy) z ich dobrą jakością zewnętrzną (wielkość, atrakcyjność i jędrność), wysoką plennością, a także małą podatnością/odpornością roślin na groźne choroby grzybowe liści. Genotypy te rozmnożono i włączono do zasobów genowych truskawki w Instytucie Ogrodnictwa - PIB jako potencjalne źródło cennych genów do przyszłych programów krzyżowań.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje naukowe

Masny, A., Mieszczakowska-Frać, M., Kuras, A., Żurawicz, E. (2020b). Badania nad możliwością zwiększenia zawartości

składników bioaktywnych w owocach truskawki na drodze hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*. Biuletyn IHAR, 291 (1), 209-211 (komunikat)

Masny, A., Mieszczakowska-Frać, M., Kuras, A., Żurawicz, E., Korbin, M. (2019a). Badania nad możliwością zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w owocach truskawki na drodze hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*. Biuletyn IHAR, 286, 393–396. DOI: 10.37317/biul-2019–0087 (komunikat)

Masny, A., Mieszczakowska-Frać, M. (2020a). Możliwości poprawy jakości owoców truskawki metodą hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*. Biuletyn IHAR 291, 63–73, DOI: 10.37317/biul-2020-PB86 (publikacja oryginalna)

Doniesienia konferencyjne (abstrakty)

Masny, A., Żurawicz, E. (2015). Podatność siewek truskawki na choroby liści w zależności od krzyżowanych genotypów rodzicielskich. IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Konferencja Naukowa pt. „Postęp w ogrodnictwie dla poprawy jakości życia i ochrony środowiska”, 14–16 września 2015, Wrocław, 207.

Kuras, A., Masny, A., Korbin, M. (2016). Molecular diversity

of selected *Fragaria* genotypes determined with microsatellite markers. Journal for scientific abstracts 3rd International Scientific Conference „Sustainable Fruit Growing: From Plant to Product”, August 17-19, 2016, Riga-Dobele, Latvia, 16.

Masny, A., Żurawicz, E. (2016). External fruit quality and leaf disease susceptibility of *Fragaria* hybrids from intra- and interspecific crosses. III International Symposium on Horticulture in Europe – Programme and Book of Abstracts, Chania, Creete, Greece, October 17-21, 2016, 151.

Masny, A., Żurawicz, E. (2017). Jakość owoców i podatność na choroby liści mieszańców truskawki z krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa „Ziemia, Roślina, Człowiek”, Kraków, 20–21 września 2017 r. Materiały konferencyjne, 110.

Masny, A., Mieszczakowska-Frać, M., Żurawicz, E. (2019b). Jakość i wartość prozdrowotna owoców wybranych klonów truskawki, uzyskanych z krzyżowań wewnątrz- i międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Fragaria*. V Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Konferencja Naukowa „Miejsce Ogrodnictwa we współczesnym życiu człowieka i ochronie środowiska, SGGW Warszawa, 16–18 września 2019 r. Streszczenia, 120.

Ocena potencjału genetycznego wybranych genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w oparciu o czynnikowy układ krzyżowań

Evaluation of the genetic potential of selected genotypes of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) based on a factorial crossing design

Stanisław Pluta✉, Łukasz Seliga, Anita Kuras, Danuta Kucharska, Małgorzata Podwyszyńska

Instytut Ogrodnictwa - PIB, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice
✉ e-mail: Stanislaw.Pluta@inhort.pl

Słowa kluczowe: GCA, jakość owoców, ocena fenotypowa, polimorfizm DNA, SCA

Cele prowadzonych badań

1. Ocena fenotypowa populacji siewek pokolenia F_1 borówki wysokiej pod kątem wybranych cech użytkowych, określenie poliploidalności 12 form rodzicielskich i 250 mieszańców oraz wybór wartościowych pojedynków i ich rozmnożenie *in vitro* i *ex vitro* – cel osiągnięty.
2. Ocena stopnia polimorfizmu DNA 12 form rodzicielskich, analiza genotypowa, potwierdzenie statusu mieszańca i pokrewieństwa genetycznego dla wybranych 20 pojedynków z populacji 2100 siewek oraz opracowanie dla nich „metek identyfikacyjnych” – cel osiągnięty.
3. Ocena sensoryczna (wygląd i smak) oraz instrumentalna (zawartość ekstraktu i witaminy C) w owocach 20 pojedynków i 12 odmian rodzicielskich borówki wysokiej – cel osiągnięty.
4. Oszacowanie ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej (GCA i SCA) form rodzicielskich borówki wysokiej, użytych w programie krzyżowań dla wybranych cech użytkowych oraz określenie ich przydatności do tworzenia nowej zmienności genetycznej – cel osiągnięty.

Materiały i Metody

Przedmiotem badań były rośliny 12 odmian (form) rodzicielskich borówki wysokiej (*V. corymbosum* L.), które skrzyżowano w układzie czynnikowym ($7♀ \times 5♂$). Genotypami

rodzicielskimi było 7 form matecznych ($♀$) – ‘Aurora’, ‘Bluecrop’, ‘Brigitta Blue’, ‘Chandler’, ‘Draper’, ‘Duke’ i ‘Northland’ oraz 5 form ojcowskich ($♂$) – ‘Earliblue’, ‘KazPliszka’, ‘Polaris’, ‘Toro’ i ‘Weymouth’. Wykonano 35 kombinacji krzyżowań, przeprowadzono stratyfikację nasion (dwie metody) i wyprodukowano populację siewek pokolenia F_1 (Pluta i in. 2019, Pluta i Seliga 2020). Materiał roślinny do badań stanowiły siewki pokolenia F_1 , łącznie 2100 szt. (35 kombinacji krzyżowań \times 4 powtórzenia \times 15 siewek/poletko).

W roku 2014 przeprowadzono badania molekularne nad zróżnicowaniem genetycznym 12 form rodzicielskich borówki wysokiej oraz utworzono biblioteki polimorficznych fragmentów DNA, mogących różnicować mieszańce uzyskane z programu krzyżowań w/w odmian.

W latach 2015–2020 wykonano ocenę fenotypową populacji mieszańcowej (2100 siewek): siła wzrostu – bonitacyjnie (1–9) oraz pomiar wysokości i szerokości roślin (cm), pokrój krzewu – bonitacyjnie (1–9), intensywność kwitnienia – bonitacyjnie (1–9), plonowanie (kg/poletko) i masa (wielkość) owoców (g).

W latach 2016–2018 zoptymalizowano warunki i rozmnożono *in vitro* oraz *ex vitro* (sadzonki zielne) 20 wyselekcjonowanych pojedynków i 5 odmian rodzicielskich jako materiał roślinny do doświadczenia odmianowo-porównawczego (Kucharska i in. 2018).

W roku 2017 zbadano skład chemiczny owoców (zawartość ekstraktu, kwasowości,

kwasu L-askorbinowego, antocyjanów i polifenoli) oraz aktywność przeciwutleniającą odmian rodzicielskich i wybranych pojedynków borówki wysokiej.

W latach 2019–2020 wykonano ocenę sensoryczną (wygląd i smak) oraz instrumentalną (zawartość ekstraktu i witaminy C) w owocach 20 pojedynków i 12 odmian rodzicielskich borówki wysokiej.

W latach 2019–2020 zweryfikowano status mieszańca dla wyselekcjonowanych 20 pojedynków oraz wykonano ocenę sensoryczną i instrumentalną ich owoców: wygląd (atrakcyjność), smak, zawartość ekstraktu refraktometrycznego (%) i witaminy C.

Analiza statystyczna. Dane poddano analizie statystycznej (ANOVA), do oszacowania efektów GCA i SCA użyto programu SERGEN (Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu).

Opis wyników

Wyniki oceny fenotypowej populacji siewek wykazały duże zróżnicowanie w sile wzrostu i pokroju roślin, intensywności kwitnienia, plonowania i masy owoców. Cechy morfologiczne i kwitnienie roślin uzależnione było od wieku siewek i ich rodowodu, czyli od krzyżowanych form rodzicielskich. Intensywność kwitnienia miała bezpośredni wpływ na zawiązanie owoców i plonowanie siewek, które było bardzo zróżnicowane. Średni plon owoców zawierał się od 0,34 do 0,43 kg/poletko dla wszystkich ocenianych siewek. Średnia masa owoców ocenianych siewek była także zróżnicowana (0,94–1,62 g) i uzależniona od ich rodowodu.

Wyniki oceny ploidalności uzyskane na podstawie histogramów analizy cytometrycznej wskazują, że odmiany rodzicielskie i wszystkie analizowane mieszańce borówki wysokiej okazały się tetraploidami ($2n=4x=48$).

Badane formy rodzicielskie różniły się zawartością ekstraktu, kwasowości, kwasu L-askorbinowego, antocyjanów, polifenoli i aktywnością przeciwutleniającą owoców. Najwyższe zawartości w/w bioaktywnych związków i aktywność przeciwutleniającą stwierdzono w owocach polskiej odmiany ‘KazPliszka’ oraz odmian ‘Northland’, ‘Duke’ i ‘Aurora’.

W badaniach molekularnych stwierdzono zróżnicowanie genetyczne 12 form rodzicielskich borówki wysokiej oraz utworzono bibliotekę polimorficznych fragmentów DNA, mogących różnicować mieszańce uzyskane z programu krzyżowań. Uzyskane dendrogramy (Jaccard-Dice/UPGMA) obrazujące pokrewieństwo form rodzicielskich

potwierdziły zgrupowanie genotypów w klastrach, które wywodziły się od odmian ‘Earliblue’, ‘Brigitta Blue’ lub ‘Bluecrop’.

Wykazano, że efektywność inicjacji, stabilizacji i rozmnażania *in vitro* borówki wysokiej była bardzo zróżnicowana, zależna od genotypu. Współczynnik namnażania kultur wynosił od 0,7 dla pojedynka 9P do 8,6 dla pojedynka nr 69. Odsetek eksplantatów, które podjęły namnażanie był dwukrotnie wyższy na pożywce z zeatyną w porównaniu do 2iP. Ukorzenianie pędów *in vitro* w perlicie, nasączonym płynną pożywką był efektywny i wynosił 68,6–97,8%. Odsetek ukorzenionych sadzonek zielnych był uzależniony od genotypu i wynosił 12,5–74,2% (Kucharska i in. 2018).

Przeprowadzone analizy molekularne dla wytypowanych 20 pojedynków borówki wysokiej potwierdziły status genetyczny mieszańca, porównując ich wzory prążkowe z wzorami form rodzicielskich.

Pokrewieństwo genetyczne analizowanych pojedynków borówki wysokiej, określone na podstawie danych uzyskanych w wyniku przeprowadzonych testów SSR, kształtowało się na poziomie 28–72%.

Wyniki oceny sensorycznej (degustacyjnej) wykazały, że owoce badanych pojedynków borówki wysokiej różniły się w atrakcyjności i smaku. Pojedynek 25C/1 (‘Draper’ x ‘Weymouth’) zdecydowanie przewyższał odmiany rodzicielskie pod względem tych cech. Inne pojedynki (4B/9, 6B/14, 22B/13, 23C/10 i 35B/1) dorównywały lub nieco przewyższały rodziców w ocenie sensorycznej jakości owoców.

W ocenie instrumentalnej stwierdzono także duże różnice w zawartości ekstraktu i witaminy C w owocach badanych pojedynków. Na wyróżnienie zasługuje pojedynek 22B/13 (‘Draper’ x ‘KazPliszka’), którego owoce były bogate w ekstrakt i witaminę C. Owoce pojedynków 4B/9, 6B/14, 23B/13, 23C/10 i 35B/1 zawierały więcej tych związków niż średnia ogólna dla wszystkich analizowanych pojedynków.

Analiza statystyczna wyników z oceny fenotypowej populacji siewek wykazała, że badane genotypy rodzicielskie borówki wysokiej różniły się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem siły wzrostu, pokroju roślin, intensywności kwitnienia, plonowania i masy owoców.

Oszacowane efekty GCA dla 12 form rodzicielskich oraz efekty SCA dla 35 rodzin mieszańcowych przyjmowały wartości istotne na plus lub minus. Istotne, dodatnie lub ujemne wartości efektów GCA form rodzicielskich użyte w programach

krzyżowań wskazują, że odmiany te są donorami genów warunkujących poprawę lub pogorszenie w/w cech u potomstwa. Istotne pozytywne (+) lub negatywne (-) wartości efektów GCA odmian rodzicielskich określono dla badanych cech:

Sila wzrostu – ‘Bluecrop’, ‘Duke’ (+); ‘Brigitta Blue’, ‘KazPliszka’ (-),

Intensywność kwitnienia – ‘Duke’, ‘Polaris’, ‘Weymouth’ (+); ‘KazPliszka’ (-),

Plon owoców – ‘Bluecrop’, ‘Duke’, ‘Polaris’, ‘Toro’ (+); ‘Brigitta Blue’, ‘KazPliszka’ (-),

Masa owoców – ‘Bluecrop’, ‘Chandler’, ‘Duke’, ‘Polaris’ (+); ‘Draper’, ‘KazPliszka’ (-).

Oszacowane istotnie dodatnie lub ujemne wartości efektów SCA wskazują, że genetyczne współdziałanie obu odmian rodzicielskich w ramach danej rodziny mieszańców warunkuje z dużym prawdopodobieństwem poprawę lub pogorszenie ocenianych cech użytkowych u siewek borówki wysokiej. Istotne pozytywne (+) lub negatywne (-) wartości efektów SCA rodzin mieszańców określono dla badanych cech:

Sila wzrostu – ‘Aurora’ x ‘Polaris’, ‘Brigitta Blue’ x ‘KazPliszka’, ‘Brigitta Blue’ x ‘Earliblue’, ‘Chandler’ x ‘Polaris’ (+); ‘Aurora’ x ‘Weymouth’, ‘Chandler’ x ‘Weymouth’, ‘Draper’ x ‘Toro’, ‘Duke’ x ‘Polaris’, ‘Northland’ x ‘KazPliszka’, ‘Northland’ x ‘Polaris’ (-),

Intensywność kwitnienia – ‘Bluecrop’ x ‘Weymouth’, ‘Chandler’ x ‘Polaris’, ‘Draper’ x ‘KazPliszka’, ‘Northland’ x ‘Weymouth’ (+); ‘Aurora’ x ‘Weymouth’, ‘Bluecrop’ x ‘Earliblue’, ‘Chandler’ x ‘Weymouth’, ‘Draper’ x ‘Toro’, ‘Duke’ x ‘Polaris’, ‘Northland’ x ‘KazPliszka’, ‘Northland’ x ‘Polaris’ (-),

Plon owoców – ‘Aurora’ x ‘KazPliszka’, ‘Chandler’ x ‘Earliblue’, ‘Chandler’ x ‘Weymouth’, ‘Duke’ x ‘KazPliszka’, ‘Northland’ x ‘Toro’ (+); ‘Aurora’ x ‘Polaris’, ‘Draper’ x ‘KazPliszka’, ‘Draper’ x ‘Toro’, ‘Duke’ x ‘Earliblue’, ‘Duke’ x ‘Polaris’, ‘Duke’ x ‘Weymouth’, ‘Northland’ x ‘Earliblue’, ‘Northland’ x ‘Weymouth’ (-),

Masa owoców – ‘Chandler’ x ‘Polaris’, ‘Draper’ x ‘KazPliszka’, ‘Draper’ x ‘Polaris’, ‘Northland’ x ‘Weymouth’ (+); ‘Aurora’ x ‘Weymouth’, ‘Chandler’ x ‘KazPliszka’, ‘Draper’ x ‘Toro’, ‘Duke’ x ‘Polaris’, ‘Northland’ x ‘Polaris’ (-).

Wnioski z prowadzonych badań

1. Wyniki badań nad oceną fenotypową siewek borówki wysokiej pokazują duże ich zróżnicowanie pod względem siły wzrostu, pokroju roślin, intensywności kwitnienia, plonu i masy

owoców.

- Analiza histogramów cytometrycznych wskazuje, że odmiany rodzicielskie i wszystkie badane mieszańce borówki wysokiej okazały się tetraploidami ($2n=4x=48$).
- Badane formy rodzicielskie są zróżnicowane genetycznie na podstawie analizy polimorficznych fragmentów DNA.
- Efektywność inicjacji, stabilizacji oraz rozmnażania *in vitro* i *ex vitro* borówki wysokiej jest bardzo zróżnicowana oraz uzależniona od genotypu, składu pożywki i dodatku zeatyny lub 2iP.
- Zastosowanie techniki molekularnej SSR-PCR umożliwia uzyskanie bogatej biblioteki fragmentów polimorficznych DNA, użytecznej w dalszych pracach nad zróżnicowaniem i oceną pokrewieństwa genetycznego genotypów borówki wysokiej.
- Badane pojedynki i odmiany rodzicielskie różnią się atrakcyjnością, smakiem oraz zawartością ekstraktu i witaminy C w owocach w ocenie sensorycznej (degustacyjnej) i instrumentalnej.
- Analiza statystyczna danych oceny fenotypowej populacji siewek wskazuje, że odmiany rodzicielskie borówki wysokiej różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem badanych cech.

Osiągnięcia projektu

- Uzyskano nowe genotypy borówki wysokiej charakteryzujące się wartościowymi cechami użytkowymi, pochodziły one ze skrzyżowania następujących odmian rodzicielskich: ‘Aurora’ x ‘Polaris’, ‘Aurora’ x ‘Toro’, ‘Bluecrop’ x ‘Toro’, ‘Chandler’ x ‘Polaris’, ‘Duke’ x ‘Earliblue’, ‘Duke’ x ‘Toro’, ‘Northland’ x ‘Toro’ i ‘Northland’ x ‘Weymouth’.
- Określono tetraploidalny poziom ploidalności odmian rodzicielskich przy użyciu cytometrii przepływowej. Jest to ważne zagadnienie, gdyż poziom ploidalności ma wpływ na zgodność krzyżowanych form rodzicielskich, czyli na proces zapylenia kwiatów, zapłodnienie, a także płodność, zawiązywanie nasion i owoców u nowo otrzymanych mieszańców.
- Najwyższą wartość hodowlaną i przydatność do tworzenia nowych odmian miały ‘Bluecrop’, ‘Duke’, ‘Chandler’ i ‘Polaris’ – oszacowano najwięcej istotnych i dodatnich efektów GCA dla badanych cech użytkowych. Najmniej przydatne do programów krzyżowań

- były ‘Brigitta Blue’ i ‘KazPliszka’.
4. Wykazano, że odsetek eksplantatów rozmnażanych klonów *in vitro*, które podjęły namnażanie był dwukrotnie wyższy na pożywce z zeatyną w porównaniu do 2iP. Opracowany sposób ukorzenia pędów *in vitro* w perlicie, nasączonym płynną pożywką, okazał się efektywny. Są to ważne zagadnienia, gdyż efektywność inicjacji, stabilizacji i rozmnażania *in vitro* borówki wysokiej jest bardzo trudna.
 5. Analiza molekularna polimorfizmu DNA form rodzicielskich potwierdziła brak homogeniczności wśród 5 roślin reprezentujących odmianę ‘Draper’, dlatego roślinę oznaczoną ‘Draper’ 1 wyeliminowano z dalszych badań.
 6. Opracowany dendrogram rodowodowy (pokrewieństwo) badanych odmian będzie wykorzystany przy doborze form rodzicielskich do programów krzyżowań i tworzenia nowych odmian tego gatunku.
 7. Opracowane tzw. „metki identyfikacyjne” charakterystyczne dla profilu genetycznego każdej z analizowanych roślin mogą być wykorzystane do potwierdzenia statusu mieszańców uzyskanych w wyniku krzyżowania wybranych form rodzicielskich.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje naukowe

- Kucharska D., Pluta S. 2018. The influence of the type of cytokinin on the initiation and stabilization of highbush blueberry *Vaccinium corymbosum* L. in *in vitro*. *BioTechnology* vol. 99 (3): 301
- Pluta S., Kucharska D., Seliga Ł. 2019. Ocena potencjału genetycznego wybranych genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w oparciu o czynnikiowy układ krzyżowań. *Biuletyn IHAR*, 286, 397–402. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0088>

doi.org/10.37317/biul-2019-0088

- Pluta S., Badek B., Seliga Ł. 2020. Ocena potencjału genetycznego wybranych genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w oparciu o czynnikiowy układ krzyżowań 291(sup.): 213-217 (komunikat)
- Pluta S., Seliga Ł. 2020. Ocena zdolności kombinacyjnej wybranych form rodzicielskich borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) dla siły wzrostu siewek. *Biuletyn IHAR*, 291: 75–85, <https://doi.org/10.37317/10.37317/biul-2020-PB87>

Doniesienia konferencyjne (abstrakty)

- Pluta S., Seliga Ł. 2015. Possibilities of increasing genetic variability in the highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) based on studies conducted at the Research Institute of Horticulture. International Scientific Conference, “*Horticulture in shaping life quality*”. Lublin 18–19.06.2015. Book of Abstract: 23.
- Jakubczyk E., Rybak K., Wiktor A., Pluta S. 2018. Wpływ genotypu na wybrane właściwości biochemiczne owoców borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.). VI Sympozjum Inżynierii Żywności, 26–27 czerwca 2018 r., SGGW w Warszawie. Streszczenia str. 43.
- Kucharska D., Pluta S., Seliga Ł. 2019. Efektywność rozmnażania 22 genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum*) w kulturach *in vitro*. V Zjazd PTNO. Warszawa 16–18 września 2019. Streszczenia, str. 34.
- Pluta S. i Seliga Ł. 2019. Assessment of combining ability of selected forms of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum*) based on phenotypic evaluation of seedling progeny. XV EUCARPIA Fruit Breeding and Genetics Symposium, 3-7 czerwca 2019, Czechy. Book of abstracts, oral presentations: 12.
- Pluta S. i Seliga Ł. 2019. Wstępna ocena jakości owoców genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum*). Konferencja Naukowa: V Zjazd PTNO, SGGW w Warszawie, 16–18 września, 2019. Streszczenia, str. 40.

Badania nad możliwością poszerzenia zmienności genetycznej maliny właściwej (*Rubus idaeus*) pod względem pory dojrzewania i jakości owoców

The research on the possibility of extending the genetic variability of red raspberry (*Rubus idaeus*) in terms of different ripening time and fruit quality

Agnieszka Masny✉, Danuta Kucharska, Mirosława Cieślińska, Anita Kuras, Edward Żurawicz

Instytut Ogrodnictwa - Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice
✉ e-mail: Agnieszka.Masny@inhort.pl

Słowa kluczowe: genotypy maliny, hodowla konwencjonalna, hybrydyzacja, jakość, selekcja

Cel badań

W zasobach genetycznych Instytutu Ogrodnictwa - PIB znajduje się wiele genotypów maliny (*Rubus idaeus*), różniących się wieloma cechami biologicznymi, ważnymi z użytkowego punktu widzenia. Celem prowadzonych badań była weryfikacja hipotezy zakładającej, że metodą hodowli konwencjonalnej możliwe jest poszerzenie istniejącej zmienności genetycznej w obrębie tego gatunku, poprzez wykorzystanie potencjału genetycznego wybranych odmian maliny właściwej, pochodzących z różnych regionów geograficznych świata. Cel ten został osiągnięty.

Materiał i Metody

Przedmiotem badań były siewki uzyskane z programu krzyżowań (układ dialleliczny, II metoda Griffinga) 10 odmian rodzicielskich maliny zróżnicowanych pod względem cech i pochodzących z różnych regionów geograficznych świata ('Canby', 'Glen Ample', 'Laszka', 'Polana', 'Polka', 'Radziejowa', 'Schönemann', 'Sokolica', 'Veten', 'Willamette'). Program krzyżowań obejmował 55 kombinacji krzyżowań (w tym 10 kombinacji samozapyleń). Przed wykonaniem krzyżowań, dla wszystkich roślin form rodzicielskich wykonano ocenę stopnia polimorfizmu DNA oraz testy DAS-ELISA i RT-PCR dla wykluczenia obecności wirusów. Otrzymane z krzyżowań nasiona poddano trzem rodzajom skaryfikacji stężonym (95%) kwasem siarkowym (20 minut, 30 minut i 40 minut), a następnie 6-tygodniowej stratyfikacji (3°C). Z puli uzyskanych siewek wybrano losowo po 48 z każdej rodziny mieszańców i posadzono

w doświadczeniu polowym (4 powtórzenia po 12 roślin). Siewki oceniano indywidualnie pod względem plonu, wielkości, atrakcyjności i barwy owoców, siły wzrostu, kolczastości pędów oraz stopnia porażenia przez choroby i szkodniki. Uzyskane wyniki wykorzystano do oszacowania ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej form rodzicielskich oraz korelacji fenotypowych i genetycznych badanych cech. Na podstawie wieloletniej oceny wyselekcjonowano i rozmnożono najbardziej wartościowe pojedynki, które posadzono w doświadczeniu dla dalszej oceny, głównie zewnętrznej i wewnętrznej jakości owoców. Dla najcenniejszych genotypów dokonano weryfikacji statusu mieszańca.

Wyniki

Badania form rodzicielskich maliny nie wykazały obecności wirusa karłowatej krzaczastości maliny (RBDV), wirusa cętkowanej plamistości liści maliny (RLMV), wirusa chlorozy nerwów liści maliny (RVCV) i wirusa plamistości maliny (RLBV) w żadnej z testowanych roślin. Po upewnieniu się, że rośliny rodzicielskie są całkowicie wolne od chorób wirusowych, użyto je do programów krzyżowań.

Jednocześnie przeprowadzono 1 600 reakcji amplifikacji dla oceny polimorfizmu DNA badanych odmian. Uzyskano 176 polimorficznych amplikonów o długości od 100 do 800 pz, różnicujących wszystkie analizowane genotypy. Zgromadzona baza produktów polimorficznych posłużyła do określenia pokrewieństwa badanych form rodzicielskich, który wynosił od 27 do 53%. Najwyższy stopień pokrewieństwa



zaobserwowano dla odmian 'Schönemann', 'Canby' (53%), 'Willamette', 'Veten' (49%) oraz 'Sokolica', 'Laszka' (48%).

Realizując dwa programy krzyżowań, łącznie zapyłono 2 466 kwiatów, z których otrzymano 1 837 owoców. Najlepsze zawiązywanie owoców obserwowano w kombinacjach krzyżowań: 'Canby' × 'Canby', 'Canby' × 'Polana', 'Glen Ample' × 'Laszka', 'Glen Ample' × 'Schönemann', 'Laszka' × 'Laszka', 'Polka' × 'Radziejowa', 'Polka' × 'Willamette', 'Polka' × 'Veten', 'Radziejowa' × 'Schönemann', 'Schönemann' × 'Sokolica', 'Veten' × 'Veten', 'Canby' × 'Laszka', 'Polana' × 'Polana', 'Polana' × 'Radziejowa', 'Polana' × 'Sokolica', 'Polka' × 'Sokolica', 'Radziejowa' × 'Sokolica' i 'Sokolica' × 'Sokolica'. Najślabsze zawiązanie owoców odnotowano w kombinacjach: 'Canby' × 'Polka', 'Canby' × 'Schönemann', 'Canby' × 'Sokolica', 'Polana' × 'Schönemann' i 'Sokolica' × 'Willamette'. Wykazano, że jeden owoc maliny zawierał przeciętnie 64,9 nasion. Jednak owoce odmian 'Laszka' i 'Radziejowa' zawierały nawet ponad 100 nasion, zaś najmniej nasion posiadały owoce otrzymane w wyniku samozapylenia odmian macecznych (Żurawicz, 2016; Żurawicz, i in., 2018).

Dowiedziano, że kiełkowanie nasion po wysiewie było bardzo nierównomierne pomimo zastosowania różnych sposobów skaryfikacji i stratyfikacji; po 18 dniach od wysiewu obserwowano wschody tylko pojedynczych nasion. Ilość skiełkowanych nasion wzrastała wraz z upływem dni od wysiewu osiągając finalnie po upływie 74 dni odpowiednio 39,3%, 45,3% i 35,6%, zależnie od długości skaryfikacji. Najwięcej nasion (45,3%) skiełkowało, jeżeli były potraktowane stężonym kwasem siarkowym w czasie 30 minut (Żurawicz, i in., 2017a). Zaobserwowano również wpływ odmiany macecznej na kiełkowanie i wschody nasion. Najlepiej kiełkowały nasiona pochodzące od odmian 'Laszka', 'Radziejowa' i 'Sokolica', zaś najgorzej – nasiona wywodzące się od odmiany 'Polana' (od 0% do 12% skiełkowanych nasion).

Wyniki indywidualnej oceny fenotypowej siewek wykazały, że siewki te w różnym stopniu łączyły cechy fenotypowe form rodzicielskich, tworząc genotypy o cechach, których nie posiadały formy rodzicielskie. Szczególnie cenne było połączenie w jednym genotypie takich cech, jak zdolność do owocowania w terminie letnio-jesiennym ze zdolnością do tworzenia pędów bez kolców oraz wytwarzania wysokiej jakości owoców. Spośród 2 640 badanych siewek, brakiem kolców odznaczały się 243 rośliny, a zdolność do owocowania

na jednorocznych pędach wykazywały 332 siewki.

Wyniki analizy ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej form rodzicielskich wykazały, że odmiany 'Glen Ample', 'Polana' i 'Polka' warunkują wysoką plenność (Żurawicz, i in., 2017b); 'Sokolica', 'Laszka' i 'Glen Ample' - duże owoce; 'Polka' i 'Sokolica' - atrakcyjne owoce; 'Canby' i 'Laszka' - silny wzrost pędów; 'Glen Ample' i 'Laszka' - małą podatność na szkodniki u potomstwa. Stwierdzono również silne dodatnie korelacje genetyczne pomiędzy wielkością i atrakcyjnością owoców oraz plonem i atrakcyjnością owoców.

Z populacji liczącej 2 640 siewek wyselekcjonowano 181 najbardziej cennych genotypów i przekazano je do rozmnożenia w kulturach *in vitro*. Zaobserwowano, że efektywność rozmnażania zależy przede wszystkim od genotypu, a także od pory pobierania pąków. Najślabiej przebiegała izolacja w miesiącach styczeń-marzec z pąków zimowych. Najbardziej efektywne były izolacje w lipcu. Na etapie namnażania kultur oraz ukorzenia obserwowano również wpływ genotypu. Dla części pojedynczych malin pomimo kilkukrotnej inicjacji, nie można było otrzymać roślin w kulturach *in vitro*. W rezultacie rozmnożonych i ukorzenionych zostało 115 klonów. Klony te posadzono w doświadczeniu i oceniano pod względem typu owocowania, plenności, jakości owoców (atrakcyjność, barwa, wielkość), wysokości i pokroju pędów oraz obecności i stopnia „agresywności kolców”. Wśród ocenianych genotypów 44 klony owocowały tylko na pędach dwuletnich, 24 to genotypy owocujące na pędach jednorocznych, zaś 47 zaliczono do odmian letnich-dwupiętrowych, owocujących jesienią na wierzchołkach pędów jednorocznych, zaś latem kolejnego roku w dolnej części tych samych pędów. Niektóre z genotypów pod względem jakości owoców przewyższały odmiany standardowe (Masny i in. 2020a). Na pędach 15 klonów zaobserwowano brak kolców, zarówno w wierzchołkowej, środkowej, jak i dolnej ich części.

Dla najbardziej wartościowych klonów i ich odmian rodzicielskich oceniono zawartość substancji rozpuszczalnych, kwasów organicznych i kwasu L-askorbinowego, związków fenolowych ogółem oraz barwników antocyjanowych w owocach. Wykazano, że owoce większości badanych klonów zawierały większe, w porównaniu do odmian standardowych, ilości związków fenolowych, antocyjanów oraz kwasu askorbinowego. Najwyższą zawartością wymienionych związków odznaczały się owoce klonów: 21, 32, 37, 207, 208, 321, 341, 381, 387, 400.

Na podstawie wieloletniej oceny, za najbardziej wartościowe genotypy, łączące w sobie ważne cechy użytkowe, uznano klony: 7, 14, 26, 47, 48, 57, 74, 95, 104, 115, 140, 146, 164, 198, 206, 208, 217, 255, 258, 271, 278, 293, 311, 317, 341, 345, 378, 388, 397, 402, 410, 433. Klony te rozmnożono w kulturach *in vitro*, a następnie posadzono do doniczek, zaaklimatyzowano do warunków polowych i przekazano do zasobów genowych Instytutu Ogrodnictwa - PIB.

Żadna z badanych roślin ww. genotypów nie wykazywała objawów, które mogłyby sugerować porażenie przez wirusy. Mimo to, na podstawie uzyskanych wyników testów DAS-ELISA oraz RT-PCR, stwierdzono obecność wirusa karłowatej krzaczastości maliny na 15, spośród 300 badanych roślin. W żadnej z tych roślin nie wykazano obecności wirusa cętkowanej plamistości liści maliny (RLMV), wirusa chlorozy nerwów liści maliny (RVCV) i wirusa plamistości maliny (RLBV).

Dla zweryfikowania rodowodu najbardziej cennych klonów maliny przeprowadzono łącznie 7 074 reakcje amplifikacji, w których wygenerowano 594 amplikony, w tym 549 polimorficznych. Każdy z testowanych genotypów został oceniony na podstawie 7–10 charakteryzujących go fragmentów DNA. Status mieszańca z planowanego zapylenia potwierdzono dla 39 z 40 testowanych genotypów.

Wnioski

1. U gatunku *Rubus idaeus* istnieje możliwość poszerzenia istniejącej zmienności genetycznej pod względem wielu cech fenotypowych, przy wykorzystaniu odmian pochodzących z różnych regionów geograficznych świata (zróżnicowanych genetycznie).
2. Odmiany ‘Glen Ample’, ‘Polana’ i ‘Polka’ są donorami genów warunkujących wysoką plenność; ‘Sokolica’, ‘Laszka’ i ‘Glen Ample’ – duże owoce; ‘Polka’ i ‘Sokolica’ – atrakcyjne owoce; ‘Canby’ i ‘Laszka’ – silny wzrost pędów; ‘Glen Ample’ i ‘Laszka’ odporność/małą podatność na szkodniki. Wymienione odmiany powinny być używane jako formy rodzicielskie w programach krzyżowań dla poprawienia wartości tych cech.
3. Istnieją silne korelacje fenotypowe i genetyczne pomiędzy niektórymi z badanych cech użytkowych u maliny. Najsilniejsze dodatnie korelacje genetyczne występują pomiędzy wielkością i atrakcyjnością owoców oraz plonem i atrakcyjnością owoców.
4. Inicjację kultur *in vitro* maliny można

prowadzić z pąków zimowych, jak też w okresie wiosny i lata.

5. Powodzenie inicjacji oraz dalszych etapów rozmnażania w kulturach *in vitro* jest zależne od genotypu, a także od warunków zewnętrznych.
6. Owoce wielu klonów posiadają zarówno wyższą, jak i niższą zawartość związków chemicznych w porównaniu do odmian rodzicielskich, od których się wywodzą, zatem możliwe jest uzyskanie genotypów maliny, których owoce będą zawierały więcej związków chemicznych, decydujących o ich jakości wewnętrznej, zarówno pod względem ilościowym jak i jakościowym.

Osiągnięcia projektu

Badania pozwoliły na uzyskanie nowych, innowacyjnych genotypów, łączących w sobie różne, pożądane cechy biologiczne, jak zróżnicowana pora dojrzewania, dobra jakość zewnętrzna i wewnętrzna owoców, mała podatność/tolerancja roślin na groźne choroby wirusowe, czy bezkolcowość. W ten sposób wzbogacono genetyczną i fenotypową różnorodność w obrębie gatunku *Rubus idaeus*, a przekazując najbardziej wartościowe genotypy do zasobów genowych Instytutu Ogrodnictwa - PIB stworzono możliwość ich szerokiego wykorzystania jako źródła genów do tworzenia nowych odmian maliny czerwonej.

Wykazano, które z badanych odmian maliny są donorami genów poprawiających wartość ważnych cech użytkowych i w związku z tym powinny być wykorzystywane w programach krzyżowań dla uzyskania nowych odmian.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje naukowe

- Żurawicz, E. (2016). Cross-pollination increases the number of drupelets in the fruits of red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Acta Hort.*, 1133, 145–151. DOI 10.17660/ActaHortic.2016.1133.22.
- Żurawicz, E., Masny, A., Kubik, J., Lewandowski, M. (2017a). Germination of red raspberry seeds as affected by the origin and chemical scarification. *Hortic. Sci. (Prague)*, vol. 44 (3), 133–140; doi: 10.17221/22/2016-HORTSCI.
- Żurawicz, E., Studnicki, M., Kubik, J., Pruski, K. (2018). A careful choice of compatible pollinizers significantly improves the size of fruits in red raspberry (*Rubus idaeus* L.). *Sci. Hortic.* 235, 253–257.
- Masny, A., Kucharska, D., Mieszczakowska-Frać, M., Kuras, A., Żurawicz, E. (2019a). Badania nad możliwością poszerzenia zmienności genetycznej maliny właściwej (*Rubus idaeus*) pod względem pory dojrzewania i jakości

owoców. Biuletyn IHAR, 286, 403–406. DOI: 10.37317/biul-2019-0089.

Masny, A., Kucharska, D., Mieszczakowska- Frąc, M., Kuras, A., Żurawicz, E. (2020b). Badania nad możliwością poszerzenia zmienności genetycznej maliny właściwej (*Rubus idaeus*) pod względem pory dojrzewania i jakości owoców. Biuletyn IHAR, 291 (1), 219-221. (komunikat).

Masny, A., Żurawicz, E., Kubik, J. (2020a). Wstępne wyniki oceny wybranych klonów maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.) poszerzających zmienność genetyczną pod względem ważnych cech fenotypowych. Biuletyn IHAR 291, 53–61, DOI: 10.37317/biul-2020-PB85.

Doniesienia konferencyjne (abstrakty)

Żurawicz, E. (2015). Effect of Postharvest Treatment of Red Raspberry (*Rubus idaeus* L.) Seeds on the Germination and Growth Vigor of Young Seedlings. 21–26.06.2015 r., XI International Rubus and Ribes Symposium, Asheville, North Carolina, USA.

Żurawicz, E., Woszczyk, K., Masny, A., Kubik, J. (2017b).

Wstępna ocena zdolności kombinacyjnej wybranych odmian maliny pod względem plonowania i siły wzrostu roślin. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa „Ziemia – Roślina – Człowiek”, Kraków, 20–21 września 2017. Materiały konferencyjne, 132.

Masny, A., Żurawicz, E., Mynett, K., Kubik, J. (2019b). Plonowanie i jakość owoców mieszańców maliny z hybrydyzacji wewnątrzgatunkowej *Rubus idaeus*. V Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Konferencja Naukowa „Miejsce Ogrodnictwa we współczesnym życiu człowieka i ochronie środowiska”, SGGW Warszawa, 16–18 września 2019 r. Streszczenia, 121.

Kuras, A., Masny, A., Żurawicz, E. (2019). Wykorzystanie markerów SSR do molekularnej weryfikacji mieszańców i opracowania profili genetycznych „DNA-fingerprinting” najwartościowszych klonów maliny właściwej. V Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Konferencja Naukowa „Miejsce Ogrodnictwa we współczesnym życiu człowieka i ochronie środowiska”, SGGW Warszawa, 16–18 września 2019 r. Streszczenia, 118.

Analiza czynników warunkujących organogenezę agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro* i *in vivo* oraz ocena genetyczna i fenotypowa otrzymanego materiału

The analysis of factors determining *in vitro* and *in vivo* organogenesis of gooseberry (*Ribes grossularia* L.), genetic and phenotypic assessment of obtained material

Danuta Kucharska✉, Danuta Wójcik, Aleksandra Trzewik, Małgorzata Kunka, Teresa Orlikowska, Stanisław Pluta, Angelika Niewiadomska-Wnuk

Instytut Ogrodnictwa - PIB, Skierniewice
✉ e-mail: danuta.kucharska@inhort.pl

Słowa kluczowe: AFLP, agrest, ISSR, kultury *in vitro*, ocena fenotypowa, polimorfizm

Cele prowadzonych badań

1. Określenie czynników warunkujących inicjację i stabilizację kultur *in vitro* oraz czystość mikrobiologiczną 15 genotypów agrestu.
2. Analiza wpływu poszczególnych składników pożywki na proces namnażania, ukorzenia i aklimatyzacji *in vitro* 15 genotypów agrestu.
3. Zbadanie potencjału regeneracji przybyszowej z fragmentów liści, pędów i korzeni 5 genotypów agrestu.
4. Poznanie reakcji pędów w kulturach *in vitro* na okresowe przechowywanie w niskich temperaturach oraz wpływ tego czynnika na indukcję procesów rozwojowych 10 genotypów agrestu.
5. Ocena fenotypowa i genetyczna roślin 15 genotypów agrestu, rozmnożonych *in vitro* oraz przez sadzonki zielne w warunkach doświadczenia polowego.
6. Określenie wpływu mikrorozmnażania agrestu na zachowanie jednorodności genetycznej i powstawanie zmienności somaklonalnej 10 genotypów agrestu techniką AFLP.
7. Analiza polimorfizmu DNA 15 genotypów agrestu przy użyciu techniki AFLP i ISSR-PCR.

Wszystkie cele zostały osiągnięte.

Materiały i Metody

Materiałem badawczym było 15 genotypów agrestu: 8 odmian ustalonych oraz 7 klonów hodowlanych. Pąki wierzchołkowe i pąki boczne pobierano w miesiącach luty-marzec oraz maj-czerwiec i wykładano na pożywkę inicjalną. Czystość mikrobiologiczną sprawdzano na pożywkach bakteryjnych: PDA, KB i NA.

Optymalizując proces mikrorozmnażania agrestu sprawdzano wpływ poszczególnych składników pożywki: soli MS, WPM oraz QL; stężenia cytokin BAP, kinetyny i *meta*-topoliny (m-T); gibereliny GA₃; współdziałania cytokinin z auksynami IAA, IBA i NAA na efektywność namnażania oraz wpływ auksyn na ukorzenie pędów *in vitro*. Sprawdzano wpływ agarów Plant, Bacto oraz Gerlite, a także dodatku jonów wapnia, magnezu i żelaza.

Badając potencjał regeneracji przybyszowej *in vitro* wykorzystywano fragmenty pędów, korzeni i liści 5 genotypów agrestu. Eksplantaty inkubowano na pożywkach indukcyjnych z tidiazuronem (TDZ), następnie przekładano na pożywki regeneracyjne z BAP, m-T i TDZ. W celu zwiększenia zdolności do organogenezy, kultury mateczne kondycjonowano przez 30 dni na pożywce z TDZ, kontrolę stanowiły pędy na pożywce z m-T.

Miesięczne kultury 10 genotypów agrestu, na pożywce do namnażania, przechowywano



przez 2, 4 i 6 miesięcy w temperaturach 2°C i 4°C. Po tym okresie sprawdzano jakość oraz współczynnik namnażania pędów.

Rośliny 15 genotypów agrestu, rozmnożone w kulturach *in vitro* oraz przez sadzonki zielne, oceniano w doświadczeniu polowym, założonym jesienią 2017 r. Prowadzono obserwacje wzrostu i plonowania krzewów oraz porażenie przez amerykańskiego mączniaka agrestu i antraknozę liści.

Genomowe DNA izolowano przy użyciu zestawów komercyjnych DNeasy® Plant Mini Kit, NucleoSpin® 96 Plant kit oraz Plant/Fungi DNA Isolation Kit pobierając ok. 100 mg tkanki roślinnej (sadzunki *in vitro*, wegetatywne oraz rośliny mateczne). Preparaty analizowano spektrofotometrycznie, obliczono stężenie DNA oraz współczynnik 260/280 nm. Otrzymane preparaty DNA wykorzystano w analizie AFLP i ISSR-PCR. Po reakcjach amplifikacji oceniano całkowitą liczbę produktów, obecność i liczbę produktów polimorficznych oraz określono poziom polimorfizmu. Dla analiz AFLP opracowano macierz podobieństwa genetycznego (SI), obliczaną pomiędzy parami wszystkich genotypów i opracowano drzewo filogenetyczne za pomocą analizy skupień metodą UPGMA z zastosowaniem programu XLSTAT.

Opis wyników

Największą efektywność inicjowania kultur odnotowano w terminie wiosennym z pąków wierzchołkowych roślin, utrzymywanych w karkasie. W każdym z genotypów zaobserwowano obecność bakterii endogennych. Największy stopień ich wykrywalności zaobserwowano na pożywce bakteryjnej KB.

Spośród trzech testowanych pożywek: MS, WPM oraz QL, najkorzystniejsza okazała się pożywka MS, na której pędy były najgrubsze, miały największe i najbardziej zielone liście. Pędy na pożywce z BAP dobrze mnożyły się, ale następowało zahamowanie wydłużania i tworzyły się rozety. Dodatek kinetyny powodował wydłużanie pędów, ale zwiększał odsetek pędów nekrotycznych. Wpływ agaru był większy niż obecność i stężenie gibereliny. Gerlita wpływał na zwiększenie współczynnika namnażania, udział pędów >1cm, ale zwiększał również szklistość pędów. Zaznaczył się wpływ gibereliny na udział pędów wyższych, jednak dla niektórych genotypów obniżał się współczynnik namnażania. Dodatek jonów wapnia oraz magnezu poprawiał parametry wzrostu i namnażania agrestu. Dodatek jonów żelaza zmniejszał współczynnik namnażania i jakość pędów. Zaobserwowano bardzo znaczący

wpływ m-T na wzrost współczynnika namnażania oraz zahamowanie zamierania pędów towarzyszące mnożeniu w obecności cytokininy BAP. Wpływ auksyny w morfogenezie agrestu zależał od genotypu. Dla większości IAA we współdziałaniu z BAP i m-T był bardziej korzystny niż IBA, zwiększał współczynnik namnażania i liczbę pędów wyższych. W procesie rizogenezy nie odnotowano większych różnic w działaniu pomiędzy auksynami. U większości genotypów jakość ukorzenionych pędów była nieznacznie lepsza na pożywce z IAA niż IBA. Procent i jakość ukorzenionych pędów bardziej zależał od ich wysokości niż badanej auksyny. Wpływ auksyny NAA na mikrozmnażanie i ukorzenianie *in vitro* dla wszystkich genotypów był niekorzystny.

W fazie indukcji regeneracji przybyszowej lepszą efektywność stwierdzono dla pożywki zawierającej 0,5 mg/l TDZ, eksplantaty były dłużej zielone a kalus mniejszy. Odnotowano niską przydatność regeneracyjną fragmentów pędów i korzeni. Zaczątki pędów przybyszowych obserwowano na eksplantatach liściowych z nasadami, na pożywce z BAP. Bez względu na zastosowane czynniki, trzy genotypy wykazywały małą zdolność do regeneracji, natomiast na dwóch pozostałych wytworzyło się więcej pędów przybyszowych. Po 14-dniowej indukcji regeneracji wytworzyło się więcej pędów przybyszowych niż po 7-dniowej. Kondycjonowanie kultur matecznych, na pożywce z TDZ nie wpłynęło na częstotliwość pojawiania się pędów przybyszowych w porównaniu do kontroli na pożywce z m-T.

Po trzech okresach chłodzenia kultur w temperaturach 2°C i 4°C, wszystkie genotypy podjęły namnażanie. Odsetek pędów nekrotycznych po 2 i 4 miesiącach chłodzenia był znikomy, a po 6 większy, jednak w stopniu umożliwiającym odtworzenie kultur. Kultury ośmiu genotypów przechowywane 6 miesięcy w 2°C były lepszej jakości niż w 4°C. Dla większości genotypów w II pasażu po chłodzeniu nastąpiło zwiększenie namnażania oraz udział pędów wyższych w porównaniu do kontroli.

W celu uzyskania roślin do doświadczenia polowego, pędy 15 genotypów agrestu ukorzeniano *in vitro* w systemie dwuetapowym, następnie poddawano aklimatyzacji w szklarni. W zależności od odmiany ukorzeniło się od 20% do 90% a zaaklimatyzowało od 50% do 100% pędów. Do rozmnażania tradycyjnego pobierano wierzchołki tegorocznych pędów. Efektywność ukorzeniania sadzonek zielnych w szklarni wynosiła od 20% do 100%. Sadzunki *in vitro* odznaczały

się silniejszym wzrostem w porównaniu do roślin z sadzonek zielnych.

Po trzech sezonach wegetacyjnych w doświadczeniu polowym, parametry wzrostu i owocowania, były większe dla krzewów rozmnażanych *in vitro*. Średnia wysokość krzewów z *in vitro* wynosiła 54,1 cm a rozmnożonych tradycyjnie 45,1 cm, szerokość wynosiła odpowiednio 67,0 cm do 53,5 cm a liczba pędów 32,4 do 20,6. Największa dynamika dotyczyła liczby pędów. W roku 2019 przyrost liczby pędów dla krzewów z *in vitro* wyniósł 1,4 a dla rozmnażanych tradycyjnie 1,8, w roku 2020 odpowiednio 18,7 i 13,8. W sezonie 2020 z roślin *in vitro* 13 genotypów, plon owoców z 3 pletek był wyższy. Z roślin rozmnażanych tradycyjnie wyższy plon zanotowano u 2 genotypów. Najlepiej plonującą odmianą, niezależnie od sposobu rozmnażania był 'Hinnonmaki Rot'. Największe porażenie przez amerykańskiego mączniaka agrestu stwierdzono u odmiany 'Biały Triumf', a największe porażenie przez antraknozę liści obserwowano u odmiany 'Biały Triumf', 'Hinnonmaki Rot', 'Pax' oraz klonów 86, 108 i 117, niezależnie od sposobu rozmnażania

Liczba produktów generowanych przez pary starterów AFLP wynosiła średnio 47,96. Zmienność genetyczna w roślinach *in vitro* wahała się od 0,35% dla odmiany 'Hinnonmaki Rot' do 18,49% dla klonu 108. Łącznie w wyniku analizy AFLP 15 genotypów agrestu z 12 kombinacjami starterów uzyskano 625 markerów AFLP, z czego 238 było polimorficznych. Największy procent polimorficznych produktów uzyskano w wyniku reakcji z zastosowaniem starterów Pst-GA/Mse-TC – 51,3%, najmniej polimorficznych produktów – 6,7% uzyskano w reakcji ze starterami Pst-TA/Mse-GA. Wartości podobieństwa genetycznego odmian agrestu wahały się od 0,870 ('Hinnonmaki Rot' vs AGR 117) do 0,978 (AGR 86 vs AGR 2/33). Na dendrogramie wyodrębniono 2 główne grupy skupień obejmujące 6 i 5 genotypów oraz 1 mniejszą, skupiającą odmiany 'Hinsel' i 'Hinnonmaki Rot'. Genotypy AGR 117 i 'Captivator' nie tworzą skupień (rys.1.).

W wyniku analizy ISSR-PCR z pięcioma starterami uzyskano łącznie 2294 produktów amplifikacji, z czego 64 (2,8%) produktów było polimorficznych. Wielkości otrzymanych produktów amplifikacji były w granicach 250 – 2900 pz, w zależności od użytego startera i odmiany. Zastosowane startery różniły się w ilości generowanych produktów PCR. Przykładowo liczba otrzymanych produktów amplifikacji w odmianie Invicta wahała się od 42 dla startera 834 do 168 dla startera 849.

Wnioski z prowadzonych badań

1. W obecności *meta*-topoliny uzyskano najwyższy współczynnik namnażania oraz udział pędów wyższych; nastąpiło także całkowite ograniczenie nekrozy pędów, występujące w obecności BAP.
2. Ukorzenianie *in vitro* i aklimatyzacja mikrosadzonek agrestu jest efektywna i wynosi ponad 90%.
3. Kultury agrestu przechowywane 6 miesięcy w temperaturze 2°C były lepszej jakości niż przechowywane w 4°C.
4. Parametry wzrostu i owocowania krzewów agrestu w doświadczeniu polowym, po trzech sezonach wegetacyjnych były większe dla krzewów rozmnażanych *in vitro*.
5. Potwierdzono skuteczność techniki AFLP w detekcji zmienności somaklonalnej agrestu, generowanej w kulturach *in vitro* oraz w badaniach zróżnicowania genetycznego pomiędzy genotypami agrestu.
6. Potwierdzono skuteczność techniki ISSR w uzyskaniu markerów identyfikacji genotypów oraz w detekcji polimorfizmu DNA agrestu.
7. Współczynniki podobieństwa genetycznego uzyskane na podstawie analizy markerów AFLP wskazują na małe zróżnicowanie genetyczne analizowanych genotypów agrestu.

Osiągnięcia projektu

1. Opracowano kompleksową procedurę mikro-rozmnażania 15 genotypów agrestu.
2. Wykazano, iż przełomowym czynnikiem w rozmnażaniu agrestu *in vitro* było zastosowanie *meta*-topoliny.
3. Potwierdzono możliwość długotrwałego przechowywania kultur agrestu w temperaturze 2°C oraz pozytywny wpływ tego czynnika na namnażanie pędów.
4. W doświadczeniu polowym prowadzono pionierskie obserwacje roślin *in vitro* oraz z sadzonek zielnych 15 genotypów agrestu.
5. Potwierdzono skuteczność technik AFLP oraz ISSR w detekcji zmienności somaklonalnej i polimorfizmu DNA oraz w uzyskaniu markerów identyfikacji genotypów agrestu.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne (postery)

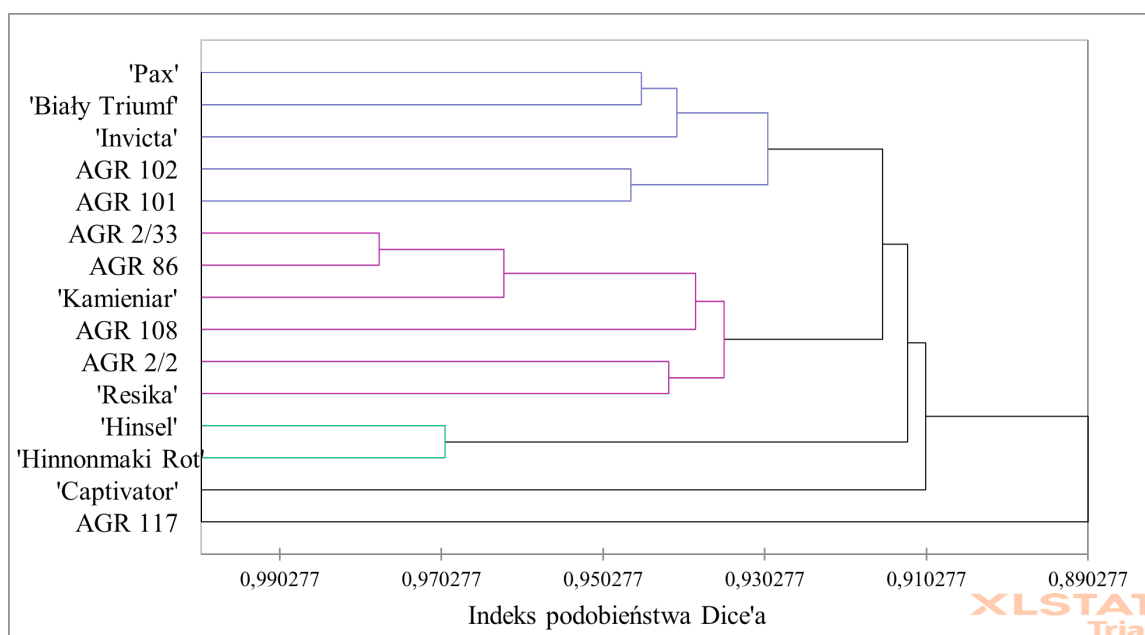
Kucharska D., Orlikowska T. (2015). The initial results of experiments of *in vitro* propagation of gooseberry (*Ribes grossularia* L.). XIV Ogóln. Konfer. Kultur In Vitro i Biotech, Poznań 14–17.09 BioTechnologia 96 (1): 116 57

- Kucharska D., Orlikowska T. (2016). Factors influencing micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia* L.). III International Symposium on Horticulture in Europe, "Growing Health and Life", Greece, October 17-21, Book of abstracts 151.
- Kucharska D., Orlikowska T. (2016). The role of meta-topolin in micropropagation gooseberry (*Ribes Grossularia* L.). 57 Zjazd PTB Lublin Mat. Konferencyjne 186.
- Kucharska D., Kunka M., Pluta S. (2017). In vitro culture of gooseberry *Ribes grossularia* L. Fourth International Horticulture Research Conference 16-20.07 East Malling, UK Book of abstracts 88.
- Kucharska D., Kunka M., Pluta S. (2017). Wpływ chłodzenia kultur pędowych na mikrorozmnażanie agrestu (*Ribes grossularia* L.) Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa, Kraków wrzesień 20–21. Mat. Konferencyjne 104.
- Niewiadomska-Wnuk A., Kucharska D. (2018). Evaluation of the possibility of adventitious regeneration of gooseberry (*Ribes grossularia* L.) *in vitro*. Mat. XV Ogóln. Konfer. Kultur In Vitro i Biotech. Roślin. BioTechnologia Vol. 99 (3) str. 294.
- Kucharska D., Kunka M. (2019). Wpływ chłodzenia na jakość i namnażanie *in vitro* agrestu. Zjazd PTB, Kraków, 1–7 lipca
- Wójcik D., Kucharska D. (2019). Evaluation of genetic diversity within gooseberry cultivars (*Ribes grossularia* subgenus *Grossularia*) with the use of AFLP technique. Eurobiotech, 7th Central European Congress of Life Sciences, Kraków 23-25.09
- Wójcik D., Kucharska D. (2019). Wpływ mikrorozmnaża-

nia agrestu na zachowanie jednorodności genetycznej w obrębie gatunku. Zjazd PTB, Kraków, 1–7 lipca..

Publikacje

- Kucharska D., Niewiadomska-Wnuk A., Kiszczak W. (2017). Czynniki wpływające na inicjację i stabilizację agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro*. Zeszyty Naukowe IO 25: 5–17. 6 pkt
- Kucharska D., Trzewik A., Wójcik D., Pluta S., Seliga Ł., Ogórek L., Wiosna B., Bodek S. (2019). Analiza czynników warunkujących organogenezę agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro* i *in vivo* oraz ocena genetyczna i fenotypowa otrzymanego materiału. Komunikat Biuletyn IHAR, 286: 407–410
- Kucharska D., Orlikowska T., Maciorowski R., Kunka M., Niewiadomska-Wnuk A. (2020). Storage of proliferating gooseberry cultures under slow growth conditions. W druku Horticultural Science 70 pkt.
- Kucharska D., Orlikowska T., Maciorowski R., Kunka M., Wójcik D., Pluta S. (2020). Application of *meta*-topolin for improving micropropagation of gooseberry (*Ribes grossularia*). Scientia Horticulture 272: 109529. 140 pkt
- Wójcik D., Trzewik A., Kucharska D. (2021). Field performance and genetic stability of micropropagated gooseberry plants (*Ribes grossularia* L.). Agronomy 2021, 11, 45. <https://doi.org/10.3390/agronomy11010045> AGRONOMY 100 pkt.
- Kucharska D., Trzewik A., Wójcik D. (2020). Ocena wzrostu i stabilności genetycznej agrestu (*Ribes grossularia* L.) rozmnażanego *in vitro* oraz *ex vitro*. Biuletyn IHAR 20 pkt



Rys 1. Dendrogram 15 genotypów agrestu metodą UPGMA w oparciu o markery AFLP.

Indukowanie zmienności genetycznej jabłoni na drodze poliploidyzacji *in vitro* oraz ocena fenotypowa i genetyczna uzyskanych poliploidów w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych

Induction of genetic variability of apple via polyploidization *in vitro* and phenotypic and genetic assessment of polyploids obtained in relation to their diploid counterparts

Małgorzata Podwyszyńska✉, Monika Markiewicz, Krzysztof Klamkowski, Agata Broniarek-Niemiec, Mirosława Cieślińska, Agnieszka Marasek-Ciołakowska, Iwona Sowik, Joanna Puławska, Bożena Matysiak, Dorota Kruczyńska

Instytut Ogrodnictwa - Państwowy Instytut Badawczy
✉ e-mail: malgorzata.podwyszynska@inhort.pl

Słowa kluczowe: ekspresja genów, *Erwinia amylovora*, *in vitro*, *Malus × domestica*, odporność, tetraploidy, *Venturia inaequalis*

Cele prowadzonych badań

Celem nadrzędnym badań było uzyskanie tetraploidów o nowych cechach użytkowych, w tym zwiększonej odporności na porażenie przez groźne patogeny jabłoni: *Erwinia amylovora* – sprawcy zarazy ogniowej oraz *Venturia inaequalis* – sprawcy parcha jabłoniowego. W kolejnych etapach badań cele badawcze obejmowały: 1) opracowanie metody poliploidyzacji *in vitro* jabłoni, 2) optymalizację ukorzenia i aklimatyzacji mikrosadzonek uzyskanych tetraploidów, 3) opracowanie metod oceny i selekcji genotypów o zwiększonej odporności na zarazę ogniową (test *in vitro*) oraz parcha jabłoniowego (test szklarniowy); 4) ocenę zmian fenotypowych i genetycznych nowo powstałych tetraploidów jabłoni w odniesieniu do odmian wyjściowych.

Osiągnięto wszystkie cele badawcze.

Material i Metody

W badaniach wykorzystano odmiany jabłoni ‘Free Redstar’, ‘Gala Must’, ‘Pinova’, Co-op 32, ‘Redchief’ i ‘Sander’, posiadające przynajmniej jedną z pożądanых cech: obniżoną podatność na porażenie przez *E. amylovora* i/lub *V. inaequalis*, późne kwitnienie oraz regularne i obfite owocowanie. Zakładano, że cechy te u neotetraploidów mogą ulec wzmocnieniu na skutek podwojenia liczby chromosomów.

Badania rozpoczęto od zapoczątkowania kultur pędów ww. odmian oraz referencyjnych ‘Idared’ i ‘Lobo’ (podatnych na porażenie przez *E. amylovora* i *V. inaequalis*). Rośliny donorowe testowano na obecność wirusów i fitoplazm. Następnie optymalizowano metodę mikrorozmnażania oraz opracowywano system regeneracji pędów przybyszowych z eksplantatów liściowych (niezbędne do prowadzenia badań nad poliploidyzacją).

W celu opracowania metody poliploidyzacji optymalizowano warunki traktowania antymitotykami ekplantatów pędowych oraz liściowych pozyskiwanych z kultur *in vitro*. Eksplantaty traktowano antymitotykami poprzez inkubację (3–7 dni) na pożywce zawierającej kolchicynę, trifluralinę, oryzalinę lub APM. Oceniano fitotoksyczność antymitotyków i efektywność tworzenia pędów. Tetraploidy wykrywano przy użyciu cytometrii przepływowej.

Optymalizowano metodę ukorzenia mikrosadzonek *in vitro* oraz bezpośrednio w miniszklarenkach (Podwyszyńska i Cieślińska 2018). Zaaklimatyzowane rośliny, uprawiane w szklarni służyły do dalszych badań.

Wykonano ocenę morfologiczną oraz parametrów fizjologicznych 39 wytypowanych tetraploidów w odniesieniu do genotypów wyjściowych. Ocenie poddano 6–9-miesięczne rośliny rosnące



w szklarni oraz 1–3-letnie drzewka (własnokorzeniowe oraz szczepione na podkładce M9), uprawiane w sadzie.

Przeprowadzono ocenę *in vitro* podatności na porażenie przez *E. amylovora* 51 tetraploidów w odniesieniu do diploidów i odmiany referencyjnej. Pędy inokulowano bakterią poprzez usunięcie wierzchołka pędu skalpelem zanurzonym w inokulum (10^5 jtk/ml (Podwyszyńska i wsp. 2020). Następnie pędy inkubowano na pożywce do namnażania. Stopień nekrozy pędów oceniano w skali 1–5 przez 2–5 tygodni.

Dokonano oceny podatności 54 tetraploidów na porażenie przez *V. inaequalis* w warunkach szklarniowych. Rośliny inokulowano zawiesiną zarodników *V. inaequalis* o koncentracji ok. 10^5 zarodników/ml, umieszczono na 48 godzin w warunkach wysokiej wilgotności, następnie przenoszono do standardowych warunków szklarniowych. Ocenę porażenia liści w odniesieniu do diploidów i odmian referencyjnych przeprowadzono po 4 tygodniach przy użyciu 5-stopniowej skali.

W celu zbadania zmienności genetycznej klonów tetraploidalnych w odniesieniu do diploidów przeprowadzono analizę AFLP-PCR z udziałem 5 par starterów. Przeprowadzono zmiany epigenetyczne, będące przyczyną przedwczesnego wchodzenia w spoczynek niektórych tetraploidów, przejawiające się zahamowaniem wzrostu, oceniano poprzez analizę wzoru metylacji DNA przy użyciu analizy MSAP z zastosowaniem 8 par starterów (Podwyszyńska i wsp. 2021a, b). Analizie poddano genotypy tetraploidalne, charakteryzujące się tendencją do przedwczesnego spoczynku oraz rośliny aktywnie rosnące przed i po traktowaniu niską temperaturą 5°C przez 10 tygodni.

W celu poznania molekularnego mechanizmu zwiększonej odporności tetraploidów ‘Free Redstar’ na parcha jabłoni w porównaniu do odmiany wyjściowej i referencyjnej przeprowadzono analizę obecności genów odporności na parcha *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi7*, *Rvi8*, *Rvii1*, *Rvii4*, *Rvii5* oraz *Rvi 17* u tetraploidów tej odmiany (Podwyszyńska i wsp. 2021a).

Do identyfikacji genów jabłoni związanych z reakcją roślin na porażenie *V. inaequalis* zastosowano technikę cDNA-AFLP z wykorzystaniem 10 par starterów różnicujących. Próby do analiz pobierano przed i po 2 dniach od inokulacji. Porównywano profile ekspresyjne otrzymane dla roślin tetraploidalnych i diploidalnych, a różnicujące je produkty – o podwyższonym poziomie ekspresji u tetraploidów – sekwencjonowano oraz poddano analizie homologii BLAST.

Ponadto przeprowadzono analizę ekspresji 6 genów związanych z odpornością: *PR1*, *PR2*, *Rvi6*, *WRKY29*, *CDPK* i *MPK4* podczas infekcji *V. inaequalis* u tetraploida ‘Free Redstar’ metodą real-time PCR.

Opis wyników

Ustalono optymalną kombinację regulatorów wzrostu do namnażania pędów: $1\text{--}1,5\text{ mg l}^{-1}$ BAP lub 2 mg l^{-1} m-topoliny w połączeniu z $0,1\text{ mg l}^{-1}$ IBA i $0,3\text{--}0,5\text{ mg l}^{-1}$ GA_3 . Regeneracja pędów przybyszowych na eksplantatach liściowych najlepiej przebiegała, gdy liście inkubowano przez 4 tygodnie w ciemności na pożywce z dodatkiem 1 mg l^{-1} TDZ lub 4 mg l^{-1} BAP w połączeniu z $0,5\text{ mg l}^{-1}$ NAA (Podwyszyńska i wsp. 2017).

W wyniku poliploidyzacji dla wszystkich odmian uzyskano w sumie 181 tetraploidów; 104 – z eksplantatów liściowych i 77 – pędowych, najwięcej po zastosowaniu kolchicyny (98) i APM (56).

Mikrosadzonki zarówno diploidów, jak i tetraploidów charakteryzowały się słabymi zdolnościami do ryzogenez. Znaczną poprawę ukorzeniania z 0–40% do 60–100% u diploidów i z 0–10% do 50–80% u tetraploidów uzyskano dzięki zastosowaniu dwu-stopniowego systemu ukorzeniania: 1) 6–7-dniowej indukcji ryzogenez w ciemności i podwyższonej temperaturze do 25°C , na pożywce zawierającej IBA i IAA oraz putrescynę, a następnie 2) sadzeniu pędów *ex vitro*.

Poliploidyzacja jabłoni spowodowała wyraźną zmianę fenotypu szczególnie widoczną u roślin własnokorzeniowych: tetraploidy były znacznie niższe, liście miały zmieniony kształt i zawierały więcej chlorofilu, w kilku przypadkach aktywność fotosyntetyczna była niższa niż u diploidów. Tetraploidy szczepione na podkładce M9 charakteryzowały się większym wigorem niż własnokorzeniowe (Podwyszyńska i wsp. 2021a).

W testach podatności na porażenie przez *E. amylovora*, przeprowadzonych metodą *in vitro* u 5 odmian ‘Free Redstar’, ‘Gala Must’, ‘Pino-va’ i ‘Redchief’ i Co-op 32, wykryto w sumie 15 klonów tetraploidalnych, charakteryzujących się istotnie niższym stopniem porażenia patogenem w porównaniu do odmiany macierzystej i referencyjnej (Podwyszyńska i wsp. 2020).

Ocena podatności na parcha jabłoni w warunkach szklarniowych wykazała, że tetraploidy odmian o małej podatności nie były w ogóle porażane, jak u ‘Free Redstar’ i Co-op 32.

Analiza molekularna potwierdziła, że różnice w obrębie tetraploidów danej odmiany są związane ze zmianami genetycznymi i epigenetycznymi,

na co wskazują zmiany w strukturze i stopniu metylacji DNA (Podwyszyńska i wsp. 2021a, b). W analizie AFLP, średni stopień zróżnicowania genetycznego tetraploidów ‘Pinova’, ‘Gala Must’ i ‘Redchief’ wyniósł 2,4% w stosunku do diploidalnych odpowiedników. Najwyższą zmienność – ponad 10%, obserwowano u 2 tetraploidów ‘Redchief’. Analiza MSAP wykazała wyższy stopień metylacji DNA u tetraploidów w porównaniu do diploidów. Klony tetraploidalne ‘Sander’ z tendencją do przedwczesnego wchodzenia w spoczynek charakteryzowały się dwukrotnie wyższym stopniem metylacji DNA (średnio 22,95%) niż diploidy. Traktowanie takich roślin niską temperaturą obniżyło stopień metylacji do 18,75%.

Analizy molekularne potwierdziły obecność 6 z 8 badanych genów *Rvi* związanych z odpornością na parcha, zarówno u diploidów i tetraploidów ‘Free Redstar’. U tetraploidów wykazano większe ilości produktów amplifikacji DNA genów *Rvi* w porównaniu do diploida oraz podwyższenie poziomu ekspresji genów odporności: 2–8-krotne w 2 lub 7 dniu po inokulacji *V. inaequalis* w zależności od genu (*PR1*, *PR2*, *Rvi6*, *WRKY29*, *CDPK* i *MPK4*) (Podwyszyńska i wsp. 2021a).

Podczas analiz transkryptomów zidentyfikowano 30 fragmentów cDNA-AFLP ulegających nadekspresji u tetraploidów ‘Free Redstar’ infekowanych *V. inaequalis* – 83% z nich wykazywało homologię do genów kodujących znane białka roślinne. Trzy z nich wykazywały podobieństwo do genów kodujących białka zaangażowane w reakcje odpornościowe roślin: czynnik transkrypcyjny RAP2, białko EFR3 oraz hydrolazę ABH.

Wnioski z prowadzonych badań

- Metoda poliploidyzacji oparta na wykorzystaniu APM i eksplantatów pędowych jest efektywna i stosunkowo wydajna.
- Łączna aplikacja auksyn (IAA z IBA lub NAA) i putrescyny oraz stosowanie dwuetapowego ukorzenia z 6-dniową indukcją ryzogenezy *in vitro*, skutkuje zwiększeniem efektywności ukorzenia mikrosadzonek tetraploidów.
- Podwojenie liczby chromosomów powoduje wyraźne zmiany fenotypu. W porównaniu z diploidami, tetraploidy mają krótsze pędy, liście o zmienionym kształcie i wyższej zawartości chlorofilu oraz niższą aktywność fotosyntetyczną i natężenie transpiracji.
- W porównaniu do tetraploidów własnokorzeniowych, tetraploidy jabłoni szczepione na podkładce M9 odznaczają się większym wigorem.

- Zmienność fenotypowa ma podłoże genetyczne i epigenetyczne.
- W wyniku poliploidyzacji można uzyskać tetraploidy o mniejszym stopniu podatności na porażenie zarazą ogniową i/lub parchem jabłoniowym.
- Na podstawie analizy transkryptomu można stwierdzić, że mechanizm molekularny podwyższonej odporności na parcha jabłoni tetraploidów ‘Free Redstar’, w porównaniu do diploidów, polega na zwiększeniu u tetraploidów poziomu ekspresji genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe.

Osiągnięcia projektu

- Opracowano wydajny system regeneracji pędów przybyszowych *in vitro* z eksplantatów liściowych oraz efektywną metodę wytwarzania tetraploidów jabłoni.
- Opracowano efektywną metodę ukorzenia mikrosadzonek tetraploidów.
- Uzyskano tetraploidy jabłoni o mniejszej podatności na zarazę ogniową i parcha jabłoniowego, które będą wykorzystane do dalszych badań oraz w hodowli odpornościowej jabłoni.
- Potwierdzono, że zmienność fenotypowa pomiędzy diploidami i tetraploidami oraz pomiędzy siostrzanymi tetraploidami jest m. in. wynikiem zmian genetycznych i epigenetycznych.
- Wyjaśniono, że mechanizm molekularny wysokiej odporności tetraploidów ‘Free Redstar’ na parcha jabłoni, polega m.in. na zwiększeniu poziomu ekspresji genów zaangażowanych w reakcje odpornościowe na choroby.
- Na podstawie analizy transkryptomu zidentyfikowano geny *Rvi* oraz inne geny, które mogą być związane z ww. zwiększoną odpornością na porażenie przez *V. inaequalis*.
- Prezentacja posterowa przedstawiona w 2018 r. na Fourth International Horticulture Research Conference (East Malling, UK) została nagrodzona za interesujące wyniki nagrodą – sekwenator MinION ufundowaną przez Oxford Nanopore Technologies.

Wykaz publikacji wyników

Doniesienia konferencyjne

Podwyszyńska M., Sowik I. 2015. Regeneracja pędów przybyszowych jabłoni z eksplantatów liściowych w kulturach *in vitro*. XIV Ogólnopolska Konferencja Kultur *in vitro* i Biotechnologii Roślin, Poznań 14–17.09.2015. Biotechnologia 96 (1): 118 (poster)

- Podwyszyńska M., Sowik I., Kruczyńska D. 2015. Indukowanie tetraploidów jabłoni metodą *in vitro*. IV Zjazd PTNO, Wrocław 14–16.09.2015: 215 (poster)
- Podwyszyńska M., Sowik I., Kruczyńska D. 2016. Optymalizacja ukorzenia mikrosadzonek nowo uzyskanych tetraploidów jabłoni. 57 Zjazd PTB, Lublin 27.06–3.07.2016: 190–191 (poster)
- Podwyszyńska M., Sowik I., Murgrabia A. 2016. Otrzymywanie autotetraploidów jabłoni *in vitro* z wykorzystaniem eksplantatów liściowych. Konferencja Nowe Osiągnięcia Polskich Zespołów Badawczych w Dziedzinie Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin. Międzyzdroje, 8–10.06.2016: 61 (referat)
- Sowik I., Podwyszyńska M. 2016. Testowanie *in vitro* podatności pędów jabłoni na porażenie przez *Erwinia amylovora* (Burr.). Konferencja naukowa j.w. Międzyzdroje, 8–10.06.2016: 71 (referat)
- Markiewicz M., Podwyszyńska M. 2017. Ocena zmian genetycznych/epigenetycznych uzyskanych tetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidalnych genotypów wyjściowych. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa (30-Lecie PTNO), 20–21.09.2017, Kraków: 107 (poster)
- Podwyszyńska M., Markiewicz M. 2017. Phenotypic and genetic evaluation of apple neotetraploids obtained by *in vitro* method. Fourth International Horticulture Research Conference. 16–20.07. 2017, East Malling, UK: 94 (poster)
- Markiewicz M., Podwyszyńska M. 2018. Genetic evaluation of apple neotetraploids cultivar 'Redchief' obtained by *in vitro* method and preliminary phenotypic observations. XXX International Horticultural Congress, S20, 12-16.08.2018, Sztambuł, Turcja: S20 (referat)
- Sowik I., Podwyszyńska M., Puławska J. 2018. *In vitro* testing of apple tetraploids for resistance to *Erwinia amylovora*. XXX International Horticultural Congress, 12-16.08.2018, Sztambuł, Turcja: S20-P22 (poster)
- Markiewicz M., Podwyszyńska M. 2019. Ocena stopnia metylacji DNA autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych. 58 Zjazd PTB, Kraków, 1–7.09.2019 (poster)
- Podwyszyńska M., Broniarek-Niemiec A., Wojtania A., Klamkowski K., Marasek-Ciołakowska A., Puławska J. 2019. Ocena fenotypowa autotetraploidów jabłoni ze szczególnym uwzględnieniem podatności na porażenie przez *Venturia inaequalis* i *Erwinia amylovora*. XIV Ogólnopolska Konferencja Naukowa Nauka Dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych, Zakopane, 5.02.2019. Biul. Inst. Hod. Aklim. Rośl. 285: 125–126. (referat)
- Podwyszyńska M., Klamkowski K., Matysiak M., Kruczyńska D., Broniarek-Niemiec A., Markiewicz M. 2019. Ocena parametrów fizjologicznych i morfologicznych autotetraploidów jabłoni w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych, porównanie wzrostu roślin rosnących na własnych korzeniach i okulantów. V Zjazd PTNO, 16–18.09.2019, Warszawa: 123 (referat)
- Podwyszyńska M., Markiewicz M. 2019. The genetic background of the phenotypic variability observed in apple autotetraploids. XV EUCARPIA Symposium on Fruit Breeding and Genetics, 3-7.06.2019, Praga, Czechy, streszczenia: O35 (referat)

Publikacje oryginalne

- Podwyszyńska M., Sowik I., Machlańska A., Kruczyńska D., Dyki B., 2017. *In vitro* tetraploid induction of *Malus x domestica* Borkh. using leaf or shoot explants. Sci. Hortic. 226: 379-388 (IF - 1,76; 35 pkt w 2017)
- Podwyszyńska M., Cieślińska M. 2018. *In vitro* shoot rooting optimization of apple scion cultivars and rooting ability evaluation of their neotetraploids. Acta. Sci. Pol., Hortorum Cultus 17 (1): 49–62 (IF – 0,445; 20 pkt w 2018)
- Podwyszyńska M., Sowik I., Puławska J., 2020. *In vitro* testing of apple tetraploids for resistance to fire blight. Acta Hortic., 1282: 343-350 (5 pkt.)
- Podwyszyńska M., Markiewicz M., Broniarek-Niemiec A., Matysiak B., Marasek-Ciołakowska A. 2021a. Apple autotetraploids with enhanced resistance to apple scab due to genome duplication - phenotypic and genetic evaluation. Int. J. Mol. Sci. 2(2), 527 (IF – 4,556; 140 pkt)
- Podwyszyńska M., Markiewicz M., Klamkowski K., Broniarek A., Wojtania A. 2021b. The genetic background of the phenotypic variability observed in apple autotetraploids. Acta Hortic. (zaakceptowane do druku, 5 pkt).

Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juvenilnego i poprawy jakości owoców

Genetic and molecular analysis of selected apple genotypes (*Malus domestica*) for shortening of the juvenile period and quality improvement of the fruits

Mariusz Lewandowski✉, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz

Instytut Ogródnictwa - Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice
✉ e-mail: mariusz.lewandowski@inhort.pl

Słowa kluczowe: faza juvenilna, jabłoni, jakość owoców, markery molekularne

Cele prowadzonych badań

1. Określenie przydatności wybranych genotypów jabłoni dla uzyskania populacji mieszańców pokolenia F_1 o krótkim okresie juvenilnym i zróżnicowanym (odtworzonym) smaku owoców "starych" odmian, obecnie już nie uprawianych oraz o wysokiej zawartości związków prozdrowotnych – cel osiągnięty.
2. Badania molekularne (cena stopnia polimorfizmu DNA form rodzicielskich, analiza genotypowa mieszańców z populacji segregującej, analiza korelacji cech fenotypowych i molekularnych populacji F_1) podsumowane scharakteryzowaniem *loci* regionów sprzężonych z długością okresu juvenilnego na mapie genomu jabłoni – cel osiągnięty.

Materiały i Metody

Przedmiotem badań były rośliny 11 genotypów jabłoni, które skrzyżowano w układzie czynnikowym ($4♀ \times 7♂$). Genotypami matecznymi były: 'Alwa', 'Golden Delicious', 'Free Redstar', 'Gold Milenium' (odmiany o krótkim okresie juvenilnym), a genotypami ojcowskimi: 'Glogierówka', 'Kronselska', 'Kosztela', 'McIntosh', 'Oliwka Żółta', 'Malinowa Oberlandzka', 'Koksa Pomarańczowa' (odmiany "stare", znane ze unikalnego smaku owoców). Wykonano 28 kombinacji krzyżowań, przeprowadzono stratyfikację nasion i otrzymano populację siewek pokolenia F_1 (Lewandowski i Żurawicz 2017). Materiał do badań stanowiło 2 800 siewek (100 siewek z każdej kombinacji – 4 powtórzenia po 25 siewek).

W latach 2018–2020 dla każdej rośliny (2 800

siewek) wykonano ocenę: siły wzrostu – wyrażoną średnicą (w mm) i wysokością pędu przewodnikowego (w cm), intensywności kwitnienia i owocowania siewek, stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni (*Venturia inaequalis*) i stopnia porażenia siewek przez mączniaka jabłoni (*Podosphaera leucotricha*).

W latach 2019–2020 dla wyselekcjonowanych 60 genotypów, z których pobrano owoce, wykonano ich ocenę sensoryczną i instrumentalną: wygląd (atrakcyjność) owoców, smak owoców, wielkość owoców, kształt owoców, jędrność owoców (N), ekstrakt refraktometryczny (Bx), zawartość kwasu L-askorbinowego (KA) i pomiar kwasowości miareczkowej.

Analiza statystyczna. Do obliczenia efektów GCA i SCA dla układu czynnikowego ($♀4 \times ♂7$), analizy wariancji oraz szczegółowego testowania jednoczesnego użyto programu SERGEN (Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu).

Opis wyników

Wśród 11 form rodzicielskich, 7 odmian: 'Free Redstar', 'Gold Milenium', 'Alwa', 'Golden Delicious', 'Kosztela', 'Oliwka Żółta' i 'Koksa Pomarańczowa' miało istotne dodatnie lub ujemne wartości efektów GCA dla siły wzrostu siewek. Odmiany: 'Free Redstar', 'Gold Milenium', 'Alwa' i 'Koksa Pomarańczowa' wykazały istotnie dodatnie wartości efektów GCA dla badanych cech, są więc donorami silnego wzrostu siewek potomnych. Natomiast odmiany 'Golden Delicious', 'Kosztela' i 'Oliwka Żółta' miały istotnie negatywne efekty GCA, są więc donorami genów warunkujących słaby wzrost siewek potomnych (Lewandowski i in. 2019, Lewandowski i in.



2020, Lewandowski i Żurawicz 2019b).

Wyniki analizy ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla intensywności kwitnienia i owocowania siewek wykazały istotnie dodatnią wartość efektu GCA dla tej cechy roślin dla odmiany 'Free Redstar'. Oznacza to, że genotyp ten przekazuje potomstwu zdolność do obfitego kwitnienia i owocowania siewek jabłoni. Natomiast odmiana 'Golden Delicious' miała istotnie negatywny efekt GCA dla tej cechy. Odmiana ta użyta jako forma rodzicielska jest więc donorem genów warunkujących słabe kwitnienie i owocowanie u potomstwa.

Dodatkowo, wyniki analizy ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni odmiany 'Free Redstar' wykazały ujemny efekt GCA. Genotyp ten jest potencjalnym donorem genów warunkujących odporność/małą podatność na parcha i mączniaka jabłoni u potomstwa. Odmiany 'Alwa' i 'Oliwka Żółta' reprezentowały natomiast istotnie dodatnie efekty GCA dla stopnia porażenia roślin przez parcha i mączniaka jabłoni, są więc donorami genów warunkujących podatność na parcha i mączniaka jabłoni u potomstwa siewek (Lewandowski i Żurawicz 2019a, Lewandowski i in. 2020, Lewandowski i Keller-Przybyłkiewicz 2020).

W ocenie sensorycznej stwierdzono, że najbardziej atrakcyjne i bardzo smaczne owoce posiada genotyp – J-2014–08 (95) otrzymany ze skrzyżowania odmian 'Gold Milenium' x 'Glogierówka'. Za ciekawe genotypy uznano także: J-2014–25 (3) i J-2014–25 (42), oba otrzymane ze skrzyżowania odmian 'Golden Delicious' x 'Kronselska'.

W ocenie instrumentalnej wykazano, że zawartość ekstraktu badanych próbek jabłek mieściła się w przedziale 13,2 – 15,9°Bx. Najwyższą zawartością ekstraktu (15,9°Bx) charakteryzował się genotyp J-2014–06 (27). Kwasowość badanych próbek jabłek mieściła się w zakresie 0,10 – 0,77%. Zawartość kwasu L-askorbinowego w owocach badanych genotypów była w przedziale 6,6 – 20,5 mg/100g, a najwięcej tego kwasu zawierały genotypy J-2014–11 (48) i J-2014–25 (83), odpowiednio 20,5 mg/100g i 20,0 mg/100g. Jędrność owoców badanych genotypów mieściła się w zakresie 68,1 N – 127,9 N. Najjędrniejsze były owoce genotypów J-2014–26 (23) i J-2014–06 (27).

W ramach badań utworzono bibliotekę ampikonów polimorficznych dla 12 genotypów jabłoni: 'Alwa', 'Golden Delicious', 'Free Redstar', 'Gold Milenium', 'Glogierówka', 'Kronselska', 'Kosztela', 'McIntosh', 'Oliwka Żółta', 'Malinowa Oberlandzka', 'Koksa Pomarańczowa' i 'Sunrise'

oraz 2 odmian: 'Red Delicious' i 'Macoun', będących przodkami ww. odmian jabłoni. Najbardziej pokrewne genetycznie były odmiany 'Free Redstar' i 'Red Delicious' (68%), 'Alwa' i 'McIntosh' (54%) oraz 'Gold Milenium' i 'Golden Delicious' (55%). Najbardziej genetycznie oddalone okazały się odmiany: 'Free Redstar', 'Glogierówka', 'Oliwka Żółta', 'Sunrise' i 'Kronselska'. W oparciu o tę bibliotekę wytypowane zostały 2 populacje mapujące ('Free Redstar' x 'Oliwka Żółta' oraz 'Free Redstar' x 'Sunrise'), przeznaczone do dalszych badań nad sporządzeniem szkieletu mapy genetycznej jabłoni.

Dla 200 genotypów mieszańcowych reprezentujących wybrane populacje segregujące z krzyżowania odmian 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta' oraz 'Free Redstar' i 'Sunrise', zróżnicowanych pod względem długości fazy juvenilnej, potwierdzono status genetyczny (eliminacja form 'outcross'). Stosując testy SSR-PCR zidentyfikowano łącznie 5 genotypów pochodzących z niekontrolowanych zapyleń. Do dalszych badań genotypowo-fenotypowych wytypowano populację 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta' (198 genotypów).

Na podstawie analiz rozkładu alleli (2015 – 2020) markerów mikrosatelitarnych (300 SSR), zidentyfikowanych w genotypach mieszańcowych ('Free Redstar' i 'Oliwka Żółta'), sporządzono odrębne mapy genetyczne genomów obu odmian. Uzyskana mapa genomu odmiany 'Oliwka Żółta' zawiera 45 grup sprzężeń w obrębie, których zidentyfikowano *loci* 241 alleli markerów SSR, segregujących w populacji mapującej. Natomiast na mapie genomu odmiany 'Free Redstar' zlokalizowano 350 alleli markerów SSR sprzężonych w 66 grupach LG. Wielkość zmapowanego genomu odmiany 'Oliwka Żółta' wyniosła 2 483,8 cM, natomiast genomu odmiany 'Free Redstar' 3 077,9 cM. Utworzone mapy genetyczne wykorzystano jako bazę do badań nad lokalizacją regionów genomów, warunkujących ważne cechy użytkowe badanych odmian jabłoni. Oszacowanie korelacji genotypowo – fenotypowej pomiędzy markerami o znanych *loci* a cechami fenotypowymi (sukcesywna ocena polowa 2015–2020) pozwoliły określić przydatność sekwencji tych markerów do selekcji nowo wytworzonych genotypów tego gatunku (MAS: Marker Assisted Selection).

Ponadto dla wyselekcjonowanych 60 genotypów (pod kątem krótkiego okresu juvenilnego i dobrej jakości zewnętrznej i wewnętrznej owoców) potwierdzono status mieszańca i zróżnicowanie genetyczne. Na podstawie analizy fragmentów genomowych, wydzielonych

z użyciem 30 wybranych markerów molekularnych o najwyższej korelacji z ocenianymi cechami fenotypowymi, sporządzono dendrogramy ich pokrewieństwa genetycznego. W wyniku uzyskanych 'drzew' dystansu genetycznego zaobserwowano, że najbardziej zróżnicowane genetycznie są genotypy pochodzące z krzyżowań, w których zastosowano odmiany: 'Gold Milenium', 'Malinowa Oberlandzka', 'Golden Delicious', 'Free Redstar' i 'Glogierówka'. Donorami alleli ważnych cech użytkowych okazały się odmiany „stare”, jak: 'Kronselska', 'Kosztela', 'Oliwka Żółta', 'Koksa Pomarańczowa' czy 'Malinowa Oberlandzka'. Genotypy te mogą być z powodzeniem wykorzystane do tworzenia nowych materiałów wyjściowych w planowanych programach genetyczno-hodowlanych, wzbogacając tym samym ich wartość produkcyjną o najwyższe parametry cech użytkowych gatunku jabłoni.

Dane genotypowe (zidentyfikowane *loci* markerów SSR) uzyskane w wyniku analizy map genetycznych odmian 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta' oraz dane z oceny fenotypowej wszystkich genotypów mieszańcowych z wytypowanej populacji F_1 , wykorzystano do analizy korelacji genotypowo-fenotypowej. Wysoki stopień korelacji zaobserwowano pomiędzy: terminem kwitnienia, średnicą i wysokością pędu, a markerami zlokalizowanymi w grupach sprzężeń LG 10, 2, 3, 6 i 8; odpornością na parcha jabłoni – w grupach LG 1, 2 i 12 oraz odpornością na mączniaka jabłoni, w grupach sprzężeń 10, 8 i 17 genomu odmiany 'Free Redstar'.

Ponadto regiony QTL potencjalnie związane z intensywnością wzrostu i średnicą pędów, zidentyfikowano w grupach 12, 17, 4, 5, 9 i 7 jej genomu. Wysoki stopień korelacji terminu kwitnienia oraz odporności na parcha jabłoni odnotowano w LG 2 genomu odmiany 'Oliwka Żółta', natomiast markery z grupy LG 10 wykazały wysoki stopień sprzężenia z wysokością i średnicą pędów. Dodatkowe regiony QTL skorelowane z terminem kwitnienia oraz wysokością pędów zidentyfikowano w grupach sprzężeń odpowiednio LG 4, 6, 8 oraz 3 i 14 genomu tej odmiany. Analiza korelacji genotypowo – fenotypowych potwierdziła obecność regionów związanych z regulacją długości okresu juvenilnego oraz ważnych cech użytkowych jabłoni w genomach obu odmian. Markery SSR (30) zlokalizowane w ich obrębie wytypowano jako przydatne do prowadzenia wczesnej selekcji (MAS; Marker Assisted Selection) klonów uzyskanych w nowych programach krzyżowań Instytutu Ogrodnictwa - PIB.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Wyniki badań pokazują, że badane genotypy rodzicielskie jabłoni różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem badanych cech.
2. Wśród 60 wyselekcjonowanych genotypów jabłoni znajdują się zarówno genotypy z wysoką i niską jędrnością owoców oraz genotypy z wysoką i niską zawartością ekstraktu, kwasowości i kwasu L-askorbinowego w owocach.
3. Utworzone mapy genetyczne stanowią bazę do dalszych badań genomów nowych odmian jabłoni, a także do oszacowania korelacji pomiędzy zlokalizowanymi markerami a cechami fenotypowymi (MAS: Marker Assisted Selection).
4. Wstępnie wytypowane markery o znanych *loci* stanowią bazę do wczesnej selekcji siewek pod kątem cech warunkujących długość fazy juvenilnej jabłoni.

Osiągnięcia projektu

1. Wytworzono nowe genotypy jabłoni o zróżnicowanych walorach smakowych i wysokiej wartości odżywczej i prozdrowotnej jabłek:
 - J-2014–08 (95) otrzymany ze skrzyżowania odmian 'Gold Milenium' x 'Glogierówka' (rys. 1),
 - J-2014–25 (3) otrzymane ze skrzyżowania odmian 'Golden Delicious' x 'Kronselska',
 - J-2014–25 (42) otrzymane ze skrzyżowania odmian 'Golden Delicious' x 'Kronselska'.

Genotypy te włączone zostaną do programu hodowli jabłoni w Instytucie Ogrodnictwa - PIB, a po wykonaniu ich oceny w doświadczeniach odmianowo-porównawczych i wdrożeniowych zostaną zgłoszone do badań rejestrowych COBORU.

2. Poszerzono pulę genową w obrębie gatunku jabłoni (*Malus domestica*), będącą w zasobach Instytutu Ogrodnictwa - PIB.
3. Uzyskano nowe genotypy jabłoni o krótkim okresie juvenilnym i zwiększonej zawartości składników bioaktywnych w owocach i odtworzonym smaku odmian "starych".

W wyniku przeprowadzonej analizy ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla intensywności kwitnienia i owocowania siewek jabłoni stwierdzono, że istotnie dodatnią wartość efektu GCA dla tej cechy roślin oszacowano dla odmiany 'Free Redstar'. Oznacza to, że genotyp ten przekazuje potomstwu zdolność do obfitego kwitnienia i owocowania siewek jabłoni. Potwierdzają to także badania polowe, w których siewki mające

w rodowodzie odmianę ‘Free Redstar’ wcześniej wchodziły w okres kwitnienia i owocowania.

4. W oparciu o korelacje genotypowo-fenotypowe w populacji F₂ określono regiony mapy genetycznej, regulujące długość okresu juwenilnego i cechy jakości owoców.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje naukowe

Lewandowski M., Keller-Przybyłkiewicz S., Korbin M., Żurawicz E. 2019. Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juwenilnego i poprawy jakości owoców. Biuletyn IHAR, 286: 419–424. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0093> (Komunikat)

Lewandowski M., Keller-Przybyłkiewicz S., Żurawicz E. 2020. Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juwenilnego i poprawy jakości owoców. Biuletyn IHAR, 291 (1): 231–234. (Komunikat)

Lewandowski M., Keller-Przybyłkiewicz S. 2020. Wartość hodowlana wybranych odmian jabłoni (*Malus domestica*)

pod względem odporności na parcha i mączniaka jabłoni. Biuletyn IHAR, 291: 47–52. <https://doi.org/10.37317/biul-2020-PB84> (Publikacja oryginalna)

Doniesienia konferencyjne (abstrakty)

Lewandowski M., Żurawicz E. 2017. Kielkowanie nasion jabłoni (*Malus domestica*) w zależności od krzyżowanych genotypów rodzicielskich. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa „Ziemia – Roślina – Człowiek”, 20–21 września 2017, Kraków. Materiały konferencyjne: 106

Lewandowski M., Żurawicz E. 2019a. Breeding value of selected apple cultivars (*Malus domestica*) for the resistance to apple scab and powdery mildew. XV EUCARPIA Fruit Breeding and Genetics Symposium, June 3-7, 2019, Prague, Czech Republic. Book of abstracts, Poster presentations: 40

Lewandowski M., Żurawicz E. 2019b. Wartość hodowlana wybranych odmian jabłoni (*Malus domestica*) pod względem siły wzrostu roślin. Konferencja naukowa „Miejsce ogrodnictwa we współczesnym życiu człowieka i ochronie środowiska” (V Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych), Warszawa, 16–18 września 2019 r., Streszczenia, s. 119



Rys. 1 Genotyp J-2014–08 (95) – ‘Gold Milenium’ x ‘Glogierówka’.

Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z tolerancją wegetatywnych podkładek jabłoni na niskie temperatury poprzez analizę transkryptomu i ocenę stopnia polimorfizmu genów kandydujących

Identification of the genome regions correlated with cold hardiness of apple rootstocks by transcriptomic analysis of differentially expressed candidate genes

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz✉, Mariusz Lewandowski

Instytut Ogrodnictwa-Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice
✉ e-mai: Sylwia.Keller@inhort.pl

Słowa kluczowe: adnotacja, EST, qPCR, RNAseq, sekwencjonowanie NGS, transkryptom

Cel prowadzonych badań

Celem realizacji zadania (lata 2014–2020) było poszerzenie dotychczasowej bazy markerów mrozoodporności i wzbogacenie wiedzy w tym zakresie. W ramach zadania przeprowadzono szeroko zakrojone badania obejmujące: analizę fenotypową 17 podkładek jabłoni z kolekcji Instytutu Ogrodnictwa (IO) w oparciu o ocenę nasilenia ich reakcji obronnej po przemrożeniu oraz ocenę zmian ekspresji genów kandydujących (CG) (qPCR), wytypowanych na podstawie sekwencjonowania transkryptomu podkładek wzorcowych M.9 (wrażliwa), P 60, P 66 (tolerancyjne).

Materiał i Metody

Materiał roślinny stanowiły podkłładki jabłoni: P 2, P 14, P 16, P 22, P 59, P 60, P 66, P 67, P 68, M.7, M.9, M.26, MM.106, CG 11, CG 16, PB-4 i Antonówka (seria P – hodowla polska, M/MM – Wielka Brytania, CG – USA, PB-4 – Białoruś, Antonówka – Rosja), pochodzące z matecznika Ośrodka Elitarnego Materiału Szkółkarskiego IO Sp. z o.o. w Prusach.

Działaniu niskich temperatur poddano łącznie 4 760 roślin w/w podkładek. Mrożenie corocznie (680 roślin) odbywało się w komorze do sztucznego przemrażania materiałów roślinnych (BINDER GmbH). Dla każdej puli podkładek, w sezonie badawczym, stosowano 3 temperatury mrożenia: -10°C, -12°C i -14°C. Kontrolę stanowiły podkłładki nie poddawane działaniu niskich temperatur. Po zabiegu materiał przenoszono

do chłodni szkółkarskiej (0°C) w celu aklimatyzacji i wiosną wysadzano w warunki polowe. W trakcie uprawy stosowano nawozy mineralne i środki chwastobójcze. Ochronę siewek przed chorobami i szkodnikami prowadzono według zaleceń dla sadów produkcyjnych.

Równoległe z oceną fenotypową, na ww. materiale roślinnym prowadzone były analizy molekularne obejmujące ocenę polimorfizmu DNA badanych roślin jak również weryfikację genów kandydujących, wyłonionych na podstawie sekwencjonowania (NGS) transkryptomu podkładek o zróżnicowanej reakcji na mroz.

Opis wyników

Ocena fenotypowa roślin po przemrażaniu obejmowała: weryfikację zdolności regeneracji podkładek; ocenę średnicy pędu przewodnikowego (mm); wysokości pędu przewodnikowego (cm); długości przyrostów jednorocznych (cm) oraz świeżej masy korzeni podkładek (g).

Generalnie, w każdym roku badań obserwowano, że żadna z zastosowanych ujemnych temperatur nie spowodowała śmierci całej puli podkładek, niemniej kondycja roślin przemrażanych była znacznie słabsza niż roślin kontrolnych.

Największy wigor spośród roślin poddanych stresowi niskich temperatur posiadały te podkłładki, które poddano działaniu temperatury -10°C. Rosły one tylko nieznacznie słabiej niż rośliny kontrolne. Najsłabszym wigorem charakteryzowały się podkłładki poddane przemrażaniu w temperaturze -14°C. Podkłładki P 66, P 67



i P 68 wykazywały słabszą reakcję na przemrażanie niż standardowe M.9 i M.26. Dla tych podkładek odnotowano większy przyrost i średnicę pędu przewodnikowego, większą długość pędów bocznych, a także większą świeżą masę korzeni niż dla podkładek M.9 i M.26. W obrębie ocenianych podkładek wyróżniono dwie grupy – mniej i bardziej wrażliwe na przemrażanie. Do pierwszej grupy można zakwalifikować podkładowki P 59, P 60, P 66, P 67, P 68, M.7, MM.106, PB-4 i Siewkę Antonówki, do drugiej - podkładowki pozostałe, czyli P 2, P 14, P 16, P 22, CG 11, CG 16, M.9 i M.26.

W pierwszych etapach badań molekularnych przeprowadzono analizę polimorfizmu DNA sekwencji 20 genów znanych z literatury tj: CBF (*C-repeat binding factor*; MdCBF1 – MdCBF4), genu COR47 (*cold regulated gene*), ERF (*ethylene response factor*), dziewięciu genów z grupy *WXL* (*Winter-induced genes in xylem*), kodujących białka dehydryn (Deh-1–9), trzech genów z grupy *DREB* – *dehydration responsive elements binding protein* (Md0000165880, Md0000198054; LH1) oraz dwóch genów z grupy *MADS box* (MADS13 i MADS14).

Polimorfizm sekwencji ww. genów (technika CAPS-PCR), badany w obrębie 17 podkładek jabłoni, zidentyfikowano dla 9 spośród badanych genów kandydujących: CDSDeh, Deh4, Deh5, CBF3, LH1, COR47, Md0000165880, EF α 1, MADS13. W przypadku pozostałych 11 genów nie odnotowano fragmentów różnicujących badane podkładowki jabłoni.

Bazując na analizie polimorfizmu genetycznego na poziomie DNA i przy zastosowaniu wieloczynnikowej analizy MCA (*Multiple Correspondence Analysis*, XLSTAT 2007), genotypy podkładek pogrupowano pod kątem obecności lub braku różnicujących fragmentów CAPS. W pierwszej grupie znalazły się tolerancyjne podkładowki P 66, P 16, P 68, CG 11, CG 16, P 59, MM.106, PB4, a w drugiej, wykazujące większy stopień wrażliwości na mróz, M.9, P 2, P 14, M.26, P 22, Antonówka, M.7, P 67.

Kolejnym etapem badań molekularnych było opracowanie uniwersalnego testu qPCR (pozwala na ocenę ilości transkryptu genów w czasie rzeczywistym). Do badań optymalizacyjnych wytypowano genotypy podkładek różniących się reakcją na stres niskich temperatur P 60, P 66 i M.9. Wyboru genu referencyjnego, który charakteryzuje się stabilnością w badanych układach eksperymentalnych, niezbędnego do oceny relatywnej ekspresji genów kandydujących, dokonano na podstawie analizy poziomu transkryptu pięciu par oligonukleotydowych, specyficznych do sekwencji genów; beta-aktyny, rybosomalnej podjednostki *18sRNA*,

amoniako-liazy L-fenyloalaniny – *PAL*, dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego – *GAPDH* oraz czynnika elnognacyjnego alfa1 – EL α 1. Na podstawie uzyskanych wyników oceniono stopień ich zmienności w badanym układzie eksperymentalnym. Zróznicowanie w ekspresji badanych genów referencyjnych wykazało, że optymalnym dla badanego układu eksperymentalnego gen badany/podkładowka/temperatura traktowania okazał się układ z genem *PAL* (SD=1, 67).

Testy weryfikacyjne na podkładowkach wzorcowych, przeprowadzone dla ww. genów z dostępnych danych literaturowych, pozwoliły wyłonić 16 (z 20 badanych) genów, dla których zaobserwowano zróżnicowane profile ekspresji (zróznicowaną liczbę kopii) transkryptów EST. Dziewięć z 16 wytypowanych genów ulegało indukcji w genomie tolerancyjnej podkładowki P 66, a siedem w genomie podkładowki M.9.

W dalszym etapie badań przeprowadzono ocenę zmian profilu ekspresji 75 fragmentów EST (wyłonię na podstawie czteroletnich analiz odczytów sekwencji transkryptów (RNAseq) prowadzonych dla podkładek wzorcowych) w genomach 17 podkładek jabłoni. Dzięki analizom qPCR wyłonię geny (DEG-differentially expressed genes) pogrupowano na te, które ulegały nadekspresji w podkładowkach tolerancyjnych i inhibicji w podkładowkach wrażliwych; takie dla których odnotowano inhibicję tylko w podkładowkach tolerancyjnych oraz na takie, które ulegały inhibicji lub nadekspresji w całej puli badanych podkładek.

Ostatecznie, testy qPCR z udziałem 20 wytypowanych nowych genów (typ regulacji aktywności genów obserwowanej w eksperymencie RNAseq zweryfikowano testem qPCR) pozwoliły na określenie statusu molekularnego podkładek podatnych tj. Antonówka, PB4, P 2, P 14, M.26, M.7, M.9, P 22, w genomach których odnotowano spadek ilości transkryptu genów o adnotacjach Md321783, Md425030, Md258197 i Md827881a oraz wzrost aktywności genów Md7327209, Md575908, Md198091, Md230831. Dodatkowo w badaniach wytypowano grupę genów o adnotacji funkcjonalnej Md258197, Md496812, Md303946, Md546831, Md827881a, które wykazały istotny wzrost ekspresji w podkładowkach dobrze znoszących stres niskich temperatur tj. MM.106, P 60, P 59, P 66, P 67, P 68, P16, CG11, CG16. Sekwencje EST o potwierdzonym typie regulacji ekspresji, stanowiły potencjalne markery funkcjonalne do monitorowania poziomu tolerancji skolekcjonowanych podkładek jabłoni na stres niskich temperatur. (Keller-Przybyłkiewicz i wsp. 2019a)

W ramach zadania skolekcjonowano bazę sekwencji transkryptomów trzech podkładek M.9, P 60 i P 66 uzyskaną z przeprowadzonych eksperymentów RNAseq (233 606 825 odczytów sekwencji) (2015 – 2018). Łącznie 75 wytypowanych dsEST genów o rozpoznanej funkcji, poddano weryfikacji (zoptymalizowaną uprzednio) metodą qPCR. Ostatecznie wytypowano 20 fragmentów EST (poszerzają bazę sekwencyjną), dla których odnotowano zróżnicowaną regulację w układzie genotyp/gen/temperatura przemrażania. Wytypowane sekwencje genów kodują: białko z rodziny auksyn odpowiedzialnych za regulację procesów roślinnych w okresie ich spoczynku (*dormancy*), komponenty błon komórkowych oraz białka uczestniczące w transporcie między- i wewnątrzkomórkowym makrocząsteczek i jonów, białka przekaźnikowe inicjujące zmiany aktywności komórkowej, białka transportowe i receptorowe błon organelli komórkowych, białka z grupy hydrolaz o funkcji wiązania kationów - uczestniczące w metabolizmie wody, białka uczestniczące w odpowiedzi komórek na czynniki stresu, uczestniczące w regulacji komórkowych systemów naprawczych oraz białko uczestniczące w produkcji i przemianie farnesanu (Md668869), które bierze udział w utrzymaniu osmozy komórkowej.

Dodatkowo przeprowadzono ocenę korelacji pomiędzy poziomem ekspresji wytypowanych genów, a wartością ocenianych cech fenotypowych (program TIBC Statistica 13.3, współczynnik korelacji Spearmana). W wyniku tych analiz wykazano bardzo istotny stopień korelacji pomiędzy wszystkimi ocenianymi cechami fenotypowymi i zmianami profili ekspresji genów wyłonionych w eksperymentach RNAseq i qPCR. Dla podkładek podatnych oszacowano pozytywną (dodatnią) korelację pomiędzy cechami fenotypowymi i obniżeniem aktywności genów, natomiast w podkładkach tolerancyjnych wraz ze wzrostem poziomu transkryptu wytypowanych genów korelacja badanych cech i aktywności genów wykazała poziom ujemny.

Na podstawie przeprowadzonych badań, z 20 wytypowanych DEG (Differentially Expressed Genes), wyłoniono 7 specyficznych genów o rozpoznanej adnotacji funkcyjnej (Md496812, Md827881a, Md425030, Md161587, Md198091, Md275908, Md303946), dla których przy spadku ilości transkryptu odnotowano dodatnią korelację z danymi cechami fenotypowymi u podkładek podatnych oraz 4 geny (Md258197, Md664464, Md572242, Md139165), dla których stwierdzono ujemną korelację pomiędzy zdolnością wzrostu/regeneracji/przeżywalności podkładek

w warunkach polowych po zastosowaniu niskich temperatur, a wzrostem aktywności wytypowanych genów (Keller-Przybyłkiewicz i wsp. 2020).

Przeprowadzone w ramach zadania analizy genotypowo-fenotypowe pozwoliły stwierdzić, że ww. geny mogą stanowić podstawę do opracowania funkcjonalnych markerów molekularnych pozwalających na szybką ocenę podkładek pod kątem ich tolerancji na mróz. Aplikacja sporządzonych w ten sposób zoptymalizowanych testów molekularnych może być także przydatna do oceny nowych podkładek wyselekcjonowanych w procesach hodowlanych.

Wnioski z prowadzonych badań

1. Żadna z zastosowanych ujemnych temperatur nie spowodowała śmierci całej puli podkładek, niemniej kondycja roślin traktowanych była znacznie słabsza niż roślin kontrolnych.
2. Podkładki P 66, P 67 i P 68 lepiej znoszą przemrożenie niż podkładki M.9 i M.26, można je więc uznać za tolerancyjne na stres niskich temperatur.
3. Poziom ekspresji badanych genów zależny jest od genotypu podkładki i stosowanej temperatury przemrażania.
4. Wytypowano jedenaście genów o rozpoznanej adnotacji funkcjonalnej, które stanowić mogą pulę specyficznych molekularnych markerów funkcjonalnych, stanowiących potencjalny test dla szybkiej oceny podkładek pod kątem tolerancji na mróz.

Osiągnięcia projektu

Na podstawie przeprowadzonych badań wytypowano łącznie jedenaście genów o rozpoznanej adnotacji funkcjonalnej. Stanowią one pulę molekularnych markerów funkcjonalnych, dla szybkiej oceny podkładek pod kątem tolerancji na mróz. W puli wyselekcjonowanych genów siedem pozwoliło na ocenę statusu molekularnego podkładek wrażliwych, a cztery – podkladek tolerujących mróz. Jednocześnie w badaniach zoptymalizowano metodykę kolekcjonowania materiału podkładek do badań oraz metodykę analiz molekularnych mogących stanowić test ukierunkowany na przydatność ww. fragmentów transkryptomu gatunku *Malus*, do monitorowania predyspozycji podkładek pod kątem mrozoodporności.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje naukowe.

Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M., Korbin M. (2019).
Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z tolerancją

wegetatywnych podkładek jabłoni na niskie temperatury poprzez analizę transkryptomu i ocenę stopnia polimorfizmu genów kandydujących. *Biuletyn IHAR*, 286: 415–418 DOI: <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0092> (Komunikat)

Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M., Korbin M. 2020. Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z tolerancją wegetatywnych podkładek jabłoni na niskie temperatury poprzez analizę transkryptomu i ocenę stopnia polimorfizmu genów kandydujących. *Biuletyn IHAR*, 291(1): 227-229, DOI: <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0092> (Komunikat)

Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M. (2020). Ocena zmian profilu ekspresji genów kandydujących w podkładkach jabłoni o odmiennym stopniu tolerancji mrozowej. *Biuletyn IHAR* 291: 21-32.

Doniesienia konferencyjne

Konferencje krajowe (postery)

Lewandowski M., Żurawicz E. 2015. Polowa ocena wytrzymałości na niskie temperatury wegetatywnych podkładek

dla jabłoni przemrażanych w warunkach kontrolowanych. IV Zjazd PTNO, Wrocław, 14-16 Września 2015. Streszczenia prac str. 32.

Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M., Korbin M. (2015). Zmiany w transkryptomie wybranych podkładek jabłoni po zadziałaniu stresu niskiej temperatury. IV Zjazd PTNO, Wrocław, 14-16 Września 2015. Streszczenia: str. 204.

Konferencje międzynarodowe (postery)

Korbin M., Keller-Przybyłkiewicz S., Jęcz T. 2016. Putative functional markers related to cold-hardiness of apple rootstocks, revealed by new generation sequencing". XI International Symposium on Integrating Canopy, Rootstock and Environmental Physiology in Orchard Systems, Bologna, Italy. Streszczenia str. 105.

Keller-Przybyłkiewicz S., Lewandowski M., Korbin M. 2017. RNA-seq markers for selection of apple rootstocks tolerant to low temperatures. The Fourth International Horticulture Research Conference. 16- 19 lipiec. East Mailling, Wielka Brytania.

Hybrydyzacja oddalona gatunków *Prunus cerasifera* (ałycza), *Prunus armeniaca* (morela), *Prunus salicina* (śliwa japońska), *Prunus domestica* (śliwa domowa) w celu zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus*

Distant hybridization of the *Prunus cerasifera* (myrobalan plum), *Prunus armeniaca* (apricot), *Prunus salicina* (Japanese plum), *Prunus domestica* (European plum) species for extending genetic biodiversity within the genus *Prunus*

Marek Szymajda✉, Anita Kuras

Instytut Ogrodnictwa - Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice
✉ e-mail: marek.szymajda@inhort.pl

Słowa kluczowe: *embryo rescue*, krzyżowanie międzygatunkowe, mieszańce międzygatunkowe, *Prunus*

Cel badań

Hybrydyzacja oddalona znajduje zastosowanie zwłaszcza wówczas, gdy w obrębie określonego gatunku roślin brak jest źródeł genów, warunkujących pożądane cechy lub ich ekspresja jest niewystarczająca. Jednak krzyżowanie gatunków drzew owocowych z rodzaju *Prunus* jest dość trudne, a jeśli już zachodzi, to charakteryzuje się niską efektywnością. Dlatego w Instytucie Ogrodnictwa podjęto badania, których celem była ocena możliwości zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus* poprzez zastosowanie hybrydyzacji oddalonej gatunków *P. cerasifera*, *P. salicina* oraz *P. armeniaca* metodą hodowli klasycznej przy wykorzystaniu techniki *embryo-rescue* (założony cel został osiągnięty). Przyjęta hipoteza badawcza zakłada, że przy pomocy konwencjonalnych metod hodowli (krzyżowanie tradycyjne i selekcja) możliwy jest transfer genów warunkujących cenne cechy biologiczne między wymienionymi gatunkami i uzyskanie nowych nie występujących w naturze genotypów łączących pożądane cechy.

Materiały i Metody

Dla uzyskania założonego celu badawczego corocznie realizowano 6 szczegółowych tematów badawczych: 1 – analiza żywotności pyłku form ojcowskich moreli, śliwy japońskiej i ałyczy. Żywotność pyłku badano trzema metodami:

wybarwienie cytoplazmy ziaren pyłku 2% aceto-orceiną, ocena zdolności kiełkowania ziaren pyłku na sztucznych pożywkach oraz ocena zdolność kiełkowania ziaren pyłku i wzrostu łagiewek pyłkowych w warunkach *in vivo*; 2 – ocena możliwości krzyżowania różnych genotypów z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałycza) w oparciu o wykonanie obszernych programów zapyleń; 3 – ocena zdolności kiełkowania nasion uzyskanych w wyniku hybrydyzacji oddalonej różnych genotypów śliwy japońskiej, moreli, ałyczy lub ich mieszańców; 4 – optymalizacja i prowadzenie hodowli zarodków *in vitro*. Zarodki mieszańcowe wykładano na 5 pożywek: wg Murashige i Skoog (MS i ½ MS), wg Lloyd i McCown (C2d), wg Boxus oraz wg Chee i Pool (WPM); 5 – analizy molekularne siewek mieszańcowych oraz ich form rodzicielskich. Do analiz zastosowano technikę SSR (Simple Sequence Repeat); 6 – ocena wybranych cech biologicznych uzyskanych siewek mieszańcowych.

Wyniki

Barwienie aceto-orceiną wykazało, że żywotność pyłku mieści się w przedziale 26% – 100%, przy czym najniższe wartości (ok. 50%) obserwowane były dla genotypów śliwy japońskiej. Żywotność pyłku oceniona na pożywkach była niższa od zaobserwowanej po barwieniu aceto-orceiną. Najniższą zdolność kiełkowania miał pyłek śliwy japońskiej (0–33% kiełkujących ziaren



pyłku), a najwyższą moreli (30–75%). Metoda barwienia acetoorceiną może więc być stosowana tylko do badań wstępnych, gdyż może wybarwiać również nieaktywne fizjologicznie ziarna pyłku.

Efektywność hybrydyzacji oddalonej różnych genotypów śliwy japońskiej, moreli i ałyczy na ogół była niska. Uzyskano tylko 8,8% owoców w odniesieniu do liczby zapylnych kwiatów. Kompatybilność genetyczna krzyżowanych genotypów w obrębie badanych gatunków drzew owocowych z rodzaju *Prunus* zależała od krzyżowanych genotypów, zwłaszcza od użytej formy macecznej. Tworzenie owoców w większym stopniu zależało od genotypu śliwy japońskiej, jako formy macecznej niż genotypu moreli lub ałyczy jako formy ojcowskiej. Przy wykorzystaniu zgodnych genotypów śliwy japońskiej i moreli zawiązanie owoców przekraczało 20% liczby zapylnych kwiatów. Śliwy japońskie ‘Trumlar’, D 17–73 i ‘Czarnuszka’ oraz ałycza ‘Amelia’ są dobrymi formami macecznymi do tradycyjnej hybrydyzacji oddalonej śliwy japońskiej, moreli i ałyczy.

W otrzymanych owocach znajdowały się zarówno nasiona dobrze wykształcone – żywotne, jak i nie w pełni wykształcone, czyli pomarszczone, zawierając niewykształcone martwe zarodki – nieżywotne. W zależności od kombinacji krzyżowań liczba nieżywotnych nasion przekraczała nawet 50% całkowitej liczby uzyskanych nasion. Kielkowanie nasion zależało od interakcji krzyżowanych form rodzicielskich, ale widoczne były wyraźne różnice pomiędzy użytymi formami macecznymi. Prawidłowo wykształcone nasiona form macecznych śliwy japońskiej ‘Trumlar’, D 17–73 i ‘Czarnuszka’ oraz ałyczy ‘Amelia’ posiadały na ogół dobrą zdolność kielkowania, która w zależności od krzyżowanych genotypów może wynosić nawet 100% skielkowanych nasion.

Ilość uzyskanych roślin techniką *embryo-rescue* zależała zarówno od rodzaju zastosowanej pożywki, jak i genotypu wyłożonych zarodków mieszańcowych. Po czterech tygodniach wzrostu najwięcej roślin mieszańcowych uzyskano z zarodków wyłożonych na pożywkę MS oraz WPM (średnio 48% i 40% mieszańców w odniesieniu do wyłożonych zarodków), natomiast najmniej na pożywkę C2d (34%). Średnio dla badanych pożywek najwięcej roślin mieszańcowych uzyskano z form macecznych śliwy japońskiej D 17–73 (ok. 50%).

Do opracowania profili genetycznych dla form rodzicielskich zastosowano zestaw 20 par oligonukleotydów, w reakcji z którymi uzyskano ok. 35 amplikonów o długości od 90 do 230 pz dla każdego genotypu. Po analizie uzyskanych wyników

wytypowano zestaw 7 starterów umożliwiający identyfikację mieszańców międzygatunkowych śliwy japońskiej i moreli, śliwy japońskiej i ałyczy oraz ałyczy i moreli. Status mieszańca z planowanego zapylenia potwierdzono dla 95% testowanych genotypów.

Duża część siewek mieszańcowych śliwy japońskiej i moreli wykazała zaburzenia genetyczne w postaci rozwoju kwiatów. W kwiatach znajdowało się od kilku do kilkunastu słupków, przy jednoczesnym braku płatków kwiatowych. Z mocno zredukowanych pylników nie dochodziło do osypywania się pyłku. W efekcie tego wiele z ocenianych siewek nie owocowało pomimo dobrego kwitnienia. Wyróżniającą populacją były siewki pochodzące z krzyżowania genotypów ‘Najdiena’ i ‘Blue Gigant’ [(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska]. Siewki te dość szybko kończyły fazę juvenilną oraz dobrze owocowały i wytwarzały też na ogół atrakcyjne owoce.

Dobrze owocowały też siewki uzyskane ze skrzyżowania ałyczy ‘Amelia’ jako formy macecznej i moreli ‘Early Orange’ lub ‘Sirena’ jako formy ojcowskiej. Siewki te wytwarzały na ogół owoce słabej lub średniej jakości z delikatnym omszeniem. Należy podkreślić, że siewki te kwitły przeważnie kilka dni przed przymrozkami, lecz mimo to niektóre z nich były zdolne do zawiązania owoców. Zaowocowały także niektóre siewki mieszańcowe śliwy japońskiej i moreli. Owoce tych siewek były znacznie atrakcyjniejsze niż owoce siewek mieszańcowych ałyczy i moreli, a ich miąższ częściowo oddzielał się od pestki.

Wnioski

1. Metodę acetoorceinową można stosować tylko do badań wstępnych, gdyż może wybarwiać ziarna pyłku nieaktywne fizjologicznie.
2. Tradycyjna hybrydyzacja oddalona gatunków morela, śliwa japońska i ałycza jest mało efektywna. Uzyskuje się małą liczbę owoców, nasion i siewek mieszańcowych w stosunku do zapylnych kwiatów.
3. Duża część nasion uzyskanych w krzyżowaniach oddalonych gatunków śliwa japońska × morela to nasiona nieprawidłowo wykształcone i nieżywotne.
4. Ilość uzyskanych roślin mieszańcowych śliwy japońskiej, moreli i ałyczy techniką *embryo-rescue* zależy od rodzaju zastosowanej pożywki i genotypu zarodków.
5. Niezgodność krzyżowanych form rodzicielskich ujawnia się na różnych etapach prac hodowlanych – od zawiązywania owoców

do wzrostu uzyskanych siewek mieszańcowych.

6. Przy pomocy tradycyjnych metod hybrydyzacji oddalonej możliwe jest uzyskanie nowych genotypów drzew owocowych, poszerzających zmienność genetyczną w obrębie rodzaju *Prunus*.
7. Spośród ocenianych rodzin mieszańców najlepszymi cechami fenotypowymi odznaczają się siewki uzyskane ze skrzyżowania genotypów ‘Najdiena’ i ‘Blue Gigant’ [(śliwa japońska × ałyca) × śliwa japońska].

Osiągnięcia projektu

1. Wykazano, że przy zastosowaniu tradycyjnej hybrydyzacji oddalonej oraz zgodnych form rodzicielskich możliwe jest uzyskanie mieszańców śliwy japońskiej, moreli i ałyzy. Jednakże z krzyżowań takich na ogół otrzymuje się mało siewek w stosunku do liczby zapylnych kwiatów, a z niektórych kombinacji krzyżowań w ogóle nie uzyskuje się potomstwa.
2. Wyniki pokazały, że niezgodność krzyżowanych genotypów ujawnia się na różnych etapach hybrydyzacji – od zapylenia kwiatów i zawiązywania owoców do wzrostu otrzymanych siewek mieszańcowych. Śliwy japońskie ‘Trumlar’ i D 17–73 są przydatnymi formami matecznymi do uzyskania siewek mieszańcowych śliwy japońskiej i moreli oraz śliwy japońskiej i ałyzy. Z kolei ałyca ‘Amelia’ użyta jako forma mateczna umożliwia uzyskanie siewek mieszańcowych ałyzy i moreli.
3. Uzyskano nowe cenne genotypy mieszańcowe. Wyróżniającą się populacją były siewki pochodzące z krzyżowania genotypów ‘Najdiena’ i ‘Blue Gigant’ [(śliwa japońska × ałyca) × śliwa japońska], ale wartościowe cechy mają także siewki śliwy japońskiej i moreli oraz ałyzy i moreli.
4. Uzyskane genotypy pozwolą poszerzyć istniejącą bioróżnorodność w obrębie rodzaju *Prunus*, a w przyszłości mogą być wykorzystane także w hodowli ukierunkowanej na uzyskanie nowych odmian moreli i śliwy japońskiej lub śliwomoreli, a także podkładek dla tych gatunków.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje naukowe

Szymajda M., Napiórkowska B., Korbin M., Żurawicz E. (2015). Studies on the interspecific crossing compatibility among three *Prunus* species and their hybrids, *Horticultural Science*, 42 (2), 70–82. <https://doi.org/10.17221/273/>

2014-HORTSCI (Oryginalny artykuł naukowy)

Szymajda M., Idczak B., Kuras A., Korbin M., Żurawicz E. (2019). Hybrydyzacja oddalona gatunków *Prunus cerasifera* (ałyca), *Prunus armeniaca* (morela), *Prunus salicina* (śliwa japońska), *Prunus domestica* (śliwa domowa) w celu zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus*, *Biuletyn IHAR*, 286, 429–432. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0095> (Komunikat)

Szymajda M., Kuras A., Żurawicz E., Idczak B. (2020). Hybrydyzacja oddalona gatunków *Prunus cerasifera* (ałyca), *Prunus armeniaca* (morela), *Prunus salicina* (śliwa japońska), *Prunus domestica* (śliwa domowa) w celu zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus*, *Biuletyn IHAR*, 291(1), 237-239 (Komunikat)

Szymajda M., Kuras A., Żurawicz E. (2020). Wpływ wybranych form rodzicielskich na zawiązywanie owoców i nasion w hybrydyzacji oddalonej trzech gatunków drzew owocowych z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałyca), *Biuletyn IHAR*, 291, 87-92. <https://doi.org/10.37317/biul-2020-PB88> (Oryginalny artykuł naukowy)

Szymajda M., Studnicki M., Kuras A., Żurawicz E. (2021). Cross-compatibility in interspecific hybridization between three *Prunus* species, *South African Journal of Botany* – praca w recenzji (Oryginalny artykuł naukowy)

Doniesienia konferencyjne (abstrakty)

Napiórkowska B., Strączyńska K., Szymajda M., Korbin M. (2015). Wpływ składu pożywek na wzrost i rozwój wyizolowanych zarodków, pochodzących z krzyżowań w obrębie rodzaju *Prunus*. IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Konferencja Naukowa pt. „Postęp w ogrodnictwie dla poprawy jakości życia i ochrony środowiska”, Wrocław, 14–16 września 2015, Streszczenia prac: 208.

Szymajda M., Żurawicz E. (2015). Ocena zdolności kiełkowania nasion uzyskanych z hybrydyzacji oddalonej gatunków z rodzaju *Prunus* – ałyca, morela, śliwa japońska, śliwa domowa. IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Konferencja Naukowa „Postęp w ogrodnictwie dla poprawy jakości życia i ochrony środowiska”, Wrocław, 14–16 września 2015, Streszczenia prac: 217.

Napiórkowska B., Strączyńska K., Szymajda M., Korbin M. (2017). Kompatybilność w krzyżowaniach międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Prunus* określona poprzez wzrost łagiewki pyłkowej. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa ‘Ziemia – Roślina – Człowiek’, Kraków 20–21 września 2017, Materiały konferencyjne s. 111.

Szymajda M., Napiórkowska B., Żurawicz E. (2017). Wpływ wybranych form rodzicielskich na zawiązywanie owoców

w krzyżowaniu oddalonym pomiędzy *Prunus salicina* Lindl. (śliwa japońska) i *Prunus armeniaca* L. (morela). Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa 'Ziemia – Roślina – Człowiek', Kraków 20–21 września 2017, Materiały konferencyjne s. 126.

Ideczak B., Strączyńska K., Szymajda M., Keller-Przybyłkiewicz S. (2019). Zdolność kiełkowania pyłku różnych gatunków z rodzaju *Prunus* (*P. armeniaca*, *P. salicina*, *P. cerasifera*) w warunkach *in vitro*. V Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Warszawa, 16–18 września 2019 r., Streszczenia, s. 116.

Szymajda M., Ideczak B., Żurawicz E. (2019). Kiełkowanie

nasion uzyskanych z hybrydyzacji oddalonej trzech gatunków z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałycza). V Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Warszawa, 16–18 września 2019 r., Streszczenia, s. 123.

Szymajda M., Ideczak B., Żurawicz E. (2019). Influence of selected parental forms on fruit and seed set in distant hybridization of *Prunus salicina* Lindl. (Japanese plum) and *Prunus armeniaca* L. (apricot). XV EUCARPIA Fruit Breeding and Genetics Symposium, June 3–7, 2019, Prague, Czech Republic. Book of abstracts, Poster presentations: 2



Rys. 1. Owoce mieszańca [(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska].

Charakterystyka markerów molekularnych, sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)

Characteristics of molecular markers linked with the resistance to gall mite (*Cecidophyopsis ribis*)

Anita Kuras[✉], Bogumiła Badek, Stanisław Pluta, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Renata Górska, Krystyna Strączyńska

Instytut Ogrodnictwa - Państwowy Instytut Badawczy, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice
✉ e-mail: anita.kuras@inhort.pl

Słowa kluczowe: mapa genetyczna, marker, porzeczką czarna, wielkopąkowiec porzeczkowy

Cel prowadzonych badań

Celem badań była ocena zróżnicowania potencjalnych markerów, sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego różnych odmian porzeczkę czarnej w oparciu o analizę polimorfizmu DNA regionów wydzielonych, na podstawie danych z opublikowanych map *R. nigrum*, jak również weryfikacja hipotezy gatunkowej lub/i odmianowej specyficzności markerów w testach molekularnych i fenotypowych, przeprowadzonych na puli genotypów w kolekcji odmian oraz w populacjach hodowlanych, uzyskanych w Zakładzie Hodowli Roślin Ogrodniczych. Cel ten został osiągnięty

Materiał i Metody

Materiał badawczy stanowiła populacja siewek pokolenia F_1 uzyskanych w wyniku krzyżowania odmian porzeczkę czarnej ‘Ceres’ x ‘Bona’ (149 roślin) oraz 500 roślin należących do kolekcji odmian i gatunków z rodzaju *Ribes* (porzeczką czarna, agrest, porzeczką-agrest, porzeczką czerwoną i dzikie gatunki). Ocenę fenotypową stopnia zasiedlenia/porażenia przez wielkopąkowca porzeczkowego (*C. ribis*) pąków testowanych siewek i genotypów z kolekcji przeprowadzano w dwóch terminach: wczesną wiosną oraz późną jesienią. Stopień tolerancji/wrażliwości testowanych genotypów oceniono na podstawie powszechnie stosowanej skali bonitacyjnej (1–5), w której 1 – oznacza brak objawów, 2 – słabe zasiedlenie, 3 – średnie zasiedlenie, 4 – średnio-silne zasiedlenie, 5 – silne zasiedlenie roślin przez szkodnika. Na wytypowanych z kolekcji 12 genotypach rodzaju *Ribes*

(6 odpornych i 6 wrażliwych na *C. ribis*), przeprowadzono analizę polimorfizmu w grupach sprzężeń hipotetycznie obejmujących regiony Ce i P. Badania obejmujące zagęszczanie kolejnych grup sprzężeń mapy genetycznej odmian ‘Ceres’ i ‘Bona’ oraz określenie korelacji genotypowo-fenotypowych w celu identyfikacji fragmentów DNA regulujących cechę odporności na wielkopąkowca porzeczkowego prowadzono na roślinach mieszańcowych populacji ‘Ceres’ x ‘Bona’.

Analizę segregacji oraz rozkładu zidentyfikowanych alleli markerów SSR w wytypowanej populacji mapującej przeprowadzono przy użyciu programu JoinMap v. 3.0. Dystans genetyczny pomiędzy wprowadzonymi na mapę markerami SSR określono przy zastosowaniu funkcji *Kosambi*. Sprzężenia pomiędzy badanymi markerami zweryfikowano za pomocą współczynnika wartości krytycznej LOD (*Logarithm Odd Ratio*; $LOD \geq 3$) i oceny stosunku rzeczywistego do oczekiwanego (teoretycznego) rozkładu genotypów w populacji segregującej (test CHI-KWARAT: X^2). Częstość rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami w badanej populacji mapującej oszacowano przy użyciu współczynnika REC ≤ 0.5 . Mapę dla populacji ‘Ceres’ x ‘Bona’ przedstawiono w formie graficznej za pomocą programu MapChart v.2.0.

Korelację fenotypowo-genotypową potwierdzono poprzez analizę modelu mapowania interwałowego (IM: Interval Mapping) oraz współczynnika LOD pomiędzy *loci* markerów zlokalizowanymi na sporządzonej mapie obu genomów porzeczkę czarnej oraz wartościami badanej cechy fenotypowej (MapQTL 6.0).



Współczynnik korelacji obliczono przy pomocy współczynnika LOD >3 oraz przy poziomie istotności $P=0,05^{**}$.

Opis wyników

Zgromadzono genotypy w kolekcji porzeczek czarnej i roślin innych gatunków rodzaju *Ribes* (porzeczką czarną, czerwoną, agrest, porzeczką-agrest i dzikie gatunki), różniących się wg danych literaturowych odpornością na *C. ribis*. Rośliny te, w warunkach polowych, poddano ocenie fenotypowej ich odporności na szkodnika. Wśród testowanych gatunków z rodzaju *Ribes*, najczęściej charakterystycznych symptomów zasiedlenia pąków przez wielkopąkowca obserwowano na roślinach porzeczek czarnej (*R. nigrum* L.).

Do badań molekularno-fenotypowych wytypowano początkowo cztery populacje hodowlane 'Ceres' x 'Bona', 'Ceres' x 'Diana', 'Polares' x 'Sejaniec Golubki' i 'Polares' x 'Golubka', których formy rodzicielskie, wg danych literaturowych różnią się wrażliwością na szkodnika. Na podstawie oceny heterozygotyczności w/w par rodzicielskich do dalszych badań i oceny stopnia zasiedlenia pąków w warunkach naturalnej, silnej presji szkodnika wytypowano siewki z 2 populacji mieszańcowych ('Ceres' x 'Bona' i 'Polares' x 'Golubka').

Wyniki oceny fenotypowej zasiedlenia/porażenia pąków przez wielkopąkowca porzeczkowego mieszańców ww. populacji wykonanej w 2015 r. wykazały obecność, powiększonych pąków wyłącznie na roślinach populacji mieszańców pochodzących ze skrzyżowania odmian 'Ceres' x 'Bona'. W kolejnych latach oceny siewki należące do rodziny mieszańców ('Ceres' x 'Bona') były w wyższym stopniu (o ok. 20%) zasiedlane/porażone przez szpeciela, w porównaniu do drugiej badanej populacji mieszańców pochodzących ze skrzyżowania odmian 'Polares' x 'Golubka'. Dlatego też populacja mieszańców ('Ceres' x 'Bona') została wytypowana do dalszych obserwacji i badań. Na podstawie wyników oceny fenotypowej wykonanej w latach 2015–2020 stwierdzono, że 149 siewek należących do populacji mieszańcowej ('Ceres' x 'Bona') różniło się stopniem zasiedlenia/porażenia pąków przez wielkopąkowca porzeczkowego. Poziom zasiedlenia pąków ocenianych mieszańców oraz ich liczba zwiększały się z wiekiem roślin.

Do monitorowania regionów genomu porzeczek czarnej użyto markerów mikrosatelitarnych z dostępnych map genomowych, bazujących na reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do unikalnych sekwencji flankujących motywy satelitarne. Ocenę polimorfizmu w grupach sprzężeń

obejmujących regiony Ce i P dwunastu genotypów *Ribes* (kolekcja IO), zróżnicowanych pod względem odporności na *C. ribis*, oparto na sekwencjonowaniu matryc DNA. Analiza porównawcza wykazała zróżnicowanie układu sekwencji ampikonów genotypów odpornych i wrażliwych. Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano specyficzne oligonukleotydy (Kuras, Badek 2020)

W następnym etapie badań skupiono się na zagęszczaniu mapy genetycznej, porzeczek odmian 'Ceres' i 'Bona', uzyskanej w latach 2017–2018. Konstrukcję mapy oparto łącznie na 40 markerach SSR zlokalizowanych na mapach referencyjnych rodzaju *Ribes*. Na podstawie analizy profili markerów SSR wytypowanych dla genotypów rodzicielskich i 149 mieszańców 'Ceres' x 'Bona', zidentyfikowano 252 allele polimorficzne, segregujące dla genotypów mieszańcowych. W 2020 roku mapa genomu porzeczek wzbogacona została o 23 allele zidentyfikowane dla wytypowanych sekwencji mikrosatelitarnych. Mapa genetyczna genomu odmiany 'Ceres' zawierała 107 loci rozlokowanych w obrębie 23 grup sprzężeń, homologicznych do chromosomów I, II, III, IV, V, VI i VII genomu porzeczek czarnej, o łącznej długości 700 cM. Natomiast na sporządzonej mapie genomu odmiany 'Bona' zlokalizowano 116 alleli markerów SSR sprzężonych w 21 grupach wykazujących homologię z opublikowanymi dotychczas mapami referencyjnymi porzeczek czarnej (*Ribes nigrum*) w obrębie LG 1, LG 2, LG 3, LG 4, LG 5, LG 6 i LG 7, o łącznej długości 670cM. Jednocześnie zaobserwowano, że loci oraz kolejność zidentyfikowanych alleli wprowadzonych na mapę markerów SSR nieznacznie różniły się w porównaniu do loci tych samych markerów zlokalizowanych na mapach referencyjnych (Badek, Pluta 2019).

Ocenę stopnia korelacji genotypowo-fenotypowych (analiza QTL) pomiędzy cechą odporności na wielkopąkowca porzeczkowego, a położeniem markerów SSR na sporządzonej w latach 2017–2020 mapie genetycznej populacji 'Ceres' x 'Bona' przeprowadzono przy użyciu programu MapQTL 6.0 (Badek, Pluta 2019).

Najsilniejszą współzależność pomiędzy cechą odporności na wielkopąkowca a analizowanymi markerami odnotowano w grupach sprzężeń LG4, LG6 oraz LG7 dla obu badanych odmian. Jednocześnie markery zlokalizowane w tych grupach wykazywały stabilną korelację z cechą badaną w poszczególnych sezonach. Na podstawie przeprowadzonych badań wytypowano czternaście markerów (g2_H21_266–269, g2_J11_266, MTT_32_266, g3_A17_137, g1_G11_227,

g1_A01_167, g1_O02_166, g1_F04_285, g1_P08_123_124, g1_H09_123_124, g1_O02_121_124, gr2_N15_404_405, g1_P01_167_168, e1_O21_288), które mogą być przydatne do selekcji (MAS: Marker Assisted Selection) nowo wytworzonych genotypów gatunku *Ribes*.

Ostatni etap badań dotyczył poszukiwania markerów sprzężonych z genami *Ce* i *P*, które umożliwiłyby charakterystykę genotypów rodzaju *Ribes*, zróżnicowanych pod względem odporności na wielkopąkowca porzeczkowego. Na 100 wytypowanych do badań genotypach przeprowadzono corocznie weryfikację 10 markerów SCAR pod kątem ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i podatnych na *C. ribis*. Przeprowadzone przez nas badania weryfikujące wytypowane sekwencje markerowe, nie potwierdziły ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i wrażliwych na wielkopąkowca porzeczkowego (Kuras, Badek 2020)

Wnioski z prowadzonych badań

1. Wyniki badań dotyczące oceny polimorfizmu fragmentów różnicujących genotypy rodzaju *Ribes* (odporne/podatne) uzyskane na matrycach DNA roślin wybranych z kolekcji stanowią wstępną bazę sekwencji sprzężonych z cechą odporności na *C. ribis*.
2. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić brak pełnej kolinearności uzyskanej mapy z mapą referencyjną. O zjawisku tym świadczy fakt, że wygenerowane grupy sprzężeń LG 1, LG 2, LG 3, LG 4, LG 5, LG 6 i LG 7 wykazują homologię z chromosomami I, II, III, IV, V, VI i VII map referencyjnych, niemniej odnotowano zmiany w lokalizacji oraz kolejności sekwencji zidentyfikowanych alleli.
3. Analiza regionów QTL badanych genomów porzeczeki czarnej wskazuje na istotne korelacje zlokalizowanych na mapie markerów SSR z genami warunkującymi odporność na wielkopąkowca porzeczkowego.
4. Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono korelacji między testowanymi markerami SCAR a cechą odporności na wielkopąkowca porzeczkowego.

Osiągnięcia projektu

1. Utworzono odrębne mapy dla odmian 'Ceres' i 'Bona'. Mapa odmiany 'Ceres' zawiera 107 loci rozlokowanych w obrębie 23 grup sprzężeń o łącznej długości 700 cM, natomiast na sporządzonej mapie odmiany 'Bona'

zlokalizowano 116 alleli markerów SSR sprzężonych w 21 grupach o łącznej długości 670cM. Wyłonione grupy sprzężeń wykazały homologię do chromosomów I, II, III, IV, V, VI i VII przedstawionych na opublikowanych dotychczas mapach referencyjnych porzeczeki czarnej (*Ribes nigrum*).

2. Utworzone mapy genetyczne stanowią bazę do dalszych badań genomów nowych odmian porzeczeki czarnej, a także do oszacowania korelacji pomiędzy zlokalizowanymi markerami a cechą tolerancji/wrażliwości na porażenie wielkopąkowcem porzeczkowym *C. ribis*.
3. Wytypowano czternaście markerów skorelowanych z badaną cechą odporności na wielkopąkowca porzeczkowego: g2_H21_266–269, g2_J11_266, MTT_32_266, g3_A17_137, g1_G11_227, g1_A01_167, g1_O02_166, g1_F04_285, g1_P08_123_124, g1_H09_123_124, g1_O02_121_124, gr2_N15_404_405, g1_P01_167_168, e1_O21_288, które mogą być przydatne do selekcji (MAS: Marker Assisted Selection) nowo wytworzonych genotypów gatunku *Ribes*.

Wykaz publikacji wyników

Publikacje naukowe

- Badek B., Pluta S., Korbin M. 2019. Charakterystyka markerów molekularnych, sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*). Biuletyn IHAR, 286: 411–414. <https://doi.org/10.37317/biul-2019-0091> (komunikat)
- Kuras A., Badek B. 2020. Analiza regionów genomu sprzężonych z odpornością porzeczeki czarnej (*Ribes nigrum*) na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*). Biuletyn IHAR, 291: 41–46. <https://doi.org/10.37317/biul-2020-PB88> (publikacja oryginalna)

Doniesienia konferencyjne

- Badek B., Korbin M., Kuras, A., Keller-Przybyłkiewicz S., Pluta S. 2015. Analiza genomu porzeczeki pod kątem markerów odporności na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophysis ribis*). IV Zjazd Polskiego Towarzystwa Nauk Ogrodniczych, Konferencja Naukowa pt. „Postęp w ogrodnictwie dla poprawy jakości życia i ochrony środowiska”, 14–16 września 2015, Wrocław., Streszczenia prac: 199 (poster)
- Badek B., Korbin M., Pluta S. 2016. Analysis of selected *Ribes* genotypes diversified in their resistance to blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis*) using SSR markers. RPD Abstracts 2, 12.3rd international scientific conference „Sustainable Fruit-Growing: From Plant to Product, Riga -Dobele (Latvia), 17–19 August 2016 (oral)
- Badek B., Pluta S., Korbin M. 2017. Ocena stopnia poli-

morfizmu regionów genomu porzeczki czarnej (*Ribes nigrum*) sprzężonych z jej odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego. Ogólnopolska Ogrodnicza Konferencja Naukowa „Ziemia, Roślina, Człowiek”, Kraków, 20–21 września 2017 r. Materiały konferencyjne s 80 (poster)

Badek B., Pluta S. 2019. Construction of genetic linkage map based on SSR markers for blackcurrant (*Ribes nigrum* L.) population Ceres x Bona. Book of abstracts: XV EUCARPIA Fruit Breeding and Genetics Symposium; Prague (Czech Republic), 3–7 June, 2019 (poster).

SPIS TREŚCI

CONTENTS

PSZENICA

- Bolesław Salmanowicz, Monika Langner, Sławomir Franaszek 5
- Badania nad efektywnością markerów funkcjonalnych w powiązaniu z analizą reologiczną w mikroskali dla oceny cech jakościowych pszenicy zwyczajnej
- Analyses of functional markers effectivity in connection with rheological microscale analysis for quality trait estimation of common wheat
- Halina Wiśniewska, Maciej Majka, Magdalena Gawłowska, Marek Korbas, Adriana Twardawska, Michał Kwiatek, Jolanta Belter 11
- Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Oculimacula yallundae* i *Oculimacula aciformis*
- The use of molecular and phenotypic markers to identify genes of wheat resistance to eyespot caused by *Oculimacula yallunda* and *Oculimacula aciformis*
- Tadeusz Adamski, Maria Surma, Zygmunt Kaczmarek, Anetta Kuczyńska, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogródowicz, Elżbieta Adamska, Karolina Krystkowiak, Renata Trzeciak, Alina Anioła, Renata Holewińska, 15
- Badania nad wpływem translokacji 1B/1R na efektywność uzyskiwania linii DH pszenicy oraz ich wartość technologiczną
- Studies on the effect of 1B/1R translocations on the efficiency of obtaining wheat DH lines and their technological value
- Paweł Czembor, Urszula Piechota, Dominika Piaskowska, Magdalena Radecka-Janusik, Piotr Słowacki, Grzegorz Czajowski, Dariusz Mańkowski 19
- Mapowanie asocjacyjne genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*) i septoriozę paskowaną liści (*Septoria tritici*) w pszenicy
- Association mapping of resistance genes for leaf rust (*Puccinia triticina*) and septoria tritici blotch (*Septoria tritici*) in wheat
- Anna Nadolska-Orczyk, Karolina Szala, Hanna Ogonowska, Izabela Rajchel, Renata Wyszyńska, Maja Boczkowska, Sebastian Gasparis, Maciej Kała 25
- Identyfikacja zmienności genetycznej pszenicy korelującej z potencjałem plonotwórczym i wybranymi cechami systemu korzeniowego
- Identification of genetic variation of wheat correlating with grain yield and development of root system

Tomasz Góral, Halina Wiśniewska, Paweł Czembor, Piotr Ochodzki, Magdalena Radecka-Janusik, Adriana Twardawska, Maciej Mańka, Jolanta Belter	29
<p>Poszukiwanie oraz wykorzystanie markerów fenotypowych, metabolicznych i molekularnych do badania typów odporności na fuzariozę kłosów u form pszenicy o zróżnicowanej podatności</p> <p>Identification and application of phenotypic, metabolic and molecular markers in studies of types of resistance to Fusarium head blight in winter wheat accessions differing in resistance</p>	
Mirosław Tyrka, Tadeusz Drzazga, Przemysław Matysik, Krzysztof Rubrycki, Bogusława Ługowska, Edward Witkowski, Justyna Buczkowicz, Semik Małgorzata, Dorota Tyrka	37
<p>Identyfikacja efektywnych genów odporności na wybrane choroby wirusowe i grzybowe pszenicy zwyczajnej</p> <p>Identification of effective resistance genes for selected viral and fungal diseases in common wheat</p>	
Yuliya Kloc, Marta Dmochowska-Boguta, Przemysław Werekci, Waclaw Orczyk	43
<p>Tolerancja na stresy abiotyczne – genotypowanie pszenicy w oparciu o strategię genów kandydujących</p> <p>Abiotic stress tolerance – genotyping of wheat based on candidate gene strategy</p>	
Aleksandra Pietrusińska	47
<p>Efektywność piramidowania genów odporności na mączniaka prawdziwego (<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>) i rdzę brunatną (<i>Puccinia triticina</i>) w pszenicy ozimej</p> <p>Pyramiding efficiency of the genes of resistance to powdery mildew (<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>tritici</i>) and leaf rust (<i>Puccinia triticina</i>) in winter wheat</p>	
Edward Arseniuk	55
<p>Toksyny białkowe <i>Parastagonospora nodorum</i> i ich związek z patogennością oraz odpornością pszenżyta i pszenicy na septoriozę liści i plew (SNB)</p> <p><i>Parastagonospora nodorum</i> proteinaceous toxins and their relationship with wheat and triticale susceptibility and resistance to stagonospora nodorum blotch (SNB)</p>	
Marcin Rapacz, Barbara Jurczyk, Monika Sasal	63
<p>Określenie czynników decydujących o zimowaniu pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego w warunkach polskich</p> <p>Identification of factors determining winter wheat and winter triticale overwintering under Polish winter conditions</p>	

Edward Arseniuk	67
<p>Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych skracających cykl hodowlany i zwiększających efektywność selekcji genotypów ozimej pszenicy i ozimego pszenżyta o podwyższonej odporności na septoriozę liści i plew [czynnik sprawczy: <i>Parastagonospora nodorum</i> (Berk.), (Quaedvlieg, Verkley & Crous.)]</p> <p>Development and use of biotechnological methods for shortening the breeding cycle and improving the effectiveness of genotypes selection of winter wheat and winter triticale with increased resistance to septoria leaf and glume (agent: <i>Parastagonospora nodorum</i> (Berk.), (Quaedvlieg, Verkley & Crous.)]</p>	
Magdalena Szechyńska-Hebda, Natalia Hordyńska, Maria Wędzony, Mateusz Dyda, Joanna Troczyńska, Zofia Banaszak, Mirosław Sobczak, Elżbieta Różańska, Iwona Wąsek, Maria Pilarska, Ireneusz Ślesak	75
<p>Alternatywne czynniki redukujące zjawisko albinizmu roślin regenerowanych z androgenicznych kultur pszenicy i pszenżyta</p> <p>Alternative factors reducing albinism of plants regenerated from androgenic cultures of wheat and triticale</p>	
Magdalena Szechyńska-Hebda, Natalia Hordyńska, Lidia Sas-Paszt, Stanisław Grzesiak, Maciej Grzesiak, Anna Maksymowicz, Anna Lisek, Beata Sumorok, Edyta Derkowska, Krzysztof Weszczak, Mateusz Frąc, Michał Przybył, Paweł Trzeciński, Sławomir Głuszek	79
<p>Fizjologiczne i genetyczne markery odporności pszenicy jarej na suszę w aspekcie interakcji zachodzących w ryzosferze</p> <p>Physiological and genetic markers of resistance of spring wheat to drought in the aspect of interactions occurring in the rhizosphere</p>	
Mirosław Tyrka, Paweł Krajewski, Paweł Milczarski, Grzegorz Fic, Magdalena Szeliga, Marcin Jaromin, Tadeusz Drzazga, Przemysław Matysik, Róża Mazur, Teresa Sikora, Edward Witkowski, Justyna Buczkowicz, Dorota Tyrka	83
<p>Selekcja genomowa pszenicy ozimej</p> <p>Genomic selection of winter wheat</p>	
Piotr T. Bednarek, Renata Orłowska, Katarzyna Pachota, Sławomir Bany	89
<p>Analiza zmienności somaklonalnej indukowanej w kulturach <i>in vitro</i> u roślin zbożowych</p> <p>Analysis of somaclonal variation induced in cereals tissue cultures</p>	
PSZENŻYTO	
Krzysztof Michalski, Sławomir Sowa, Anna Linkiewicz	95
<p>Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych do skrócenia cyklu hodowlanego pszenżyta oraz do poprawy efektywności selekcji — miejscowo-specyficzna mutageneza z wykorzystaniem miejscowo-specyficznych nukleaz</p> <p>Development and application of methods for the shortening of triticale breeding cycle and for the effective selection — site-specific mutagenesis using programmable nucleases</p>	

- Halina Wiśniewska, Adriana Twardawska, Tomasz Góral, Piotr Ochodzki, Maciej Majka, 99
Michał Kwiatek, Dorota Walentyn-Góral, Jolanta Belter
- Badanie typów odporności na fuzariozę kłosów u pszenżyta ozimego za pomocą markerów fenotypowych i metabolicznych
- Evaluation of Fusarium head blight resistance types in winter triticale using phenotypic and metabolic markers
- Piotr Tomasz Bednarek, Marzena Wasiak, Agnieszka Niedziela, Sławomir Bany, Mirosław 103
Pojmaj, Henryk Woś, Janina Woś
- Poszukiwanie markerów molekularnych genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt*
- Identification of molecular markers associated with maintenance of pollen sterility genes in triticale with CMS *Tt*
- Sylvia Oleszczuk, Janusz Zimny, Katarzyna Makowska, 107
- Badania nad optymalizacją metod indukowanego podwajania garnituru chromosomowego w haploidalnych regenerantach pszenżyta
- Optimization of induced chromosome doubling methods in haploid regenerants of triticale
- Justyna Leśniowska-Nowak, Magdalena Sozoniuk, Sylvia Okoń, Michał Nowak, 111
Sylvia Sowa, Wojciech Marecki, Aneta Koroluk, Magdalena Kawęcka
- Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone
- Development of new genetic sources of triticale by wide crossing
- Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina, Aleksandra Ponitka, Hanna Pudelska, Jolanta Woźna 117
- Badania nad zwiększeniem efektywności uzyskiwania haploidów w procesie androgenezy oraz optymalizacja parametrów otrzymywania podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego
- Studies on increasing the efficiency of obtaining haploids in the androgenesis and optimization of parameters for production doubled haploids winter and spring triticale
- Michał Nowak, Piotr Tomasz Bednarek, Justyna Leśniowska-Nowak, Adam Kuzdraliński, 121
Edyta Paczos-Grzęda, Magdalena Sozoniuk, Karolina Dudziak, Magdalena Kawęcka, Karolina Różaniecka
- Identyfikacja regionów genomu oraz markerów DNA związanych z heterozją w heksaploidalnym pszenżycie ozimym
- Identification of genome regions and DNA markers associated with heterosis in hexaploid winter triticale

Stefan Stojałowski, Marta Orłowska, Martyna Sobczyk, Anna Bienias, Marcin Berdzik, 127
Beata Myśków, Halina Góral, Magdalena Simlat, Tomasz Warzecha, Wojciech Wesołowski,
Marek Szklarczyk, Mirosław Pojmaj

Genetyczne podłoże męskiej sterylności pszenżyta z różnymi cytoplazmami oraz
możliwość wykorzystania badanych cytoplazm do tworzenia systemów CMS u pszenicy

Genetic background of male sterility in triticale with different cytoplasm and perspectives
of their utilization for development of CMS system in wheat

JĘCZMIENŃ

Mirosław Kwaśniewski, Karolina Chwiałkowska, Urszula Nowakowska, Małgorzata 131
Nawrot, Janusz Jelonek, Grażyna Skawińska-Zydroń, Agnieszka Bielska

Analiza zmienności epigenetycznej indukowanej stresem suszy oraz ocena jej stabilności
transgeneracyjnej w aspekcie tolerancji jęczmienia na stres niedoboru wody

The analysis of the epigenetic diversity induced by drought stress and the assessment of
its transgenerational stability with respect to the drought stress tolerance in barley

Damian Gruszka 135

Badania nad wpływem brasinosteroidów na tolerancję roślin jęczmienia na stres
niedoboru wody

Studies of the influence of brassinosteroids on tolerance of barley plants to drought stress

Iwona Żur, Ewa Dubas, Monika Krzewska, Anna Nowicka, Przemysław Kopeć, 139
Tomasz Hura, Agnieszka Ostrowska, Sabina Malaga, Anna Janeczko, Gabriela Gołębiowska-
Pikania, Marcin Rapacz, Magdalena Wójcik-Jagła

Identyfikacja czynników determinujących odporność jęczmienia ozimego (*Hordeum
vulgare* L.) na suszę i mróz

Identification of factors which determine drought and freezing tolerance in barley
(*Hordeum vulgare* L.)

Jerzy H. Czembor 145

Współdziałanie odporności na mączniaka (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) warunkowanej
genem *mlo* z wartością cech gospodarczych jęczmienia ozimego

Interaction of resistance to mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) determined by the *mlo*
gene with the agronomic value of winter barley

Anetta Kuczyńska, Tadeusz Adamski, Maria Surma, Krzysztof Mikołajczak, 149
Piotr Ogrodowicz, Michał Kempa, Hanna Ćwiek-Kupczyńska, Renata Trzeciak,
Renata Holewińska, Alina Anioła

Efekty pleiotropowe genów *Ppd-H1* i *Ppd-H2* a podatność roślin jęczmienia jarego
na fuzariozę kłosów i akumulację mykotoksyn

Pleiotropic effects of *Ppd-H1* and *Ppd-H2* genes and the susceptibility of spring barley
to Fusarium head blight and accumulation of mycotoxins

Renata Orłowska, Piotr T. Bednarek, Katarzyna Pachota, Sławomir Bany	155
Molekularna charakterystyka wpływu elementów mobilnych na zmienność genetyczną w zbożowych kulturach <i>in vitro</i>	
Molecular characterization of the impact of transposable elements on genetic variation in cereals tissue cultures	
Anetta Kuczyńska, Tadeusz Adamski, Maria Surma, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogrodowicz, Michał Kempa, Monika Mokrzycka, Renata Trzeciak, Renata Holewińska, Alina Anioła	161
Wpływ stresu niedoboru wody na rozwój i architekturę systemu korzeniowego u jęczmienia (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	
Effects of drought on the development and architecture of barley root system	
ŻYTO	
<hr/>	
Tomasz Kosiada, Roman Andrzejak, Marcin Wieczyński, Patrycja Marciniak	167
Badania nad zwiększeniem odporności żyta na sporysz i na fuzariozę kłosów przez poznanie interakcji pasożyt – żywiciel – środowisko z wykorzystaniem genetycznych źródeł odporności na <i>Claviceps purpurea</i> i grzyby rodzaju <i>Fusarium</i>	
The research on increasing resistance in rye to ergot and to <i>Fusarium</i> head blight by studying the host-parasite-environment relationship using genetic sources of resistance to <i>Claviceps purpurea</i> and <i>Fusarium</i> genus	
Stefan Stojalowski, Marta Orłowska, Martyna Sobczyk, Anna Bienias, Beata Myśków, Przemysław Tomczak, Wojciech Wesołowski, Marek Szklarczyk, Waldemar Brukwiński, Katarzyna Banaszak, Monika Hanek, Renata Krzysztofik, Marek Zając	173
Poszukiwanie wspólnych mechanizmów dziedziczenia płodności roślin z cytoplazmą CMS – C oraz z cytoplazmą CMS-Pampa	
Search of common genetic mechanisms determining fertility of plants with cytoplasm CMS-C and CMS-Pampa	
Piotr Tomasz Bednarek, Agnieszka Niedziela, Waldemar Brukwiński, Barbara Kozber	177
Poszukiwanie markerów molekularnych genów przywracania płodności pyłku u żyta (<i>Secale cereale</i> L.) z CMS-Pampa	
Identification of pollen fertility restoration markers in rye (<i>Secale cereale</i> L.) with CMS-Pampa	
Henryk Bujak, Kamila Nowosad	181
Poszukiwanie źródeł genetycznej odporności na mączniaka i rdzę w kolekcji linii, rodów i odmian żyta	
Search for genetic sources to powdery mildew and brown rust resistance in rye inbred lines and varieties collection	

Ewa Dubas, Kamil Zieliński, Monika Krzewska, Iwona Żur, Anna Nowicka, Przemysław Kopeć, Izabela Marcińska, Ilona Czyczyło-Mysza, Edyta Skrzypek 185

Identyfikacja czynników determinujących efektywność otrzymywania podwojonych haploidów żyta (*Secale cereale* L.) metodami androgenezy i krzyżowań oddalonych

Identification of factors determining the efficiency of doubled haploids production in rye (*Secale cereale* L.) through androgenesis and distant crosses

Janusz Zimny, Sylwia Oleszczuk, Aleksandra Zimny, Katarzyna Makowska, Andrzej Czaplicki 189

Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury *in vitro*

Rye microspores response of to stress and *in vitro* culture conditions

Sylwia Mikołajczyk, Zbigniew Broda, Dorota Weigt, Agnieszka Tomkowiak, Jan Bocianowski 193

Haploidyzacja żyta – diagnostyka molekularna oraz wpływ nanomolekuł na wspomaganie indukcji i regeneracji roślin w warunkach *in vitro*

Haploidization of the rye – the molecular diagnostics and the influence of nanomolecules on supporting the induction and the regeneration of plants in *in vitro* conditions

Stefan Stojałowski, Marta Orłowska, Martyna Sobczyk, Anna Bienias, Beata Myśków, Marzena Ostrowska, Marek Zajac, Róża Martofel, Dorota Jasińska, Michał Materka 199

Badania wewnętrznej struktury genetycznej odmian żyta oraz dziedzicznego podłoża efektu heterozji

Study on internal genetic structure of rye cultivars and genetic background of heterosis

OWIES

Grzegorz Lemańczyk, Aleksander Łukanowski, Anna Baturo-Cieśniewska 203

Poszukiwanie źródeł odporności owsa (*Avena sativa* L.) na nowy patogeniczny i mykotoksynotwórczy gatunek – *Fusarium langsethiae*

Searching for oat (*Avena sativa* L.) resistance to a new pathogenic and mycotoxigenic species - *Fusarium langsethiae*

Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa, Aneta Koroluk, Joanna Toporowska, Ewelina Marek, Piotr Bednarek 209

Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego

Linkage and association mapping of oat

Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa, Aneta Koroluk, Joanna Toporowska, Ewelina Marek 213

Piramidyzacja genów odporności na rdzę koronową w genomie owsa oraz identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla tych genów

Crown rust resistance genes pyramiding in oat genome and identification of DNA markers for these genes

Danuta Boros, Damian Gołębiowski	217
<p>Badanie składników determinujących wartość odżywczą i funkcjonalną owsa oraz ich relacji w ziarnie obłuszczonej i oplewionym</p> <p>Study of components determining the nutritional and functional value of oats and their relations in hulled and dehulled grain</p>	
Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa, Aleksandra Nucia	221
<p>Identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla wybranych genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie zwyczajnym oraz piramidyzacja efektywnych genów odporności w genomie owsa</p> <p>Identification and localization of DNA markers for selected powdery mildew resistance genes in common oat and pyramiding of the effective resistance genes in the oat genome</p>	
<p>RZEPAK</p>	
Elżbieta Adamska, Tadeusz Adamski, Tadeusz Caliński, Teresa Cegielska-Taras, Zygmunt Kaczmarek, Laurencja Szała, Renata Trzeciak, Bernadeta Borucka, Halina Gdeczyk	225
<p>Jedno- i wielozmienne modele analizy wariancji i kowariancji dla doświadczeń populacyjnych i mieszańcowych z rzepakiem ozimym</p> <p>Uni- and multivariate models of variance and covariance analyses for winter oilseed rape experiments</p>	
Iwona Bartkowiak-Broda, Alina Liersch, Katarzyna Mikołajczyk, Marcin Matuszczak, Joanna Nowakowska, Wiesława Popławska, Joanna Wolko	229
<p>Badanie genomu rzepaku ozimego przy wykorzystaniu markerów molekularnych</p> <p>The investigation of winter rapeseed genome with the use of molecular markers</p>	
Michał Starzycki, Elżbieta Starzycka-Korbas, Renata Daleka	235
<p>Badanie bioróżnorodności gatunków z plemina <i>Brassicaceae</i> w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny</p> <p>Biodiversity studies of species of <i>Brassicaceae</i> to obtain forms of oilseed rape improved in terms of resistance to pathogens</p>	
Małgorzata Jędrzycka, Joanna Kaczmarek, Witold Irzykowski, Joanna Majka, Tomasz Książczyk, Noor Ramzi, Janetta Niemann, Idzi Siatkowski, Agnieszka Wolna-Maruwka, Lidia Irzykowska, Marek Korbas, Ewa Jajor, Jakub Danielewicz, Anna Nieróbca	239
<p>Zastosowanie konwencjonalnych i molekularnych narzędzi fitopatologicznych w poszukiwaniu źródeł odporności na kiłę kapusty oraz charakterystyka aktualnej populacji patogenu w Polsce</p> <p>The use of conventional and molecular phytopathological tools in searching for sources of resistance to clubroot and characterisation of the current pathogen population in Poland</p>	

<p>Teresa Cegielska-Taras, Laurencja Szała, Katarzyna Sosnowska</p> <p>Wprowadzanie nowych alleli z pul genowych różnych gatunków z rodzaju <i>Brassica</i> do bazy genowej rzepaku ozimego</p> <p>Introduction of new alleles from gene pools of various <i>Brassica</i> species to the winter oilseed rape genome</p>	<p>245</p>
<p>Teresa Cegielska-Taras, Laurencja Szała, Katarzyna Sosnowska</p> <p>Badania nad indukcją embriogenezy mikrospor u roślin z rodzaju <i>Brassica</i> sp.</p> <p>Studies on the induction of microspore embryogenesis in plants of the genus <i>Brassica</i> sp.</p>	<p>249</p>
<p>Stanisław Spasibonek, Katarzyna Mikołajczyk, Marcin Matuszczak, Magdalena Walkowiak, Joanna Nowakowska</p> <p>Wykorzystanie nowej puli genowej dla uzyskania form rzepaku ozimego o zmienionych cechach jakościowych</p> <p>The use of a new gene pool for obtaining forms of winter oilseed rape with changed quality characteristics</p>	<p>253</p>
<p>Janetta Niemann, Dorota Weigt, Justyna Szwarz, Jan Bocianowski, Andrzej Wojciechowski, Małgorzata Jędryczka, Joanna Kaczmarek, Witold Irzykowski, Joanna Majka, Marek Mrówczyński, Wojciech Karłowski, Andrzej Zieleziński</p> <p>Introdukcja genów odporności na choroby i owady oraz męskiej sterylności z pokrewnych gatunków rodzaju <i>Brassica</i> do rzepaku (<i>Brassica napus</i> L.)</p> <p>Introduction of disease and pest resistance genes and male sterility from <i>Brassica</i> relatives to rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)</p>	<p>261</p>
<p>Krzysztof Michalski, Renata Daleka</p> <p>Opracowanie modeli kalibracyjnych dla spektrometru NIRS o zakresie widma 400 – 2500 nm dla oznaczania glukozynolanów, białka, NDF, ADF oraz steroli i badania zmienności tych związków w roślinach oleistych</p> <p>Development of calibration models for NIRS spectrometer with spectra range 400 – 2500 nm destined to quantitative measurement of glucosinolates, protein, NDF, ADF, sterols sum and research of variability of those in oilseed plants</p>	<p>265</p>
<p>Danuta Boros, Kinga Gołębiewska</p> <p>Badanie czynników determinujących niską strawność białka śruty uzyskanej z nasion rzepaku ozimego</p> <p>Study of the factors determining the low protein digestibility of meal obtained from winter oilseed rape</p>	<p>267</p>

GRYKA

Agnieszka Płazek, Franciszek Dubert, Aneta Słomka, Przemysław Kopeć, Michał Dziurka 271

Badanie możliwości zwiększenia żywotności i stopnia zapylenia kwiatów gryki zwyczajnej w celu uzyskania wyższego plonu nasion

Study of the possibility of increasing the vitality and pollination of buckwheat flowers in order to obtain a higher seed yield

KUKURYDZA

Elżbieta Czembor, Seweryn Frasiński 277

Poszukiwanie form kukurydzy o wysokiej odporności na fuzariozę kolb i zgorzeli podstawy łodygi powodowanej przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.

Identification of new sources highly resistant to ear rot and stalk rot of maize caused by *Fusarium* spp.

Henryk Bujak, Kamila Nowosad, Jerzy Nawracała, Agnieszka Tomkowiak, Danuta Kurasiak-Popowska, Dorota Weigt 281

Określenie zróżnicowania genetycznego linii wsobnych kukurydzy za pomocą markerów molekularnych

Evaluation of genetic diversity of inbred maize lines using molecular markers

Marcin Wit, Piotr Ochodzki, Roman Warzecha, Monika Żurek, Ewa Mirzwa-Mróż, Emilia Jabłońska, Józef Adamczyk, Anna Rogacka, Janusz Rogacki, Krzysztof Wójcik, Wojciech Wakuliński 285

Fusarium temperatum – znaczenie i szkodliwość w uprawie kukurydzy, poszukiwanie i charakterystyka źródeł odporności

ZIEMNIAK

Renata Lebecka, Jadwiga Śliwka, Anna Grupa-Urbańska, Zofia Murawska, Katarzyna Szajko, Janusz Dębski, Michał Kistowski, Waldemar Marczewski, Ewa Zimnoch-Guzowska 289

Badania ekspresji i genetyczna charakterystyka odporności na bakterie *Dickeya solani* w wyróżnionych źródłach odporności w ziemniaku na poziomie diploidalnym

Research on the expression and genetic characterization of the resistance to bacteria *Dickeya solani* in selected for resistance diploid potato

Włodzimierz Przewodowski, Grzegorz Gryń, Milena Pietraszko, Katarzyna Salamońska, Dorota Szarek, Agnieszka Przewodowska, Wioleta Stochła, Teresa Pastuszewska, Wojciech Nowacki, Krzysztof Treder, Danuta Sekrecka, Dorota Michałowska, Katarzyna Franke, Joanna Chołuj, Anna Pawłowska, Agata Trocka, Małgorzata Łabańska, Paulina Dederko-Kantowicz, Mateusz Nowakowski i Zuzanna Munczkowska. 293

Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czulej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych

Research and development of selective isolation and sensitive identification methods of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria in difficult diagnostic environmental samples

Krzysztof Treder, Anna Pawłowska, Joanna Chołuj, Bogumiła Zacharzewska, Mateusz Mielczarek, Agata Kaczmarek, Maria Fedczak 303

Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka

Development of sensitive methods for detection of the most important potato viruses

Dominika Boguszewska-Mankowska, Krystyna Zarzyńska, Beata Wasilewska-Nascimento, Cezary Trawczyński, Krzysztof Treder, Mateusz Mielczarek, Anna Pawłowska, Bogumiła Zacharzewska 307

Badania tolerancji odmian ziemniaka na stresy abiotyczne w świetle postępujących zmian klimatycznych

Drought tolerance of potato cultivars to abiotic stress in relation to climate change

Dorota Mielczarek, Anna Podlewska-Przetakiewicz, Bogdan Flis 309

Wyróżnianie form ziemniaka o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak przy wykorzystaniu metod konwencjonalnych i molekularnych. Charakterystyka nowego źródła odporności na *Globodera pallida* znalezionej w *Solanum gourlayi*

Selection of potato forms with accumulated resistances to nematodes attacking the potato by using conventional and molecular methods. Characterization of a new source of resistance to *Globodera pallida* found in *Solanum gourlayi*

Beata Tatarowska, Bogdan Flis, Iwona Wasilewicz Flis, Katarzyna Szajko 313

Wyróżnianie i charakterystyka tetraploidalnych form ziemniaka odpornych na wirusy M i S ziemniaka z wykorzystaniem selekcji metodami konwencjonalnymi i markerami molekularnymi

Distinguished and characterization of tetraploid forms of potato resistant on PVM and PVS viruses by using conventional methods and marker assisted selection

Bogdan Flis, Beata Tatarowska 319

Analiza interakcji genotypowo-środowiskowej w odniesieniu do wybranych cech użytkowych ziemniaka jadalnego w różnych systemach uprawy

Analysis of genotype by environment interaction for selected traits of table potato in various cultivation systems

Dorota Michałowska, Danuta Sekrecka, Włodzimierz Przewodowski, Sławomir Wróbel, Anna Krzewińska, J. Downar-Zapolska, Tomasz Erlichowski, J. Piskorz, Agnieszka Przewodowska, Paulina Buryło, Oksana Olejnik, Paulina Gierszewska 323

Eliminacja patogenów niekwarentannowych (bakterie endogenne i wirusy) oraz kontrola zdrowotności roślin ziemniaka w banku *in vitro*

Elimination of non-quarantine pathogens (viruses and endophytic bacteria) and control of Potato plantlets healthiness in the *in vitro* bank

Zhimin Yin, Renata Lebecka, Zofia Murawska, Krystyna Michalak, Fuliang Xie, 329
Baohong Zhang, Magdalena Pawełkiewicz

Badania nad regulatorową funkcją cząsteczek miRNA w przebiegu infekcji wirusami ziemniaka PVY i TRV

Research on the regulatory function of miRNA in the course of infection with potato viruses PVY and TRV

BURAK CUKROWY

Anita Wiśniewska, Chrystian Chomontowski, Joanna Dąbrowska-Bronk, 333
Sławomir Podlaski, Danuta Chołuj

Identyfikacja i zastosowanie fenotypowych i molekularnych markerów tolerancji na stres suszy u buraka cukrowego

Identification and application of phenotypic and molecular markers of drought stress tolerance in sugar beet

Gabriela Machaj, Wojciech Wesołowski, Alicja Macko-Podgórn, Rafał Barański, Marek 339
Szklarczyk, Dariusz Grzebelus

Opracowanie metod globalnej analizy polimorfizmów w genomie buraka cukrowego

Development of methods for global analysis of polymorphisms in the genome of sugar beet

Sandra Cichorz, Małgorzata Malicka, Maria Gośka 343

Badania nad mechanizmami warunkującymi proces embriogenezy gametycznej u buraka cukrowego

The research on the mechanisms responsible for gynogenic embryogenesis in sugar beet

BURAK ĆWIKŁOWY

Krystyna Górecka, Waldemar Kiszczak, Małgorzata Podwyszyńska, Urszula Kowalska, 347
Agata Kapuścińska, Maria Burian, Lidia Fornal, Anna Bakalarska, Danuta Prochaska,
Agnieszka Rojek

Otrzymanie populacji homozygotycznych roślin buraka ćwikłowego z zastosowaniem embriogenezy gametycznej

Obtaining a population of homozygous plants of red beet using gametic embryogenesis

Wojciech Wesołowski, Stefan Stojałowski, Hieronim Golczyk, Przemysław Gierski, Anna 351
Szlachtowska, Beata Domnicz, Marcelina Wajdzik, Anna Burda, Marek Szklarczyk

Analiza czynników genetycznych związanych z przywracaniem płodności roślin buraka ćwikłowego

Analysis of genetic factors linked to fertility restoration in table beet

OGÓREK

Renata Słomnicka, Helena Olczak-Woltman, Aleksandra Korzeniewska, Teresa Gałęcka, Karolina Kaźmińska, Katarzyna Niemirowicz-Szczytt, Grzegorz Bartoszewski 355

Doskonalenie ogórka (*Cucumis sativus* L.) pod względem odporności na kanciastą plamistość

Improvement of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in terms of angular leaf spot resistance

Urszula Kłosińska, Marzena Nowakowska, Wojciech Szczechura, Katarzyna Nowak, Waldemar Treder, Krzysztof Klamkowski, Katarzyna Wójcik, Elżbieta U. Kozik 359

Opracowanie genetycznych, fizjologicznych i biochemicznych podstaw tolerancji ogórka na stres niedoboru wody

Development of genetic, physiological and biochemical basis of cucumber tolerance to water deficiency

POMIDOR

Marzena Nowakowska, Urszula Kłosińska, Katarzyna Nowak, Wojciech Szczechura 363

Badania nad opracowaniem molekularnej metody identyfikacji genów warunkujących ważne cechy użytkowe pomidora

Studies on the development of molecular methods for identifying genes responsible for important traits of tomato

Wojciech Szczechura, Marzena Nowakowska, Urszula Kłosińska, Katarzyna Nowak, Krzysztof Rutkowski 367

Badania cytologicznych i biochemicznych mechanizmów odporności roślin w patosystemach pomidor-*Phytophthora infestans* oraz ogórek-*Pseudoperonospora cubensis*

Studies of cytological and biochemical mechanisms of plant resistance in the pathosystems tomato - *Phytophthora infestans* and cucumber-*Pseudoperonospora cubensis*

Małgorzata Czernicka, Kinga Kęska, Anna Kołton, Marek Szklarczyk, Sylwester Smoleń, Małgorzata Kapusta, Michał Dziurka, Iwona Kamińska 371

Analiza wpływu hipoksji na zwiększenie tolerancji na stresy u pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.) i ogórka (*Cucumis sativus* L.)

Analysis of the effects of exposure to hypoxia on increase stress tolerance at tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.)

ROŚLINY WARZYWNE

Alicja Macko-Podgórn, Katarzyna Stelmach, Kornelia Kwolek, Gabriela Machaj, Rafał Barański, Dariusz Grzebelus 375

Opracowanie i wykorzystanie wysokowydajnych technik selekcji genomowej w doskonaleniu warzyw

Development and application of high-throughput techniques of genomic selection in vegetable crop improvement

Stefan Stojakowski, Wojciech Wesołowski, Wojciech Bieniek, Dagmara Kwolek,
Anna Szlachtowska, Anna Burda, Marek Szklarczyk 379

Identyfikacja genów odpowiedzialnych za przywracanie płodności i samozgodność
u wybranych roślin warzywnych

Identification of genes responsible for fertility restoration and self-compatibility
in selected vegetable species

CEBULA

Urszula Kłosińska, Marzena Nowakowska, Katarzyna Nowak, Wojciech Szczechura,
Waldemar Treder, Krzysztof Klamkowski, Katarzyna Wójcik, Mariusz Chojnowski 383

Analiza genetycznych i biochemicznych podstaw tolerancji cebuli (*Allium cepa* L.)
na stres niedoboru wody

Analysis of genetic and biochemical basis of onion (*Allium cepa* L.) tolerance to water
deficit stress

MARCHEW

Ewa Grzebelus, Marek Szklarczyk, Rafał Barański, Magdalena Klimek-Chodacka,
Miron Gieniec, Katarzyna Maćkowska, Aneta Malec-Pala, Tomasz Oleszkiewicz,
Dariusz Kadłuczka 387

Transfer cytoplazmatycznej męskiej sterylności poprzez somatyczną hybrydyzację
u marchwi

Transfer of cytoplasmic male sterility through somatic hybridization in carrot

ROŚLINY KAPUSTNE

Agnieszka Kiełkowska, Adela Adamus, Marek Szklarczyk 393

Wykorzystanie metod biotechnologicznych do poszerzenia zmienności genetycznej
warzyw kapustnych

Biotechnological methods for broadening of the genetic diversity in brassica vegetables

Piotr Kamiński, Małgorzata Podwyszyńska, Agnieszka Marasek-Ciołakowska, Michał
Starzycki, Elżbieta Starzycka-Korbas, Barbara Dyki, Katarzyna Nowak 399

Otrzymanie nowej zmienności genetycznej warzyw kapustowatych przy wykorzystaniu
krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica*

Development of the new genetic diversity of vegetable brassicas by the use of distant
hybridization

Monika Markiewicz, Lech Michalczyk, Beata Kowalska, Urszula Smolińska,
Agnieszka Czajka, Józef Robak, Anna Czubatka-Bieńkowska, Piotr Kamiński,
Małgorzata Podwyszyńska 403

Badanie molekularnego mechanizmu odporności na kiłę kapusty (*Plasmodiophora
brassicae*) u roślin z rodzaju *Brassica*

Studies on molecular mechanism of clubroot resistance (*Plasmodiophora brassicae*)
in *Brassica* plants

GROCH

Wojciech Świącicki, Magdalena Gawłowska, Andrzej Górny, Dominika Ratajczak, Katarzyna Beczek, Alicja Niewiadomska, Lech Boros, Anna Wawer 407

Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stresy abiotyczne

Identification of pea genome regions in the determining of the selected parameters of the physiological effectiveness as an important factor of the resistance to abiotic stresses

SOJA

Jerzy Nawracała, Danuta Kurasiak-Popowska, Agnieszka Katańska-Kaczmarek 413

Analiza bioróżnorodności zasobów genowych soi przydatnej do hodowli w warunkach klimatycznych Polski i opracowanie metodyki krzyżowania międzygatunkowego *Glycine max* x *Glycine soja*

Analysis of biodiversity of soybean gene resources useful for breeding in climatic conditions of Poland and development of interspecific *Glycine max* x *Glycine soja* crossing methodology

Jerzy Nawracała, Janetta Niemann, Agnieszka Tomkowiak, Dorota Weigt, Danuta Kurasiak-Popowska, Michał Książkiewicz, Sandra Rychel-Bielska, Wojciech Bielski, Bogdan Wolko, Agnieszka Kaczmarek 417

Identyfikacja układów allelicznych genów fotoneutralności i wczesności oraz opracowanie metodyki otrzymywania roślin homozygotycznych u soi

Identification of alleles arrangement of photoneutrality and earliness genes and developing method of obtaining soybean homozygous plants

ŁUBIN

Michał Książkiewicz, Piotr Plewiński, Sandra Rychel-Bielska, Wojciech Bielski, Magdalena Tomaszewska, Barbara Naganowska, Bogdan Wolko 421

Cecha wczesności kwitnienia u łubinu białego i łubinu żółtego – podstawy genetyczne i molekularne

Early flowering traits of white lupin and yellow lupin – genetic and molecular backgrounds

Wojciech Świącicki, Magdalena Kroc, Paweł Barzyk, Katarzyna Czepiel, Paulina Wilczura/Aleksandra Burdzińska 425

Identyfikacja i sposób dziedziczenia genów warunkujących odporność na choroby grzybowe i niską zawartość alkaloidów w doskonaleniu wartości użytkowej łubinów, ze szczególnym uwzględnieniem łubinu żółtego

Identification and mode of inheritance of genes underlying fungal disease resistance and low alkaloid content in lupins improvement, with particular attention to yellow lupin

Wojciech Rybiński, Wojciech Świącicki, Paweł Barzyk	431
<p>Analiza zmienności genetycznej i piramidyzacja genów warunkujących cechy użytkowe łubinu białego</p> <p>Estimation of genetic variability and pyramiding of genes controlling agricultural traits of white lupin</p>	
Renata Galek, Bartosz Kozak, Dariusz Zalewski	435
<p>Fenotypowanie i genotypowanie łubinu wąskolistnego pod względem wybranych cech morfologicznych, plonotwórczych i parametrów technologicznych nasion</p> <p>Phenotyping and genotyping of in terms of selected morphological, yield elements and technological parameters of narrow-leafed lupin seeds</p>	
Renata Galek, Bartosz Kozak, Dariusz Zalewski, Adela Adamus, Agnieszka Kiełkowska	441
<p>Badania nad gametyczną embriogenezą u <i>Lupinus angustifolius</i> L. – indukcja haploidów i analiza genetycznego podłoża tego procesu</p> <p>Research on gametic embryogenesis in <i>Lupinus angustifolius</i> L. - haploid induction and analysis of the genetic basis of this process</p>	
CHMIEL	
Marcin Przybyś, Urszula Skomra, Grażyna Korbecka-Glinka	449
<p>Występowanie dotychczas niemonitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce</p> <p>The occurrence of previously unmonitored viruses (HpLV, ArMV) and viroids (HpSVd, AFCVd, CBCVd) in hop gardens in Poland</p>	
TRAWY WIELOLETNIE	
Arkadiusz Kosmala, Adam Augustyniak, Dawid Perlikowski, Izabela Pawłowicz, Katarzyna Lechowicz, Włodzimierz Zwierzykowski, Zbigniew Zwierzykowski, Marcin Rapacz, Agnieszka Płazek, Ewa Pociecha, Eugeniusz Paszkowski	453
<p>Identyfikacja genów związanych z ekspresją zimotrwałości i tolerancji suszy u form introgresyjnych <i>Lolium multiflorum/Festuca arundinacea</i></p> <p>Identification of genes associated with winter-hardiness and drought tolerance in the introgression forms of <i>Lolium multiflorum/Festuca arundinacea</i></p>	
Elżbieta Czembor, Wojciech Majtkowski, Jan Schmidt, Seweryn Frasiński	457
<p>Gromadzenie i ocena kolekcji ekotypów traw wieloletnich z uwzględnieniem cech warunkujących ich wykorzystanie na cele alternatywne</p> <p>Collection and assessment the collection of perennial grasses ecotypes, taking into account traits which determine their usage for alternative purposes</p>	

Grzegorz Żurek, Danuta Martyniak, Kamil Prokopiuk, Agnieszka Rachwalska, Eugenisz Paszkowski, Maciej Jurkowski 461

Badanie cech warunkujących zawiązywanie nasion, ich jakość oraz plon w wybranych gatunkach traw wieloletnich

The examination of traits affecting seed formation as well as seed quality and yield in selected perennial grass species.

TRUSKAWKA

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Agnieszka Masny, Bogusława Idczak, Krystyna Strączyńska, Małgorzata Korbin 467

Badania nad saturacją mapy genetycznej ‘Elsanta’ x ‘Senga Sengana’ pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria* × *ananassa*)

Research on saturation of the genetic map of ‘Elsanta Senga’ × ‘Sengana’ for locating genes linked to important traits of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*)

Agnieszka Masny, Monika Mieszczakowska-Frać, Anita Kuras, Edward Żurawicz 471

Badania nad możliwością zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w owocach truskawki na drodze hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*

Studies on possibilities of increasing of bioactive compounds in strawberry fruits through intra- and interspecific hybridization within *Fragaria* genus

BORÓWKA WYSOKA

Stanisław Pluta, Łukasz Seliga, Anita Kuras, Danuta Kucharska, Małgorzata Podwyszyńska 475

Ocena potencjału genetycznego wybranych genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w oparciu o czynnikowy układ krzyżowań

Evaluation of the genetic potential of selected genotypes of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) based on a factorial crossing design

MALINA

Agnieszka Masny, Danuta Kucharska, Mirosława Cieślińska, Anita Kuras, Edward Żurawicz 479

Badania nad możliwością poszerzenia zmienności genetycznej maliny właściwej (*Rubus idaeus*) pod względem pory dojrzewania i jakości owoców

The research on the possibility of extending the genetic variability of red raspberry (*Rubus idaeus*) in terms of different ripening time and fruit quality

AGREST

- Danuta Kucharska, Danuta Wójcik, Aleksandra Trzewik, Małgorzata Kunka, Teresa Orlikowska, Stanisław Pluta 483

Analiza czynników warunkujących organogenezę agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro* i *in vivo* oraz ocena genetyczna i fenotypowa otrzymanego materiału

The analysis of factors determining *in vitro* and *in vivo* organogenesis of gooseberry (*Ribes grossularia* L.), genetic and phenotypic assessment of obtained material

JABŁOŃ

- Małgorzata Podwyszyńska, Monika Markiewicz, Krzysztof Klamkowski, Agata Broniarek-Niemiec, Mirosława Cieślińska, Agnieszka Marasek-Ciołakowska, Iwona Sowik, Joanna Puławska, Bożena Matysiak, Dorota Kruczyńska 487

Indukowanie zmienności genetycznej jabłoni na drodze poliploidyzacji *in vitro* oraz ocena fenotypowa i genetyczna uzyskanych poliploidów w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych

Induction of genetic variability of apple via polyploidization *in vitro* and phenotypic and genetic assessment of polyploids obtained in relation to their diploid counterparts

- Mariusz Lewandowski, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz 491

Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juvenilnego i poprawy jakości owoców

Genetic and molecular analysis of selected apple genotypes (*Malus domestica*) for shortening of the juvenile period and quality improvement of the fruits

- Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Mariusz Lewandowski 495

Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z tolerancją wegetatywnych podkładek jabłoni na niskie temperatury poprzez analizę transkryptomu i ocenę stopnia polimorfizmu genów kandydujących

Identification of the genome regions correlated with cold hardiness of apple rootstocks by transcriptomic analysis of differentially expressed candidate genes

PRUNUS

- Marek Szymajda, Anita Kuras 499

Hybrydyzacja oddalona gatunków *Prunus cerasifera* (ałyca), *Prunus armeniaca* (morela), *Prunus salicina* (śliwa japońska), *Prunus domestica* (śliwa domowa) w celu zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus*

Distant hybridization of the *Prunus cerasifera* (myrobalan plum), *Prunus armeniaca* (apricot), *Prunus salicina* (Japanese plum), *Prunus domestica* (European plum) species for extending genetic biodiversity within the genus *Prunus*

PORZECZKA

Anita Kuras, Bogumiła Badek, Stanisław Pluta, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, 503
Renata Góralska, Krystyna Strączyńska

Charakterystyka markerów molekularnych, sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)

Characteristics of molecular markers linked with the resistance to gall mite (*Cecidophyopsis ribis*)

Radzików, dnia 02.09.2021 r.

SPROSTOWANIE

Redakcja czasopisma „Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin”, na wniosek złożony na podstawie art. 31a ustawy — Prawo prasowe (Dz. U. 2018 r. poz. 1914) przez Hodowlę Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupę IHAR, niniejszym zamieszcza sprostowanie dotyczące afiliacji dwóch współautorów w artykule pt. „Poszukiwanie markerów molekularnych genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS *Tt*” nr 295 / 2021: s. 103-106 opublikowanym w „Biuletynie Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin.

Nieprawdziwa jest informacja podana w „Biuletynie Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin”, że Henryk Woś i Janina Woś są pracownikami Hodowli Roślin Strzelce Sp. Z. o. o. Grupa IHAR.

Redakcja