

MARIA SURMA
TADEUSZ ADAMSKI
ANETTA KUCZYŃSKA
KAROLINA KRYSZKOWIAK
RENATA TRZECIAK
KRZYSZTOF MIKOŁAJCZAK
PIOTR OGRODOWICZ

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Zmodyfikowana technika pojedynczego ziarna w hodowli jęczmienia ozimego*

Modified single seed descent technique in winter barley breeding

Technika pojedynczego ziarna (ang. single seed descent, SSD) jest coraz częściej stosowana do uzyskiwania form homozygotycznych w hodowli zbóż. Stanowi ona modyfikację klasycznego ramszu i polega na losowym wyborze w każdym pokoleniu, począwszy od F₂, po 1 ziarnie z rośliny. W pokoleniu F₅ lub dalszym zbiera się wszystkie nasiona z rośliny; potomstwo pojedynczej rośliny stanowi linię SSD. Praca przedstawia modyfikację techniki SSD polegającą na połączeniu jej z kulturą *in vitro* niedojrzałych zarodków. Pozwala to wyeliminować okres spoczynku nasion i tym samym przyspieszyć cykl hodowlany. Wykazano, że stosując zaproponowaną technikę można w ciągu pierwszych trzech lat przyspieszyć cykl hodowli jęczmienia ozimego o 2–3 lata.

Słowa kluczowe: jęczmień ozimy, jarowizacja, kultura *in vitro*, niedojrzałe zarodki, linie SSD

Single seed descent technique (SSD) is frequently used in cereal breeding to obtain homozygous lines. It is a modified method of classical ramsh (bulk) and it is based on random choice of one seed from each individual plant in each generation (number of individuals is dependent on assumed number of lines to obtain), starting from F₂ hybrids. In F₅ or later generation all seeds from each plant are harvested and progeny of a single plant is treated as a SSD line. In the present paper a modification of this technique is presented, which combines the procedure with *in vitro* culture of immature embryos. The modified SSD technique allows elimination of seed dormancy and acceleration of the breeding process. It was shown that the use of proposed technique in early stages of winter barley breeding permits to accelerate breeding cycle by 2-3 years.

Key words: immature embryos, *in vitro* culture, winter barley, SSD lines, vernalization

* Praca finansowana przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi, Zadanie MR38 „Optymalizacja procesu homozygotyzacji jęczmienia w aspekcie skracania cyklu hodowlanego”

WSTĘP

W hodowli jęczmienia, podobnie jak i innych gatunków roślin uprawnych, istotną kwestią jest skrócenie okresu czasu potrzebnego do uzyskania nowych odmian. U roślin samopylnych związane jest to głównie z czasem potrzebnym do otrzymania z heterozygotycznych mieszańców form o wysokim stopniu homozygotyczności. Uzyskiwanie linii homozygotycznych lub prawie homozygotycznych może odbywać się dwiema drogami: pośrednią poprzez samozapylenie roślin w kolejnych pokoleniach bądź bezpośrednio poprzez haploidyzację mieszańców wczesnych pokoleń (F_1 lub F_2). W przypadku jęczmienia rośliny haploidalne można uzyskać wykorzystując zjawisko eliminacji chromosomów zachodzące w wyniku krzyżowania *Hordeum vulgare* z *H. bulbosum* bądź też metodą androgenezy (Adamski i in., 1983; Pickering, Devaux, 1992). Rośliny haploidalne uzyskane z mieszańców odpowiadają losowej próbie gamet wytwarzanych przez heterozygoty, a podwajając liczbę chromosomów u haploidów uzyskuje się formy homozygotyczne o utrwalonej segregacji i rekombinacji na poziomie gametycznym. Mogą być one wykorzystane do badań genetycznych bądź też w hodowli nowych odmian (Snape, 1976; Gardner, 1977; Choo i Reinbergs, 1982; Kaczmarek i in., 1994).

Jedną z dróg pośrednich jest metoda pojedynczego nasiona (ang. single seed descent, SSD). Stanowi ona modyfikację klasycznego ramszu i polega na wyborze w każdym pokoleniu, począwszy od roślin pokolenia F_2 , po 1 nasieniu (ziarnie w przypadku zbóż) z rośliny (liczba roślin F_2 uzależniona jest od założonej liczby linii, jaką chcemy uzyskać). Z roślin pokolenia F_5 lub dalszego zbiera się wszystkie nasiona. Potomstwo pojedynczej rośliny stanowi linię SSD (Golden, 1939). Zarówno system DH jak i SSD pozwalają uzyskać linie homozygotyczne w stosunkowo krótkim czasie, przy czym linie DH są homozygotyczne we wszystkich *loci*, natomiast SSD mogą zawierać tzw. resztkową heterozygotyczność, która w przypadku linii SSD- F_5 wynosi 6,25%, a SSD- F_6 już tylko 3,12%. Mimo to technika SSD ma przewagę nad DH wynikającą z możliwości uzyskania linii z każdego heterozygotycznego genotypu, podczas gdy w przypadku androgenezy mogą wystąpić formy odporne, z których otrzymanie form haploidalnych jest trudne. Przewaga techniki SSD związana jest również z większym prawdopodobieństwem wystąpienia korzystnych rekombinantów wynikającym z faktu „wykorzystania” w procesie ich otrzymywania kilku rund crossing-over, podczas gdy w przypadku linii DH uzyskiwanych z mieszańców F_1 czy F_2 — jedynie 1–2 rund. Ma to istotne znaczenie, ponieważ w miarę upływu pokoleń wzrasta prawdopodobieństwo przerwania sprzężeń genów, a tym samym powstania nowego kompleksu cech. Zaletą techniki SSD jest także zachowanie wystarczającego zakresu zmienności genetycznej potomstwa przy maksymalnej oszczędności pracy i kosztów (Courtois, 1993; Surma i in., 2003, 2006).

Zastosowanie techniki SSD w jej klasycznej formule pozwala zaoszczędzić miejsce i ograniczyć pracochłonność w procesie hodowli nowych odmian, nie skraca natomiast czasu potrzebnego dla otrzymania form ustalonych. Poniżej przedstawiamy propozycję modyfikacji tej techniki dla jęczmienia ozimego, która może być zastosowana także do innych gatunków zbóż ozimych.

MATERIAŁ I METODY

W celu skrócenia czasu potrzebnego do uzyskania kolejnego pokolenia przeprowadzono doświadczenie mające na celu zbadanie możliwości wyeliminowania okresu spoczynku ziarniaków poprzez hodowlę *in vitro* niedojrzałych zarodków. Aby ustalić optymalny termin izolacji zarodków pobierano je z ziarniaków odmian Nickela, Reni, Lomerit i Merlot w stadium dojrzałości wodnej, późno-mlecznej oraz woskowej twardej, co odpowiada kodom 71, 77 i 87 w skali BBCH (skala przyjęta w krajach UE do określania faz wzrostu i rozwoju roślin — skrót od Biologische Bundesanstalt, Bundessortenamt and Chemical Industry), w każdym terminie po 100 zarodków z odmiany.

Technikę SSD w połączeniu z kulturą *in vitro* niedojrzałych zarodków stosowano począwszy od: (1) ziarniaków uzyskanych bezpośrednio ze skrzyżowania (doświadczenie I); (2) ziarniaków pobranych z roślin pokolenia F₁ (doświadczenie II); (3) ziarniaków pobranych z roślin F₂ (doświadczenie III), przy czym we wszystkich trzech przypadkach w pierwszym etapie badań ziarniaki pochodziły z roślin rosnących w warunkach polowych. Każde następne pokolenie uzyskiwano w warunkach szklarniowych stosując hodowlę *in vitro* niedojrzałych zarodków izolowanych z ziarniaków w odpowiednim stadium rozwoju. W doświadczeniu I i II materiał do badań stanowiły mieszańce Nickela × Reni i Tiffany × Bombay, Lomerit × Merlot, Franziska × Merlot, natomiast w doświadczeniu III — Pascaline × Carola, Orchidee × Bażant, Merle × Orchidee i Merele × Amarena.

Stosowano pożywkę B5 Gamborga (Gamborg i in., 1968). Hodowlę *in vitro* prowadzono w pudełkach o wymiarach 77 × 77 × 97 mm firmy Sigma (Magenta Vessel GA-7), w które wykładano po 50 zarodków. Obserwowano liczbę zarodków rozwijających się oraz długość pędu po 4, 8 i 12 dniach kultury.

Jarowizację roślin w kulturze *in vitro* rozpoczynano po 2–5 dniach od wyłożenia zarodków na pożywkę i prowadzono ją w temperaturze 4°C przez 8 tygodni. Po tym okresie rośliny wysadzano do doniczek o średnicy 20 cm lub skrzynek o wymiarach 60 × 40 × 30 cm w rozstawie 5 × 3 cm w szklarni, gdzie rosły do czasu osiągnięcia stadium rozwojowego odpowiedniego do pobrania ziarniaków do dalszej hodowli.

WYNIKI I DYSKUSJA

W kulturze *in vitro* hodowano niedojrzałe zarodki pobrane z ziarniaków w trzech różnych stadiach rozwojowych. Stwierdzono, że optymalnym stadium rozwoju ziarniaków, z których izolowano zarodki, było końcowe stadium dojrzałości mlecznej. W omawianym doświadczeniu był to okres 16–24 dni po zapyleniu w zależności od genotypu. W tabeli 1 podano rezultaty kultury *in vitro* zarodków 4 odmian izolowanych z ziarniaków będących w różnych stadiach dojrzałości. Tempo wzrostu zarodków badanych odmian było podobne. Rozwój w kulturze *in vitro* zarodków młodych, pobranych z ziarniaków w stadium dojrzałości wodnej był znacznie wolniejszy niż zarodków pochodzących ze starszych ziarniaków, tak więc w efekcie wcześniejsze wykładanie zarodków nie skracało czasu potrzebnego do uzyskania roślin. W przypadku zbyt młodych ziarniaków nie wszystkie wyizolowane zarodki rozwijały się w warunkach *in vitro*.

Tabela 1

Rozwój roślin jęczmienia ozimego w kulturze *in vitro* z zarodków pobranych z ziarniaków w trzech stadiach dojrzałości: wodnej, późno-mlecznej i woskowej twardej

Development of winter barley plants in *in vitro* culture of embryos dissected from grains of watery ripeness, late milk and hard dough stages

Odmiana Variety	Liczba dni od rozpoczęcia kultury <i>in vitro</i> No. of days from beginning of <i>in vitro</i> culture	Dojrzałość wodna Watery ripeness stage (BBCH – 71)		Dojrzałość późno-mleczna Late milk stage (BBCH – 77)		Dojrzałość woskowa twarda Hard dough stage (BBCH - 87)	
		zarodki rozwijające się developing embryos (%)	długość pędu shoot length (cm)	zarodki rozwijające się developing embryos (%)	długość pędu shoot length (cm)	zarodki rozwijające się developing embryos (%)	długość pędu shoot length (cm)
Nickela	4	60	0,1	95	1,0	80	0,5
	8	75	0,2	99	5,5	85	4,0
	12	85	0,5	100	9,0	90	7,5
Reni	4	62	0,1	90	2,1	87	1,2
	8	68	0,2	94	6,9	90	3,9
	12	73	0,4	97	8,9	92	6,4
Lomerit	4	55	0,2	85	1,5	87	0,8
	8	59	0,3	88	4,8	92	3,2
	12	68	0,4	93	6,5	93	7,4
Merlot	4	63	0,1	79	2,3	80	3,1
	8	76	0,4	86	4,6	83	4,3
	12	87	0,9	95	7,9	88	6,9
Średnia Mean	4	60,0	0,17	87,2	2,3	83,5	1,4
	8	69,5	0,27	91,7	5,4	90,0	3,8
	12	78,2	0,55	96,2	8,1	90,7	7,0

Jak wspomniano wyżej, metodę pojedynczego ziarna stosuje się począwszy od pokolenia F₂, jednakże aby skrócić cykl hodowlany kulturę *in vitro* niedojrzałych zarodków można zastosować wcześniej. W prezentowanych badaniach zarodki izolowano z ziarniaków uzyskanych bezpośrednio po skrzyżowaniu oraz — dla porównania — z roślin F₁ i F₂ rosnących w polu. Dalsze pokolenia — do F₅ lub F₆ — otrzymywano w warunkach szklarniowych.

W doświadczeniu I stosując kulturę *in vitro* niedojrzałych zarodków wyizolowanych z ziarniaków uzyskanych bezpośrednio w wyniku skrzyżowania roślin w 2008 r., w następnym roku otrzymano już rośliny pokolenia F₃ i F₄, a jesienią 2010 r., to jest po upływie 2,5 roku od przeprowadzenia krzyżowań, dojrzałe rośliny pokolenia F₅. W doświadczeniu II, w którym kulturę *in vitro* zaczęto stosować w 2008 r. począwszy od zarodków wyizolowanych z ziarniaków pochodzących z roślin pokolenia F₁ (krzyżowanie odmian przeprowadzono w 2007 r.), w 2009 r. uzyskano rośliny pokolenia F₅, a w 2010 r. jesienią dojrzałe ziarna z roślin pokolenia F₆, a więc po upływie 3,5 roku od przeprowadzenia krzyżowań. W doświadczeniu III pobierając w 2009 r. zarodki z ziarniaków z roślin pokolenia F₂ w 2010 r. uzyskano rośliny F₅, z których jesienią (październik — listopad) 2010 r. zebrano dojrzałe ziarno. W tym wypadku przyspieszono cykl hodowlany o 2 lata (tab. 2).

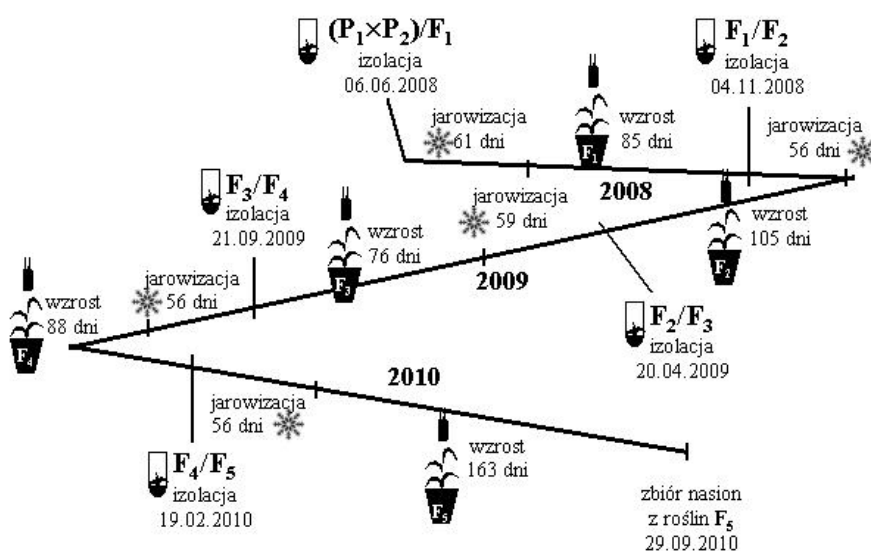
Efektywność techniki SSD w połączeniu z kulturą *in vitro* niedojrzałych zarodków u jęczmienia ozimego
Effectiveness of SSD technique in combination with *in vitro* culture of immature embryos in winter barley

Kombinacja krzyżówkowa Cross combination	Krzyżowanie (rok) Crossing (year)	Rozpoczęcie kultury <i>in vitro</i> Start of vitro culture	Zbiór nasion linii SSD (pokolenie — rok) Kernel harvest of SSD lines (generation — year)	Pokolenie uzyskane metodą rodowodową w 2010 roku Generation obtained by pedigree method in 2010	Liczba „zaoszczędzonych” lat Number of „saved” years
Doświadczenie I — Experiment I					
Nickela × Reni	2008	6.06.2008	F ₅ — 29.09.2010	F ₂	3
Tiffany × Bombay		(ziarniaki	F ₅ — 21.09.2010	F ₂	3
Franziska × Merlot		bezpośrednio po skrzyżowaniu	F ₅ — 23.11.2010	F ₂	3
Lomerit × Merlot		grains directly after crossing)	F ₅ — 27.09.2010	F ₂	3
Doświadczenie II — Experiment II					
Nickela × Reni	2007	28.05.2008	F ₆ — 30.08.2010	F ₃	3
Tiffany × Bombay		(ziarniaki z roślin F ₁	F ₆ — 20.09.2010	F ₃	3
Franziska × Merlot		grains from F ₁ plants)	F ₆ — 25.11.2010	F ₃	3
Lomerit × Merlot			F ₆ — 30.08.2010	F ₃	3
Doświadczenie III — Experiment III					
Pascaline × Carola	2007	6.06.2009	F ₅ — 25.11.2010	F ₃	2
Orchidee × Bażant		(ziarniaki z roślin F ₂	F ₅ — 18.10.2010	F ₃	2
Merle × Orchidee		grains from F ₂	F ₅ — 28.11.2010.	F ₃	2
Merle × Amarena		plants)	F ₅ — 28.11.2010	F ₃	2

Na rysunku 1. przedstawiono przebieg trzyletniego cyklu prac związanych z uzyskaniem linii SSD, w którym zastosowano kulturę *in vitro* zarodków izolowanych z ziarniaków uzyskanych bezpośrednio ze skrzyżowania.

Przeprowadzone badania wykazały, że zastosowanie zmodyfikowanej metody SSD już od początku cyklu hodowlanego, to znaczy od momentu uzyskania ziarniaków w wyniku przeprowadzonych krzyżowań, bądź też od roślin pokolenia F₁ można w ciągu trzech pierwszych lat przyspieszyć cykl hodowlany o 3 lata. Warunkiem zastosowania tej metody w praktyce jest posiadanie odpowiedniego wyposażenia, a więc ogrzewanej szklarni, chłodni do jarowizacji roślin oraz laboratorium do prowadzenia kultur *in vitro*. Ważne jest także, aby końcowy zbiór ziaren z roślin pokolenia F₅ lub F₆ odbył się w czasie umożliwiającym ich wysiew jesienią do gruntu. W prezentowanych badaniach materiał początkowy do kultury *in vitro* zarodków pochodził z roślin uprawianych w warunkach polowych, a zakończenie cyklu i końcowy zbiór dojrzałych ziaren miał miejsce jesienią w okresie od września do listopada, w zależności od roku i genotypu jęczmienia. Taki termin zbioru nie zawsze dawałby możliwość wysiewu ziarniaków do gruntu jeszcze tego samego roku. Porównując zastosowane trzy podejścia należy stwierdzić, że najkorzystniejsze byłoby rozpoczęcie stosowania kultury *in vitro* zarodków z nasion otrzymanych bezpośrednio ze skrzyżowania. Aby uzyskać dojrzałe nasiona z roślin F₅ w okresie letnim

lub wczesnojesiennym, należałoby krzyżowanie przeprowadzać w wiosną warunkach szklarniowych, co pozwoliłoby na wcześniejsze zakończenie cyklu.



izolacja — isolation, jarowizacja — vernalization, wzrost — growth, zbiór nasion — harvest

Rys. 1. Schemat obrazujący otrzymywanie linii SSD jęczmienia ozimego z mieszańców Nickela (P_1) × Reni (P_2) techniką SSD w połączeniu z kulturą zarodków *in vitro*
Fig. 1. Scheme of development of winter barley lines from Nickela (P_1) × Reni (P_2) hybrids by means of SSD technique in combination with embryo *in vitro* culture

W przedstawionych badaniach jarowizację roślin przeprowadzano w kulturze *in vitro* po upływie 2-5 dni od momentu wyłożenia zarodków na pożywkę. Dzięki takiemu rozwiązaniu można zaoszczędzić zarówno miejsce jak i czas. Dla uzyskania 100 linii z jednej kombinacji krzyżówkowej, kulturę *in vitro* zarodków prowadzono w 2 pudełkach (2 x 50 zarodków), a rośliny w szklarni w jednej skrzynce (100 roślin). Należy jednak zwrócić uwagę, żeby rośliny ostatniego pokolenia SSD rosły w większej rozstawie, najlepiej w doniczkach, aby dobrze się rozkrzewiły i wydały jak najwięcej nasion.

Czynnikiem przyspieszającym uzyskiwanie kolejnych pokoleń — oprócz wyeliminowania okresu spoczynku — są także warunki wzrostu i rozwoju roślin w szklarni, które powinny być ustalone na minimalnym poziomie agrotechnicznym, to jest tak, aby rośliny wchodziły jak najwcześniej w fazę rozwoju generatywnego. Cykl mógłby być również znacznie skrócony, gdyby można było wyeliminować lub ograniczyć okres jarowizacji. U jęczmienia wynosi on od 4-8 tygodni w zależności od genotypu. Ponieważ hodowcy nie mają informacji *a priori* o wymaganiach jarowizacyjnych poszczególnych komponentów do krzyżowań, w naszych badaniach zastosowano najdłuższy, 8-tygodniowy okres gwarantujący skuteczność jarowizacji wszystkich genotypów. Podjęto próby skróceniem okresu jarowizacji poprzez zastosowanie zearalenonu, który został

zidentyfikowany po raz pierwszy przez Menga i in. (1986, 1992) jako substancja istotna dla kontroli procesu rozwoju generatywnego. W Polsce badania prowadzone przez Biesagę-Kościelniak i in. (1997, 2009) na pszenicy potwierdziły rolę tego związku w przyspieszaniu rozwoju generatywnego pszenicy ozimej. W naszych badaniach (dane niepublikowane) użycie w kulturach *in vitro* niedojrzałych zarodków jęczmienia ozimego zearalenonu w ilości 1 mg na 1 l pożywki nie spowodowało skrócenia okresu jarowizacji.

WNIOSKI

1. Optymalnym terminem izolacji niedojrzałych zarodków jęczmienia ozimego jest okres dojrzałości późno-mlecznej. Wcześniejszy termin powoduje wolniejszy rozwój zarodków w kulturze *in vitro* i w konsekwencji nie uzyskuje się spodziewanego przyspieszenia cyklu hodowlanego.
2. Najbardziej efektywne jest zastosowanie techniki SSD w połączeniu z kulturą *in vitro* niedojrzałych zarodków począwszy od ziarniaków uzyskanych bezpośrednio po skrzyżowaniu roślin bądź pobranych z roślin pokolenia F₁, gdyż wówczas można uzyskać w okresie pierwszych 3 lat przyspieszenie cyklu hodowlanego o 3 lata.

LITERATURA

- Adamski T., Jeżowski S., Kurhańska G., Surma M. 1983. Zastosowanie metody bulbosowej w hodowli jęczmienia. I. Otrzymywanie form haploidalnych i linii autodiploidalnych. *Hodowla Roślin* 4: 1 — 5.
- Biesaga-Kościelniak J., Dubert F., Marcińska I. 1997. Wpływ ekstraktów tkankowych na rozwój generatywny pszenicy ozimej — współdziałanie ekstraktów z egzogennym zearalenonem. W: F. Dubert i A. Skoczowski (red.), „Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin”, Kraków: 39 — 49.
- Biesaga-Kościelniak J., Dziurka M. 2009. Endogenne zmiany poziomu zearalenonu w zależności od długości okresu wernalizacji. Jakość środowiska, surowców i żywności, Lublin: 140 — 142.
- Choo T. M., Reinbergs E. 1982. Estimation of the number of genes in doubled haploid populations of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Can. J. Genet. Cytol.* 24: 337 — 341.
- Courtois B. 1993. Comparison of single seed descent and anther culture-derived lines of three single crosses of rice. *Theor. Appl. Genet.* 85: 625 — 631.
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell Res.* 50: 151 — 158.
- Gardner C. O. 1977. Quantitative genetic research in plants: past accomplishments and research needs. In: *Proceedings of the International Conference Quantitative Genetics*. Iowa State Univ. Press, Ames.: 29 — 37.
- Goulden C. H. 1939. Problems in plant selection. In: *Proc. Seventh Genet. Cong.* Cambridge University Press: 132 — 133.
- Kaczmarek Z., Surma M., Adamski T. 1994. Theoretical bases for detection of linkage of genes between two quantitative characters in the presence of nonallelic interaction. *Genet. Pol.* 35: 53 — 62.
- Meng F. J., Que Y. M., Zhang S. Q. 1986. Zearalenone-like substance in winter plants and its relation to vernalization. *Acta Botanica Sinica* 28: 622 — 627.
- Meng F. J., Han Y. Z., Que Y. M., Wang H. 1992. Zearalenone, a key substance controlling plant development. *Advances in Plant Regulation*. Kluwer Acad. Press, Dordrecht: 291 — 297.
- Pickering R. A., Devaux P. 1992. Haploid production: Approaches and use in plant breeding. In: *Barley: Genetics, biochemistry, molecular biology and biotechnology*. CAB International, Wallingford, UK: 519 — 547.
- Snape J. W. 1976. A theoretical comparison of diploidised haploid and single seed descent populations. *Heredity* 36 (2): 275 — 277.

Surma M., Adamski T., Kaczmarek Z., Czajka S. 2003. Zmienność cech ilościowych w populacjach linii DH i SSD jęczmienia. *Biul. IHAR* 226/227: 277 — 283.

Surma M., Adamski T., Kaczmarek Z. 2006. Phenotypic distribution of barley SSD lines and doubled haploids derived from F₁ and F₂ hybrids. *Euphytica* 149: 19 — 25.