

**ELŻBIETA MAŁUSZYŃSKA****JERZY DRZEWIECKI****BOGUSŁAW ŁAPIŃSKI**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie

## Tożsamość nietypowych roślin pszenżyta na podstawie analizy elektroforetycznej i cytogenetycznej ziarniaków \*

### Identity of triticale off-type plants on the basis of electrophoretic and cytogenetic analysis of kernels

W latach 1998–2000, w trzech punktach badawczych prowadzono reprodukcję 2, 3 i 4 generacji superelity pszenżyta ozimego odmian Bogo i Presto. W każdym punkcie badawczym prowadzono obserwacje roślin na 8 poletkach o wielkości 1 m<sup>2</sup>. Wybierano rośliny nietypowe — nie odpowiadające opisowi odmiany według metodyki OWT. Ziarniaki losowo wybranych, płodnych roślin poddano analizie cytogenetycznej i elektroforetycznej. Liczbę chromosomów oznaczono w 53 wykiełkowanych ziarniakach i wykryto jedynie 7 aneuploidów. Elektroforeza prolamin wykazała obecność dodatkowych prążków białka u większości badanych ziarniaków. Aneuploidalność nie stanowiła głównej przyczyny pojawiania się nietypowych roślin pszenżyta. Występowanie takich roślin mogło być spowodowane innymi czynnikami, jak: przekrzyżowania, zanieczyszczenia mechaniczne i błędy agrotechniczne.

**Słowa kluczowe:** aneuploidy, elektroforeza, prolaminy, pszenżyto, roślina nietypowa

The 2<sup>nd</sup>, 3<sup>rd</sup> and 4<sup>th</sup> multiplications of pre-basic seed of winter triticale varieties Bogo and Presto were conducted in three locations during 3 years (1998–2000). In each location plants were observed on 8 field plots of 1 m<sup>2</sup> size. Off-type plants were selected which did not fit description of a variety, according to the DUS requirements. Kernels of the randomly selected plants were subjected to cytogenetic and electrophoretic examinations. Chromosome number was determined in seedling roots of 53 germinated kernels and only 7 aneuploids were detected. The occurrence of additional bands in prolamin electrophoregrams was revealed for most of the examined kernels. It suggests that aneuploidy is not the main cause of occurrence of non-typical triticale plants. It could be attributed rather to other factors like cross-pollination or contamination with other varieties' seed.

**Key words:** aneuploids, electrophoresis, triticale, prolamins, off-type plant

\* Praca wykonana w ramach projektu badawczego nr 5P06B04915 finansowanego przez KBN

## WSTĘP

Odmiana jest wyrównana, gdy rośliny są do siebie w wymaganym stopniu podobne charakterystycznymi dla niej właściwościami, przy uwzględnieniu sposobu rozmnażania odpowiedniego dla tej odmiany (Borys, 1997). Ocena wyrównania polega na obserwacji wszystkich cech objętych metodyką OWT i oznaczeniu liczby roślin nietypowych, tj. różniących się fenotypowo w całej próbie. W analizie OWT przyjmuje się dla pszenżyta, gatunku zasadniczo samopylnego, dopuszczalną liczbę roślin nietypowych dwa razy większą niż dla gatunków w pełni samopylnych.

Niewyrównanie morfologiczne roślin w odmianie jest jednym z głównych problemów w hodowli pszenżyta (Maćkowiak i in., 1993; Wolski, 1993). W ostatnich latach nawet do 47% rodów było z tego powodu odrzuconych w badaniach rejestrowych (Grzesiek, inf. ustna, 2001).

Pszenżyto jest w zasadzie rośliną samopylną, ale w mniejszym lub większym stopniu podlega obcozapyleniu (Pickett, 1988; Tarkowski, 1989). Zapylenie obcym pyłkiem w doświadczeniach polowych może dochodzić do 10%. U odmiany Presto stwierdzono obcozapylenie na poziomie 4% (Sowa, Krysiak, 1994). Wszystkie odmiany pszenżyta wykazują obecność aneuploidów, które powstają w wyniku niestabilności cytogenetycznej tego gatunku (Tarkowski, 1989; Rogalska i in., 1991). Heksaploidalne pszenżyto składa się z trzech genomów i podobnie jak w przypadku heksaploidalnej pszenicy utrata pojedynczego chromosomu jest dobrze tolerowana. Towarzyszący temu efekt fenotypowy ogranicza wyrównanie odmian. Pojawianie się roślin aneuploidalnych i zjawisko spontanicznego przekrzyżowania są głównymi przyczynami zróżnicowania morfologicznego, czyli niewyrównania na plantacjach pszenżyta. Pozostałymi przyczynami mogą być zaburzenia rozwojowe roślin w wyniku stresu środowiskowego, porażenia przez choroby i szkodniki. W niektórych przypadkach mogą nastąpić przekrzyżowania wewnątrzodmianowe, powodujące zwiększenie zmienności w odmianie (Tarkowski, 1989).

Sposobem weryfikacji tożsamości roślin może być badanie obrazu elektroforetycznego białek zapasowych (prolamin) w nasionach. Nasiona z roślin nietypowych o identycznym elektroforegramie uważa się za zgodne z odmianą, lecz powstałe w innych warunkach agroekologicznych.

Celem badań było określenie tożsamości nietypowych roślin pszenżyta za pomocą analizy cytogenetycznej i elektroforetycznej ziarniaków zebranych z tych roślin.

## MATERIAŁ I METODY

W latach 1998–2000 reprodukowano dwie odmiany pszenżyta ozimego (Bogo i Presto) w trzech punktach badawczych (Lublin, Olsztyn i Sandomierz). Analizowano materiał 2, 3 i 4 pokolenia z rozmnożenia superelity w 1996 roku. W każdym punkcie badawczym prowadzono obserwacje roślin na 8 poletkach 1 m<sup>2</sup>. Zgodnie z metodyką badania OWT dla pszenżyta (COBORU, 1996) wyselekcjonowano rośliny nietypowe. Wydzielono rośliny wyróżniające się przynajmniej jedną z cech: wysokością, skręceniem

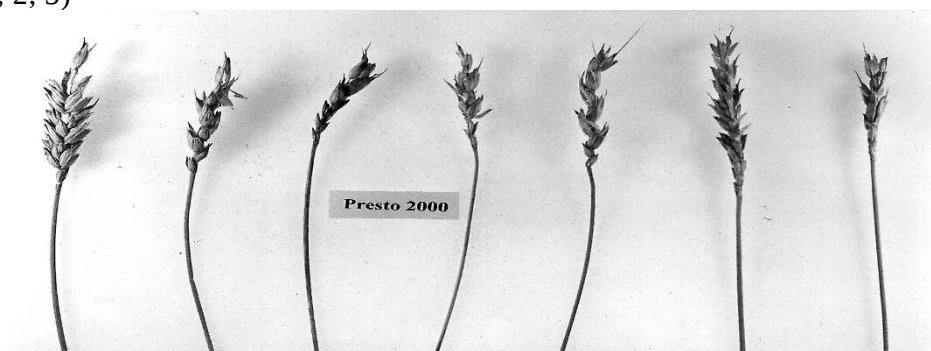
żdźbła, brakiem ości, barwą kłosa lub jego kształtem (kłosa beczułkowate, karpiowate, szczyrbate), sztywnością i omszeniem dokłosa, owłosieniem zewnętrznej strony plewy dolnej i długością pierwszego ząbka plewy dolnej. Spośród nietypowych kłosów wydzielono kłosa płone.

W celu oznaczenia liczby chromosomów u form nietypowych wybrano losowo 10 roślin, które zawiązały przynajmniej 10 nasion, ze zbioru w 1999 roku w Sandomierzu (9 odmiany Bogo i 1 odmiany Presto). Z każdej rośliny pobrano do badań po 10 ziarniaków. Z wysoce sterylnej rośliny nr 4 (odmiana Presto) można było pobrać tylko 5 ziarniaków. Ziarniaki poddano kiełkowaniu w celu pobrania korzeni do badań cytogenetycznych. Preparaty cytogenetyczne wykonano standardową techniką rozgniatań merystemów wierzchołkowych korzeni z usuwaniem szkiełek przykrywkowych po zamrożeniu w ciekłym azocie. Barwienie wykonano metodą Giemsy w modyfikacji Łukaszewskiego i wsp. (1995).

Badania elektroforetyczne wykonano dla całych, pojedynczych ziarniaków form nietypowych obu odmian zebranych w 1999 roku w Sandomierzu i w roku 2000 w Olsztynie. Pobrano 50 ziarniaków z 5 kłosów (po 10 ziarniaków z kłosa). Wzorzec stanowiły nasiona superelity obu odmian przechowywane od 1996 roku. W badaniach elektroforetycznych białka rozdzielano w 7% żelu poliakrylamidowym, w systemie nieciągłej elektroforezy kwaśnej (A-PAGE), według metodyki Brzezińskiego i wsp. (1989). Proces prowadzono przy stałym napięciu 500 V. Żele z prążkami białek utrwalano i barwiono roztworem 0,002% Coomassie Blue R-250 z dodatkiem 5% TCA, odbarwiano 1% roztworem detergentu i suszono w folii celofanowej nasączonej roztworem 10% glikolu etylenu.

#### WYNIKI I DYSKUSJA

W 1998 roku w Sandomierzu, u odmiany Bogo znaleziono 94 rośliny nietypowe, a u Presto 89 roślin. W roku 1999 wytypowano u odmiany Bogo 86 roślin nietypowych, a u Presto 67. W roku 2000 stwierdzono ich więcej, u Bogo 210 roślin i Presto 107 roślin. Przykłady nietypowej budowy kłosa i nietypowego omszenia dokłosa prezentują zdjęcia (rys.1, 2, 3)



Rys. 1. Rośliny pszenżyta odmiany Presto o nietypowych kłosach  
Fig. 1. The plants of triticale cv. Presto with non-typical ears



Rys. 2. Nietypowe rośliny Presto o różnym stopniu omszenia dokłosa

Fig. 2. The stem necks with different level of hairness density of non-typical plants of triticale cv. Presto



Rys. 3. Kłosy nietypowych roślin odmiany Bogo

Fig. 3. The ears of non-typical plants of triticale cv. Bogo

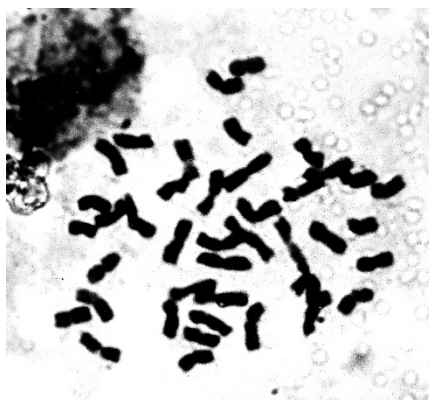
Większość roślin nietypowych miała kłosy pełne, co nie pozwalało na dalsze badania. Niewielkie liczebności roślin nietypowych stwierdzono na poletkach obu odmian w Olsztynie i Lublinie.

#### **Badania cytogenetyczne**

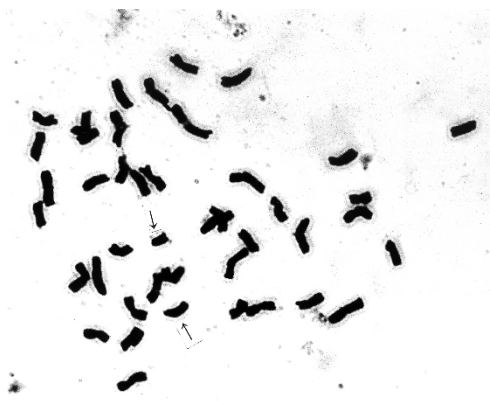
Z 95 ziarniaków wykiełkowało 78. Ze względu na słabą aktywność mitotyczną merystemów korzeni liczbę chromosomów udało się oznaczyć jedynie u 53 roślin. Zestawienie wyników dla poszczególnych potomstw nietypowych roślin zawiera tabela 1. Jedynie potomstwa nr 4 i nr 6 nasuwają podejrzenie, że mogą pochodzić od roślin aneuploidalnych. W przypadku rośliny nr 4 jest to najbardziej prawdopodobne, także

z powodu sterylności, pomarszczenia ziarna i jego słabego kiełkowania. Niestety, spowodowało to ograniczenie materiału badawczego do jednej rośliny. Podobnie dla potomstwa nr 6 udział 2 aneuploidów na 5 roślin nie pozwalał na stwierdzenie istotności odstępstwa od spodziewanej dla potomstw aneuploidów proporcji 1:1 (euploidów do aneuploidów).

Ogółem w zbadanej populacji wykryto tylko 7 aneuploidów, w tym 5 z obniżoną liczbą chromosomów (rys. 4) i 2 z podwyższoną (tab. 1). W dwóch przypadkach aneuploidalność była ograniczona do braku lub nadmiaru jednego ramienia chromosomu, w pozostałych aneuploidach były to całe chromosomy. W dwóch roślinach zaobserwowano poprzeczne pęknięcia centromerowe pojedynczych chromosomów (rys. 5).



Rys. 4. Chromosomy rośliny aneuploidalnej z brakiem jednego chromosomu  
Fig. 4. Chromosomes of aneuploid plant with one chromosome lacking



Rys. 5. Chromosomy rośliny z poprzecznym pęknięciem centromerowym jednego chromosomu  
(fragmenty zaznaczono strzałkami)  
Fig. 5. Chromosomes of a plant with centromeric breakdown of a single chromosome (the resulting fragments marked with arrows)

Nie traktowano ich jako aneuploidy ze względu na niezmienną liczbę ramion chromosomów. Uzyskane wyniki badań cytogenetycznych nie pozwoliły na precyzyjną ocenę wpływu aneuploidalności na wystąpienie form nietypowych. Trudności w uzyskaniu miarodajnych danych do takiej oceny wynikały ze słabego kiełkowania i niskiej aktywności mitotycznej merystemów korzeni zwłaszcza w potomstwach roślin słabych, u których aneuploidalność była najbardziej prawdopodobna. Aneuploidalność nie była najważniejszym z czynników, które spowodowały zróżnicowanie wewnątrzodmianowe. Jeśli nawet przyjmujemy, że potomstwa nr 4 i nr 6 pochodziły z aneuploidów, stanowi to tylko 20% próby badanych form nietypowych. Pozostałe 8 potomstw zawierało jedynie 4 rośliny aneuploidalne, co stanowi 8,5% populacji. Wielkość ta mieści się w zakresie od 7,9 do 9,1%, jak podaje Rogalska i wsp. (1991), dla polskich odmian pszenżyta heksaploidalnego. Jest to także zbliżone z wynikami Guedes-Pinto i wsp. (1984) dla wysoko plonujących form pszenżyta (5,75–11,51%).

W badanym materiale zaobserwowano niewielką skłonność do poprzecznych pęknięć centromerowych w chromosomach żyta. Związek tych pęknięć z morfologią analizowanych roślin jest nieznany i nic nie wskazuje, żeby był istotny. Jednak w potomstwie takich roślin należy się spodziewać form nietypowych z ubytkami połówek chromosomów, jak to wykryto u roślin nr 7 i 10. Zatem pęknięcia centromerowe należy również uznać za potencjalne źródło niewyrównania odmiany.

Szanse na wykrycie aneuploidów metodą elektroforezy prolamin przy tak niewielkiej ich liczbie są niskie, ponieważ dopiero ubytek pary chromosomów homologicznych stwarza możliwość zniknięcia prążka białek.

Tabela 1

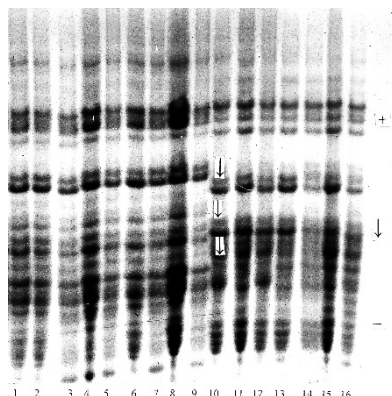
**Stabilność kariotypowa w potomstwach uzyskanych z 10 nietypowych roślin pszenżyta ozimego ze zbioru 1999**

**Stability of karyotype in progeny of 10 off-type winter triticales plants collected in 1999**

| Nr rośliny<br>No. of plant | Liczba połówek ziarniaków<br>Number of kernels |                              |                       | Euploidy<br>Euploids<br>(2n=42) | Aneuploidy<br>Aneuploids |         |                 |                 |         | Pęknięcia chromosomów<br>Centromeric breaks |
|----------------------------|------------------------------------------------|------------------------------|-----------------------|---------------------------------|--------------------------|---------|-----------------|-----------------|---------|---------------------------------------------|
|                            | wysianych<br>sown                              | wykiełkowanych<br>germinated | zbadanych<br>analysed |                                 | (2n=40)                  | (2n=41) | (2n=41+<br>1/2) | (2n=42+<br>1/2) | (2n=43) |                                             |
| 1                          | 10                                             | 6                            | 3                     | 3                               | —                        | —       | —               | —               | —       | —                                           |
| 2                          | 10                                             | 5                            | 3                     | 3                               | —                        | —       | —               | —               | —       | —                                           |
| 3                          | 10                                             | 8                            | 4                     | 4                               | —                        | —       | —               | —               | —       | —                                           |
| 4                          | 5                                              | 2                            | 1                     | —                               | —                        | —       | —               | —               | 1       | —                                           |
| 5                          | 10                                             | 9                            | 9                     | 7                               | 1                        | —       | —               | —               | —       | 1                                           |
| 6                          | 10                                             | 9                            | 5                     | 3                               | 1                        | 1       | —               | —               | —       | —                                           |
| 7                          | 10                                             | 9                            | 8                     | 6                               | —                        | —       | —               | 1               | —       | 1                                           |
| 8                          | 10                                             | 10                           | 8                     | 8                               | —                        | —       | —               | —               | —       | —                                           |
| 9                          | 10                                             | 10                           | 6                     | 6                               | —                        | —       | —               | —               | —       | —                                           |
| 10                         | 10                                             | 10                           | 6                     | 4                               | —                        | 1       | 1               | —               | —       | —                                           |
| Razem<br>Total             | 95                                             | 78                           | 53                    | 44                              | 2                        | 2       | 1               | 1               | 1       | 2                                           |

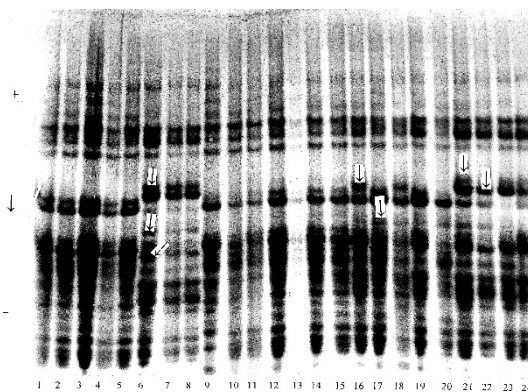
### Badania elektroforetyczne

Wszystkie badane ziarniaki danej formy nietypowej charakteryzowały się identycznym obrazem białek. Elektroforegramy prolamin wyekstrahowanych z pojedynczych, całych ziarniaków form nietypowych cechowały się obecnością dodatkowych prążków (patrz strzałki na rys. 6, 7 i 8). Elektroforegramy prolamin ziarniaków Bogo o omszonym dokłosiu (rys. 6), białek ziarniaków Presto ze szczyrbatym kłosem (rys. 7), a także Presto o jaśniejszej barwie kłosa (rys. 8) wyraźnie różniły się od wzorca. U roślin Presto o nietypowym omszeniu dokłosia obok ziarniaków różniących się obrazem białek znaleziono także identyczne ze wzorcem (rys. 7).



Rys. 6. Elektroforegram prolamin ziarniaków wzorca odmiany Bogo (1–9) i ziarniaków roślin Bogo z nietypowym omszeniem dokłosia (10–16, dodatkowe prążki oznaczono strzałkami)

Fig. 6. The electrophoregram of kernel prolamins of cv. Bogo standard (1–9) and the Bogo plants with non-typical hairiness of stem neck (10–16, the additional bands marked with arrows)

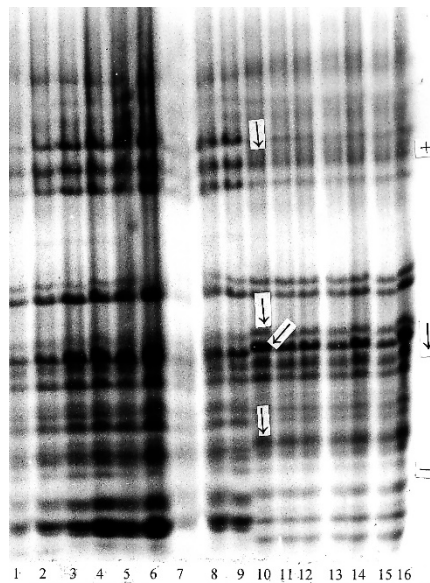


Rys. 7. Elektroforegram prolamin ziarniaków wzorca odmiany Presto (1–5), ziarniaków z roślin Presto o szczyrbatych kłosach (6–9) i ziarniaków z roślin Presto o nietypowym omszeniu dokłosia (ziarniaki 10–15 — identyczne z wzorcem, 16–24 — różne od wzorca, dodatkowe prążki oznaczone strzałkami)

Fig. 7. The electrophoregram of kernel prolamins of cv. Presto standard (1–5), kernels from low fertile plants (6–9) and kernels of plants with non-typical hairiness of stem neck (kernels 10–15 identical with the standard, 16–24 different from the standard, the additional bands marked with arrows)

W pewnych przypadkach wykrycie aneuploidów jest możliwe dzięki analizie elektroforetycznej, gdy utracona została para chromosomów homologicznych kodujących prolaminę i na elektroforegramie brak prążka lub prążków (Pickett, 1988). Zakładając aneuploidalną naturę form nietypowych o zmniejszonej liczbie chromosomów mogliśmy się spodziewać obrazów białek zubożonych o prążki, a jest odwrotnie, elektroforegramy form nietypowych mają więcej prążków.

Zakładano, że badane formy nietypowe nie powstały ze skrzyżowania roślin Presto i Bogo z innymi odmianami pszenżyta, gdyż zachowano 100 m izolacji przestrzennej. Jednak obecność dodatkowych prążków w elektroforegramie sugeruje wpływ obcego zapylenia lub błędy agrotechniczne. Przyczyną mogą być samosiewy pszenżyta, które nawet po kilku latach mogą pojawiać się na polu. Występowanie form nietypowych może być także rezultatem zanieczyszczenia mechanicznego.



Rys. 8. Elektroforegram prolamin ziarniaków wzorca odmiany Presto (1–9) i ziarniaków z roślin Presto o nietypowych, jasnych kłosach (10–16, dodatkowe prążki oznaczone strzałkami)

Fig. 8. The electrophoregram of kernel prolamins of cv. Presto — standard (1–9), and kernels from Presto plants with non-typical white ears (10–16, the additional bands marked with arrows)

Nie zawsze zmienność fenotypowa (na przykładzie nietypowego dla Presto braku omszenia dokłosa) musi przejawiać się w postaci innego obrazu elektroforetycznego prolamin. Stwierdziliśmy, że takie formy nietypowe są identyczne pod względem składu tej frakcji białek z wzorcem.

Liczba roślin nietypowych była największa w ostatnim roku badań, czyli w czwartej generacji pszenżyta. Trudno ocenić, czy był to efekt kolejnej reprodukcji i obcozapylen, czy niekorzystnych warunków pogodowych wiosną 2000 roku i obcozapylen itp. Większość kłosów tych roślin była sterylna.

#### WNIOSKI

1. Aneuploidalność nie stanowiła głównej przyczyny pojawiania się nietypowych roślin pszenżyta ozimego.
2. Pojawianie się form nietypowych mogło być rezultatem wielu czynników: przekrzyżowania, zanieczyszczenia mechanicznego, błędów płodozmianowych itp.
3. Odrębność fenotypowa większości badanych nietypowych roślin miała charakter dziedziczny, co przejawiało się odmiennością obrazu białek w nasionach tych roślin.
4. Zmienność fenotypowa nie zawsze ma związek z różnicami obrazu elektroforetycznego prolamin.

#### LITERATURA

- COBORU. 1996. Metodyka badania odrębności, wyrównania i trwałości (OWT) — pszenżyto (*X Triticosecale* Wittm.) COBORU, Słupia Wielka.
- Borys J. 1997. Zależność wielkości frakcji odmian nie spełniających kryterium wyrównania od parametrów testu statystycznego (dla wybranych gatunków roślin samopylnych). *Wiad. Odmian.* 65: 15 — 24.
- Brzeziński W., van Gelder W.M.J., Mendelewski P., Kolster P. 1989. Polyacrylamide gel electrophoresis of wheat gliadins: the use of a moving boundary for improved resolution. *Euphytica* 40: 207 — 212.
- Guedes-Pinto H., Rangel-Figueiredo T., Carnide O. 1984. Aneuploidy in high yielding 6x-triticales. *Cereal Res. Commun.* 12, 3/4: 229 — 235.
- Łukaszewski A. J., Xitang Xu. 1995. Screening large populations of wheat hybrids by C-banding. *Cereal Res. Commun.* 23: 9 — 13.
- Maćkowiak W., Paizert K., Mazurkiewicz L., Woś H. 1993. Osiągnięcia i problemy hodowli pszenżyta w Polsce. *Biul. IHAR* 187: 143 — 166.
- Pickett. A. A. 1988. Factors affecting seed production of triticales (*X Triticosecale* Wittm.) *Plant Varieties Seeds* 1: 63 — 74.
- Rogalska S., Cybulska-Augustyniak J., Kulawinek A. 1991. Aneuploidy in Polish cultivars of winter triticales. *Genet. Pol.* 32, 1/2: 11 — 16.
- Sowa Wł., Krysiak H. 1994. Ocena odmian pszenżyta pod względem skłonności do obcozapyłania. *Biul. IHAR* 192: 23 — 28.
- Tarkowski Cz. (red.). 1989. *Biologia pszenżyta*. PWN, Warszawa.
- Wolski T. 1993. Pszenżyto ozime hodowli Danko w Europie. *Biul. IHAR* 187: 139 — 142.