

SYLWIA MIKOŁAJCZYK

DOROTA WEIGT

AGNIESZKA TOMKOWIAK

ZBIGNIEW BRODA

JAN BOCIANOWSKI

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii,

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Kierownik Tematu: dr inż. Sylwia Mikołajczyk Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki

i Hodowli Roślin, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań, tel. 61 8487719, e-mail: sylwia.mikolajczyk@up.poznan.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.802.16.2018, Zadanie 86.

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 regeneration of plants in *in vitro* conditions

Słowa kluczowe: androgeniza, kultury pylników, markery ISSR i RAPD, żyto

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. W pracach dotyczących kultur pylników i izolowanych mikrospor podkreślana jest konieczność poszukiwania nowych rozwiązań metodycznych niezbędnych dla przełamania braku zdolności regeneracyjnych u tzw. „opornych genotypów” (Shahinul Islam i Tuteja, 2012). Parametry odpowiedzi w kulturze pylników i izolowanych mikrospor są cechami ilościowymi kontrolowanymi przez geny jądrowe. Dla jęczmienia, owsa, pszenżyta i ryżu opisano markery oraz QTL powiązane z otrzymywaniem podwojonych haploidów (Chen i in., 2007; Kiviharju i in., 2004). Żyto jest gatunkiem, u którego prowadzono badania nad tłem genetycznym i QTL odpowiedzialnymi za odpowiedź w kulturach tkankowych — TCR tissue culture response (Bolibok i in., 2006; Targońska i in., 2013).

Do badań realizowanych w zadaniu nr 86 wykorzystano materiały hodowlane o zróżnicowanym pochodzeniu oraz odmiany populacyjne z polskiej hodowli:

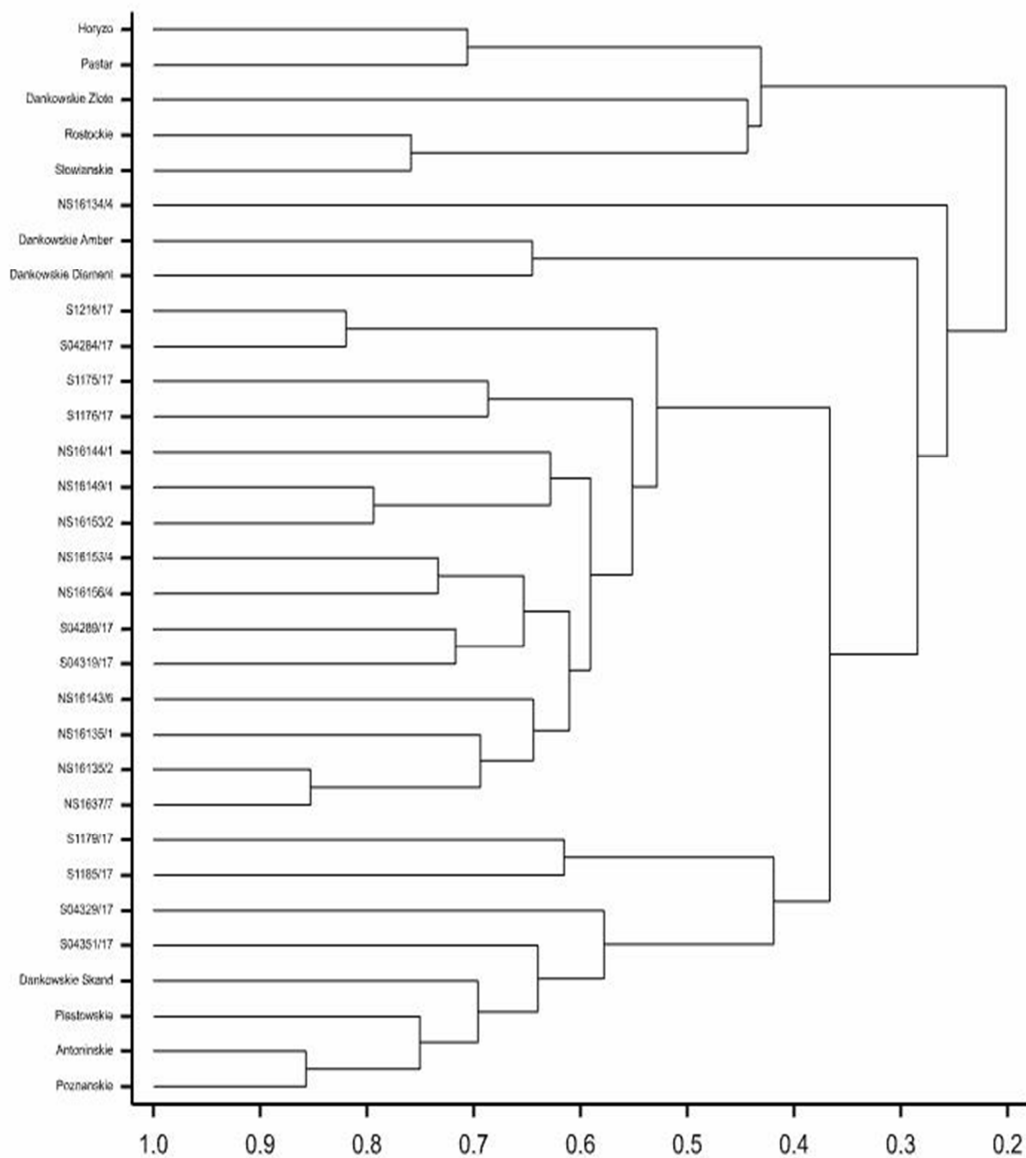
1. materiały hodowlane: NS16134/4, NS16135/1, NS16135/2, NS16137/7, NS16143/6, NS16144/1, NS16149/1, NS16153/2, NS16153/4, NS16156/4, S01175/17, S01176/17, S01179/17, S01185/17, S01216/17, S04284/17, S04298/17, S04319/17, S04329/17, S04351/17,
2. odmiany populacyjne: Antonińskie, Dańkowskie Amber, Dańkowskie Diament, Dańkowskie Skand, Dańkowskie Złote, Horyzo, Pastar, Piastowskie, Poznańskie, Rostockie, Słowiańskie.

TEMAT BADAWCZY 1

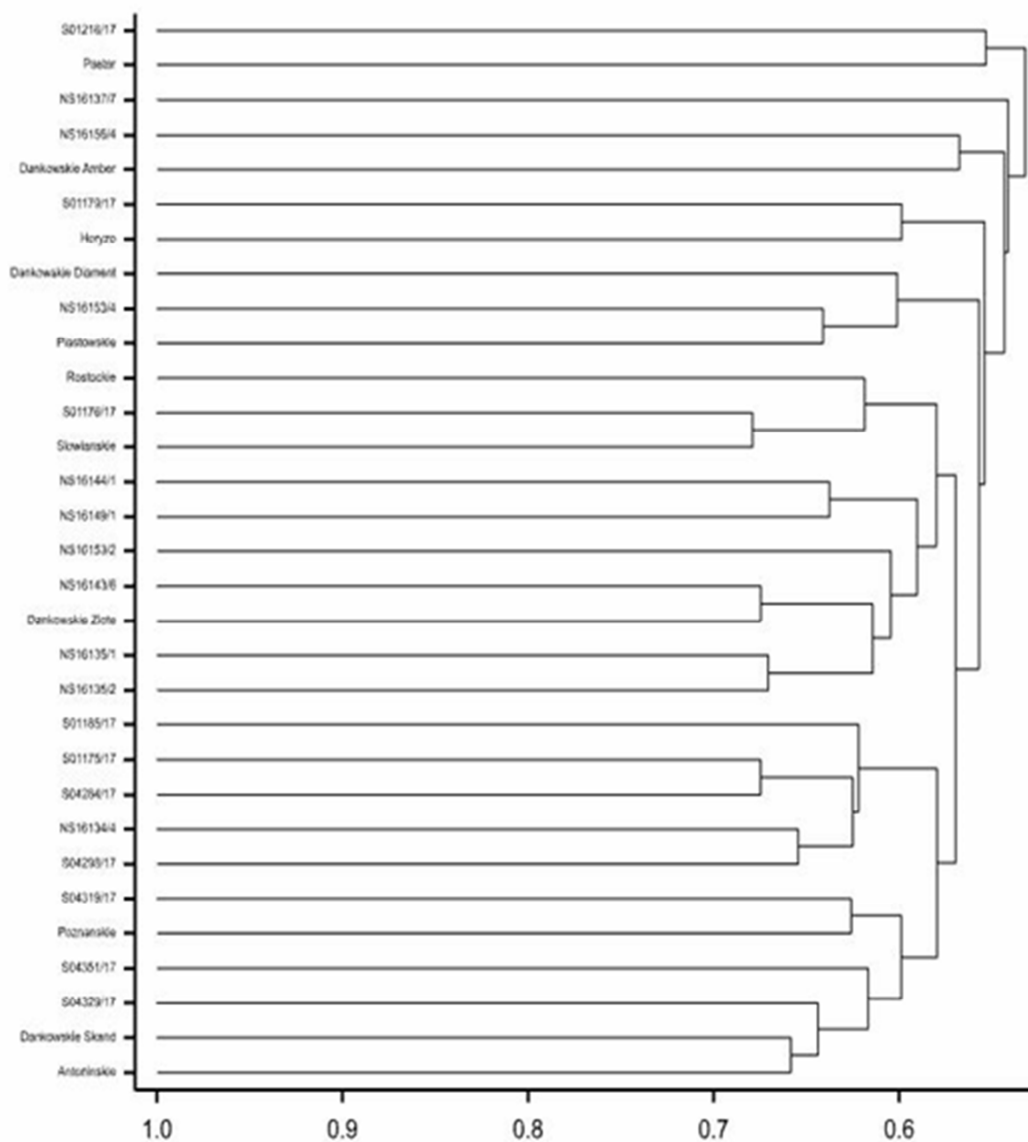
Ocena polimorfizmu DNA i poszukiwanie markerów RAPD i ISSR powiązanych z odpowiedzią żyta w kulturach pylników

Celem tematu badawczego 1 była ocena polimorfizmu DNA za pomocą markerów RAPD i ISSR oraz poszukiwanie markerów DNA powiązanych z efektywnością indukcji androgenezy i regeneracji roślin zielonych w kulturach pylników 31 genotypów żyta dla selekcji genotypów o wysokiej podatności na haploidyzację. Do analizy polimorfizmu DNA techniką RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA) zastosowano 30 starterów 10 nukleotydowych o losowej sekwencji, które wybrano na podstawie literatury i badań własnych. (Bolibok i in., 2007; Broda i in., 2008; Ćwiklińska i in., 2010; Kiviharju i in., 2004). Genomowy DNA został poddany również analizie ISSR (Inter Simple Sequence Repeats) z zastosowaniem 30 starterów reakcji wybranych na podstawie literatury (Bolibok i in., 2007; Hackauf i Wehling, 2002; Saal i Wricke, 1999).

W wyniku przetestowania 60 starterów (30 losowych dla RAPD i 30 o wybranej sekwencji nukleotydów dla ISSR) stwierdzono, że w reakcjach ISSR otrzymywano wyższą liczbę produktów, a wyniki analiz były bardziej powtarzalne. Podobieństwo genetyczne badanych 31 obiektów żyta mieściło się w zakresie od 5,3% pomiędzy odmianą Horyzo a linią NS16153/2 do 85,7% pomiędzy odmianą Antonińskie i Poznańskie. Analiza otrzymanych dendrogramów UPGMA (Unweighted Pair Group Method of Arithmetic Means) wykreślonych na podstawie podobieństwa genetycznego pozwoliła na wyróżnienie 5 głównych grup podobieństw pomiędzy badanymi 31 obiektami żyta (rys. 1 i 2). Otrzymane dendrogramy odzwierciedlały podobieństwo genetyczne badanych form i ich pochodzenie (rys. 1 i 2).



Rys. 1. Dendrogram przedstawiający podobieństwo genetyczne (GS — genetic similarity) pomiędzy badanymi genotypami żyta otrzymanymi na podstawie polimorfizmu DNA z zastosowaniem 30 starterów RAPD



Rys. 2. Dendrogram przedstawiający podobieństwo genetyczne (GS — genetic similarity) pomiędzy badanymi genotypami żyta otrzymanymi na podstawie polimorfizmu DNA z zastosowaniem 30 starterów ISSR

TEMAT BADAWCZY 2

Weryfikacja opracowanej metodyki prowadzenia kultur pylników w aspekcie powtarzalności rezultatów i możliwości aplikacji dla szerokiego spectrum genotypów żyta

Celem tematu badawczego 2 była ocena wpływu traktowania wstępnego kłosów żyta (temperatura 4°C) oraz pożywki C17 i 190-2 na indukcję androgenyzy i regenerację roślin w kulturach pylników żyta. W trakcie realizacji tematu badawczego 2 wyłożono 20 000 pylników z 200 kłosów, w tym 10.000 z linii nonrestorerowych żyta i 10 000 z mieszańców pokolenia S0 wyprowadzonych w ramach usług badawczych, z których otrzymano 87 kalusów mikrosporowych i 3 rośliny zielone. Średnia efektywność androgenyzy na 100 wyłożonych pylników dla 20 badanych genotypów żyta, wynosiła 0,43%, a efektywność regeneracji roślin 0,01%. Kultury pylnikowe zakładano w 2 wariantach traktowania wstępnego kłosów i pylników żyta na 2 pożywkach indukujących androgenezę w kulturach pylników — pożywce C17 zawierającej mieszaninę auksyn 1 mg/ 2,4-D i 1 mg/l dikamby i 190-2 z taką samą kombinacją auksyn. Najwyższą liczbę pylników tworzących struktury androgeniczne zaobserwowano dla genotypu S04351/17 — 32 kalusy mikrosporowe. W kulturach pylników tego genotypu najwyższą indukcję androgenyzy zaobserwowano na pożywce C17 po 14 dniach przechowywania kłosów w temperaturze 4°C. Najwyższą liczbę zregenerowanych roślin zaobserwowano dla genotypu S01175/17 — 2 rośliny po 21 dniach w 4°C na pożywce 190-2. Dla 10 badanych linii nonrestorerowych żyta nie zaobserwowano indukcji androgenyzy i regeneracji roślin na obu pożywkach po traktowaniu założonych kultur pylnikowych temperaturą 4°C przez 21 dni.

Traktowanie ściętych kłosów żyta temperaturą 4°C przez 21 dni było najefektywniejsze dla indukcji androgenyzy w kulturze pylników na pożywce C17 z mieszańców pokolenia S0. Indukcja androgenyzy w kulturach pylników żyta była prawie dwukrotnie wyższa po 21 dniach w 4°C — 46 reagujących pylników niż po 14 dniach w 4°C — 24 reagujące pylniki mieszańców S0 żyta. Po traktowaniu kłosów temperaturą 4°C przez 21 dni zregenerowały 3 rośliny zielone w porównaniu z brakiem regeneracji roślin zielonych po chłodzeniu kłosów mieszańców S0 żyta przez 14 dni w 4°C.

Na podstawie oceny efektywności indukcji androgenyzy i regeneracji roślin w kulturach pylników 20 genotypów żyta stwierdzono, że traktowanie pylników temperaturą 4°C przez 21 dni wpłynęło inhibująco na analizowane parametry androgenyzy dla linii nonrestorerowych żyta, które tworzyły struktury androgeniczne tylko na pożywce C17 po 14 dniach przechowywania kłosów w temperaturze 4°C.

LITERATURA

- Bolibok H., Gruszczyńska A., Hromada-Judycka A., Rakoczy-Trojanowska M. 2007. Identification of QTLs associated with the in vitro response of rye (*Secale cereale* L.). *Cel. Mol. Biol. Lett.* 12 (4): 523 — 35.
- 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*. Biul. IHAR 247: 65 — 71.
- Chen X. W., Cistué L., Munoz-Amatrian M., Sanz M., Romagosa I., Castillo A. M., Valles M. P. 2007. Genetic markers for doubled haploid response in barley. Euphytica 158: 287 — 294.
- Ćwiklińska A., Broda Z., Bocianowski J., Dobrzycka A. 2010. The usefulness of RAPD and AFLP markers for determining genetic similarity in rye (*Secale L.*) species and subspecies. Acta Biol. Cracov. Bot.; 52 (1): 19 — 25.
- Hackauf B., Wehling P. 2002. Identification of microsatellite polymorphism in an expressed portion of the rye genome. Plant Breeding 121: 17 — 25.
- Kiviharju E., Laurila J., Lehtonen M., Tanhuanpää P., Manninen O. 2004. Anther culture properties of oat × wild red oat progenies and a search for RAPD markers associated with anther culture ability. Agricultural and Food Sci. 13: 151 — 162.
- Saal B., Wricke G. 1999. Development of simple sequence repeat markers in rye (*Secale cereale L.*). Genome. 42 (5): 964 — 72.
- Shahinul Islam S. M., Tuteja N. 2012. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species. Plant Science 182: 134 — 144.
- Targońska M., Hromada-Judycka A., Bolibok-Braĝoszewska 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.