

BIULETYN

Nr 286/2019

ISSN 0373-7837

E-ISSN 2657-8913

INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN

BULLETIN
OF PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE

BIULETYN INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN Nr 286/2019



Owies nagoziarnisty. Fot. Bogusław Łapiński

RADZIKÓW 2019
INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

BIULETYN
INSTYTUTU HODOWLI
I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
Nr 286/2019



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

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY

Dyrektor: Prof. dr hab. Henryk Bujak

Komitety Redakcyjne

NAUKA

REDAKTOR NACZELNY: Danuta Boros

Maja Boczkowska, Henryk J. Czembor, Anna Linkiewicz, 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 Stępień, Roman Warzecha, Sławomir Wróbel

KONFERENCJE

REDAKTOR TEMATYCZNY: Magdalena Szechyńska-Hebda

Katarzyna Gacek, Karolina Mitura, Wiesław Podyma

SEKRETARZ REDAKCJI: Gabriela Wodzyńska-Łapińska

REDAKTOR MERYTORYCZNY I PROWADZĄCY NUMERU:

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB: Magdalena Szechyńska-Hebda

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi: Marta Czarnak-Kłós

CZASOPISMO UKAZUJE SIĘ OD 1951 ROKU

Redaktor techniczny i skład komputerowy: Gabriela Wodzyńska-Łapińska

Druk: ATEMI Andrzej Jaczewski

PAWEŁ CZ. CZEMBOR

DARIUSZ MAŃKOWSKI

PIOTR SŁOWACKI

DOMINIKA PIASKOWSKA

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: dr hab. Paweł Cz. Czembor prof. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy

Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin, tel. 22 7334555,

p.czembor@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 4.

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

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

Słowa kluczowe: mapowanie, markery molekularne, odporność, pszenica ozima, *Puccinia triticina*, *Septoria tritici*

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

Jednymi z ważniejszych chorób, mogących powodować znaczne straty plonu ziarna w uprawie pszenicy są rdza brunatna (czynnik sprawczy *Puccinia triticina*) i septorioza paskowana liści (ang. *Septoria Tritici* Blotch, STB) (czynnik sprawczy *Septoria tritici*) (Orton i in., 2011; Kolmer, 2013). Do tej pory zidentyfikowano ponad 70 genów odporności na *P. triticina* (McIntosh i in., 2008) i blisko 20 genów głównych *Stb* (Orton i in., 2011; Tabib Ghaffary i in., 2012). W celu lepszego wykorzystania genów odporności w programach hodowlanych, konieczna jest znajomość ich występowania w obecnie uprawianych odmianach europejskich. Klasyczną metodą, która z dużym prawdopodobieństwem pozwala wnioskować o ich występowaniu w odmianach jest tzw. metoda postulowania genów oparta na ogólnie znanym modelu interakcji gen-na-gen Flor (1956). Obecność rasowo specyficznych genów odporności może być postulowana na podstawie jego wzoru ekspresji fenotypowej w postaci tzw. typu infekcyjnego (ang. Infection Type, IT) przy użyciu zestawu izolatów patogenu.

W tym roku celem zadania było określenie reakcji fenotypowej 200 odmian/linii pszenicy ozimej na zakażenie izolatami *S. tritici* oraz założenie doświadczenia dla określenia reakcji fenotypowej kolejnych 200 odmian/linii pszenicy ozimej na zakażenie izolatami *S. tritici*, co będzie miało miejsce w roku 2019.

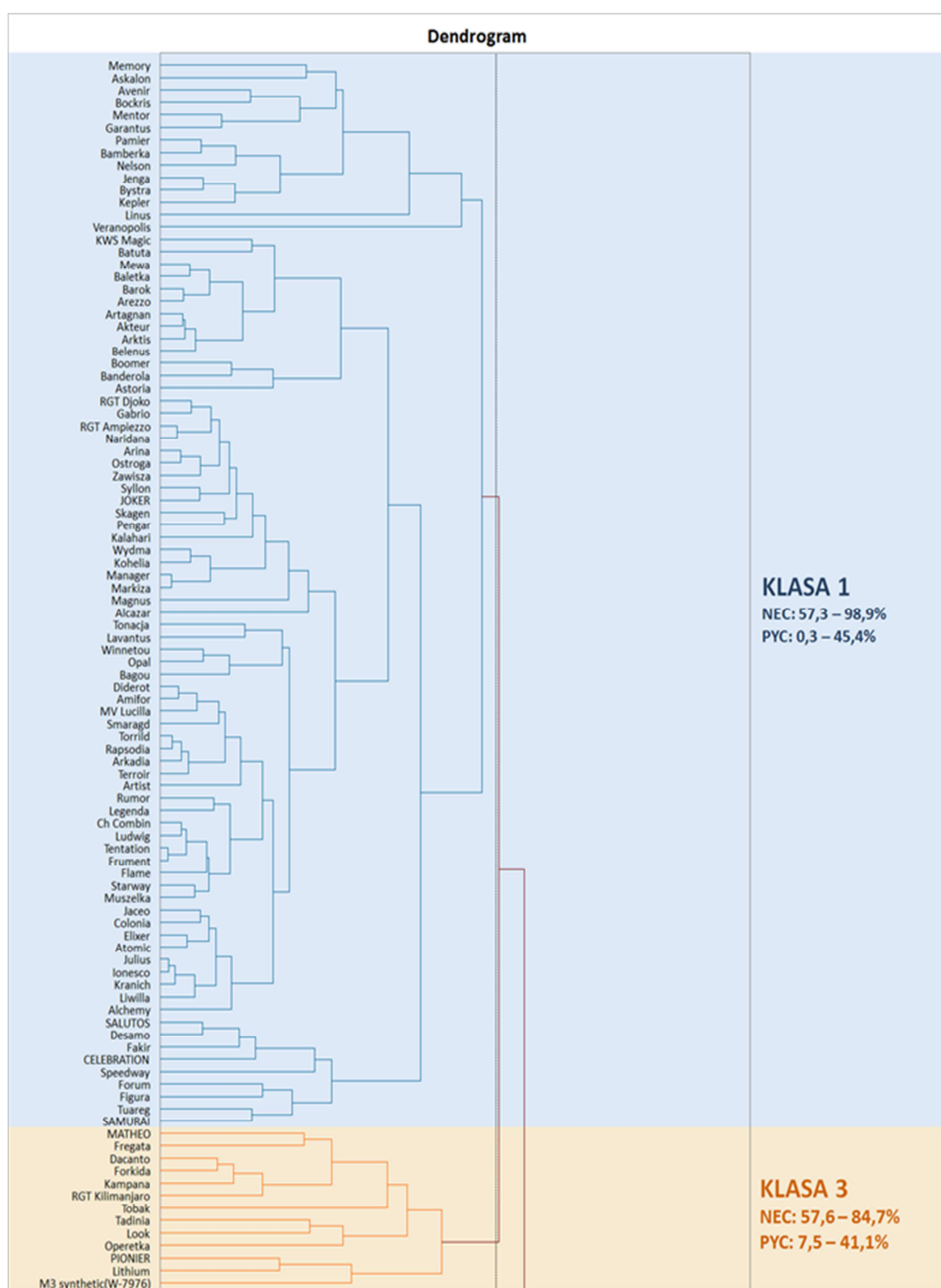
Zadanie realizowano w ramach dwóch tematów badawczych:

1. Ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej w stadium rośliny dorosłej przez izolaty *Septoria tritici* (test St-4);
2. Ocena porażenia odmian/linii pszenicy ozimej w stadium rośliny dorosłej przez izolaty *Septoria tritici* (test St-5), kontynuacja w roku 2019.

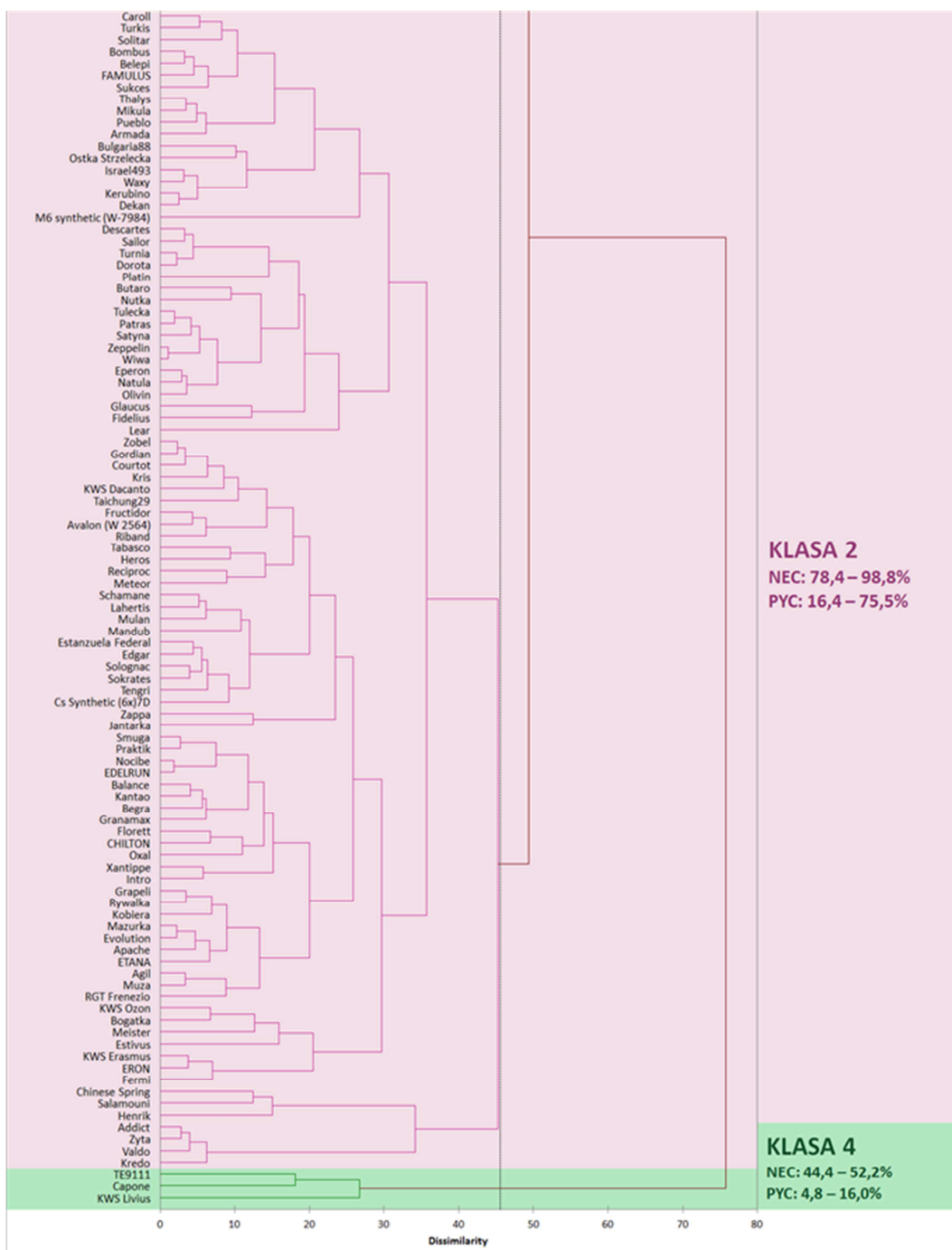
OPIS WYNIKÓW

Do badań wykorzystano 175 odmian/linii pszenicy ozimej zarówno krajowych, jak i zarejestrowanych w innych krajach europejskich, oraz 25 odmian/linii różnicujących, które wysiano w układzie dwóch losowych bloków, w rzędach jednowierszowych. Rośliny z rozwiniętym w pełni liściem flagowym zakażano izolatami *S. tritici* IPO86036. Po około trzech tygodniach przeprowadzono ocenę reakcji fenotypowej każdego obiektu określając dwa parametry chorobowe przy użyciu komputerowej analizy obrazu porażonych liści: procent powierzchni liścia pokryty nekrozą (NEC) oraz piknidiami (PYC) (WinCam 2010, Regent Instruments Inc., Kanada). W celu wyróżnienia odmian charakteryzujących się podobną reakcją fenotypową (NEC i PYC) zastosowano analizę skupień aglomeracyjnego grupowania hierarchicznego (ang. agglomerative hierarchical clustering, AHC – program komputerowy XLSTAT). W wyniku analizy otrzymano 4 klasy obiektów. Najodporniejszą, a zarazem najmniej liczną, okazała się klasa czwarta. Klasę tę stanowiły 3 obiekty: TE9111, Capone i KWS Livius, których procent pokrycia powierzchni liścia (NEC) wynosił odpowiednio 44,4%, 50,4% i 52,2%. W kolejnej pod względem odporności klasie trzeciej zanotowano 13 odmian o zakresie NEC w granicach 57,6–84,7%, natomiast klasa pierwsza zawierała 86 obiektów o zakresie NEC wynoszącym od 57,3 do 98,9%. Najbardziej podatna, ale i najliczniejsza, klasa druga zawierała 98 obiektów charakteryzujących się zakresem NEC w granicach 78,4–98,8%. Wśród nich znalazły się m.in. Famulus, Waxy, Bombus, Avalon (W 2564) i Rywalka. Podział roślin na klasy obrazuje załączony dendrogram (rys. 1).

Pszenica



Pszenica



Rys. 1. Analiza skupień dla procentowej powierzchni liści pokrytej nekrozą i piknidiami liści flagowych odmian/linii pszenicy ozimej po inokulacji izolatem *Septoria tritici* IPO86036

WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

W badaniach prowadzonych w poprzednich latach (Czembor i in., 2011) nad spektrum wirulencji izolatów *S. tritici*, izolat IPO86036 był awirulentny do odmian: Arina (*Stb15+6*), Tadinia (*Stb4+6*) i Liwilla (odporność ilościowa). W tegorocznym doświadczeniu odmiany te nie wykazały jednak tak wysokiej odporności — odmiany Arina i Liwilla zostały przypisane do klasy pierwszej (trzeciej pod względem odporności) m.in. razem z odmianą Veranopolis, w stosunku do której (odnosząc się do wcześniej wspomnianych doświadczeń wykonanych na siewkach) izolat IPO86036 powinien być odpowiednio zdecydowanie bardziej wirulentny.

Do wyników uzyskanych w tegorocznym doświadczeniu należy odnosić się z dużą ostrożnością, ponieważ wysokie temperatury panujące w czasie trwania doświadczenia (średnia temperatura dobową 19,5°C, maksymalna 33,8°C — dane ze stacji meteorologicznej — IHAR Radzików) przyspieszyły znacząco starzenie się roślin, co prawdopodobnie nie pozwoliło na właściwe rozwinięcie się objawów chorobowych.

LITERATURA

- COBORU. 2013. Strona internetowa: http://www.coboru.pl/Polska/Rejestr/gat_w_rej.aspx (wersja 10.01.2013).
- 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.
- Flor H. H. 1956. The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8: 29 — 54.
- Kolmer J. 2013. Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Forests* 4: 7 — 84.
- McIntosh R.A., Yamazaki Y., Dubcovsky J., Rogers J., Morris C., Somers D. J., Appels R., Devos K. M. 2008. Catalogue of Gene Symbols for Wheat. Strona internetowa: <http://wheat.pw.usda.gov/GG2/Triticum/wgc/2008>.
- Orton E.S., Deller S., Brown J. K. 2011. *Mycosphaerella graminicola*: from genomics to disease control. *Molecular Plant Pathology* 12: 413 — 424.
- Tabib Ghaffary S. M., Faris J. D., Friesen T. L., Visser R. G. F, van der Lee T. A. J., Robert O., Kema G. H. J. 2012. New broad-spectrum resistance to septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 125 — 142.

TADEUSZ ADAMSKI
MARIA SURMA
ZYGMUNT KACZMAREK
ANETTA KUCZYŃSKA
KRZYSZTOF MIKOŁAJCZAK
MICHAŁ KEMPA
PIOTR OGRODOWICZ
ELŻBIETA ADAMSKA
RENATA TRZECIAK
ALINA ANIOŁA
RENATA HOLEWIŃSKA

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań
Kierownik Tematu: prof. dr hab. Tadeusz Adamski Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk,
ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań; tel. 61 6550270, e-mail: tada@igr.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.802.18.2018, Zadanie 3.

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

Słowa kluczowe: pszenica ozima, linie homozygotyczne, marker molekularne, segregacja alleli, białka gluteninowe

Celem badań wieloletnich jest stwierdzenie, czy obecne w niektórych odmianach (rodach) pszenicy translokacje 1B/1R mają wpływ na efektywność uzyskiwania form haploidalnych i linii podwojonych haploidów (DH) na drodze krzyżowania pszenicy z kukurydzą oraz na prawidłowość zachodzenia segregacji w populacjach linii DH i SSD wyprowadzonych z mieszańców form translokowanych. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań stwierdzono, że mieszańce zawierające translokacje odznaczały się w większości przypadków korzystnymi wartościami parametrów związanych z efektywnością uzyskiwania form haploidalnych. Wykazano także brak wpływu efektów matecznych na efektywność otrzymywania haploidów drogą krzyżowania pszenicy z kukurydzą.

W roku 2018 badano wpływ efektów matecznych na częstość występowania alleli wybranych markerów molekularnych i białkowych w 8 populacjach linii SSD pszenicy ozimej (Temat nr 1), a także poprawność segregacji alleli wybranych markerów molekularnych w populacjach linii DH i SSD pszenicy ozimej wyprowadzonych z tej samej kombinacji krzyżówkowej (Temat nr 2). Ponadto prowadzono prace związane z określeniem związku między występowaniem translokacji 1B/1R a efektywnością otrzymywania form haploidalnych pszenicy ozimej (Temat nr 3). Materiał do badań wpływu efektów matecznych stanowiły linie SSD uzyskane z mieszańców wzajemno-przemiennych między formami zawierającymi i niezawierającymi translokacji: STH007A × Brillant*, Brillant* × STH007A, Brillant* × Fidelius, Fidelius × Brillant*, Fidelius × Palma*, Palma* × Fidelius, STH007A × Palma*, Palma* × STH007A (* oznacza formę z translokacją). Badano łącznie 160 linii SSD. Segregację alleli wybranych markerów molekularnych analizowano w populacjach linii DH (F1DH) i SSD (SSDF5) trzech kombinacji krzyżówkowych: C15384, K16124, K16125. W obu tematach analizy molekularne linii wykonano z wykorzystaniem wybranych z literatury markerów mikrosatelitarnych związanych z ważymi z użytkowego punktu widzenia cechami, takimi jak wysokość roślin, reakcja fotoperiodyczna, długość okresu wegetacji, masa ziarna (MTZ), a także markera identyfikującego obecność translokacji. Produkty amplifikacji rozdzielono z wykorzystaniem elektroforezy kapilarnej przy użyciu analizatora genetycznego (Analizator Genetyczny DNA firmy Applied Biosystem). Ponadto określono skład wysokocząsteczkowych białek gluteninowych metodą SDS-PAGE. Segregację alleli badano za pomocą testu chi-kwadrat.

Wyniki analizy segregacji alleli markerów SSR w populacjach linii SSD (Temat nr 1) zamieszczono w tabeli 1. Spośród 8 analizowanych kombinacji krzyżówkowych w czterech obserwowano istotne zaburzenia w segregacji markera Scm9, wskazującego na obecność translokacji 1B/1R. Segregacja pozostałych markerów (z nielicznymi wyjątkami) odpowiadała oczekiwanemu stosunkowi 1:1.

Materiał do badań w ramach Tematu 3 stanowiło 12 kombinacji krzyżówkowych pokolenia F₁ uzyskanych ze skrzyżowania form zróżnicowanych pod względem obecności translokacji 1B/1R. Dla uzyskania informacji o wpływie translokacji 1B/1R na efektywność uzyskiwania form haploidalnych z wykorzystaniem zjawiska eliminacji chromosomów przeprowadzono krzyżowanie pszenicy z kukurydzą. Analizowano podstawowe parametry, w tym liczbę rozrośniętych zalążni/100 zapylnych kwiatków, liczbę zarodków/100 rozrośniętych zalążni, liczbę zarodków oraz liczbę haploidów na 100 zapylnych kwiatków. Uzyskane wyniki opracowano statystycznie. Na podstawie wyników uzyskanych w latach poprzednich stwierdzono, że procent haploidalnych zarodków w rozrośniętych zalążniach był istotnie wyższy w przypadku mieszańców, których jedna lub obie formy rodzicielskie posiadały translokację, niż przypadku mieszańców między formami bez translokacji. W 2018 największą efektywność mierzoną procentem uzyskanych haploidów w stosunku do zapylnych kwiatków stwierdzono również dla mieszańca zawierającego translokację pszenno-żytnią.

Wyniki testu chi-kwadrat dotyczącego segregacji alleli wybranych loci w populacjach linii SSD z uwzględnieniem kierunku krzyżowania

Marker	Allel (pz)	Liczba genotypów w kombinacjach krzyżówkowych							
		STH × Brillant	Brillant × STH	Brillant × Fidelius	Fidelius × Brillant	Palma × Fidelius	Fidelius × Palma	STH × Palma	Palma × STH
Scm9	206#	5	7	7	5	8	5	5	5
	-	15	13	13	15	12	12	15	14
	χ^2	5,00*	1,80	1,80	5,00*	0,80	2,88	5,00*	4,26*
Xgwm261	174	10	7	18	18	19	19	9	11
	192	7	12	0	0	0	0	10	9
	χ^2	0,53	1,32	-	-	-	-	0,05	0,20
Xbarc151-A	210	11	8	10	9	20	19	20	19
	224	7	10	9	8	0	0	0	0
	χ^2	0,89	0,22	0,05	0,06	-	-	-	-
Xgwm382	165	18	10	5	9	10	10	20	20
	124	2	9	10	11	9	7	0	0
	χ^2	12,80	0,06	1,67	0,20	0,05	0,53	-	-
Xwmc602	193	19	20	19	19	20	20	19	20
	168	0	0	0	0	0	0	0	0
	χ^2	-	-	-	-	-	-	-	-
Xgwm639	154	7	10	19	19	19	19	7	8
	172	12	10	0	0	0	0	12	10
	χ^2	1,32	0,00	-	-	-	-	1,32	0,06
Xgwm484	160	11	12	0	0	10	9	20	20
	162	8	8	18	18	9	8	0	0
	χ^2	0,47	0,80	-	-	0,05	0,06	-	-
Xgwm257	190	0	0	10	13	20	19	8	11
	192	19	20	9	6	0	0	10	8
	χ^2	-	-	0,05	2,58	-	-	0,22	0,47
Xgwm344	126	8	12	8	10	19	18	18	20
	147	11	6	9	7	0	0	0	0
	χ^2	0,22	2,00	0,06	0,06	-	-	-	-
Xgwm165	178	11	7	0	0	4	7	19	20
	182	8	12	19	19	14	11	0	0
	χ^2	0,47	1,32	-	-	5,56*	0,89	-	-

#allel 206 pz identyfikuje translokację; $\chi^2_{0,05}$ — 3,84; $\chi^2_{0,01}$ — 6,63

WNIOSKI

1. Obecność translokacji 1B/1R w populacjach linii SSD wytworzonych z mieszańców F₁ nie powodowała zaburzeń w segregacji analizowanych markerów molekularnych związanych z cechami użytkowymi.
2. W badanych populacjach linii SSD pszenicy częstość występowania form nietranslokowanych była wyższa niż zawierających translokację. Różnice te nie zawsze były jednak statystycznie istotne.
3. W większości przypadków nie stwierdzono wpływu kierunku krzyżowania form translokowanych z nietranslokowanymi w procesie otrzymywania mieszańców F₁, a w dalszej kolejności z wyprowadzonych z nich populacji linii SSD na częstość występowania alleli wybranych markerów molekularnych i białkowych.

4. Stwierdzono zaburzenia w segregacji alleli markerów związanych z wernalizacją i długością okresu wegetacji w kombinacjach krzyżówkowych K16124, K16125 i C15384.
5. Segregacja alleli w *loci Glu-1* była w większości przypadków prawidłowa. Zaburzenia wystąpiły tylko w kombinacji C15384 — w liniach DH w *locus Glu-B1* i w liniach SSD w *locus Glu-A1*.

TOMASZ GÓRAL¹
HALINA WIŚNIEWSKA²
PAWEŁ CZEMBOR¹
PIOTR OCHODZKI¹
MAGDALENA RADECKA-JANUSIK¹
MACIEJ MAJKA²
JAROSŁAW PRZETAKIEWICZ¹

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

² Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań

Kierownik Tematu: dr hab. Tomasz Góral Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, tel. 22 7334636, e-mail: t.goral@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 6.

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

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

CELE PROJEKTU

1. Ocena stopnia porażenia kłosów genotypów pszenicy ozimej przez *Fusarium* celem wyboru form odpornych pod względem odporności typu 1 oraz 2 na fuzariozę kłosów.
2. Ocena odporności na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (typ odporności 3) oraz tolerancji genotypów pszenicy na fuzariozę kłosów (typ odporności 4) celem wyboru form odpornych.
3. Określenie zawartości ergosterolu (wskaźnik zawartości grzybni) oraz toksyn fuzaryjnych w ziarnie (typ odporności 5) wybranych genotypów pszenicy

wykazujących podwyższoną odporność na porażenie kłosa i uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium*.

4. Uzyskanie pokolenia F₃BC₂ pięciu kombinacji krzyżówkowych pszenicy ozimej po wcześniejszej selekcji molekularnej osobników pokolenia F₂BC₂ na obecność genu *Fhb1* odporności na fuzariozę kłosa.

MATERIAŁY I METODY

Odporność na fuzariozę kłosów genotypów pszenicy testowano w warunkach polowych w IHAR Radzików oraz w IGR PAN w Poznaniu (Cerekwica). Materiał badawczy stanowiły genotypy, które wykazały odporność w roku 2017 oraz nowe niebadane dotychczas genotypy. Formy wzorcowe stanowiły odmiany i linie odporne; wybrane genotypy o wysokiej podatności na porażenie kłosa; współczesne odmiany o wysokim plonie. Kłosa pszenicy w fazie kwitnienia opryskiwano zawiesiną zarodników *Fusarium culmorum*. Oceniano porażenie kłosów wyliczając indeks fuzariozy kłosów (IFK).

W celu określenia odporności typu 1 kłosa pszenicy opryskiwane były zawiesiną zarodników *F. culmorum*. Oceniana była liczba punktów infekcji na kłosach. W celu określenia odporności typu 2 zastosowana była metoda inokulacji punktowej. Nasilenie fuzariozy kłosów oceniane było poprzez określanie liczby kłosków z objawami choroby.

Prowadzone były doświadczenia infekcyjne w 5 punktach doświadczalnych (Dębina, Nagradowice, Polanowice, Smolice, Strzelce). W doświadczeniach tych wysiano nowe genotypy, których odporność nie była dotychczas badana. Metodyka doświadczenia była podobna w Radzikowie i Poznaniu.

Proporcja ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* była określana wizualnie poprzez podział próby ziarniaków na ziarniaki zdrowe i ziarniaki z objawami porażenia przez *Fusarium* (Argyris i in., 2003). Wyliczono wartość FDK w oparciu o masę ziarniaków uszkodzonych (FDK masa) oraz ich liczbę (FDK liczba) w odniesieniu do masy lub liczebności całej próby. Określona została względna wartość komponentów plonu ziarna w odniesieniu do prób kontrolnych.

W wybranych próbach ziarna pszenicy z doświadczeń z roku 2017 analizowana była zawartość DNA *F. culmorum*. Wykorzystano technikę real-time PCR zgodnie z metodyką opisaną przez Nicolaisen i in. (2009). Wyliczono względną zawartość DNA *F. culmorum* w stosunku do DNA pszenicy (pg/μg).

Ziarno z genotypów o najwyższej odporności analizowano pod względem zawartości ergosterolu oraz toksyn fuzaryjnych. Zawartość ergosterolu określona była metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (Perkowski i in., 2007, 2008). Zawartość trichotecenów z grupy B (deoksyniwalenol [DON], 3-acetyl deoksyniwalenol [3AcDON], 15-acetyl deoksyniwalenol [15AcDON], niwalenol [NIV]) analizowano przy wykorzystaniu techniki chromatografii gazowej (Góral i in., 2019). Zawartość zearalenonu (ZEN) oznaczano za pomocą ilościowego testu ELISA AgraQuant® ZON 40/1000 zgodnie z procedurą podaną przez producenta.

Selekcja wspomagana markerami molekularnymi (MAS)

Materiałem wykorzystanym w badaniach były rośliny pokolenia F_2BC_2 pochodzące z pięciu kombinacji krzyżówkowych. Dawcą genu odporności na fuzariozę była linia AIII62/1, natomiast biorcami — linie SMH8527, DL414/10, STH1178, MIB11262 oraz NAD10041. W ramach tematu przeanalizowano łącznie 600 roślin — po 120 z każdej kombinacji. W pierwszym etapie selekcji rośliny pokolenia F_2BC_2 testowano w poszukiwaniu osobników homozygotycznych pod względem genu odporności *Fhb1* (w typie rodzica-dawcy), na podstawie analizy polimorfizmu markerów SSR sprzężonych z genem, tj. UMN10 lub cfb6033. Polimorfizm badano również w *loci* markerów flankujących dystalnie (gwm389) i proksymalnie (gpw3248), mając na celu selekcję homozygot w typie rodzica wypierającego. Po tym etapie zawężono pulę roślin do osobników, które były homozygotami pod względem genu odporności *Fhb1* (w typie rodzica-dawcy) oraz (w miarę możliwości) homozygotami w typie rodzica wypierającego pod względem *loci* markerów flankujących. W celu potwierdzenia wyników selekcji przetestowano ponownie *loci* wymienionych wcześniej markerów oraz dodatkowo zbadano polimorfizm kolejnych dwóch markerów flankujących, tj. gwm493 i barc12, położonych bliżej genu *Fhb1*.

Po zakończeniu analiz molekularnych wybrane rośliny pokolenia F_2BC_2 zostały wykorzystane do uzyskania pokolenia F_3BC_2 . Rośliny zostały poddane jarowizacji (8 tygodni w temp. 4°C), a następnie prowadzono je w warunkach szklarniowych.

WYNIKI

Średni IFK w Cerekwicy wyniósł 6,9% (0–33,0%), natomiast w Radzikowie 9,0% (0,5–30,0%). Najwyższą odporność wykazały wzorce odporne oraz genotypy: KBP04.164, KBP05.284, NAD13014, NAD13015, NAD13016, NAD13017, POB0316, POB457/07, POB759/04 i STH9059.

Średnia odporność typu 1 wyniosła 1,54 punktów infekcji (pi) (1,00–2,89 pi). Najwyższą odporność typu 1 wykazał wzorzec odporny: 20816/2[Fhb1+] oraz genotypy NAD13015, KBP10 40, NAD13014, POB0211, POB0114, STH105, NAD11053, NAD13024, NAD13017, POB759/04, DC332/09-3, DCh4763/07, POB0616. Średnia odporność typu 2 wyniosła 1,89 porażonych kłosek (pk) (0–6,71 pk). Najwyższą odporność typu 2 wykazało 10 wzorców odpornych oraz genotypy STH032 i KOH275. Najwyższą średnią odporność obu typów wykazało 9 wzorców odpornych. Wysoka była również odporność następujących genotypów: STH2041, NAD13016, POB0514, NAD13017. Średnia odporności obu typów korelowała istotnie z IFK warunkach polowych ($r = 0,632$).

Analiza składowych głównych, w której zmiennymi były IFK z lokalizacji (Poznań, Radzików, Dębina, Nagradowice, Polanowice) pozwoliła na zidentyfikowanie genotypów wykazujących odporność na porażenie kłosa we wszystkich środowiskach. Były to np.: AND82/11/50, POB1016, POB1216, NAD14008, STH5483, AND532/11, AND245/13, STH4317, POB0616, POB0216, POB0816, POB0516, SMH9523, NAD14020,

POB0316, STH5407, KBP296/48, SMH9326, STH5485, DM850/14. Najwyższą odporność spośród wzorców wykazała odmiana Kilimanjaro.

Średnie uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* wyniosło FDK masa = 14,3% (2,6–43,2%) oraz FDK liczba = 21,1% (3,7–52,4%). Najniższe uszkodzenie ziarniaków miało 21 genotypów w tym 7 wzorców odpornych. Były to np. STH 9059, NAD 13014, NAD 13017, POB 170/04, NAD 14008, STH 5261, STH 5316. IFK korelował istotnie z uszkodzeniem ziarniaków.

Redukcja plonu ziarna z kłosa (RMZK) wyniosła średnio 45,6% 90–86,4%). Liczba ziarniaków w kłosie (LZK) została zredukowana średnio o 33,2% (0–81,5%). Masa tysiąca ziarniaków (MTZ) została zredukowana średnio o 20,9% (0–54,9%). Najniższą redukcję MZK w odniesieniu do kontroli odnotowano u 7 wzorców odpornych, odmiany Artist oraz 11 genotypów (w tym: AND82/11/50, STH9059, POB0316). Średni indeks fuzariozy kłosów oraz FDK korelowały z redukcjami masy ziarna z kłosa i liczby ziarniaków w kłosie.

Zidentyfikowano genotypy łączące odporność na porażenie kłosa (typ 1+2), uszkodzenie ziarniaków (typ 3) oraz niską redukcję plonu ziarna (typ 4). Były to: STH9059, POB0316, NAD13014, KBP1629, STH5261 oraz część wzorców odpornych.

W wybranych próbach pszenicy z 2017 koncentracja DNA *F. culmorum* wyniosła średnio 28034 pg na 1 µg DNA pszenicy. W próbach z Poznania zawartość DNA (39117 pg/µg) była ponad dwukrotnie wyższa niż z Radzikowa (16952 pg/µg). Zawartość DNA korelowała istotnie z innymi miernikami oceny odporności pszenicy na fuzariozę kłosów. Bardzo wysokie były współczynniki korelacji z IFK i FDK.

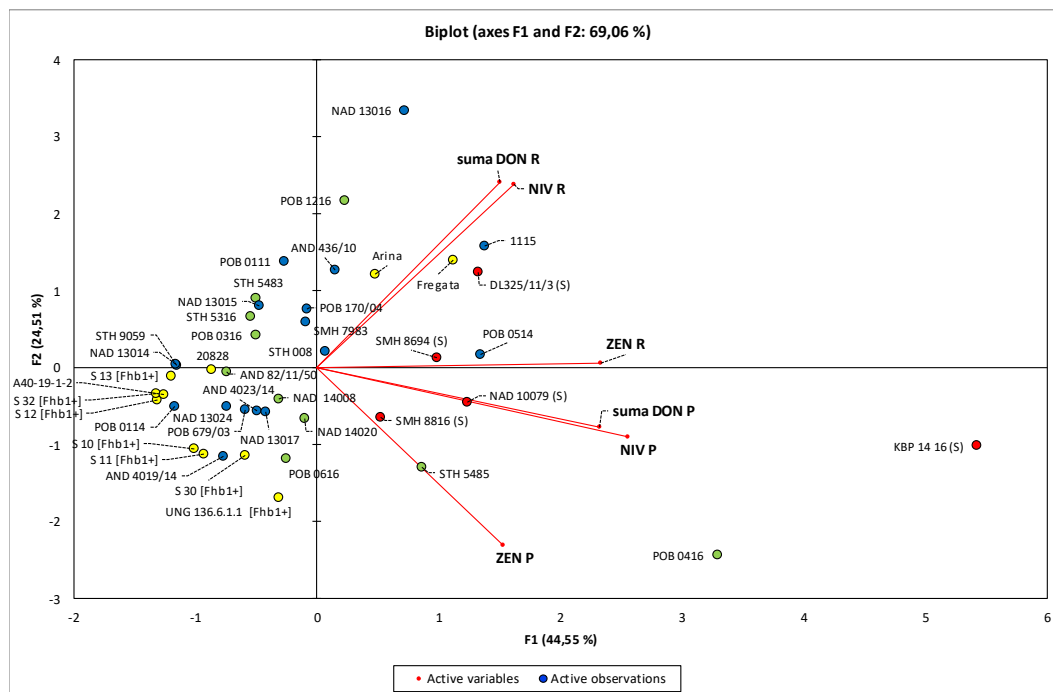
Średnia zawartość deoksyniwalenolu (DON) w ziarnie badanych genotypów wyniosła 1495 µg/kg (58–7726 µg/kg). W próbach z Poznania zawartość DON była bardzo niska i wyniosła 595 µg/kg (23–8300 µg/kg). W Radzikowie natomiast była 4-krotnie wyższa i wyniosła 2395 µg/kg (0–13825 µg/kg). Stwierdzono obecność w ziarnie pszenicy pochodnych acetylowych DON — 3AcDON i 15AcDON. Zawartości tych toksyn były bardzo niskie. Średnia zawartość niwalenolu (NIV) w ziarnie badanych genotypów była wyższa niż zawartość DON i wyniosła 2778 µg/kg (353–8173 µg/kg). W próbach z Radzikowa zawartość NIV była bardzo niska i wyniosła 67 µg/kg (0–375 µg/kg). W Poznaniu natomiast była bardzo wysoka i wyniosła 5488 µg/kg (680–16295 µg/kg).

Średnia sumaryczna zawartość trichotecenów z grupy B w ziarnie genotypów pszenicy wyniosła 4338 µg/kg. Zakres zmienności od 840 (S10[Fhb1+]) do 14465 µg/kg (POB0416).

Zawartość ZEN w ziarnie była niska i wyniosła średnio 45 µg/kg (0–454 µg/kg). W próbach ziarna z Poznania stwierdzono jedynie średnio 17 µg/kg ZEN, natomiast w próbach z Radzikowa zawartość ZEN wyniosła 73 µg/kg.

Ze względu na znaczne różnice w porażeniu kłosów genotypów badanych w dwóch doświadczeniach z Radzikowie, analizowano ich wyniki oddzielnie. Analiza wieloczynnikowa wykazała, że w grupie odpornych najniższą akumulację różnych grup toksyn stwierdzono u wzorców odpornych (z wyjątkiem Ariny i Fregaty) oraz u genotypów POB0114, NAD13014, STH9059, NAD13024 i AND82/11/50, AND4019/14, POB0111,

NAD13024, AND4023/14, POB679/03, NAD13017, POB0616 (rys. 1). W grupie DW najniższą akumulację różnych grup toksyn stwierdzono u genotypów STH6151, STH5347, STH6130, NAD15105, STH6116, STH6167, STH6177, NAD15115, STH5261, POB0517, STH6177, STH6167 i STH6111 (rys. 2).

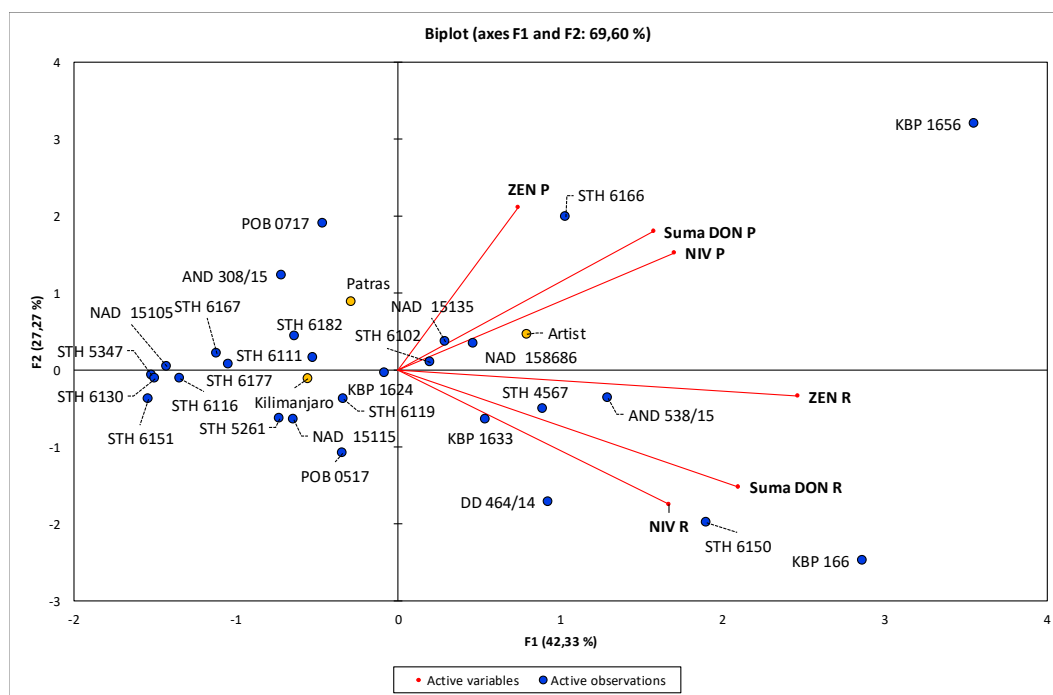


Rys. 1. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 43 genotypów pszenicy ozimej z grupy ‘odporne’. Składowe wyjaśniają 69,06% zmienności odporności akumulację zearalenonu (ZEN) i trichotecenów z grupy B (suma DON, NIV) w ziarnie z doświadczeń w Poznaniu (P) i Radzikowie (R). Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych

Indeks fuzariozy kłosów korelował istotnie z zawartością trichotecenów oraz zearalenonu. Najniższy był współczynnik korelacji z 15AcDON, najwyższy dla ZEN. Uszkodzenie ziarniaków nie korelowało z zawartością DON, natomiast wysokie były współczynniki korelacji z zawartościami NIV i ZEN. Stężenie DON nie korelowało istotnie z zawartością NIV. Istotny, lecz niski był współczynnik korelacji ze stężeniem ZEN.

W wyniku selekcji we wszystkich populacjach zidentyfikowano łącznie 166 osobników homozygotycznych w *loci* markerów centralnych (UMN10 lub cfb6033) sprzężonych z genem odporności na fuzariozę kłosów *Fhb1*. Wśród tej grupy znalazło się 135 roślin homozygotycznych (w typie rodzica wypierającego) w *locus* flankującego proksymalnie markera gpw3248 (27 w *locus* markera gwm493) oraz 75 osobników homozygotycznych w *locus* markera flankującego dystalnie — gwm389 (47 w *locus* markera barc12). Najbardziej pożądanym układem alleli był natomiast układ:

homozygota w typie rodzica dawcy w *locus* markera centralnego oraz homozygoty w typie rodzica wypierającego w *loci* markerów flankujących.



Rys. 2. Układ współrzędnych dwóch składowych głównych dla 30 genotypów pszenicy ozimej z grupy ‘DW. Składowe wyjaśniają 69,60% zmienności odporności akumulację zearalenonu (ZEN) i trichotecenów z grupy B (suma DON, NIV) w ziarnie z doświadczeń w Poznaniu (P) i Radzikowie (R). Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych

Po zakończeniu analiz wybrano 55 roślin, które posłużyły do uzyskania pokolenia F_3BC_2 . Każdą z kombinacji potraktowano indywidualnie pod względem kryteriów selekcji osobników do dalszego rozmnażania, wybierając te o wcześniej wspomnianej najlepszej kombinacji alleli. Dodatkowo, w każdej kombinacji zebrano nasiona z ośmiu roślin homozygotycznych w typie rodzica wypierającego zarówno w *locus* markera centralnego, jak i w *loci* markerów flankujących. Rośliny te będą stanowić grupę kontrolną w przyszłych doświadczeniach infekcyjnych.

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.
- 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.

- Nicolaisen M., Suproniene S., Nielsen L. K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justesen A. F. 2009. Real-time PCR for quantification of eleven individual *Fusarium* species in cereals. *Journal of Microbiological Methods* 76: 234 — 240.
- 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 (4): 542 — 547.
- Perkowski J., Wiwart M., Buško 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.

ANNA NADOLSKA-ORCZYK

KAROLINA BARCHACKA

SEBASTIAN GASPARI

HANNA OGONOWSKA

MACIEJ KAŁA

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Anna Nadolska-Orczyk Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin —

Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie tel. kierownik: 22 7334619; sekretariat:

22 7334658, e-mail: a.orczyk@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 5

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

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

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

Najnowszy stan wiedzy w temacie genów głównych wpływających na produktywność i inne ważne cechy agrotechniczne pszenicy i jęczmienia w tym geny z rodziny *CKX* przedstawiliśmy w pracy przeglądowej Nadolska-Orczyk i in. (2017). Ich poznawanie i analiza funkcji jest możliwa dzięki rozwijającej się wiedzy dotyczącej genomów, genomiki porównawczej oraz technikom biotechnologicznym umożliwiającym charakterystykę wybranych genów.

W dalszej części tej pracy zebraliśmy informacje na temat charakterystyki/funkcji innych genów głównych istotnie wpływających na produktywność zbóż, zidentyfikowanych i scharakteryzowanych za pomocą najnowszych narzędzi biotechnologicznych. Zostały one sklasyfikowane, ze względu na ich funkcje do grupy: 1) czynników transkrypcyjnych regulujących rozwój kłosa i wpływających na liczbę i wielkość ziarna, 2) genów biorących udział w metabolizmie lub szlakach sygnałowych regulatorów

wzrostu, 3) genów determinujących podziały i proliferację komórek, głównie modulując wielkość ziarna, 4) regulatorów kwitnienia wpływających na architekturę kwiatostanu i liczbę nasion, 5) genów kontrolujących metabolizm węglowodanów i tym samym wpływających na architekturę roślin i plon ziarna.

Wśród scharakteryzowanych genów biorących udział w metabolizmie cytokinin są geny *CKX* pszenicy i jęczmienia. Kodują one enzym dehydrogenazę cytokininy (*CKX*), nieodwracalnie degradujący cytokininy a ich ekspresja i aktywność kodowanego przez nie enzymu jest rozwojowo i tkankowo-specyficzna. Wykazana przez nas ujemna korelacja pomiędzy liczbą nasion oraz ekspresją genów *HvCKX1* i *HvCKX2* w rozwijających się kłosach jęczmienia (Zalewski i in., 2010, 2012, 2014) świadczyła o silnym wpływie zawartości cytokinin w określonych organach na produktywność. Podobnie wykazano, że liczba ziarniaków u ryżu była regulowana przez gen z tej samej rodziny *CKX*, *OsCKX2* (Ashikari i in., 2005). W najnowszych badaniach u pszenicy opisano 5 haplotypów genu *TaCKX6-D1*, z których jeden, *TaCKX6-D1a*, wykazujący obniżoną w stosunku do pozostałych ekspresję determinował formowanie większego ziarna o wyższej masie (Lu i in., 2015; Zhang i in., 2012). Dla innego genu z rodziny *TaCKX*, *TaCKX4* wykazano silny związek pomiędzy liczbą kopii a zawartością chlorofilu w liściu flagowym po kwitnieniu i masą ziarna (Chang i in., 2015).

Do innej, ciekawej rodziny genów kontrolujących wielkość ziarna pszenicy należą geny *NAC* kodujące czynniki transkrypcyjne *NAC*. Najistotniejszy z nich, *NAM-B1* (*Gpc-B1*) determinuje przyspieszenie starzenia się roślin, co wpływa na podniesienie jakości białka poprzez zwiększenie zawartości cynku i żelaza (Uauy i in., 2006 a,b). Nad-ekspresja innego genu z tej rodziny, *TaNAC2-5A*, wzmacnia wzrost korzeni i poziom akumulacji azotu przez co zwiększa plon ziarna (He i in., 2015).

Celem tegorocznego tematu badawczego jest ocena dziedziczenia znaczników genetyczno/biochemiczno/fizjologicznych produktywności i masy korzenia w przekazanych przez hodowców genotypach/materiałach hodowlanych i poszerzenie puli charakteryzowanych genotypów (ocena minimum 6 F_1 ; poszerzenie puli genotypów — minimum 10).

OPIS WYNIKÓW

Wykonano trzy dalsze krzyżowania niezbędne do oceny minimum 6 mieszańców F_1 oraz wytypowano na podstawie informacji od hodowców następujących 10 genotypów pszenicy do badań. W uzyskanych mieszańcach i w wytypowanych genotypach przeprowadzono ocenę poziomu ekspresji względnej genów *TaCKX1*, *TaCKX6* i *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek i genu *TaCKX1* w dojrzewających kłosach 7 DAP. Dane dotyczące poziomu ekspresji genu *TaCKX1* w dojrzewających kłosach (kłosy 7 DAP) pobranych z fitotronu i z pola 10 rodów i odmian z Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz 6 pokoleń F_1 przedstawiono w tabeli 1. Nie stwierdzono istotnej korelacji między ekspresją *TaCKX1* w kłosie 7 DAP z fitotronu i z pola. Dane dotyczące oceny poziomu ekspresji genów *TaCKX1*, *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek 10 rodów i odmian z Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. oraz 6 pokoleń F_1

przedstawiono w tab. 2. Stwierdzono istotną statystycznie, silną korelację pomiędzy ekspresją *TaCKX1* a *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A*, a także między ekspresją *TaNAC2-5A* a *TaCKX6*.

Tabela 1

Ocena poziomu ekspresji genu *TaCKX1* w dojrzewających kłosach (kłosy 7 DAP) roślin rosnących w fitotronie i na polu oraz aktywność enzymu CKX 10 rodów i odmian z Hodowli Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR oraz 6 pokoleń F₁ (tylko dla fitotronu)

Lp.	Rody i odmiany z HR Strzelce oraz 6 F ₁	Ekspresja <i>TaCKX1</i> , średnia: 3 roślin. × 3 (FIT.)	OS	Ekspresja <i>TaCKX1</i> , średnia: 3 roślin. × 3 (POLE)	OS	Ekspresja <i>TaCKX1</i> POLE + FIT.	Aktywność względna POLE/FIT.
1	KOH 1-18	0,039	0,013	0,037	0,007	0,076	1,170/0,730
2	KOH 2-18	0,060	0,016	0,038	0,008	0,099	1,411/1,766
3	KOH 3-18	0,121	0,019	0,019	0,005	0,140	1,183/0,743
4	KOH 4-18	0,073	0,025	0,031	0,002	0,106	1,025/1,033
5	KOH 5-18	0,127	0,014	0,026	0,006	0,153	0,753/1,183
6	KOH 6-18	0,049	0,006	0,046	0,020	0,095	0,751/1,445
7	KOH 7-18	0,032	0,018	0,018	0,006	0,050	0,901/0,917
8	KOH 8-18	0,078	0,029	0,055	0,009	0,133	1,171/0,825
9	KOH 9-18	0,032	0,003	0,021	0,006	0,053	1,021/1,461
10	KOH 10-18	0,082	0,011	0,026	0,007	0,108	0,725/0,662
11	1K	0,109	0,023	n.t.	n.t.	0,109	n.t./1,283
12	2K	0,064	0,016	n.t.	n.t.	0,064	n.t./1,246
13	3K	0,143	0,023	n.t.	n.t.	0,143	n.t./1,408
14	4K	0,078	0,014	n.t.	n.t.	0,078	n.t./0,910
15	5K	0,077	0,011	n.t.	n.t.	0,077	n.t./1,609
16	6K	0,103	0,018	n.t.	n.t.	0,103	n.t./0,880
	średnia	0,079	0,016	0,032	0,008	0,099	1,011/1,020
	OS	0,034	0,007	0,012	0,005	0,032	0,228/0,362

FIT. — fitotron, n.t. — nie testowano

W próbkach poddawanych analizie ekspresji genów *TaCKX* wykonano pomiary aktywności enzymu CKX. Były to kłosy 7 DAP (tab. 1) i korzenie 5-dniowych siewek (tab. 2) pobranych z rodów hodowlanych/odmian z HR Strzelce oraz 6 mieszańców F₁. Stwierdzono istotną statystycznie korelację między ekspresją *TaCKX1* w kłosach 7 DAP pobranych z fitotronu a aktywnością. Zakresy aktywności enzymu w korzeniach materiałów z HR Strzelce oraz 6 pokoleń F₁ (tab. 2) były bardziej zróżnicowane, jednak nie odnotowano korelacji między aktywnością enzymu CKX a ekspresją genów *TaCKX1*, *TaCKX6*, *TaNAC2-5A*.

Następnie przeprowadzono ocenę najważniejszych cech fenotypowych jak masa korzenia 5-dniowych siewek i produktywność. Wyniki masy korzenia 5-dniowych siewek pobranych z rodów hodowlanych oraz odmian z HR Strzelce oraz 6 pokoleń F₁ zamieszczono w tabeli 2. Nie stwierdzono wyraźnej korelacji między masą korzenia i ekspresją genów *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A*. Dla genu *TaCKX1* wykazano istotną statystycznie korelację z masą korzenia 5-dniowej siewki.

Wyniki innych cech fenotypowych, tj. wysokości roślin, liczby łodyg i kłosów w tym kłosów półpustych, liczby nasion, masy nasion i średniej długości kłosa dla 10 rodów

i odmian z HR Strzelce oraz 6 pokoleń F₁ były korelowane z poziomem ekspresji badanych genów. Nie odnotowano istotnych statystycznie korelacji.

Tabela 2

Ocena poziomu ekspresji genów *TaCKX1*, *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A*, aktywność względna enzymu CKX oraz masa korzenia w korzeniach siewek 10 rodów i odmian z HR Strzelce oraz 6 pokoleń F₁

Lp.	Rody i odmiany z HR Strzelce oraz 6 F ₁	Masa korzenia [g]	Aktywność względna FIT.	Ekspresja <i>TaCKX1</i>	Ekspresja <i>TaCKX6</i>	Ekspresja <i>TaNAC2-5A</i>
1	KOH 1-18	0,067	1,175	0,0039	0,0040	0,1505
2	KOH 2-18	0,063	2,026	0,0058	0,0069	0,1891
3	KOH 3-18	0,092	1,022	0,0030	0,0033	0,1530
4	KOH 4-18	0,065	1,131	0,0024	0,0021	0,1441
5	KOH 5-18	0,094	0,930	0,0048	0,0011	0,1143
6	KOH 6-18	0,090	0,990	0,0029	0,0018	0,0018
7	KOH 7-18	0,086	0,953	0,0019	0,0037	0,1323
8	KOH 8-18	0,073	0,759	0,0037	0,0036	0,1210
9	KOH 9-18	0,084	0,539	0,0055	0,0061	0,1225
10	KOH 10-18	0,076	0,690	0,0029	0,0036	0,1180
11	1K	0,039	1,019	0,0056	0,0043	0,1626
12	2K	0,066	1,015	0,0025	0,0031	0,0326
13	3K	0,053	1,228	0,0130	0,0103	0,2346
14	4K	0,055	0,920	0,0031	0,0041	0,1317
15	5K	0,054	0,938	0,0016	0,0018	0,0468
16	6K	0,066	1,042	0,0002	0,0003	0,0086
	średnia	0,070	1,000	0,0039	0,0038	0,1162
	OS	0,016	0,334	0,0028	0,0024	0,0640

Przeprowadzono również dodatkowe badania ekspresji genów *TaCKX2.1* i *TaCKX2.2* w kłosach 7 DAP z 30 genotypów rosnących w fitotronie lub na polu, zebranych w 2017 roku. Nie stwierdzono istotnych statystycznie korelacji między ekspresją w kłosie 7 DAP z fitotronu i z pola dla genu *TaCKX2.1*, *TaCKX2.2* oraz pomiędzy nimi (dla fitotronu). Natomiast wykazano wysoką, istotną statystycznie korelację pomiędzy *TaCKX2.1* a *TaCKX2.2* dla kłosów 7 DAP z pola, która wynosiła 0,70 (p=0,001).

WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

1. 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.
2. Istotna statystycznie, silna korelacja pomiędzy ekspresją genów *TaCKX1*, *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek świadczy o silnej koregulacji tych genów.
3. Korelacja ekspresji genu *TaCKX1* z masą korzenia z 5-dniowej siewki świadczy o możliwości użycia tego miernika do oceny wzrostu korzeni siewek a tym samym prognozowania produktywności roślin.
4. Brak korelacji między aktywnością enzymu CKX a ekspresją genów *TaCKX1*, *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A* w korzeniach oraz pozytywna korelacja pomiaru aktywności enzymu CKX w kłosach 7 DAP próbek pochodzących tylko z fitotronu

jednej hodowli wskazuje na brak możliwości użycia pomiaru aktywności jako markera produktywności.

5. 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*).
6. 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.

LITERATURA

- Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E. R., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M. 2005. Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* 309: 741 — 745.
- Chang C., Lu J., Zhang H. P., Ma C. X., Sun G. 2015. Copy number variation of cytokinin oxidase gene *Tackx4* associated with grain weight and chlorophyll content of flag leaf in common wheat. *PLoS ONE* 10:e0145970. DOI:10.1371/journal.pone.0145970.
- He X., Qu B., Li W., Zhao X., Teng W., Ma W., Ren Y., Li B., Li Z., Tong Y. 2015. The nitrate-inducible NAC transcription factor TaNAC2-5A controls nitrate response and increases wheat yield. *Plant Physiol.* 169: 1991 — 2005. DOI:10.1104/pp.15.00568.
- Lu J., Chang C., Zhang H. P., Wang S. X., Sun G., Xiao S. H., Ma C. X. 2015. Identification of a Novel allele of *TaCKX6a02* associated with grain size, filling rate and weight of common wheat. *PLoS ONE* 10:e0144765. DOI:10.1371/journal.pone.0144765.
- Nadolska-Orczyk A., Rajchel I. K., Orczyk W., Onysk A., Gasparis S. Major genes determining yield-related traits in wheat and barley. (Theor. Appl. Genet. Recenzowane).
- Uauy C., Brevis J. C., Dubcovsky J. 2006 a. The high grain protein content gene Gpc-B1 accelerates senescence and has pleiotropic effects on protein content in wheat. *Journal of Experimental Botany* 57: 2785 — 2794. DOI:10.1093/jxb/erl047.
- Uauy C., Distelfeld A., Fahima T., Blechl A., Dubcovsky J. 2006 b. A NAC gene regulating senescence improves grain protein, zinc, and iron content in wheat. *Science* 314: 1298 — 1301.
- Zalewski W., Galuszka P., Gasparis S., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. 2010. Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytokinin oxidase/dehydrogenase level in barley and leads to higher plant productivity. *J. Exp. Bot.* 61: 1839 — 1851. DOI:10.1093/jxb/erq052.
- Zalewski W., Gasparis S., Boczkowska M., Rajchel I. K., Kala 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:e115729. DOI:10.1371/journal.pone.0115729.
- Zalewski W., Orczyk W., Gasparis S., Nadolska-Orczyk A. 2012. *HvCKX2* gene silencing by biolistic or *Agrobacterium*-mediated transformation in barley leads to different phenotypes. *BMC Plant Biol.* 12: 1 — 12.
- Zhang L., Zhao Y. L., Gao L. F., Zhao G. Y., Zhou R. H., Zhang B. S., Jia J. Z. 2012. *TaCKX6-D1*, the ortholog of rice *OsCKX2*, is associated with grain weight in hexaploid wheat. *New Phytol.* 195: 574 — 584. DOI:10.1111/j.1469-8137.2012.04194.x.

MARCIN RAPACZ**BARBARA JURCZYK****MONIKA SASAL**

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Marcin Rapacz Wydział Rolniczo-Ekonomiczny, Katedra Fizjologii Roślin, UR w Krakowie, ul. Podłużna 3, 30-239 Kraków, tel. (012) 4253301, w. 50, e-mail: rrapacz@cyf-kr.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.802.8.2018, Zadanie 11.

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

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

Celem projektu przewidzianego do realizacji w ciągu sześciu kolejnych zim jest określenie czynników wpływających na zimotrwałość pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego w warunkach polskich oraz czynników najbardziej różnicujących zimotrwałość badanych rodów. Cel realizowany jest na podstawie wieloletnich i wielopunktowych doświadczeń polowych z pomocą metod umożliwiających modelowanie wpływu różnych parametrów pogodowych/klimatycznych na badane cechy. W roku 2018 realizowane były dwa tematy badawcze.

TEMAT BADAWCZY 1: OCENA ZIMOTRWAŁOŚCI ORAZ MROZOODPORNOCI ROŚLIN

Celem tematu było określenie zimotrwałości, mrozoodporności całych roślin oraz mrozoodporności na poziomie komórkowym pszenicy i pszenżyta. Materiał do badań stanowiły rody pszenicy i pszenżyta ozimego w ilości 67 rodów/odmian pszenicy ozimej oraz 28 rodów/odmian pszenżyta ozimego wybranych spośród rodów/odmian badanych

w doświadczeniach wstępnych firm hodowlanych na rok 2017/18. Oceniana była: polowa zimotrwałość roślin w 7 punktach doświadczalnych dla pszenicy, a w 6 dla pszenżyta, 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 serii 1 temperaturę obniżono od 0°C do -15°C z szybkością 2°C na godzinę. Po 2 godzinach mrożenia w -15°C temperatura została podniesiona do +2°C z podobną szybkością.

W serii 2 przeprowadzony został test przedłużonego mrożenia (Waaen i in., 2011). 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.

Wnioski

- Wyniki ocen mrozoodporności wykonane techniką fluorescencyjną i testem polowo-laboratoryjnym były zgodne, za wyjątkiem pomiarów fluorescencji chlorofilu wykonywanych na liściach mrożonych przez 7 dni w temperaturze -8°C (seria 2).
- Wyniki pomiarów fluorescencji chlorofilu wykonywane po mrożeniu liści przez 7 dni w temperaturze -8°C nie wskazują poprawnie stopnia mrozoodporności roślin.
- Wyniki oceny przeżywalności roślin wykonywane testem polowo-laboratoryjnym przy mrożeniu przez 24 h w temperaturze -15°C były zgodne z wynikami uzyskanymi po mrożeniu przedłużonym (seria 2), jednakże w tym drugim przypadku uszkodzenia roślin były mniejsze co mogło spowodować nieujawnienie się niektórych różnic.

TEMAT BADAWCZY 2: OPRACOWANIE DANYCH POGODOWYCH — WSKAZANIE WSKAŹNIKÓW PRZEBIEGU ZIMY DECYDUJĄCYCH O ZIMOWANIU

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 zimą 2017/18.

Dane uzyskano dla wszystkich 10 lokalizacjach w jakich prowadzone były doświadczenia polowe. Obejmowały one m.in. przebieg temperatur (średnia, max., min.) w ciągu doby, ilość opadów, grubość okrywy śniegowej. Z pozyskanych danych wyliczone zostały wskaźniki przebiegu zimy (Waaen i in., 2013). W badaniach uwzględniono też opracowane w poprzednich latach realizacji projektu termiczne wskaźniki rozhartowywania roślin (Rapacz i in., 2017). Wobec niekompletności danych dostarczonych bezpośrednio z lokalizacji doświadczeń oraz w celu poprawy standaryzacji wyników wykorzystano dane z sieci stacji meteorologicznych OGIMET (<http://www.ogimet.com/>) dla lokalizacji bliskiej polu doświadczalnemu. Wartości

temperatur minimalnych oraz grubości okrywy śniegowej były w miarę dostępności weryfikowane dla rzeczywistych warunków pól doświadczalnych.

Zima 2017/2018 była łagodna i przebiegała podobnie we wszystkich punktach doświadczalnych (tab. 1). Temperatury stopniowo w sposób oscylacyjny obniżały się, a najniższe odnotowano na przełomie lutego i marca. Poza Dębiną okrywa śniegowa była cienka i krótkotrwała. Uszkodzenia zimowe roślin odnotowano jedynie w dwóch punktach doświadczalnych, w przypadku mniej zimotrwałej pszenicy ozimej.

Tabela 1

Zestawienie wybranych wskaźników przebiegu zimy z zimotrwałością roślin ocenioną w poszczególnych punktach doświadczalnych. Dane dla okresu XII-III. $DI_{T_{max}}$ — termiczny wskaźnik rozhartowywania roślin wyliczany na podstawie maksymalnych temperatur dobowych; $DI_{T_{mean}}$ — termiczny wskaźnik rozhartowywania roślin wyliczany na podstawie średnich temperatur dobowych

Punkt doświadczalny	Średnia zimotrwałość	Termiczny wskaźnik wegetacji	$DI_{T_{max}}$	$DI_{T_{mean}}$	Indeks mrozowy	Intensywność zimy	ilość dni $<-5^{\circ}C$	Temp. min.	Średnia ważona grubość okrywy śniegowej (cm)	Ilość cykli mrozowych	Ilość dni z lodem
Pszenica											
DED	7,8	27,4	-76,8	-108,0	288,7	4,0	41	-18,9	8,5	11	10
KBP	7,0	146,9	-16,0	-72,0	127,6	3,8	27	-14,4	2,2	9	10
NAD	9,0	123,7	-44,2	-86,7	158,6	4,0	30	-16,4	1,4	9	10
POB	9,0	65,5	-73,8	-110,3	202,1	3,7	31	-18,0	2,1	14	3
RAH	9,0	83,5	-59,0	-88,6	198,8	4,1	32	-15,3	3,1	10	3
SMH	9,0	103,3	-60,0	-112,1	148,2	4,0	26	15,0	3,3	9	4
STH	9,0	74,7	-63,7	-91,1	199,9	3,9	33	14,8	2,9	10	4
Pszenżyto											
CHD	9,0	103,3	-60,0	-112,1	148,2	2,8	26	-15,0	3,3	9	4
DED	9,0	27,4	-76,8	-108,0	288,7	4,0	41	-18,9	8,5	11	10
LAD	9,0	87,1	-61,1	-97,0	245,3	4,2	36	-17,9	5,5	13	10
RAH	9,0	83,5	-59,0	-88,6	198,8	4,1	32	-15,3	3,1	10	3
STH	9,0	74,7	-63,7	-91,1	199,9	3,9	33	-14,8	2,9	10	4
SZD	9,0	124	-47,8	-87,8	170,1	4,1	29	-14,3	2,1	11	4

Oznaczenia punktów doświadczalnych: **DED** — Dębina, **KBP** — Kobierzyce, **NAD** — Nagradowice, **POB** — Polanowice, **RAH** — Radzików, **SMH** — Smolice, **STH** — Strzelce, **CHD** — Choryń, **LAD** — Laski

Wnioski

- Zimą 2017/2018 przyczyny pogorszenia się zimowania pszenicy w dwóch lokalizacjach były odmienne.
- W przypadku Dębiny obniżone zimowanie związane było zapewne z wysoką intensywnością zimy i to pomimo stosunkowo grubej okrywy śniegowej. Stopień zimotrwałości w tym punkcie nie był jednak związany z mrozoodpornością roślin.
- W przypadku Kobierzyc, zima miała łagodny przebieg, ale skorelowanie stopnia zimotrwałości z wynikami polowo-laboratoryjnej oceny mrozoodporności wskazuje, że na słabsze przezimowanie mogły mieć wpływ elementy mikroklimatu, np. mroźne wiatry.

LITERATURA

- Rapacz M., Jurczyk B., Sasal M. 2017. Deacclimation may be crucial for winter survival of cereals under warming climate. DOI:10.1016/j.plantsci.2016.11.007. *Plant Sci.* 256: 5 — 15.
- Waalén W. M., Tanino K. K., Olsen J. E., Eltun R., Rognli O. A., Gusta L. V. 2011. Freezing Tolerance of Winter Canola Cultivars is Best Revealed by a Prolonged Freeze Test. DOI:10.2135/cropsci2011.02.0098. *Crop Sci.* 51: 1988 — 1996.
- Waalén W., Øvergaard S. I., Åssveen M., Eltun R., Gusta L. V. 2013. Winter survival of winter rapeseed and winter turnip rapeseed in field trials, as explained by PPLS regression. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.eja.2013.06.004>. *Eur. J. Agron.* 51: 81 — 90.

MIROSLAW TYRKA¹
GRZEGORZ FIC¹
MAGDALENA SZELIGA¹
MARCIN JAROMIN¹
PAWEŁ KRAJEWSKI²
PAWEŁ MILCZARSKI³
TADEUSZ DRZAZGA⁴
PRZEMYSŁAW MATYSIK⁵
RÓŻA MAZUR⁶
TERESA SIKORA⁷
EDWARD WITKOWSKI⁸
JUSTYNA BUCZKOWICZ¹
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

Kierownik Tematu: dr hab. Mirosław Tyrka Zakład Biotechnologii i Bioinformatyki, Politechnika Rzeszowska im. Ignacego Łukasiewicza, Al. Powstańców Warszawy 6, 35-959 Rzeszów, +48 17 8651927, e-mail: mtyrka@prz.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 decyzji HOR.hn.802.12.2018, Zadanie 109.

Selekcja genomowa pszenicy ozimej

Genomic selection of winter wheat

Słowa kluczowe: genotypowanie przez sekwencjonowanie, pszenica zwyczajna, zmienność epigenetyczna

CEL BADAŃ

Celem badań było poszerzenie wiedzy na temat uwarunkowań genetycznych i epigenetycznych kształtujących zmiany w wysokości plonowania. Plon jest niezwykle złożoną cechą, a hipoteza badawcza zakłada, że część tej zmienności jest kształtowana

przez zmiany epigenetyczne. Realizacja przewidzianego cyklu badań powoli na określenie udziału i roli tych zmian w kształtowaniu plonu.

Celem zadania jest:

1. wdrożenie metody genotypowania przez sekwencjonowanie (GBS) wrażliwej na metylację,
2. wykorzystanie metody GBS do oznaczenia zmienności genetycznej w grupie 200 genotypów pszenicy zwyczajnej scharakteryzowanych pod względem plonu,
3. ocena zmienności fenotypowej w doświadczeniu porównawczym w wybranych lokalizacjach.

OPIS WYNIKÓW

Pierwszy cel badawczy, tj. wdrożenie i optymalizację metody GBS realizowano w etapach: a) wybór endonuleaz 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 f) obróbka bioinformatyczna uzyskiwanych danych pozwalająca na ocenę pokrycia i powtarzalności wyników.

Dla 43 enzymów restrykcyjnych rozpoznających różne motywy 6-nuleotydowe określono liczbę fragmentów o wielkości w zakresie od 75 do 150 nukleotydów. Przewidziano % fragmentów unikalnych i ich rozkład w genomie podzielonym na partycje o wielkości 300 kpz. W efekcie przeprowadzonych symulacji komputerowych stwierdzono, że liczba fragmentów o wielkości w zakresie 75–150 pz generowana przez poszczególne enzymy wynosi średnio 147 tysięcy i w zależności od zastosowanego enzymu restrykcyjnego waha się w szerokim zakresie od 14 do 483 tys. fragmentów. Udział fragmentów unikalnych dla zestawu 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%. (tab. 1). Na podstawie danych o liczbie fragmentów unikalnych i pokryciu do wstępnych testów wybrano 3 enzymy restrykcyjne.

W drugim etapie symulacji przewidziano ilości i rozkład fragmentów po dodatkowym trawieniu redukcyjnym enzymem rozpoznającym motywy 4pz. Na podstawie symulacji komputerowej wybrano 5 kombinacji enzymów (oznaczonych M1-M5) i zaprojektowano adaptory dla 12 losowych barkodów odpowiadających odmianom pszenicy ozimej wybranym losowo z listy odmian roślin uprawnych (KWS Ozon, Mewa, Muszelka, Natula, Nutka, Opcja, Ostka Strzelecka, Ostroga, Owacja, Pokusa, Sailor i Satyna).

W celu weryfikacji symulacji, zaadaptowano metodykę Poland i in. (2012) do wytypowanych kombinacji enzymów restrykcyjnych. Stosowano adaptory do pierwszego enzymu. Fragmenty o docelowej wielkości 75–150 nukleotydów, po uwzględnieniu ligowanych adaptorów, wycinano z żelu, oczyszczano i charakteryzowano na fluorymetrze. Próbkę łączono w ilościach równomolowych i sekwencjonowano na aparacie Miseq zgodnie z instrukcją.

Tabela 1

Charakterystyka polimorfizmu w bibliotekach M1-5. W analizie rozkładu podano liczbę genotypów u których wykryto zmienność w tym samym locus

Biblioteka	M1		M2		M3		M4		M5	
Liczba wszystkich sekwencji	89396		97884		3046		406		6106	
Liczba sekwencji unikalnych	55550		56926		977		252		2083	
Średnie pokrycie	1,39	1,27	1,06	1,08	2,29	2,38	1,38	1,34	2,21	2,16
Rozkład										
12	2	0	0	0	5	3	0	0	3	3
11	0	0	4	3	5	5	0	0	12	10
10	3	0	0	0	16	15	0	0	30	13
9	1	1	3	3	31	14	0	0	45	29
8	13	1	3	2	41	15	0	0	66	29
7	40	9	3	3	47	14	3	2	113	42
6	147	21	13	11	75	28	2	1	179	52
5	489	111	40	33	137	43	1	1	261	66
4	1758	526	167	122	194	51	6	4	391	124
3	5240	2249	627	434	392	102	28	13	650	150
2	16316	8294	4325	2877	571	158	49	28	1065	278
1	65387	44338	92699	53438	1532	529	317	203	3291	1287

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). Wprowadzenie tego etapu do analizy miało na celu przyspieszenie docelowych obliczeń dla dużej liczby próbek. Najwyższa liczba sekwencji unikalnych była dla bibliotek M1 i M2. Sekwencje unikalne w bibliotekach M3-M5 stanowiły od 324 tysięcy do 575 tysięcy. Następnie wykonano dopasowanie unikalnych sekwencji 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). Dane o występowaniu SNP w poszczególnych badanych odmianach w bibliotekach M1-5 zebrano i przeanalizowano pod kątem zmienności (tab. 1). W bibliotekach M1 i M2 stwierdzono występowanie odpowiednio 89 tys. i 98 tys. fragmentów co przekracza możliwości rzetelnej oceny na aparacie Miseq. W przypadku bibliotek M3-M5 uzyskiwane liczby markerów były akceptowalne i pokrycie wystarczające do identyfikacji SNP można uzyskać na posiadanym aparacie. Analizując rozkład fragmentów w badanych odmianach do dalszych analiz na 200 genotypach wybrano kombinację M5.

W ramach realizacji drugiego etapu prac kombinację enzymów M5 wykorzystano do uzyskania i sekwencjonowania 3 bibliotek (po 67 genotypów każda). Uzyskane dane są w trakcie obróbki bioinformatycznej i będą wykorzystane do identyfikacji markerów epigenetycznych po skompletowaniu wyników oceny fenotypowej.

W ramach realizacji trzeciego celu badawczego założono doświadczenia w 5 lokalizacjach (Strzelce, Modzurów, Nagradowice, Smolice, Kobierzyce). Określono wysokość plonu ziarna o wilgotności 15% dla 200 genotypów badanych w 4 seriach w odniesieniu do wzorców w układzie bloków niekompletnych. We wszystkich seriach stwierdzono

istotne efekty związane z genotypem badanych linii. Analiza wariancji z uwzględnieniem lat i miejscowości wskazuje na celowość uzupełnienia analiz o zmienne towarzyszące uwzględniające warunki pogodowe panujące w trakcie wegetacji.

WNIOSKI

W efekcie przeprowadzonych badań wdrożono skalowalną metodykę skanowania całego genomu pszenicy. Wydajność opracowanego systemu docelowo powinna pozwalać na uzyskiwanie do 6000 markerów na genotyp. Proponowany system ma wydajność pośrednią pomiędzy markerami DArT bazującymi na hybrydyzacji (około 1000 markerów) a systemem DArTseq (około 20000 markerów). Uzyskano dane o plonowaniu 200 linii pszenicy ozimej po uzupełnieniu o dane z doświadczenia założonego w 2018 roku będą wartościowe bez względu na rozwój technologii markerowych i mogą służyć obliczaniu efektów selekcyjnych oraz identyfikacji markerów epigenetycznych związanych z plonowaniem.

LITERATURA

Poland J. A., Brown P. J., Sorrells M. E., Jannink J.-L. 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.

ALEKSANDRA PIETRUSIŃSKA

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych

Kierownik Tematu: dr Aleksandra Pietrusińska Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych 05-870 Błonie, tel. 22 7334507, e-mail: a.pietrusinska@ihar.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.802.19.2018, Zadanie nr 9.

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 brown rust (*Puccinia triticina*) in winter wheat

Słowa kluczowe: geny odporności, hodowla odpornościowa, piramidowanie genów odporności, pszenica ozima, mączniak prawdziwy zbóż i traw, rdza brunatna zbóż i traw

TEMAT BADAWCZY 1. PIRAMIDOWANIE EFEKTYWNYCH GENÓW ODPORNOŚCI

Cel tematu

Celem tematu badawczego 1 było wykonanie krzyżowań wypierających (wstecznych) z liniami wyselekcjonowanymi w 2017 roku. Jako rodziców wypierających wykorzystano 4 odmiany pszenic ozimych: Hondia, Euforia, RGT Bilanz, Formacja. Kolejny etap prowadzonych prac obejmował selekcję fenotypową materiału roślinnego pod kątem odporności/podatności na choroby grzybowe tj.: rdza brunatna zbóż i traw oraz mączniak prawdziwy zbóż i traw, a następnie przeprowadzenie selekcji molekularnej materiału roślinnego przy wykorzystaniu specyficznych markerów molekularnych pod kątem obecności wprowadzonych genów odporności (tab. 1). Końcowy etap prowadzonych prac obejmował wytypowanie genotypów o spiramidyzowanym tle odpornościowym.

Tabela 1

Selekcja molekularna materiału roślinnego przy wykorzystaniu specyficznych markerów molekularnych pod kątem obecności wprowadzonych genów odporności

Gen	Marker(y)
<i>Pm21</i>	NAU/xibao (902 pz) ¹
<i>Lr47</i>	(PSCAPSR+PS10L+PS10L2) ² (400 pz), Gwm60 (180 pz) ³
<i>Lr41</i>	Gdm35 (170 pz), Barc124 (250 pz), Gwm210 (182 pz), Gwm296 (135 pz), Gwm261 (160–200 pz) ⁴
<i>Pm34</i>	Xbarc177 (129-138 pz), Xbarc144 (235 pz) ⁵
<i>Pm37</i>	Gwm332 (192 pz), Wmc790 (149 pz), STSBE406627 (550 pz), STSBE445653 (750 pz) ⁶

Legenda: ¹Cao i in., 2006; ²Helguera i in., 2000; ³Vanzetti i in., 2006; ⁴Singh i in., 2004; ⁵Miranda i in., 2006; ⁶Perugini i in., 2008

Celem tematu badawczego 1 było również wytypowanie polimorficznego(ych) markera(ów) molekularnego(ych) wykorzystywanego(ych) do selekcji materiału roślinnego pod kątem obecności genu odporności na rdzę brunatną zbóż i traw — genu *Lr55*.

Opis wyników

Wykonano łącznie 16 kombinacji krzyżówek wstecznych, w których rodzicami wypierającymi były odmiany pszenic ozimych: Hondia, Formacja, RGT Bilauz oraz Euforia (tab. 2).

Tabela 2

Populacje mieszańcowe BIO w odniesieniu do piramid genowych oraz krzyżowań wstecznych

Lp.	Nazwa populacji	Piramida genowa	Krzyżowania wsteczne wykonane w 2018 roku
1	BIO_1	(<i>Lr41+Pm21+Lr47</i>)	Hondia (1) Formacja (2) RGT Bilauz (3) Euforia (4)
2	BIO_2	(<i>Lr4 +Pm21+Lr47+Pm34</i>)	Hondia (5) Formacja (6) RGT Bilauz (7) Euforia (8)
3	BIO_3	(<i>Lr41+Pm21+Lr47+Pm37</i>)	Hondia (9) Formacja (10) RGT Bilauz (11) Euforia (12)
4	BIO_4	(<i>Lr41+Pm21+Pm37+Lr47+Pm34</i>)	Hondia (13) Formacja (14) RGT Bilauz (15) Euforia (16)

Łącznie otrzymano 600 ziarniaków. Następnie w stadium drugiego liścia przeprowadzono inokulację roślin wykorzystując dwa różnicujące izolaty *B. graminis* oraz *P. recondita*. Na podstawie reakcji odporności/podatności do badań molekularnych wyselekcjonowano łącznie 300 linii, jednocześnie odpornych na oba patogeny. Przy wykorzystaniu specyficznych markerów DNA wytypowano linie o określonych piramidach genowych. Na podstawie przeprowadzonych analiz molekularnych wyselekcjonowano do dalszych badań genotypy o następującym profilu odpornościowym: (*Pm21 + Lr47 + Lr41*), (*Lr47 + Lr41 + Pm34 + Pm37*), (*Lr47 + Lr41 + Pm37*), (*Lr41 + Pm34 + Pm37*), (*Pm21 + Lr41 + Pm37*) oraz (*Pm21 + Pm34 + Pm37*).

Na podstawie analiz genetycznych ustalono rozmieszczenie genu *Lr55* wraz z markerami oraz określono odległości genetyczne pomiędzy nimi.

Wnioski

- Na drodze krzyżowań zbieżnych oraz wstecznych możliwe jest wprowadzenie do odmian pszenic uprawnych efektywnych genów odporności oraz różnych kombinacji tych genów.
- Przeprowadzone w badaniach testy fenotypowe skutecznie różnicują materiał roślinny pod kątem reakcji: odporności, podatności oraz typu pośredniego.
- Selekcja molekularna przy wykorzystaniu markerów DNA skutecznie identyfikuje w materiale roślinnym wprowadzane geny odporności.
- Potwierdzono, że gen *Lr55* zlokalizowany jest na chromosomie 1BS.
- Mapowany fragment jest związany z rejonem syntenicznym do *Elymus trachycaulis*.
- Na podstawie uzyskanych segregacji dla populacji mapującej (Bogatka × *Lr55*) do identyfikacji genu *Lr55* wyznaczono markery molekularne, które będzie można wykorzystywać do selekcji tego genu w materiale roślinnym.

TEMAT BADAWCZY 2. POSZUKIWANIE NOWYCH ŹRÓDEŁ ODPORNOŚCI

Cel tematu

W bieżącym roku sprawozdawczym, 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.

Opis wyników

Po 8–10 dniach od inokulacji oceniano reakcję roślin wykorzystując do tego pięciostopniową skalę Levine i Cherewick, gdzie rośliny o reakcji 0–2 oceniano jako odporne, 3–4 jako podatne (Czembor i Czembor, 2001). Doświadczenia obejmujące ocenę wykorzystywanych w badaniach źródeł odporności pod kątem reakcji na populację *P. recondita* potwierdziły, że za efektywne źródła odporności nadal można uznać linie z genami: *Lr41* oraz *Lr55*. Natomiast linia z genem odporności *Lr47* daje odporność częściową na *P. recondita* aktualnie występującą w Polsce. W odniesieniu do dawnej odmiany pszenicy Ostka Czerwona Lopuska (*Lr* unknown) badane izolaty wykazywały wysoki poziom wirulencji o typie reakcji ocenianej w skali 3–4. Testy fenotypowe przeprowadzone pod kątem reakcji materiału roślinnego na izolaty *B. graminis* potwierdziły, że efektywnymi źródłami na mączniaka prawdziwego pszenicy są linie z genem *Pm21* oraz *Pm37*. Natomiast linia z genem *Pm34* warunkuje odporność częściową. Wszystkie izolaty pszeniczne oraz pszenżytnie porażały dawną odmianę pszenicy Stieglera 22 (*Pm* unknown), klasyfikowaną w grupie odmian podatnych na *B. graminis* aktualnie występującą na terenie Polski.

Wnioski

- Izolaty *P. recondita* oraz *B. graminis* charakteryzowały się zróżnicowanym stopniem wirulencji w stosunku do genów odporności obecnych w zestawie odmian i linii różnicujących.

- Za efektywne źródła odporności na rdzę brunatną można uznać linie z genami: *Lr41* oraz *Lr55*, a także *Lr47*.
- Nowe źródło odporności na rdzę brunatną pszenicy odmiana Ostka Czerwona Lopuska (*Lr unknown*) była całkowicie porażana przez izolaty *P. recondita*.
- Za efektywne źródła na mączniaka prawdziwego można uznać linie z genami: *Pm21*, *Pm37* oraz *Pm34*.
- Nowe źródło odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw odmiana Stieglera 22 (*Pm unknown*) charakteryzowała się reakcją podatności na populację *B. graminis*.
- Formy dzikie i im pokrewne stanowią unikatowe źródła odporności na ważne z punktu widzenia hodowcy choroby.

TEMAT BADAWCZY 3. OCENA LINII W RÓŻNYCH WARUNKACH ŚRODOWISKOWYCH

Cel tematu

Celem tematu badawczego 3 w 2018 roku była ocena materiału roślinnego pod kątem reakcji na najczęściej występujące choroby zbóż oraz selekcja materiału roślinnego pod kątem korzystnych cech gospodarczych.

Opis wyników

Celem tematu badawczego 3 w 2018 roku była ocena materiału roślinnego pod kątem reakcji na najczęściej występujące choroby zbóż oraz selekcja materiału roślinnego pod kątem korzystnych cech gospodarczych. Jesienią 2017 roku, w trzech lokalizacjach: Radzików (IHAR — PIB), Strzelce (HR Strzelce) oraz Smolice (HR Smolice), założono selekcyjne doświadczenia jednopowtórzeniowe. Dla wszystkich punktów doświadczalnych materiał roślinny stanowiły 3240 linii pszenic ozimych. 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. Łącznie obserwowano 7 cech (na każdą z trzech miejscowości). Obiekty o wysokiej odporności na choroby oraz o korzystnych cechach gospodarczych stanowiły materiał wyjściowy do dalszych badań.

Przebieg doświadczenia w Radzikowie

Na poletkach doświadczalnych w Radzikowie wysiano łącznie 1056 linii. W odniesieniu do każdego obiektu przeprowadzono ocenę przezimowania. Materiał roślinny powszedził oraz przezimował prawie w 100% (2 linie nie przezimowały, co stanowiło 0,18%). Materiał roślinny charakteryzował się terminem kłoszenia typu średnio-wczesnego. Wszystkie oceny porażenia chorobami wykonane zostały przełom czerwca oraz lipca br. w odniesieniu do 9-stopniowej skali, gdzie 1 — oznacza całkowite porażenie, do 9 — brak objawów porażenia. Ciepła i sucha pogoda, prawdopodobnie przyczyniły się do występowania mączniaka prawdziwego w minimalnym nasileniu. Większość ocenianych linii pod kątem odporności na *B. graminis* oceniana była w skali od 7 do 9. Odnotowano występowanie rdzy brunatnej, żółtej (w dużym nasileniu) oraz septoriozy liści. Do dalszych etapów badań wytypowano rośliny o odporności na choroby ocenianej wg skali od 8 do 9 dla rdzy brunatnej oraz mączniaka prawdziwego, rdza żółta

oceniana od 7 do 9, septorioza liści od 5 do 9. Reszta materiału roślinnego została wyeliminowana z dalszych etapów badań. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji polowych wyselekcjonowano do dalszych badań 260 linii.

Przebieg doświadczenia w HR Strzelce

Jesienią 2017 roku na polu hodowlanym w Strzelcach wysiano w siewie rzędownym 1083 linie kłosowe pszenicy ozimej. Dodatkowo dla wybranych genotypów z zeszłego roku założono doświadczenie polowe z 20 liniami. Ze szczególną uwagą monitorowano rozwój mączniaka prawdziwego oraz rdzy brunatnej. Przebieg zimy w sezonie vegetacyjnym 2017/18 był dość łagodny, dlatego też, nie zaobserwowano znaczących różnic w przezimowaniu omawianych materiałów. W celu oceny cech rolniczych wykonano obserwacje daty kłoszenia oraz oceny występowania chorób grzybowych, wysokości i pokroju roślin. Pierwsze obserwacje dotyczące chorób grzybowych wykonano na przełomie maja i czerwca dotyczyły one pojawienia się objawów mączniaka prawdziwego. W celu porównania linii zestawiono je z odmianami wzorcowymi COBORU oraz najczęściej uprawianymi odmianami pszenicy. Wyselekcjonowano obiekty, celem sprawdzenia potencjału plonowania oraz zbadania podstawowych cech jakościowych.

Przebieg doświadczenia w HR Smolice

Na poletkach obserwacyjnych w Kobylin — Smolice wysiano po 3 rządki 364 linie pszenicy ozimej (razem 1092 linie). Ocena materiału roślinnego dokonywana była w odniesieniu do 9-stopniowej skali, gdzie 1 — oznacza całkowite porażenie, do 9 — brak objawów porażenia. Wszystkie materiały powschodziły i przezimowały bardzo dobrze (100%). Septorioza liści w roku bieżącym nie wystąpiła, natomiast mączniak prawdziwy zbóż i traw wystąpił w bardzo małym nasileniu. Dodatkowo materiał roślinny oceniono pod kątem wylegania. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji polowych do doświadczeń zakładowych DZ I wytypowano 29 linii. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji polowych w 2018 roku linie, które wyselekcjonowano w 2017 roku wyeliminowano z dalszej analizy ze względu na niską plenność oraz porażenie chorobami.

Wnioski

- Warunki atmosferyczne panujące w 3 lokalizacjach w sezonie 2017/2018 były niesprzyjające dla rozwoju mączniaka prawdziwego zbóż i traw.
- W sezonie 2017/2018 we wszystkich punktach doświadczalnych wystąpiła rdza brunatna oraz żółta.
- W Smolicach nie wystąpiła septorioza liści.
- Na podstawie przeprowadzonych obserwacji wytypowano genotypy do dalszych badań.

LITERATURA

- Cao A. Z., Wang X. E., Chen Y. P., Zou X. W., Chen P. D. 2006. A sequence-specific PCR marker linked with *Pm21* distinguishes chromosomes 6AS, 6BS, 6DS of *Triticum aestivum* and 6VS of *Haynaldia villosa*. *Plant Breeding* 125: 201 — 205.
- 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.

- Helguera M., Khan I. A., Dubcovsky J. 2000. Development of PCR markers for the wheat leaf rust resistance gene *Lr47*. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1137 — 1143.
- Mains E. B., Dietz S. M. 1930. Physiologic forms of barley mildew, *Erysiphe graminis hordei* Marchal. *Phytopathol.* 20: 229 — 239.
- Miranda L. M., Murphy J. P., Leath S., Marshall D. 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.
- Perugini L. D., Murphy J. P., Marshall D., Brown-Guedira G. 2008. *Pm37*, a new broadly effective powdery mildew resistance gene from *Triticum timopheevii*. *Theor. Appl. Genet.* 116: 417 — 425.
- Singh S., Franks C. D., Huang L., Brown-Guedira G. L., Marshall D. S., Gill B. S. 2004. *Lr41*, *Lr39*, and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS. *Theor. Appl. Genet.* 108: 586 — 591.
- Vanzetti L. S., Brevis J. C., Dubcovsky J. 2006. Identification of microsatellites linked to *Lr47*. *Electronic Journal of Biotechnology* 9 (3): 267 — 271.

HALINA WIŚNIEWSKA¹

MACIEJ MAJKA¹

MAGDALENA GAWŁOWSKA¹

MAREK KORBAS²

JOLANTA BELTER¹

¹ Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

² Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Poznań

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Halina Wiśniewska Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk,
Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, tel. 662044293, e-mail: hwis@igr.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. 802.18.2018, Zadanie 2.

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***

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

WSTĘP

Łamliwość źdźbła to jedna z najważniejszych chorób pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) Powodowana jest przez dwa grzyby patogeniczne *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*. Szczególnie podczas łagodnych zim i chłodnych wiosen, na zewnętrznych pochwach liści pszenicy występują bursztynowo-brązowe plamy. W trakcie vegetacji patogen z pochw liściowych przedostaje się na podstawy źdźbła, gdzie na obszarze plam w źdźble tworzy się watowata grzybnia. Skutkiem tego podstawa źdźbła próchnieje i powoduje łamliwość źdźbła, co może powodować ubytek plonu nawet do 50%. Istnieje kilka źródeł odporności na łamliwość podstawy źdźbła, lecz dotąd tylko dwa geny, *Pch1* i *Pch2* zostały przeniesione do pszenicy uprawnej i warunkują odporność. Gen *Pch1* jest najbardziej efektywny, został zidentyfikowany w *Aegilops ventricosa* i translokowany do długiego ramienia chromosomu 7D heksaploidalnej pszenicy (Maia i in., 1967).

Nie zapewnia on całkowitej odporności rośliny, jednakże znacząco redukuje skalę porażenia. Drugim genem, który w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła jest *Pch2* zlokalizowany na dłuższym ramieniu chromosomu 7A pszenicy odmiany „Capelle-Desprez” (Burt i in., 2014).

Cele badań w roku 2018:

- piramidyzacja genów odporności *Pch1* i *Pch2* na łamliwość źdźbła u pszenicy.
- Identyfikowanie w genotypach pszenicy ozimej obecności genu *Pch1* przy użyciu markera izoenzymatycznego w postaci endopeptydazy *EpD1b* oraz genów *Pch1* i *Pch2* przy użyciu markerów SSR,
- ocena porażenia siewek genotypów pszenicy (test w fitotronie) i dojrzałych źdźbeł (test polowy) po inokulacji zawiesiną grzybni i zarodników *O. yallundae* i *O. acufiformis* oraz ocena naturalnego porażenia w lokalizacjach,
- analiza elementów struktury plonu badanych form — określenie wpływu genów *Pch1* i *Pch2* na cechy agronomiczne.

MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy dla piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2* stanowiły formy pszenicy z genami *Pch1* i *Pch2* wyselekcjonowane we wcześniejszych badaniach oraz formy bez tych genów — **temat badawczy nr 1**. Materiał do identyfikacji w genotypach pszenicy genów *Pch1* i *Pch2* oraz do oceny podatności genotypów pszenicy na łamliwość źdźbła w testach inokulacyjnych siewkowych i polowych stanowiło 200 genotypów pszenicy ozimej o zróżnicowanym podłożu genetycznym, trzy odmiany kontrolne, odm. Rendezvous — wzorzec odporności — **temat badawczy nr 2 i 3**.

WYNIKI

Temat badawczy 1

Krzyżowania genotypów wybranych na podstawie wcześniejszych badań w celu piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2*

Wykonano krzyżowania wewnątrzgatunkowe (3 kombinacje) form pszenicy o stwierdzonej wcześniej podwyższonej odporności na patogeny z rodzaju *Oculimacula* oraz ze zidentyfikowanymi przy pomocy markerów molekularnych genów *Pch1* i *Pch2* związanych z odpornością na te patogeny oraz formy bez genów *Pch1* i *Pch2*. Uzyskano 236 ziarniaków mieszańcowych.

Temat badawczy 2

Wytworzenie skutecznego systemu markerów do identyfikacji molekularnej spiramidyzowanych genów *Pch1* i *Pch2*

W badaniach wykorzystano 5 markerów molekularnych (tab. 1). Wykazano obecność markerów *Pch1* i/lub *Pch2* w 25 genotypach pszenicy ozimej. U odmiany odpornej Rendezvous, a także w 5 badanych genotypach pszenicy stwierdzono przy pomocy markera izoenzymatycznego *EpD1b* i markerów molekularnych *Xust2001*, *Xorw1* obecność genu *Pch1*, a za pomocą pozostałych markerów molekularnych *Xcfa2040*,

Xwmc525 obecność genu *Pch2*. Geny te warunkują odporność pszenicy na grzyby patogeniczne z rodzaju *Oculimacula*, wywołujące chorobę zwaną łamliwością źdźbła (15,4% badanego materiału); u 5 z tych genotypów potwierdzono obecność genu *Pch1* i *Pch2* również pozostałymi użytymi w badaniach markerami. U kolejnych 4 genotypów pszenicy zaobserwowano przerwanie sprzężenia markera *Xust2001* z genem *Pch1*, wykazano obecność genów *Pch1* i *Pch2* pozostałymi markerami.

U 49 linii pszenicy ozimej stwierdzono tylko gen *Pch2*, a u pozostałych badanych genotypów pszenicy nie stwierdzono obecności genów *Pch1* *Pch2*.

Tabela 1

Markery molekularne wykorzystane w badaniach

Lp.	Marker	Gen	Lokalizacja w chromosomie
1	<i>EpD1b</i> (izoenzymatyczny)	<i>Pch1</i>	7D
2	<i>Xust2001</i>	<i>Pch1</i>	7D
3	<i>Xorw1</i>	<i>Pch1</i>	7D
4	<i>Xcfa2040</i>	<i>Pch2</i>	7A
5	<i>Xwmc525</i>	<i>Pch2</i>	7A

Temat badawczy 3

Testy inokulacyjne badanych genotypów pszenicy oraz obserwacje naturalnego porażenia genotypów przez *O. acufiformis* i *O. yallundae* na poletkach doświadczalnych w kilku miejscach Polski.

Zbiór materiału roślinnego inokulowanego oraz analiza porażenia przez *O. acufiformis* i *O. yallundae* w celu selekcji genotypów odpornych. Analiza korelacji między cechami fenotypowymi roślin a ich odpornością na łamliwość podstawy źdźbła.

Nie obserwowano naturalnego porażenia pszenicy w naturalnych warunkach. Genotypy z genami *Pch1* i *Pch2* cechowały się najmniejszym porażeniem siewek. Genotypy posiadające tylko gen *Pch1* wykazywały niższe porażenie siewek, niż genotypy posiadające tylko gen *Pch2*. Taka sama zależność obserwowana była dla inokulacyjnego testu polowego. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna z poletka. Stwierdzono brak istotnego wpływu obecności genów *Pch1*, *Pch2* lub ich braku na masę tysiąca ziarniaków (MTZ).

Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna z poletka, chociaż plon był najwyższy przy obecności obu genów. Obserwowano również brak istotnego wpływu obecności genów *Pch1*, *Pch2* lub ich braku na masę tysiąca ziarniaków.

WNIOSKI

1. Z kombinacji krzyżówkowych związanych z piramidyzacją u pszenicy genów *Pch1* i *Pch2* uzyskano 236 ziarniaków mieszańcowych — **temat badawczy 1**.
2. U odmiany odpornej *Rendezvous*, a także w 5 genotypach pszenicy stwierdzono przy pomocy markera izoenzymatycznego *EpD1b* i markerów molekularnych *Xust2001*, *Xorw1* obecność genu *Pch1*, a za pomocą pozostałych markerów molekularnych

- Xcfa2040*, *Xwmc525* obecność genu *Pch2* (15,4% badanego materiału) — **temat badawczy nr 2.**
3. U 49 genotypów pszenicy stwierdzono tylko gen *Pch2* — **temat badawczy nr 2.**
 4. Genotypy z genami *Pch1* i *Pch2* cechowały się najmniejszym porażeniem siewek — **temat badawczy nr 3.**
 5. Genotypy posiadające tylko gen *Pch1* wykazywały niższe porażenie siewek, niż genotypy posiadające tylko gen *Pch2*. Taka sama zależność obserwowana była dla inokulacyjnego testu polowego — **temat badawczy nr 3.**
 6. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna z poletka i masę tysiąca ziarniaków — **temat badawczy 3.**

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.
- Maia N. 1967. Obtention de blés tendres résistants au piétin-verse (*Cercospora herpotrichoides*) par croisements interspécifiqu. *es. CR Acad. Agric. Fr.* 52: 149 — 154.

WACŁAW ORCZYK**MARTA DMOCHOWSKA-BOGUTA****YULIYA KLOC**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Zakład Inżynierii Genetycznej

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Wacław Orczyk Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Zakład Inżynierii Genetycznej, 05-870 Błonie, tel. 22 7334621, e-mail w.orczyk@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 8.

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

Tolerance for abiotic stresses — genotyping of wheat based on candidate gene strategy

Słowa kluczowe: genom pszenicy, mikrosporogeneza, sekwencje mikrosatelitarne, susza, wypełnienie kłosa, żywotność pyłku

CELE TEMATÓW W ROKU 2018

- Sekwencjonowanie fragmentów gDNA pszenicy z określonymi regionami SSR w genotypach pszenic różniących się tolerancją na stres suszy w czasie mikrosporogenezy.
- Eksperymentalna weryfikacja poznanych sekwencji w genotypach pszenic różniących się tolerancją na stres suszy w czasie mikrosporogenezy.

WYNIKI

W trzech skafoldach pszenicy zawierających wybrany gen kandydujący *TaInv1* sekwencjonowano 9 regionów SSR. Były to Reg29-404 zawiera dwa motywy (CT)2-AC-(CT)6 i jest zlokalizowany na skafoldzie 4041295BL, Reg32-404 zlokalizowany na skafoldzie 404129 5BL zawiera dwa sprzężone motywy (CAGC)3-(AAGA)5, Reg35-404 zlokalizowany na skafoldzie 404129 5BL zawiera sekwencję mikrosatelitarną z motywem AG powtórzoną 18 razy, Reg41-404 zlokalizowany na skafoldzie 404129 5BL zawiera dwa sprzężone motywy

(GGC)5-(GCG)5 oraz Reg3-435 zlokalizowany na skafoldzie 435640 5DL zawiera dwa sprzężone motywy (GAT)10-(GAA)9.

PODSUMOWANIE I WNIOSKI

1. Na wszystkich analizowanych skafoldach genomu pszenicy zidentyfikowano sekwencje mikrosatelitarne (SSR).
2. Najwięcej SSR było na najdłuższym skafoldzie 4041295BL, na tym skafoldzie zagęszczenie SSR było największe, 1 SSR na 10 tysięcy pz (tpz).
3. Wśród zidentyfikowanych SSR motywy 2-nukleotydowe były w 6 SSR, motyw 3-nukleotydowy był w 3 SSR. Przeważały motywy niedoskonałe tj. przedzielone krótką wstawką. W 2 przypadkach regionom SSR towarzyszył region o niepoznanej sekwencji nukleotydowej.
4. Projektowanie starterów w praktycznie wszystkich regionach napotkało duże trudności ze względu na i) nierównomierny rozkład par AT i GC w obszarach flankujących SSR, ii) znacznie zwiększony udział AT lub GC w całym regionie i iii) niedoskonałe powtórzenia kilkunukleotydowych motywów w regionach gdzie powinny być startery do amplifikacji.
5. Wyniki sekwencjonowania potwierdziły obecność regionów SSR wytypowanych we wcześniejszych analizach *in silico* w badanych genotypach pszenic.
6. Wyniki sekwencjonowania regionów SSR wykazały polimorfizm długości tych regionów w wybranych genotypach pszenic.
7. Rozdziały elektroforetyczne amplikonów zawierających regiony SSR potwierdziły polimorfizm długości tych regionów w 12 testowanych genotypach pszenic.
8. Dla przynajmniej czterech regionów zawierających sekwencje mikrosatelitarne polimorfizm zidentyfikowany po sekwencjonowaniu był również obserwowany po rozdziale amplikonów w żelu poliakrylamidowym. W kolejnym etapie analizowana będzie zbieżność tych polimorfizmów z obserwowanymi wcześniej danymi żywotności pyłku i stopnia wypełnienia kłosów.

MAGDALENA SZECHYŃSKA-HEBDA¹

NATALIA HORDYŃSKA¹

STANISŁAW GRZESIAK¹

MACIEJ GRZESIAK¹

LIDIA SAS-PASZT²

ANNA LISEK²

BEATA SUMOROK²

EDYTA DERKOWSKA²

KRZYSZTOF WESZCZAK²

MATEUSZ FRĄC²

MICHAŁ PRZYBYŁ²

PAWEŁ TRZCIŃSKI²

SŁAWOMIR GŁUSZEK²

¹Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN

²Instytut Ogrodnictwa

Kierownik Tematu: dr hab. Magdalena Szechyńska-Hebda Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN

ul. Niezapominajek 21, 30-239 Kraków, tel. 12 4251833, e-mail: m.szechynska@ifr-pan.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.802.15.2018, Zadanie 103.

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

Słowa kluczowe: mikroorganizmy pożyteczne, pszenica, ryzosfera, susza

CEL BADAŃ

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. Dotychczas prowadzone badania podstawowe i prace o charakterze aplikacyjnym koncentrowały się na określaniu mechanizmów tolerancji roślin na stres suszy, typowaniu cech przydatnych do selekcji roślin odpornych i na stosowaniu pożytecznych

mikroorganizmów, głównie arbuskularnych grzybów mikoryzowych dla polepszenia warunków glebowych. Prowadzone przez nas badania nie tylko łączą te zagadnienia, ale również znacząco je rozszerzają. Celem analiz jest bowiem określenie specyficznych genotypowo interakcji roślina-mikroorganizmy glebowe, które determinują odporność roślin na stres suszy na poziomie systemu korzeniowego.

WYNIKI

W pierwszym etapie badań przeprowadzano charakterystykę fizjologiczną 20 genotypów pszenicy jarej w aspekcie ich odporności na stres umiarkowanej suszy. Wytypowano genotypy, które produkują stabilnie wysoką biomasę (DM) i plon ziarna (GY) zarówno w warunkach suszy i kontroli, pół-stabilne genotypy osiągające odpowiednio niższy DM i GY, i wrażliwe genotypy o najniższych DM i GY. Ostatecznie do dalszych doświadczeń wytypowano sześć genotypów z skrajnych grup, które wykazały dużą tolerancję lub dużą wrażliwość na deficyt wody w glebie. Telimena, Sirocco, Goplana wybrane zostały jako genotypy wrażliwe na stres suszy; Struna, SMJ 2115, Sharki jako genotypy odporne na stres suszy. Wskaźnik podatności na suszę (DSI), wskaźnik tolerancji stresu (STI), indeks naprężenia (SI), średnia geometryczna produktywność (GMP) były indeksami najbardziej użytecznymi dla charakterystyki wybranych genotypów. Przygotowano konsorcja mikroorganizmów w oparciu o szczepy dostępne w SYMBIO-BANKu. Konsorcja o różnym składzie, przetestowano względem synergistycznej aktywności mikroorganizmów w konsorcjach i wytypowano trzy najbardziej efektywne konsorcja. Zastosowanie mikroorganizmów wpłynęło na zwiększenie wzrostu nadziemnych części roślin w optymalnych warunkach wodnych i w warunkach stresu suszy, wskazując, że mogą one ograniczać negatywne skutki niedoboru wody.

WNIOSKI

Zależność genotypowa tolerancji na suszę jest czynnikiem krytycznym, jednak może ona być modyfikowana przez mikroorganizmy glebowe.

MAGDALENA SZECHYŃSKA-HEBDA¹

NATALIA HORDYŃSKA¹

MARIA PILARSKA¹

IRENEUSZ ŚLESIAK¹

MARIA WĘDZONY¹

JOANNA TROCZYŃSKA²

ZOFIA BANASZAK²

¹ Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN, Kraków

² DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.

Kierownik Tematu: dr hab. Magdalena Szechyńska-Hebda Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN
ul. Niezapominajek 21, 30-239 Kraków, tel. 12 4251833, e-mail: m.szechynska@ifr-pan.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.802.15.2018, Zadanie 80.

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

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

Zjawisko albinizmu roślin regenerowanych z androgenicznych kultur pylnikowych stanowi istotny problem ograniczający wykorzystanie androgenyzy w hodowli zbóż. Doniesienia naukowe wskazują, że poziom albinizmu zależy od genotypu oraz rodzaju i natężenia stresu stosowanego w celu indukcji androgenyzy. W przedstawionych badaniach analizowane są możliwości zastosowania alternatywnych stresów indukujących proces androgenyzy pszenicy i pszenżyta, które umożliwiają ograniczenie zjawiska albinizmu w kulturach *in vitro*. Cel badawczy ukierunkowany został na poznanie mechanizmów blokady biogenezy chloroplastów oraz ich regulacji przez stosowane alternatywne czynniki stresowe. Badania prowadzone są dla genotypów scharakteryzowanych wcześniej jako podatne na zjawisko albinizmu *vs* genotypy regenerujące wysoki procent roślin zielonych.

Uzyskane w roku 2018 wyniki wskazują, że zależność genotypowa jest czynnikiem krytycznym w procesie androgenезы i determinuje regenerację roślin zielonych/albinotycznych. Jednak, czynnikiem modyfikującym proces androgenезы może być termin zbioru kłosów, temperatura podczas wzrostu roślin donorowych, wczesność faz osiągniętych na poszczególnych etapach rozwoju roślin. Chłodne zimy, szybszy termin wysiewu, lub wcześniejsze genotypy, wpływają następczo na zwiększenie efektywności procesu androgenезы. Dane te wskazują na znaczenie fotosyntezy i sygnałów stresowych zależnych od procesu fotosyntezy w procesach indukcji przeprogramowania rozwoju gematofitycznego w sporofityczny. Jednoznacznie skorelowano wyższy poziom stresu oksydacyjnego podczas stosowania niższej temperatury z lepszą efektywnością regeneracji roślin zielonych. Uzasadnione jest zatem stosowanie stresu chłodu jako pozytywnego regulatora przeprogramowania rozwoju mikrospor i regeneracji roślin zielonych e procesie androgenезы. Podczas doświadczeń stwierdzono również, że dodatkowo zastosowany stres wysokiego natężenia światła może podwyższyć parametry regeneracji, jednak dotyczy to wyłącznie genotypów podatnych na proces androgenезы. W genotypach opornych po zastosowaniu dodatkowego stresu wysokiego natężenia światła obserwowano zjawisko szybszego dojrzewania ziaren pyłku, zamiast przeprogramowania mikrospor.

Wiele tych procesów regulowanych jest przez odpowiednie zbalansowanie ROS i systemu antyoksydacyjnego. Wpływ ROS na funkcjonowanie fotosystemów chloroplastowych i ich rola w przekazie sygnałów komórkowych i międzykomórkowych zostały potwierdzone eksperymentalnie (Szechyńska-Hebda i in., 2010). Egzogenna aplikacja H_2O_2 oraz zablokowanie enzymu rozkładającego H_2O_2 (CAT) zwiększała ilość regenerantów zielonych, podczas gdy zablokowanie SOD, enzymu rozkładającego anionorodnik ponadtlenkowy i produkującego jednocześnie H_2O_2 , ograniczała regenerację. Inhibitor CAT powodował natomiast częściową blokadę rozwoju chloroplastów i albinizm (Szechyńska-Hebda i in., 2012). Wskazano również, że chloroplasty i retorsygnaly pełnią rolę w PCD i zbalansowanie systemu antyoksydacyjnego jest kluczowym czynnikiem w tym procesie (Wituszyńska i in., 2014). Brak odpowiednich sygnałów rozwojowych na poziomie plastydów/chloroplastów może prowadzić zatem do autoeliminacji mikrospor zdolnych do przeprogramowania rozwoju w kierunku sporofitycznym (indukcja PCD). Faktycznie, zastosowanie światła o wysokim natężeniu spowodowało szereg zmian metabolicznych, z których przynajmniej część może być specyficzna i wpływać następczo na przeprogramowanie mikrospor podczas chłodzenia i na efektywność procesu androgenезы. Specyficzne wydają się być między innymi zmiany aktywności peroksydaz — enzymów antyoksydacyjnych, które pełnią rolę ochronną w warunkach stresu oksydacyjnego (m.in. indukowanego w warunkach niskiej temperatury). Genotypy, które scharakteryzowane zostały jako podatne na proces androgenезы miały prawie czterokrotnie wyższe wartości aktywności puli peroksydaz na każdym etapie procesu androgenезы. Natomiast, zmiany aktywności SOD były priorytetowo zależne od warunków środowiska; a nie specyfiki procesu androgenезы. Zmiany aktywności CAT były genotypowo zależne; znacznie wyższe wartości obserwowano dla genotypów pszenżyta. W roślinach albinotycznych

reakcje stresowe były osłabione, między innymi w wyniku upośledzonego aparatu fotosyntetycznego i osłabionego procesu fotosyntezy. Zawartość białek fotosyntetycznych w regenerowanych roślinach albinosów była poniżej poziomu detekcji. Synteza białek PsbO, Lhcb2, D2 była szczególnie ograniczona.

WNIOSKI

1. Zależność genotypowa jest czynnikiem krytycznym w procesie androgenezy.
2. Stres chłodu jest pozytywnym regulatorem procesu androgenezy, a dodatkowo zastosowany stres wysokiego natężenia światła może podwyższyć parametry regeneracji, jednak dotyczy to wyłącznie genotypów podatnych na androgenezę.
3. Czynnikiem modyfikującym proces androgenezy może być względnie wyższy poziom stresu oksydacyjnego i zbalansowanie enzymatycznego systemu antyoksydacyjnego.
4. Obniżona synteza białek fotosyntetycznych PsbO, Lhcb2, D2 jest ograniczeniem w formowaniu prawidłowych struktur chloroplastowych i przekazywaniu odpowiednich sygnałów komórkowych.

LITERATURA

- Szechyńska-Hebda M., Kruk J., Gorecka M., Karpinska B., Karpinski S. 2010. Evidence for light wavelength-specific photoelectrophysiological signaling and memory of excess light episodes in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 22: 2201 — 2218.
- Szechyńska-Hebda M., Skrzypek E., Dąbrowska G., Wędzony M., van Lammeren A. 2012. The effect of endogenous hydrogen peroxide induced by cold treatment in the improvement of tissue regeneration efficiency, *Acta Physiol Plant.* 34: 547 — 560.
- Wituszewska W., Slesak I., Vanderauwera S., Szechyńska-Hebda M., Kornas A., Van Der Kelen K., Muhlenbock P., Karpinska B., Mackowski S., Van Breusegem F., Karpinski S. 2013. LESION SIMULATING DISEASE1, ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1, and PHYTOALEXIN DEFICIENT4 conditionally regulate cellular signaling homeostasis, photosynthesis, water use efficiency, and seed yield in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 161: 1795 — 1805.

PIOTR T. BEDNAREK**RENATA ORŁOWSKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Piotr T. Bednarek Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy

Instytut Badawczy, Radzików, Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, 05-870 Błonie, tel. 601827259,

22 7334533, e-mail: p.bednarek@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 12.

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

Analysis of somaclonal variation induced in cereals tissue cultures

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

Prace w prezentowanym zadaniu w 2018 roku realizowano w trzech tematach badawczych z następującymi celami:

- uzyskanie regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta z roślin donorowych w kulturach niedojrzałych zarodków zygocycznych oraz w kulturach pylnikowych według parametrów prowadzenia kultur *in vitro* uzyskanych w procesie optymalizacji,
- uzyskanie genomowego DNA z regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta oraz wykonanie analiz techniką metAFLP na pozyskanym DNA,
- przygotowanie matryc zerojedynkowych z autoradiogramów otrzymanych z analizy techniką metAFLP dla DNA regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta. Określenie zmienności genetycznej i metylacyjnej indukowanej *in vitro* u regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8), pszenicy (genotyp P2/9, Svilena) i pszenżyta (genotyp 28/2) z doświadczenia weryfikującego proces optymalizacji.

MATERIAŁY I METODY

Regeneranty zostały wyprowadzone z roślin donorowych (Dopt), które otrzymano w ubiegłym roku (2017) trwania projektu. Embriogeneza somatyczna była prowadzona z 36 sztuk roślin donorowych (po 12 roślin z każdego gatunku: jęczmień genotyp-2dh/8,

pszenica genotyp-P2/9 i pszenżyto genotyp-28/2). Do etapu indukcji zastosowano pożywkę MS (Murashige i Skoog, 1962) z dodatkiem 2mg/l 2,4D dla wszystkich gatunków. Każda pożywka indukująca została wykonana w czterech różnych wariantach (tab. 1) ze względu na dodatek CuSO₄, AgNO₃ oraz różny czas utrzymania zarodków na tej pożywce, wg warunków zoptymalizowanych metodą Taguchiego.

Tabela 1

Zestawienie warunków zoptymalizowanych wg metody Taguchiego — doświadczenie weryfikujące. M10 — warunki kontrolne, M11 — warunki zoptymalizowane w kierunku uzyskania maksymalnej liczby zielonych regenerantów na 100 wyłożonych pylników, M12 — warunki zoptymalizowane w kierunku maksymalnej całkowitej zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* (TTCIV — Total Tissue Culture Induced Variation), M13 — warunki zoptymalizowane w kierunku minimalnej TTCIV

Gatunek	Somatyczna embriogeneza			Androgeneza		
	CuSO ₄ (μM)	AgNO ₃ (μM)	Czas (dni)	CuSO ₄ (μM)	AgNO ₃ (μM)	Czas (dni)
Jęczmień						
M10 kontrola	0,1	0	21	0,1	0	21
M11 MAX Z REG/100Pyl	-	-	-	10	30	21
M12 MAX TTCIV	10	60	28	10	60	21
M13 MIN TTCIV	2,76	30	34	2,95	15	28
Pszenica						
M10 kontrola	0,1	0	28	0,1	0	35
M11 MAX Z REG/100Pyl	-	-	-	0,1	60	37
M12 MAX TTCIV	10	60	28	0,1	60	37
M13 MIN TTCIV	1	0	42	10	25	35
Pszenżyto						
10M kontrola	0,1	0	28	0,1	0	35
M11 MAX Z REG/100Pyl	-	-	-	10	0	49
M12 MAX TTCIV	0	60	42	0,1	60	49
M13 MIN TTCIV	10	30	42	10	0	23

Do regeneracji zastosowano pożywkę K4 (Kumlehn i in., 2006) z 1mM BAP dla jęczmienia oraz 190-2 (R1) (Zhuang i Xu, 1983) uzupełniona regulatorami wzrostu (Pauk et al. 1991), 0,5mg/l NAA i 0,5mg/l kinetyną dla pszenicy i pszenżyta. Zregenerowane, zielone rośliny przeniesiono do kolb na pożywkę ukorzeniającą jednakową dla wszystkich gatunków: 190-2 (N₆J) z 2 mg/l IAA.

Androgeneza była prowadzona z 48 roślin donorowych (po 12 roślin jęczmienia genotyp-2dh/8 i pszenicy odmiana Svilena oraz 24 rośliny pszenżyta genotyp-28/2). Kłosa chodzono w 4°C przez 3–4 tygodnie w zależności od gatunku w ciemności. Pylniki wyłożono na następujące pożywki indukujące: N6 (Chu 1987), (makro i mikroelementy (Li i in. 1988) z dodatkiem 80 g/l maltozy oraz z dodatkiem 2 mg/l 2,4D, 0,5 mg/l NAA i 0,5 mg/l kinetyny dla jęczmienia, C17 z 2 mg/l 2,4D dla pszenicy oraz 190-2 (SM) (Zhuang i Xu, 1983) uzupełniona 90 g/l maltozy, 438mg/l glutaminy, 2 mg/l 2,4-D oraz 0,5 mg/l kinetyny dla pszenżyta. Każda pożywka indukująca została wykonana w czterech różnych wariantach (tab. 1) z uwzględnieniem odpowiedniej ilości CuSO₄, AgNO₃ oraz różnego czasu utrzymania pylników na tej pożywce. Regenerację regenerantów prowadzono na pożywkach: K4 (z 0,225 mg/l BAP dla jęczmienia

(Kumlehn i in., 2006) i 190-2 (R1) (Zhuang i Xu, 1983) uzupełniona regulatorami wzrostu (Pauk i in., 1991), 0,5 mg/l NAA i 0,5mg/l kinetyną dla pszenicy i pszenżyta. Zielone regeneranty ukorzeniano w kolbach na pożywce 190-2 (N₆J) z 2 mg/l IAA jednakowej dla wszystkich gatunków.

Efektywność pozyskiwania podwojonych haploidów (DH) określono jako ilość regenerantów o podwojonym garniturze chromosomowym (DH) do wszystkich zielonych regenerantów (DH + H — zielone regeneranty haploidalne) i wyrażono w procentach.

W celu porównania wyników z różnych wariantów doświadczeń obliczenia wykonywano na liczbie zielonych regenerantów przypadających na 100 wyłożonych pylników. W oparciu o uzyskane wyniki przeprowadzono testy *F* analizy wariancji (ANOVA) wraz z grupowaniem średnich za pomocą procedury Tukeya przy założonym poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Z siewek regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8), pszenicy (genotyp P2/9, Svilena) i pszenżyta (genotyp 28/2) wykonano ekstrakcję DNA (Qiagen). Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie a czystość oraz integralność preparatów zweryfikowano w żelu agarozowym. Tak pozyskane DNA przygotowano do techniki metAFLP i wykoano analizy ta techniką z 8 parami selektywnych starterów. Z uzyskanych elektroforegramów policzono prążki DNA i przygotowano dane do szacowania zmienności genetycznej i metylacyjnej w badanym materiale roślinnym.

Policzono wszystkie uzyskane fragmenty DNA dla regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8), pszenicy (genotyp P2/9, Svilena) oraz pszenżyta (genotyp 28/2) otrzymane w różnych warunkach kultur *in vitro* na drodze somatycznej embriogenezy i andro-genezy. Z policzonych prążków DNA utworzono matryce zerojedynkowe dla DNA ciętego enzymami *Acc65I/MseI* oraz *KpnI/MseI*. Zastosowane w technice metAFLP enzymy będące izoschizomerami pozwoliły na określenie zmian indukowanych w kulturze *in vitro* na poziomie DNA (Machczyńska, 2014). W oparciu o przedstawiony system wyliczeń, przy użyciu specjalnie stworzonego arkusza kalkulacyjnego zostały wyliczone ilości poszczególnych zmian powstałych pod wpływem działania kultury tkankowej: TTCIV — całkowita zmienność indukowana w kulturach *in vitro* (SV+DMV+DNMV); SV — zmienność sekwencyjna; DMV — demetylacja; DNMV — metylacja *de novo*. Określono także zmianę metylacji \bar{X}_{met} jako różnicę metylacji *de novo* i demetylacji genomu: $\bar{X}_{met} = \text{metylacja } de\ novo - \text{demetylacja}$.

W oparciu o uzyskane wyniki uzyskane dla różnych charakterystyk metAFLP przeprowadzono testy *F* analizy wariancji (ANOVA) wraz z grupowaniem średnich za pomocą testu Tukeya (poziomie istotności $\alpha=0,05$). Przetestowano czy występują różnice między: wariantami doświadczenia M10, M12, M13 w obrębie TTCIV; typami zmienności SV, DMV i DNMV w obrębie TTCIV; zmiennością sekwencyjną (SV) a zmianą metylacji (\bar{X}_{met}); wariantami doświadczenia M10, M12, M13 w obrębie poszczególnych typów zmienności SV, DMV i DNMV. Testowano korelację między zmiennością sekwencyjną (SV) a zmianą metylacji \bar{X}_{met} . W tym celu wykonano analizę korelacji określając współczynnik korelacji liniowej Pearsona *r*. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano w programie XLSTAT2018.Ink.

WYNIKI

Aby otrzymać zaplanowane ilości regenerantów wyłożono na pożywki indukujące od 786 do 1639 zarodków oraz od 2153 do 17152 pylników z roślin donorowych jęczmienia, pszenicy i pszenżyta. Proces somatycznej embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych badanych gatunków zbóż pozwolił na otrzymanie w sumie 90 regenerantów po 30 roślin dla każdego gatunku.

Proces androgenyzy w kulturach pylnikowych skutkowało uzyskaniem od 13 do 79 zielonych regenerantów w zależności od badanego gatunku i wariantu doświadczenia. Wśród uzyskiwanych regenerantów obserwowano rośliny albinotyczne. Efektywność spontanicznego podwojenia wynosiła od 15 do 55% w zależności od gatunku.

Dla wszystkich badanych gatunków zbóż określono ilość zregenerowanych zielonych roślin przypadających na 100 wyłożonych pylników w warunkach mających na celu maksymalizację produkcji zielonych regenerantów w kulturach pylnikowych (M11) wariant doświadczenia w warunkach zoptymalizowanych i w warunkach kontrolnych (M10) (tab. 2).

Tabela 2

Zestawienie ilości zielonych oraz albinotycznych regenerantów w przeliczeniu na 100 wyłożonych pylników dla jęczmienia, pszenicy oraz pszenżyta uzyskanych w doświadczeniu weryfikującym warunki zoptymalizowane według metody Taguchiego. M10 — warunki kontrolne, M11 — warunki zoptymalizowane. Wartości w tabeli oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($\alpha = 0,05$) według grupowania testem Tukeya. *F*-wartość statystyki ANOVA, *p*-prawdopodobieństwo

Zregenerowane rośliny	Wariant doświadczenia	Gatunek		
		jęczmień	pszenica	pszenżyto
Zielone regeneranty	M10	0,95 ^a	4,95 ^a	0,55 ^b
	M11	1,97 ^a	7,99 ^a	1,61 ^a
	<i>F</i>	2,256	0,814	12,716
	<i>p</i>	0,142	0,375	0,001
Albinotyczne regeneranty	M10	6,45 ^a	2,21 ^a	1,05 ^a
	M11	9,10 ^a	3,67 ^a	0,92 ^a
	<i>F</i>	1,357	0,455	0,226
	<i>p</i>	0,251	0,505	0,636

Analiza ilości uzyskanych zielonych i albinotycznych regenerantów w warunkach kontrolnych (M10) i zoptymalizowanych (M11) wykazała, obniżenie ilości regenerantów albinotycznych w stosunku do regenerantów zielonych u jęczmienia i pszenżyta, zaś u pszenicy ten stosunek nie uległ zmianie.

Warianty doświadczenia M10, M12 i M13 dostarczyły regenerantów, do badań mających na celu optymalizację w kierunku maksymalizacji (M12) lub minimalizacji (M13) całkowitej zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* (TTCIV). Uzyskano w sumie 185 roślin.

Analizy molekularne obejmowały ekstrakcję genomowego DNA z regenerantów uzyskanych w warunkach zoptymalizowanych metodą Taguchiego. Jakość DNA wyizolowanego z liści regenerantów sprawdzono w żelu agarozowym, po czym przygotowano do techniki metAFLP. Wykonano rozdziały metAFLP dla 185

regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta oraz dla odpowiadających im roślin donorowych (9 roślin jęczmienia, 7-pszenica, 10-pszenżyto). W sumie amplifikowano 502 fragmenty dla roślin jęczmienia, 693 dla pszenicy i 666 dla pszenżyta dla DNA ciętego obydwoma zestawami enzymów restrykcyjnych (*Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*). Średnio dla każdego gatunku identyfikowano 31, 43 i 42 fragmenty DNA przypadające na parę starterów.

W eksperymencie weryfikującym ANOVA wykazała istotne różnice między poszczególnymi wariantami doświadczenia weryfikacyjnego dla TTCIV tylko w przypadku regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy. Zgodnie z grupowaniem Tukeya warunki zoptymalizowane w kierunku najwyższej (M12) i najniższej wartości TTCIV (M13) różniły się istotnie od siebie ($F = 10,379$; $p = 0,000$).

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 androgeny gdzie wyższa była metylacja *de novo*.

Dla wszystkich badanych grup regenerantów istotna była różnica między zmiennością sekwencyjną a wartością zmiany metylacji. Test Pearsona wykazał dla wszystkich materiałów roślinnych ujemną korelację zmienności sekwencyjnej i zmian metylacji. Wzrost wartości zmienności sekwencyjnej wiązał się z obniżeniem wartości \bar{X}_{met} .

Analiza wariancji wykonana dla wariantów doświadczenia M10, M12 i M13 dla typów zmienności u poszczególnych gatunków nie wykazała różnic dla regenerantów jęczmienia wyprowadzonych na drodze androgeny oraz dla regenerantów pszenicy i pszenżyta uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy. Dla pozostałych grup regenerantów obserwowano zróżnicowanie między wariantami doświadczenia.

WNIOSKI I PODSUMOWANIA

1. Zastosowanie metody Taguchiego pozwoliło na wytypowanie warunków zoptymalizowanych w kierunku produkcji maksymalnej ilości zielonych regenerantów.
2. W warunkach zoptymalizowanych obserwowano obniżenie ilości roślin albino-tycznych w stosunku do zielonych regenerantów u jęczmienia i pszenżyta.
3. Podjęte prace pozwoliły na przygotowanie preparatów DNA z badanych gatunków zbóż do analiz molekularnych.
4. Wykonane prace pozwoliły na uzyskanie elektroforegramów do określenia ilościowych charakterystyk metAFLP dotyczących zmienności indukowanej w trakcie pozyskiwania regenerantów na etapie weryfikacji warunków zoptymalizowanych na podstawie metody Taguchiego.
5. Zastosowanie metody Taguchiego do procesu optymalizacji pozwoliło ograniczyć ilość powtórzeń w przypadku testowania kilku czynników jednocześnie.

6. 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.
7. Zastosowane podejście na poziomie TTCV dało wynik pozytywny w przypadku regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy, nie oznacza to jednak, że metoda nie pozwoliła na optymalizację warunków regeneracji.
8. Analiza statystyczna wykonana dla regenerantów M10, M11 i M12 u jęczmienia uzyskanego na drodze somatycznej embriogenezy oraz pszenicy i pszenżyta uzyskanych na drodze androgenozy wykazała, że różnice pomiędzy M10, M11 i M12 występują na poziomie typów zmienności, co świadczy o tym, że metoda Taguchiego umożliwia optymalizację warunków uzyskania regenerantów dla tych gatunków zbóż w ww. typach kultur *in vitro*.
9. Stwierdzono, że zarówno w przypadku somatycznej embriogenezy jak i androgenozy u wszystkich gatunków wzrost zmian sekwencyjnych jest ujemnie skorelowany z demetylacją genomu.
10. Uzyskane dane pokazują, że bazowanie na TTCV, jako wskaźniku zmienności bez analizy poszczególnych charakterystyk jakościowych metAFLP (SV, DMN, DNMN) może dawać mylące wyniki.

LITERATURA

- Kumlehn J., Serazetdinova L., Hensel G., Becker D., 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.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture Physiologia Plantarum 15: 473 — 497.
- Pauk J., Manninen O., Mattila I., Salo Y., Pulli S. 1991. Androgenesis in hexaploid spring wheat F2 populations and their parents using a multiple-step regeneration system Plant Breeding 107: 18 — 27.
- Zhuang J. J., Xu J. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu H., Vega M.R. (eds) Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press, Beijing.

PIOTR T. BEDNAREK

MARZENA WASIAK

AGNIESZKA NIEDZIELA

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Piotr Bednarek Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, tel. 601827259, (22) 7334533, e-mail: p.bednarek@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 15.

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

Exploration the markers linked to the pollen sterility genes in triticale with CMS Tt

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, pszenżyto

Cytoplazmatyczna męska sterylność (CMS) występuje u roślin wyższych i charakteryzuje się upośledzeniem w procesie wytwarzania pyłku, wynikającym z zaburzenia oddziaływań genomu mitochondrialnego i jądrowego (Schnable, Wise, 1998). CMS z *Triticum timopheevii* jest najbardziej obiecującym systemem do hodowli hybrydowej w pszenżyta. Obecnie jednak niewiele wiadomo o genach odpowiedzialnych za przywrócenie płodności pyłku i utrzymania sterylności (Warzecha i in., 2014).

CEL ZADANIA

Celem zadania jest opracowanie markerów DNA silnie sprzężonych/asocjowanych z możliwie jak najszerszym spektrum genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS Tt występujących w obrębie badanych populacji RIL oraz określenie wkładu tych genów do zmienności fenotypowej.

OPIS WYNIKÓW

W ramach tematu w oparciu o markery DArTseq i silicoDArT uzyskane w wyniku genotypowania populacji RIL8: DB2 × RB2 opracowano mapę genetyczną, która składała się z 21 grup sprzężeń (849 markerów szkieletowych i 1220 redundantnych).

Najmniej liczna pod względem liczby markerów szkieletowych grupa sprzężeń składała się z 15, natomiast najliczniejsza z 81 markerów. Łącznie, wszystkie grupy sprzężeń pokrywały 2270,72 cM, przy czym średnio markery występowały co 2,67 cM. Na podstawie markerów DArTseq i silicoDArT o znanej lokalizacji chromosomowej 7 grup sprzężeń przypisano do genomu A, 7 genomu do B pszenicy oraz 7 do genomu R żyta.

Do identyfikacji QTL genów utrzymania sterylności pyłku w systemie z CMS Tt u pszenżyta wykorzystano populację mapującą RIL8: DB2 x RB2 oraz dane fenotypowe uzyskane w wyniku analizy zawiązywania ziarniaków w obrębie populacji BC1F8: DB2 x [RIL8: DB2 x RB2]. Przeprowadzono mapowanie kompozytowe, które Borwo umożliwiło identyfikację 4 QTL determinujących cechę męskiej sterylności pyłku u pszenżyta z CMS Tt w obrębie badanej populacji mapującej. Analizę wykonano przy parametrach 'Walk Speed' — 2, 'Window Size' — 2 i 'Markers' — 10. Test permutacji (1000 permutacji) wykazał istotność tych QTL, przy czym punktem odcięcia wszystkich QTL była wartość 3,7 LOD. QTL e identyfikowano w obrębie chromosomów 1B, 3B, 5B oraz 6A. Na uwagę zasługuje QTL 1 i QTL 4 ze względu na ich wysoką odziedziczalność cechy określoną na podstawie odpowiedniego markera (odpowiednio $R^2 = 0,29$ i $R^2 = 0,41$) wynoszącą odpowiednio 29 i 41,4%. Ponadto QTL e wykazują wysoką wartość LOD w miejscu maksimum funkcji LOD (QTL 1 = 15,76 i QTL 4 = 19,63).

WNIOSKI

W ramach tematu opracowano mapę genetyczną dla populacji RIL8: DB2 x RB2 o średnim pokryciu genomu (wzięto pod uwagę wyłącznie markery szkieletowe) wynoszącym jeden marker na 2,92 cM. Mimo wysycenia mapy genetycznej markerami SNP obserwowano obszary pozbawione markerów. Takie luki są wynikiem rzadkich aktów rekombinacji w niektórych obszarach genomu. Na podstawie dostępnych danych dotyczących genomu referencyjnego pszenicy oraz mapy genetycznej żyta zbudowanej na markerach DArTseq wszystkie grupy sprzężeń genomu pszenżytniego przypisano do odpowiednich chromosomów gatunku oraz określono ich orientacje od krótkiego do długiego ramienia. Interwałowe mapowanie kompozytowe (CIM) wykazało, że w obrębie populacji RIL8: DB2 x RB2 za utrzymanie sterylności pyłku mogą odpowiadać co najmniej cztery QTL, które lokalizują się na chromosomach 1B, 3B, 5B oraz 6A. Na szczególną uwagę zasługują QTL na 1B i 6A ze względu na wysoką odziedziczalność tych QTL i. Uzyskane wyniki potwierdzają wielogenowy charakter cechy i sugerują, że różne QTL e mogą występować w różnych populacjach oraz, że ich kumulacja w obrębie genotypu jest istotna dla ekspresji cechy. Mapowanie genetyczne w połączeniu z mapowaniem kompozytowym (CIM) umożliwiło identyfikację markerów silnie sprzężonych z QTL-ami badanej cechy.

LITERATURA

Schnable, P.S., Wise, R.P. 1998. The Molecular Basis of Cytoplasmic Male Sterility and Fertility Restoration. *Trends Plant Sci.* 3/5: 175 — 180.

Warzecha T., Sutkowska A., Góral H. 2014. Male sterility of triticale lines generated through recombination of triticale and rye maintainers. *Span. J. Agric. Res.* 12 (3): 1124 — 1130.

STEFAN STOJAŁOWSKI¹

MARTA ORŁOWSKA¹

MARTYNA SOBCZYK¹

ANNA BIENIAS¹

MARCIN BERDZIK¹

BEATA MYŚKÓW¹

HALINA GÓRAL²

MAGDALENA SIMLAT²

TOMASZ WARZECHA²

WOJCIECH WESOŁOWSKI³

MAREK SZKLARCZYK³

MIROSLAW POJMAJ⁴

¹ Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

² Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

³ Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

⁴ DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.

Kierownik Tematu: dr hab. Stefan Stojalowski prof. ZUT Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, tel. 91 4496404, e-mail: stefan.stojalowski@zut.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.802.13.2018, Zadanie 83.

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's and perspectives of it utilization for development of CMS system in wheat

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, odmiany mieszańcowe, pszenżyto

WSTĘP

Pszenżyto jest syntetycznym gatunkiem uprawnym, który został stworzony przez człowieka. Jego popularność w produkcji rolniczej systematycznie rośnie. Wynika to z wielu zalet tego zboża. W hodowli komercyjnej duże nadzieje wiąże się z możliwością szerszego wdrożenia odmian mieszańcowych. Podstawą do zorganizowania produkcji nasiennej odmian heterozyjnych jest dostępność systemów cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS). W przypadku pszenżyta największe nadzieje na praktyczne wykorzystanie systemów CMS wiąże się z cytoplazmami *Triticum timopheevi* i *Aegilops sharonensis* (Cauderon i in., 1985; Nalepa, 1990; Spiss i Góral, 1994; Warzecha i Góral, 2009). Jako alternatywę można wskazać cytoplazmę Pampa pochodzącą z żyta (Geiger i Schnell, 1970) i cytoplazmę *Aegilops ventricosa*. Lokalizacja genów przywracających płodność u pszenżyta z wyżej wymienionymi cytoplazmami sterylizującymi jest słabo poznana. Dotychczasowe badania dotyczące głównych genów restorerowych wykazały, że w cytoplazmie *T. timopheevi* są one zlokalizowane na chromosomie 6R (Curtis i Lukaszewski, 1993; Stojalowski i in., 2013), natomiast w cytoplazmie Pampa znajdują się one na chromosomach 4R, 1R i 3R (Miedaner i in., 2000; Hackauf i in., 2012).

CELE ZADANIA

- Oceny fenotypowe męskiej płodności/sterylności w obrębie czterech populacji mapujących F_2 z cytoplazmami *T. timopheevi*, CMS-Pampa, *Ae. sharonensis* i *Ae. ventricosa* oraz konstrukcja map sprzężeń dla dwóch populacji.
- Analizy sekwencyjne mitochondrialnego DNA pszenżyta z cytoplazmami normalną (*T. aestivum*), sterylizującą *T. timopheevi* i Pampa.
- Wytworzenie i oceny fenotypowe zestawu linii alloplazmatycznych pszenżyta oraz testowanie wybranych rodów hodowlanych pod kątem zdolności do utrzymywania męskiej sterility i przywracania płodności w cytoplazmie *T. timopheevi*.

Badania nad kwitnieniem czterech populacji mapujących prowadzono na polu doświadczalnym Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie. Ocenę fenotypową przeprowadzono z zastosowaniem 5-stopniowej skali bonitacyjnej (Góral, 2002). W okresie prowadzenia badań zaobserwowano nietypowe dla tego regionu warunki pogodowe. Czas kwitnienia poprzedził około 4-tygodniowy okres bez opadów, a samo kwitnienie przebiegało w czasie suszy i przy wysokich temperaturach powietrza. W rezultacie, rośliny kwitły bardzo dynamicznie — czas kwitnienia był krótki, a pylniki bardzo szybko zasychały. Prawdopodobnie z tego powodu wizualna ocena pylenia uniemożliwiła wytypowanie w pełni płodnych osobników (5 stopień płodności), pomimo to ocena zawiązywania ziaren pod izolatorami była u wielu roślin wysoka. Tylko siedem roślin z populacji mapującej z cytoplazmą *T. timopheevi* zostało ocenionych wzrokowo jako w pełni męskopłodne. U pozostałych mieszańców takich ocen nie zaobserwowano, pomimo iż każda z populacji liczyła powyżej 170 ocenionych pojedynków.

Analizy DArTseq i PCR wykonano w obrębie dwóch populacji mapujących. Z każdej wybrano po 90 osobników. Mapy chromosomów w populacji [CMS-Baltiko P ×

DAD282/00] F₂ mają długość od 37 do 130 cM. Długości zmapowanych chromosomów mieszańca [CMS-Salvo 15/1 T × DAD282/00]F₂ mieszczą się w granicach od 33 cM do 112 cM. W trakcie analiz kilka grup sprzężeń zostało przypisanych do tych samych chromosomów, ale też nie wszystkie chromosomy pszenżyta zostały ujęte na mapach.

Dane sekwencyjne mtDNA uzyskano dla trzech cytoplazm, następnie złożono je w kontigi oraz skafoldy (złożenia wyższego rzędu). Uzyskano kilka alternatywnych układów złożonych sekwencji, Jest to rezultatem występowania w genomach mitochondrialnych sekwencji powtórzonych.

Wśród wytworzonych linii alloplazmatycznych rosnących i ocenianych fenotypowo na poletkach doświadczalnych w Krakowie, linia DAD 1 w każdej cytoplazmie była męskopłodna. Indeks restoracji zawierał się w granicach 70,0–95,0%. Linia Salvo 15 była w pełni męskosterylna. Pozostałe dwie linie wykazały specyficzną reakcję w zależności od rodzaju cytoplazmy. Linia Baltiko 1 była męskosterylna w cytoplazmie Pampa i męskopłodna w cytoplazmie *Ae. sharonensis*, natomiast linia Zorro 1 męskosterylna w cytoplazmach Pampa i *Ae. sharonensis* oraz męskopłodna w cytoplazmach *T. timopheevi* i *Ae. ventricosa*.

WNIOSKI

1. Stworzono mapy genetyczne dwóch populacji mapujących pokrywające większą część genomu pszenżyta.
2. W wyniku analiz bioinformatycznych uzyskano kilka alternatywnych wersji sekwencji mtDNA pszenżyta.
3. Cytoplazmy sterylizujące CMS-T, CMS-P, CMS-A i CMS-V mogą być wykorzystane do tworzenia stabilnych fenotypowo linii męskosterylnych pszenżyta.

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.
- 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.
- Spiss L., Góral H. 1994. Breeding of male sterile and fertility restoring forms of triticale. Zesz. Nauk. AR Szczecin 162: 243 — 246.

- Stojałowski S., Bobrowska A., Hanek M., Myśków B. 2013. The importance of chromosomes from the sixth homeologic group in the restoration of male fertility in winter triticales with *Triticum timopheevii* cytoplasm. *J. Appl. Genetics* 54: 179 — 184.
- Warzecha T., Góral H. 2009. Otrzymywanie mieszańców z krzyżowań zwrotnych heksaploidalnej pszenicy z cytoplazmą *Aegilops sharonensis* z pszenżytem. W: *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.

EDWARD ARSENIUK**LIDIA KOWALSKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Edward Arseniuk Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy

Instytut Badawczy, Radzików 05-870 Błonie, tel. (22) 725 45 36; e-mail: e.arseniuk@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 81.

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
[czynniki 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 and tolerance to septoria leaf and glume [agent: *Parastagonospora nodorum* (Berk.), (Quaedvlieg, Verkley & Crous.)]

Słowa kluczowe: androgeniza, pszenica, pszenżyto, septorioza liści i plew, somatyczna embriogeneza

Septorioza liści i plew wywołana przez grzyb *Parastagonospora nodorum* należy do jednej z najniebezpieczniejszych chorób zbóż. Patogen powoduje zmniejszenie powierzchni asymilacyjnej łanu, co skutkuje obniżeniem plonu nawet do 40% (Arseniuk i in.; 2002). Z uwagi na wzrastające znaczenie septoriozy liści i plew należy podjąć kroki, które przyczynią się do podwyższenia jakości ziarna i ograniczenia strat w plonie. Jednym z takich kroków jest hodowla odpornościowa. Włączenie do uprawy odmian

zbóż o podwyższonej odporności na *P. nodorum* w znacznym stopniu przyczyni się do ochrony środowiska naturalnego przed nadmierną ilością związków chemicznych.

Celem projektu jest porównanie efektywności i wykorzystanie biotechnologicznych technik, somatycznej embriogenezy i androgenozy, poszerzających zmienność genetyczną i skracających cykl hodowlany pszenicy i pszenżyta pod względem odporności i tolerancji zbóż na septoriozę liści i plew. W ramach projektu przeprowadzono ocenę odporności na *P. nodorum* dla linii dihaploidalnych i somaklonalnych otrzymanych w latach 2015–2017 oraz rodzicielskich ozimych odmian pszenicy i pszenżyta, które posłużyły do krzyżowania i wyprowadzenia somaklonów i dihaploidów. Dodatkowo przeprowadzono atestację otrzymanych linii na toksynę produkowaną przez grzyb *P. nodorum*, Tox3.

Testy odporności zbóż na *P. nodorum* prowadzone są już od wielu lat. Arseniuk i Fried (1991) w swoich badaniach porównywali odporność dwóch genotypów pszenżyta ozimego i sześciu genotypów pszenicy ozimej na prezentowany patogen. Wykazali znacznie wyższą odporność na septoriozę liści i plew u pszenicy niż pszenżyta. Średnia powierzchnia porażenia liści wyniosła u pszenicy ozimej 17,2% podczas gdy u pszenżyta aż 30,5%. Podobne wyniki otrzymano dla obiektów w warunkach kontrolowanego środowiska. Średnie porażenie liścia przez omawiany genotyp wyniósł 46% dla pszenicy i 52% dla pszenżyta. Natomiast w warunkach polowych wyższą odporność na septoriozę liści i plew zaobserwowano dla genotypów pszenżyta. Porażenie tkanki liścia wyniosło 14%. Otrzymane w tym roku wyniki testów odporności na septoriozę liści i plew w warunkach kontrolowanego środowiska są zbieżne z wynikami z ubiegłych lat. Somaklony pszenżyta ozimego wykazują najwyższą odporność na działanie *P. nodorum*. Średnia porażonej tkanki liścia wyniosła 37%, podczas gdy w przypadku somaklonów pszenicy odnotowano 47% porażonej tkanki liścia. W ubiegłym roku udział zainfekowanej tkanki wyniósł 17% dla somaklonów pszenicy i 10% dla somaklonów pszenżyta. Podobne wyniki uzyskali Arseniuk i in. (1998) badając odporność linii somaklonalnych pszenżyta. Ponad to, na podstawie analizy statystycznej wykazano istotny statystycznie związek korelacyjny między odpornością na toksynę Tox3 a porażeniem liści przez *P. nodorum* w stadium siewki dla obiektów pszenżyta ozimego. Współczynnik korelacji wyniósł 0,44. Wrażliwość odmian na toksynę Tox3 jest bardzo powszechna. W badaniach Kar-Chun Tan i in. (2014) po przetestowaniu 46 komercyjnych odmian pszenicy, u 91% zaobserwowano wrażliwość na toksynę Tox3. Również w Zakładzie Fitopatologii w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin zaobserwowano, że największy wpływ na odporność fenotypową ma odporność na toksynę Tox3 (Walczewski i in., 2017). Udział obiektów hodowlanych podatnych na tę toksynę wyniósł 70%. Uzyskane wyniki nie są zbieżne z prezentowanymi pracami. Podatność na toksynę Tox3 zaobserwowano dla 45% obiektów pszenicy oraz 30% genotypów pszenżyta ozimego otrzymanych w ramach projektu. Odporne odmiany rodzicielskie produkowały przede wszystkim bardziej odporne somaklony i dihaploidy. Spośród wszystkich przebadanych obiektów, najwyższą odporność na septoriozę liści i plew zarówno w warunkach polowych, jak i kontrolowanego środowiska wykazuje linia D-44. Dihaploid ten pochodzi ze skrzyżowania odmian Borwo i Tomko.

Uzyskane wyniki wskazują, że możliwa jest poprawa odporności genotypów obydwu gatunków zbóż w procesie somatycznej embriogenezy. Zmienność somaklonalna może być stosowana jako dodatkowe źródło odporności na patogen *P. nodorum* oraz być zalecana do stosowania w komercyjnych programach hodowlanych. Przedstawione wyniki poszerzają naszą wiedzę na temat odporności zbóż na omawiany patogen i przybliżają zastosowanie metod biotechnologicznych w hodowli odpornościowej.

LITERATURA

- 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., Czembor H. J., Zimny J., Scharen A. L., Laudański 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., 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: 163 — 177.
- 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.
- Walczewski J., Arseniuk E., Ochodzki P. 2017. Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum*. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka Dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych, Zakopane.

EDWARD ARSENIUK
JAKUB WALCZEWSKI
PIOTR OCHODZKI

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Edward Arseniuk Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, tel. (22) 7334630, e-mail: e.arseniuk@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 10.

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

***Parastagonospora nodorum* proteinaceous toxins and their connection with wheat and triticale susceptibility and resistance on stagonospora nodorum blotch**

Słowa kluczowe: nekrotrof, nodorum, patogen, parastagonospora, septorioza, toksyny

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

Celem badań było określenie wpływu poszczególnych toksyn białkowych *Parastagonospora nodorum* na rozwój septoriozy liści i plew, oraz wyznaczenie priorytetowych z punktu widzenia hodowli odpornościowej genów warunkujących odporność.

OPIS WYNIKÓW

Zadanie obejmowało niżej wymienionych 6 tematów.

1. Doskonalenie metodyki oczyszczania oraz rozdzielania toksyn z hodowli *P. nodorum*, produkcja toksyn.
2. Wytypowanie oraz pozyskanie z zagranicy różnicujących linii pszenicy.
3. Analiza odporności obiektów pszenicy i pszenżyta na białkowe toksyny *P. nodorum*.
4. Analiza odporności obiektów pszenicy i pszenżyta na *P. nodorum* w warunkach fitotronowych.
5. Polowa analiza odporności materiałów roślinnych na *P. nodorum*.
6. Krzyżowanie wyselekcjonowanych linii.

Wyniki Ad 1)

Przy pomocy metod chromatograficznych oczyszczono około 15 ml toksyny Tox5. Ilość ta była wystarczająca do przetestowania zakładanej liczby obiektów roślinnych. Przy pomocy ekspresji w *Pichia pastoris* uzyskaliśmy po ok 15 ml preparatów toksyn Tox1, Tox3 i ToxA. Ilość ta wystarczyła do założonych badań wykorzystania systemu ekspresyjnego *Pichia pastoris* umożliwia uzyskanie ilości wystarczających nawet do masowego badania materiałów hodowlanych.

Wyniki Ad 2)

Posiadane linie różnicujące zostały namnożone do ilości zabezpieczającej potrzeby badawcze.

Wyniki Ad 3)

Przy pomocy oczyszczonych toksyn Tox1, Tox3, Tox5 przetestowano po 170 linii pszenicy i 100 linii pszenżyta. Przy pomocy oczyszczonej toksyny ToxA przetestowano 355 obiektów pszenicy i 310 obiektów pszenżyta. Spośród przebadanych toksyn podatność na toksynę Tox3 była najbardziej rozpowszechniona. Większość przebadanych linii pszenżyta (57%) i 30% obiektów pszenicy jest podatnych na tę toksynę. Podatność na toksynę Tox5 występuje w ok. 30% obiektów pszenżyta i około 10% pszenicy. Większość przebadanych obiektów pszenicy i pszenżyta jest odporna na Toksyny: Tox1 oraz ToxA.

Wyniki Ad 4)

Przy pomocy mieszaniny izolatów przetestowano po 142 obiekty pszenicy i pszenżyta w warunkach kontrolowanego środowiska w stadium siewki. Uzyskane wyniki umożliwiły badanie wpływu podatności na toksyny na odporność fenotypową.

Wyniki Ad 5)

Przy pomocy mieszaniny izolatów przetestowano po 142 obiekty pszenicy i pszenżyta w warunkach polowych w stadium rośliny dorosłej. Uzyskane wyniki umożliwiły badanie wpływu podatności na toksyny na odporność fenotypową.

Wyniki Ad 6)

Uzyskano 6 linii F1 będących materiałem do wyprowadzania populacji F1 w przyszłym roku. Z Mieszańców F1 uzyskanych w roku ubiegłym wyprowadzono linie DH. Populację Begra vs Liwilla przetestowano przy pomocy toksyn Tox1 i ToxA. Populacja ta jest w całości odporna na te toksyny. Uzyskiwane populacje DH będą materiałami wyjściowymi do przyszłych badań nad mechanizmami odporności na *P. nodorum*.

W Polskiej populacji *P. nodorum* szeroko rozpowszechniona jest zdolność do produkcji toksyn Tox1, Tox3 i Tox5. Analiza wariacji oraz związków korelacyjnych między toksyną Tox1 a odpornością fenotypową pokazuje, że toksyna ta ma marginalny wpływ na rozwój choroby. Odporność na tę toksynę jest szeroko rozpowszechniona w puli obu gatunków badanych zbóż.

Najszerzej rozpowszechniona wśród obiektów hodowlanych jest wrażliwość na Tox3, szczególnie u pszenżyta gdzie obiekty wrażliwe stanowią ok. 60%. W tegorocznych badaniach Tox3 stanowiła główny czynnik rozwoju choroby w stadium siewek u pszenicy i pszenżyta. Toksyna ta determinowała 49% i 24% objawów chorobowych

u obu zbóż. U pszenżyta odporność na tę toksynę była statystycznie istotnie skorelowana z odpornością fenotypową w warunkach polowych. W tegorocznych badaniach polowych obiektów pszenicy nie stwierdzono istotnego statystycznie związku między odpornością na Tox3 a fenotypową odpornością polową. Z uwagi na suszę już w trzecim tygodniu po wystąpieniu pierwszych objawów, rozpoczęło się zamieranie liści pszenicy, co najprawdopodobniej przyczyniło się do niewykrycia statystycznie istotnego związku między odpornością na tę toksynę a odpornością polową. Statystyczną istotność tego związku regularnie wykrywano w poprzednich latach.

Z kolei, wykazano istotny statystycznie związek korelacyjny między odpornością na toksynę Tox5 a odpornością pszenżyta w stadium siewki. Tox5 determinuje 10,5% tej zależności. Analiza wariancji wykazała że odporność na toksynę Tox5 w sposób statystycznie istotny wyjaśnia 6,3% zmienności w stadium rośliny dorosłej w doświadczeniu polowym.

WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

- Ze względu na szerokie rozpowszechnienie w pulach genowych pszenicy i pszenżyta wrażliwości na Tox3 i Tox5 oraz istotny wpływ tych toksyn na rozwój choroby, powinny one być wykorzystane w hodowli odpornościowej tych gatunków zbóż na SNB.
- Badania prowadzone w pracowni mogą być spożytkowane poprzez wykorzystanie danych z bonitacji roślin, lub poprzez wykorzystanie zdolności Pracowni Hodowli Odpornościowej, do produkcji dużych ilości toksyn możliwych do wykorzystania w rutynowym testowaniu obiektów hodowlanych.

HALINA WIŚNIEWSKA¹

TOMASZ, GÓRAL²

PIOTR OCHODZKI²

MACIEJ MAJKA¹

DOROTA WALENTYN-GÓRAL²

JOLANTA BELTER¹

¹ Instytut Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk, Poznań

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

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Halina Wiśniewska Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań; ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań; tel. 662044293, e-mail: hwis@igr.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.802.18.2018, Zadanie 14.

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

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

WPROWADZENIE

Odmiany pszenżyta okazują się podatne na fuzariozę kłosów i kumulację w ziarnie toksyn fuzaryjnych. Głównym źródłem odporności jest *locus* cech ilościowych (QTL) *Fhb1* zlokalizowany w krótkim ramieniu chromosomu 3BS, warunkuje wysoką odporność na fuzariozę — obecny w pszenicy Sumai 3. Scharakteryzowany jest również inny QTL — *Fhb2* na 6BS. Ma on znacznie mniejszy wpływ na odporność. Podejmowane są próby poszerzenia zmienności pszenżyta przez wprowadzanie genów z gatunków oddalonych.

CELE PROJEKTU

— Badanie odporności typu I i II na fuzariozę kłosów u pszenżyta z wykorzystaniem markerów fenotypowych.

- Identyfikacja molekularna genu *Fhb1* mieszańców BC₁ i BC₂.
- Ocena odporności na uszkodzenie ziarna (typ III odporności).
- Określenie redukcji parametrów struktury plonu (typ IV odporności).
- Analiza zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarniakach (typ V odporności).

MATERIAŁY I METODY

Materiał badawczy

Genotypy pszenżyta ozimego — **temat badawczy 1, 2, 3 i 4** oraz linie pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy — **temat badawczy nr 1**

Metody badawcze

- Testowanie metodą inokulacji (oprysk) w warunkach polowych oraz metodą inokulacji punktowej w Radzikowie i Cerekwicy.
- Badanie odporności na infekcję pierwotną (typ I odporności), na rozprzestrzenianie się patogenu wzdłuż osadki kłosowej (typ II odporności). Określanie indeksu fuzariozy kłosów (IFK) (połączone typy odporności I i II) — **temat badawczy nr 1**.
- Analizowanie odporności na uszkodzenie ziarniaków (typ III odporności) — określanie wizualne proporcji ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (FDK) i ziarniaków wyglądających zdrowo (HLK) — **temat badawczy nr 3**.
- Określanie redukcji parametrów struktury plonu: (masy ziarna z kłosa (MZK), liczby ziarniaków w kłosie (LZK), masy tysiąca ziarniaków (MTZ), analiza tolerancji czyli odporności na obniżkę parametrów struktury plonu (typ IV odporności) — **temat badawczy nr 3**.
- Analiza zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarniakach — deoksyniwalenolu (DON), niwalenolu (NIV), zearalenonu (ZEN) — chromatografia gazowa, (typ V — odporność na kumulację/degradację toksyn fuzaryjnych) — **temat badawczy nr 4**.
- Identyfikowanie molekularne genu *Fhb1* — **temat badawczy 2**.

WYNIKI

Temat badawczy 1

Doświadczenia infekcyjne w IHAR — PIB Radzików i IGR PAN Poznań z około 75 genotypami pszenżyta ozimego wybranymi jako formy o podwyższonej odporności w latach ubiegłych oraz z nowymi uzyskanymi na drodze krzyżowań z różnymi źródłami odporności

Brak opadów w okresie kwitnienia pszenżyta nie sprzyjał rozwojowi fuzariozy. W lokalizacji Cerekwica zastosowano po inokulacji zamgławianie, stąd porażenie kłosów było 3-krotnie wyższe (8,7%) aniżeli w Radzikowie (2,7%). Najniższe IFK poniżej 3,0% odnotowano u 7 genotypów pszenżyta — DANKO 22 (2015), DANKO 6/15, DANKO 20/16, BOH 534-4, DS 1238, BOH 2271-4, MAH 34762-2.

Średnie IFK badanych linii pszenżyta z introgresją chromatyny *T. monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy wynosiło 6,8%, porażenie do 4% odnotowano u 8 linii.

Średnia liczba punktów infekcji (typ I odporności) dla 49 genotypów pszenżyta wynosiła 1,9. Najwyższą odporność typu I odnotowano dla genotypów DC 06080-56, BOHD 898-1, MAHD 33404-1, DC 03326/06/2, DS. 9, DANKO 17 (2014), BOHD 1025-2 i MAH 35657-2.

Średnia liczba porażonych kłosek (typ II odporności) dla 49 badanych genotypów wynosiła 2. Najwyższą odporność typu II zanotowano dla genotypów MAH 33544-3, BOH 835-4, DANKO 2 (2014), DANKO 21 (2015), BOH 1062-2, DANKO 10 (2015). Średnia odporność obu typów odporności była najwyższa u genotypów MAH 33544-3, DS. 9, DC 06080-56, DL 593/07, MAH 34359-1 i BOHD 1025-2. Średnia odporność typu I i II korelowała istotnie z IFK w obu lokalizacjach oraz ze średnim IFK.

Temat badawczy 2

Doświadczenia infekcyjne w dodatkowych lokalizacjach. Krzyżowanie wybranych genotypów pszenżyta, rozmnażanie uzyskanych mieszańców

Inokulacja pszenżyta przeprowadzona w lokalizacjach Dębina, Borowo, Małyszyn i Szelejewo wykazała wystąpienie porażenia kłosek tylko w Dębinie. Średni %IFK z lokalizacji Cerekwica i Radzikowo korelował z IFK w Dębinie ($r = 0,430$).

Formy mieszańcowe BC₁ i BC₂ niosące gen odporności na fuzariozę kłosa *Fhb1*, zostały poddane krzyżowaniom wstecznym w celu otrzymania mieszańców pokolenia BC₂ i BC₃. Uzyskano 11 form BC₂ z genem odporności *Fhb1* oraz 56 form BC₃.

Temat badawczy 3

Analiza zebranego materiału pod kątem oceny odporności na uszkodzenie ziarniaków (typ III)

Prażenie ziarna było zróżnicowane. Średni procent FDK masa w Cerekwicy wynosił 11,39% natomiast FDK liczba 18,55%. Dla genotypów ocenionych w Radzikowie średni procent FDK masa wynosił 14,18%, a FDK liczba 14,80%. Najniższą liczbę porażonego ziarna (FDK liczba) odnotowano u genotypu DS.9.

IFK w Poznaniu korelował istotnie z wartościami FDK w Poznaniu i ze średnimi FDK. Podobne były zależności IFK i FDK w Radzikowie. Średnia wartość IFK korelowała z wartościami średnimi FDK masa i FDK liczba.

Średnio najniższą redukcję MZK odnotowano u genotypów MAH 34068-5 (S), DANKO 3/15, MAH 33115-4/1 i DANKO 2/16. Najniższa średnia redukcja MTZ wystąpiła u genotypów BOHD 2027-1, DANKO 3/17, DS. 9, DANKO 13/17 i DANKO 28/17.

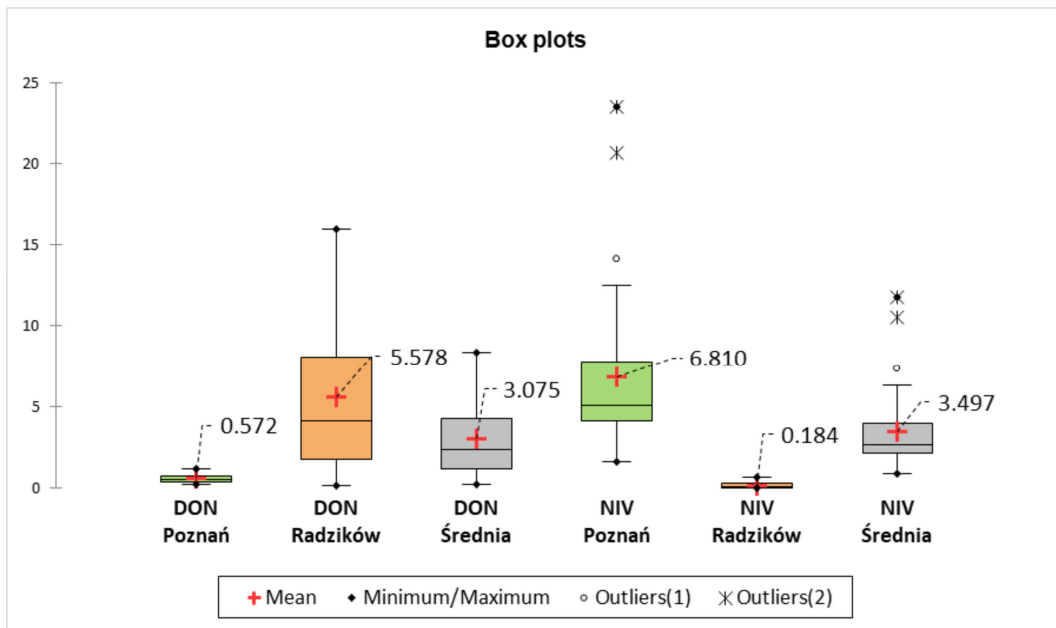
IFK korelował z uszkodzeniem ziarniaków. Uszkodzenie ziarniaków (FDK masa i FDK liczba) korelowało z względną redukcją MTZ.

Temat badawczy 4

Analiza w badanym materiale zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie, kumulacja/degradacja toksyn (typ V odporności)

We wszystkich próbach ziarna stwierdzono obecność DON, NIV oraz pochodnej acetylowej 3Ac-DON. Brak było 15Ac-DON, a pochodna 3Ac-DON występowała w ilościach śladowych.

W Poznaniu dominował NIV — zawartość ponad 10-krotnie wyższa niż DON-u. W Radzikowie natomiast dominował DON (30-krotnie więcej NIV) (rys. 1).



Rys. 1. Porównanie zawartości DON i NIV w próbach ziarna 39 genotypów pszenżyta pochodzących z Poznania i Radzikowa. Prostokąty pokazują pierwszy kwartył, medianę i trzeci kwartył. Wąsy pokazują dolny i górny limit, poza którym wartości są odstające

Najniższe zawartości DON stwierdzono u genotypów LD 121/08, MAHD 35399-1, BOH 534-4, DANKO 2/17, MAH 34359-1, BOHD 898-1 i odmiany Trefl. Natomiast najniższe zawartości NIV stwierdzono u genotypów DS. 9, BOH 537-2, DANKO 3/17, BOHD 898-1. Sumarycznie najmniej trichotecenów B było w ziarnie genotypów BOHD 898-1, DANKO 3/17, DS. 9, DC 03326/06/2, Trefl, BOHD 1025-2 i MAHD 35399-1.

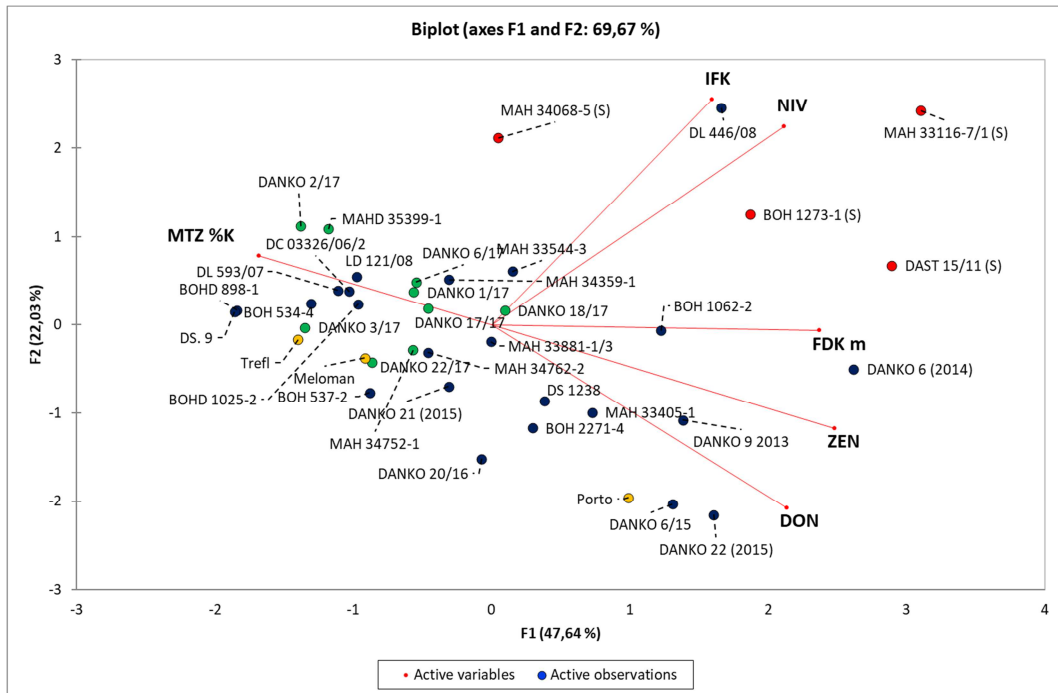
Zawartość ZEN w ziarnie wynosiła średnio 94 µg/kg. W próbach ziarna z Radzikowa było go około 5-krotnie więcej niż w próbach ziarna z Cerekwicy. Najmniej ZEN było w ziarnie genotypów BOH 534-4, MAH 34359-1, BOHD 898-1, DANKO 2/17, LD 121/08, MAHD 35399-1 i DS. 9. IFK korelował z zawartością NIV i sumaryczną zawartością trichotecenów B, nie stwierdzono korelacji z zawartością DON i ZEN. Poziom uszkodzenia ziarniaków korelował z zawartością wszystkich badanych mykotoksyn.

Stwierdzono istotne ujemne współczynniki korelacji MTZ oraz DON, ZEN i sumy trichotecenów B.

PODSUMOWANIE

Analiza wieloczynnikowa pozwoliła na zidentyfikowanie genotypów łączących odporności różnych typów. Są to DS. 9, BOHD 898-1, odmiana Trefl, DANKO 2/17, DANKO 3/17, BOH 534-4, MAHD 35399-1, DL 593/07, DC 03326/06/2, LD 121/08,

BOHD 1025-2, odmiana Meloman, BOH 537-2 i DANKO 22/17. Cztery z nich to nowe genotypy pochodzące w Doświadczenia Wstępne 2017/2018 (rys. 2).



Rys. 2. Układ współrzędnych dwóch pierwszych składowych głównych dla 39 genotypów pszenżyta ozimego. Składowe wyjaśniają 69,67% zmienności odporności na fuzariozę kłosów mierzona indeksem fuzariozy kłosów (IFK), stopniem uszkodzenia ziarniaków (FDK m), względną wartością MTZ (% kontroli) oraz zawartością toksyn fuzaryjnych (deoksyniwalenolu [DON] niwalenolu [NIV] oraz zearalenonu [ZEN]) w ziarnie. Wektory wskazują kierunek wzrostu wartości zmiennych. Na zielono zaznaczono genotypy z DW 17/18, na czerwono wzorce podatne

ANNA LINKIEWICZ**KRZYSZTOF MICHALSKI**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Laboratorium Kontroli GMO

Kierownik Tematu: dr Anna Linkiewicz Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Laboratorium Kontroli GMO, tel. +48 (22) 7334517, e mail: a.linkiewicz@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 13.

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

Słowa kluczowe: Crispr-Cas9, edytowanie genomu, mutageneza miejscowo-specyficzna, pszenżyto, TALEN

Celem badań było opracowanie konstruktów genowych do wprowadzenia mutacji w genach związanych z porastaniem u pszenżyta, ocenę funkcjonalności konstruktów nukleaz w systemie transfekcji protoplastów oraz optymalizację transformacji roślin wybranymi konstruktami i regeneracji *in vitro* pszenżyta. Zaprojektowano i wykonano 6 konstruktów do edycji sekwencji homologów genów PDF1 i CYP707A u pszenżyta. Konstrukty były sprawdzane metodą *transient assay* na protoplastach izolowanych z 4–7 dniowych siewek pszenżyta odmiany Bogo. Konstrukty zawierające sgRNA3 i sgRNA5 zostały wykorzystane do wprowadzania zmian w DNA protoplastów przy użyciu transfekcji z PEG. Obecny w konstrukcie gen markerowy GFP umożliwił ocenę wydajności transfekcji. Analizy na poziomie DNA potwierdziły wystąpienie zmian typu

delecje/insercje w przewidywanych regionach homologów genów CYP707A i PDF1 u pszenżyta. Wykonano analizy prowadzące do allelo-specyficznego amplifikacji PCR dla poszczególnych genomów cząstkowych A, B i R dla genów poddanych mutagenezie. Wybrane konstrukty genowe po przeklonowaniu do szczepu AGL1 *A. tumefaciens* zostały użyte do transformacji niedojrzałych zarodków pszenżyta zgodnie z procedurami opisanymi w Oleszczuk i in. 2004, z modyfikacjami własnymi. W wyniku prowadzonej selekcji i regeneracji otrzymano 10 linii T0 pszenżyta, które wykazały *in vitro* odporność na czynnik selekcyjny fosfotrycynę.

LITERATURA

Oleszczuk S., Sowa S., Zimny J. 2004. Direct embryogenesis and green plants regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (*x Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep.* 22: 885 — 893.

JUSTYNA LEŚNIEWSKA-NOWAK**MICHAŁ NOWAK****MAGDALENA SOZONIUK**

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

Kierownik Tematu: dr Justyna Leśniowska-Nowak Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, tel. 81 4456625,

e-mail: justyna.lesniowska@up.lublin.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.802.9.2018, Zadanie 17.

Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone

Development of new genetic sources of triticale based on wide crosses

Słowa kluczowe: karłowatość, krzyżowanie oddalone, komponenty plonu, pszenżyto

CEL ZADANIA 1

Celem zadania 1 było uzyskanie mieszańców wstecznych (BC_1) w wyniku krzyżowania roślin pokolenia F_1 otrzymanych z krzyżowania kozińców z pszenicą oraz pszenżytem, a także uzyskanie mieszańców F_1 , gdzie genotypy z rodzaju *Aegilops* przeznaczone zostaną na formę ojcowską.

WYNIKI

Wykonano 40 kombinacji krzyżówkowych pomiędzy pszenżytem i kozińcami. We wszystkich wykonanych kombinacjach kozińców był formą ojcowską a zboże formą mateczną. Zdolność kombinacyjna została obliczona, zarówno dla form uprawnych, jak również dla kozińców. Dla pszenżyta wahała się od 0% do 21,6%, natomiast dla kozińców od 0% do 37,5%. Ponadto wykonano 30 kombinacji krzyżówkowych pomiędzy mieszańcami oddalonymi a formami uprawnymi pszenicy i pszenżyta. Mieszańce zawsze były formą mateczną. Dla każdego mieszańca oddalonego obliczono zdolność kombinacyjną w krzyżowaniach wstecznych z pszenżytem. Zdolność kombinacyjna wahała się od 0% do 20% dla mieszańców oddalonych.

WNIOSKI

- Odmiany uprawne pszenżyta mogą być z dużym powodzeniem wykorzystywane na formy mateczne w krzyżowaniach z kozieńcami.
- 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.
- Zdolność kombinacyjna mieszańców oddalonych w krzyżowaniach wstecznych jest generalnie wyższa niż przy uzyskiwaniu mieszańców F_1 .

CEL ZADANIA 2

Celem zadania 2 była analiza wysokości oraz podstawowych elementów plonu mieszańców oddalonych F_3 z kozieńcami (tab. 1).

Tabela 1

Rośliny mieszańcowe poddawane ocenie laboratoryjnej

Kombinacja krzyżówkowa	Liczba analizowanych roślin mieszańcowych	Formy rodzicielskie	Liczba analizowanych roślin rodzicielskich
[(<i>Ae. column.</i> × <i>Poshuk</i>) × <i>Top</i>] × <i>Tomko</i> × <i>Tomko</i>	15	<i>Tomko</i>	15
[(<i>Ae. column.</i> × <i>Poshuk</i>) × <i>Top</i>] × <i>Tomko</i>	15	<i>Poshuk</i>	15
		<i>Top</i>	15

WYNIKI

Analizie poddano mieszańce oddalone uzyskane w wyniku krzyżowania kozieńca (*Aegilops columnaris*) z pszenicą po jednym i dwóch krzyżowaniach wstecznych z odmianą pszenżyta *Tomko*. Wykazano, że mieszańce BC_1 i BC_2 nie różnią się istotnie między sobą pod względem żadnej z analizowanych cech. Charakteryzują się one istotnie wyższą liczbą kłosek w kłosie głównym w porównaniu z obiema odmianami pszenicy, a także istotnie niższą liczbą ziarniaków z kłosa głównego w porównaniu z odmianą *Tomko*.

Dwukrotne krzyżowanie wsteczne wpłynęło na wzrost masy ziarniaków z kłosa głównego. Masa ziarniaków w kłosie w mieszańcu pokolenia BC_1 była istotnie niższa niż masa ziarniaków w odmianie *Tomko*. W pokoleniu BC_2 masa ta była już statystycznie taka sama jak w przypadku ‘*Tomko*’.

Zbitość kłosa mieszańców nie różniła się istotnie od pszenżyta, ale była istotnie wyższa w porównaniu z obiema odmianami pszenicy.

Mieszańce obu pokoleń wstecznych miały ponadto istotnie obniżoną płodność kłosa w stosunku do wszystkich odmian pszenicy i pszenżyta. Masa tysiąca ziarników w mieszańcach obu pokoleń nie różniła się istotnie od pszenżyta ‘*Tomko*’. Jedynie mieszańiec BC_1 wykazywał istotnie wyższą MTZ w porównaniu z pszenicą ‘*Poshuk*’.

WNIOSKI

- Krzyżowanie spowodowało zwiększenie wysokości roślin mieszańcowych w stosunku do form rodzicielskich.
- Krzyżowanie spowodowało podwyższenie MTZ w roślinach pokolenia BC₁ jak i BC₂.

CEL ZADANIA 3

Celem zadania 3 było zwiększenie wydajności uzyskiwania mieszańców międzyrodzajowych pszenicy i pszenżyta z kozieńcami poprzez zastosowanie techniki ratowania zarodków.

WYNIKI

Do rozwoju w kulturach *in vitro* przekazano 20 zarodków. Pozostałe ziarniaki zostały wysiane bezpośrednio do ziemi. Spośród wyłożonych 20 zarodków uzyskano 6 roślin (tab. 2). Daje to wydajność na poziomie 30%.

Tabela 2

Kombinacje krzyżówkowe przekazane do Embryo Rescue

Lp.	Kombinacja z pszenżytem	Liczba zarodków	Liczba roślin
1	Baltiko × Ae44	2	0
2	Baltiko × Ae52	1	0
3	Lombardo × Ae39	1	1
4	Lombardo × Ae44	3	1
5	MAH4-16 × Ae31	1	0
6	MAH4-16 × Ae18	3	1
7	Rotondo × Ae38	3	0
8	Rotondo × Ae40	1	1
9	Sekret × Ae9	2	0
10	Tomko × Ae87	1	1
11	Tomko × Ae156	2	1
		20	6

WNIOSKI

- Zastosowanie techniki ratowania zarodków umożliwiło zwiększenie wydajności uzyskiwania mieszańców międzyrodzajowych.

CEL ZADANIA 4

- Mapowanie asocjacyjne populacji CZR876/01×CZR891/01.
- Analiza populacji 541×84A/2 z wykorzystaniem technologii DArT.
- Potwierdzenie charakteru mieszańcowego roślin uzyskanych w roku 2017.

WYNIKI

Mapowanie asocjacyjne populacji CZR876/01×CZR891/01

- Genotypowanie populacji mapującej pozwoliło na identyfikację 10489 markerów silicoDArT, z których 4632 było polimorficzne.
- Mapowanie asocjacyjne pozwoliło na identyfikację 75 markerów związanych z wysokością rośliny.
- 9 zasocjowanych markerów zostało zmapowanych na genetycznej mapie pszenżyta (Tyrka i in., 2015).
- Markery pogrupowano w dwa regiony chromosomalne przypisane do chromosomu 5R
- Markery pogrupowano w dwa obszary chromosomalne położone w odległości około 11 cM.

Analiza populacji 541×84A/2 z wykorzystaniem technologii DArT

W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano 37 963 markery SilicoDArT specyficzne dla roślin wczesnych, późnych oraz o pośredniej wczesności. W obrębie tych markerów zidentyfikowano 25 269 markery SNP.

Średnia wartość PIC dla wszystkich analizowanych prób wynosiła 0,269. W analizowanej populacji stwierdzono dość wysoki współczynnik heterozygotyczności, który wyniósł 0,353. Związane jest z faktem iż analizowana populacja była populacją F₂, czyli na bardzo wczesnym poziomie zaawansowania hodowlanego.

Potwierdzenie charakteru mieszańcowego roślin uzyskanych w roku 2017

W celu potwierdzenia charakteru mieszańcowego wykorzystano 30 kombinacji starterów SRAP. W większości przypadków uzyskano monomorficzne obrazy nieumożliwiające identyfikację i potwierdzenia charakteru mieszańcowego badanych genotypów. Zidentyfikowano trzy pary starterów, które generowały wysoki poziom polimorfizmu. Umożliwiło to potwierdzenie mieszańcowości wszystkich badanych form. Para me5+em14_2 potwierdziła mieszańcowość genotypów Ae156×Torino, Ae156×Sailor oraz Ae 157×Top. Zidentyfikowano amplikony o wielkościach 130bp, 490bp i 600bp które były specyficzne dla odmiany Torino i jednocześnie występujące w mieszańcu. Dla odmiany Sailor i mieszańca Ae156×Sailor zidentyfikowano produkty o wielkości 200bp, 350bp, 420bp. Druga para starterów (me22+em15) potwierdziła charakter mieszańcowy genotypów Ae152×B124, Ae75×Sailor, Ae75×L169. Produkty specyficzne dla B124 oraz mieszańca miały wielkość 210bp, 420bp i 550bp. Dla odmiany Sailor i mieszańca zidentyfikowano 4 specyficzne amplikony: 150bp, 210bp, 550bp, 900bp. Mieszańcowość Ae75×L169 potwierdziła obecność amplikonów o wielkości 550bp i 900bp.

Trzecia para starterów me6_1+em7 potwierdziła mieszańcowość czterech genotypów. Mieszaniec o kombinacji Ae74×Astoria potwierdzony został amplikonem o wielkości 350bp, mieszaniec Ae63×Figura amplikonem 550bp. Produkty o wielkościach 350bp, 550bp, 710bp potwierdziły mieszańcowy charakter kombinacji Ae77×Lombardo. Produkty 350bp i 710bp były również specyficzne dla genotypu Ae128 × Lombardo.

W tabeli zaznaczono, które produkty występują u matki, ojca i mieszańca. Charakter mieszańcowy potwierdzają produkty występujące u form ojcowskich i mieszańca, a nie występujące u form matecznych.

WNIOSKI

Mapowanie asocjacyjne populacji CZR876/01×CZR891/01

- Mapowanie asocjacyjne przy użyciu populacji biparentalnej F2 za pomocą markerów silicoDArT umożliwiło identyfikację 75 markerów związanych z karłowatością QTL znajdującą się na chromosomie 5R z genomu pszenżyta.
- Wykorzystanie dostępnej mapy genetycznej pszenżyta zasugerowało 92 dodatkowe markery, które mogą być wartościowe dla dalszej hodowli.
- Istotne jest sprawdzenie, czy zidentyfikowane QTL (y) są dominujące lub recesywne, jeżeli mają być stosowane w programach hodowlanych, i czy warto przekształcać zidentyfikowane markery do celów MAS.
- Poziom polimorfizmu uzyskany w badaniach własnych jest wystarczający dla pewnej i wiarygodnej oceny zróżnicowania genetycznego analizowanych form pszenżyta ozimego.

Analiza populacji 541×84A/2 z wykorzystaniem technologii DArT

- Poziom polimorfizmu uzyskany w badaniach własnych jest wystarczający dla pewnej i wiarygodnej oceny zróżnicowania genetycznego analizowanych form pszenżyta ozimego.

Potwierdzenie charakteru mieszańcowego roślin uzyskanych w roku 2017

- Markery SRAP okazały się przydatne w ocenie charakteru mieszańcowego badanych genotypów.

MICHAŁ NOWAK¹**PIOTR T. BEDNAREK**²**JUSTYNA LEŚNIEWSKA-NOWAK**¹**MAGDALENA SOZONIUK**¹**KAROLINA DUDZIAK**¹**MAGDALENA KAWĘCKA**¹**KAROLINA RÓŻANIECKA**¹¹ Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

Kierownik Tematu: dr Michał Nowak Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet

Przyrodniczy w Lublinie ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, tel. 81 4456901,

e-mail: michal.nowak@up.lublin.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.802.9.2018, Zadanie 82.

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 triticales

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

1. FENOTYPOWANIE LINII WSOBNYCH ORAZ LINII DH PSZENŻYTA

Celem tematu badawczego w roku 2018 była ocena plonu analizowanych genotypów pszenżyta w warunkach doświadczenia polowego. Analizowane genotypy pszenżyta wysiane zostały jesienią w roku 2017 na poletka doświadczalne o równej powierzchni, wynoszącej 2 m² przy gęstości zasiewu wynoszącej 350 ziarniaków/m² w celu analizy plonu uzyskanego z jednostki powierzchni dla każdego genotypu. Każdy obiekt wysiano w dwóch oddalonych od siebie lokalizacjach. W trakcie sezonu wegetacyjnego rośliny poddawano zabiegom stosowanym typowo w doświadczeniach poletkowych. W fazie dojrzałości pełnej rośliny zebrano mechanicznie i określona została masa ziarniaków uzyskanych z każdego poletka, która następnie przeliczona została na plon z 1 m².

WYNIKI

Dla badanych genotypów ozimego pszenżyta heksaploidalnego średni plon z jednostki powierzchni (1 m^2) w roku 2018 wyniósł $0,57 \text{ kg/m}^2$. Najniższy średni plon uzyskano dla rodu LD_122/08 ($0,18 \text{ kg/m}^2$) natomiast najwyższy dla rodu DC_07063/01 ($1,4 \text{ kg/m}^2$).

WNIOSKI

- Średni plon pszenżyta uzyskany w badaniach wyniósł $5,7 \text{ Mg/ha}$ i był wyższy niż średni plon uzyskiwany dla tego zboża w warunkach uprawy w Polsce.
- Wynik plonowania uzyskany w drugim roku badań był niższy od uzyskanego w poprzednim sezonie wegetacyjnym, co sugeruje znaczny wpływ warunków środowiska na cechę. Potwierdza to konieczność uwzględnienia tego czynnika w szacowaniu efektu heterozji u pszenżyta.
- Analizowane formy pszenżyta charakteryzowały się bardzo dużym stopniem zróżnicowania pod względem plonowania (od $1,8$ do 14 Mg/ha), co potwierdza wykorzystanie jako materiał badawczy w projekcie form zróżnicowanych, charakteryzujących się zarówno niskim, jak i wysokim potencjałem plonowania.

2. GENOTYPOWANIE POPULACJI MAPUJĄCYCH RIL

Celem tematu badawczego było uzyskanie preparatów DNA z przeznaczeniem do analiz techniką DArT dla jednej populacji mapującej RIL składających się ze 170 osobników, a następnie ich wysyłka do firmy Diversity Array Technology Ltd. i analiza otrzymanych wyników.

Materiał roślinny w zadaniu stanowiła populacja mapująca rekombinowanych linii wsobnych (RIL) pszenżyta pokolenia S_6 . DNA z przeznaczeniem do analiz techniką DArT izolowano ze świeżych liści badanych roślin. Do izolacji DNA wykorzystano komercyjny zestaw odczynników oparty na oczyszczaniu kwasu nukleinowego na złożu w kolumnkach. Wyizolowane preparaty DNA poddane zostały ocenie jakościowej i ilościowej za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000, jak również analizie integralności przy użyciu elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym. W kolejnym etapie wszystkie preparaty DNA doprowadzono do jednakowego stężenia $100 \text{ ng}/\mu\text{l}$ i przesłano do firmy Diversity Array Technology Ltd. (Canberra) w celu wykonania genotypowania w oparciu o markery DArT.

WYNIKI

W wyniku realizacji zadania dokonano przekształcenia surowego zestawu danych otrzymanych z Diversity Arrays Technology do postaci usystematyzowanego pliku wsadowego, umożliwiającego wykonanie procedury mapowania z wykorzystaniem dedykowanego oprogramowania. W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano 22 018 markerów silicoDArT specyficznych dla poszczególnych genotypów populacji S_6 pszenżyta. W obrębie tych markerów zidentyfikowano 6 228 markerów SNP.

Średnia wartość PIC dla wszystkich analizowanych prób wynosiła 0,402, natomiast wartość współczynnika heterozygotyczności wyniosła 0,112.

WNIOSKI

- Poziom polimorfizmu uzyskany w badaniach własnych jest wystarczający dla pewnej i wiarygodnej oceny zróżnicowania genetycznego analizowanych form pszenżyta ozimego.
- Współczynnik heterozygotyczności uzyskany w wyniku genotypowania techniką DArT dla populacji rekombinowanych linii wsobnych cechuje się relatywnie niską wartością w porównaniu z populacją materiałów hodowlanych, co było obserwacją oczekiwaną.

3. KRZYŻOWANIE WYBRANYCH GENOTYPÓW, OCENA MIESZAŃCÓW F₁ I OSZACOWANIE EFEKTU HETEROZJI.

Celem tematu badawczego w roku 2018 była ocena plonowania mieszańców F₁ uzyskanych w roku 2017 na drodze krzyżowania ze sobą genotypów charakteryzujących się największym zróżnicowaniem genetycznym, oszacowanym na podstawie analizy markerów DNA zlokalizowanych na poszczególnych chromosomach pszenżyta oraz oszacowanie efektu heterozji.

Badane mieszańce oraz odpowiednie formy rodzicielskie wysiano na poletka doświadczalne o powierzchni 1 m² przy gęstości wysiewu 350 ziarniaków/m². Doświadczenie polowe założono w gospodarstwie doświadczalnym Felin Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Efekt heterozji został oszacowany na podstawie oceny plonu z jednostki powierzchni, która została wykonana w warunkach doświadczenia polowego. Plon mieszańców F₁ 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 form rodzicielskich o wyższym plonowaniu.

WYNIKI

Wartości współczynnika MPH dla badanych form wahały się w zakresie od -28% do +129% przy zastosowaniu do projektowania formuły krzyżowania markerów o różnej lokalizacji chromosomowej. Dla efektu BPH wartości te wyniosły odpowiednio -38% i +111%. Dodatkowo uzyskane wyniki porównano z wynikiem uzyskanym przy wykorzystaniu do szacowania dystansu genetycznego ogólnej puli markerowej, niezależnie od lokalizacji chromosomowej i wykazano, że wybór form w oparciu o ogólną pulę markerów nie pozwolił w przeprowadzonym doświadczeniu na uzyskanie efektu heterozji.

WNIOSKI

- Współczynniki MPH i BPH uzyskane dla mieszańców F_1 analizowanych w ramach projektu były znacznie wyższe, niż prezentowane w publikacjach. Najbardziej prawdopodobną przyczyną tej różnicy jest wykonanie doświadczenia w pojedynczym roku na poletkach o relatywnie niewielkiej powierzchni.
- Analiza oparta na markerach lokalizujących się na konkretnych chromosomach pszenżyta pozwala na dużo bardziej precyzyjną predykcję wystąpienia zjawiska heterozji w pokoleniu F_1 w porównaniu z ogólną pulą markerową.

4. ANALIZY TAKSONOMICZNE W OPARCIU O PULĘ MARKEROWE I WYBÓR GENOTYPÓW DO KRZYŻOWAŃ.

Celem tematu badawczego było zaplanowanie drugiej serii krzyżowań z wykorzystaniem drugiego zestawu niezależnie otrzymanych form mieszańcowych.

Dane odnośnie efektu heterozji uzyskane w wyniku realizacji zadania 3 zostały zestawione z danymi analizy hierarchicznej. Analizę tą 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 analizę porównawczą wytypowano te grupy markerów, których wykorzystanie umożliwiło uzyskanie mieszańców o najwyższym plonie. Równolegle zgrupowano markery lokalizujące się na tych chromosomach, które dały najgorsze wyniki. W ramach realizacji ponownie przeprowadzona analizę statystyczną i na jej podstawie wytypowano nowe formuły krzyżowań.

WYNIKI

Uzyskane wartości współczynnika maksymalnego dystansu genetycznego stanowiły podstawę do wyboru komponentów rodzicielskich do krzyżowań. Wybrano po jednej parze genotypów skrajnych, które charakteryzowały się największym zróżnicowaniem genetycznym w obrębie poszczególnych chromosomów i przeznaczono je na formy rodzicielskie do krzyżowania (tab. 1).

Formuły krzyżowań zaplanowanych celem uzyskania drugiego zestawu mieszańców F₁ do oszacowania efektu heterozji

Lp.	Chromosom	Kombinacja krzyżówkowa
1	1A	DC 07064-16 × BOH_2207-3
2	1B	DL 678/12 × DANKO_12
3	1R	cD 175/08 × DS_4211/11
4	2A	L-203 × DL_643/09
5	2B	B-210 × DANKO_11
6	2R	DL 593/07 × DD_333/09
7	3A	B-262 × L-205
8	3B	MAH 34985-5 × DS 4043/13
9	3R	DT_270/11 × BOH_1439-5
10	4A	MAHD 35081-7 × DL_402/11
11	4B	BOH_1439-8 × MAHD 35188-16
12	4R	MAH 34964-2 × CT 08006/12
13	5A	DL 26/13 × BOH_2039-2
14	5B	DC_07063/03 × DS_4211/11
15	5R	CT 08006/12 × L-207
16	6A	BOH_1684-2 × LAD 21/11
17	6B	DC_08220-4 × DANKO_8
18	6R	B-263 × CT 10104-74
19	7A	BOH_2039-2 × CT 08221/08
20	7B	B-47 × DL_593/11
21	7R	DC 07004-4 × DD 293/11

WNIOSKI

— Powtórzenie analizy potwierdziło, że lokalizacja chromosomowa markerów DArTseq wpływa na uzyskiwane wartości współczynników dystansu genetycznego pszenżyta.

MIROSLAW KWAŚNIEWSKI
KAROLINA CHWIAŁKOWSKA
URSZULA NOWAKOWSKA
MAŁGORZATA NAWROT
JANUSZ JELONEK
GRAŻYNA SKAWIŃSKA-ZYDRÓŃ
AGNIESZKA BIELSKA

Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Kierownik Tematu: dr hab. Mirosław Kwaśniewski Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski w Katowicach,
ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. 32 2009457, 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.

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

Słowa kluczowe: epigenetyka, jęczmień, NGS, stres, susza, zmienność transgeneracyjna

Metylacja cytozyny jest modyfikacją DNA odgrywającą istotną rolę w regulacji ekspresji genów. Całościowy profil metylacji cytozyny w genomie, określany jako metylom DNA, może ulegać zmianom o charakterze dziedzicznym lub niedziedzicznym, określanym zbiorczo jako zmiany epigenetyczne w DNA. Indukowane czynnikami stresowymi zmiany epigenetyczne, a w konsekwencji zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów, odgrywają istotną rolę w procesie odpowiedzi roślin na niekorzystne warunki środowiskowe. Długoterminowym celem wieloletniego projektu jest weryfikacja hipotezy zakładającej, że zmiany w metylacji DNA, indukowane podczas stresu suszy, mogą mieć pozytywną wartość adaptacyjną. W związku z tym zakłada się

również, że indukcja nowych, korzystnych epialleli może być cennym narzędziem stosowanym w hodowli roślin.

W roku 2018 realizowano dwa tematy badawcze.

TEMAT BADAWCZY 1

Globalne analizy transkryptomu roślin pokolenia EPI₃, które są potomstwem roślin EPI₂ wyprowadzonych w warunkach kontrolowanego eksperymentu polowego w roku 2016, oraz analizy porównawcze transkryptomów pomiędzy wyprowadzonymi populacjami roślin

CEL

Podstawowym celem realizacji tematu badawczego 1 było uzyskanie globalnych profili transkryptomicznych roślin pokolenia EPI₃, które są potomstwem 6 populacji roślin EPI₂ wyprowadzonych w warunkach kontrolowanego eksperymentu polowego w roku 2016.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badań stanowiły rośliny jęczmienia jarego odmiany ‘Karat’ pokolenia EPI₃ będące potomstwem 6 populacji roślin pokolenia EPI₂ wyprowadzonych w roku 2016. Rośliny hodowano w kontrolowanych warunkach szklarni WBiOŚ, w warunkach identycznych jak w roku 2015. W celu analizy transkryptomu badanych roślin, postępowano identycznie jak w poprzednich latach prowadzenia analiz RNA-Seq. Analiza RNA-Seq przeprowadzona została na matrycy mRNA oczyszczonego z frakcji rRNA i tRNA metodą deplecji z użyciem bibliotek anty-rRNA i anty-tRNA. Gotowe biblioteki połączono w równomolowych ilościach, po 6 próbek, a następnie przeprowadzono generowanie klastrów i zsekwencjonowano je w trybie sparowanych końców (PE) 2 × 76 pz, w Centrum Analiz Genomowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, z wykorzystaniem sekwenatora NGS HiSeq 4000 firmy Illumina. Na jednej ścieżce zsekwencjonowano 6 prób RNA-Seq.

Jakość uzyskanych danych sekwencyjnych była oceniana przed analizą oraz po każdym z jej etapów, za pomocą narzędzia FastQC (Babraham Institute, Cambridge, Wielka Brytania). W związku z wysoką jakością uzyskanych odczytów, zostały one poddane jedynie łagodnemu przycięciu i filtrowaniu. Odczyty zmapowano do genomu referencyjnego jęczmienia (ASM32608v1.31 — Ensembl Plants) za pomocą narzędzia STAR umożliwiającego mapowanie z przerwami. Za pomocą wbudowanej opcji zliczono ilości odczytów mapujących się unikalnie do określonych genów. Zliczenia odczytów zostały znormalizowane za pomocą algorytmu narzędzia DESeq2. Analiza różnic w ekspresji genów pomiędzy próbami, była wykonywana również za pomocą narzędzia DESeq2. Dalszą analizę uzyskanych danych prowadzono z wykorzystaniem szeregu dedykowanych pakietów w środowisku R.

WYNIKI

Przeprowadzono eksperyment związany ze wzrostem opisanych powyżej grup roślin w kontrolnych warunkach szklarniowych. Podczas eksperymentu kontrolowano warunki wilgotnościowe gleby w celu utrzymania stałego poziomu wilgotności wagowej gleby. Warunki eksperymentu (gleba, wilgotność gleby, temperatura i oświetlenie w szklarni oraz pora roku) były identyczne jak w latach poprzednich kompleksowego projektu, co gwarantuje możliwość porównania stanu transkryptomu analizowanych roślin między pokoleniami.

WNIOSKI

Przeprowadzone analizy jakości i ilości przygotowanych bibliotek potwierdziły poprawne przygotowanie prób do analiz metodą RNA-Seq. Analizy bioinformatyczne wykazały, że uzyskane wyniki umożliwiają dokładną analizę transkryptomów badanych roślin. Podczas przeprowadzonych analiz zyskano wysoki poziom unikalnie zmapowanych odczytów w obrębie wszystkich prób. Następnie, wyniki przeprowadzonych badań analizowano łącznie z innymi wynikami w ramach tematu badawczego 2.

TEMAT BADAWCZY 2

Wielowymiarowe analizy bioinformatyczne i statystyczne danych uzyskanych w toku realizacji projektu w latach 2014–2018

CEL

Celem tematu badawczego 2 była pełna, wielowymiarowa charakterystyka zmian w transkrypcji i metylacji roślin jęczmienia pokolenia EPI3 w stosunku do pokoleń poprzednich oraz pokolenia wyjściowego EPI0, charakterystyka oraz ocena odziedziczalności epialleli indukowanych w trakcie realizacji projektu w układzie kumulacyjnym (EPI0, EPI1, EPI2) w odniesieniu do epitypu wyjściowego EPI0 oraz, w konsekwencji, określenie możliwości wykorzystania indukowanej zmienności epigenetycznej w pracach hodowlanych roślin zbożowych oraz jej pełna charakterystyka molekularna i ocena wpływu na fenotyp.

MATERIAŁ I METODY

Materiał analiz stanowiły wszystkie wyniki oraz surowe dane pochodzące z analiz molekularnych i fenotypowych, uzyskanych w latach 2014–2018. Na podstawie zebranych danych przeprowadzone zostały ponownie analizy porównawcze ekspresji genów oraz analizy porównawcze profili metylacyjnych roślin pokoleń EPI0-EPI3. Ponadto, przeprowadzono analizy oceny wpływu zmienności metylacyjnej na zmienność transkryptyczną, a także analizy koncepcyjne wpływu zmienności transkryptomu na szlaki metaboliczne i fizjologię roślin, przejawiające się w zmianach fenotypu/plonu roślin.

WYNIKI

W przeprowadzonych analizach wykazano, że doświadczanie stresu suszy w stadium mejozy ale też w stadium siewki indukuje szereg zmian w poziomie ekspresji genów. Aby określić stopień odziedziczalności wyindukowanych stresem niedoboru wody profili ekspresyjnych, przeprowadzono szereg analiz w wielu układach porównawczych. Wytypowano szereg genów zaangażowanych w kluczowe procesy odpowiedzi na warunki niedoboru wody w glebie, jednakże odpowiedź na obydwa rodzaje suszy była zróżnicowana. Kompleksowe analizy porównawcze kilku pokoleń roślin badanych podczas całego projektu umożliwiły jednak wyciągnięcie znacznie istotniejszych wniosków. Co szczególnie interesujące, wykazano, że pewna część genów wykazujących zmieniony profil ekspresji pod wpływem stresu suszy, wykazywała jego odziedziczalność w kolejnym pokoleniu — w szczególności w przypadku roślin doświadczających suszy w stadium mejozy. W takim przypadku, odziedziczalność profilu ekspresji charakterystycznego dla odpowiedzi na stres, powodować może z założenia przygotowanie na wystąpienie tego stresu u roślin kolejnego pokolenia, a tym samym potencjalnie większą tolerancję na stres w momencie jego wystąpienia. Co ciekawe, przeprowadzone analizy wykazały, że wzrost kolejnych pokoleń roślin w optymalnych warunkach nawodnienia nie powoduje istotnego powrotu profili ekspresyjnych do stanu z początku eksperymentu (przed zadaniem jakiegokolwiek stresu).

W konsekwencji wytypowano pulę genów, których profil ekspresji jest stabilnie przekazywany w kolejnych pokoleniach, mimo braku czynnika indukującego w postaci stresu niedoboru wody. Analizy ontologii zidentyfikowanych genów umożliwiły charakterystykę procesów, które regulowane są przez te geny. Wykazano, że geny o obniżonym lub podwyższonym profilu ekspresji u wszystkich roślin analizowanych w latach 2015–2018 w stosunku do roślin kontrolnych z 2014 roku zaangażowane są głównie w transport transmembranowy i transport komórkowy jonów oraz metabolizm tłuszczów. Procesy te związane są z adaptacją do warunków niedoboru wody, w związku z czym możliwe jest stwierdzenie, że zaobserwowana stabilna indukcja zmian w ekspresji genów może pozytywnie wpływać na adaptację do warunków stresu w kolejnych pokoleniach roślin, a tym samym zwiększać ich produktywność w stosunku do roślin, u których taka indukcja nie wystąpiła.

WNIOSKI

Przeprowadzona analiza zmian w metylomach roślin wyprowadzanych w kolejnych latach kilkuletniego projektu, umożliwiła identyfikację regionów genomowych podlegających zróżnicowanej metylacji. Wykazano, że największa liczba zmian wystąpiła w potomstwie roślin, które w roku 2014 i 2015 wzrastały w warunkach kontrolnych a w roku 2016 przeszły suszą polową, w stosunku do roślin które w każdym eksperymencie wzrastały w warunkach kontrolnych, oraz w potomstwie roślin, które w roku 2014 i 2015 przeszły suszę późną a w roku 2016 wzrastały w warunkach

kontrolnych, w stosunku do roślin które w każdym eksperymencie wzrastały w warunkach kontrolnych.

Analiza funkcji genów, w których zaszło najwięcej odziedziczalnych zmian metylacyjnych wyindukowanych stresem niedoboru wody, wskazuje na istotny udział indukowanych zmian metylacyjnych w regulacji procesów epigenetycznych związanych z modyfikacjami histonów, oraz procesami regulacji ekspresji genów na drodze miRNA. Jest to niezwykle ciekawa i oryginalna obserwacja, ponieważ sugeruje wpływ wyindukowanych zmian w metylomie na stabilizację zmian transkryptycznych.

Geny, których profile ekspresji i/lub metylacji podlegają stabilnej transmisji międzypokoleniowej mogą leżeć u podstaw procesów adaptacyjnych do warunków stresu. 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.

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.

JERZY CZEMBOR**ALEKSANDRA PIETRUSIŃSKA****KINGA SMOLIŃSKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Jerzy Czembor Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy

Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, tel. 22 883273863, e-mail: j.h.czembor@ihar.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.802.19.2018, Zadanie nr 27.

Współdziałanie odporności na mączniaka (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) warunkowanej genem *mlo* z wartością cech gospodarczych jęczmienia ozimego

Interaction between powdery mildew (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) resistance determined by *mlo* gene and economical value characteristics in winter barley

Słowa kluczowe: *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, gen *mlo*, jęczmień ozimy, mączniak prawdziwy

Straty w plonie jęczmienia jarego i ozimego powodowane przez mączniaka prawdziwego sięgają 30%. Recesywny gen *mlo* warunkuje odporność form jarych na wszystkie znane dotychczas patotypy *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, sprawcy mączniaka prawdziwego (Czembor i in., 2016). Brak jest komercyjnych odmian jęczmienia ozimego, których odporność na mączniaka prawdziwego jest warunkowana tym genem. Do badań wykorzystano linie jęczmienia ozimego: 6-rzędowa BKH 5735 oraz 2-rzędowa: RAH 22, jako donory odporności na mączniaka warunkowanej genem *mlo* pochodzącym z form jarych. Jako biorców genu *mlo* wykorzystano dwie 2-rzędowe i dwie 6-rzędowe elitarne odmiany jęczmienia ozimego zarejestrowane w Polsce, o wysokiej wartości cech gospodarczych, lecz podatne na patotypy mączniaka prawdziwego wirulentne w stosunku do genów M1 St, 1-B-53 i innych genów obecnych w nowszych odmianach jęczmienia jarego i ozimego.

Cele szczegółowe realizowane w roku 2018 to: (1) ocena linii pokolenia F₃BC₂ homozygotycznych dla genu *mlo* oraz wybór i rozmnożenie do dalszych badań sublinii F₆BC₂ na podstawie ocen ważnych pod względem gospodarczym cech, w tym odporności

na choroby i potencjału plonowania, (2) ocena plonowania i odporności na ważne choroby linii F_5BC_2 wybranych na podstawie oceny pod kątem odporności na choroby oraz o korzystnych cechach gospodarczych w warunkach polowych (3) określenie obecności genu *mlo* dla 1000 roślin F_6BC_2 , reprezentujących 100–150 linii wytypowanych do badań i reselekcji w warunkach polowych, na podstawie oceny fenotypowej w warunkach kontrolowanych i molekularnej.

W warunkach polowych oceniono wielośrodowiskowo 200 linii wyprowadzonych z siewek pojedynczych roślin należących do 4 populacji mieszańcowych o genotypie *mlomlo* pokolenia F_5BC_2 jęczmienia ozimego (po około 50 linii na populację). Homozygotyczność genotypu *mlomlo* określona została testem fitopatologicznym i markerami molekularnymi w roku poprzednim. W okresie wegetacji wykonane zostały oceny cech: stan roślin przed zimą, stan po zimie, odporność na choroby, wczesność i wysokość (zgodnie z metodyką COBORU). Nie stwierdzono dużego nasilenia mączniaka prawdziwego, a odporność wszystkich 200 linii i 4 form rodzicielskich oceniono w zakresie 7–9. Znacznie większe zróżnicowanie stwierdzono dla rdzy karłowej. W obrębie populacji (Souleyka \times BKH 735) \times Souleyka oraz (Linia 42 \times Metaxa) \times Metaxa można było wydzielić kilka obiektów, których porażenie w Wiatrowie i Szelejowie oceniono na 4 (średni stopień porażenia dla tych populacji wahał się w zakresie 6,1–6,5). Linie należące do populacji (Titus \times BKH 735) \times Titus były w mniejszym stopniu porażone rdzą karłową w stosunku do pozostałych populacji (średnia powyżej 7,0 we wszystkich lokalizacjach). Natomiast były one bardziej podatne na rynchosporiozę (zakres ocen 3,0–9,0; średnie porażenie w zależności od lokalizacji 6,7–7,8). W żadnej z lokalizacji nie stwierdzono dużego nasilenia żółtej karłowatości jęczmienia.

Dodatkowo, w warunkach polowych oceniono 490 siewek należących do 4 populacji mieszańcowych pokoleń F_5BC_2 jęczmienia ozimego w genomie, których w roku poprzednim potwierdzono fenotypowo i molekularnie obecność genu *mlo* a 200 z nich wytypowano do dalszych badań wielośrodowiskowych i rozmnożono (po ok. 50 na populację).

Do doświadczeń poletkowych prowadzonych jedno środowiskowo, których celem była ocena plonowania i odporności na ważne choroby, włączono 35 linii F_5BC_2 jęczmienia ozimego, o genomie *mlomlo*. Układ doświadczeń: doświadczenie 4-powtórzeniowe; poletka 10 m² do zbioru. W okresie wegetacji wykonano oceny (wg metodyki COBORU): stan roślin przed zimą i po zimie, porażenie przez choroby: mączniak prawdziwy, rdza karłowa, żółta karłowatość jęczmienia, rynchosporioza oraz termin kłoszenia, wysokość roślin i plon. Na podstawie analiz statystycznych wykonanych za pomocą programu ADOWBLOK-(TP) wykazano istotne zróżnicowanie pomiędzy badanymi liniami w obrębie każdej populacji, oraz wskazano linie plonujące powyżej odmian wzorcowych i wytypowano je do dalszych badań wielośrodowiskowych. Łącznie wytypowano 9 linii 6-rzędowych i 7 2-rzędowych.

Do badań prowadzonych w warunkach kontrolowanych, mających na celu reselekcję pokolenia F_6BC_2 pod kątem obecności genu włączono 1000 roślin F_6BC_2 . W stadium pierwszego liści rośliny zostały zakażone izolatem Bgh 27 i po 8 dniach ocenione w pod

względem reakcji na infekcję w skali: 0(4)–4, gdzie 0(4) oznacza odporność typu Mlo i 4 — podatność. Próbki drugiego liścia zostały wykorzystane do analiz molekularnych, które prowadzono z wykorzystaniem dwóch markerów HVMlo1 oraz HVMlo3. Marker HVMlo1 okazał się mniej efektywny ponieważ często nie wykazywał polimorfizmu. Jednak analizy prowadzone z wykorzystaniem tego markera pozwoliły również wskazać genotypy z genem *mlo*, które na podstawie analiz prowadzonych z wykorzystaniem markera HVMlo3 włączono do grupy roślin o niezidentyfikowanym profilu lub do grupy roślin o profilu heterogenicznym. Testy fitopatologiczne również potwierdzały jego obecność.

Liczba obiektów wytypowanych do dalszych badań na podstawie wyników testu fitopatologicznego i analiz molekularnych to: formy sześciorzędowe (Souleyka × BKH 735) × Souleyka — 194 linii; Titus × BKH 735) × Titus — 185 linii, formy dwurzędowe (Linia 42 × SU Vireni) × SU Vireni — 207 linii, (Linia 42 × Metaxa) × Metaxa — 250 linii. Zostaną ocenione pod względem odporności na choroby w warunkach polowych, a 200 rozmnożone w kolejnym roku badań. Prowadzenie równoczesnej selekcji metodami molekularnymi i na podstawie testów fitopatologicznych w obrębie populacji mieszańcowych zwiększa skuteczność trafnego wyboru roślin homozygotycznych o odporności typu Mlo (Czembor i in., 2016). Linie, które zostały wytypowane do dalszych badań na podstawie ocen odporności na ważne gospodarczo choroby oraz plonowania nasiennego ocenione na poziomie odmian wzorcowych lub być włączone również do programów hodowlanych.

LITERATURA

- 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.
- Czembor J. H., Pietrusińska A., Czembor H. 2016. Odporność na mączniaka prawdziwego zbóż i traw (*Blumeria graminis* f.sp. *hordei*) odmian jęczmienia włączonych do badań rejestrowych w Polsce w roku 2013. *Biul. IHAR* 280: 3 — 12.

DAMIAN GRUSZKA

Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Genetyki

Kierownik Tematu: dr hab. Damian Gruszka Uniwersytet Śląski, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Genetyki, 40-032 Katowice ul. Jagiellońska 28, tel. (032) 2009482, e-mail: damian.gruszka@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 24.

Badania nad wpływem brasinosteroidów na tolerancję roślin jęczmienia na stres niedoboru wody

Research on influence of brassinosteroids on tolerance of barley plants to drought stress

Słowa kluczowe: brasinosteroidy, jęczmień, susza

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

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:

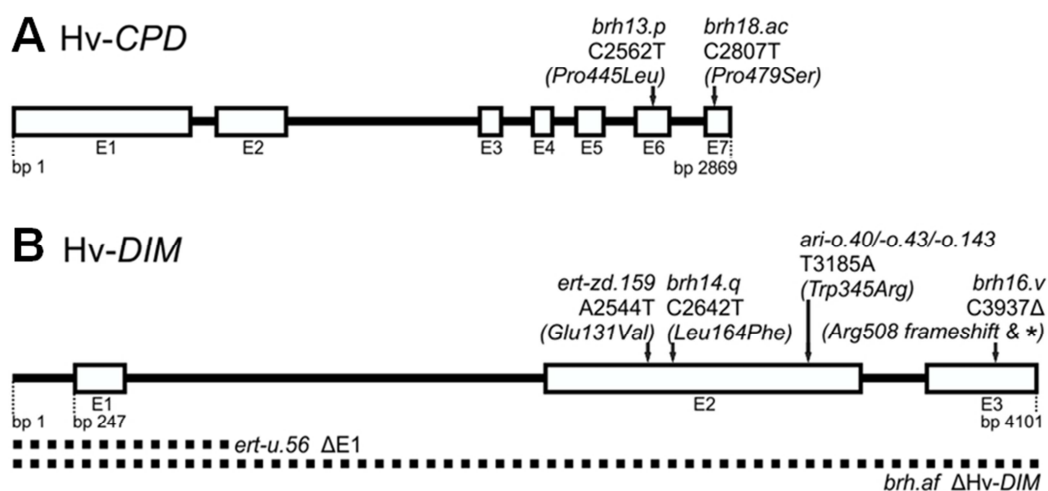
- identyfikację i analizę funkcjonalną genów *HvCPD* oraz *HvDIM1* jęczmienia związanych z biosyntezą BR oraz charakterystykę mutantów cechujących się zaburzeniami w tym procesie,
- określenie reakcji półkarłowych mutantów brasinosteroidowych jęczmienia na stres niedoboru wody w różnych fazach rozwoju 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.

OPIS WYNIKÓW

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*). Strukturę genu *HvCPD* oraz zidentyfikowane mutacje przedstawiono na rys. 1A. 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*). Strukturę genu *HvDIM1* oraz zidentyfikowane mutacje przedstawiono na rys. 1B. 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).



Rys. 1. Struktura zidentyfikowanych genów *HvCPD* oraz *HvDIM1* wraz z pozycjami mutacji oraz ich wpływem na sekwencje kodowanych polipeptydów (w nawiasach) (Dockter i in., 2014)

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 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 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, GA₇, 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 GA₇ u wszystkich analizowanych genotypów. W rezultacie w warunkach stresu suszy koncentracje endogennej GA₇ były porównywalne u wszystkich analizowanych genotypów. Te wyniki wskazują, że u jęczmienia GA₇ jest główną aktywną biologicznie formą giberelin, której akumulacja jest znacząco indukowana przez stres suszy (Gruszka i in., 2016). W warunkach kontrolnych akumulacja kwasu abscysynowego (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 podlewania, 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 PROWADZONYCH BADAŃ

1. 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.
2. Zaburzenia metabolizmu BR u badanych mutantów nie wpływają na sprawność fotosystemu II oraz zawartość barwników fotosyntetycznych.
3. Półkarłowe mutanty BR jęczmienia wykazują zwiększoną tolerancję na stres niedoboru wody.
4. Stężenie BR (kastasteronu) wzrasta w reakcji na stres niedoboru wody.
5. BR regulują homeostazę innych fitohormonów (gibereliny GA₇ i kwasu jasmonowego) u jęczmienia w warunkach optymalnego nawodnienia.
6. BR regulują homeostazę kluczowych nieenzymatycznych antyoksydantów zarówno w warunkach optymalnego nawodnienia, jak i podczas stresu niedoboru wody.
7. 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.

LITERATURA

- 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., Matyszcak I., Müller A.H., Oklestkova J., Schulz B., Zakhrabekova S., Hansson M. 2014. Induced variations in brassinosteroid genes define barley height and sturdiness, and expand the green revolution genetic toolkit. *Plant Physiol.* 166: 1912 — 1927.
- Gruszka D., Janeczko A., Dziurka M., Pociecha E., Oklestkova J., Szarejko I. 2016. Barley brassinosteroid mutants provide an insight into phytohormonal homeostasis in plant reaction to drought stress. *Front. Plant Sci.* 7: 1824.
- Gruszka D., Janeczko A., Dziurka M., Pociecha E., Fodor J. 2018. Non-enzymatic antioxidant accumulations in BR-deficient and BR-insensitive barley mutants under control and drought conditions. *Physiol. Plant.* 163: 155 — 169.

RENATA ORŁOWSKA**PIOTR TOMASZ BEDNAREK****SŁAWOMIR BANY**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: dr inż. Renata Orłowska Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, tel. 22 7334538,

e-mail: r.orłowska@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 89.

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

Słowa kluczowe: jęczmień, kultury tkankowe, MSTD, retrotranspozony

W roku sprawozdawczym 2018 zaplanowano do wykonania cztery tematy badawcze z następującymi celami:

- uzyskanie genomowego DNA z regenerantów jęczmienia do analiz technikami RP-HPLC, MSTD,
- oszacowanie poziomu globalnej metylacji DNA dla 80 regenerantów jęczmienia przy użyciu techniki RP-HPLC (*Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*),
- wykonanie analiz MSTD na DNA regenerantów jęczmienia — uzyskanie autoradiogramów,
- uzyskanie roślin będących genetycznym potomstwem regenerantów jęczmienia.

Analizy molekularne obejmowały ekstrakcję genomowego DNA z regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8) uzyskanych na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych. Wyziolowany genomowy DNA rozdzielono w 1,4% żelach agarozowych

w celu sprawdzenia jego integralności. Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie. Uzyskano DNA w odpowiedniej ilości i jakości do dalszych analiz.

Określono poziom globalnej metylacji DNA u regenerantów jęczmienia (80 roślin) uzyskanych w kulturach pylnikowych z 4 roślin donorowych (D). Analiza całkowitej metylacji cytydyny (5mdC) genomowego DNA wykonana metodą RP-HPLC wykazała, że średnio 21,31% ($\pm 0,41$) cytydyny uległo metylacji. Dla poszczególnych zestawów regenerantów wyprowadzonych z 4 różnych roślin donorowych uzyskano odpowiednio: JRP72-21,50%, JRP68-21,30%, JRP69-21,22% i JRP70-20,15%. Wykazano istotne różnice ($F = 133,274$, $p = 0,0001$) między poszczególnymi zestawami regenerantów a roślinami donorowymi uzyskanymi w ubiegłym roku sprawozdawczym (Sprawozdanie PBwPR 89_2016).

Wykonano rozdziały metAFLP dla 80 regenerantów jęczmienia, oraz dla odpowiadających im roślin donorowych (4 rośliny). Rozdziały wykonano w dwóch układach enzymów restrykcyjnych — *Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*. Podjęte prace pozwoliły uzyskać czytelne elektroforegramy. Uzyskane obrazy w zależności od zastosowanych starterów w reakcji PCR różniły się wizualnie liczebnością fragmentów DNA. Zliczanie prążków DNA i tworzenie matryc zerojedynkowych będzie realizowane w przyszłym roku badawczym.

Regeneranty jęczmienia, pozyskane na drodze androgenezy były źródłem ziarniaków do uzyskania generatywnego potomstwa. W temacie zaplanowano uzyskanie około 90 roślin potomnych z regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy. Aby otrzymać zaplanowane ilości roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów wysiano ok. 10% więcej nasion, niż oczekiwane liczebności roślin potomnych. Uzyskano w sumie 90 roślin z czterech różnych regenerantów.

PODSUMOWANIE

1. Ekstrakcja DNA skutkowała odpowiednimi preparatami DNA do dalszych analiz.
2. Wykonana w temacie badawczym analiza RP-HPLC określiła poziom globalnej metylacji DNA dla 80 regenerantów jęczmienia. Obserwowano zróżnicowanie w poziomie globalnej metylacji DNA między zestawami regenerantów pochodzącymi z różnych regenerantów.
3. Uzyskano stabilne profile prążków DNA techniką MSTD do dalszych prac.
4. Uzyskano reprezentatywną liczbę roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów pozyskanych w poprzednim roku badań.

IWONA ŻUR**EWA DUBAS****SABINA MALAGA****FRANCISZEK JANOWIAK****ANNA JANECZKO****MARCIN RAPACZ****TOMASZ HURA****PIOTR WALIGÓRSKI****AGNIESZKA OSTROWSKA****MAGDALENA WÓJCIK-JAGŁA**

Instytut Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

Kierownik Tematu: dr hab. Iwona Żur Instytut Fizjologii Roślin Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

ul. Niezapominajek 21, 30-239 Kraków, tel. +48 12 4253301, e-mail: i.zur@ifr-pan.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.802.15.2018, Zadanie 26.

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.)

Słowa kluczowe: abiotyczne czynniki stresowe, hartowanie, jęczmień ozimy, mrozoodporność, susza, tolerancja

Jęczmień ozimy jest gatunkiem zboża o wysokim potencjale plonotwórczym i ziarnie o dużej wartości paszowej i użytkowej. Potencjalnie wysoka wydajność tego zboża jest jednak znacząco obniżana przez niską zimotrwałość tego gatunku, wynikającą przede wszystkim z jego niskiej odporności na mróz. Ogranicza to areal uprawy jęczmienia ozimego do rejonów o łagodniejszym klimacie. Innym czynnikiem wpływającym na obniżenie plonowania jest susza glebowa, zwłaszcza w okresie największego zapotrzebowania na wodę, od kwietnia do czerwca. Susza w tym okresie powoduje u jęczmienia znaczne obniżenie liczby kłosów oraz liczby ziaren w kłosie i co za tym

idzie znaczący spadek plonowania. Z tych względów, identyfikacja czynników determinujących tolerancję na suszę i mróz oraz opracowanie wiarygodnych procedur selekcji roślin o zwiększonej tolerancji na te czynniki stresowe jest bardzo istotne i może w znaczący sposób ograniczyć straty plonowania oraz zwiększyć areał uprawy jęczmienia ozimego. 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 piramidyacji korzystnych genów wydaje się być najbardziej odpowiednia. Jednak korzystny układ wielu alleli leżących u podłoża odporności ilościowej może zostać zaburzony wskutek rekombinacji w kolejnych pokoleniach. Jedną z możliwości ominięcia tego problemu jest wykorzystanie technologii podwojonych haploidów (ang. doubled haploids, DH), umożliwiającej wyprowadzenie całkowicie homozygotycznych linii z heterozygotycznego materiału w ciągu jednego pokolenia. Inną korzyścią wynikającą z zastosowania technologii DH jest możliwość znacznego poszerzenia zakresu zmienności badanych cech, wynikająca z ekspresji alleli recesywnych oraz nowych plejotropowych i epistatycznych interakcji międzygenowych.

Celem projektu była identyfikacja fizjologicznych, metabolomicznych i molekularnych podstaw adaptacji jęczmienia ozimego do temperatur mrozowych oraz suszy glebowej. Poszerzenie wiedzy dotyczącej mechanizmów determinujących odporność na suszę i mróz może mieć istotne znaczenie dla uprawy tego gatunku w obliczu dynamicznych zmian klimatycznych, postępującej degradacji środowiska naturalnego oraz wymogów nowoczesnych, zrównoważonych i ekologicznych systemów produkcji rolniczej.

W badaniach wykorzystano linie DH jęczmienia ozimego, o istotnie różnej tolerancji na mróz i suszę glebową, wyprowadzone metodą androgenyzy w kulturach pylnikowych, z materiałów hodowlanych dostarczonych przez polskie spółki hodowlane. Wybrane do badań, skrajnie zróżnicowane linie DH posłużyły we wcześniejszych latach realizacji projektu jako materiał do analiz proteomicznych, analiz zawartości hormonów roślinnych biorących udział w reakcjach obronnych uruchamianych w odpowiedzi na stres oraz analiz aktywności systemu antyoksydacyjnego. W roku 2018 badania zostały uzupełnione o analizy profilu brasinosteroidów oraz ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w proces nabywania tolerancji na mróz oraz determinujących poziom tolerancji na suszę.

Analizy przeprowadzono w dwóch układach eksperymentalnych. W pierwszym, ze względu na fakt, iż tolerancja na mróz jest cechą indukowaną pod wpływem aklimatyzacji/hartowania do niskich temperatur, materiał do badań stanowiły siewki w fazie 3–4 liści, umieszczone na okres 3 tyg. w 4/2°C (dzień/noc). Obiekty kontrolne stanowiły siewki rosnące w optymalnych warunkach termicznych (25/17°C, dzień/noc). W drugim eksperymencie, analizy przeprowadzono na roślinach w fazie kłoszenia, po 3 tygodniu wzrostu w glebie o wilgotności wynoszącej 35% ppw. Jako obiekty kontrolne wykorzystano rośliny rosnące w warunkach optymalnego nawodnienia (75% ppw).

TEMAT BADAWCZY 1: ANALIZA ENDOGENNEJ ZAWARTOŚCI BRASINOSTEROIDÓW (BR) — ZMIANY INDUKOWANE POD WPLYWEM HARTOWANIA I SUSZY GLEBOWEJ

Analizy BR przeprowadzono wg zmodyfikowanej procedury Tarkowskiej i in. (2016) metodą ultra wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (UHPLC-MS/MS).

Bez względu na warunki wzrostu, w siewkach wszystkich badanych linii DH jęczmienia ozimego 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 jęczmienia ozimego w fazie kłoszenia średni poziom BR₁₂ był prawie 5.-krotnie wyższy w stosunku do poziomu zmierzonego w roślinach w fazie siewki. Oprócz BR₁₂ wykryto również obecność kastasteronu (BR₂), teasteronu (BR₈) i po raz pierwszy u roślin zbożowych — dolicholidu (BR₃), jednakże poziom akumulacji tych BR był znacząco niższy. Poziom wszystkich zidentyfikowanych BR był warunkowany czynnikami o charakterze genotypowo-specyficznym. W większości przypadków deficyt wody wywarł istotny wpływ na poziom akumulacji BR, a reakcja roślin była zróżnicowana u linii DH o różnym poziomie tolerancji na suszę. W warunkach ograniczonej dostępności wody w podłożu, u większość wrażliwych na suszę linii DH obserwowano 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 DH bardziej wrażliwych na ten czynnik stresowy.

Podsumowując uzyskane wyniki, w badanych liniach DH jęczmienia ozimego wykazano specyficzny, związany z fazą rozwojową profil BR, a poziom akumulacji tych związków związany był z poziomem tolerancji na badane, abiotyczne czynniki stresowe. Wykazano, iż zmiany zawartości niektórych BR wydają się być istotnie związane z poziomem odporności na mróz (homokastasteron) i suszę (kastasteron). Natomiast akumulacja innych BR (homokastasteronu, teasteronu i dolicholidu) w reakcji na deficyt wody może stanowić potencjalny marker identyfikujący genotypy o wysokim poziomie wrażliwości na suszę.

TEMAT BADAWCZY 2: ANALIZY MOLEKULARNE GENÓW POTENCJALNIE ZAANGAŻOWANYCH W DETERMINACJĘ ODPORNOŚCI NA MRÓZ I SUSZĘ

Selekcję wybranych do badań genów przeprowadzono na podstawie wyników analiz proteomicznych wykonanych w poprzednich latach realizacji projektu, opublikowanych w pracach Gołębiowska i in. (2017a, b). W eksperymencie analizującym wpływ hartowania na ekspresję wybranych genów do analiz wybrano geny kodujące: elongation factor 1 alpha (EF1a), reduktazę Ferrodoksyna — NADP, białko 14-3-3a, β-fructofuranozydazę oraz białka CBF4B i CBF2A. W eksperymencie dotyczącym molekularnych podstaw odporności jęczmienia ozimego na stres suszy analizowano poziom

ekspresji genów kodujących aktywę, transketolazę, peryplazmatyczną proteazę serynową, izomerazę triozofosforanową, gen *groES* kodujący białko z regionem ko-chaperonu oraz gen *pfam14200* kodujący lektynę (białko ricin-type beta-trefoil lectin domain-like).

Analiza ekspresji wybranych genów przeprowadzona techniką ilościowego RT-qPCR wykazała zróżnicowany poziom ekspresji pomiędzy liniami DH jęczmienia ozimego 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 wrażliwej na mróz linii DH575 oraz mrozoodpornej (a równocześnie nieodpornej na suszę) linii DH602. W przypadku wszystkich genów poziom ich ekspresji był statystycznie istotny, a w przypadku trzech odwrotny był kierunek obserwowanych zmian — u linii DH602 obserwowano hamowanie, a u linii DH575 wzrost poziomu ich ekspresji w porównaniu z kontrolą. Reakcja pozostałych linii DH była jednakowa, pośrednia pomiędzy DH602 i DH575. Być może obserwowane wcześniej różnice w ich mrozoodporności wynikać mogą z innych czynników, niezależnych od zmian obserwowanych w zastosowanym układzie doświadczalnym. W przypadku linii DH534, która jest zarówno mrozoodporna jak i odporna na suszę mogłoby to na przykład wynikać z istotnej w obydwu stresach możliwości zabezpieczania tkanek przed dehydratacją, która indukowana jest nie podczas hartowania na mróz w temperaturach dodatnich lecz dopiero pod wpływem mrozu.

W przypadku suszy poziom ekspresji wszystkich badanych genów obniżył się. Co więcej, u linii DH lepiej tolerujących deficyt wody poziom ekspresji większości analizowanych genów (z wyjątkiem *groES*) 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 (proteaza serynowa, izomeraza triozofosforanów) oraz potencjalnie związane z transdukcją sygnału (gen *pfam14200* kodujący lektynę).

LITERATURA

- Gołębiowska-Pikania G., Kopeć P., Surówka E., Krzewska M., Dubas E., Nowicka A., Rapacz M., Wójcik-Jaęła M., Malaga S., Żur I. 2017 a. 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 b. Changes in protein abundance and activity induced by drought during generative development of winter barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Proteomics* 169: 73 — 86.
- Tarkowska D., Novak O., Oklestkova J., Strnad M. 2016. The determination of 22 natural brassinosteroids in a minute sample of plant tissue by UHPLC-ESI-MS/MS. *Anal. Bioanal. Chem.* 408: 6799 — 6812.

ANETTA KUCZYŃSKA

MARIA SURMA

TADEUSZ ADAMSKI

PAWEŁ KRAJEWSKI

KRZYSZTOF MIKOŁAJCZAK

PIOTR OGRODOWICZ

MICHAŁ KEMPA

HANNA ĆWIEK-KUPCZYŃSKA

RENATA TRZECIAK

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

Kierownik Tematu: dr hab. Anetta Kuczyńska Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34
60-479 Poznań, tel. 61 6550232, e-mail: akuc@igr.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.802.18.2018, Zadanie 106.

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

Słowa kluczowe: fenotypowanie, genotypowanie, obrazowanie korzeni, plonowanie, stres abiotyczny, susza, właściwości elektryczne systemu korzeniowego

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

Rośliny uprawne narażone są na wiele czynników stresowych, biotycznych i abiotycznych, wśród których niedobór wody jest jedną z głównych przyczyn obniżających produktywność (Anjum i in., 2011; Rahdari i Hoseini, 2012). Susza jest zjawiskiem ekstremalnym, jednak dość powszechnym i często pojawiającym się niemal na wszystkich kontynentach. W ostatnim stuleciu obserwuje się coraz większe przesuszenie środowiska przyrodniczego w Polsce. Średnie roczne opady atmosferyczne dla Polski wynoszą ok. 600 mm. Regionem najbardziej narażonym na występowanie suszy w Polsce jest Wielkopolska i Kujawy (średnie opady 450–550 mm), czyli tereny o intensywnej produkcji rolnej (GUS, 2012). Niedobór opadów w latach 1992, 2000, 2006, gdy dodatkowo wystąpiły wysokie temperatury, spowodował znaczne obniżenie

plonów. W 2008 roku aż 70% upraw objęte było zagrożeniem suszą, a w konsekwencji istotną stratą plonów (dane IUNG; <http://ies.jrc.ec.europa.eu>). Gospodarka wodna zależy nie tylko od ilości opadów, lecz również od temperatury. Podwyższenie temperatury oraz stałe ocieplenie klimatu (Szwed i in., 2010) wpływa na intensyfikację parowania obniżając zawartość wody w glebie i zwiększając prawdopodobieństwo pojawienia się suszy.

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. Dobrze rozwinięty i aktywnie pobierający składniki pokarmowe system korzeniowy powoduje lepsze odżywienie mineralne rośliny i zaopatrzenie jej w wodę, bardziej efektywne wykorzystanie nawozów, a szybszy rozwój systemu korzeniowego ogranicza straty plonu w warunkach stresu wodnego. W późniejszym okresie wegetacji rozwój systemu korzeniowego jest m.in. efektem kierowania związków węglowych do korzeni z zielonych części roślin (Manschadi i in., 2006). Zatem rośliny o lepiej rozwiniętej biomasy części zielonych mogą wykazywać większy potencjał rozwoju systemu korzeniowego. Stąd kluczowa jest analiza stosunku biomasy części nadziemnej do części podziemnej rośliny (ang. shoot/root ratio). Wskaźnik ten zależy od wielu czynników, w tym stresów abiotycznych, np. susza. Zdolność roślin do ograniczenia strat wody na drodze transpiracji jest powiązana ze stosunkiem biomasy części zielonej do biomasy systemu korzeniowego rośliny (Brouwer i de Wit, 1968; Troughton, 1978).

Celem badań jest zbadanie wpływu niedoboru wody na rozwój i architekturę systemu korzeniowego u jęczmienia. W tym celu wykorzystanych zostanie 150 różnych form jęczmienia jarego, to jest odmian, rodów lub linii o zróżnicowanym pochodzeniu, wybranych w porozumieniu z firmami hodowlanymi (Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o.).

Dla zrealizowania założonego celu wykonano:

- zastosowanie najnowszych technik obrazowania korzeni w warunkach kontrolnych oraz w warunkach deficytu wody na platformie do fenotypowania roślin wyposażonej w najnowsze urządzenia służące do ciągłego, nieinwazyjnego mierzenia parametrów korzeni;
- genotypowanie w oparciu o najnowsze metody sekwencjonowania nowej generacji — genotypowanie przez sekwencjonowanie (GBS);
- przeprowadzenie doświadczenia w warunkach polowych w celu określenia potencjału plonowania, zbadania rozwoju i architektury systemu korzeniowego badanych genotypów, a także ustalenia stosunku części nadziemnej do części podziemnej rośliny.

OPIS WYNIKÓW Z DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ (PIERWSZY ROK TRWANIA PROJEKTU)

Na podstawie danych literaturowych i własnych doświadczeń można założyć, że dane fenotypowe i genotypowe uzyskane z zastosowaniem najnowszych metod analizy fenomu i genomu pozwolą na określenie zmienności badanych genotypów pod względem rozwoju systemu korzeniowego w czasie trwania suszy oraz związku (korelacji) między parametrami systemu korzeniowego a cechami plonotwórczymi. Umożliwi to zidentyfikowanie regionów w genomie jęczmienia związanych z rozwojem systemu korzeniowego w warunkach optymalnego nawodnienia, jak i w stresie niedoboru wody, a także regionów warunkujących cechy plonotwórcze.

W badaniach przeprowadzona seria komplementarnych i skoordynowanych doświadczeń związanych z obrazowaniem korzeni pozwoli z jednej strony na opracowanie markerów związanych z systemem korzeniowym, z drugiej zaś na wytypowanie genotypów o korzeniach głębiej penetrujących podłoże i o większej zdolności pobierania wody z głębszych warstw gleby, stąd potencjalnie lepiej plonujących w suszy.

Pilotaż w pierwszym roku trwania projektu miał na celu ustalenie dokładnych warunków prowadzenia doświadczenia głównego zaplanowanego na rok 2019. Doświadczenie pilotażowe zostało przeprowadzone na poletkach doświadczalnych znajdujących się przy Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Do doświadczenia pilotażowego wybrano losowo 50 odmian jęczmienia jarego. 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 z wykorzystaniem pomiaru pojemności elektrycznej (ang. electrical capacitance) 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 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. Zebrane dane posłużyły do obliczeń statystycznych, w ramach których przeprowadzono ocenę współczynnika korelacji między badanymi cechami. Wartości średnie dla cech związanych z systemem korzeniowym dla badanych 50 genotypów jęczmienia jarego w doświadczeniu pilotażowym wahały się w przedziałach: biomasa 0,13–1,02 g, długość korzeni 10,00–20,67 cm, pojemność elektryczna w fazie krzewienia 3,13–11,67, pojemność elektryczna w fazie strzelania w źdźbło 9,57–18,73, pojemność elektryczna w fazie kłoszenia 32,67–149,00 oraz pojemność elektryczna w fazie nalewania ziarna 75,00–205,00. Z kolei wartości średnie dla cech związanych z częścią nadziemną dla badanych 50 genotypów jęczmienia w doświadczeniu pilotażowym wahały się w prze-

działach: wysokość roślin 44,00–62,33 cm, długość kłosa 6,03–10,20, liczba ziaren z kłosa 14,17–23,37, masa ziarna z kłosa 0,64–1,19 g, masa ziarna z rośliny 3,11–7,76 g oraz masa 1000 ziaren 41,86–56,75 g.

Na podstawie współczynników korelacji w doświadczeniu pilotażowym między cechami związanymi z systemem korzeniowym a wyselekcjonowanymi cechami związanymi z częścią nadziemną roślin stwierdzono, że większość cech była ze sobą pozytywnie skorelowana na poziomie istotności $P < 0,01$. Nie wykazano korelacji pomiędzy długością korzeni a pomiarem pojemności elektrycznej w fazie T1, T3 oraz T4.

WNIOSKI Z DOTYCHCZASOWYCH BADAŃ (PIERWSZY ROK TRWANIA PROJEKTU)

Ze względu na trudności metodologiczne związane z monitorowaniem wzrostu korzeni w glebie, istnieje ciągłe zainteresowanie wykorzystaniem i rozwojem prostych, szybkich metod *in situ* dostarczających informacji na temat rozwoju systemu korzeniowego bez uszkodzenia całej rośliny (Milchunas, 2012). Jedną z takich nieinwazyjnych technik opiera się na właściwościach elektrycznych systemu korzeniowego. Metoda elektryczności pierwotnej (C_R , ang. root electrical capacitance) została po raz pierwszy zastosowana przez Chloupek (1972), który wykorzystał w swoich badaniach miernik pojemności z niskim napięciem (1V) prądu przemiennego (1000 Hz prądu przemiennego). Chloupek stwierdził, że C_R mierzony między elektrodą uziemiającą (włożoną do gleby) a elektrodą roślinną (przymocowaną do rośliny) wykazuje dodatnią korelację z suchą masą korzenia (RDM, ang. root dry mass), długością korzenia (RL, ang. root length) i powierzchnią korzenia (RSA, ang. root surface area). Podobnie w doświadczeniu pilotażowym, prowadzonym w ramach prezentowanego projektu, 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.

Kormanek i in. (2016) stwierdzili, że powierzchnia i kształt elektrody gruntowej silnie wpłynęły na korelację między C_R a parametrami systemu korzeniowego. Niemniej jednak, przy przestrzeganiu stałej wysokości elektrody roślinnej nad powierzchnią podłoża, metoda adekwatnie szacuje rozmiar systemu korzeniowego (Postic i Doussan 2016). Dlatego istotne okazało się w doświadczeniu pilotażowym ustalenie stałej wysokości lokalizowania elektrody zarówno na roślinie, jak i jednakowego oraz o równej głębokości umieszczania drugiej elektrody w glebie. Ogromną zaletą metody pojemnościowej jest to, że skoro prąd elektryczny przepływa wyłącznie przez korzeń, C_R ma potencjał do oceny funkcjonalnego zasięgu korzenia (Cermák i in., 2006; Cseresnyés i in., 2016). W przeciwieństwie do innych, powszechnie stosowanych technik, metoda pojemnościowa mierzy aktywność korzenia, w tym również włósniki.

W warunkach polowych czasowe zmiany zawartości wody w glebie (SWC, ang. soil water content) uniemożliwiają w większości przypadków ciągłe monitorowanie rozwoju systemu korzeniowego. Z tego powodu rośliny uprawiane na polach mogą być porównywane tylko na podstawie C_R uzyskanego w określonym przedziale czasowym

z porównywalnym SWC. Przestrzegając tego metoda C_R została z powodzeniem zastosowana w doświadczeniach prowadzonych w warunkach polowych w celu zbadania cech korzeni jęczmienia i pszenicy (Nakhforoosh i in., 2014; Svacina i in., 2014, Hermanská i in., 2015) oraz scharakteryzowania różnic odmianowych w ich odporności na stres suszy, czy efektywności wykorzystania wody (Chloupek i in., 2010, Streda i in., 2012).

LITERATURA

- Anjum S., Xie X., Wang L., Saleem M., Man C., Lei W. 2011. Morphological, physiological and biochemical responses of plants to drought stress. *J. African Agri. Res.* 6 (9): 2026 — 2032.
- Brouwer R., De Wit C. T. 1968. A simulation model of plant growth with special attention to root growth and its consequences. In: *Root Growth. Proceedings of Fifteenth Easter School in Agricultural Science*, University of Nottingham, ed. Whittington W. J. London UK: Butterworths: 224 — 242.
- Cermák J., Ulrich R., Stanek Z., Koller J., Aubrecht L. 2006. Electrical measurement of tree root absorbing surfaces by the earth impedance method: 2. Verification based on allometric relationships and root severing experiments. *Tree Physiol.* 26: 1113 — 1121.
- Chloupek O. 1972. The relationship between electric capacitance and some other parameters of plant roots. *Biol. Plantarum* 14: 227 — 230.
- Chloupek O., Dostál V., Streda T., Psota V., Dvoráková O. 2010. Drought tolerance of barley varieties in relation to their root system size. *Plant Breed.* 129: 630 — 636.
- Cseresnyés I., Rajkai K., Takács T. 2016. Indirect monitoring of root activity in soybean cultivars under contrasting moisture regimes by measuring electrical capacitance. *Acta Physiol. Plant.* 38: 121.
- Hermanská A., Streda T., Chloupek O. 2015. Improved wheat grain yield by a new method of root selection. *Agron. Sustain. Dev.* 35: 195 — 202.
- Kormanek M., Głab T., Klimek-Kopyra A. 2016. Modification of the tree root electrical capacitance method under laboratory conditions. *Tree Physiol.* 36: 121 — 127.
- Manschadi A. M., Christopher J., DeVoil P., Hammer G. L. 2006. The role of root architectural traits in adaptation of wheat to water-limited environments. *Funct. Plant Biol.* 33: 823 — 837.
- Milchunas D. G. 2012. Biases and errors associated with different root production methods and their effects on field estimates of belowground net primary production. In: *Measuring Roots*, ed. S. Mancuso (Berlin: Springer Verlag): 303 — 339.
- Nakhforoosh A., Grausgruber H., Kaul H.-P., Bodner G. 2014. Wheat root diversity and root functional characterization. *Plant Soil* 380: 211 — 229.
- Postic F., Doussan C. 2016. Benchmarking electrical methods for rapid estimation of root biomass. *Plant Methods* 12:33.
- Rahdari P., Hoseini S. M. 2012. Drought Stress: A Review. *Intl. J. Agron. Plant Prod.* 3 (10): 443 — 446.
- Streda T., Dostál V., Horáková V., Chloupek O. 2012. Effective use of water by wheat varieties with different root system size in rain-fed experiments in Central Europe. *Agr. Water Manage.* 104: 203 — 209.
- Svacina P., Streda T., Chloupek O. 2014. Uncommon selection by root system size increases barley yield. *Agron. Sustain. Dev.* 34: 545 — 551.
- Szwed M., Karg G., Pińskwar I., Radziejewski M., Graczyk D., Kędziora A., Kundzewicz Z. W. 2010. Climate change and its effect on agriculture, water resources and human health sectors in Poland. *Nat. Hazards Earth Syst. Sci.* 10:1725 — 1737.
- Troughton A. 1978. The influence of reproductive development upon the root system of perennial ryegrass and some effects upon herbage production. *J. Agric. Sci., Camb.* 91:427 — 431.

IWONA SZAREJKO
MONIKA GAJECKA
MIROSLAW KWAŚNIEWSKI
MAREK MARZEC
BEATA CHMIELEWSKA
JANUSZ JELONEK
JUSTYNA ZBIESZCZYK

Katedra Genetyki, Uniwersytet Śląski w Katowicach

Kierownik Tematu: Prof. dr hab. Iwona Szarejko Uniwersytet Śląski w Katowicach, Wydział Biologii i Ochrony Środowiska, Katedra Genetyki ul. Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, tel. (32) 2009570, fax. (32) 2009396, e-mail: iwona.szarejko@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 25.

Molekularne podstawy zjawiska albinizmu w kulturach izolowanych mikrospor jęczmienia

Molecular basis of albinism in barley isolated microspore culture

Słowa kluczowe: albinizm, amyloplasty, androgeneza, kultura izolowanych mikrospor, plastyd

Brak chlorofilu (albinizm), występujący u znacznej części regenerantów z kultur pylnikowych lub kultur izolowanych mikrospor zbóż, jest podstawowym problemem zmniejszającym efektywność uzyskiwania podwojonych haploidów w procesie androgenезy, Szczególnie u jęczmienia, wysoka częstotliwość regeneracji roślin albinotycznych, dochodząca u wielu genotypów do 90% regenerantów, znacząco obniża praktyczne wykorzystanie procesu androgenезy w programach hodowlanych tego gatunku. Rośliny albinotyczne zawierają нефункционалне chloroplasty, co powoduje, że ich wzrost poza kulturą *in vitro* nie jest możliwy.

Mikrospory i niedojrzałe ziarna pyłku zawierają proplastydy, które w procesie mikrosporoģenезy *in vivo* rozwijają się zazwyczaj w amyloplasty, magazynujące skrobię i stanowiące źródło węglowodanów (Clement i Pacini, 2001). Natomiast w procesie androgenезy *in vitro*, niezróznicowane proplastydy mogą przekształcić się zarówno w amyloplasty, jak i w chloroplasty. Plastydy posiadają genom, który występuje

w postaci wielu kopii kolistego DNA. Genom chloroplastowy jęczmienia jest kolistą, dwuniciową cząsteczką DNA o długości 136.462 pz. Zawiera on sekwencje ok. 140 genów, w tym geny dla polimerazy RNA, tRNA, rRNA, podjednostki rybosomów i białek będących podjednostkami enzymów uczestniczących w fotosyntezie (Pyke, 2007). Zarówno rozwój plastydów, jak i inicjacja różnicowania plastydów w chloroplasty pod wpływem światła pozostają pod kontrolą jądra komórkowego, w którym kodowane są czynniki transkrypcyjne oraz większość białek wymaganych dla funkcjonowania plastydów (Pyke, 2007; Sakamoto i in., 2008). Badania ultrastrukturalne wykazały, iż rośliny albinotyczne zregenerowane z mikrospor zawierają amyloplasty lub plastydy zatrzymane w rozwoju, lecz nie zidentyfikowano przyczyn obserwowanych defektów (Caredda i in., 2004). Wykazano, iż rośliny albinotyczne uzyskane w procesie androgenezy posiadają delecje lub reorganizacje w genomie chloroplastowym (Day i Ellis, 1985), jednakże zidentyfikowano także rośliny albinotyczne posiadające niezmienny genom chloroplastowy. Rośliny te wykazywały jednak zmiany w poziomie transkrypcji lub zaburzenia w procesie translacji genów chloroplastowych (Ankele i in., 2005). Nie stwierdzono dotąd jednoznacznej przyczyny albinizmu u roślin zregenerowanych w procesie androgenezy, jak również nie określono przyczyn regeneracji roślin albinotycznych zależnej od genotypu.

Głównym tematem badawczym realizowanym w roku 2018 w ramach zadania nr 25 było sekwencjonowanie genomów plastydowych izolowanych w różnych dniach kultury *in vitro* izolowanych mikrospor i androgenicznych regenerantów jęczmienia. Celem tematu było określenie sekwencji i integralności genomów plastydowych dla sprawdzenia czy przyczyną albinizmu roślin uzyskiwanych z androgenicznych zarodków mogą być mutacje genowe i delecje/rearanzacje ich genomów plastydowych i, jeśli zmiany takie mają miejsce, w jakim etapie kultury *in vitro* zachodzą. Dla ustalenia sekwencji i integralności genomów plastydowych wykorzystano sekwencjonowanie NGS oraz analizę bioinformatyczną uzyskanych wyników. Przygotowane w 2017 roku biblioteki NGS zostały zsekwencjonowane w sekwenatorze Illumina HiSeq 4000 w Centrum Analiz Genomowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku. Biblioteki te pochodziły z DNA wyizolowanego z mikrospor w stadium średnio-późnym (ML, tj. stadium wykorzystywane do inicjacji kultury izolowanych mikrospor) oraz z androgenicznych zarodków w 21. i 46. dniu kultury *in vitro*. Analizowano także plastydowe DNA zielonych i albinotycznych regenerantów oraz 10-dniowych siewek. Badania prowadzono w trzech powtórzeniach biologicznych dla dwóch odmian jęczmienia jarego 'Jersey' i 'Mercada', które w kulturze izolowanych mikrospor wykazały podobny poziom regeneracji roślin ogółem, lecz różniły się poziomem regeneracji roślin zielonych. Odmiana 'Jersey' produkuje ponad 90% zielonych regenerantów, podczas gdy ponad 90% regenerantów odmiany 'Mercada' to rośliny albinotyczne. Odmiany te wybrano na podstawie wcześniejszych doświadczeń wykonanych w roku 2014 w Katedrze Genetyki UŚ w ramach niniejszego zadania.

Przeprowadzone analizy wykazały brak różnic w sekwencji chloroplastowego DNA między siewkami odmian 'Morex' (genom referencyjny), 'Mercada' i 'Jersey'. Ponadto, wykazano że zielone regeneranty uzyskane w kulturach izolowanych mikrospor z odmian

'Mercada' i 'Jersey' posiadają genomy chloroplastowe identyczne jak siewki roślin wyjściowych. Co ciekawe jednak, stwierdzono znaczny poziom zmian w sekwencji genomu chloroplastowego mikrospor *in vivo* w czasie pobierania materiału do kultur (stadium ML) oraz zarodków w 21. dniu kultury. Zmiany te dotyczyły szeregu mutacji, precyzyjnie zlokalizowanych we fragmencie genomu chloroplastowego obejmującego region od nukleotydu 35093 do 41800. Zidentyfikowane mutacje prowadziły do zmiany sensu szeregu aminokwasów w genach *atpA*, *rps14*, *psaB*, *psaA*, oraz zmian nukleotydów w genach tRNA *trnM-CAU*, *trnR-UCU*, *trnS-GGA*, *trnL-UAA* i *trnF-GAA*. Mutacje występowały w genomach chloroplastowych mikrospor i 21-dniowych zarodków zarówno odmiany 'Mercada' jak i 'Jersey'.

Co szczególnie interesujące, zarodki pochodzące z 46. dnia kultury odmiany 'Mercada' charakteryzowały się podobnym profilem mutacyjnym jak mikrospory w stadium ML oraz zarodki w 21. dniu kultury tej odmiany, natomiast zarodki pochodzące z 46. dnia kultury odmiany 'Jersey' posiadały genom plastydowy identyczny jak chloroplasty roślin wyjściowych, czyli bez mutacji, lub wykazywały tylko kilka mutacji cichych. Wykazano więc, że zarodki analizowane w 46. dniu kultury izolowanych mikrospor znacznie różnią się pomiędzy odmianami 'Jersey' i 'Marcada'. Zarodki odmiany 'Mercada' posiadały genomy plastydowe z mutacjami zmiany sensu w kluczowych genach związanych z fotosyntezą oraz z translacją białek, natomiast zarodki odmiany 'Jersey' posiadały plastydy z genomami bez zmian mutacyjnych prowadzących do zmian w funkcji genów. Co istotne, albinotyczne regeneranty obu odmian (stanowiące tylko kilka procent regenerantów u odmiany 'Jersey' i ponad 90% regenerantów u odmiany 'Mercada') wykazały istnienie zmian mutacyjnych identycznych jak zmiany obserwowane w 46. dniu kultury u odmiany 'Mercada'. Na podstawie uzyskanych wyników można postawić hipotezę, że mechanizmy kontroli i reperacji DNA w plastydach mikrospor jęczmienia są zahamowane lub nie funkcjonują prawidłowo, co prowadzi do wystąpienia szeregu zmian mutacyjnych w ich genomach plastydowych. W rezultacie, genomy plastydowe mikrospor wykazują się dużą zmiennością mutacyjną, jednak wśród genomów zmutowanych identyfikuje się również genomy o prawidłowej, niezmienionej sekwencji. W toku prowadzenia kultury, w dniu 21. dniu, ta zmienność mutacyjna obserwowana jest w dalszym ciągu zarówno u odmiany 'Mercada' jak i 'Jersey'. W dalszym procesie prowadzenia kultury, u odmiany 'Jersey' następuje selekcja zarodków z prawidłowymi genomami plastydowymi i w konsekwencji dochodzi do regeneracji głównie zarodków prawidłowo fotosyntetyzujących. W przypadku odmiany 'Mercada' taka selekcja nie ma miejsca — zarodki w 46. dniu kultury bardzo często posiadają zmutowane genomy plastydowe. W rezultacie większość zregenerowanych roślin odmiany 'Mercada' to mutanty plastydowe, niezdolne do fotosyntezy.

LITERATURA

- Ankele E., Heberle-Bors E., Pfosser M. F., Hofinger B. J. 2005. Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals. *Acta Physiol. Plant.* 27: 651 — 664.

- Caredda S., Devaux P., Sangwan R. S., Prout I., Clément C. 2004. Plastid ultrastructure and DNA related to albinism in androgenetic embryos of various barley (*Hordeum vulgare*) cultivars. *Plant Cell. Tissue Organ Cult.* 76: 35 — 43.
- Clement C., Pacini E. 2001. Anther plastids in Angiosperms. *Bot. Rev.* 67: 54 — 73.
- Day A., Ellis, T. H. N. 1985. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr. Genet.* 9: 671 — 678.
- Pyke K. 2007. Plastid biogenesis and differentiation. In: *Cell and Molecular Biology of Plastids*: 51 — 79.
- Sakamoto W., Miyagishima S., Jarvis P. 2008. Chloroplast Biogenesis: Control of Plastid Development, Protein Import, Division and Inheritance. In: *The Arabidopsis Book*: 1.

TOMASZ KOSIADA
ROMAN ANDRZEJAK
MARCIN WIECZYŃSKI
PATRYCJA MARCINIAK

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań

Kierownik Tematu w latach 2014–2017: dr hab. Tomasz Kosiada

Kierownik Tematu w roku 2018: dr inż. Roman Andrzejak Uniwersytet Przyrodniczy, Katedra Fitopatologii i Nasiennictwa, Dąbrowskiego 159, 60-594 Poznań, tel. 602599463, e-mail: tomasz.kosiada@up.poznan.pl, tel. 723830069, e-mail: roman.andrzejak@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.HOR.hn.802.16.2018, Zadanie 19.

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

Słowa kluczowe: *Claviceps purpurea*, ergot, *Fusarium*, genotyp, rye, sporysz, żyto

CEL BADAŃ

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 mikroplotkach 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 pozyskanie 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 zróżnicowanie 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 zróżnicowanie 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 zróżnicowanie 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.

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	WTD 32/14	NS135N/4	WM 34R	WM 52R
	WM 46R	WTD 29/14	NSIN 0723	WTD 28/15	WTD 18/15
	WM 41R	WM 45/1	WM 52R	NSIN T1	
	WM 45R			ANTONIŃSKIE	
				WTD 21/15	
				NS 58N/08	
				WM 37/2	
				GRADAN	
				WM 60 R	
				WM 51R	
Danko (Choryń)	DC 1168	DC 98	L 77/11	DC 1431	DL 15
		SZK 3N/12	DC 63	SZK 15/13	DL 16
		DC 42		DC 42	DC 104
				DC 63	DC 84
				DC 73	DC 97
				LS 256N/13	DL 10
				LS 266N/13	
				LS 229N/13	
				DC 92	
Smolice	HRSM 102-4R	HRSM 147-4R	HRSM 181-4R	HRSM 238-3R	HRSM 224-4R
	HRSM 95-4R	HRSM 130-4R	HRSM 185-4R	HRSM 228-3R	
	HRSM 11-4R	HRSM 135-4R	HRSM 161-4R	HRSM 209-4R	
		HRSM 154-4R	HRSM 186-4R	HRSM 250-3R	
				HRSM 200-4R	
				HRSM 220-3R	
				HRSM 239-3R	
				HRSM 214-4R	

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 zawieszoną 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).

Tabela 2

Genotypy w których nie stwierdzono obecności sklerocjów *C. purpurea*

Pochodzenie genotypu	2014	lata			
		2015	2016	2017	2018
PHR (Wiatrowo)	Brak	WM 18 R	WTD 16/15	NS 135N/4	WM 52R
		WM 31 R	WTD 21/15	NS58/08	WTD 27/15
		WM 41 R	WM 60R		
		WM 45 R	DC 1289		
		WM 47 R	NS94N/06		
		WM 50 R	NS 5N07		
		WM 53 R	NS 857N/95		
		WM 54 R			
		WTD 33/14			
		RPD 492			
		NS 94N/06			
		NS 58N/08			
		Danko (Choryń)	Brak	DL 10	DL 13
DL 11	LS 172N/10			DC 12	
DC 98	TUR				
DC 88	D.GRADA N				
DC 81					
Smolice	Brak	HRSM 127-4R	HRSM 162-4R	brak	brak
		HRSM 128-4R	HRSM 165-4R		
		HRSM 130-4R	HRSM 169-4R		
		HRSM 131-4R	HRSM 181-4R		
		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					

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 wegetacyjnej 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 zawiesiną zarodników *Trichoderma* dwa dni po zakażeniu przez *Fusarium* powoduje obniżenie porażenia ziarniaków przez *Fusarium* sp.

LITERATURA

- Mańka K. 1974 Zbiorowiska grzybów jako kryterium oceny wpływu środowiska na choroby roślin. Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 160: 9 — 23.

EWA DUBAS**KAMIL ZIELIŃSKI****MONIKA KRZEWSKA****IWONA ŻUR****ANNA NOWICKA****KATARZYNA JUZOŃ**Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* PAN w KrakowieKierownik Tematu: dr hab. Ewa Dubas Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* PAN

w Krakowie, ul. Niezapominajek 21, 30-239 Kraków, tel. 12 4253301 wew. 39; sekretariat IFR PAN

tel. 12 4251833 wew. 102, e-mail: e.dubas@ifr-pan.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.802.15.2018, Zadanie 84.

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

Słowa kluczowe: androgeneza, glutation, haploidy, krzyżowania oddalone, programowana śmierć komórki, żyto

Celem nadrzędnym proponowanego projektu 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 (*Secale cereale* L. ssp. *cereale* × *Zea mays* L.). Celami pośrednimi były: (1) wybór optymalnej metody indukcji haploidalnych zarodków żyta (androgenezy i/lub krzyżowań oddalonych), (2) ustalenie optymalnych warunków kiełkowania i regeneracji zarodków/kalusów dla uzyskania na drodze androgenezy i/lub krzyżowań oddalonych roślin diploidalnych (DH) żyta, (3) identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną produkcję DH żyta.

Wyznaczone cele realizowane były etapami:

- Temat badawczy 2015–2018: Ocena efektywności haploidyzacji żyta metodami androgenezy w kulturach pylników i izolowanych mikrospor oraz krzyżowań oddalonych z kukurydzą.
- Temat badawczy 2015–2016: Określenie odpowiedniej fazy rozwoju gametofitu oraz optymalizacja warunków indukcji haploidalnych zarodków żyta w wybranej w Zb1 metodzie.
- Temat badawczy 2016–2017: Optymalizacja warunków kiełkowania i regeneracji zarodków/kalusów dla uzyskania roślin diploidalnych (DH) żyta.
- Temat badawczy 2017–2018: Identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną produkcję DH żyta.

Przeprowadzone badania nad haploidyzacją genomu wykonano na mieszańcach pokolenia F₁ (samopylnego oraz obcopylnego) żyta ozimego (*Secale cereale* L, ssp. *cereale*) udostępnionych przez polskie spółki hodowli roślin. Testowano metody: androgenezy w kulturach pylników i izolowanych mikrospor oraz krzyżowań oddalonych żyta z kukurydzą.

Scharakteryzowano testowane techniki haploidyzacji w indukcji zarodków (kultury pylnikowe, izolowanych mikrospor oraz krzyżowań oddalonych z kukurydzą) i wybrano najbardziej efektywną metodę. Na tej podstawie dokonano selekcji genotypów skrajnie zróżnicowanych pod względem podatności na haploidyzację, które wykorzystano następnie, jako obiekty modelowe w badaniu fizjologicznego podłoża indukcji i regeneracji DH żyta na dalszych etapach projektu. W ramach zadań badawczych określono: (1) optymalną fazę rozwoju gametofitu żeńskiego do indukcji haploidalnych zarodków żyta w metodzie krzyżowań oddalonych. Wykazano, że na efektywność metody krzyżowania oddalonego u żyta ma wpływ przede wszystkim genotyp, okres pomiędzy kastrowaniem a zapyłaniem (4 lub 6 dni) oraz rodzaj stosowanej auksyny (Marcinińska i in., 2018); (2) optymalną fazę rozwoju gametofitu męskiego do indukcji haploidalnych zarodków żyta w androgenezie. Wykazano wpływ genotypu roślin macierzystych i rodzaju wstępnego traktowania kłosów na żywotność oraz na średnią ilość poszczególnych typów komórek, będących w optymalnym stadium do zainicjowania androgenezy (w stadium jednojądrowym) oraz komórek inicjujących rozwój sporofitowy (po symetrycznym podziale) w dniu izolacji z kłosów; (3) warunki kiełkowania i regeneracji zarodków/kalusów dla uzyskania roślin diploidalnych (DH) żyta. Wykazano wpływ zastosowanej pożywki indukcyjnej i regeneracyjnej na efektywność androgenezy; (4) zidentyfikowano fizjologiczne podłoże warunkujące efektywną produkcję DH żyta. Wykazano, że na podatność na indukcję androgenezy ma wpływ endogenne stężenie glutationu w tkance wegetatywnej liścia flagowego i w pylnikach. Przedstawiono, na podstawie analizy aktywności enzymów szlaku glutationowego, jak aktywowany jest system antyoksydacyjny w pylnikach wyizolowanych z kłosów poddanych traktowaniu wstępnemu w odniesieniu do efektywności indukcji androgenezy i regeneracji.

Czynnikami, które bardzo często decydowały o przebiegu kultury w przedstawianych doświadczeniach były (1) genotyp rośliny macierzystej, (2) interakcja pomiędzy genotypem i traktowaniem wstępnym kłosów oraz (3) interakcja pomiędzy genotypem,

traktowaniem wstępnym kłosów oraz rodzajem zastosowanej pożywki indukcyjnej i regeneracyjnej. Wykazano, że genotypowe uwarunkowanie podatności na androgenezę zależy od wydajności system antyoksydacyjnego, w tym endogennego stężenia glutationu oraz aktywności badanych enzymów metabolizujących ten niskocząsteczkowy antyoksydant (Zieliński i in., 2017, 2018 a,b).

Zastosowane modyfikacje traktowania wstępnego kłosów (niska temperatura, stres osmotyczny, łagodzenie stresu oksydacyjnego łącznie z chemiczną modyfikacją aktywności enzymu metabolizującego glutation) podtrzymywały żywotność komórek oraz chroniły DNA jądrowe w mikrosporach przed fragmentacją (Zieliński i in., 2017, 2018c). Dodatkowo, optymalizacja składu pożywek na etapie indukcji (glutamina, arabinogalaktany, związki miedzi, węgiel aktywowany, phytigel) i regeneracji (arabinogalaktany, związki miedzi) istotnie wpłynęła na indukcję procesu androgenyzy oraz regenerację roślin DH żyta z uzyskanych struktur androgenicznych. Zaproponowane w projekcie warunki kultury *in vitro* (w kulturach pylników oraz izolowanych mikrospor) poskutkowały przełamaniem oporności/podniesieniem efektywności parametrów indukcji AS/SP i regeneracji R_{Total} u wszystkich linii. W przypadku kultur zawieszinowych mikrospor, istotnym okazało się zastosowanie inhibitorów PCD *in vitro*, co pozwoliło na przełamanie oporności u linii opornych i kilkukrotne podniesienie efektywności procesu indukcji androgenyzy u linii podatnej.

Analiza cytologiczna oraz molekularna, uzyskanych w kulturach pylników i izolowanych mikrospor zarodków, pozwoliła na częściowe znalezienie przyczyny niskiej efektywności procesu androgenyzy. Zilustrowano, że przyczyną nieprawidłowości rozwoju zarodków androgenicznych u żyta jest nie tylko fragmentacja DNA, ale także aktywność proteolityczna enzymów PCD, w tym kaspazy 1.

LITERATURA

- Marcińska I., Czyczyło-Mysza I., Skrzypek E., Warchoł M., Zieliński K., Dubas E. 2018. Obtaining of winter rye (*Secale cereale* L. *ssp. cereale*) haploid embryos through hybridization with maize (*Zea mays* L.). Cereal Research Communications 46 (3) DOI: 10.1556/0806.46.2018.029.
- Zieliński K., Nowicka A., Żur I., Krzewska M., Dubas E. 2017. Programowana śmierć komórki samobójczym zagrożeniem dla indukcji androgenyzy u żyta (*Secale cereale* L.). III Ogólnopolska konferencja doktorantów nauk o życiu BIOOPEN, Łódź, 11–12 maj 2017: 63 s.
- Zieliński K., Fodor J., Krzewska M., Nowicka A., Żur I., Dubas E. 2018 a. Glutationowa równowaga w indukcji androgenyzy u żyta (*Secale cereale* L.). IV Ogólnopolska konferencja doktorantów nauk o życiu BIOOPEN, Łódź, 24–25 maja 2018, p.: 85.
- Zieliński K., Krzewska M., Nowicka A., Żur I., Fodor J., Dubas E. 2018 b. Redox regulation of androgenesis in rye (*Secale cereale* L.). 11th International Conference ‘Plant Functioning Under Environmental Stress’, Krakow, 12–15 September 2018: 82 p.
- Zieliński K., Krzewska M., Nowicka A., Juzoń K., Żur I., Dubas E. 2018 c. Programmed cell death (PCD) and androgenesis induction in rye (*Secale cereale* L.). 11th International Conference ‘Plant Functioning Under Environmental Stress’, Krakow, 12–15 September 2018: 3.

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: androgeneza, 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:

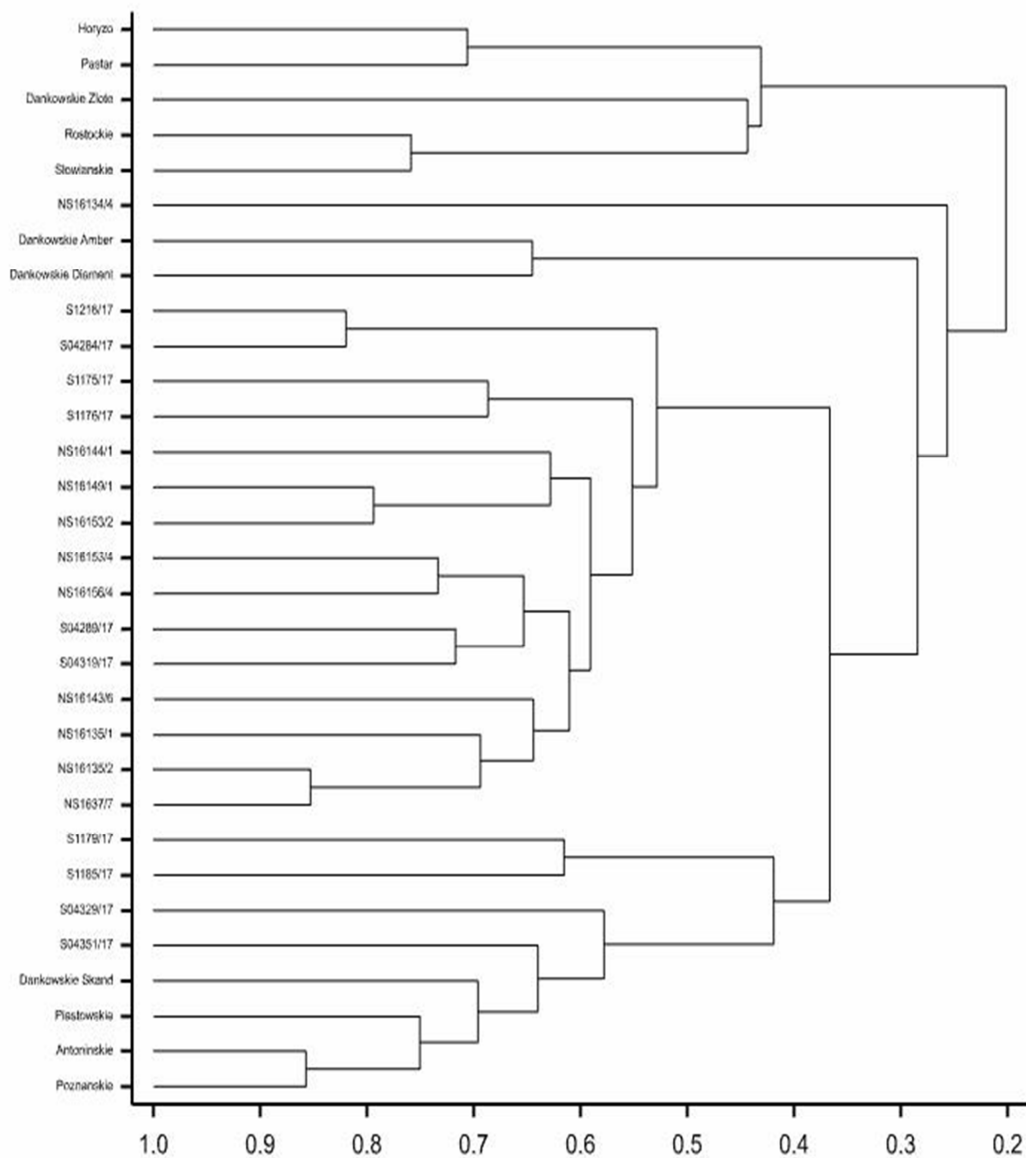
1. materiały hodowlane: NS16134/4, NS16135/1, NS16135/2, NS16137/7, NS16143/6, NS16144/1, NS16149/1, NS16153/2, NS16153/4, NS16156/4, S01175/17, S01176/17, S01179/17, S01185/17, S01216/17, S04284/17, S04298/17, S04319/17, S04329/17, S04351/17,
2. odmiany populacyjne: Antonińskie, Dańkowskie Amber, Dańkowskie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

TEMAT BADAWCZY 1

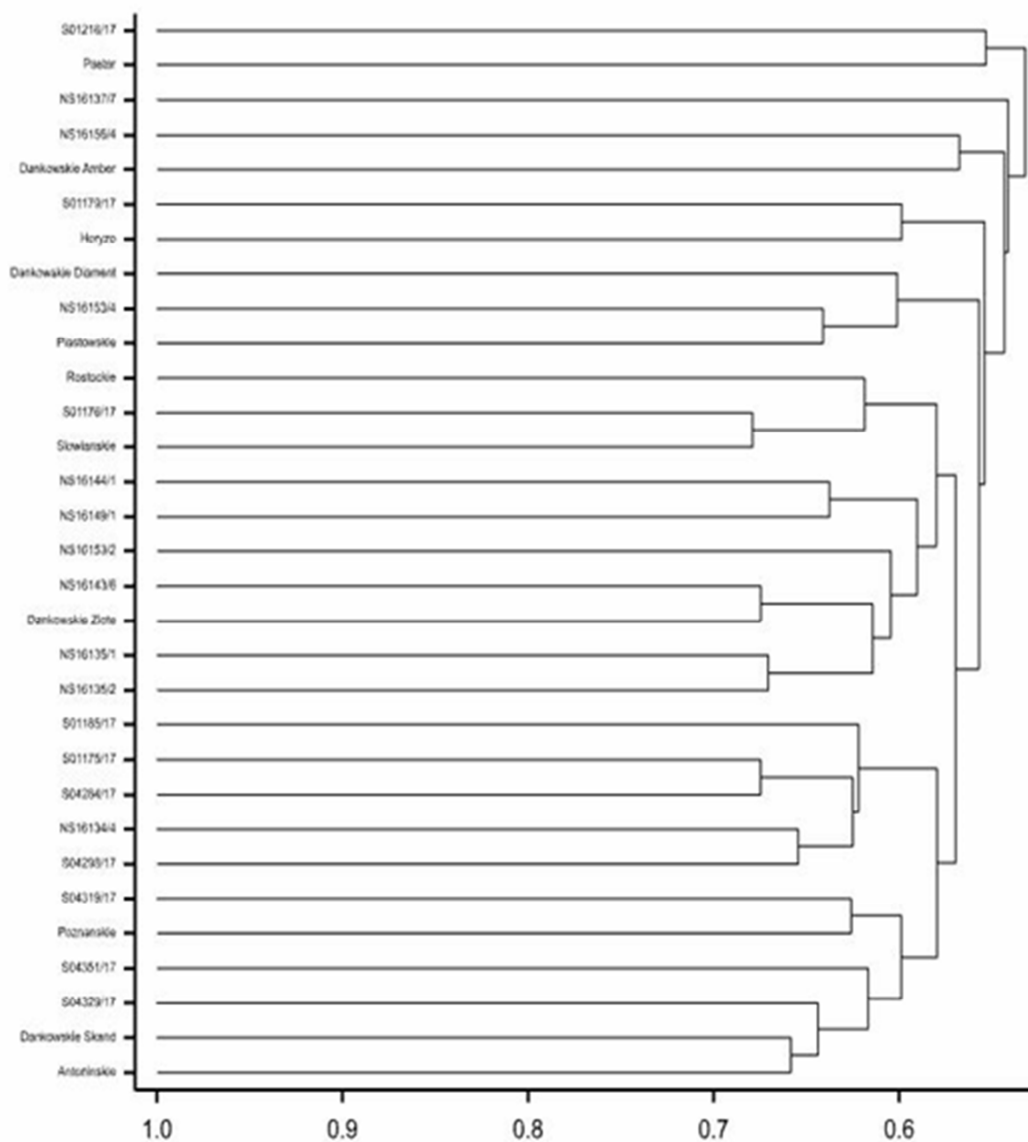
Ocena polimorfizmu DNA i poszukiwanie markerów RAPD i ISSR powiązanych z odpowiedzią żyta w kulturach pylników

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-Braęoszewska 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.

PIOTR BEDNAREK
AGNIESZKA NIEDZIELA
MARZENA WASIAK
SŁAWOMIR BANY

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Piotr Bednarek Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, tel.: 601827259, e-mail: p.bednarek@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 21.

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

Słowa kluczowe: CMS-Pampa, markery DArTseq, *Secale cereale* L.

Hodowla heterozyjna oraz produkcja nasion żyta bazuje na zjawisku cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS) indukowanej przez cytoplazmę typu Pampa (Geiger i Schnell, 1970). Sterylność jest cechą dziedziczną od matki i charakteryzuje się degradacją pylników oraz brakiem lub występowaniem śladowych ilości pyłku. Aby przywrócić wytwarzanie pyłku w uzyskanych hybrydach niezbędne jest znalezienie linii posiadających dominujące, jądrowe geny przywracania płodności *Rf* (ang. restorer genes). Dotychczasowe badania prowadzone w Niemczech wykazały, że główny gen *Rf* u linii restorerowej żyta L18 lokalizuje się na chromosomie 1RS (Wricke i in., 1993), a trzy geny o słabszym efekcie działania na chromosomach 3RL, 4RL i 5R (Miedaner i in., 2000). Inny dominujący gen *Rf* wykryto na chromosomie 4RL u żyta odmiany Pico Gentario i prymitywnego żyta irańskiego IRAN IX (Miedaner i in., 2000). W ramach niniejszego projektu badana jest lokalizacja QTLi cechy w obrębie materiałów dostępnych w Polsce.

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

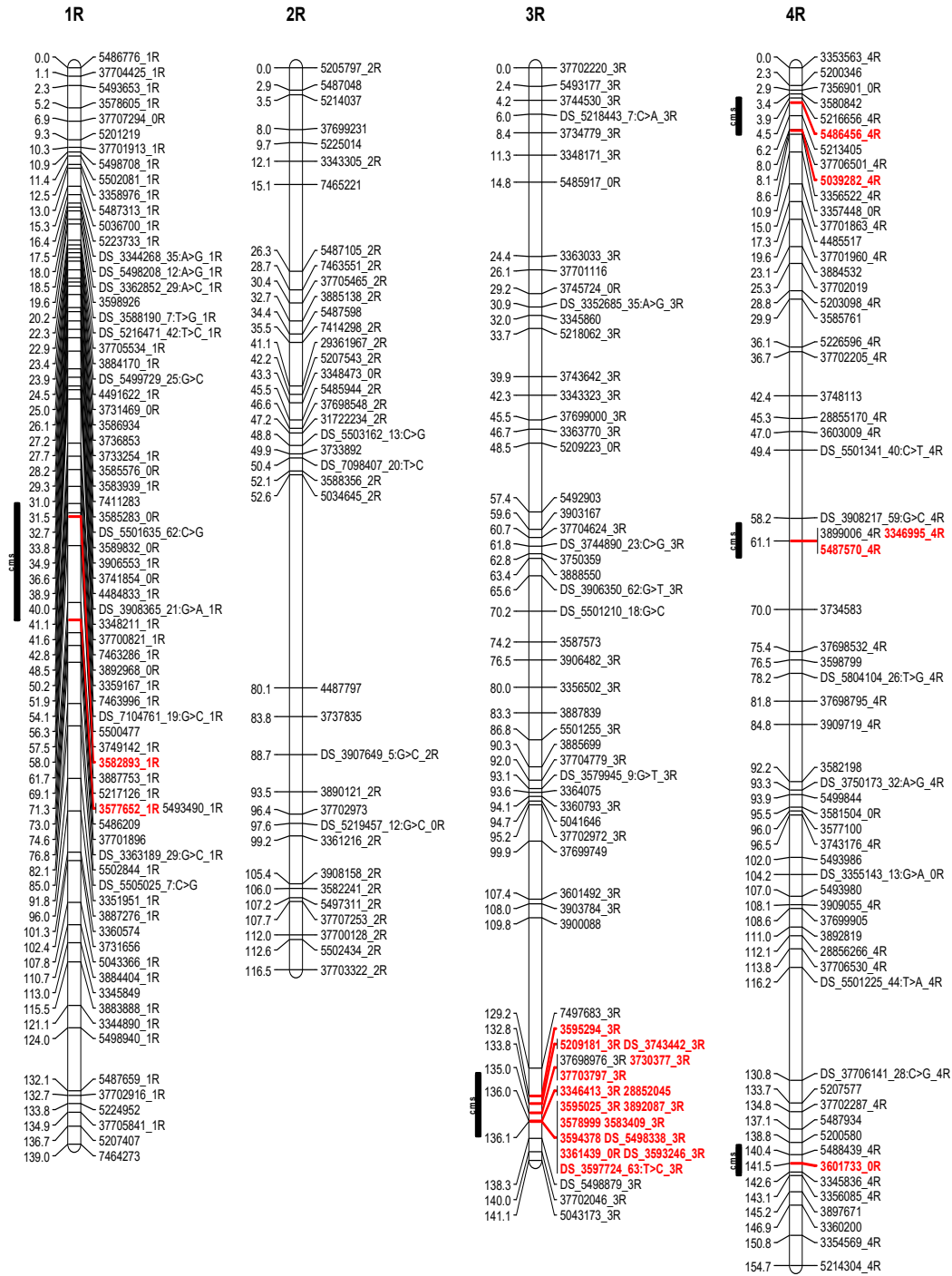
Celem badań było genotypowanie populacji mapującej żyta RIL8 (RIL-A): NS 08135N/2 × 83/81 (78A-674 TUR.)/2 za pomocą markerów DArTseq oraz mapowanie genów utrzymania przywracania płodności pyłku typu PAMPA wraz ze wskazaniem markerów związanych z badaną cechą.

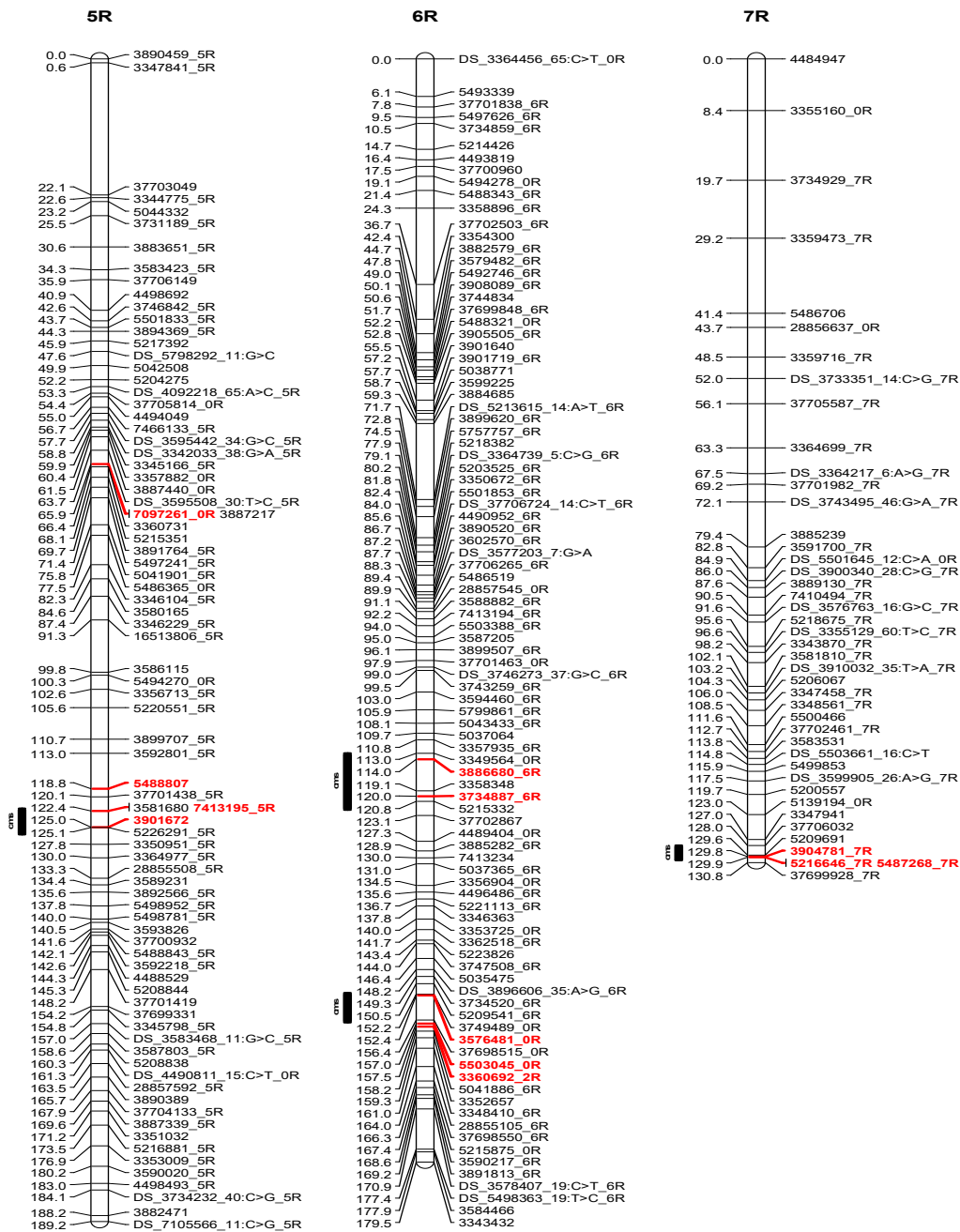
OPIS WYNIKÓW

Materiał roślinny do analiz molekularnych stanowiły liście populacji RIL-A: NS 08135N/2 × 83/81 (78A-674 TUR.)/2. Wykonano 140 genotypowań włączając kontrole form rodzicielskich (8 powtórzeń), powtórzenia wewnętrzne (12 powtórzeń losowo wybranych preparatów) oraz kontrole w postaci pojedynczych roślin linii sterylnych (10 linii sterylnych P1-10). W wyniku genotypowania uzyskano 40073 markerów DArTseq (marker SNP) oraz 92928 silicoDArT (marker dominujący). Wykorzystanie kontroli wewnętrznych oraz powtórzeń umożliwiło weryfikację powtarzalności genotypowania, które wynosiło około 99%.

Mapowanie genetyczne wykonane w programie MultiPoint UltraDense z wykorzystaniem obu typów markerów (DArTseq, silicoDArT) umożliwiło identyfikację siedmiu grup sprzężeń (LG1-LG7). Poszczególne LGs różniły się między sobą zarówno długością jak i liczbą markerów szkieletowych, redundantnych oraz dodanych. Na mapie genetycznej umieszczono 424 markery szkieletowe, 1564 redundantne (1988 łącznie dla wszystkich LG) oraz 32270 markerów dodanych (interpolowane na mapę). Opracowana mapa genetyczna pokrywała 1051,8 cM. Największa grupa rozciągała się na obszarze 189,3 cM, a najmniejsza na 68,80 cM. Średnio na pojedynczą LG przypadało 60 markerów szkieletowych, 223 markerów redundantnych i 4610 markerów dodanych. Największą lukę między markerami stwierdzono w przypadku grupy LG2 i wynosiła ona 27,5 cM. Poszczególne grupy sprzężeń przypisano do chromosomów żyta na podstawie znanej lokalizacji markerów DArTseq oraz silicoDArT.

Mapowanie asocjacyjne wykonane w programie TASSEL z zastosowaniem wielokrotnego modelu liniowego (MLM ang. Multiple Linear Model) wykazało, że 144 markery DArTseq oraz silicoDArT są asocjowane z genami przywracania płodności pyłku u żyta z CMS-Pampa. Najwyższa wartość prawdopodobieństwa testowego dla jednego z markerów silicoDArT wynosiła $2,64E-12$ przy wartości testu Bonferroniego równej $8,64E-07$.





Rys. 1. Graficzna reprezentacja mapy genetycznej populacji mapującej RIL8 (RIL-A): NS 08135N/2 × 83/81 (78A-674 TUR.)/2. Na czerwono zaznaczono markery asocjowane z cechą przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa. Potencjalny obszar QTL określony na podstawie lokalizacji markerów asocjowanych z badaną cechą przedstawiono w postaci czarnej linii

Stożenie asocjacji określony za pomocą współczynnika determinacji R^2 wahał się od 0,768 do 0,347 co świadczyło o silnych asocjacjach identyfikowanych markerów z badaną cechą. Markery asocjowane z cechą przywracania płodności pyłku u żyta zaznaczono na kolor czerwony na mapie genetycznej populacji mapującej RIL8 (RIL-A): NS 08135N/2 × 83/81 (78A-674 TUR.)₂ (rys. 1). Na podstawie ich lokalizacji zaznaczono również potencjalny obszar QTL badanej cechy.

WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

Dotychczasowe badania prowadzone w ramach niniejszego projektu wykazały, że w materiałach roślinnych dostępnych w Polsce dominują geny przywracania płodności pyłku z CMS-Pampa lokalizujące się na chromosomach 1R i 4R. Pewną rolę odgrywają również geny na 3R oraz 5R. W badaniach tych udowodniono wysoką zbieżność wyników mapowania kompozytowego i asocjacyjnego. Mapowanie asocjacyjne dla populacji mapującej RIL8 (RIL-A): NS 08135N/2 × 83/81 (78A-674 TUR.)₂ potwierdza wielogenowość cechy wykazując, że regiony odpowiedzialne za przywracanie płodności pyłku u żyta z CMS Pampa mogą lokalizować się na chromosomach 1R, 3R, 4R, 5R, 6R oraz 7R. Uzyskany wynik jest zgodny z danymi literaturowymi.

LITERATURA

- Geiger H. H., Schnell F. W. 1970. Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). Crop Sci. 10: 590 — 593.
- 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.
- Wricke G., Wilde P., Wehling P., Gieselmann C. 1993. An isozyme marker for pollen fertility restoration in the Pampa cms system of rye (*Secale cereale* L.). Plant Breed 111: 290 — 294.

STEFAN STOJAŁOWSKI¹

MARTA ORŁOWSKA¹

MARTYNA SOBCZYK¹

ANNA BIENIAS¹

BEATA MYŚKÓW¹

PRZEMYSŁAW TOMCZAK²

WOJCIECH WESOŁOWSKI³

MAREK SZKLARCZYK³

WALDEMAR BRUKWIŃSKI⁴

KATARZYNA BANASZAK⁴

MONIKA HANEK⁴

RENATA KRYSZTROFIK⁴

MAREK ZAJĄC⁵

¹ Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

² Hala Wegetacyjna, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

³ Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

⁴ DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.

⁵ Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o.

Kierownik Tematu: dr hab. Stefan Stojalowski prof. ZUT Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, tel. 91 4496404, e-mail: stefan.stojalowski@zut.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.802.13.2018, Zadanie 20.

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**

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterility, odmiany mieszańcowe, żyto

Zjawisko cytoplazmatycznej męskiej sterility wykorzystywane jest w komercyjnej hodowli odmian mieszańcowych wielu gatunków roślin uprawnych. U żyta znanych jest

szereg źródeł cytoplazm sterylizujących, ale w praktycznej hodowli dominuje wykorzystanie odkrytej przez Geigera i Schnella (1970) cytoplazmy Pampa (CMS-P). Źródło CMS-C odkryto w Szczecinie (Łapiński, 1972) i obecnie jest ono zaliczane do grupy cytoplazm o nazwie Vavilovii (CMS-V). Realizację badań podjęto z zamiarem bliższego poznania podobieństw i różnic w genetycznej determinacji męskiej sterility u żyta z cytoplazmą Pampa i cytoplazmą C.

Cele pracy to:

- poszukiwanie markerów związanych z genami przywracania płodności w cytoplazmach C i P na drodze mapowania sprzężeniowego oraz asocjacyjnego,
- walidacja wyników bioinformatycznej analizy danych dotyczących sekwencji DNA mitochondrialnego z cytoplazm: normalnej, Pampa i CMS-C,
- określenie frekwencji roślin męskopłodnych i męskosterylnych w mieszańcach między źródłami CMS-C i CMS-P a populacjami żyta,
- ocena zdolności kombinacyjnej wybranych linii męskosterylnych z cytoplazmą C na tle linii zawierających cytoplazmę Pampa.

Wyniki mapowania genetycznego w obrębie mieszańców międzyliniowych oraz odmian mieszańcowych wskazują na duże znaczenie genów zlokalizowanych na długim ramieniu chromosomu 4R. Geny zlokalizowane w tym obszarze genomu żyta są istotne w kontrolowaniu męskiej płodności zarówno w cytoplazmie Pampa, jak i C. Wynik ten jest zgodny z wcześniejszymi doniesieniami literaturowymi (Miedaner i in., 2000; Stracke i in., 2003; Stojałowski i in., 2004; 2011; Hackauf i in., 2012). Dodatkowe geny o niewielkich efektach fenotypowych zlokalizowane są na kilku różnych chromosomach, a ich rozmieszczenie nie jest identyczne dla obu badanych cytoplazm. Przy ocenie męskiej płodności pojedynczych roślin odmian mieszańcowych, zaobserwowano, że w odmianie Skaltio i Konto udział roślin pyłących był bardzo niewielki, więcej męskopłodnych roślin było w odmianie Tur, Stach i Picasso, a najwięcej w odmianie Bono. We wszystkich tych odmianach udział roślin męskosterylnych był jednak nie mniejszy niż 40%.

Poszukiwania mitochondrialnych czynników genetycznych wywołujących męską sterility w cytoplazmach Pampa i C nie zakończyły się sukcesem. Zidentyfikowano kilka polimorfizmów mtDNA, ale nie miały one związku z determinacją zjawiska CMS.

Badania nad frekwencją alleli sterility/płodności wykonano poprzez ocenę płodności mieszańców między źródłami CMS-C i CMS-P a europejskimi populacjami żyta. Ocena płodności była wykonywana wzrokowo przez cały okres kwitnienia żyta, przy zastosowaniu skali bonitacyjnej opracowanej przez Geigera i Morgensterna (1975). Badano trzy historyczne odmiany: z Rosji, Węgier i byłej Jugosławii oraz trzy populacje hodowlane z Polski. Większość badanych populacji bardzo dobrze przywracała płodność w systemie CMS-C, a słabo w CMS-P. Wyjątkiem była jugosłowiańska populacja Landsorte K9538, która charakteryzowała się relatywnie dużą częstotliwością występowania genotypów dopełniających względem cytoplazmy C (prawie 40%).

Ocenę zdolności kombinacyjnej 30 linii męskosterylnych z cytoplazmami C (4 linie) i P (26 linii) wykonywano w doświadczeniach polowych trójpowtórzeniowych założonych w dwóch miejscowościach (Wiatrowo i Nagrałowice) metodą losowanych

bloków. Obiektami badawczymi w doświadczeniach były mieszańce wyżej wymienionych linii męskosterylnych z populacją syntetyczną SR27. Wielkość poletek doświadczalnych do zbioru wynosiła 5 m². Wykonano ocenę wielkości plonu, wylegania przed zbiorem, porażenia przez rdzę brunatną i wysokości roślin. Poza badanymi 30 mieszańcami eksperymentalnymi w doświadczeniu badano dwie odmiany wzorcowe: KWS Serafino F₁ i KWS Binnto F₁. Wszystkie badane w 2018 roku linie dawały mieszańce plonujące wyraźnie gorzej niż odmiany wzorcowe. Plony mieszańców eksperymentalnych stanowiły od nieco ponad 60% do niespełna 85% średniego plonu wzorców. Mieszańce eksperymentalne z udziałem trzech linii męskosterylnych z cytoplazmą C należały do najslabiej plonujących — poniżej 70% wzorców. Podobny poziom plonowania odnotowano dla ośmiu mieszańców eksperymentalnych z cytoplazmą Pampa. Najlepszy wynik dała linia ZUT_160086P — ponad 75% plonu wzorca. Pod względem pozostałych badanych w doświadczeniu cech użytkowych mieszańce z cytoplazmą C ocenione zostały na poziomie zbliżonym do tych, w których formy mateczne zawierały cytoplazmę Pampa.

WNIOSKI Z BADAŃ

1. Odmiany mieszańcowe żyta są wewnątrznie zróżnicowane pod względem przywrócenia męskiej płodności.
2. Geny kontrolujące przywracanie płodności u żyta z cytoplazmami Pampa i C są zlokalizowane na różnych chromosomach, a największe znaczenie mają geny z długiego ramienia chromosomu 4R.
3. We wszystkich ocenionych populacjach żyta z Polski i innych krajów Europy przeważały genotypy przywracające męską płodność w systemie CMS-C, a utrzymujące męską sterylność w systemie CMS-P.
4. Badane linie męskosterylne z cytoplazmami C i P dawały mieszańce plonujące słabiej niż zarejestrowane odmiany wzorcowe.
5. Pod względem wysokości, wylegania i porażenia przez rdzę brunatną genotypy z CMS-C nie różniły się od tych z cytoplazmą Pampa.

LITERATURA

- Geiger H. H., Morgenstern K. 1975. Angewandt-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.
- 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.
- Stojalowski S., Łapiński M., Masojć P. 2004. RAPD markers linked with restorer genes for the C-source of cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Breeding* 123: 428 — 433.

- Stojałowski S., Milczarski P., Hanek M., Bolibok-Braęoszewska 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.

STEFAN STOJAŁOWSKI¹**MARTA ORŁOWSKA**¹**MARTYNA SOBCZYK**¹**ANNA BIENIAS**¹**BEATA MYŚKÓW**¹**MARZENA OSTROWSKA**²**MAREK ZAJĄC**²**RÓŻA MAZUR**²**DOROTA JASIŃSKA**²

¹ Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie

² Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o.

Kierownik Tematu: dr hab. Stefan Stojałowski prof. ZUT Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie, Słowackiego 17, 71-434 Szczecin, tel. 91 4496404, e-mail: stefan.stojalowski@zut.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.802.13.2018, Zadanie 87.

Badania wewnętrznej struktury genetycznej odmian żyta oraz dziedzicznego podłoża efektu heterozji

Study on internal genetic structure of rye cultivars and genetic background of heterosis

Słowa kluczowe: efekt heterozji, odmiany populacyjne i mieszańcowe, żyto

Hodowla heterozyjna żyta została zapoczątkowana w latach 70. XX wieku, a rejestracja pierwszych odmian mieszańcowych miała miejsce w Niemczech w połowie lat 80. Strategia prac hodowlanych w Niemczech opracowana została na Uniwersytecie Hohenheim i od początku zakładała wydzielenie dwóch heterotycznych pul genetycznych (Geiger, 1985) dla komponentów matecznych (Petkus-pool) i ojcowskich (Carsten-pool). Początkowo hodowla komponentów rodzicielskich dla mieszańców polegała na tworzeniu linii wsobnych na drodze powtarzanego samozapylenia roślin reprezentujących obie pule genetyczne, następnie nowe linie wsobne tworzono w oparciu o mieszańce między wcześniej otrzymanymi najlepszymi (elitarnymi) liniami wsobnymi (Fischer i in., 2010).

Jednoczesne krzyżowanie najlepszych linii wsobnych w obrębie jednej puli genetycznej w połączeniu z selekcją najlepszych genotypów nieuchronnie prowadzić musi do zawężenia zmienności genetycznej w obrębie heterotycznych pul (Duvick i in., 2004). W konsekwencji nieuniknione jest zahamowanie dalszego postępu biologicznego w hodowli mieszańców połączone ze wzrostem podatności odmian mieszańcowych na biotyczne i abiotyczne stresy środowiskowe. Dlatego też niezbędny jest systematyczny dopływ nowych genów do każdej z heterotycznych pul genowych. Realizacja tego zadania w sposób planowy wymaga wiedzy na temat struktury genetycznej aktualnie uprawianych i historycznych odmian, oceny wpływu zróżnicowania genetycznego na wartość gospodarczą populacji i szeregu innych badań.

Celami realizowanych badań była:

- ocena zmienności genetycznej występującej w obrębie odmian populacyjnych i mieszańcowych,
- ocena w warunkach polowych wartości gospodarczej populacji syntetycznych o zróżnicowanej strukturze genetycznej,
- wytworzenie pokolenia S₃ linii introgressyjnych żyta.

Analizami genetycznymi objęto pięć odmian żyta — trzy populacyjne (Armand, Dańkowskie Granat i Horyzo) oraz dwie mieszańcowe (Skaltio F1 i Stakkatto F1). Do badań wykorzystano 90 losowo wybranych roślin z każdej odmiany. Przeprowadzono analizy z użyciem techniki DArTseq oferowanej przez firmę Diversity Arrays Technology Pty jako komercyjny wariant metody GBS (ang. Genotyping by Sequencing). Analizy podobieństwa genetycznego wykonywano w programie NTSys2.2, a dendryty ilustrujące podobieństwo genetyczne skonstruowano w oparciu o wyniki DArTseq przy użyciu metody UPGMA. Analizy DArTseq dostarczyły informacji o 65534 markerach Silico-DArT. Zakres podobieństwa genetycznego między roślinami odmiany Armand mieścił się w granicach od 0,73 do 0,84. Dla odmiany Dańkowskie Granat zakres zmienności współczynników podobieństwa był bardzo podobny — od 0,74 do 0,83. W obu tych odmianach populacyjnych nie zaobserwowano obecności wyraźnie wydzielonych grup skupień. Odmiana Skaltio F1 charakteryzowała się najmniejszym wewnętrznym zróżnicowaniem genetycznym. Wartości współczynników podobieństwa genetycznego dla pojedynczych roślin tej odmiany mieściły się w granicach od 0,81 do 0,92. Nieznacznie większe wartości współczynników zmienności zaobserwowano u odmiany Stakkatto F1, mieściły się one w granicach od 0,77 do 0,91. W obu odmianach mieszańcowych najniższe wartości współczynników podobieństwa dotyczyły nielicznych roślin wykazujących odrębność od dominującej grupy genotypów charakterystycznej dla danej populacji. Ogólnie w odmianach populacyjnych badanych w 2018 roku obserwowano nieznacznie większą zmienność genetyczną niż w odmianach mieszańcowych.

Jesienią 2017 roku wysiano, w trzech powtórzeniach i w dwóch lokalizacjach (Wiatrowo, Nagradowice), doświadczenie polowe z sześcioma populacjami syntetycznymi żyta. Doświadczenie zaprojektowano w układzie bloków losowych, powierzchnia poletek wynosiła 5 m². Jako wzorce odmianowe w doświadczeniu wykorzystano dwie odmiany mieszańcowe (Binnto F1 i Serafino F1) oraz jedną odmianę populacyjną —

Antonińskie. W doświadczeniu wykorzystano też 6 eksperymentalnych mieszańców F_1 z cytoplazmą Pampa. Łącznie badano 15 obiektów doświadczalnych. Oceniano plon ziarna z poletka (w przeliczeniu na wilgotność 15%), wysokość roślin, wyleganie przed zbiorem oraz porażenie przez rdzę brunatną. Dwie wzorcowe odmiany mieszańcowe plonowały najlepiej ze wszystkich obiektów badanych w doświadczeniu. Poziom plonowania sześciu populacji syntetycznych był niski. Nawet najlepiej plonujące syntetyki SYN_4 i SYN_5 nie dorównywały odmianom wzorcowym (zarówno mieszańcowym, jak i odmianie populacyjnej Antonińskie). W porównaniu do kilku najsłabszych eksperymentalnych mieszańców F_1 , najlepsze syntetyki plonowały nieco lepiej. Najsłabiej plonującym obiektem doświadczenia był syntetyk SYN_3. Jego plon był o ponad połowę mniejszy niż plony dwóch wzorcowych odmian mieszańcowych.

Badane rośliny z populacji syntetycznych były względnie niskie. Ich wysokość była zbliżona do poziomu dwóch mieszańcowych odmian wzorcowych. Wzorzec populacyjny był wyraźnie wyższy od Binntto F1 i Serafino F1 oraz od badanych populacji syntetycznych. Najwyższym obiektem doświadczenia był jednak jeden z eksperymentalnych mieszańców F_1 (LS_336P/15).

Wyleganie w doświadczeniach miało miejsce na bardzo niewielką skalę. Podczas eksperymentu polowego w Wiatrowie wylegania w ogóle nie zaobserwowano. Lekkie pochylenie roślin miało miejsce w Nagradowicach — w granicach od 7,3 do 8,0 w 9-punktowej skali bonitacyjnej.

W wyniku ścisłego chowu wsobnego, w stacji doświadczalnej Zachodniopomorskiego Uniwersytetu Technologicznego w Szczecinie uzyskano nasiona pokolenia S_3 zestawu 90 linii introgresyjnych. Obserwowano objawy depresji wsobnej związane z wymuszonym samozapyleniem linii. Linie wysiano w polu w celu kontynuowania prac.

WNIOSKI

1. Badane odmiany populacyjne charakteryzowały się nieznacznie większym wewnętrznym zróżnicowaniem genetycznym niż odmiany mieszańcowe.
2. Wytworzone populacje syntetyczne plonowały słabo w porównaniu do odmian wzorcowych.
3. Zaobserwowano zróżnicowanie w wartości gospodarczej badanych syntetyków — wyniki najlepsze i najgorsze otrzymano dla syntetyków dwuliniowych.
4. Wytworzony zestaw introgresyjnych linii wsobnych żyta w pokoleniu S_3 charakteryzował się obniżoną żywotnością w porównaniu do mieszańca wyjściowego.

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.

JANUSZ ZIMNY

KATARZYNA MAKOWSKA

ALEKSANDRA ZIMNY

ANDRZEJ CZAPLICKI

SYLWIA OLESZCZUK

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Janusz Zimny Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, Instytut

Hodowli i Aklimatyzacji — PIB, Radzików, 05-870 Błonie, tel. 22 7334520, e-mail: j.zimny@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 85.

Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury *in vitro*

The study on rye microspore reaction to stress and *in vitro* culture conditions

Słowa kluczowe: androgeneza, *in vitro*, mikrospory, podwojone haploidy, regeneracja, żyto

Celem zadania jest: określenie wpływu zastosowanych stresów przeprogramowania mikrospor i warunków kultury (rodzaj pożywki) na indukowanie androgenezy, jakościową (rośliny zielone i albinotyczne) i ilościową regenerację roślin oraz określenie alternatywnego do kolchicyny sposobu podwajania liczby chromosomów wśród otrzymanych regenerantów. **Zadanie obejmowało 4 zagadnienia.**

ZAGADNIENIE 1

Analiza wpływu różnych czynników stresowych na indukcję androgenezy. Celem badań było sprawdzenie zróżnicowania reakcji mikrospor na 9 rodzajów stresu przeprogramujących ich rozwój gametofitowy w kierunku sporofitowego

Potwierdzono znaczenie odpowiednio dobranego rodzaju stresu dla efektywności indukowania androgenezy w kulturach pylników żyta. Linie 5 i 8 zareagowały wyraźnie lepiej w porównaniu do linii 6, niezależnie od zastosowanego stresu. Wyraźnie źle reagowały pylniki wszystkich genotypów na stres z zastosowaniem HNA w połączeniu z BAP i 2,4-D. Najlepsze wyniki dla linii 5 i 8 otrzymano w wyniku działania stresu

4°C/21 dni oraz chłodzenia pędów z kłosami i ich prekultury w roztworze mannitolu przez 7 dni/4°C. Obok chłodu istotne znaczenie miało zastosowanie, jako prekultury mannitolu lub pożywki SolA (Corondaro i in., 2005). Uzyskane dane wskazują, że te stresy były najbardziej uniwersalne.

Różna reakcja na zastosowane stresy stwarza konieczność zbadania i dostosowania stresu do konkretnego genotypu. Uniwersalnym typem stresu jest chłodzenie pędów z kłosami przez 21 dni oraz chłodzenie pędów z kłosami w połączeniu prekulturą pylników w roztworze mannitolu lub pożywce SolA.

ZAGADNIENIE 2

Zbadanie wpływu czynników stresowych i składu pożywek na zjawisko albinizmu regenerantów. Celem prac było określenie możliwości ograniczenia zjawiska albinizmu poprzez dobór stresu inicjującego androgenezę oraz modyfikację składu pożywek zastosowanych na etapie indukcji procesu

Poziom regeneracji wahał się w granicach od 0 do ponad 20 roślin (zielone + albinotyczne) na 100 wyłożonych pylników, w zależności od genotypu, rodzaju stresu i stosowanej pożywki. Wytypowano genotypy o wysokim potencjale regeneracyjnym (linie 5 i 8) oraz takie, dla których możliwe było otrzymanie kilku roślin, tylko w niektórych kombinacjach stresowych. Poziom albinizmu wahał się od 0 do 10,5%, w zależności od rodzaju zastosowanego stresu i pożywki. Najwyższy odsetek roślin bezchlorofilowych, otrzymano dla stresów chłodu i chłodu + prekultura w mannitolu w linii 5, zwłaszcza w kombinacji z pożywką KBP (Kumlehn i in. 2006). Dla linii 8, po zastosowaniu stresu chłodu + prekultura na pożywce SolA regeneracja albinosów była na zbliżonym poziomie ok. 3,8% na obu badanych pożywkach (190-2 (Pauk i in. 1991) i KBP). Zastosowanie pożywki KBP przyniosło wzrost wydajności regeneracji roślin, ale nie wpłynęło na zredukowanie zjawiska albinizmu.

Genotyp ma kluczowe znaczenie dla efektywności procesu androgenazy, regeneracji roślin oraz poziomu albinizmu, niemniej jednak poprzez odpowiedni dobór warunków zewnętrznych możliwe jest wpływanie na powyższe parametry. Rodzaj stresu ma wpływ na liczbę roślin albinotycznych u konkretnych genotypów. Pożywka KBP istotnie poprawia wydajność regeneracji roślin, dla niektórych genotypów i zastosowanych stresów.

ZAGADNIENIE 3

Zbadanie wpływu ustalonego stresu, warunków kultury i systemu podwajania liczby chromosomów na liczbę regenerowanych zielonych roślin. Morfologiczna i cytometryczna charakterystyka oraz ocena poziomu płodności otrzymanych regenerantów

Odsetek osobników diploidalnych po analizach cytometrycznych wynosił 72%. Nie uwidocznił się związek pomiędzy częstotliwością spontanicznej diploidyacji a genotypem. Różnice w ogólnym pokroju, intensywności wzrostu i rozwoju pomiędzy liniami

w obrębie genotypu, obserwowano niezależnie od zastosowanego czynnika stresowego. Występowała duża rozpiętość w liczbie wytworzonych pędów, długości źdźbła oraz długości kłosów. Około 5% linii odznaczało się zróżnicowaniem morfologicznym obejmującym min. skrócenie źdźbła, sektorialne zmiany w budowie kłosa, zaburzenie pokroju, trudności z wykłoszeniem, spowolniony wzrost, degenerację pylników, wysoki udział pyłku sterylnego. Płodne rośliny stanowiły od 16% do 75% dla różnych linii. Od 30% do 60% osobników wykazywało częściową płodność. Często ziarniaki były pomarszczone i mniejsze w porównaniu do tych z roślin donorowych, a efektywność ich zawiązywania wynosiła od 1 do 47/na roślinę. Liczba nasion w kłosie była wyższa w wyniku swobodnego przypylenia.

Cytometryczna ocena diploidyzacji regenerantów wykonana wg Galbraith i in. (1983) nie przekłada się na płodność ocenioną na etapie pełnej dojrzałości. Płodność regenerantów i efektywność zawiązywania ziarniaków nie są związane z rodzajem stresu indukującego androgenezę.

ZAGADNIENIE 4

Ocena wpływu herbicydów antymitotycznych na podwajanie liczby chromosomów w kulturach *in vitro* — badania wstępne (drugi rok). Badania obejmowały przetestowanie wytypowanych w roku ubiegłym inhibitorów mitozy na przeżywalność androgenicznych roślin

Odnotowano wysoką śmiertelność wśród młodszych roślin (ok 2 cm) powodowaną toksycznym działaniem antymitotyków, tj. 5 μ M oryzaliny — O₅ oraz 10 μ M trifluraliny — T₁₀. Negatywny wpływ stosowanych związków w tej grupie eksplantatów objawiał się żółknięciem, brązowieniem tkanek, w wyniku czego dalszy rozwój roślin ulegał częściowemu spowolnieniu lub zahamowaniu — śmiertelność regenerantów wzrastała wraz z wydłużeniem czasu ekspozycji. Po zastosowaniu T₁₀ zmarło 42,5% eksplantatów oraz prawie 50% w przypadku O₅, podczas gdy w kontroli zaledwie 7%. Natomiast w grupie starszych eksplantatów — tj. ukorzenionych roślin, nie znaleziono powiązania między liczbą regenerantów, które przeżyły/wypadły po wysadzeniu do gleby, a rodzajem antymitotyku i czasem jego ekspozycji. Na etapie wysadzania do gleby obserwowano zamieranie głównie roślin rachitycznych, obecnych również w badaniu kontrolnym.

Przeżywalność eksplantatów poddawanych działaniu antymitotyków w formie herbicydów na pożywkach w warunkach *in vitro* jest zależna od ich stadium rozwojowego. Oryzalina wykazuje silniejsze działanie fitotoksyczne w porównaniu do trifluraliny na etapie małych roślin. Spadek przeżywalności regenerantów wysadzonych do gleby nie jest spowodowany działaniem substancji antymitotycznych.

LITERATURA

Coronado M. J., Hensel G., Broeders S., Otto I., Kumlehn J. 2005. Immature pollen-derived doubled haploid formation in barley cv. Golden Promise as a tool for transgene recombination. *APP*. 27 (4): 591 — 599.

- Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P., Firoozabady E. 1983. Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science* 220: 1049 — 1051.
- Kumlehn J., Serazetdinova, L., Hensel G., Becker D., Lörz H. 2006. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal* 4: 251 — 261.
- Pauk J., Manninen O., Mattila I., Salo Y., Puli S. 1991. In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Breed.* 107: 18 — 27.

HENRYK BUJAK**KAMIŁA NOWOSAD****AGNIESZKA ŁĄCKA**

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Henryk Bujak Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki,

Hodowli Roślin i Nasiennictwa, 50-363 Wrocław, Plac Grunwaldzki 24A, tel. 713201829,

e-mail: henryk.bujak@upwr.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.802.14.2018, Zadanie nr 22.

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

Słowa kluczowe: materiały hodowlane, mączniak prawdziwy, rdza brunatna, odmiany, żyto

Celem badań była próba znalezienia efektywnych genów odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną u różnych genotypów żyta ozimego oraz weryfikacja markerów molekularnych przydatnych do ich identyfikacji. Wyniki badań pozwoliły na identyfikację i sprawdzenie efektywności działania genów odporności na obecnie występujące rasy mączniaka prawdziwego oraz rdzy brunatnej. Do analizy molekularnej pozwalającej na identyfikację posiadanych genów odporności wykorzystano opracowane i pozyskane z literatury sekwencje starterowe sprzężone z najbardziej efektywnymi genami odporności na wymienione patogeny żyta.

Materiał badawczy w 2018 roku stanowiły zgromadzone w kolekcji własnej homozygotyczne linie wsobne oraz przesłane przez hodowców genotypy żyta. Oceny odporności genotypów żyta ozimego na porażenie przez mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną prowadzono w warunkach sztucznej inokulacji oraz w warunkach infekcji polowej. W trakcie prowadzonych w 2018 roku badań przetestowano ponad 180 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 odporność na patogeny około 180 linii wsobnych żyta.

Wyniki przeprowadzonych doświadczeń pozwoliły wyselekcjonować wyprowadzone przez hodowców materiały pod kątem ich odporności 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 obydwu patogeny jednocześnie. Liczba genotypów odpornych na poszczególne patogeny zależała od roku badań tzn. przesłanych przez hodowców materiałów oraz wirulencji zebranych izolatów patogenów służących do infekcji. Stwierdzono brak 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 zostały przekazane zainteresowanym hodowcom.

Sprawdzono przydatność markerów molekularnych do identyfikacji genów odporności na mączniaka prawdziwego i rdzę brunatną u badanych genotypów żyta. Ponieważ dla żyta nie było opracowanych specyficznych markerów molekularnych sprzężonych z genami odporności na mączniaka prawdziwego (*Pm*), na początku wykorzystywano 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 odporności na mączniaka prawdziwego u żyta ozimego ponieważ charakterystyczne produkty amplifikacji występowały jedynie w grupie genotypów żyta odpornych.

Do identyfikacji genów odporności na rdzę brunatną wykorzystano markery sprzężone z genami odporności opracowane dla żyta oraz sprawdzono przydatność markerów opracowanych dla innych zbóż. Wykorzystano następujące startery stworzone na bazie sekwencji genów związanych z odpornością 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 odporności na rdzę brunatną można wyróżnić te, które pozwoliły na wykazanie obecności genów odporności 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.

GRZEGORZ LEMAŃCZYK**ALEKSANDER ŁUKANOWSKI****ANNA BATURO-CIEŚNIEWSKA**

Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy im. J. J. Śniadeckich w Bydgoszczy

Kierownik Tematu: dr hab. inż. Grzegorz Lemańczyk prof. Uniwersytet Technologiczno-Przyrodniczy,

Pracownia Fitopatologii i Mykologii Molekularnej, ul. Kordeckiego 20, 85-225 Bydgoszcz, tel. 52 3749491,

e-mail: grzegorz.lemanczyk@utp.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.802.10.2018, Zadanie 29.

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***

Słowa kluczowe: *Fusarium langsethiae*, hodowla odpornościowa, owies, postęp hodowlany, real-time PCR, wrażliwość genotypów

ZADANIE NR 29

Przyczyną fuzariozy występującej na wiechach owsa, jak i kłosach innych zbóż, są różne gatunki *Fusarium*. W warunkach Polski oraz innych krajów Europy są to głównie *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. poae* i *F. avenaceum*. Szkodliwość tych grzybów polega nie tylko na zmniejszeniu ilości plonu, ale także na pogorszeniu cech technologicznych ziarna, a zwłaszcza zanieczyszczeniu go mykotoksynami. W ubiegłym dziesięcioleciu w Europie stwierdzono występowanie nowego gatunku tego rodzaju — *Fusarium langsethiae*. Początkowo opisywano go jako prószysta forma gatunku *F. poae* (Torp i Langseth, 1999). Jednak w 2004 r. Torp i Nirenberg prószyste formy *F. poae* sklasyfikowali jako odrębny gatunek — *F. langsethiae*. W Polsce występowanie tego gatunku po raz pierwszy stwierdzono w 2006 r. (Łukanowski i in., 2008; Lemańczyk 2008). Ze względu na to, że brak wyraźnych objawów porażenia przez *F. langsethiae* na wiechach oraz ziarnie owsa identyfikacja obecności tego grzyba jest możliwa tylko

w warunkach laboratoryjnych, w tym 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).

W ramach zadania nr 29 w 2018 roku wykonywano dwa tematy badawcze:

- 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.

TEMAT 1. ANALIZA ODPORNOŚCI OWSA NA PORAŻENIE PRZEZ *F. LANGSETHIAE* PROWADZONA W FORMIE TESTU LIŚCIOWEGO

Celem tematu było poszukiwanie genotypów owsa odpornych lub wykazujących cechy zmniejszonej podatności na porażenie przez izolaty *F. langsethiae* o zróżnicowanej wirulencji. Badania obejmowały 40 genotypów owsa, w tym 6 gatunków. Oprócz owsa zwyczajnego (forma oplewiona i nieoplewiona), przebadano po dwa genotypy *Avena strigosa*, *Avena fatua*, *Avena magna*, *Avena insularis* i *Avena sterilis*. Na przebadane genotypy owsa składało się również 10 odmian, 18 rodów hodowlanych oraz 2 genotypy formy ozimej owsa zwyczajnego. Materiał badawczy pozyskano od firm zajmujących się hodowlą owsa: Danko Hodowla Roślin, Małopolska Hodowla Roślin, Hodowla Roślin Strzelce oraz COBORU SDOO w Chrzęstawie. Do sztucznej inokulacji użyto dwa izolaty *F. langsethiae* pozyskane z ziarna owsa (FL 11H4 i FL 298P5) i jeden z pszenicy ozimej (FL 9P1-7). Ocenę wykonano została zgodnie z metodyką opisaną przez Imathiu i in. (2009).

W przeprowadzonym teście liściowym najsilniejszą wirulencją odznaczał się izolat FL 9P1-7 a najsłabszą izolat FL 11H4. Porażeniu przez *F. langsethiae* uległy wszystkie gatunki owsa. Najdłuższą długość strefy z nekrozą na liściach zanotowano dla formy nieoplewionej *A. sativa* a najkrótszą — dla *A. sterilis*. Długość nekrozy obserwowana dla poszczególnych gatunków była zróżnicowana w zależności od genotypu owsa i izolatu *F. langsethiae* zastosowanego do testowania wrażliwości.

Spośród 18 przebadanych rodów hodowlanych średnio dla trzech izolatów *F. langsethiae* najmniej wrażliwym był ród STH 8.25 i POB 3938/14, a najbardziej wrażliwym — DC10067/10/2/4. Zaobserwowano jednak odmienną wrażliwość rodów na poszczególne izolaty patogena. Najmniej wrażliwym na porażenie przez FL 11H4 był ród DC 10054/8/1/1/1, na FL 298P5 — ród STH 8.30, na FL 9P1-7 — ród STH 8.30. Najbardziej wrażliwymi rodami były odpowiednio DC10061/1/1/2, POB 5710/16 i POB 3938/14.

Spośród 10 odmian owsa najmniej wrażliwą na *F. langsethiae* była odmiana Bingo, a najbardziej wrażliwą — Amant. Najmniej wrażliwą na porażenie przez FL 11H4 była odmiana Bingo i Agent, na izolat FL 298P5 — Bingo, na FL 9P1-7 — Kozak. Najbardziej wrażliwymi odmianami owsa były odpowiednio: Nagus; Armani; Amant.

TEMAT 2. ANALIZA ODPORNOŚCI OWSA NA *F. LANGSETHIAE* NA PODSTAWIE JEGO ANALIZY ILOŚCIOWEJ W ZIARNIE TECHNIKĄ REAL-TIME PCR

Celem tematu było poszukiwanie genotypów owsa odpornych lub wykazujących cechy zmniejszonej podatności na porażenie przez *F. langsethiae* na podstawie jego analizy ilościowej w ziarnie techniką Real-Time PCR. Aby zrealizować ten cel przeprowadzono analizę ilościową zasiedlenia ziarna rodów hodowlanych, odmian uprawnych owsa, gatunków owsa przez tego patogena. Badania wykonano dla ziarna 40 prób genotypów owsa pochodzących z doświadczeń prowadzonych w warunkach naturalnych, oraz 15 genotypów z doświadczenia ze sztuczną inokulacją *F. langsethiae*. Analizę-Real Time PCR przeprowadzono z użyciem specyficznych gatunkowo starterów i barwnika SYBR Green I na termocyklerze LIGHTCycler 480 II firmy Roche.

Wykorzystując technikę Real-Time PCR stwierdzono zróżnicowanie wrażliwości genotypów owsa pozyskanych od firm zajmujących się hodowlą. Najwyższe stężenie DNA *F. langsethiae* odnotowano w próbach pochodzących ze Strzelec, znacznie mniejsze w próbach z Kopaszewa i Polanowic. Średnio największe stężenie DNA *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie rodu hodowlanego POB 3938/14, najmniej w ziarnie rodu DC 18-4.

W ziarnie odmian owsa pozyskanych z doświadczeń prowadzonych przez COBORU najwięcej grzyba stwierdzono w ziarnie pochodzącym z ZDOO Dukla, znacznie mniej z ZDOO Żabnica i SDOO Wróćkowo. Średnio z trzech miejscowości największe stężenie DNA *F. langsethiae* odnotowano w ziarnie odmiany Romulus a najmniejsze w ziarnie odmiany Monsun.

W ziarnie owsa pochodzącego z doświadczenia, w którym prowadzono sztuczną inokulację wiech grzybem *F. langsethiae* średnie stężenie tego patogena wynosiło 12872,94 pg DNA / kg ziarna owsa, natomiast w kombinacjach kontrolnych bez sztucznej inokulacji — 1,44 pg DNA / kg. Najwyższe stężenie *F. langsethiae* stwierdzono w ziarnie odmiany Krezus. Grzyba tego nie stwierdzono w ziarnie rodów hodowlanych DC10067/10/2/4, POB 5547/16, STH 11215 i STH 11315. W kombinacji kontrolnej obecność patogena odnotowano tylko w ziarnie rodów hodowlanych DC 10054/8/1/1/1, POB 3913/14, owsie głuchym i owsie szorstkim.

W wyniku przeprowadzonej izolacji grzybów na pożywce PDA, z ziarna owsa o różnym genotypie, izolaty *F. langsethiae* stanowiły 0,06%. W próbach tych stwierdzono również różne gatunki grzybów rodzaju *Fusarium*, spośród których dominował *F. poae*. Rzadziej izolowano *F. avenaceum*, *F. graminearum*, *F. sporotrichoides*, *F. tricinctum*, *F. culmorum*, *F. equiseti* i *F. crookwellense*. Ziarno owsa najczęściej było zasiedlone przez gatunki saprotroficzne, przede wszystkim *Alternaria alternata*, rzadziej *Epicoccum nigrum* i *Gonatobotrys simplex*.

WNIOSKI

1. Izolaty *Fusarium langsethiae* cechowały się zróżnicowaną wirulencją wobec badanych liści owsa. Najsilniejszą wirulencją odznaczał się izolat z pszenicy — FL 9P1-7, a najsłabszą izolat FL 11H4 (z owsa).
2. 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*.
3. W teście liściowym odnotowano zróżnicowanie w podatności analizowanych rodów hodowlanych owsa na *F. langsethiae*. Najmniejszą wrażliwością odznaczały się rody hodowlane STH 8.25 i POB 3938/14, a najbardziej wrażliwym był ród DC10067/10/2/4.
4. Spośród odmian najmniej wrażliwą na *F. langsethiae* okazała się odmiana Bingo, a najbardziej — Amant.
5. Duża czułość analizy Real-Time PCR na obecność *F. langsethiae* w ziarnie owsa okazała się przydatna w określaniu podatności owsa na porażenie przez tego patogena.
6. Obecności DNA grzyba nie stwierdzono w ziarnie rodów hodowlanych: DC10067/10/2/4, POB 5547/16, STH 11315 i STH 11215. Z przebadanych odmian najmniej grzyba odnotowano w ziarnie odmiany Monsun.
7. Zarówno w teście liściowym jak i analizie Real-Time PCR nie stwierdzono istnienia genotypów owsa całkowicie odpornych na porażenie przez *F. langsethiae*.
8. Genotypy owsa, dla których w zebranych ziarnie nie stwierdzono obecności *F. langsethiae* mogą stanowić podstawę do uzyskania odmian o istotnie ulepszonej odporności.

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.
- Lemańczyk G. 2008. Zasiadlenie ziarna pszenicy ozimej przez grzyby rodzaju *Fusarium* w zależności od zdrowotności podstawy źdźbła, Zesz. Probl. Post. Nauk Roln. 529: 65 — 71.
- 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.

EDYTA PACZOS-GRZEDA¹**SYLWIA SOWA**¹**ANETA KOROLUK**¹**JOANNA TOPOROWSKA**¹**EWELINA MAREK**¹**PIOTR BEDNAREK**²¹ Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: dr Edyta Paczos-Grzęda Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin ul. Akademicka 15, 20-934 Lublin, (81) 4456884,

e-mail: edyta.paczos@up.lublin.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.802.9.2018, Zadanie 30.

Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego

Linkage and association mapping of oat

Słowa kluczowe: identyfikacja QTL, mapowanie asocjacyjne, mapowanie sprzężeniowe, mieszańce międzygatunkowe, mieszańce międzyodmianowe

Owies zwyczajny (*Avena sativa* L.) jest trudnym obiektem badawczym zarówno w klasycznych analizach genetycznych, jak i badaniach molekularnych, z uwagi na skomplikowaną strukturę genomową. Rozwój badań nad owsem w dużej mierze jest limitowany brakiem konsensusowej mapy genetycznej opracowanej w oparciu o ogólnie dostępne markery molekularne. Pierwszym etapem uzyskania tego typu mapy jest wyprowadzenie wielu biparentalnych populacji mapujących doprowadzonych do zaawansowanych linii wsobnych. Szczegółowe mapy konsensusowe umożliwiają typowanie markerów genetycznych sprzężonych z cechami użytkowymi efektywnych na szerokiej puli genetycznej. Inną metodą poszukiwania markerów jest mapowanie asocjacyjne (Brachi i in., 2010). Polega ono na określeniu powiązania markerów genetycznych z cechami morfologicznymi, fizjologicznymi czy biochemicznymi przy zastosowaniu odpowiednich modeli statystycznych (Rex, 2013). Dzięki takiemu podejściu możliwa staje się identyfikacja markerów asocjowanych z QTL cech wielogenowych.

Do mapowania asocjacyjnego wykorzystuje się niespokrewnione i zróżnicowane pod względem badanych cech odmiany i homozygotyczne linie, które poddaje się szczegółowemu fenotypowaniu i precyzyjnemu genotypowaniu. Do profilowania DNA wykorzystywane są metody skanujące dużą część genomu np. GBS (Huang i in., 2014), DArTseq czy DArT (Elshire i in., 2011; Sansaloni i in., 2011; Kilian i Graner, 2012).

Celem zadania było wyprowadzanie nowych populacji mapujących, kontynuowanie rozmnożeń materiałów przeznaczonych do uzyskania zaawansowanych międzyodmianowych i międzygatunkowych rekombinacyjnych linii wsobnych, identyfikacja QTLi dla wybranych cech w populacji mapującej RIL E56 wyprowadzonej w oparciu o krzyżowanie biparentalne *A. fatua* 216 × *A. sativa* ‘Sam’, identyfikacja sekwencji DArTseq różnicujących osypujące i nieosypujące linie populacji E56, analiza asocjacyjna MTZ linii i odmian *A. sativa*, jak również identyfikacja i testowanie potencjalnych markerów asocjowanych z wysokością roślin.

W ramach projektu wyprowadzono kolejne międzyodmianowe populacje mapujące oraz międzygatunkowe populacje *A. fatua* × *A. sterilis* oraz *A. sterilis* × *A. fatua*. Otrzymano cztery nowe kombinacje mieszańcowe z genami karłowatości *Dw*: ‘Palestine Dwarf’ × ‘Bingo’ oraz ‘Palestine Dwarf’ × ‘North Caroline’. Średnia efektywność wszystkich przeprowadzonych krzyżowań wyniosła 9,54%. Kontynuowano rozmnożenia dotychczas wyprowadzonych międzyodmianowych i międzygatunkowych populacji reprezentujących pokolenia F₁ – F₈.

Przeprowadzono fenotypowanie międzygatunkowej populacji mapującej RIL F₈ E56 *A. fatua* 216 × *A. sativa* ‘Sam’. Analizowano wysokość, liczbę pędów produkcyjnych i niedogonów, długość wiechy, liczbę kłosek, podatność na osypywanie i obecność ości. Dokonano oceny 10 roślin z każdej linii RIL. W sumie ocenie poddano 150 linii oraz po 30 roślin rodzicielskich. Linie RIL F₈ E56 charakteryzowały się wysoką zmiennością pod względem badanych cech, ponadto u mieszańców obserwować można było przekroczenie wartości cech rodzicielskich i tego typu sytuację odnotowano w przypadku wysokości, liczby pędów produkcyjnych, długości wiechy i liczby kłosek w wieszce. W porównaniu z formami rodzicielskimi wysokość roślin była bardziej zbliżona do *A. fatua*, aniżeli do *A. sativa*. Pomimo dużej liczby kłosek u *A. sativa*, średnia ilość formowanych kłosek w wieszce u mieszańców wyniosła zaledwie 49,2 i była niższa aniżeli średnia wartość tej cechy u *A. fatua* (52,4), przy czym w wiechach poszczególnych linii RIL stwierdzono występowanie od 18,8 do 133,4 kłosek. Określając rozkład wartości cechy w populacji stwierdzono, że tylko wysokość roślin i długość wiechy są dopasowane do rozkładu normalnego. Analiza korelacji cech wykazała, że długość wiechy jest pozytywnie skorelowana z wysokością oraz z liczbą kłosek. Dodatnią korelację stwierdzono również pomiędzy osypywaniem, a liczbą ości.

Fenotypowaniu poddano również rekombinacyjne linie wsobne międzyodmianowej populacji mapującej F₈ E101 (Bingo × STH 9787) oraz formy rodzicielskie tej populacji. Wysokość linii wahała się średnio od 53,6 cm do 129,2 cm, przy czym średnia wysokość dla populacji wyniosła 89,2 cm. Średnia długość wiechy wśród linii RIL (20,1 cm) była większa, aniżeli stwierdzona u obu form rodzicielskich, ponadto zróżnicowanie wśród linii było bardzo duże i długość wiechy wahała się od zaledwie 12,3 do 27,7 cm. Pomimo

dużej liczby kłosek formowanych w linii ojcowskiej STH 9787, średnia ilość kłosek w wiesze u mieszańców wyniosła zaledwie 52,2, przy czym w wiechach stwierdzono występowanie od 31,0 do 101,3 kłosek. Masa ziarniaków z wiechy u mieszańców była wyższa, aniżeli u obu form rodzicielskich. Określając rozkład wartości cechy w populacji stwierdzono, że tylko w przypadku długości wiechy jest on dopasowany do rozkładu normalnego, podczas gdy pozostałe cechy nie wykazują takiego dopasowania. Analiza korelacji cech wykazała, że wysokość jest pozytywnie skorelowana z długością wiechy i masą ziarniaków. Pozytywną korelację zaobserwowano również pomiędzy liczbą kłosek a liczbą i masą ziarniaków oraz pomiędzy liczbą a masą ziarniaków.

Genotypowaniu metodą DArTseq poddano 120 linii reprezentujących populację mapującą F_2 E822 (*A. sterilis* 172a \times *A. sativa*), 150 linii RIL E101 (*A. sativa* STH9787 \times *A. sativa* 'Bingo') oraz formy rodzicielskie. Dane uzyskane dla populacji E822 posłużyły do weryfikacji markerów dla cech związanych z udomowieniem owsa uzyskanych w oparciu o analizy genetyczne populacji E52 i E56.

Celem tematu była również identyfikacja QTLi dla wybranych cech w oparciu o populację mapującą F_8 E56 (*A. fatua* 216 \times *A. sativa* 'Sam'). Dla osypywania w populacji E56 zidentyfikowano tylko jeden bardzo silny QTL. Wartość LOD dla tego QTL wynosiła 67,7, zaś odziedziczalność 63,7%. W przypadku wysokości zidentyfikowano 8 QTLi w obrębie 6 grup sprzężeń.

Z wykorzystaniem danych fenotypowych 370 odmian i linii przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego oraz danych genotypowych uzyskanych metodą DArTseq przeprowadzono analizę asocjacyjną dla masy tysiąca ziarniaków z zastosowaniem metod GLM (general linear model — ogólny model liniowy) oraz MLM (mixed linear model — wielokrotny model liniowy). Umożliwiła ona identyfikację 2 markerów silicoDArT oraz 4 markerów DArTseq, które asocjowały z masą tysiąca ziarniaków określoną na podstawie wyników uzyskanych w trzech latach badań (4 powtórzeniach). W przypadku 48 markerów stwierdzono asocjację z masą tysiąca ziarniaków w trzech spośród czterech niezależnych analiz.

Wykorzystując zidentyfikowane w roku poprzednim sekwencje zasocjowane z wysokością roślin do wybranych z nich zaprojektowano markery specyficzne. Reakcje PCR przeprowadzono dla odmian i linii o skrajnych fenotypach. Najlepsze dopasowanie segregacji markera asocjowanego z wysokością roślin do fenotypu uzyskano dla dwóch par starterów.

Zidentyfikowane w roku poprzednim markery SRAP sprzężone z karłowatością warunkowaną genem *Dw7* poddano klonowaniu i konwersji do warunków specyficznego PCR. W oparciu o wyniki przeprowadzonych badań do identyfikacji recesywnego allelu genu karłowatości *dw7* wytypowano kombinację specyficznych starterów.

W kolejnym etapie prowadzonych analiz zidentyfikowano sekwencje DArTseq różnicujące osypujące i nieosypujące linie populacji E56. Zidentyfikowano 16 takich sekwencji, a analiza BLAST wykazała ich wysokie podobieństwo do znanych genów w innych gatunkach traw, szczególnie biorących udział w kondensacji długołańcuchowych kwasów tłuszczowych.

WNIOSKI

1. Fenotypowanie międzygatunkowej populacji mapującej RIL F₈ E56 *A. fatua* 216 × *A. sativa* ‘Sam’ oraz międzyodmianowej populacji mapującej RIL F8 E101 (Bingo × STH 9787) wykazało wysokie zróżnicowanie analizowanych cech.
2. W oparciu o dane fenotypowe i genotypowe dla populacji mapującej F8 E56 *A. fatua* 216 × *A. sativa* ‘Sam’ zidentyfikowano jeden bardzo silny QTL dla osypywania ziarniaków oraz 8 QTLi wysokości roślin.
3. Analiza asocjacyjna umożliwiła identyfikację 2 silnie zasocjowanych z MTZ markerów *silicoDArT* oraz 4 *DArTseq*.
4. Opracowano dwa markery specyficzne w oparciu o sekwencje *silicoDArT* i *DArTseq* zasocjowane z wysokością roślin.
5. Wytypowano kombinację specyficznych starterów umożliwiającą identyfikację recesywnego allelu genu karłowatości *dw7*.
6. Zidentyfikowano sekwencje *DArTseq* różnicujące osypujące i nieosypujące linie populacji E56.

LITERATURA

- Brachi B., Faure N., Horton M., Flahauw E., Vazquez A., Nordborg M., Bergelson J., Cuguen J., Roux F. 2010. Linkage and Association Mapping of *Arabidopsis thaliana* Flowering Time in Nature. *PLoS Genet* 6 (5): e1000940.
- Elshire R. J., Glaubitz J. C., Sun Q., Poland J. A., Kawamoto K., Buckler E. S., Mitchell S. E. 2011 A Robust, Simple Genotyping-by-Sequencing (GBS) Approach for High Diversity Species. *PLoS One* 6 (5): e19379.
- Huang Y. F., Poland J. A., Wight C. P., Jackson E. W., Tinker N. A. 2014. Using Genotyping By Sequencing (GBS) for genomic discovery in cultivated oat. *PLoS ONE* 9 (7): e102448. DOI: 10.1371/journal.pone.0102448.
- Kilian B., Graner A. 2012. NGS technologies for analyzing germplasm diversity in genebanks, Briefings in functional genomics. Vol.11, No 1: 38 — 50.
- Rex B. 2013. Genomewide Markers for Controlling Background Variation in Association Mapping. *Plant Gen.* 10.3835/plantgenome2012.11.0028.
- Sansaloni C., Petroli C., Jaccoud D., Carling J., Detering F., Grattapaglia D., Kilian A. 2011. Diversity Array Technology (DArT) and next-generation sequencing combined: genome-wide, high throughput, highly informative genotyping for molecular breeding of Eucalyptus. *BMC Proceedings* 5 (Suppl. 7): P54.

EDYTA PACZOS-GRZĘDA

SYLWIA SOWA

ANETA KOROLUK

JOANNA TOPOROWSKA

EWELINA MAREK

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

Kierownik Tematu: dr Edyta Paczos-Grzęda Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie Instytut Genetyki,

Hodowli i Biotechnologii Roślin ul. Akademicka 15, 20-934 Lublin, (81) 4456884,

e-mail: edyta.paczos@up.lublin.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.802.9.2018, Zadanie 31.

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

Słowa kluczowe: geny odporności, markery molekularne, owies zwyczajny, piramidyzacja genów, *Puccinia coronata*, rdza koronowa

Rdza koronowa, jest jedną z najpowszechniej występujących chorób grzybowych owsa. Straty plonu wywołane porażeniem mogą sięgać nawet 50% (Martinelli i in., 1994). Czynnikiem infekcyjnym jest grzyb *Puccinia coronata* Cda. f.sp. *avenae* P. Syd. & Syd., który poraża głównie liście. Rozwojowi choroby sprzyjają wysoka temperatura, zwiększona wilgotność powietrza oraz nadmierne nawożenie azotowe (Simons, 1985). Szczególnie silne porażenie dotyczy odmian późnych i częściej ma miejsce przy opóźnionych siewach. Naturalna odporność roślin owsa warunkowana jest genami *Pc*. Monitorowanie zmian w populacji patogenu oraz sukcesywne prace nad określeniem efektywnych na obszarze Polski genów odporności na rdzę koronową umożliwiają naturalne jego zwalczanie poprzez wprowadzanie genów odporności do nowych odmian i eliminują konieczność stosowania fungicydów, co jest korzystne ze względów ekonomicznych i sprzyja ochronie środowiska naturalnego. Dotychczas w owsie

zidentyfikowano i opisano ponad 100 genów odporności na *Puccinia coronata* (Chong i Kolmer, 1993). Niektóre z tych genów zostały już przełamane, jednakże po piramidyzacji mogą one nadal kształtować wysoką odporność. Nieliczne z genów zostały zmapowane, dla niektórych opracowano również markery sprzężone z tymi genami (Gnanesh i in., 2014). Niestety ich wykorzystanie jest ograniczone z uwagi na dominującą naturę tych markerów (RAPD, AFLP i DArT) oraz brak możliwości konwersji w markery najnowszej generacji zapewniające wysoką przepustowość selekcji opartej na genotypie (Gnanesh i in., 2013). Niezmiernie istotne jest, aby dla poszczególnych genów *Pc* zidentyfikować i opracować silnie sprzężone markery molekularne, które umożliwiłyby monitorowanie przepływu genów i kumulację pożądaných alleli w mieszańcach.

Celem zadania było określenie patogeniczności izolatów *Puccinia coronata* zebranych w roku 2017, poszukiwanie markerów dla genu odporności *Pc51* metodą SRAP, próba konwersji markerów losowych SRAP dla genu *Pc60* na markery specyficzne, identyfikacja sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genu *Pc60*, próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genów *Pc52* oraz *Pc60* zidentyfikowanych na podstawie całogenomowych analiz polimorfizmu.

W zadaniu określono patogeniczność izolatów *Puccinia coronata* wyprowadzonych z populacji skolekcjonowanych w roku 2017 w Czesławicach, Kopaszewie, Polanowicach i Strzelcach względem zestawu 45 linii referencyjnych. Najsilniejsze izolaty, podobnie jak w latach poprzednich, wyprowadzono z populacji skolekcjonowanych w Polanowicach i Czesławicach. Pełną odporność w stadium siewki warunkowały geny *Pc50K*, *Pc51K*, *Pc51U*, *Pc52*, *Pc57*, *Pc59U*, *Pc68*, *Pc71* oraz *Pc91*, które nie zostały przełamane przez żaden z testowanych izolatów. W roku 2018 najsilniejsze porażenie grzybem *P. coronata* na poziomie ok. 80% w warunkach naturalnej infekcji polowej zaobserwowano w Strzelcach i Czesławicach. Pełną odporność w warunkach naturalnej infekcji polowej, w stadium rośliny dorosłej, nadawały geny *Pc51U*, *Pc52*, *Pc58U*, *Pc59K*, *Pc91* oraz *Pc94*. W przypadku genów *Pc52* oraz *Pc91* był to kolejny rok pełnej skuteczności tych genów na różnych etapach rozwoju rośliny oraz w różnych warunkach infekcji.

W ramach zadania przeprowadzono krzyżowania mające na celu uzyskanie mieszańców pomiędzy formami ze zdefiniowanymi genami odporności. W efekcie krzyżowań uzyskano kolejne mieszańce odporne na rdzę koronową posiadające kombinację genów *Pc39* i *Pc52* z czterema innymi genami: *Pc51U*, *Pc60*, *Pc70* i *Pc91*. Ocena cech plonotwórczych mieszańców dwugenowych pokolenia F₁ (*Pc39* z czterema innymi genami: *Pc51*, *Pc52*, *Pc60* oraz *Pc70*) wskazuje na możliwość selekcji wśród nich form o korzystnym układzie alleli wpływających na cechy agronomiczne.

Przeprowadzono ocenę segregacji genów odporności w 4 populacjach mieszańców F₂ z genami *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* i *Pc59U*. Wytypowano izolaty umożliwiające identyfikację tych genów w kolejnych pokoleniach mieszańców. Przeprowadzone obserwacje polowe porażenia wyżej wymienionych mieszańców umożliwiły identyfikację form odpornych i porażonych w tych populacjach w warunkach naturalnej infekcji

w stadium rośliny dorosłej, co umożliwi wytypowanie korespondującego izolatu do przeprowadzenia analiz w stadium siewki.

Zidentyfikowane na podstawie testów żywiciel-patogen homozygoty w populacji E635 (*Pc51U* × Kasztan) wykorzystano do poszukiwania markerów molekularnych dla genu odporności *Pc51U* metodą BSA. Przetestowano 500 kombinacji starterów SRAP, spośród których wstępnie wyselekcjonowano 27 inicjujących na próbach zbiorczych o przeciwstawnych fenotypach (odpornych/porażonych) syntezę produktów różnicujących. Amplifikacja z wytypowanymi starterami z wykorzystaniem jako matrycy DNA pojedynczych roślin nie potwierdziła specyficzności amplifikowanych z ich udziałem produktów względem określonego fenotypu warunkowanego allelem *Pc51* lub *pc51*.

Konwersji na markery specyficzne dla genu *Pc60* poddano 12 potencjalnych markerów SRAP zidentyfikowanych w roku poprzednim, spośród których tylko dwa identyfikowały rośliny odporne i porażone w populacji E660 segregującej pod względem odporności warunkowanej tym genem. Przeprowadzono identyfikację sekwencji DArTseq, których segregacja zgodna była z obecnością allelu dominującego genu *Pc60*. Do analiz wstępnie wytypowano 21 sekwencji. Konwersję przeprowadzono dla 5 sekwencji *silico*DArT specyficznych dla genu *Pc60* oraz dla 5 sekwencji wytypowanych w roku ubiegłym dla genu *Pc52*. Żadna z konwertowanych sekwencji zarówno w przypadku genu *Pc52*, jak i *Pc60* nie segregowała zgodnie z fenotypem badanych roślin.

WNIOSKI

1. Najsilniejsze izolaty *Puccinia coronata* wyprowadzono z populacji skolekcjonowanych w roku 2017 w Polanowicach i Czesławicach.
2. W roku 2018 najsilniejsze porażenie grzybem *P. coronata* w warunkach naturalnej infekcji polowej zaobserwowano w Strzelcach i Czesławicach.
3. Najbardziej efektywne w warunkach Polski w latach 2017–2018 były geny *Pc52* oraz *Pc91*.
4. Nie zidentyfikowano markerów SRAP specyficznych względem alleli *Pc51* lub *pc51*.
5. Skutecznej konwersji na markery specyficzne dla allelu dominującego genu *Pc60* poddano 2 markery zidentyfikowane metodą SRAP.
6. Żadna z konwertowanych w markery STS sekwencji *silico*DArT specyficznych dla genów *Pc52* oraz *Pc60* nie segregowała zgodnie z fenotypem badanych roślin.

LITERATURA

- Chong J., Kolmer J. A. 1993. Virulence dynamics and phenotypic diversity of *Puccinia coronata* f. sp. *avenae* in Canada from 1974 to 1990. *Can. J. Bot.* 71: 248 — 255.
- Gnanesh B. N., Mitchell Fetch J., Menzies J. G., Beattie A. D., Eckstein P. E., McCartney C. A. 2013. Chromosome location and allele-specific PCR markers for marker-assisted selection of the oat crown rust resistance gene *Pc91*. *Mol. Breed.* 32 (3): 679 — 686.
- Gnanesh B. N., Mitchell Fetch J., Zegeye T., McCartney C., Fetch T. 2014. Oat. In: Pratap A., Kumar J. (eds) *Alien Gene Transfer in Crop Plants*, vol. 2. Springer New York: 51 — 73.

- Martinelli J. A., Federizzi L. C., Bennedetti A. C. 1994. Yield reductions of oat grains due leaf rust severity. *Summa Phytopathologica* 20: 116 — 118.
- Simons M. D. 1985. Crown rust. In: *The Cereal Rusts: Vol. II. Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control*. Ed by: Roelfs A. P., Bushnell W. R. Academic Press, Orlando, FL: 131 — 172.

DANUTA BOROS**DAMIAN GOŁĘBIEWSKI**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Samodzielna Pracownia Oceny Jakości Produktów Roślinnych

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Danuta Boros Samodzielna Pracownia Oceny Jakości Produktów Roślinnych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, tel. +48 (22) 7334547, e-mail: d.boros@ihar.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.802.19.2018 Zadanie 32.

Badanie składników determinujących wartość odżywczą i funkcjonalną owsa oraz ich relacji w ziarnie obłuszczonej i oplewionym

Components determining the nutritive and functional values of oat and its relation between hulled and dehulled grains

Słowa kluczowe: metody selekcji, owies, wartości prozdrowotne, wartość żywieniowa, zmienność genotypowa

CEL BADAŃ

Celem badań prowadzonych w latach 2014–2018 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. W ramach zadania opracowano również warunki pomiaru lepkości, jako prostego testu przesiewowego do zastosowania w pracach hodowlanych nad tworzeniem genotypów owsa o wysokiej wartości prozdrowotnej bądź paszowej.

WYNIKI

W okresie pięciu lat badań analizowano ogółem 203 próbki owsa, w formie oplewionej i po ich obłuszczeniu. Stwierdzono małe zróżnicowanie zawartości składników odżywczych ogółem w ziarnie oplewionym badanych odmian i linii owsa, zmienność tej cechy była na poziomie 5,2%, a średnia zawartość wynosiła 64% (tab. 1).

Tabela 1

Zmienność zawartości składników odżywczych w ziarnie owsa oplewionym i obluszczonym ze zbioru w latach 2013–2017 (% s.m.)

	Białko	Składniki mineralne	Lipidy	Skrobia	Cukry wolne	SSO
Ziarno oplewione						
Wartość średnia	11,4	2,7	5,6	42,4	1,5	63,7
<i>sd</i>	1,7	0,3	0,7	3,2	0,2	3,3
CV	14,9	11,1	12,8	7,5	16,1	5,2
min.	6,6	2,1	4,3	30,6	1,0	54,7
max.	17,1	3,4	7,6	48,9	2,2	72,0
Ziarno obluszczone						
Wartość średnia	14,8	2,2	7,6	56,1	1,7	82,0
<i>sd</i>	1,9	0,1	1,4	2,9	0,2	2,4
CV	13,1	5,9	18,2	5,2	14,6	2,9
min.	10,3	1,8	5,1	45,1	1,1	73,9
max.	19,4	2,5	11,8	61,4	2,8	87,6

Największym zróżnicowaniem charakteryzowała się zawartość cukrów wolnych (16,1%), następnie białka (14,9%), lipidów (12,8%) oraz popiołu (11,1%), a w najmniejszym stopniu skrobi (7,5%). Zawartość trzech ostatnich składników odżywczych określono jako stabilną w warunkach uzyskania ziarna, a zmienność wartości tych parametrów była wynikiem w głównej mierze zmienności genetycznej. Owies charakteryzował się dużą zawartością błonnika pokarmowego (TDF), średnio w ziarnie było 32,3%, przy zmienności około 10% (tab. 2).

Tabela 2

Zmienność zawartości składników bioaktywnych w ziarnie owsa oplewionym i obluszczonym ze zbioru w latach 2013–2017 (% s.m.)

	I-NSP	S-NSP	T-NSP	Lignina Klasona	TDF	β-głukan	I-AX	S-AX	AX
Ziarno oplewione									
Wartość średnia	18,5	3,5	22,1	10,3	32,3	3,1	8,9	0,3	9,1
<i>sd</i>	2,5	0,5	2,5	1,3	3,2	0,4	1,2	0,0	1,2
CV	13,5	13,2	11,1	12,9	9,8	13,2	13,5	15,0	13,1
min.	12,6	2,5	16,4	6,6	24,1	2,3	5,7	0,2	6,0
max.	25,0	4,8	28,5	14,5	41,0	4,6	12,0	0,5	12,3
Ziarno obluszczone									
Wartość średnia	4,1	4,7	8,8	4,0	12,7	4,1	2,0	0,3	2,3
<i>sd</i>	0,5	0,5	0,8	1,3	1,8	0,5	0,2	0,0	0,2
CV	11,6	11,8	9,1	31,8	13,9	11,7	11,5	11,4	10,3
min.	2,3	3,3	6,1	1,2	8,3	2,9	1,1	0,2	1,3
max.	5,2	6,2	10,7	7,3	16,9	5,9	2,6	0,4	2,9

Wśród składników błonnika pokarmowego największy w nim udział stanowiła frakcja nierozpuszczalna nieskrobiowych polisacharydów (NSP) (57%) oraz lignina (32%). β-głukan, składnik w największym stopniu odpowiedzialny za prozdrowotne właściwości owsa, stanowił blisko 10% TDF z zawartością średnio 3,1% i zmiennością 13%. Plewka stanowiła średnio około 26% masy ziarniaka, a jej udział wpływał istotnie na zawartość składników odżywczych i bioaktywnych w ziarnie owsa, w każdym roku badań. Ze wzrostem jej udziału malała ilość białka, skrobi i lipidów, a także rozpuszczalnych

składników NSP. Wzrastała natomiast zawartość frakcji nierozpuszczalnej NSP i ligniny, a przez to TDF.

WNIOSKI

1. Usunięcie plewki miało wpływ na zwiększenie zawartości tych składników, które są zlokalizowane w endospermie oraz zarodku ziarna owsa. W takim ziarnie zawartość składników odżywczych zwiększyła się średnio o 29%. Zmniejszyła się zawartość nierozpuszczalnej frakcji NSP (78%), a w następstwie zawartość TDF, do poziomu około 13%. Spośród składników błonnika pokarmowego w ziarnie obłuszczonego zwiększyła się jedynie zawartość frakcji rozpuszczalnej NSP (o 32%), a w szczególności β -glukanu (o 30%).
2. Na podstawie wyników pięcioletnich badań obliczono współczynniki korelacji Pearsona i regresji liniowej pomiędzy ziarnem oplewionym i po jego obłuszczeniu w odniesieniu do każdego oznaczanego składnika. Największym odwzorowaniem z wykorzystaniem współczynników regresji liniowej charakteryzują się: zawartość białka, lipidów i MTZ.
3. W pracach metodycznych nad udoskonaleniem testu lepkości ziarna obłuszczonego i oplewionego przeznaczonego odpowiednio do produkcji żywności bądź na paszę wyznaczono najbardziej odpowiednie dla ziarna owsa warunki ekstrakcji oraz wskazano czynniki w największym stopniu wpływające na lepkość.

SYLWIA OKOŃ

TOMASZ OCIEPA

ALEKSANDRA NUCIA

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

Kierownik Tematu: dr hab. Sylwia Okoń prof. Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie, Instytut Genetyki,

Hodowli i Biotechnologii Roślin, ul. Akademicka 15, 20-950 Lublin, tel. 81 445 69 20,

e-mail: sylwia.okon@up.lublin.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.802.9.2018, Zadanie 91.

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 oats and the pyramidization of effective resistance genes
in the oat genome**

Słowa kluczowe: *B. graminis* f.sp. *avenae*, efektywność genów, markery molekularne, odporność, owies

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 (Aung i in., 1997; Clifford, 1995; Hsam i in., 1997; Banyal i in., 2016; Xue i in., 2017). Ograniczenie strat powodowanych występowaniem mączniaka prawdziwego można osiągnąć między innymi przez wprowadzenie do uprawy odmian efektywnymi genami odporności (Feuillet i 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 celem badań realizowanych w 2018 roku w ramach zadania 91 była analiza efektywności opisanych do tej pory genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie oraz ich piramidyzacja. Celem projektu była również próba opracowania markerów molekularnych dla najbardziej efektywnych genów odporności na mączniaka prawdziwego w owsie.

Uzyskane wyniki potwierdziły, że najbardziej efektywne są obecnie geny *Pm4* i *Pm7*. Niski poziom wirulencji patogenu zanotowano również względem genu *Pm5*. W związku z tym, linie zawierające te geny wykorzystano w procesie krzyżowania, w którym uzyskano szereg odpornych mieszańców. W 2018 roku przeprowadzono również próbę konwersji markerów losowych typu RAPD, SRAP i DArT w markery specyficzne oparte na PCR. Przedmiotem konwersji były zidentyfikowane w poprzednich latach markery specyficzne dla pul roślin odpornych i wrażliwych w populacjach *Pm4* × Fuchs, *Pm7* × Fuchs i Canyon × Fuchs.

W wyniku przeprowadzonych analiz zidentyfikowano i przekonwertowano jeden marker specyficzny dla homozygotycznych osobników z genem *Pm4* w populacji Av1860 × Fuchs (Okoń i in., 2018). Zidentyfikowano również produkty specyficzne dla genu *Pm7*, jednakże próba ich konwersji nie przyniosła oczekiwanych rezultatów. Dla populacji Canyon × Fuchs zidentyfikowano tylko jeden produkt specyficznych dla pul roślin odpornych, co może wskazywać na konieczność zastosowania większej liczby starterów lub innych metod losowych do poszukiwania markerów specyficznych dla tego źródła odporności.

LITERATURA

- Aung T., Thomas H., Jones T. 1977. The transfer of the gene for mildew resistance from *Avena barbata* (4x) into the cultivated oat *A. sativa* by an induced translocation. *Euphytica* 26: 623 — 632.
- Banyal D. K., Sood V. K., Singh A., Mawar R. 2016. Integrated management of oat diseases in north-western Himalaya. *Range Management and Agroforestry* 37 (1): 84 — 87.
- Clifford B. C. 1995. Diseases, pest and disorders of oat. In: R. W. Welch (Ed), *The Oat Crop*, Chapman & Hall, London: 252 — 278.
- Feuillet C., Keller B. 1998. Molecular aspects of biotic stress resistance in wheat. *Proc. 9th Int. Wheat Genet. Symp.*, Saskatoon, Saskatchewan, Canada, Oral Presentations. 1: 171 — 177.
- Hsam S. L. K., Peters N., Paderina E. V., Felsenstein F., Oppitz K., Zeller F. J. 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.
- 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.
- Pietrusińska A., Czembor J. H. 2015. Gene pyramiding — a tool commonly used in breeding programs breeding programs. *Biul. IHAR* 278: 3 — 16.
- Xue L. H., Li, C. J., Zhao G. Q. 2017. First Report of Powdery Mildew Caused by *Blumeria graminis* *Avena sativa* in China. *Plant Disease* 101, 11: 1954.

MARCIN WIT¹
PIOTR OCHODZKI²
ROMAN WARZECHA²
ADA ZAWADZKA²
MONIKA ŻUREK²
EWA MIRZWA-MRÓZ¹
EMILIA JABŁOŃSKA¹
DOROTA BYLICKA¹
JÓZEF ADAMCZYK³
ANNA ROGACKA³
JANUSZ ROGACKI³
KRZYSZTOF WÓJCIK⁴
WOJCIECH WAKULIŃSKI¹

¹ Samodzielny Zakład Fitopatologii, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie

³ Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Smolice 146, 63-740 Kobylin

⁴ Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Stacja Hodowli Roślin Koberzyce, ul. Sportowa 21, 55-040 Koberzyce

Kierownik Tematu: dr Marcin Wit Samodzielny Zakład Fitopatologii, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, tel. 22 5932034; e-mail: marcin_wit@sggw.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.802.17.2018, Zadanie nr 92.

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**

Słowa kluczowe: amylose content, *Fusarium temperatum*, mycotoxins, *Zea mays*

Fuzarioza kolb kukurydzy jest uważana za jeden z najważniejszych problemów w uprawie tej rośliny. Szkodliwość choroby polega na znaczącym spadku plonu,

uzyskiwaniu ziarna gorszej jakości oraz jego zanieczyszczeniem metabolitami wtórnymi *Fusarium* spp. Jest to choroba o złożonej etiologii, a wśród czynników sprawczych wymienia się między innymi: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans* i *Fusarium proliferatum*. O ile ocena znaczenia wymienionych gatunków była przedmiotem licznych analiz i opracowań, o tyle wiedza na temat porażenia kukurydzy (odmian, linii hodowlanych) przez *Fusarium temperatum* jest fragmentaryczna (Gromadzka i in., 2017; Scauflaire i in., 2011).

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*. Wiarygodność diagnostyki była potwierdzana molekularnie. Analiza molekularna opierała się na sekwencjonowaniu *EF-1 α* oraz *β -tubuliny* uznawanych za podstawowe markery barkodingu.

Celem badań w 2018 r. była:

- ocena podatności linii hodowlanych *Zea mays* na porażenie przez *Fusarium temperatum*,
- analiza profilu metabolitów wtórnych występujących w materiale roślinnym porażonym przez *Fusarium temperatum*,
- analiza populacji *Fusarium temperatum* w zakresie cech istotnych w patogenezie i epidemiologii fuzariozy kolb kukurydzy.

WYNIKI BADAŃ

W badanej populacji izolatów *F. temperatum* frekwencja występowania dopełniających typów kojarzeniowych MAT1-1 i MAT1-2 wyniosła odpowiednio 35 do 35.

Ocenę patogeniczności przeprowadzono dla 70 izolatów *F. temperatum* w warunkach szklarniowych. Stwierdzono istotne zróżnicowanie tej cechy w obrębie badanej populacji patogenów. Izolatami dającymi najbardziej rozległe zmiany na pędach inokulowanych roślin były izolaty: Pft-349, Pft-362, Pft-363, Pft-352 oraz Pft-322. Stanowiły one podstawę do badań podatności genotypów kukurydzy przez *F. temperatum*.

W 2018 r. porażenie kolb badanych 120 genotypów kukurydzy oceniane w dwóch lokalizacjach (Hodowla Roślin Smolice i IHAR — PIB Radzików oraz Małopolska Hodowla Roślin Oddział w Kobierzycach oraz IHAR — PIB Radzików) było na poziomie średnim. Zakres zmienności analizowanej cechy wahał się od 0,54 (dla genotypu S-20) do 2,88 w przypadku genotypu o numerze kodowym K-47.

Średni stopień porażenia materiałów pochodzących z hodowli MHR Kobierzyce (1,56) i HRS Smolice (1,39) różnił się znacznie i różnica ta przy $\alpha = 0,05$ była statystycznie istotna ($F = 51,44$ $p = 0,0000$).

Formy flint pochodzące z hodowli MHR Kobierzyce były porażone w zakresie od 0,80 do 2,28, natomiast dent od 0,85 do 2,88. Formy flint pochodzące z hodowli HRS Smolice były porażone w zakresie 0,54 do 2,35, natomiast dent od 1,03 do 2,03.

Stopień porażenia pochodzących z hodowli A (Smolice i Radzików) i B (Kobierzycy i Radzików) różnił się nieznacznie, lecz różnica ta była istotna statystycznie. W przypadku materiału roślinnego pochodzącego z hodowli A i B średni stopień porażenia kolb wynosił odpowiednio 1,39 i 1,56 ($F = 51,44$ $p = 0,0000$).

W przypadku materiałów pochodzących z hodowli HRS Smolice, testowanych w Smolicach i Radzikowie (hodowla A) zmienność porażenia kolb badanych genotypów wahała się od 0,54 dla genotypu o numerze kodowym S-20 do 2,35 dla genotypu o numerze S-30. Formy flint pochodzące z tej hodowli były porażone w zakresie od 0,54 do 2,35, natomiast dent od 1,03 do 2,03.

Zakres zmienności badanej cechy dla materiałów pochodzących z hodowli MHR Kobierzycy, testowanych w Kobierzycach i Radzikowie (hodowla B) wahał się od wartości 0,80 dla genotypu o numerze kodowym K-26 do 2,88 dla genotypu K-47. Formy flint pochodzące z tej hodowli były porażone w zakresie 0,80 do 2,28, natomiast dent od 0,85 do 2,88.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji, z ryzykiem błędu $\alpha = 0,05$ stwierdzono istotny wpływ warunków środowiska na stopień porażenia badanych genotypów kukurydzy ($F = 40,41$ $p = 0,000$). Średni stopień porażenia materiałów badanych w Radzikowie wynosił 1,38 i był istotnie mniejszy niż w Smolicach (1,51) i Kobierzycach (1,64).

Na podkreślenie zasługuje stwierdzenie mniejszej podatności na porażenie form flint niż dent. Stopień porażenia roślin wynosił odpowiednio 1,38 i 1,57. Zależność taką obserwowano w przypadku trzech lokalizacji doświadczenia, tj. Smolice i Radzików. Porażenie form dent i flint wynosiło odpowiednio:

- w Smolicach 1,58 i 1,43 ($F = 9,70$ $p = 0,0018$),
- w Radzikowie 1,45 i 1,30 ($F = 20,90$ $p = 0,0000$),
- w Kobierzycach 1,81 i 1,47 ($F = 39,39$ $p = 0,0000$).

Różnice w trzech lokalizacjach doświadczenia były istotne statystycznie.

Udział amylozy w strukturze skrobi ziarniaków form dent i flint, materiałów pochodzących z Hodowli Smolice wynosił 30,91% i 31,53%, różnił się znacznie i różnica ta była statystycznie istotna ($F = 13,54$ $p = 0,0002$).

Udział amylozy w strukturze skrobi ziarniaków form dent i flint, materiałów pochodzących z Hodowli MHR Kobierzycy wynosił 30,57% i 31,39%, różnił się znacznie i różnica ta przy $\alpha = 0,05$ była statystycznie istotna ($F = 11,36$ $p = 0,0007$).

W poszczególnych lokalizacjach doświadczeń połowych udział amylozy w ziarniakach form flint kukurydzy był istotnie wyższy niż dent. Zależność tę zanotowano w przypadku dwóch lokalizacji doświadczenia, tj. Smolic i Radzikowa. Udział amylozy w ziarniakach form dent i flint wynosił odpowiednio w Smolicach 29,99% i 31,76% ($F = 84,03$ $p = 0,0000$), w Radzikowie 31,47% i 32,15% ($F = 13,33$ $p = 0,0003$). Natomiast udział amylozy w ziarniakach form dent i flint w Kobierzycach wynosił odpowiednio 30,05% i 29,77% ($F = 0,56$ $p = 0,4539$), tym samym różnica ta nie była istotna statystycznie.

Zarówno w porażonych ziarniakach pochodzących z doświadczeń inokulacyjnych, jak również w warunkach *in vitro* wykazano, że dominującą grupą mykotoksyn

biosyntetyzowanych przez izolaty *F. temperatum* są związki heksadepsyptydowe, tj. bowerycyna (BEA) i eniatyny (ENN).

WNIOSKI

1. Badane materiały hodowlane różnią się podatnością na porażenie przez *Fusarium temperatum*.
2. Formy dent są bardziej podatne na porażenie przez *Fusarium temperatum*, niż flint wśród badanych materiałów hodowlanych kukurydzy.
3. Formy flint i dent różnią się pod względem udziału amylozy w strukturze skrobi.
4. Istotny wpływ na zawartość amylozy w skrobi mają warunki środowiska.
5. Sekwencje *EF-1a* oraz *β-tubulina* umożliwiają jednoznaczną diagnostykę *Fusarium temperatum*.
6. Z uwagi na znaczenie *Fusarium temperatum* za celowe należałoby uznać podjęcie prac zmierzających do opracowania markerów SCAR dla wspomnianego gatunku.

LITERATURA

- Gromadzka K., Wit M., Górna K., Chełkowski J., Waśkiewicz A., Ochodzki P., Warzecha R. 2017. Fumonisin and related *Fusarium* species in pre-harvest maize ear rot in Poland. *Cereal Res. Comm.* 45 (1): 93 — 103.
- Scauflaire J., Mahieu O., Louveaux J., Foucart G., Renard F., Munaut F. 2011. Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium. *Eur. J. Plant Pathol.* 131: 59 — 66.

HENRYK BUJAK¹**KAMIŁA NOWOSAD**²**AGNIESZKA ŁĄCKA**¹**JERZY NAWRACAŁA**²**AGNIESZKA TOMKOWIAK**²**DANUTA KURASIAK-POPOWSKA**²**DOROTA WEIGT**²¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa² Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli RoślinKierownik Tematu: prof. dr hab. Henryk Bujak Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, 50-363 Wrocław, Plac Grunwaldzki 24A, tel. 71 3201829, e-mail: henryk.bujak@upwr.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.802.14.2018, Zadanie 34.

Określenie zróżnicowania genetycznego linii wsobnych kukurydzy za pomocą markerów molekularnych

Evaluation of genetic diversity of inbred maize lines using molecular markers

Słowa kluczowe: heterozja, kukurydza, linie wsobne, markery molekularne, podobieństwo genetyczne

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 powtarzalne ze względu na budowę starterów, a ich użycie jest stosunkowo niedrogi. Polimorfizm uzyskany dzięki zastosowaniu wymienionych systemów molekularnych pozwolił na rozróżnienie linii pochodzących z odmiennych 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 maksymalizacji 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 w 2018 roku były wyprowadzone w polskich spółkach hodowlanych 94 linie wsobne kukurydzy. Badane linie charakteryzowały się zróżnicowanym pochodzeniem i zostały uzyskane z materiałów będących w dyspozycji hodowli i cechowały się brakiem pokrewieństwa. Podstawę klasyfikacji tych linii stanowiła budowa ziarniaka i można je było wstępnie podzielić na formy o ziarnie zębokszałtnym (*dent*) oraz szklistym (*flint*). W trakcie trwania zadania przeanalizowano łącznie 476 linii wsobnych kukurydzy pochodzących z polskich hodowli (Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Oddział Koberzyce). Analizowane linie wykazywały duże zróżnicowanie pod względem cech morfologicznych, jak i użytkowych, co potwierdzono stosując jedno- i wielocechowe narzędzia statystyczne.

Do analizy zróżnicowania genetycznego wykorzystane zostały początkowo markery molekularne typu RAPD oraz 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. Następnie w trakcie 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 2018 roku do określenia zróżnicowania genetycznego linii kukurydzy zastosowano dwa różne systemy markerowe (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.

Na podstawie obliczonych dystansów genetycznych wybrano komponenty rodzicielskie do krzyżowań w celu uzyskania mieszańców eksperymentalnych, które umożliwiły określenie związków pomiędzy dystansem linii rodzicielskich a efektem heterozji mieszańców F_1 . 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 wielocechowym 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, niskie koszty analiz oraz 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.

DOMINIKA BOGUSZEWSKA-MAŃKOWSKA¹

KRYSTYNA ZARZYŃSKA¹

KRZYSZTOF TREDER²

BOGUMIŁA ZACHARZEWSKA²

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

¹ Zakład Agronomii Ziemiaka w Jadwisinie

² Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka w Boninie

Kierownik Tematu: dr Dominika Boguszevska-Mańkowska Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin —

Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział Jadwisin, ul. Szaniawskiego 15, 05-140 Serock,

tel. 22 7826620 w. 108, e-mail: d.boguszevska-mankowska@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 59.

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

Słowa kluczowe: odmiana, susza glebowa, wysoka temperatura, ziemniak

Badania Mittlera i in. (2006) wykazały, że straty w produkcji rolniczej USA spowodowane suszą wyniosły około 20 bilionów USD w latach 1980–2004, natomiast łącznym wystąpieniem suszy i wysokiej temperatury aż 120 bilionów USD. Obecnie stosowane techniki dotyczą atestacji roślin odpornych na działanie pojedynczego niekorzystnego czynnika środowiska. Dlatego, istnieje pilna konieczność podjęcia badań nad reakcją roślin na łączne działanie więcej niż jednego czynnika środowiska modyfikującego wzrost i rozwój roślin, a tym samym wielkość i jakość plonu rolniczego. Ponadto w celu aplikacji wyników w/w badań, zasadne jest podjęcie próby identyfikacji takich enzymów, których aktywność pod wpływem stresu zmienia się w znaczącym stopniu i różnicuje odmiany odporne i podatne na niedobory wody. Ten sposób podejścia powinien pozwolić na opracowanie mikroplątkowych metod oznaczania aktywności, umożliwiających szybką ocenę odporności odmian na stresy.

Dużą rolę w odporności roślin na suszę glebową odgrywa system korzeniowy. Próby znalezienia korelacji między wielkością systemu korzeniowego a wielkością plonu podejmowane były przez wielu badaczy, nie wszystkim jednak udało się uzyskać proste zależności (Leszczynski i Tanner, 1976; Opena i Porter, 1999; Aspray i in., 1983; Parker i in., 1989; Stalham i Allen, 2001; Vos i Groenvald, 1986; Zarzyńska i in., 2017). W pracy przeglądowej dotyczącej badań nad systemem korzeniowym ziemniaka Iwama (2008) stwierdza wprawdzie, że masa korzeni generalnie wskazuje pozytywne korelacje z plonem bulw. Rozpoznanie i określenie wielkości i zasięgu systemu korzeniowego u różnych odmian daje możliwość skierowania w rejony o częstszych niedoborach opadów odmian, które warunki takie mogą znosić łatwiej, a więc z mniejszym uszczerbkiem dla plonu. Informacje o wielkości systemu korzeniowego mogą stanowić dobrą wskazówkę dla hodowców.

Celem podjętych badań było wytypowanie odmian o różnej wrażliwości na suszę glebową, wysoką temperaturę, poznanie zależności pomiędzy 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 stresy 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. Na podstawie naszych wyników można wybrać odmiany o małych zmianach morfologicznych pod wpływem stosowanych stresów jak Lech, Laskara i odmiany o dużych zmianach: Lawenda i Jurata.

Na podstawie dotychczas prowadzonych badań zaobserwowano, że zarysowuje się zależność pomiędzy wielkością systemu korzeniowego a wielkością masy nadziemnej rośliny i plonem bulw. Jak wykazano, odmiany ziemniaka różnią się zarówno wielkością całej masy korzeniowej, jak i dystrybucją korzeni w poszczególnych warstwach gleby. W naszych badaniach nie stwierdzono istotnych zależności między wielkością systemu korzeniowego a plonem bulw pochodzącym z kombinacji gdzie nie stosowano suszy glebowej, większą korelację zanotowano z plonem bulw z kombinacji, w której zastosowano suszę glebową, a jeszcze większą ze spadkiem plonu między kombinacją kontrolną i z zastosowaną suszą. Była to oczywiście zależność odwrotna tj. im większy system korzeniowy tym mniejszy spadek plonu. Wykazano, również że im większy udział masy korzeni w całej biomase rośliny i im niższy stosunek części nadziemnej do podziemnej tym wyższa tolerancja odmiany na niedobór wody.

Badania biochemiczne sześciu odmian ziemniaka o różnej tolerancyjności na suszę wykazały, że najwyższy wzrost stężenia L-proliny pod wpływem stresu suszy w wysokiej temperaturze (38°C) zaobserwowano dla odmiany Bogatka. Koncentracja L-proliny dla tej odmiany wzrosła sześciokrotnie w piątym dniu suszy w 38°C. Przy optymalnych warunkach temperaturowych 21°C nie zaobserwowano znaczącego podwyższenia stężenia L-proliny zarówno w przypadku kontroli, jak i suszy. Zauważono niewielki wzrost stężenia L-proliny u roślin poddanych stresowi suszy i temperatury 38°C w przypadku odmian Gawin i Cekin. W pozostałych odmianach ziemniaka zarówno

susza, jak i wysoka temperatura nie indukowały wyraźnego wzrostu stężenia L-proliny w badanym okresie pięciu dni. W przypadku odmian Gwiazda i Oberon, poziom L-proliny był taki sam w ciągu pięciu dni dla wszystkich badanych kombinacji, co świadczy, że w badanym okresie odmiany te nie reagowały wzmożoną produkcją tego aminokwasu w odpowiedzi na zadany stres.

LITERATURA

- Iwama K. 2008. Physiology of the potato: New insights into root system and repercussions for crop management. *Potato Research*, 51: 333 — 353.
- Leszczynski, D. B., Tanner C.B. 1976. Seasonal variation of root distribution of irrigated, field-grown Russet Burbank potato. *Am. Potato J.* 69 — 78.
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11: 15 — 19.
- Opena G. B., Porter G. A. 1999. Soil management and supplemental irrigation effects on potato: II. Root growth. *Agronomy Journal* 91: 426 — 431.
- Parker, C. J., Carr M. K. V, Jarris N. J, Evans M. T. B., Lee V. H. 1989. Effect of subsoil loosening and irrigation on soil physical properties, root distribution and water uptake of potatoes (*Solanum tuberosum*). *Soil Tillage Res.* 13: 267 — 285.
- Stalham M. A., Allen E. J. 2001. Effect of variety, irrigation regime and planting date on depth, rate, duration and density of root growth in the potato (*Solanum tuberosum*) crop. *Journal of Agricultural Science* 137: 251 — 270.
- Vos J., Groenwold J. 1986. Root growth of potato crops on a marine clay soil. *Plant and Soil*: 161: 289 — 298.
- 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 Environ.* 63: 159 — 164.

BOGDAN FLIS**BEATA TATROWSKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział Młochów
Kierownik Tematu: dr hab. Bogdan Flis prof. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut
Badawczy, Radzików, Oddział Młochów ul. Platanowa 19, Młochów 05-831, tel. (0 22) 7299248 w. 216,
e-mail: b.flis@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 62.

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

Słowa kluczowe: cechy kulinarne, interakcja genotypowo środowiskowa, plon bulw, stabilność, zawartość skrobi, ziemniak

Celem badań jest ocena wpływu interakcji genotypowo-środowiskowej na kształtowanie zmienności, która powstaje w odpowiedzi na zmieniające się środowisko uprawy. Ocena ta dotyczy 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.

W 2018 roku cele prac były następujące (1) przeprowadzenie doświadczeń polowych w 3 lokalizacjach z wybranymi rodami i odmianami ziemniaka (pierwszy element 3-letniego cyklu), (2) rozmnażanie badanych rodów i odmian oraz (3) selekcjonowanie klonów tetraploidalnych wyróżniających się poziomem cech użytkowych i wybranych cech odpornościowych.

MATERIAŁ I METODY

W doświadczeniach polowych oceniano 30 rodów i 10 odmian ziemniaka. Wśród rodów jest 11 genotypów pochodzących z krzyżowań interploidalnych (tj. typu odmiana skrzyżowana z diploidalnym donorem cech jakościowych), 11 form odpornych na zarazę ziemniaka oraz 8 form pochodzących z krzyżowań odmian jadalnych z rodami własnymi odpornymi na wirus Y ziemniaka i średnią odpornością na zarazę ziemniaka.

Doświadczenia założono w 2 miejscowościach położonych w centralnej Polsce (z uprawą tradycyjną w Młochowie i ekologiczną w Grabowie) oraz w Boguchwale na południowym wschodzie, w której można oczekiwać naturalnej silnej epifitozy zarazy ziemniaka (również uprawa tradycyjna). Doświadczenia prowadzono w układzie bloków losowanych (3 bloki) z 7 krzakowymi poletkami. Rody i odmiany oceniano pod względem plonu bulw, zawartości skrobi, nasilenia wad bulw oraz smaku i ciemnienia miąższu bulw gotowanych. W Młochowie prowadzono także 15 krzakowe rozmnożenia ocenianych w doświadczeniach rodów i odmian.

Do ocen zróżnicowania wykorzystano analizę wariancji i test Tukeya lub test Kruskala-Wallisa. Analizę stabilności przeprowadzono przy użyciu współczynnika zmienności (Francis i Kannenberg, 1978) i/lub wariancji stabilności Shukli (Shukla, 1972). Obliczenia wykonano przy użyciu programu R (R Core Team, 2015; Mendiburu, 2015).

W przypadku wad bulw (oceny wg skali 1–4, gdzie 4 oznacza brak wad) oraz ocen smaku i ciemnienia miąższu bulw gotowanych (wg skali 1–9, gdzie 9 najsmaczniejszy lub nieciemniejący miąższ), jako miarę zastosowano wartość mediany i wartość minimalną spośród wszystkich otrzymanych wartości. W przypadku wad bulw, jako wartość graniczną przyjęto medianę ≥ 3 i wartość minimalną ≥ 2 . Dla ocen smaku wartości te wynosiły: mediana > 6 i minimum ≥ 6 , a dla ciemnienia miąższu bulw — mediana ≥ 7 i minimum $\geq 6,5$.

W 2018 r. prowadzono także selekcję wśród 60 tetraploidalnych rodów ziemniaka pochodzących od form własnych i odmian, będących donorami odporności na zarazę ziemniaka krzyżowanych z donorami cech jakości, którymi były rody diploidalne. Materiał obejmował 60 rodów, które utrzymywano na poletkach 15 krzakowych.

WYNIKI

Wyniki przeprowadzonych w 2018 r. doświadczeń wskazują na istotny wpływ genotypu (tj. badanych rodów i odmian) i miejscowości dla wszystkich badanych cech. Najwyższy plon bulw i najniższą zawartość skrobi stwierdzono w Boguchwale, zaś w Młochowie i Grabowie (z uprawą ekologiczną) plony były niższe, a zawartość skrobi najwyższa w uprawie ekologicznej w Grabowie. W przypadku plonu i zawartości skrobi stwierdzono wysoce istotną statystycznie interakcję rodów/odmian z miejscowościami. Największe nasilenie wad stwierdzono w bulwach pochodzących z uprawy w Młochowie i Grabowie. Najlepszy smak miały bulwy pochodzące z uprawy tradycyjnej w Młochowie. Bulwy z uprawy tradycyjnej w Młochowie i Boguchwale wykazywały

także niższą skłonność do ciemnienia po ugotowaniu w porównaniu do bulw z uprawy ekologicznej w Grabowie. Na otrzymane wyniki duży wpływ miał przebieg pogody (długotrwała susza w centralnej Polsce).

W celu oceny stabilności plonu zastosowano tylko wariację stabilności (Shukla, 1972). Dodatkowo, zmodyfikowano wyjściowy ranking badanych genotypów wg rosnącego plonu, uwzględniając statystyczną istotność różnic pomiędzy badanymi genotypami oraz istotność wariacji stabilności. Odpowiednio zwiększając lub zmniejszając wyjściową rangę każdego rodu lub odmiany otrzymano nowy ranking genotypów i wyróżniono najlepsze genotypy, tj. plenne i stabilne (Mendiburu, 2015). W takim uproszczonym schemacie selekcji, najważniejszym czynnikiem decydującym o wyborze wydaje się być wysokość średniego plonu, a stabilność (lub jej brak) ma mniejsze znaczenie — wśród wybranych 20 rodów/odmian jest 5 form niestabilnych, podobnie jak wśród niewybranych form niskoplennych.

W przypadku zawartości skrobi oceniono stabilność za pomocą 2 miar (wariancja stabilności Shukli i współczynnik zmienności), które były silnie skorelowane i pozwoliły wyróżnić bardzo dużą liczbę genotypów z niestabilnym poziomem skrobi. Wśród takich niestabilnych genotypów znalazły się prawie wszystkie odmiany. Zawartość skrobi jest ważną cechą odmianową, a zatem należałoby oczekiwać niewielkiej zmienności pomiędzy miejscowościami (=środowiskami). Wyniki ocen stabilności mogą wskazywać na brak przydatności użytych miar do oceny stabilności takiej cechy jak zawartość skrobi albo zbyt małą liczbę środowisk.

Do oceny stabilności nasilenia wad bulw, smaku i ciemnienia posłużono się wartościami mediany i ustalonymi wartościami minimalnymi, których użycie zapewnia wybór form stabilnych i jednocześnie o wysokim (akceptowalnym) poziomie badanych cech. Jednoroczna ocena wskazuje, że stabilnym poziomem tych cech wyróżniały się rody interploidalne.

WNIOSKI

1. W doświadczeniach polowych z uprawą tradycyjną lub ekologiczną prowadzonych w trzech miejscowościach stwierdzono:
 - istotny wpływ genotypu (rodu lub odmiany) i miejscowości na poziom wszystkich ocenianych cech oraz wpływ ich interakcji na poziom plonu i zawartości skrobi.
 - stabilny poziom plonu większości badanych rodów i odmian. Z kolei stabilność zawartości skrobi była znacznie rzadziej obserwowana. Uważa się, że wysokość plonu w dużej mierze podlega wpływom środowiskowym, a zawartość skrobi jest cechą odmianową. Należy przyjąć, że oceny uzyskane w jednym sezonie wegetacyjnym nie pozwalają jednoznacznie określić wpływu interakcji środowiskowo genotypowej na poziom plonu i zawartości skrobi.
 - stosunkowo rzadkie występowanie stabilnie małego nasilenia wad bulw. Stabilnym poziomem smaku i nieciemnienia miąższu bulw wyróżniła się grupa rodów z krzyżowań interploidalnych. Do wyróżniania rodów lub odmian stabilnych pod względem

cech wyrażanych w skali posłużono się wartościami mediany i przyjętymi granicznymi wartościami minimalnymi.

2. Charakteryzowano 60 rodów pod względem cech użytkowych i odporności na zarazę ziemniaka (za pomocą testów laboratoryjnych i z użyciem markerów molekularnych). Wybrano grupę 30 rodów o dobrym plonie, odpornych na zarazę i niewadliwym smaku bulw.

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.
- Mendiburu F. 2015. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-3. <http://CRAN.R-project.org/package=Agricole>.
- R Core Team 2015. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Shukla G. K. 1972. Some statistical aspects of partitioning genotype-environmental components of variability. *Heredity* 29: 237 — 245.

RENATA LEBECKA¹
ZOFIA MURAWSKA¹
KATARZYNA SZAJKO¹
JANUSZ DĘBSKI²
MICHAŁ KISTOWSKI²
WALDEMAR MARCZEWSKI¹
EWA ZIMNOCH-GUZOWSKA¹

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie

² Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Kierownik Tematu: dr hab. Renata Lebecka prof. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów, tel. (22) 7299248 w. 207, e-mail: r.lebecka@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 56.

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**

Słowa kluczowe: białka ziemniaka, *Dickeya solani*, loci cech ilościowych, mokra zgnilizna bulw ziemniaka, odporność

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

Mokra zgnilizna bulw ziemniaka to choroba powodowana przez kilka gatunków bakterii pektynolitycznych należących do dwóch rodzajów: *Pectobacterium* i *Dickeya*. Bakterie *Dickeya* spp. są bardziej agresywne od innych bakterii pektynolitycznych (Czajkowski i in., 2013). Straty ekonomiczne powodowane przez bakterie pektynolityczne to: obniżenie wielkości plonu bulw, utrata części plonu w czasie przechowywania, wystąpienie czarnej nóżki w czasie sezonu wegetacyjnego, koszty związane z degradacją plantacji nasiennych. Nie stosuje się ochrony chemicznej

do zwalczania bakterii wywołujących choroby ziemniaka. Odporność bulw ziemniaka na bakterie pektynolityczne jest cechą poligeniczną (Zimnoch-Guzowska i in., 2000).

Celem tematu jest:

- (1) zmapowanie odporności na bakterie *D. solani* w diploidalnej nieselekcjonowanej populacji ziemniaka, otrzymanej po skrzyżowaniu formy wysoko odpornej z formą o niskiej odporności na te bakterie oraz
- (2) znalezienie różnic w profilach białkowych odmian ziemniaka, różniących się między sobą poziomem odporności bulw na zakażenie bakteriami *D. solani*, 8 lub 48 godzin po inokulacji.

CEL (1). OPIS WYNIKÓW

Przeprowadzono analizę markerów DArTseq 186 osobników potomnych i ich form rodzicielskich, wykonano ocenę fenotypową odporności bulw na bakterie *D. solani* (Lebecka, 2017) oraz oceniono zawartość skrobi w bulwach ziemniaka w populacji mapującej (Zgórska, 2001). Testowana cecha przyjmowała rozkład normalny. Średnia masa zgniłej tkanki genotypów potomstwa populacji mapującej wynosiła 2,3 g, zakres cechy od 0,0 do 7,6 g, u odpornej formy rodzicielskiej DG 00-270 wynosiła 0,8 g, a u podatnej formy, DG 08-305 — 5,9 g. Zawartość skrobi w formach rodzicielskich populacji mapującej wynosiła 20,5% w DG 00-270 i 17,3% w DG 08-305. Zakres badanej cechy w potomstwie wynosił od 11,4% do 23,9%, ze średnią populacji 17,7%.

CEL (1). WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

Testowanie porażenia bulw w teście sztucznej inokulacji będzie powtórzone w trzecim (ostatnim) roku badań. Dane będą wykorzystane do mapowania *loci* cech ilościowych (QTLs) odporności bulw na bakterie *D. solani*. Ocena zawartości skrobi w kolejnym roku badań umożliwi zbadanie związku zawartości skrobi z odpornością bulw na mokrą zgniliznę. Badania będą kontynuowane.

CEL (2). OPIS WYNIKÓW

Na podstawie trzyletniej oceny porażenia bulw w testach laboratoryjnych przeprowadzonych w poprzednich latach tego projektu (Lebecka, 2017) do badań proteomicznych wybrano dwie odmiany o wysokiej odporności (Bea i Humalda) i trzy odmiany o niższej odporności (Katahdin, Ulster Supreme i Irys). Próbkę z pięciu odmian ziemniaka pobierano z bulw zranionych inokulowanych bakteriami *D. solani*, z bulw zranionych traktowanych wodą (8 i 48 h po inokulacji) oraz z bulw nieranionych (8 h po inokulacji). Doświadczenia prowadzono w dwóch terminach. Pobierano od dwóch do czterech fragmentów z każdej kombinacji doświadczenia. Białka izolowano według protokołu opracowanego w poprzednich latach tego projektu (Murawska i in., 2017). Analizę próbek wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Programem Diffprot (Malinowska i in., 2012) porównano listy peptydów danych grup eksperymentalnych pomiędzy sobą,

obliczając zależności statystyczne i typując białka, których poziom ekspresji pomiędzy badanymi grupami różnił się w sposób istotny ($P \leq 0,1$), co najmniej 1,5 razy. (1) Porównano białka z bulw inokulowanych bakteriami *D. solani* z białkami bulw zranionych i traktowanych wodą. Przeprowadzono cztery porównania, dla grupy odmian odpornych i podatnych, po 8 i 48 h po inokulacji. Wyróżniono wyłącznie jedno białko różnicowe, peroksydazę, w grupie odmian odpornych, 48 godzin po inokulacji. (2) Porównano białka z bulw odmian odpornych z podatnymi. We wczesnej fazie infekcji, 8 godzin po inokulacji, wyróżniono 4 białka (patatyny, inhibitory proteinaz w tym inhibitor chymotrypsyny), których ekspresja była istotnie wyższa w odmianach odpornych, w próbkach pobranych zarówno z bulw inokulowanych bakterią jak i traktowanych wodą, natomiast w bulwach nieranionych istotnie większą ekspresję stwierdzono dla białka patatyny. Wyższą ekspresją w odmianach odpornych, tylko po inokulacji, charakteryzowały się dwa białka, inhibitor proteinazy PTI i syntetaza tiaminotiazolowa. W późniejszej fazie infekcji w odmianach odpornych w obu rodzajach bulw, inokulowanych i traktowanych wodą, było istotnie więcej inhibitorów proteinaz, patatyny (tak samo jak po 8 h) i inhibitorów proteazy serynowej. Wyróżniono białka o wyższej ekspresji w odmianach odpornych wyłącznie po inokulacji bakteriami, inhibitory proteazy aspartylowej, oksydazy polifenolowe i endoplazminy.

Wykonano dwie analizy głównych składowych dla wszystkich prób z doświadczenia (1) po 8 h oraz (2) po 8 i 48 h. Analiza próbek z doświadczenia po 8 h wyjaśnia 19% zmienności a analiza po 48 h — 26% zmienności, mimo to analiza po 8 h pozwala na oddzielenie odmian odpornych od podatnych na podstawie drugiej składowej (PC2). Po 48 h różnice pomiędzy jedną z odpornych odmian, a pozostałymi odmianami podatnymi zaczynają się zacierać.

CEL (2). WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

Wykazano różnice w białkach pomiędzy odpornymi i podatnymi odmianami na mokraj zgniliznę bulw, w początkowej i późniejszej fazie infekcji. Większość białek różnicowych występuje w bulwach inokulowanych bakteriami w zranienia i w bulwach zranionych traktowanych wodą. W bulwach nieranionych 8 h po inokulacji, spośród białek różnicowych wykrytych w początkowej i późniejszej fazie infekcji, tylko patatyny występowały w większej ilości w odmianach odpornych w porównaniu z podatnymi. Na podstawie analizy głównych składowych 8 h oraz 8 i 48 h po inokulacji zakładamy, że różnice obserwowane w czasie wczesnej fazy infekcji, 8 h po inokulacji, mogą odgrywać większą rolę w hamowaniu rozwoju objawów choroby.

LITERATURA

- Czajkowski R., De Boer W. J., Van der Zouwen P.S., Kastelein P., Jafra S., de Haan E.G., Van den Bovenkamp G. W., Van der Wolf J. M. 2013. Virulence of '*Dickeya solani*' and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*). Plant Pathol. 62: 597 — 610.
- Lebecka R. 2017. Screening for potato resistance to blackleg and soft rot. Plant Breed Seed Sci 75: 97 — 104 DOI:10.1515/plass-2017-00013.

- Malinowska A., Kistowski M., Bakun M., Rubel T., Tkaczyk M., Mierzejewska J., Dadlez M. 2012. Diffprot — software for non-parametric statistical analysis of differential proteomics data. *J. Proteomics* 75 (13): 4062 — 4073.
- Murawska Z., Dębski J., Szajko K., Lebecka R. 2017. Isolation of proteins from potato tubers. *Plant Breed Seed Sci* 75: 23 — 27 DOI: 10.1515/plas-2017-0005.
- Zgórska K. 2001. Oznaczanie zawartości skrobi w bulwach ziemniaka. W: *Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR Radzików*, 10a: 113 — 116.
- 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.

DOROTA MILCZAREK**BOGDAN FLIS**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie
Kierownik Tematu: dr Dorota Milczarek Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut
Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów, tel. 22 7299248 w. 222,
e-mail: d.milczarek@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 60.

**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*

Słowa kluczowe: cechy użytkowe, mapowanie, mątwik, odporność, *Solanum gourlayi*, ziemniak

CEL

Celem zadania jest poznanie genetycznych uwarunkowań odporności na mątwiki, zaobserwowanej w gatunku *Solanum gourlayi* oraz wyróżnienie w obrębie ziemniaka o różnych kierunkach użytkowania form o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak (patotypy mątwika ziemniaczanego — *Globodera rostochiensis* i mątwika agresywnego — *G. pallida*).

Celem tematów realizowanych w 2018 roku była: a) ocena odporności klonów diploidalnej populacji mapującej na patotypy *G. pallida*; b) prowadzenie doświadczenia polowego z udziałem materiałów tetraploidalnych o złożonej odporności na patotypy *Globodera* spp., selekcja form o złożonej odporności z wykorzystaniem markerów molekularnych oraz prowadzenie krzyżowań interploidalnych w celu wprowadzenia

odporności ze źródła *S. gourlayi* na poziom tetraploidalny; c) analiza DArT diploidalnej populacji mapującej.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy obejmował: (a) klonów z diploidalnej populacji mapującej DW 94-4235 × Sg 2/7 oraz (b) 197 klonów tetraploidalnych o złożonej odporności na patotypy *Globodera* spp. pochodzących z 3 kombinacji krzyżówkowych. Dla klonów populacji mapującej prowadzono oceny odporności na patotypy Pa2 i/lub Pa3 *G. pallida*. Klonów tetraploidalnych prowadzono w doświadczeniu polowym (7 krzakowe poletka × 2 powtórzenia) i oceniono plon bulw, zawartość i plon skrobi, morfologię bulw (w skali 1–9, 9 = najlepsze oceny) oraz nasilenie występowania defektów bulw (w skali 1–4, 4 = brak wad).

Prowadzono także polowe rozmnożenie klonów populacji mapującej, uzupełniono dane dotyczące amplifikacji markerów związanych z genami odporności *H1* i *Gro1-4* dla klonów tetraploidalnych oraz przeprowadzono krzyżowania interploidalne w celu przeniesienia odporności z *S. gourlayi* na poziom tetraploidalny (dwie tetraploidalne formy mateczne krzyżowano z diploidalnym klonem Sg 2/7).

WYNIKI

Źródłem genów odporności ziemniaka uprawnego na mątwiki (*Globodera* spp.) są dzikie gatunki *Solanum*, a jednym z nich jest *S. gourlayi*, w którym zaobserwowano podwyższoną odporność na mątwika agresywnego *G. pallida* (Van Soest i in., 1983), ale stopień tej odporności i jej spektrum działania nie są znane. W ramach tematu ustalono odporność na patotypy *G. pallida* wybranych klonów diploidalnych *S. gourlayi*, które wykorzystano do przygotowania populacji diploidalnych (z nich wybrano populację mapującą). W 2018 r. przeprowadzono ocenę odporności na patotypy Pa2 i/lub Pa3 *G. pallida* klonów populacji mapującej, spośród których 15 było odpornych na patotyp Pa2, a 44 klonów — na patotyp Pa3. Odporność przetestowanych klonów diploidalnych mieściła się w zakresie od 1 do 6 (przy skali 1–9), co pokazuje segregację poszukiwanej cechy w wytypowanej diploidalnej populacji mapującej.

W doświadczeniu polowym charakteryzowano klonów tetraploidalnych, a spośród nich selekcjonowano, z użyciem markerów molekularnych, formy o złożonej odporności na *Globodera* spp. Średnie wartości uzyskane dla tych klonów były następujące: plon bulw 1,1 kg/krzak (dla odmian wzorcowych 1,4 kg/krzak), zawartość skrobi 13,1% (14,3% dla odmiany Kuba), plon skrobi 79,8 q/ha (128,3 q/ha dla odmiany Kuba), wielkość bulw 4,3 (odmiany wzorcowe 4,8), regularność zarysu 5,7 (odmiany 6,0), głębokość oczek 6,0 (odmiany 6,4). Wady bulw badanych klonów kształtowały się na poziomie 2,7 (ocena dla odmian 1,8 wynikała ze znacznego nasilenia wzrostu wtórnego). Oceny te wskazują na nieco słabszy poziom cech w porównaniu do wykorzystanych w doświadczeniu odmian wzorcowych. Wśród badanych klonów

były jednak takie, które przewyższały odmiany wzorcowe pod względem plenności i/lub morfologii bulw.

Przeprowadzono porównanie średnich wartości cech pomiędzy grupą klonów, w których stwierdzono amplifikację wybranego markera molekularnego, a grupą bez markera. Różnice stwierdzono jedynie dla markera HC, związanego z genem odporności na patotypy Pa2/Pa3 (klony z markerem miały wyższy plon, niższą skrobię i słabszą regularność zarysu bulw w porównaniu do grupy bez markera) i dla markera Gro1-4, sprzężonego z genem odporności na patotyp Ro1 (różnice między grupami dotyczyły kształtu i wielkości bulw). Dla markera 57R (dla genu odporności na Ro1 i Ro4) nie stwierdzono takich zależności dla żadnej z cech, podobnie jak w poprzednich badaniach (Milczarek i in., 2014).

Wyselekcjonowano 10 klonów posiadających wszystkie trzy stosowane w projekcie markery, tj. HC, Gro1-4 i 57R. Klony te charakteryzowały się dość dobrym poziomem cech agronomicznych, co wskazuje na możliwość wyróżniania klonów o dobrych cechach użytkowych i odpornych na patotypy Ro1 i Ro4 *G. rostochiensis* oraz Pa2/3 *G. pallida*.

Zrealizowano również program krzyżowań interploidalnych. Diploidalna forma ojcowska, klon Sg 2/7 miała płodny pyłek (płodność 70%) i tworzyła duże ziarna pyłku, które są wskaźnikiem męskich gamet o niezredukowanej liczbie chromosomów. Przeprowadzono łącznie 300 zapyleń i uzyskano 29 jagód.

Do mapowania genów odporności wykorzystuje się diploidalne populacje mapujące, które uzyskuje się poprzez krzyżowanie formy odpornej z formą podatną (Gebhardt, 2007). W 2018 roku otrzymano wyniki genotypowania nieselekcjonowanej populacji mapującej wysokowydajną metodą DArTseq wykonaną przez Diversity Array Technology, Pty Ltd. (Canberra, Australia). Metoda ta jest połączeniem wcześniej opracowanej metody DArT z sekwencjonowaniem nowej generacji (next generation sequencing). Otrzymano wyniki dla ponad 82 tysięcy markerów. Obecnie trwa analiza i opracowywanie tych wyników (np. usuwanie markerów niepolimorficznych dla rodziców populacji mapującej, usuwanie markerów, które nie segregowały w potomstwie, ustalanie kryterium liczby dopuszczalnych braków danych) w celu przygotowywania danych do stworzenia mapy genetycznej.

WNIOSKI

1. Segregacja odporności w wytypowanej diploidalnej populacji mapującej pozwoli na zbadanie podłoża genetycznego odporności pochodzącej z wykorzystanego źródła — *S. gourlayi*.
2. Wyniki doświadczenia polowego wskazują, że klony uzyskane w wyniku krzyżowań form o złożonej odporności na *Globodera* spp. charakteryzują się nieco niższym poziomem cech użytkowych w porównaniu do odmian wzorcowych. Jednak obserwowane zakresy ocen tych cech wskazują, że jest możliwe wytypowanie spośród nich klonów o wysokim poziomie badanych cech i jednocześnie odpornych na patotypy *Globodera* spp.

3. Nie obserwowano negatywnych związków pomiędzy obecnością genu odporności identyfikowanego markerem molekularnym a poziomem cech użytkowych.
4. Wyselekcjonowano 10 klonów posiadających markery Gro1-4 genu *Gro1-4*, 57R genu *H1* oraz marker HC genu *GpaV_{vrn}* o dość dobrym poziomie cech użytkowych.
5. Uzyskano 29 jagód z krzyżowań interploidalnych (zapyłacz był formą diploidalną Sg 2/7), co wskazuje na możliwość wprowadzenia odporności z *S. gourlayi* na poziom tetraploidalny.
6. Otrzymano wyniki genotypowania populacji nieselekcjonowanej (wyniki dla 82 tys. markerów) i rozpoczęto analizę w celu przygotowywania danych.

LITERATURA

- Gebhardt C. 2007. Molecular markers, maps and population genetics. In: Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gebhardt C., Govers F., Mackerron D. K. L., Taylor M. A., Ross H. A. (Eds): Potato biology and biotechnology advances and perspectives. Elsevier, Oxford: 77 — 86.
- Milczarek D., Przetakiewicz A., Kamiński P., Flis B. 2014. Early Selection of potato clones with the H1 resistance gene — the relation of nematode resistance to quality characteristics. Czech J. Genet. Plant Breed., 50: 278 — 284.
- Van Soest L. J. M., Rumpfenhorst H. J., Huijsman C. A. 1983. Resistance to potato cyst-nematodes in tuber-bearing *Solanum* species and its geographical distribution. Euphytica 32: 65 — 74.

DOROTA MICHAŁOWSKA
AGNIESZKA PRZEWODOWSKA
WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI
PAULINA BURYŁO

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie
Kierownik Tematu: mgr inż. Dorota Michałowska Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy
Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie, 76-009 Bonin, 94 3423031 wew. 213,
e-mail: michalowska@ziemniak-bonin.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.802.19.2018, Zadanie 63.

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

Słowa kluczowe: bakterie endogenne, biocydy, chemioterapia, *in vitro*, termoterapia, ziemniak

Głównym celem zadania nr 63 są prace nad doskonaleniem metod uwalniania roślin ziemniaka od patogenów niekwwarantannowych (bakterie endogenne i wirusy) przy pomocy kultur *in vitro*.

Choroby wirusowe ziemniaka powodują degenerację plantacji nasiennych i wpływają na znaczne straty w plonie bulw. Największe zagrożenie stanowi wirus PVY ziemniaka, który może powodować spadek plonu bulw nawet o 50% (Chrzanowska, 2000). Z kolei wirus PVS i PVM ziemniaka, które łatwo się rozprzestrzeniają mogą powodować straty rzędu 30% (Kostiw, 2013). Infekcje wirusowe są poważnym zagrożeniem dla hodowli ziemniaka, gdyż ich koncentracja wzrasta w kolejnych pokoleniach bulw w wyniku rozmnażania wegetatywnego, a także są odporne na działanie zabiegów chemicznych. Dlatego tak ważna jest eliminacja wirusów z zainfekowanych roślin ziemniaka (Faccioli, 2001).

W ramach tematu badawczego wykonano badania nad uwalnianiem roślin od wirusów PVS i PVM ziemniaka przy zastosowaniu dwóch metod: termoterapii połączonej

z izolacją merystemów i chemioterapii jednowęzłowych fragmentów roślin *in vitro* porażonych wirusami.

Już w 1952 roku ukazały się pierwsze informacje w literaturze o tym, iż wirusy mogą w mniejszym stopniu infekować wierzchołki, a wyizolowane merystemy mogą być od nich wolne (Morel, Martin, 1952). Kolejne badania wykazały że ilość roślin wolnych od wirusa wzrasta proporcjonalnie wraz z temperaturą oraz czasem trwania termoterapii (Biniam i Tedesse, 2008), jednocześnie zmniejsza się liczba eksplantatów, które po zakończeniu terapii są zdolne do regeneracji (Zaklukiewicz, 1982; Ali i in., 2013). W tegorocznych badaniach wykazaliśmy również jak duży wpływ na uzyskanie zdrowych roślin *in vitro* ma czynnik osobowy, na co składa się m.in. jakość i wielkość izolowanego merystemu. Z materiału poddanego tym samym warunkom termoterapii, w zależności od wykonawcy uzyskano z merystemów od 68% (wykonawca 1) do 30% (wykonawca 2) roślin *in vitro*, w tym wolnych od wirusa 26,4% (wykonawca 1) do 8% (wykonawca 2).

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). Nasir i in. (2010) oraz Mahmoud i in. (2009) zaobserwowali, że rybawiryna z wysoką skutecznością eliminuje PVA, PVX, PVS, PVM, PVY i PLRV, natomiast tiouracyl sporadycznie eliminował PVS oraz wirusa PVX. Stosowanie antymetabolitów ma również wady, gdyż wraz ze zwiększeniem ich stężenia w pożywce 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). Nasze badania wykazały, że wyższe dawki RBV obniżają poziom ekstynkcji wirusa PVS i PVY, ale działają fitotoksycznie na eksplantaty. Dodanie do pożywki rybawiryny nie ma wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVM ziemniaka. Natomiast zastosowane dawki tiouracylu nie mają wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVS i PVM ziemniaka, jedynie zmniejszyła się koncentracja wirusa PVY ziemniaka. Dodany do podłoża tiouracyl nie ma negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*.

Bakterie endofityczne są problemem, który pojawia się systematycznie w kulturach *in vitro*, niezależnie od gatunku roślin. Nawet największa staranność w procesie mikro-rozmnażania nie daje stuprocentowej pewności otrzymania i rozmnażania kultur bez zanieczyszczeń. Obecnie trudno jest powiedzieć o kulturach *in vitro* że są sterylne. Prawidłowo przeprowadzona dezynfekcja eksplantatów w początkowej fazie nie wykazuje zanieczyszczeń bakteryjnych i mogą one nie być zauważone (Orlikowska i in., 2012). Pierwszym sygnałem świadczącym o obecności bakterii w kulturach *in vitro* jest nieznaczne zmętnienie pożywki pod wyszczepionym eksplantatem oraz pojawiające się wodniste „hallo” wokół eksplantatu. Proces ten ujawnia się w kulturach po 3–5 dniach od pasażowania. Dodanie biocydu do pożywki hodowlanej może spowodować zahamowanie namnażania się bakterii endogennych.

Celem tematu w 2018 roku było badanie trzech dostępnych na rynku preparatów bakteriobójczych: PPMTM, ProClin 300® i AgNO₃, pod kątem skuteczności zwalczania

zanieczyszczeń bakteryjnych (bakterie endogenne) w kulturach *in vitro* ziemniaka i ocena ich fitotoksyczności.

Biocyd PPM™ został przetestowany dla wielu gatunków roślin m.in. rośliny cytrusowe, kapustne, melon, tytoń (Compton, Koch, 2001). Badania wykazały pozytywny wpływ preparatu w ograniczeniu zanieczyszczeń bakteryjnych. Badacze zwracali uwagę, że musi być on stosowany w odpowiedniej koncentracji w zależności od gatunku roślin, gdyż zbyt wysokie stężenie może mieć negatywny wpływ na rozwój tkanki roślinnej. Włączenie do pożywek związków bakteriobójczych i bakteriostatycznych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego ważne są badania nad ich skutecznością i fitotoksycznością.

Na podstawie dotychczas prowadzonych badań zaobserwowano, że w zależności od zastosowanego biocydu eliminacja bakterii endogennych była zróżnicowana. Dodany do podłoża preparat PPM™, podobnie jak w latach poprzednich nie wykazywał fitotoksycznego wpływu na eksplantaty, a nawet najniższa dawka 0,3% w dużym stopniu eliminowała bakterie endogenne — 78,35% „czystych kultur”. Wyższe dawki — od 0,4% to 100% kultur wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych. Również dodatek do pożywki ProClin300® eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 100% przy zastosowaniu najwyższej dawki i w 86,67% przy zastosowaniu niższej dawki. Jednocześnie przy niższych dawkach nie zaobserwowano fitotoksycznego działania preparatu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*, tylko przy najwyższej dawce 0,04% rośliny słabiej korzeniły się i rosły niższe w stosunku do kontroli. Azotan srebra (AgNO₃) dodany do pożywki nie miał wpływu na eliminację bakterii endogennych z kultur *in vitro* ocenianych odmian. Dodatkowo przeszczepione fragmenty roślin *in vitro* zareagowały na azotan srebra, tworząc słabe roślinki (jedno międzywęźle), często z mikrobulwkami.

W naszych badaniach wykazaliśmy pozytywny wpływ PPM™ i ProClin 300® na zanieczyszczenia bakteryjne w kulturach *in vitro* ziemniaka. Niestety preparaty te nie powodują trwałego „oczyszczenia”, tzn. po przeszczepieniu roślin *in vitro* z podłoża z dodatkiem biocydu na standardowe podłoże MS tylko wierzchołkowe fragmenty roślin zachowały czystość bakteryjną. Należy sprawdzić po ilu pasażach zastosowane dawki PPM™ i ProClin 300® wyeliminują bakterie endogenne z kultur *in vitro* ziemniaka.

LITERATURA

- Biniam T., Tedesse M. 2008. A survey of Vidal status on potatoes grown in Eritrea and *in vitro* elimination of local variety Tsaeda embaba. *Afri. J. Biotech.* 7 (4): 397 — 403.
- Chrzanowska M. 2000. Choroby ziemniaka wywołane przez wirusy. *Wiś Jutra* 3 (20): 27 — 29.
- Compton M., Koch J. 2001. Influence of plant preservative mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 259 — 261.
- Faccioli G. 2001. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures. *Thermotherapy and chemotherapy*. Ed. *Virus and Virus-like Disease of Potatoes and production of Seed Potatoes*: 382 — 385.
- Kostiw M. 2013. Przyrodnicze i poza przyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasienną ziemniaka. *Wiś Jutra* 1 (174): 28 — 29.
- Mahmoud S. Y. M., Hossen 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 2001: 36.
- Morel G., Martin C. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *C. R. Acad. Sci.* 235: 1324 — 1325.
- 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. Phytopathol.* 22 b (1): 63— 70.
- Orlikowska T., Zawadzka M., Zenkteler E., Sobiczewski P. 2012. Influence of the biocides PPM and Vitrofur on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* Vol. 87. No: 3: 223 — 230.
- Zaklukiewicz K. 1982. Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. *Ziemniak* 1981/82: 137 — 160.

BEATA TATAROWSKA**BOGDAN FLIS****IWONA-WASILEWICZ FLIS**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Młochowie

Kierownik Tematu: dr Beata Tatarowska Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut

Badawczy, Oddział w Młochowie, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów, tel. 22 7299087 wew. 222,

e-mail: b.tatarowska@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 61.

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

Słowa kluczowe: odporność, reakcja nadwrażliwości — HR, *Solanum tuberosum*, wirus M ziemniaka, wirus S ziemniaka

Celem projektu jest określenie reakcji form z genem *Rm* pochodzącym z *S. megistacrobium* lub *Gm* z *S. gourlayi* na nowe warianty wirusa M ziemniaka oraz poznanie dodatkowych czynników genetycznych warunkujących tę odporność w różnych warunkach środowiskowych przy zastosowaniu ilościowych metod molekularnych. W przypadku odporności warunkowanej genem *Rm* określona zostanie zależność między odpornością, a występowaniem reakcji nekrotycznej. W przypadku wirusa S ziemniaka celem projektu jest ocena wpływu dawki genu na odporność, aby można było stwierdzić, czy uzasadnione jest tworzenie form typu multipleks pod względem genu *Ns* w celu otrzymania form o podniesionej odporności na wirus PVS ziemniaka. W roku 2018 w ramach zadania 61 realizowano cztery tematy badawcze.

TEMAT 1

Rozmnażanie w polu odpornych na PVM rodów ziemniaka z sześciu populacji ze źródłem odporności pochodzącym z *S. megistacrolobum* lub *S. gourlayi* oraz dwóch populacji mających w swym pochodzeniu źródło odporności na PVS z *S. tuberosum subsp. andigena*

Celem tematu było stworzenie kolekcji rodów odpornych na PVM oraz rozmnożenie w polu populacji mających w swym pochodzeniu odporność na PVS.

Wyniki

W ramach tematu rozmnażano w polu 423 rody tetraploidalne mające w swym pochodzeniu gen odporności na PVM pochodzący z *S. megistacrolobum* (*Rm*) oraz 157 rodów tetraploidalnych, mających w swym pochodzeniu gen odporności na PVM pochodzący z *S. gourlayi* (*Gm*) (Miętkiewska, 1999). Po przeprowadzeniu oceny odporności z porażenia wtórnego w testach ELISA (Wasilewicz-Flis, 2001), ocenie cech morfologicznych bulw i wad zewnętrznych, do kolekcji rodów odpornych na PVM wybrano 268 rodów. Z populacji z segregującym genem *Ns* z *S. tuberosum subsp. andigena* zebrano 154 rody, tylko te, które nie uległy porażeniu w testach ELISA (ocena porażenia pierwotnego).

Wnioski

- W kolekcji rodów wysoko odpornych na PVM znalazło się 200 rodów z genem odporności *Rm* oraz 68 rodów z genem *Gm*.
- Rody znajdujące się w kolekcji M zostały ocenione pod kątem odporności na PVM w testach laboratoryjnych, w porażeniu pierwotnym i wtórnym oraz uzyskały pełną charakterystykę cech morfologicznych.
- Genotypy znajdujące się w kolekcji mogą zostać wykorzystane w dalszych pracach hodowlanych, jako formy rodzicielskie w programach krzyżowań.
- Wytypowano 154 rody, które nie uległy porażeniu PVS w ocenie porażenia pierwotnego.

TEMAT 2

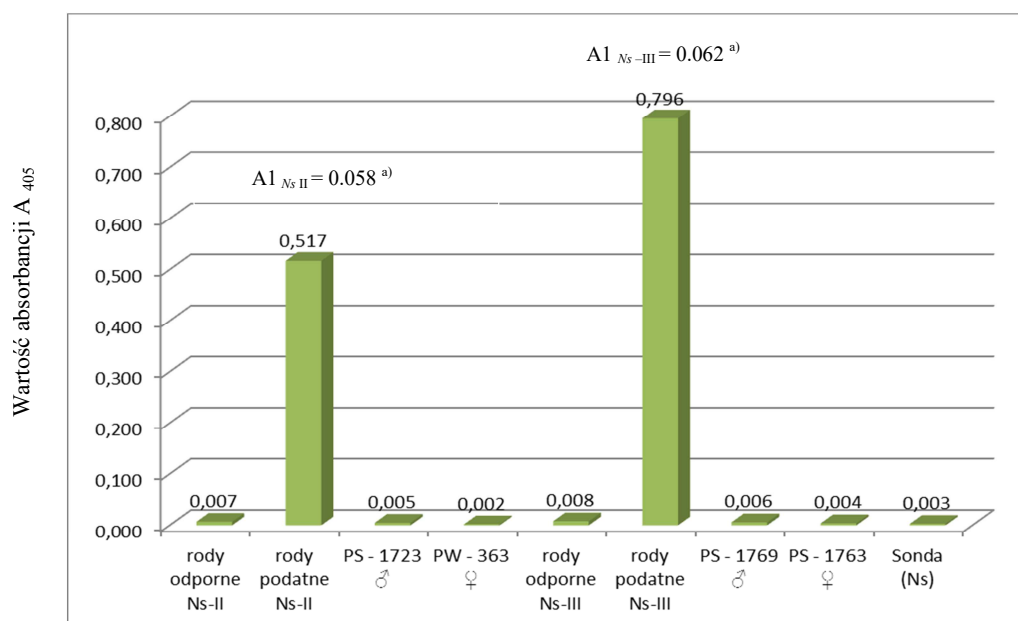
Ocena fenotypowa na wirus S ziemniaka rodów pochodzących z populacji 4x (*Ns*) — inokulacja mechaniczna roślin

Celem tematu była ocena fenotypowa poziomu odporności na wirus S ziemniaka rodów pochodzących z dwóch populacji tetraploidalnych, w których źródłem odporności na PVS był gatunek *S. tuberosum subsp. andigena*.

Wyniki

W ramach zadania 2 przeprowadzono ocenę odporności na PVS rodów pochodzących z dwóch populacji tetraploidalnych. Ocena porażenia pierwotnego pozwoliła wyróżnić rody odporne i podatne na PVS. Średnie wartości absorbancji A_{405} w grupie rodów odpornych, podatnych, wzorców i form rodzicielskich przedstawiono na rysunku 1. Badane rody, które posiadały średnie wartości absorbancji na poziomie lub poniżej wartości granicznej, zostały zaliczone wstępnie do grupy rodów najodporniejszych. Z 200

ocenianych rodów wyróżniono 154, które w porażeniu pierwotnym nie uległy zakażeniu PVS. Porażenie odnotowano dla 46 rodów ziemniaka. Z roślin badanych w roku 2018 zostały zebrane bulwy, aby w przyszłym sezonie ocenić porażenie wtórne.



a) wartość graniczna w teście ELISA dla populacji Ns-II i Ns-III

Rys. 1. Średnie wartości A₄₀₅ dla grupy rodów odpornych i podatnych na PVS z populacji Ns-II i Ns-III, form rodzicielskich i odmiany wzorcowej

Wnioski

- Z populacji Ns-II i Ns-III po ocenie porażenia pierwotnego wyróżniono rody, które nie uległy porażeniu PVS.
- Wytypowano 154 rody wstępnie uznane za odporne na PVS.
- Pomimo wysokich wartości A₄₀₅ w teście ELISA dla rodów podatnych, objawy fenotypowe na liściach roślin ziemniaka nie zawsze były obserwowane.

TEMAT 3

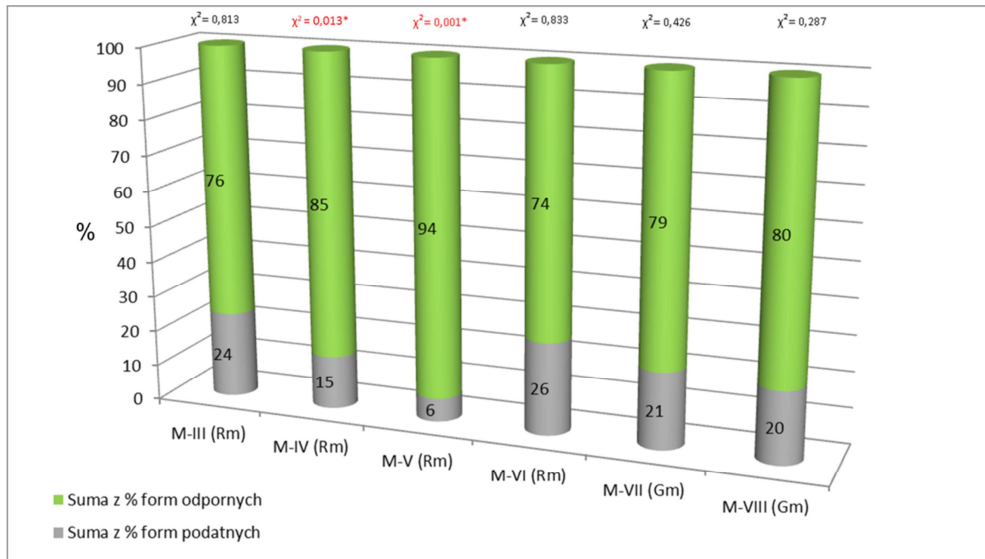
Ocena porażenia wtórnego rodów pochodzących z 6 populacji 4x zakażanych mechanicznie PVM w poprzednim sezonie

Celem tematu było wyróżnienie rodów 4x wysoko odpornych na wirus M ziemniaka.

Wyniki

W ramach tematu 3 przeprowadzono ocenę porażenia wtórnego rodów pochodzących z 6 populacji 4x z segregującym genem *Rm* z *S. megistacrolobum* i *Gm* z *S. gourlayi* zakażanych mechanicznie PVM. Ze wszystkich 580 ocenianych genotypów wyróżniono rody podatne na PVM (n = 48) i odporne (n = 538). W każdej z 6 ocenianych populacji

uzyskaliśmy przewagę form odpornych nad podatnymi. Dla czterech ocenianych populacji (M-III, M-IV, M-VII, M-VIII) uzyskano rozkład form odpornych i podatnych, zgodny z rozkładem oczekiwanym (3:1) (rys. 2). Zgodność wyników potwierdzono testem chi-kwadrat (χ^2). Rody wysoko odporne na PVM, z poprawną oceną cech morfologicznych, bez wad zewnętrznych i wewnętrznych zostały umieszczone w kolekcji genotypów odpornych na wirus M ziemniaka.



Rys. 2. Udział genotypów podatnych i odpornych na wirus M ziemniaka w 6 tetraploidalnych populacjach (wyniki dwuletnie)

Wnioski

- W testach oceniających porażenie wtórne wyróżniono z każdej populacji rody odporne na PVM.
- Frekwencja form odpornych do podatnych dla 4 populacji była zgodna z oczekiwaną.
- Rody odporne mogą zostać wykorzystane jako formy rodzicielskie, w przyszłych programach hodowlanych.

TEMAT 4

Ocena porażenia wtórnego rodów ocenianych w doświadczeniu szczegółowym:

- ocena porażenia wtórnego (testy ELISA) wytypowanych rodów 4x (*Rm* i *Gm*) poddanych kompleksowej ocenie odporności na wirus M ziemniaka w poprzednim sezonie.
- ocena porażenia wtórnego (analizy Real-Time PCR) wytypowanych rodów 4x (*Rm* i *Gm*) poddanych kompleksowej ocenie odporności na wirus M ziemniaka w poprzednim sezonie.

Celem tematu było do charakteryzowanie (poprzez ocenę porażenia wtórnego) reakcji odpornościowej wybranych rodów ziemniaka przy zastosowaniu różnych źródeł zmienności.

Wyniki

W ramach tematu 4 oceniano reakcję odpornościową na PVM 12 rodów należących do 4 populacji mających w swym pochodzeniu gen *Rm* i dwóch populacji z genem *Gm*. Porównywano wpływ kilku czynników (genotypu, szczepu wirusa i temperatury) na poziom porażenia oceniany po zakażeniu mechanicznym roślin i po szczepieniu. Ocena zawartości wirusa w komórkach roślinnych była oceniana w doświadczeniach na roślinach pochodzących z próby oczkowej (porażenie wtórne). Obecność PVM była oceniana w testach ELISA (Wasilewicz-Flis, 2001) i metodą Real-Time PCR. Wyniki z porażenia wtórnego dla rodów z populacji *Rm* i *Gm* potwierdziły poziom odporności uzyskany dla nich w porażeniu pierwotnym. Uzyskano bardzo wysoką korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi dla roślin z porażenia pierwotnego i wtórnego we wszystkich układach doświadczeń.

Wnioski

- Rody należące do populacji *Rm* i *Gm* w ocenie porażenia wtórnego potwierdziły swój poziom odporności na wirus M ziemniaka uzyskany z porażenia pierwotnego.
- Dla genotypu M-III-130 odnotowano istotny wpływ temperatury i szczepu na namnażanie się wirusa w komórkach roślinnych.
- Odporność na PVM pochodząca od *S. megistacrolobum* i warunkowana genem *Rm* w naszych badaniach nie była rasowo specyficzna. Wyjątek stanowił ród M-III-130.
- Odporność na PVM warunkowana genem *Rm* dla dwóch genotypów z populacji M-III w dużym stopniu zależała od temperatury inkubacji.
- Odporność na PVM pochodząca od *S. gourlayi* przejawia się w szerokiej skali temperatur i nie zależy od szczepu wirusa użytego do zakażeń oraz związana jest ze zjawiskiem tolerancji (brak objawów fenotypowych na roślinach i brak spadku wigoru roślin).
- Rody odporne z genem *Gm* mogą stanowić doskonały materiał hodowlany i wprowadzać do programów hodowlanych wysoki poziom odporności na PVM.
- Zakażenia mechaniczne roślin wydają się być wystarczające do przeprowadzenia fenotypowej oceny poziomu odporności na PVM.

LITERATURA

- 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.
- Wasilewicz-Flis I. 2001. Selekcja rodów hodowlanych odpornych na wirus M ziemniaka (PVM), w których odporność determinowana jest genami *Gm* i *Rm*. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, IHAR Monografie i Rozprawy Naukowe 10/2001: 49 — 51.

KRZYSZTOF TREDER**MATEUSZ MIELCZAREK****ANNA PAWŁOWSKA****BOGUMIŁA ZACHARZEWSKA****MARIA FEDCZAK**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii

Kierownik Tematu: dr Krzysztof Trederek Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie, Bonin 3, 76-009 Bonin, tel. 943423031 w. 207, e-mail: k.trederek@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 58.

Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka

Development of sensitive methods for detection of the most important potato viruses

Słowa kluczowe: test ELISA, RT-PCR, RT-LAMP, wirusy ziemniaka, wykrywanie, ziemniak

Sprawcami największych strat plonu w Polsce są: wirus ziemniaka Y (PVY, Y), wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV, L) oraz wirus ziemniaka M (PVM, M). Głównym celem Zadania nr 58 jest opracowanie czułych metod wykrywania tych wirusów w różnych tkankach ziemniaka. Cel ten jest realizowany w postaci pięciu 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 za pomocą koktajl i DAS ELISA. (IV) Adaptacja i optymalizację metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach *in vitro*. (V). Opracowanie testów diagnostycznych do szybkiego wykrywania wirusów.

Zdrowotność sadzeniaków jest oceniana za pomocą tzw. próby oczkowej, która stanowi połączenie testu biologicznego z immunologicznym. Próba oczkowa polega na wycięciu fragmentów bulw z pojedynczymi oczkami, chemicznym przerwaniu ich spoczynku, podkiełkowaniu w 21°C w ciemności, a następnie wysadzeniu w szklarni

i wykonaniu testu DAS-ELISA wg Clark i Adams (1977) z użyciem soku z próbek liści pobranych z 4–6 tyg. roślin. Wykrywanie wirusów metodą ELISA prowadzone jest metodą pośrednią z roślin, ze względu na znaczący wzrost koncentracji cząstek wirusa w roślinach, co zwiększa szansę na wykrycie testem ELISA wirusów o bardzo niskiej koncentracji w bulwach. Bezpośrednie badanie bulw byłoby optymalne, jednak Hill i Jackson (1984) wykazali, że czułość testu ELISA jest za mała do wykrycia wirusów w bulwach. Podejmowano próby zwiększenia czułości tego testu. Wstępne wyniki wskazywały, że koktajlowa wersja testu umożliwia wykrywanie PVY i PLRV w bulwach (Treder i in., 2009). Wieloletnie badania prowadzone w ramach Zadania nr 58 wykazały, że test był wiarygodny jedynie dla PLRV i PVM. W przypadku PVY uzyskiwano zarówno wyniki zgodne z próbą oczkową, jak również wykazujące mniejszą skuteczność testu w porównaniu z próbą oczkową. W celu wyjaśnienia tej rozbieżności podjęto badania nad wpływem odporności odmian na skuteczność wykrywania wirusów w bulwach. Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników stwierdzono, że wzrost odporności odmian ma negatywny wpływ na wykrywalność PVY. W celu zwiększenia czułości testu prowadzone są prace nad możliwością wykorzystania różnych metod zagęszczania cząstek wirusowych z większych objętości. Obiecujące wyniki uzyskano stosując cząstki magnetyczne pokryte przeciwciałami. Obecnie badana jest możliwość wykorzystania membran jonowymiennych w tym samym celu.

Alternatywą dla próby oczkowej może być test na kielkach opracowany dla PLRV przez Syllera (1988). W Zadaniu nr 58 prowadzone są prace nad wykrywaniem wirusów Y, M i L w tym organie. Potwierdzono dobrą zgodność wykrywania wirusów Y, M i L w kielkach z próbą oczkową. Do wykrywania w bulwach można także stosować testy molekularne — RT-PCR lub RT-LAMP, (Singh i in., 1995; Boonham i in., 2008). Koszt testów molekularnych można obniżyć zastępując komercyjne zestawy do izolacji RNA krzemionką (Zacharzewska i in., 2014) lub cząstkami magnetycznymi (Treder i in., 2018).

Metody molekularne mogą być również przydatne do oceny stanu zdrowia roślin wprowadzanych do kolekcji zasobów genowych ziemniaka. Taką kolekcję (Bank Genów Ziemniaka) posiada Pracownia Zasobów Genowych i Kultur *in vitro*, wchodząca w skład Oddziału IHAR — PIB w Boninie. Rutynowa ocena kolekcji na obecność wirusów wykonywana jest za pomocą ELISA. Koszt testu RT-PCR jest zbyt wysoki do oceny kolekcji. Można go obniżyć stosując multipleksowy wariant (m-RT-PCR) testu (Du i in., 2008). W ramach Zadania nr 58 opracowano wariant klasycznego m-RT-PCR do jednoczesnego wykrywania Y, M i L w tej samej próbce. Za pomocą opracowanego testu stwierdzono, że przebadane 150 genotypy ziemniaka z kolekcji podstawowej Banku Genów są wolne od wirusów Y, M i L. Dalsze usprawnienie testu wymaga opracowania m-RT-PCR w czasie rzeczywistym.

Rozwój metod izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych umożliwił opracowanie metod diagnostycznych, które można wykonać poza laboratorium (Boonham i in., 2008). W ramach Zadania nr 58 opracowano szybki test fluorescencyjny RT-LAMP do wykrywania PVY (Przewodowska i in., 2015) oraz jego czulszy wariant, umożliwiający różnicowanie serotypów PVY (Treder i in., 2018) i kolorymetryczne wykrywanie wirusa poprzez obserwację zmiany barwy badanych prób (Treder i in.,

2017). Zmiana barwy była specyficzna dla prób RNA izolowanego z roślin z wirusem i nie zachodziła w próbach, do których dodawano RNA z roślin zdrowych. Opracowano również procedurę wykrywania wirusów Y, M i L za pomocą testu RT-LAMP bezpośrednio w soku z roślin, bez izolacji RNA. Metoda działała dobrze we fluorescencyjnej wersji RT-LAMP. W kolorymetrycznym RT-LAMP, zmiana barwy następowała zarówno po dodaniu do prób soku wyciśniętego z roślin z badanymi wirusami, jak i po dodaniu soku z roślin zdrowych.

Celem projektu w 2018 r. było: (I) opracowanie metody zagęszczania wirusów z większych objętości poprzez wiązanie cząstek wirusa na membranach jonowymiennych, (II) zbadanie, czy odporność odmian wpływa na wykrywalność wirusów bezpośrednio w bulwach, (III) ocena przydatności kielków do wykrywania wirusów, (IV) opracowanie multipleksowego RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, M i L; (V) opracowanie metody przygotowania soków do RT-LAMP, eliminującej z soku czynniki wywołujące zmianę barwy błękitu hydroksynaftolowego (HNB).

W roku 2018 w ramach prac nad metodą zagęszczania wirusów z większych objętości na membranach jonowymiennych stwierdzono, że PVM wiązał się silnie a PLRV słabo ze złożem Q. Oba wirusy nie wiązały się ze złożem S. W skład populacji PVY wchodziły wiriony o słabym i silnym wiązaniu do złoża Q oraz o słabym i silnym wiązaniu do złoża S. Zagęszczanie cząstek wirusów na membranie Q miało pozytywny wpływ na wykrywanie PVY. Dla PVM zabieg ten zwiększał dwukrotnie czułość wykrywania wirusa, jednak negatywnie wpływał na wysokość absorbancji w teście ELISA. Zateżnienie cząstek wirusa nie powiodło się dla PLRV, prawdopodobnie z uwagi na słabe oddziaływanie tego wirusa ze złożem Q w zastosowanych warunkach. W 2018 r. w doświadczeniu polowym porażenie PVY było wysokie w porównaniu z ubiegłymi sezonami a porażenie PVM i PLRV bardzo niskie, podobnie jak w ubiegłych sezonach. Dla PVY potwierdzono wpływ odporności odmian na spadek wykrywalności wirusa w bulwach. Badając wykrywalność wirusów w bulwach i kielkach ziemniaka potwierdzono dobrą zgodność wykrywania wirusów w kielkach z próbą oczkową. Wyższą skutecznością wykazał się test koktajl ELISA niż DAS-ELISA dla kielków. Stwierdzono wyższą skuteczność wykrywania PVM bezpośrednio w bulwach niż za pomocą próby oczkowej. Test RT-qPCR był bardziej skuteczny w ocenie porażenia liści, kielków i bulw wirusem Y niż RT-LAMP i DAS-ELISA. Wyniki prac nad optymalizacją metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach *in vitro* w 2018 r. potwierdziły, że pojedynczy RT-PCR w czasie rzeczywistym pozwalał na wykrycie wszystkich badanych wirusów. Multipleksowy test RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, L i M wymaga dalszych badań. W roku 2018 wykazano, że stosując chloroform można wizualnie wykrywać PVY za pomocą kolorymetrycznego testu RT-LAMP z barwnikiem HNB bez izolacji RNA z badanych prób. Dodanie do prób alfa-kazeiny istotnie skracало czas wykrycia w próbach o niskiej koncentracji PVY. Czułość wizualnej detekcji z HNB była taka sama jak czułość wykrywania PVY za pomocą fluorescencyjnego testu RT-LAMP.

LITERATURA

- Boonham N., Glover R., Tomlinson J., Mumford R. 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 355 — 363.
- Clark M. F., Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475 — 483.
- Du Z., Chen J. and Hiruki C. 2006. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Disease* 90: 185 — 189.
- Hill S. A., Jackson E. A. 1984. An investigation of the reliability of ELISA as a practical test for detecting potato leafroll virus and potato virus Y in tubers. *Plant Pathol.* 33: 21 — 26.
- 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. *Am. J. Potato Res.*, 92: 303 — 311.
- Singh R. P., Kurz J, Boiteau G., Bernard G. 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J. Virol. Methods* 55: 133 — 43.
- Syller J. Detection of potato leaf roll virus in intact sprout disks by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Phytopathology*, 121: 58 — 64.
- 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. DOI:10.1007/s00705-017-3635-3, *Archives of Virology* 163: 447 — 458.
- 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 Breed. Seed Sci.* 75: 77 — 85.
- Treder K., Przewodowski W., Barnyk A. 2009. Factors influencing detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tuber extracts. *Plant Breed. Seed Sci.* 59: 65 — 74.
- 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.

WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI

KATARZYNA SALAMOŃSKA

DOROTA SZAREK

DOROTA MICHAŁOWSKA WIOLETA STOCHŁA

AGNIESZKA PRZEWODOWSKA

GRZEGORZ GRYŃ

MILENA PIETRASZKO

KATARZYNA FRANKE

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: dr hab. inż. Włodzimierz Przewodowski Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział W Boninie, 76-009 Bonin 3, tel. 94 3423031 w. 211,

e-mail: w.przewodowski@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 57.

**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**

Słowa kluczowe: bakterioza pierścieniowa ziemniaka, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*,
diagnostyka, nowoczesne metody, próby środowiskowe, ziemniak

CEL TEMATU ORAZ PROWADZONYCH BADAŃ

Celem realizowanego projektu było opracowanie materiałów i procedur do selektywnej izolacji kwarantannowej bakterii — *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) z różnych prób środowiskowych oraz opracowanie i weryfikacja wysoce czułych i specyficznych metod identyfikacji tej bakterii.

Założony cel osiągnięto poprzez realizację założeń poszczególnych tematów badawczych projektu.

OPIS WYNIKÓW

Wyniki uzyskane w temacie 1 pozwoliły na opracowanie materiałów do konstrukcji immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z badanych prób. Na podstawie opracowanych antygenów, w procesie immunizacji królików uzyskano 3 surowice z IgG anty-Cms, które po oczyszczeniu badano pod kątem czułości i specyficzności względem stosowanych szczepów bakteryjnych. Do opracowania immunopodłoża użyto przeciwciał dających najlepszy stosunek miana do specyficzności. Opracowane materiały pozwoliły na opracowanie funkcjonalnego immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z soku ziemniaka w warunkach laboratoryjnych oraz polowych.

Badania związane z weryfikacją metody izolacji DNA z zawiesin Cms o różnej zawartości śluzów bakteryjnych, potwierdziły skuteczność opracowanej metody zarówno w obecności wody, jak i komponentów soku ziemniaka. Jakość wyizolowanego DNA oceniano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego oraz analizy elektroforegramów zawierających produkty amplifikacji DNA po przeprowadzeniu testu PCR. W porównaniu do zalecanej obecnie metody izolacji DNA, którą stosowano jako odnośną, opracowana metoda pozwalała na uzyskanie wyższej czułości w przypadku prób z wody, ale była jednocześnie bardziej wrażliwa na komponenty soku ziemniaka. Wprowadzenie modyfikacji w opracowanej metodyce w trakcie izolacji DNA z ekstraktów roślinnych pozwoliło na uzyskanie czułości adekwatnej do metody odnośnej.

Wyniki uzyskane w ramach tematu 3 związane z porównaniem stopnia porażenia badanych roślin oraz bulw potomnych pozwoliły potwierdzić funkcjonalność opracowanych materiałów oraz metodyki izolacji DNA. Badane odmiany wykazały podobnie jak w poprzednim roku zróżnicowaną podatność na sztuczną inokulację bakteriami Cms obu szczepów. Pomimo odmiennych do poprzednich lat warunków pogodowych, stopień porażenia bakteriami Cms zależał zarówno od stosowanego profilu glebowego, jak i użytego do inokulacji szczepu Cms. Wyniki wskazały na większą efektywność szczepu silnie mukoidalnego. Najmniejszą podatność uzyskano dla odmian Courage i Ikar, natomiast największe porażenie bulw zanotowano u odmian Gwiazda i Sagitta. Stosowanie profilu glebowego miało wpływ na wysokość plonu i liczbę bulw potomnych. Metody IFAS i PCR w znacznym stopniu korelowały ze sobą potwierdzając wyższy indeks porażenia prób z bulw, niezależnie od wykrywanego szczepu Cms.

Wyniki badań uzyskane w ramach tematu 4, pozwoliły ocenić wpływ obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin *in vitro*. Badane odmiany wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność poszczególnych szczepów bakterii Cms. W porównaniu do wcześniejszych badań z użyciem mieszaniny 3 szczepów Cms, przy zastosowaniu pojedynczych szczepów i analogicznych koncentracji komórek bakterii w mieszaninie inokulacyjnej, oddziaływanie fitotoksyczne było znacznie słabsze. Obecność bakterii Cms oceniona testem PCR potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych, często pomimo braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach oraz zamgleń w podłożach wskazujących na silne porażenie bakteriami Cms.

Badania dotyczące zapobiegania kontaminacjom bakteriami Cms podłoży stosowanych do hodowli roślin *in vitro* ziemniaka, pozwoliły na ocenę wpływu obecności koloidu złota na działanie mieszaniny dwóch innych koloidów o działaniu antymikrobiologicznym. Obserwowano różną wrażliwość badanych odmian ziemniaka na mieszaninę koloidów, zależnie od stosowanej koncentracji. Niższe stężenia badanych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi, natomiast zwiększenie koncentracji nanocząsteczek w mieszaninie powodowało wyższą aktywność antymikrobiologiczną w stosunku do Cms.

WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

1. Przeciwciała skierowane na komórki bakterii Cms uzyskane w ramach pierwszego z tematów badawczych w porównaniu z IgG z roku 2017 roku cechowały się wysoką specyficnością oraz relatywnie niższym mianem wobec badanych bakterii Cms. Odpowiednia modyfikacja podłoży oraz zastosowanie opracowanych w roku poprzednim IgG pozwoliły na opracowanie powtarzalnego immunopodłoża do specyficznej izolacji komórek bakterii Cms niezależnie od stopnia mukoidalności badanych szczepów Cms, jak również wczesności i zawartości skrobi badanych odmian ziemniaka. Opracowany test immuno-PCR w porównaniu do poprzedniego roku został ulepszony, ale wymaga jeszcze dopracowania i optymalizacji w celu poprawienia czułości.
2. Badania dotyczące opracowania warunków izolacji DNA bakteryjnego pozwoliły porównać i wyznaczyć warunki, przy których uzyskano najwyższą i najniższą czułość testu PCR bakterii Cms izolowanych z wody oraz z ekstraktu z bulw ziemniaka. Z uwagi na znaczne oddziaływanie inhibitorów reakcji PCR w próbach z ekstraktu ziemniaka, do dalszych badań w ramach zadania wybrano metodę wysokosolną z proteinazą K stosując 10-krotne rozcieńczenie izolowanego DNA.
3. W temacie trzecim wykazano zróżnicowaną podatność badanych odmian na sztuczną inokulację badanymi szczepami bakterii Cms. Odmianami najmniej podatnymi na porażenie roślin i bulw potomnych przez badane szczepy Cms były Courage, Ikar i Jurek, natomiast porażenie bulw w wysokim stopniu obserwowano u odmian Annabelle, Gwiazda i Sagitta. Wysokie porażenie pędów przekładało się na wysokie porażenie plonu. Obserwowane w trakcie wegetacji zmiany w postaci chloroz na liściach u odmian Sagitta i Gwiazda potwierdzone zostały wysokim indeksem porażenia obliczonym na podstawie obserwacji mikroskopowej. Wyższy indeks porażenia łodyg i bulw stwierdzono w preparatach pochodzących z roślin, których sadzeniaki były inokulowane mukoidalnym szczepem Cms NCPPB 4053 i były uprawiane na glebie ciężkiej, gliniastej profilu VI. Metody IFAS i PCR w znacznym stopniu korelowały ze sobą potwierdzając wyższy indeks porażenia prób z bulw, niezależnie od wykrywanego szczepu Cms.
4. Badania przeprowadzone w ramach kolejnego zadania pozwoliły ocenić wpływ obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin

- in vitro*. Badane odmiany wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność poszczególnych szczepów bakterii Cms. Najbardziej wrażliwą odmianą była się odmiana Sagitta, natomiast najmniej podatną na obecność badanych szczepów Cms, odmiana Courage. Obecność bakterii Cms oceniona testem PCR potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych często pomimo braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach oraz zamgleń w podłożach wskazujących na silne porażenie bakteriami Cms.
5. W ramach tematu 5 oceniono wpływ obecności koloidu złota na działanie mieszaniny koloidów srebra i miedzi na bakterie Cms, jak również na wzrost i namnażanie badanych roślin *in vitro*. Obecność złota zwiększyła działanie toksyczne nanocząsteczek w stosunku do mukoidalnego szczepu patogenicznych bakterii Cms już przy koncentracji 0,1% docelowego stężenia nanocząsteczek w podłożu mikrobiologicznym. Obserwowano różną wrażliwość badanych odmian ziemniaka w postaci kultur *in vitro* na mieszaninę koloidów, zależnie od stosowanej koncentracji. Niższe stężenia badanych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

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.
- Gryń G., Pastuszewska T., Przewodowski W. 2016. Ocena patogeniczności wybranych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* pochodzących z kolekcji NCPPB w Wielkiej Brytanii. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 56 (1): 73 — 78. DOI: 10.14199/2016-013.
- Nowacki W. 2009. Problemy profilaktyki i zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka wywoływanej przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 49 (2): 678 — 685.
- Pastuszewska T., Gryń G., Franke K. 2010. Podatność odmian ziemniaka na porażenie przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 50: 244 — 248.
- Pastuszewska T., Gryń G. 2012. Przeżycie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na powierzchniach wybranych materiałów w warunkach różnych temperatur. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 52 (2): 443 — 446.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9629-6>.
- Przewodowski W. 2009. Nowoczesne metody w diagnostyce bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 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*. PLoSONE12(1):e0169785. DOI:10.1371/journal.pone.0169785.
- Salamońska K., Stochła W., Przewodowski W. 2016. Nowoczesne metody diagnostyczne w identyfikacji molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka Ziemn. Pol. 2016, 4: 41 — 45.
- Stochła W., Przewodowski W., Przewodowska A. 2014. Wybrane metody otrzymywania przeciwciał służących do wykrywania i identyfikacji patogenów ziemniaka. Ziemn. Pol. 3: 46 — 49.

- Stochła W., Przewodowska A., Przewodowski W. 2015. Przydatność przeciwciał króliczych uzyskiwanych dwiema metodami do wykrywania *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* testem DAS-ELISA. Prog. Plant Prot. /Post. Ochr. Rośl. 55: 352 — 357.
- 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.

MARCIN WIT¹
PIOTR OCHODZKI²
ROMAN WARZECHA²
ADA ZAWADZKA²
MONIKA ŻUREK²
EWA MIRZWA-MRÓZ¹
EMILIA JABŁOŃSKA¹
DOROTA BYLICKA¹
JÓZEF ADAMCZYK³
ANNA ROGACKA³
JANUSZ ROGACKI³
KRZYSZTOF WÓJCIK⁴
WOJCIECH WAKULIŃSKI¹

¹ Samodzielny Zakład Fitopatologii, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie

³ Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Smolice 146, 63-740 Kobylin

⁴ Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Stacja Hodowli Roślin Kobierzyce, ul. Sportowa 21, 55-040 Kobierzyce

Kierownik Tematu: dr Marcin Wit Samodzielny Zakład Fitopatologii, Wydział Ogrodnictwa, Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, tel. 22 5932034; e-mail: marcin_wit@sggw.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.802.17.2018, Zadanie nr 92.

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**

Słowa kluczowe: amylose content, *Fusarium temperatum*, mycotoxins, *Zea mays*

Fuzarioza kolb kukurydzy jest uważana za jeden z najważniejszych problemów w uprawie tej rośliny. Szkodliwość choroby polega na znaczącym spadku plonu,

uzyskiwaniu ziarna gorszej jakości oraz jego zanieczyszczeniem metabolitami wtórnymi *Fusarium* spp. Jest to choroba o złożonej etiologii, a wśród czynników sprawczych wymienia się między innymi: *Fusarium graminearum*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium avenaceum*, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium subglutinans* i *Fusarium proliferatum*. O ile ocena znaczenia wymienionych gatunków była przedmiotem licznych analiz i opracowań, o tyle wiedza na temat porażenia kukurydzy (odmian, linii hodowlanych) przez *Fusarium temperatum* jest fragmentaryczna (Gromadzka i in., 2017; Scauftaire i in., 2011).

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*. Wiarygodność diagnostyki była potwierdzana molekularnie. Analiza molekularna opierała się na sekwencjonowaniu *EF-1 α* oraz *β -tubuliny* uznawanych za podstawowe markery barkodingu.

Celem badań w 2018 r. była:

- ocena podatności linii hodowlanych *Zea mays* na porażenie przez *Fusarium temperatum*,
- analiza profilu metabolitów wtórnych występujących w materiale roślinnym porażonym przez *Fusarium temperatum*,
- analiza populacji *Fusarium temperatum* w zakresie cech istotnych w patogenezie i epidemiologii fuzariozy kolb kukurydzy.

WYNIKI BADAŃ

W badanej populacji izolatów *F. temperatum* frekwencja występowania dopełniających typów kojarzeniowych MAT1-1 i MAT1-2 wyniosła odpowiednio 35 do 35.

Ocenę patogeniczności przeprowadzono dla 70 izolatów *F. temperatum* w warunkach szklarniowych. Stwierdzono istotne zróżnicowanie tej cechy w obrębie badanej populacji patogenów. Izolatami dającymi najbardziej rozległe zmiany na pędach inokulowanych roślin były izolaty: Pft-349, Pft-362, Pft-363, Pft-352 oraz Pft-322. Stanowiły one podstawę do badań podatności genotypów kukurydzy przez *F. temperatum*.

W 2018 r. porażenie kolb badanych 120 genotypów kukurydzy oceniane w dwóch lokalizacjach (Hodowla Roślin Smolice i IHAR — PIB Radzików oraz Małopolska Hodowla Roślin Oddział w Kobierzycach oraz IHAR — PIB Radzików) było na poziomie średnim. Zakres zmienności analizowanej cechy wahał się od 0,54 (dla genotypu S-20) do 2,88 w przypadku genotypu o numerze kodowym K-47.

Średni stopień porażenia materiałów pochodzących z hodowli MHR Kobierzyce (1,56) i HRS Smolice (1,39) różnił się znacznie i różnica ta przy $\alpha = 0,05$ była statystycznie istotna ($F = 51,44$ $p = 0,0000$).

Formy flint pochodzące z hodowli MHR Kobierzyce były porażone w zakresie od 0,80 do 2,28, natomiast dent od 0,85 do 2,88. Formy flint pochodzące z hodowli HRS Smolice były porażone w zakresie 0,54 do 2,35, natomiast dent od 1,03 do 2,03.

Stopień porażenia pochodzących z hodowli A (Smolice i Radzików) i B (Kobierzycy i Radzików) różnił się nieznacznie, lecz różnica ta była istotna statystycznie. W przypadku materiału roślinnego pochodzącego z hodowli A i B średni stopień porażenia kolb wynosił odpowiednio 1,39 i 1,56 ($F = 51,44$ $p = 0,0000$).

W przypadku materiałów pochodzących z hodowli HRS Smolice, testowanych w Smolicach i Radzikowie (hodowla A) zmienność porażenia kolb badanych genotypów wahała się od 0,54 dla genotypu o numerze kodowym S-20 do 2,35 dla genotypu o numerze S-30. Formy flint pochodzące z tej hodowli były porażone w zakresie od 0,54 do 2,35, natomiast dent od 1,03 do 2,03.

Zakres zmienności badanej cechy dla materiałów pochodzących z hodowli MHR Kobierzycy, testowanych w Kobierzycach i Radzikowie (hodowla B) wahał się od wartości 0,80 dla genotypu o numerze kodowym K-26 do 2,88 dla genotypu K-47. Formy flint pochodzące z tej hodowli były porażone w zakresie 0,80 do 2,28, natomiast dent od 0,85 do 2,88.

Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji, z ryzykiem błędu $\alpha = 0,05$ stwierdzono istotny wpływ warunków środowiska na stopień porażenia badanych genotypów kukurydzy ($F = 40,41$ $p = 0,000$). Średni stopień porażenia materiałów badanych w Radzikowie wynosił 1,38 i był istotnie mniejszy niż w Smolicach (1,51) i Kobierzycach (1,64).

Na podkreślenie zasługuje stwierdzenie mniejszej podatności na porażenie form flint niż dent. Stopień porażenia roślin wynosił odpowiednio 1,38 i 1,57. Zależność taką obserwowano w przypadku trzech lokalizacji doświadczenia, tj. Smolice i Radzików. Porażenie form dent i flint wynosiło odpowiednio:

- w Smolicach 1,58 i 1,43 ($F = 9,70$ $p = 0,0018$),
- w Radzikowie 1,45 i 1,30 ($F = 20,90$ $p = 0,0000$),
- w Kobierzycach 1,81 i 1,47 ($F = 39,39$ $p = 0,0000$).

Różnice w trzech lokalizacjach doświadczenia były istotne statystycznie.

Udział amylozy w strukturze skrobi ziarniaków form dent i flint, materiałów pochodzących z Hodowli Smolice wynosił 30,91% i 31,53%, różnił się znacznie i różnica ta była statystycznie istotna ($F = 13,54$ $p = 0,0002$).

Udział amylozy w strukturze skrobi ziarniaków form dent i flint, materiałów pochodzących z Hodowli MHR Kobierzycy wynosił 30,57% i 31,39%, różnił się znacznie i różnica ta przy $\alpha = 0,05$ była statystycznie istotna ($F = 11,36$ $p = 0,0007$).

W poszczególnych lokalizacjach doświadczeń połowych udział amylozy w ziarniakach form flint kukurydzy był istotnie wyższy niż dent. Zależność tę zanotowano w przypadku dwóch lokalizacji doświadczenia, tj. Smolic i Radzikowa. Udział amylozy w ziarniakach form dent i flint wynosił odpowiednio w Smolicach 29,99% i 31,76% ($F = 84,03$ $p = 0,0000$), w Radzikowie 31,47% i 32,15% ($F = 13,33$ $p = 0,0003$). Natomiast udział amylozy w ziarniakach form dent i flint w Kobierzycach wynosił odpowiednio 30,05% i 29,77% ($F = 0,56$ $p = 0,4539$), tym samym różnica ta nie była istotna statystycznie.

Zarówno w porażonych ziarniakach pochodzących z doświadczeń inokulacyjnych, jak również w warunkach *in vitro* wykazano, że dominującą grupą mykotoksyn

biosyntetyzowanych przez izolaty *F. temperatum* są związki heksadepsyptydowe, tj. bowerycyna (BEA) i eniatyny (ENN).

WNIOSKI

1. Badane materiały hodowlane różnią się podatnością na porażenie przez *Fusarium temperatum*.
2. Formy dent są bardziej podatne na porażenie przez *Fusarium temperatum*, niż flint wśród badanych materiałów hodowlanych kukurydzy.
3. Formy flint i dent różnią się pod względem udziału amylozy w strukturze skrobi.
4. Istotny wpływ na zawartość amylozy w skrobi mają warunki środowiska.
5. Sekwencje *EF-1α* oraz *β-tubulina* umożliwiają jednoznaczną diagnostykę *Fusarium temperatum*.
6. Z uwagi na znaczenie *Fusarium temperatum* za celowe należałoby uznać podjęcie prac zmierzających do opracowania markerów SCAR dla wspomnianego gatunku.

LITERATURA

- Gromadzka K., Wit M., Górna K., Chełkowski J., Waśkiewicz A., Ochodzki P., Warzecha R. 2017. Fumonisin and related *Fusarium* species in pre-harvest maize ear rot in Poland. *Cereal Res. Comm.* 45 (1): 93 — 103.
- Scauflaire J., Mahieu O., Louveaux J., Foucart G., Renard F., Munaut F. 2011. Biodiversity of *Fusarium* species in ears and stalks of maize plants in Belgium. *Eur. J. Plant Pathol.* 131: 59 — 66.

HENRYK BUJAK¹**KAMIŁA NOWOSAD**²**AGNIESZKA ŁĄCKA**¹**JERZY NAWRACAŁA**²**AGNIESZKA TOMKOWIAK**²**DANUTA KURASIAK-POPOWSKA**²**DOROTA WEIGT**²¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa² Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli RoślinKierownik Tematu: prof. dr hab. Henryk Bujak Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, 50-363 Wrocław, Plac Grunwaldzki 24A, tel. 71 3201829, e-mail: henryk.bujak@upwr.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.802.14.2018, Zadanie 34.

Określenie zróżnicowania genetycznego linii wsobnych kukurydzy za pomocą markerów molekularnych

Evaluation of genetic diversity of inbred maize lines using molecular markers

Słowa kluczowe: heterozja, kukurydza, linie wsobne, markery molekularne, podobieństwo genetyczne

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 powtarzalne ze względu na budowę starterów, a ich użycie jest stosunkowo niedrogi. Polimorfizm uzyskany dzięki zastosowaniu wymienionych systemów molekularnych pozwolił na rozróżnienie linii pochodzących z odmiennych 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 maksymalizacji 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 w 2018 roku były wyprowadzone w polskich spółkach hodowlanych 94 linie wsobne kukurydzy. Badane linie charakteryzowały się zróżnicowanym pochodzeniem i zostały uzyskane z materiałów będących w dyspozycji hodowli i cechowały się brakiem pokrewieństwa. Podstawę klasyfikacji tych linii stanowiła budowa ziarniaka i można je było wstępnie podzielić na formy o ziarnie zębokszałtnym (*dent*) oraz szklistym (*flint*). W trakcie trwania zadania przeanalizowano łącznie 476 linii wsobnych kukurydzy pochodzących z polskich hodowli (Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR, Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o. Oddział Koberzyce). Analizowane linie wykazywały duże zróżnicowanie pod względem cech morfologicznych, jak i użytkowych, co potwierdzono stosując jedno- i wielocechowe narzędzia statystyczne.

Do analizy zróżnicowania genetycznego wykorzystane zostały początkowo markery molekularne typu RAPD oraz 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. Następnie w trakcie 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 2018 roku do określenia zróżnicowania genetycznego linii kukurydzy zastosowano dwa różne systemy markerowe (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.

Na podstawie obliczonych dystansów genetycznych wybrano komponenty rodzicielskie do krzyżowań w celu uzyskania mieszańców eksperymentalnych, które umożliwiły określenie związków pomiędzy dystansem linii rodzicielskich a efektem heterozji mieszańców F_1 . 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 wielocechowym 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, niskie koszty analiz oraz 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.

DOMINIKA BOGUSZEWSKA-MAŃKOWSKA¹

KRYSTYNA ZARZYŃSKA¹

KRZYSZTOF TREDER²

BOGUMIŁA ZACHARZEWSKA²

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

¹ Zakład Agronomii Ziemiaka w Jadwisinie

² Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemiaka w Boninie

Kierownik Tematu: dr Dominika Boguszevska-Mańkowska Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin —

Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział Jadwisin, ul. Szaniawskiego 15, 05-140 Serock,

tel. 22 7826620 w. 108, e-mail: d.boguszevska-mankowska@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 59.

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

Słowa kluczowe: odmiana, susza glebowa, wysoka temperatura, ziemniak

Badania Mittlera i in. (2006) wykazały, że straty w produkcji rolniczej USA spowodowane suszą wyniosły około 20 bilionów USD w latach 1980–2004, natomiast łącznym wystąpieniem suszy i wysokiej temperatury aż 120 bilionów USD. Obecnie stosowane techniki dotyczą atestacji roślin odpornych na działanie pojedynczego niekorzystnego czynnika środowiska. Dlatego, istnieje pilna konieczność podjęcia badań nad reakcją roślin na łączne działanie więcej niż jednego czynnika środowiska modyfikującego wzrost i rozwój roślin, a tym samym wielkość i jakość plonu rolniczego. Ponadto w celu aplikacji wyników w/w badań, zasadne jest podjęcie próby identyfikacji takich enzymów, których aktywność pod wpływem stresu zmienia się w znaczącym stopniu i różnicuje odmiany odporne i podatne na niedobory wody. Ten sposób podejścia powinien pozwolić na opracowanie mikroplątkowych metod oznaczania aktywności, umożliwiających szybką ocenę odporności odmian na stresy.

Dużą rolę w odporności roślin na suszę glebową odgrywa system korzeniowy. Próby znalezienia korelacji między wielkością systemu korzeniowego a wielkością plonu podejmowane były przez wielu badaczy, nie wszystkim jednak udało się uzyskać proste zależności (Leszczynski i Tanner, 1976; Opena i Porter, 1999; Aspray i in., 1983; Parker i in., 1989; Stalham i Allen, 2001; Vos i Groenvald, 1986; Zarzyńska i in., 2017). W pracy przeglądowej dotyczącej badań nad systemem korzeniowym ziemniaka Iwama (2008) stwierdza wprawdzie, że masa korzeni generalnie wskazuje pozytywne korelacje z plonem bulw. Rozpoznanie i określenie wielkości i zasięgu systemu korzeniowego u różnych odmian daje możliwość skierowania w rejony o częstszych niedoborach opadów odmian, które warunki takie mogą znosić łatwiej, a więc z mniejszym uszczerbkiem dla plonu. Informacje o wielkości systemu korzeniowego mogą stanowić dobrą wskazówkę dla hodowców.

Celem podjętych badań było wytypowanie odmian o różnej wrażliwości na suszę glebową, wysoką temperaturę, poznanie zależności pomiędzy 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 stresy 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. Na podstawie naszych wyników można wybrać odmiany o małych zmianach morfologicznych pod wpływem stosowanych stresów jak Lech, Laskara i odmiany o dużych zmianach: Lawenda i Jurata.

Na podstawie dotychczas prowadzonych badań zaobserwowano, że zarysowuje się zależność pomiędzy wielkością systemu korzeniowego a wielkością masy nadziemnej rośliny i plonem bulw. Jak wykazano, odmiany ziemniaka różnią się zarówno wielkością całej masy korzeniowej, jak i dystrybucją korzeni w poszczególnych warstwach gleby. W naszych badaniach nie stwierdzono istotnych zależności między wielkością systemu korzeniowego a plonem bulw pochodzącym z kombinacji gdzie nie stosowano suszy glebowej, większą korelację zanotowano z plonem bulw z kombinacji, w której zastosowano suszę glebową, a jeszcze większą ze spadkiem plonu między kombinacją kontrolną i z zastosowaną suszą. Była to oczywiście zależność odwrotna tj. im większy system korzeniowy tym mniejszy spadek plonu. Wykazano, również że im większy udział masy korzeni w całej biomase rośliny i im niższy stosunek części nadziemnej do podziemnej tym wyższa tolerancja odmiany na niedobór wody.

Badania biochemiczne sześciu odmian ziemniaka o różnej tolerancyjności na suszę wykazały, że najwyższy wzrost stężenia L-proliny pod wpływem stresu suszy w wysokiej temperaturze (38°C) zaobserwowano dla odmiany Bogatka. Koncentracja L-proliny dla tej odmiany wzrosła sześciokrotnie w piątym dniu suszy w 38°C. Przy optymalnych warunkach temperaturowych 21°C nie zaobserwowano znaczącego podwyższenia stężenia L-proliny zarówno w przypadku kontroli, jak i suszy. Zauważono niewielki wzrost stężenia L-proliny u roślin poddanych stresowi suszy i temperatury 38°C w przypadku odmian Gawin i Cekin. W pozostałych odmianach ziemniaka zarówno

susza, jak i wysoka temperatura nie indukowały wyraźnego wzrostu stężenia L-proliny w badanym okresie pięciu dni. W przypadku odmian Gwiazda i Oberon, poziom L-proliny był taki sam w ciągu pięciu dni dla wszystkich badanych kombinacji, co świadczy, że w badanym okresie odmiany te nie reagowały wzmożoną produkcją tego aminokwasu w odpowiedzi na zadany stres.

LITERATURA

- Iwama K. 2008. Physiology of the potato: New insights into root system and repercussions for crop management. *Potato Research*, 51: 333 — 353.
- Leszczynski, D. B., Tanner C.B. 1976. Seasonal variation of root distribution of irrigated, field-grown Russet Burbank potato. *Am. Potato J.* 69 — 78.
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends in Plant Science* 11: 15 — 19.
- Opena G. B., Porter G. A. 1999. Soil management and supplemental irrigation effects on potato: II. Root growth. *Agronomy Journal* 91: 426 — 431.
- Parker, C. J., Carr M. K. V, Jarris N. J, Evans M. T. B., Lee V. H. 1989. Effect of subsoil loosening and irrigation on soil physical properties, root distribution and water uptake of potatoes (*Solanum tuberosum*). *Soil Tillage Res.* 13: 267 — 285.
- Stalham M. A., Allen E. J. 2001. Effect of variety, irrigation regime and planting date on depth, rate, duration and density of root growth in the potato (*Solanum tuberosum*) crop. *Journal of Agricultural Science* 137: 251 — 270.
- Vos J., Groenwold J. 1986. Root growth of potato crops on a marine clay soil. *Plant and Soil*: 161: 289 — 298.
- 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 Environ.* 63: 159 — 164.

BOGDAN FLIS**BEATA TATROWSKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział Młochów
Kierownik Tematu: dr hab. Bogdan Flis prof. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut
Badawczy, Radzików, Oddział Młochów ul. Platanowa 19, Młochów 05-831, tel. (0 22) 7299248 w. 216,
e-mail: b.flis@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 62.

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

Słowa kluczowe: cechy kulinarne, interakcja genotypowo środowiskowa, plon bulw, stabilność, zawartość skrobi, ziemniak

Celem badań jest ocena wpływu interakcji genotypowo-środowiskowej na kształtowanie zmienności, która powstaje w odpowiedzi na zmieniające się środowisko uprawy. Ocena ta dotyczy 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.

W 2018 roku cele prac były następujące (1) przeprowadzenie doświadczeń polowych w 3 lokalizacjach z wybranymi rodami i odmianami ziemniaka (pierwszy element 3-letniego cyklu), (2) rozmnażanie badanych rodów i odmian oraz (3) selekcjonowanie klonów tetraploidalnych wyróżniających się poziomem cech użytkowych i wybranych cech odpornościowych.

MATERIAŁ I METODY

W doświadczeniach polowych oceniano 30 rodów i 10 odmian ziemniaka. Wśród rodów jest 11 genotypów pochodzących z krzyżowań interploidalnych (tj. typu odmiana skrzyżowana z diploidalnym donorem cech jakościowych), 11 form odpornych na zarazę ziemniaka oraz 8 form pochodzących z krzyżowań odmian jadalnych z rodami własnymi odpornymi na wirus Y ziemniaka i średnią odpornością na zarazę ziemniaka.

Doświadczenia założono w 2 miejscowościach położonych w centralnej Polsce (z uprawą tradycyjną w Młochowie i ekologiczną w Grabowie) oraz w Boguchwale na południowym wschodzie, w której można oczekiwać naturalnej silnej epifitozy zarazy ziemniaka (również uprawa tradycyjna). Doświadczenia prowadzono w układzie bloków losowanych (3 bloki) z 7 krzakowymi poletkami. Rody i odmiany oceniano pod względem plonu bulw, zawartości skrobi, nasilenia wad bulw oraz smaku i ciemnienia miąższu bulw gotowanych. W Młochowie prowadzono także 15 krzakowe rozmnożenia ocenianych w doświadczeniach rodów i odmian.

Do ocen zróżnicowania wykorzystano analizę wariancji i test Tukeya lub test Kruskala-Wallisa. Analizę stabilności przeprowadzono przy użyciu współczynnika zmienności (Francis i Kannenberg, 1978) i/lub wariancji stabilności Shukli (Shukla, 1972). Obliczenia wykonano przy użyciu programu R (R Core Team, 2015; Mendiburu, 2015).

W przypadku wad bulw (oceny wg skali 1–4, gdzie 4 oznacza brak wad) oraz ocen smaku i ciemnienia miąższu bulw gotowanych (wg skali 1–9, gdzie 9 najsmaczniejszy lub nieciemniejący miąższ), jako miarę zastosowano wartość mediany i wartość minimalną spośród wszystkich otrzymanych wartości. W przypadku wad bulw, jako wartość graniczną przyjęto medianę ≥ 3 i wartość minimalną ≥ 2 . Dla ocen smaku wartości te wynosiły: mediana > 6 i minimum ≥ 6 , a dla ciemnienia miąższu bulw — mediana ≥ 7 i minimum $\geq 6,5$.

W 2018 r. prowadzono także selekcję wśród 60 tetraploidalnych rodów ziemniaka pochodzących od form własnych i odmian, będących donorami odporności na zarazę ziemniaka krzyżowanych z donorami cech jakości, którymi były rody diploidalne. Materiał obejmował 60 rodów, które utrzymywano na poletkach 15 krzakowych.

WYNIKI

Wyniki przeprowadzonych w 2018 r. doświadczeń wskazują na istotny wpływ genotypu (tj. badanych rodów i odmian) i miejscowości dla wszystkich badanych cech. Najwyższy plon bulw i najniższą zawartość skrobi stwierdzono w Boguchwale, zaś w Młochowie i Grabowie (z uprawą ekologiczną) plony były niższe, a zawartość skrobi najwyższa w uprawie ekologicznej w Grabowie. W przypadku plonu i zawartości skrobi stwierdzono wysoce istotną statystycznie interakcję rodów/odmian z miejscowościami. Największe nasilenie wad stwierdzono w bulwach pochodzących z uprawy w Młochowie i Grabowie. Najlepszy smak miały bulwy pochodzące z uprawy tradycyjnej w Młochowie. Bulwy z uprawy tradycyjnej w Młochowie i Boguchwale wykazywały

także niższą skłonność do ciemnienia po ugotowaniu w porównaniu do bulw z uprawy ekologicznej w Grabowie. Na otrzymane wyniki duży wpływ miał przebieg pogody (długotrwała susza w centralnej Polsce).

W celu oceny stabilności plonu zastosowano tylko wariację stabilności (Shukla, 1972). Dodatkowo, zmodyfikowano wyjściowy ranking badanych genotypów wg rosnącego plonu, uwzględniając statystyczną istotność różnic pomiędzy badanymi genotypami oraz istotność wariacji stabilności. Odpowiednio zwiększając lub zmniejszając wyjściową rangę każdego rodu lub odmiany otrzymano nowy ranking genotypów i wyróżniono najlepsze genotypy, tj. plenne i stabilne (Mendiburu, 2015). W takim uproszczonym schemacie selekcji, najważniejszym czynnikiem decydującym o wyborze wydaje się być wysokość średniego plonu, a stabilność (lub jej brak) ma mniejsze znaczenie — wśród wybranych 20 rodów/odmian jest 5 form niestabilnych, podobnie jak wśród niewybranych form niskoplennych.

W przypadku zawartości skrobi oceniono stabilność za pomocą 2 miar (wariancja stabilności Shukli i współczynnik zmienności), które były silnie skorelowane i pozwoliły wyróżnić bardzo dużą liczbę genotypów z niestabilnym poziomem skrobi. Wśród takich niestabilnych genotypów znalazły się prawie wszystkie odmiany. Zawartość skrobi jest ważną cechą odmianową, a zatem należałoby oczekiwać niewielkiej zmienności pomiędzy miejscowościami (=środowiskami). Wyniki ocen stabilności mogą wskazywać na brak przydatności użytych miar do oceny stabilności takiej cechy jak zawartość skrobi albo zbyt małą liczbę środowisk.

Do oceny stabilności nasilenia wad bulw, smaku i ciemnienia posłużono się wartościami mediany i ustalonymi wartościami minimalnymi, których użycie zapewnia wybór form stabilnych i jednocześnie o wysokim (akceptowalnym) poziomie badanych cech. Jednoroczna ocena wskazuje, że stabilnym poziomem tych cech wyróżniały się rody interploidalne.

WNIOSKI

1. W doświadczeniach polowych z uprawą tradycyjną lub ekologiczną prowadzonych w trzech miejscowościach stwierdzono:
 - istotny wpływ genotypu (rodu lub odmiany) i miejscowości na poziom wszystkich ocenianych cech oraz wpływ ich interakcji na poziom plonu i zawartości skrobi.
 - stabilny poziom plonu większości badanych rodów i odmian. Z kolei stabilność zawartości skrobi była znacznie rzadziej obserwowana. Uważa się, że wysokość plonu w dużej mierze podlega wpływom środowiskowym, a zawartość skrobi jest cechą odmianową. Należy przyjąć, że oceny uzyskane w jednym sezonie wegetacyjnym nie pozwalają jednoznacznie określić wpływu interakcji środowiskowo genotypowej na poziom plonu i zawartości skrobi.
 - stosunkowo rzadkie występowanie stabilnie małego nasilenia wad bulw. Stabilnym poziomem smaku i nieciemnienia miąższu bulw wyróżniła się grupa rodów z krzyżowań interploidalnych. Do wyróżniania rodów lub odmian stabilnych pod względem

cech wyrażanych w skali posłużono się wartościami mediany i przyjętymi granicznymi wartościami minimalnymi.

2. Charakteryzowano 60 rodów pod względem cech użytkowych i odporności na zarazę ziemniaka (za pomocą testów laboratoryjnych i z użyciem markerów molekularnych). Wybrano grupę 30 rodów o dobrym plonie, odpornych na zarazę i niewadliwym smaku bulw.

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.
- Mendiburu F. 2015. *Agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research*. R package version 1.2-3. <http://CRAN.R-project.org/package=Agricole>.
- R Core Team 2015. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing.
- Shukla G. K. 1972. Some statistical aspects of partitioning genotype-environmental components of variability. *Heredity* 29: 237 — 245.

RENATA LEBECKA¹
ZOFIA MURAWSKA¹
KATARZYNA SZAJKO¹
JANUSZ DĘBSKI²
MICHAŁ KISTOWSKI²
WALDEMAR MARCZEWSKI¹
EWA ZIMNOCH-GUZOWSKA¹

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie

² Instytut Biochemii i Biofizyki Polskiej Akademii Nauk, Warszawa

Kierownik Tematu: dr hab. Renata Lebecka prof. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów, tel. (22) 7299248 w. 207, e-mail: r.lebecka@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 56.

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**

Słowa kluczowe: białka ziemniaka, *Dickeya solani*, loci cech ilościowych, mokra zgnilizna bulw ziemniaka, odporność

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

Mokra zgnilizna bulw ziemniaka to choroba powodowana przez kilka gatunków bakterii pektynolitycznych należących do dwóch rodzajów: *Pectobacterium* i *Dickeya*. Bakterie *Dickeya* spp. są bardziej agresywne od innych bakterii pektynolitycznych (Czajkowski i in., 2013). Straty ekonomiczne powodowane przez bakterie pektynolityczne to: obniżenie wielkości plonu bulw, utrata części plonu w czasie przechowywania, wystąpienie czarnej nóżki w czasie sezonu wegetacyjnego, koszty związane z degradacją plantacji nasiennych. Nie stosuje się ochrony chemicznej

do zwalczania bakterii wywołujących choroby ziemniaka. Odporność bulw ziemniaka na bakterie pektynolityczne jest cechą poligeniczną (Zimnoch-Guzowska i in., 2000).

Celem tematu jest:

- (1) zmapowanie odporności na bakterie *D. solani* w diploidalnej nieselekcjonowanej populacji ziemniaka, otrzymanej po skrzyżowaniu formy wysoko odpornej z formą o niskiej odporności na te bakterie oraz
- (2) znalezienie różnic w profilach białkowych odmian ziemniaka, różniących się między sobą poziomem odporności bulw na zakażenie bakteriami *D. solani*, 8 lub 48 godzin po inokulacji.

CEL (1). OPIS WYNIKÓW

Przeprowadzono analizę markerów DArTseq 186 osobników potomnych i ich form rodzicielskich, wykonano ocenę fenotypową odporności bulw na bakterie *D. solani* (Lebecka, 2017) oraz oceniono zawartość skrobi w bulwach ziemniaka w populacji mapującej (Zgórska, 2001). Testowana cecha przyjmowała rozkład normalny. Średnia masa zgniłej tkanki genotypów potomstwa populacji mapującej wynosiła 2,3 g, zakres cechy od 0,0 do 7,6 g, u odpornej formy rodzicielskiej DG 00-270 wynosiła 0,8 g, a u podatnej formy, DG 08-305 — 5,9 g. Zawartość skrobi w formach rodzicielskich populacji mapującej wynosiła 20,5% w DG 00-270 i 17,3% w DG 08-305. Zakres badanej cechy w potomstwie wynosił od 11,4% do 23,9%, ze średnią populacji 17,7%.

CEL (1). WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

Testowanie porażenia bulw w teście sztucznej inokulacji będzie powtórzone w trzecim (ostatnim) roku badań. Dane będą wykorzystane do mapowania *loci* cech ilościowych (QTLs) odporności bulw na bakterie *D. solani*. Ocena zawartości skrobi w kolejnym roku badań umożliwi zbadanie związku zawartości skrobi z odpornością bulw na mokrą zgniliznę. Badania będą kontynuowane.

CEL (2). OPIS WYNIKÓW

Na podstawie trzyletniej oceny porażenia bulw w testach laboratoryjnych przeprowadzonych w poprzednich latach tego projektu (Lebecka, 2017) do badań proteomicznych wybrano dwie odmiany o wysokiej odporności (Bea i Humalda) i trzy odmiany o niższej odporności (Katahdin, Ulster Supreme i Irys). Próbkę z pięciu odmian ziemniaka pobierano z bulw zranionych inokulowanych bakteriami *D. solani*, z bulw zranionych traktowanych wodą (8 i 48 h po inokulacji) oraz z bulw nieranionych (8 h po inokulacji). Doświadczenia prowadzono w dwóch terminach. Pobierano od dwóch do czterech fragmentów z każdej kombinacji doświadczenia. Białka izolowano według protokołu opracowanego w poprzednich latach tego projektu (Murawska i in., 2017). Analizę próbek wykonano metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej z tandemowym spektrometrem mas (LC-MS/MS). Programem Diffprot (Malinowska i in., 2012) porównano listy peptydów danych grup eksperymentalnych pomiędzy sobą,

obliczając zależności statystyczne i typując białka, których poziom ekspresji pomiędzy badanymi grupami różnił się w sposób istotny ($P \leq 0,1$), co najmniej 1,5 razy. (1) Porównano białka z bulw inokulowanych bakteriami *D. solani* z białkami bulw zranionych i traktowanych wodą. Przeprowadzono cztery porównania, dla grupy odmian odpornych i podatnych, po 8 i 48 h po inokulacji. Wyróżniono wyłącznie jedno białko różnicowe, peroksydazę, w grupie odmian odpornych, 48 godzin po inokulacji. (2) Porównano białka z bulw odmian odpornych z podatnymi. We wczesnej fazie infekcji, 8 godzin po inokulacji, wyróżniono 4 białka (patatyny, inhibitory proteinaz w tym inhibitor chymotrypsyny), których ekspresja była istotnie wyższa w odmianach odpornych, w próbkach pobranych zarówno z bulw inokulowanych bakterią jak i traktowanych wodą, natomiast w bulwach nieranionych istotnie większą ekspresję stwierdzono dla białka patatyny. Wyższą ekspresją w odmianach odpornych, tylko po inokulacji, charakteryzowały się dwa białka, inhibitor proteinazy PTI i syntetaza tiaminotiazolowa. W późniejszej fazie infekcji w odmianach odpornych w obu rodzajach bulw, inokulowanych i traktowanych wodą, było istotnie więcej inhibitorów proteinaz, patatyny (tak samo jak po 8 h) i inhibitorów proteazy serynowej. Wyróżniono białka o wyższej ekspresji w odmianach odpornych wyłącznie po inokulacji bakteriami, inhibitory proteazy aspartylowej, oksydazy polifenolowe i endoplazminy.

Wykonano dwie analizy głównych składowych dla wszystkich prób z doświadczenia (1) po 8 h oraz (2) po 8 i 48 h. Analiza próbek z doświadczenia po 8 h wyjaśnia 19% zmienności a analiza po 48 h — 26% zmienności, mimo to analiza po 8 h pozwala na oddzielenie odmian odpornych od podatnych na podstawie drugiej składowej (PC2). Po 48 h różnice pomiędzy jedną z odpornych odmian, a pozostałymi odmianami podatnymi zaczynają się zacierać.

CEL (2). WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

Wykazano różnice w białkach pomiędzy odpornymi i podatnymi odmianami na mokną zgniliznę bulw, w początkowej i późniejszej fazie infekcji. Większość białek różnicowych występuje w bulwach inokulowanych bakteriami w zranienia i w bulwach zranionych traktowanych wodą. W bulwach nieranionych 8 h po inokulacji, spośród białek różnicowych wykrytych w początkowej i późniejszej fazie infekcji, tylko patatyny występowały w większej ilości w odmianach odpornych w porównaniu z podatnymi. Na podstawie analizy głównych składowych 8 h oraz 8 i 48 h po inokulacji zakładamy, że różnice obserwowane w czasie wczesnej fazy infekcji, 8 h po inokulacji, mogą odgrywać większą rolę w hamowaniu rozwoju objawów choroby.

LITERATURA

- Czajkowski R., De Boer W. J., Van der Zouwen P.S., Kastelein P., Jafra S., de Haan E.G., Van den Bovenkamp G. W., Van der Wolf J. M. 2013. Virulence of '*Dickeya solani*' and *Dickeya dianthicola* biovar-1 and -7 strains on potato (*Solanum tuberosum*). Plant Pathol. 62: 597 — 610.
- Lebecka R. 2017. Screening for potato resistance to blackleg and soft rot. Plant Breed Seed Sci 75: 97 — 104 DOI:10.1515/plass-2017-00013.

- Malinowska A., Kistowski M., Bakun M., Rubel T., Tkaczyk M., Mierzejewska J., Dadlez M. 2012. Diffprot — software for non-parametric statistical analysis of differential proteomics data. *J. Proteomics* 75 (13): 4062 — 4073.
- Murawska Z., Dębski J., Szajko K., Lebecka R. 2017. Isolation of proteins from potato tubers. *Plant Breed Seed Sci* 75: 23 — 27 DOI: 10.1515/plass-2017-0005.
- Zgórska K. 2001. Oznaczanie zawartości skrobi w bulwach ziemniaka. W: *Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR Radzików*, 10a: 113 — 116.
- 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.

DOROTA MILCZAREK**BOGDAN FLIS**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie
Kierownik Tematu: dr Dorota Milczarek Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut
Badawczy, Radzików, Oddział w Młochowie, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów, tel. 22 7299248 w. 222,
e-mail: d.milczarek@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 60.

**Wyróżnianie form ziemniaka o złożonej odporności
na mątwiki atakujące ziemniak przy wykorzystaniu
metod konwencjonalnych i molekularnych.
Charakterystyka nowego źródła odporności
na *Globodera pallida* znalezionego
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*

Słowa kluczowe: cechy użytkowe, mapowanie, mątwik, odporność, *Solanum gourlayi*, ziemniak

CEL

Celem zadania jest poznanie genetycznych uwarunkowań odporności na mątwiki, zaobserwowanej w gatunku *Solanum gourlayi* oraz wyróżnienie w obrębie ziemniaka o różnych kierunkach użytkowania form o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak (patotypy mątwika ziemniaczanego — *Globodera rostochiensis* i mątwika agresywnego — *G. pallida*).

Celem tematów realizowanych w 2018 roku była: a) ocena odporności klonów diploidalnej populacji mapującej na patotypy *G. pallida*; b) prowadzenie doświadczenia polowego z udziałem materiałów tetraploidalnych o złożonej odporności na patotypy *Globodera* spp., selekcja form o złożonej odporności z wykorzystaniem markerów molekularnych oraz prowadzenie krzyżowań interploidalnych w celu wprowadzenia

odporności ze źródła *S. gourlayi* na poziom tetraploidalny; c) analiza DArT diploidalnej populacji mapującej.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy obejmował: (a) klony z diploidalnej populacji mapującej DW 94-4235 × Sg 2/7 oraz (b) 197 klonów tetraploidalnych o złożonej odporności na patotypy *Globodera* spp. pochodzących z 3 kombinacji krzyżówkowych. Dla klonów populacji mapującej prowadzono oceny odporności na patotypy Pa2 i/lub Pa3 *G. pallida*. Klony tetraploidalne prowadzono w doświadczeniu polowym (7 krzakowe poletka × 2 powtórzenia) i oceniono plon bulw, zawartość i plon skrobi, morfologię bulw (w skali 1–9, 9 = najlepsze oceny) oraz nasilenie występowania defektów bulw (w skali 1–4, 4 = brak wad).

Prowadzono także polowe rozmnożenie klonów populacji mapującej, uzupełniono dane dotyczące amplifikacji markerów związanych z genami odporności *H1* i *Gro1-4* dla klonów tetraploidalnych oraz przeprowadzono krzyżowania interploidalne w celu przeniesienia odporności z *S. gourlayi* na poziom tetraploidalny (dwie tetraploidalne formy mateczne krzyżowano z diploidalnym klonem Sg 2/7).

WYNIKI

Źródłem genów odporności ziemniaka uprawnego na mątwiki (*Globodera* spp.) są dzikie gatunki *Solanum*, a jednym z nich jest *S. gourlayi*, w którym zaobserwowano podwyższoną odporność na mątwika agresywnego *G. pallida* (Van Soest i in., 1983), ale stopień tej odporności i jej spektrum działania nie są znane. W ramach tematu ustalono odporność na patotypy *G. pallida* wybranych klonów diploidalnych *S. gourlayi*, które wykorzystano do przygotowania populacji diploidalnych (z nich wybrano populację mapującą). W 2018 r. przeprowadzono ocenę odporności na patotypy Pa2 i/lub Pa3 *G. pallida* klonów populacji mapującej, spośród których 15 było odpornych na patotyp Pa2, a 44 klony — na patotyp Pa3. Odporność przetestowanych klonów diploidalnych mieściła się w zakresie od 1 do 6 (przy skali 1–9), co pokazuje segregację poszukiwanej cechy w wytypowanej diploidalnej populacji mapującej.

W doświadczeniu polowym charakteryzowano klony tetraploidalne, a spośród nich selekcjonowano, z użyciem markerów molekularnych, formy o złożonej odporności na *Globodera* spp. Średnie wartości uzyskane dla tych klonów były następujące: plon bulw 1,1 kg/krzak (dla odmian wzorcowych 1,4 kg/krzak), zawartość skrobi 13,1% (14,3% dla odmiany Kuba), plon skrobi 79,8 q/ha (128,3 q/ha dla odmiany Kuba), wielkość bulw 4,3 (odmiany wzorcowe 4,8), regularność zarysu 5,7 (odmiany 6,0), głębokość oczek 6,0 (odmiany 6,4). Wady bulw badanych klonów kształtowały się na poziomie 2,7 (ocena dla odmian 1,8 wynikała ze znacznego nasilenia wzrostu wtórnego). Oceny te wskazują na nieco słabszy poziom cech w porównaniu do wykorzystanych w doświadczeniu odmian wzorcowych. Wśród badanych klonów

były jednak takie, które przewyższały odmiany wzorcowe pod względem plenności i/lub morfologii bulw.

Przeprowadzono porównanie średnich wartości cech pomiędzy grupą klonów, w których stwierdzono amplifikację wybranego markera molekularnego, a grupą bez markera. Różnice stwierdzono jedynie dla markera HC, związanego z genem odporności na patotypy Pa2/Pa3 (klony z markerem miały wyższy plon, niższą skrobię i słabszą regularność zarysu bulw w porównaniu do grupy bez markera) i dla markera Gro1-4, sprzężonego z genem odporności na patotyp Ro1 (różnice między grupami dotyczyły kształtu i wielkości bulw). Dla markera 57R (dla genu odporności na Ro1 i Ro4) nie stwierdzono takich zależności dla żadnej z cech, podobnie jak w poprzednich badaniach (Milczarek i in., 2014).

Wyselekcjonowano 10 klonów posiadających wszystkie trzy stosowane w projekcie markery, tj. HC, Gro1-4 i 57R. Klony te charakteryzowały się dość dobrym poziomem cech agronomicznych, co wskazuje na możliwość wyróżniania klonów o dobrych cechach użytkowych i odpornych na patotypy Ro1 i Ro4 *G. rostochiensis* oraz Pa2/3 *G. pallida*.

Zrealizowano również program krzyżowań interploidalnych. Diploidalna forma ojcowska, klon Sg 2/7 miała płodny pyłek (płodność 70%) i tworzyła duże ziarna pyłku, które są wskaźnikiem męskich gamet o niezredukowanej liczbie chromosomów. Przeprowadzono łącznie 300 zapyleń i uzyskano 29 jagód.

Do mapowania genów odporności wykorzystuje się diploidalne populacje mapujące, które uzyskuje się poprzez krzyżowanie formy odpornej z formą podatną (Gebhardt, 2007). W 2018 roku otrzymano wyniki genotypowania nieselekcjonowanej populacji mapującej wysokowydajną metodą DArTseq wykonaną przez Diversity Array Technology, Pty Ltd. (Canberra, Australia). Metoda ta jest połączeniem wcześniej opracowanej metody DArT z sekwencjonowaniem nowej generacji (next generation sequencing). Otrzymano wyniki dla ponad 82 tysięcy markerów. Obecnie trwa analiza i opracowywanie tych wyników (np. usuwanie markerów niepolimorficznych dla rodziców populacji mapującej, usuwanie markerów, które nie segregowały w potomstwie, ustalanie kryterium liczby dopuszczalnych braków danych) w celu przygotowywania danych do stworzenia mapy genetycznej.

WNIOSKI

1. Segregacja odporności w wytypowanej diploidalnej populacji mapującej pozwoli na zbadanie podłoża genetycznego odporności pochodzącej z wykorzystanego źródła — *S. gourlayi*.
2. Wyniki doświadczenia polowego wskazują, że klony uzyskane w wyniku krzyżowań form o złożonej odporności na *Globodera* spp. charakteryzują się nieco niższym poziomem cech użytkowych w porównaniu do odmian wzorcowych. Jednak obserwowane zakresy ocen tych cech wskazują, że jest możliwe wytypowanie spośród nich klonów o wysokim poziomie badanych cech i jednocześnie odpornych na patotypy *Globodera* spp.

3. Nie obserwowano negatywnych związków pomiędzy obecnością genu odporności identyfikowanego markerem molekularnym a poziomem cech użytkowych.
4. Wyselekcjonowano 10 klonów posiadających markery Gro1-4 genu *Gro1-4*, 57R genu *H1* oraz marker HC genu *GpaV_{vrn}* o dość dobrym poziomie cech użytkowych.
5. Uzyskano 29 jagód z krzyżowań interploidalnych (zapyłacz był formą diploidalną Sg 2/7), co wskazuje na możliwość wprowadzenia odporności z *S. gourlayi* na poziom tetraploidalny.
6. Otrzymano wyniki genotypowania populacji nieselekcjonowanej (wyniki dla 82 tys. markerów) i rozpoczęto analizę w celu przygotowywania danych.

LITERATURA

- Gebhardt C. 2007. Molecular markers, maps and population genetics. In: Vreugdenhil D., Bradshaw J., Gebhardt C., Govers F., Mackerron D. K. L., Taylor M. A., Ross H. A. (Eds): Potato biology and biotechnology advances and perspectives. Elsevier, Oxford: 77 — 86.
- Milczarek D., Przetakiewicz A., Kamiński P., Flis B. 2014. Early Selection of potato clones with the H1 resistance gene — the relation of nematode resistance to quality characteristics. Czech J. Genet. Plant Breed., 50: 278 — 284.
- Van Soest L. J. M., Rumpfenhorst H. J., Huijsman C. A. 1983. Resistance to potato cyst-nematodes in tuber-bearing *Solanum* species and its geographical distribution. Euphytica 32: 65 — 74.

DOROTA MICHAŁOWSKA
AGNIESZKA PRZEWODOWSKA
WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI
PAULINA BURYŁO

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie
Kierownik Tematu: mgr inż. Dorota Michałowska Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy
Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie, 76-009 Bonin, 94 3423031 wew. 213,
e-mail: michalowska@ziemniak-bonin.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.802.19.2018, Zadanie 63.

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

Słowa kluczowe: bakterie endogenne, biocydy, chemioterapia, *in vitro*, termoterapia, ziemniak

Głównym celem zadania nr 63 są prace nad doskonaleniem metod uwalniania roślin ziemniaka od patogenów niekwwarantannowych (bakterie endogenne i wirusy) przy pomocy kultur *in vitro*.

Choroby wirusowe ziemniaka powodują degenerację plantacji nasiennych i wpływają na znaczne straty w plonie bulw. Największe zagrożenie stanowi wirus PVY ziemniaka, który może powodować spadek plonu bulw nawet o 50% (Chrzanowska, 2000). Z kolei wirus PVS i PVM ziemniaka, które łatwo się rozprzestrzeniają mogą powodować straty rzędu 30% (Kostiw, 2013). Infekcje wirusowe są poważnym zagrożeniem dla hodowli ziemniaka, gdyż ich koncentracja wzrasta w kolejnych pokoleniach bulw w wyniku rozmnażania wegetatywnego, a także są odporne na działanie zabiegów chemicznych. Dlatego tak ważna jest eliminacja wirusów z zainfekowanych roślin ziemniaka (Faccioli, 2001).

W ramach tematu badawczego wykonano badania nad uwalnianiem roślin od wirusów PVS i PVM ziemniaka przy zastosowaniu dwóch metod: termoterapii połączonej

z izolacją merystemów i chemioterapii jednowęzłowych fragmentów roślin *in vitro* porażonych wirusami.

Już w 1952 roku ukazały się pierwsze informacje w literaturze o tym, iż wirusy mogą w mniejszym stopniu infekować wierzchołki, a wyizolowane merystemy mogą być od nich wolne (Morel, Martin, 1952). Kolejne badania wykazały że ilość roślin wolnych od wirusa wzrasta proporcjonalnie wraz z temperaturą oraz czasem trwania termoterapii (Biniam i Tedesse, 2008), jednocześnie zmniejsza się liczba eksplantatów, które po zakończeniu terapii są zdolne do regeneracji (Zaklukiewicz, 1982; Ali i in., 2013). W tegorocznych badaniach wykazaliśmy również jak duży wpływ na uzyskanie zdrowych roślin *in vitro* ma czynnik osobowy, na co składa się m.in. jakość i wielkość izolowanego merystemu. Z materiału poddanego tym samym warunkom termoterapii, w zależności od wykonawcy uzyskano z merystemów od 68% (wykonawca 1) do 30% (wykonawca 2) roślin *in vitro*, w tym wolnych od wirusa 26,4% (wykonawca 1) do 8% (wykonawca 2).

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). Nasir i in. (2010) oraz Mahmoud i in. (2009) zaobserwowali, że rybawiryna z wysoką skutecznością eliminuje PVA, PVX, PVS, PVM, PVY i PLRV, natomiast tiouracyl sporadycznie eliminował PVS oraz wirusa PVX. Stosowanie antymetabolitów ma również wady, gdyż wraz ze zwiększeniem ich stężenia w pożywce 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). Nasze badania wykazały, że wyższe dawki RBV obniżają poziom ekstynkcji wirusa PVS i PVY, ale działają fitotoksycznie na eksplantaty. Dodanie do pożywki rybawiryny nie ma wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVM ziemniaka. Natomiast zastosowane dawki tiouracylu nie mają wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa PVS i PVM ziemniaka, jedynie zmniejszyła się koncentracja wirusa PVY ziemniaka. Dodany do podłoża tiouracyl nie ma negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*.

Bakterie endofityczne są problemem, który pojawia się systematycznie w kulturach *in vitro*, niezależnie od gatunku roślin. Nawet największa staranność w procesie mikro-rozmnażania nie daje stuprocentowej pewności otrzymania i rozmnażania kultur bez zanieczyszczeń. Obecnie trudno jest powiedzieć o kulturach *in vitro* że są sterylne. Prawidłowo przeprowadzona dezynfekcja eksplantatów w początkowej fazie nie wykazuje zanieczyszczeń bakteryjnych i mogą one nie być zauważone (Orlikowska i in., 2012). Pierwszym sygnałem świadczącym o obecności bakterii w kulturach *in vitro* jest nieznaczne zmętnienie pożywki pod wyszczepionym eksplantatem oraz pojawiające się wodniste „hallo” wokół eksplantatu. Proces ten ujawnia się w kulturach po 3–5 dniach od pasażowania. Dodanie biocydu do pożywki hodowlanej może spowodować zahamowanie namnażania się bakterii endogennych.

Celem tematu w 2018 roku było badanie trzech dostępnych na rynku preparatów bakteriobójczych: PPMTM, ProClin 300® i AgNO₃, pod kątem skuteczności zwalczania

zanieczyszczeń bakteryjnych (bakterie endogenne) w kulturach *in vitro* ziemniaka i ocena ich fitotoksyczności.

Biocyd PPM™ został przetestowany dla wielu gatunków roślin m.in. rośliny cytrusowe, kapustne, melon, tytoń (Compton, Koch, 2001). Badania wykazały pozytywny wpływ preparatu w ograniczeniu zanieczyszczeń bakteryjnych. Badacze zwracali uwagę, że musi być on stosowany w odpowiedniej koncentracji w zależności od gatunku roślin, gdyż zbyt wysokie stężenie może mieć negatywny wpływ na rozwój tkanki roślinnej. Włączenie do pożywek związków bakteriobójczych i bakteriostatycznych musi być bezpieczne dla tkanek roślinnych i dlatego ważne są badania nad ich skutecznością i fitotoksycznością.

Na podstawie dotychczas prowadzonych badań zaobserwowano, że w zależności od zastosowanego biocydu eliminacja bakterii endogennych była zróżnicowana. Dodany do podłoża preparat PPM™, podobnie jak w latach poprzednich nie wykazywał fitotoksycznego wpływu na eksplantaty, a nawet najniższa dawka 0,3% w dużym stopniu eliminowała bakterie endogenne — 78,35% „czystych kultur”. Wyższe dawki — od 0,4% to 100% kultur wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych. Również dodatek do pożywki ProClin300® eliminował zanieczyszczenia bakteryjne w 100% przy zastosowaniu najwyższej dawki i w 86,67% przy zastosowaniu niższej dawki. Jednocześnie przy niższych dawkach nie zaobserwowano fitotoksycznego działania preparatu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*, tylko przy najwyższej dawce 0,04% rośliny słabiej korzeniły się i rosły niższe w stosunku do kontroli. Azotan srebra (AgNO₃) dodany do pożywki nie miał wpływu na eliminację bakterii endogennych z kultur *in vitro* ocenianych odmian. Dodatkowo przeszczepione fragmenty roślin *in vitro* zareagowały na azotan srebra, tworząc słabe roślinki (jedno międzywęźle), często z mikrobulwkami.

W naszych badaniach wykazaliśmy pozytywny wpływ PPM™ i ProClin 300® na zanieczyszczenia bakteryjne w kulturach *in vitro* ziemniaka. Niestety preparaty te nie powodują trwałego „oczyszczenia”, tzn. po przeszczepieniu roślin *in vitro* z podłoża z dodatkiem biocydu na standardowe podłoże MS tylko wierzchołkowe fragmenty roślin zachowały czystość bakteryjną. Należy sprawdzić po ilu pasażach zastosowane dawki PPM™ i ProClin 300® wyeliminują bakterie endogenne z kultur *in vitro* ziemniaka.

LITERATURA

- Biniam T., Tedesse M. 2008. A survey of Vidal status on potatoes grown in Eritrea and *in vitro* elimination of local variety Tsaeda embaba. *Afri. J. Biotech.* 7 (4): 397 — 403.
- Chrzanowska M. 2000. Choroby ziemniaka wywołane przez wirusy. *Wiś Jutra* 3 (20): 27 — 29.
- Compton M., Koch J. 2001. Influence of plant preservative mixture (PPM) on adventitious organogenesis in melon, petunia and tobacco. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* 37: 259 — 261.
- Faccioli G. 2001. Control of potato viruses using meristem and stem-cutting cultures. *Thermotherapy and chemotherapy*. Ed. *Virus and Virus-like Disease of Potatoes and production of Seed Potatoes*: 382 — 385.
- Kostiw M. 2013. Przyrodnicze i poza przyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasienną ziemniaka. *Wiś Jutra* 1 (174): 28 — 29.
- Mahmoud S. Y. M., Hossen 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 2001: 36.
- Morel G., Martin C. 1952. Guérison de dahlias atteints d'une maladie à virus. *C. R. Acad. Sci.* 235: 1324 — 1325.
- 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. Phytopathol.* 22 b (1): 63— 70.
- Orlikowska T., Zawadzka M., Zenkteler E., Sobiczewski P. 2012. Influence of the biocides PPM and Vitrofur on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *The Journal of Horticultural Science & Biotechnology* Vol. 87. No: 3: 223 — 230.
- Zaklukiewicz K. 1982. Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. *Ziemniak* 1981/82: 137 — 160.

BEATA TATAROWSKA**BOGDAN FLIS****IWONA-WASILEWICZ FLIS**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Młochowie

Kierownik Tematu: dr Beata Tatarowska Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut

Badawczy, Oddział w Młochowie, ul. Platanowa 19, 05-831 Młochów, tel. 22 7299087 wew. 222,

e-mail: b.tatarowska@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 61.

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

Słowa kluczowe: odporność, reakcja nadwrażliwości — HR, *Solanum tuberosum*, wirus M ziemniaka, wirus S ziemniaka

Celem projektu jest określenie reakcji form z genem *Rm* pochodzącym z *S. megistacrolobum* lub *Gm* z *S. gourlayi* na nowe warianty wirusa M ziemniaka oraz poznanie dodatkowych czynników genetycznych warunkujących tę odporność w różnych warunkach środowiskowych przy zastosowaniu ilościowych metod molekularnych. W przypadku odporności warunkowanej genem *Rm* określona zostanie zależność między odpornością, a występowaniem reakcji nekrotycznej. W przypadku wirusa S ziemniaka celem projektu jest ocena wpływu dawki genu na odporność, aby można było stwierdzić, czy uzasadnione jest tworzenie form typu multipleks pod względem genu *Ns* w celu otrzymania form o podniesionej odporności na wirus PVS ziemniaka. W roku 2018 w ramach zadania 61 realizowano cztery tematy badawcze.

TEMAT 1

Rozmnażanie w polu odpornych na PVM rodów ziemniaka z sześciu populacji ze źródłem odporności pochodzącym z *S. megistacrolobum* lub *S. gourlayi* oraz dwóch populacji mających w swym pochodzeniu źródło odporności na PVS z *S. tuberosum subsp. andigena*

Celem tematu było stworzenie kolekcji rodów odpornych na PVM oraz rozmnożenie w polu populacji mających w swym pochodzeniu odporność na PVS.

Wyniki

W ramach tematu rozmnażano w polu 423 rody tetraploidalne mające w swym pochodzeniu gen odporności na PVM pochodzący z *S. megistacrolobum* (*Rm*) oraz 157 rodów tetraploidalnych, mających w swym pochodzeniu gen odporności na PVM pochodzący z *S. gourlayi* (*Gm*) (Miętkiewska, 1999). Po przeprowadzeniu oceny odporności z porażenia wtórnego w testach ELISA (Wasilewicz-Flis, 2001), ocenie cech morfologicznych bulw i wad zewnętrznych, do kolekcji rodów odpornych na PVM wybrano 268 rodów. Z populacji z segregującym genem *Ns* z *S. tuberosum subsp. andigena* zebrano 154 rody, tylko te, które nie uległy porażeniu w testach ELISA (ocena porażenia pierwotnego).

Wnioski

- W kolekcji rodów wysoko odpornych na PVM znalazło się 200 rodów z genem odporności *Rm* oraz 68 rodów z genem *Gm*.
- Rody znajdujące się w kolekcji M zostały ocenione pod kątem odporności na PVM w testach laboratoryjnych, w porażeniu pierwotnym i wtórnym oraz uzyskały pełną charakterystykę cech morfologicznych.
- Genotypy znajdujące się w kolekcji mogą zostać wykorzystane w dalszych pracach hodowlanych, jako formy rodzicielskie w programach krzyżowań.
- Wytypowano 154 rody, które nie uległy porażeniu PVS w ocenie porażenia pierwotnego.

TEMAT 2

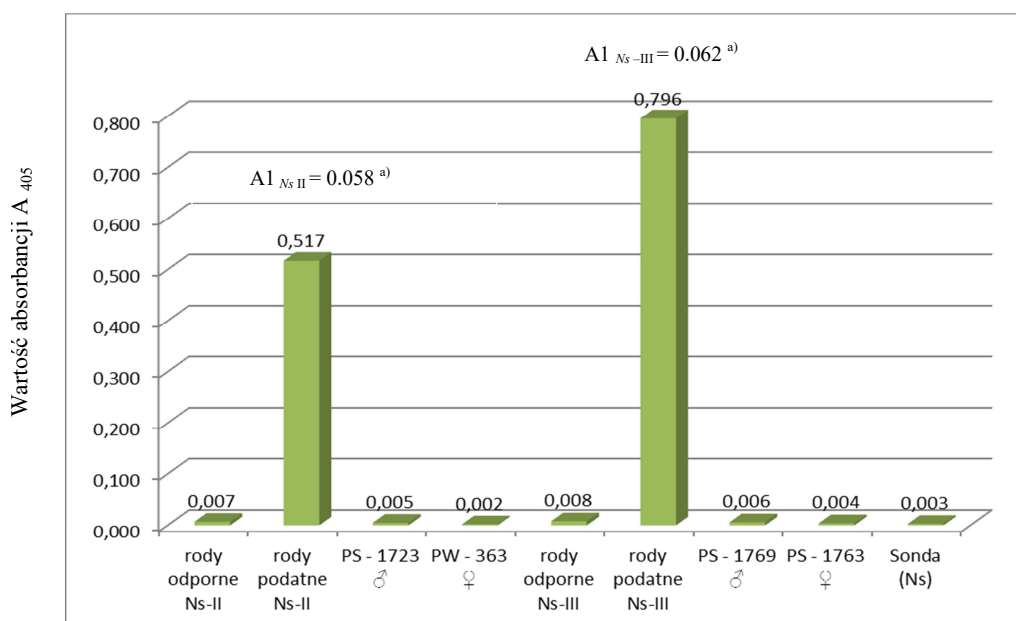
Ocena fenotypowa na wirus S ziemniaka rodów pochodzących z populacji 4x (*Ns*) — inokulacja mechaniczna roślin

Celem tematu była ocena fenotypowa poziomu odporności na wirus S ziemniaka rodów pochodzących z dwóch populacji tetraploidalnych, w których źródłem odporności na PVS był gatunek *S. tuberosum subsp. andigena*.

Wyniki

W ramach zadania 2 przeprowadzono ocenę odporności na PVS rodów pochodzących z dwóch populacji tetraploidalnych. Ocena porażenia pierwotnego pozwoliła wyróżnić rody odporne i podatne na PVS. Średnie wartości absorbancji A_{405} w grupie rodów odpornych, podatnych, wzorców i form rodzicielskich przedstawiono na rysunku 1. Badane rody, które posiadały średnie wartości absorbancji na poziomie lub poniżej wartości granicznej, zostały zaliczone wstępnie do grupy rodów najodporniejszych. Z 200

ocenianych rodów wyróżniono 154, które w porażeniu pierwotnym nie uległy zakażeniu PVS. Porażenie odnotowano dla 46 rodów ziemniaka. Z roślin badanych w roku 2018 zostały zebrane bulwy, aby w przyszłym sezonie ocenić porażenie wtórne.



a) wartość graniczna w teście ELISA dla populacji $Ns-II$ i $Ns-III$

Rys. 1. Średnie wartości A_{405} dla grupy rodów odpornych i podatnych na PVS z populacji $Ns-II$ i $Ns-III$, form rodzicielskich i odmiany wzorcowej

Wnioski

- Z populacji $Ns-II$ i $Ns-III$ po ocenie porażenia pierwotnego wyróżniono rody, które nie uległy porażeniu PVS.
- Wytypowano 154 rody wstępnie uznane za odporne na PVS.
- Pomimo wysokich wartości A_{405} w teście ELISA dla rodów podatnych, objawy fenotypowe na liściach roślin ziemniaka nie zawsze były obserwowane.

TEMAT 3

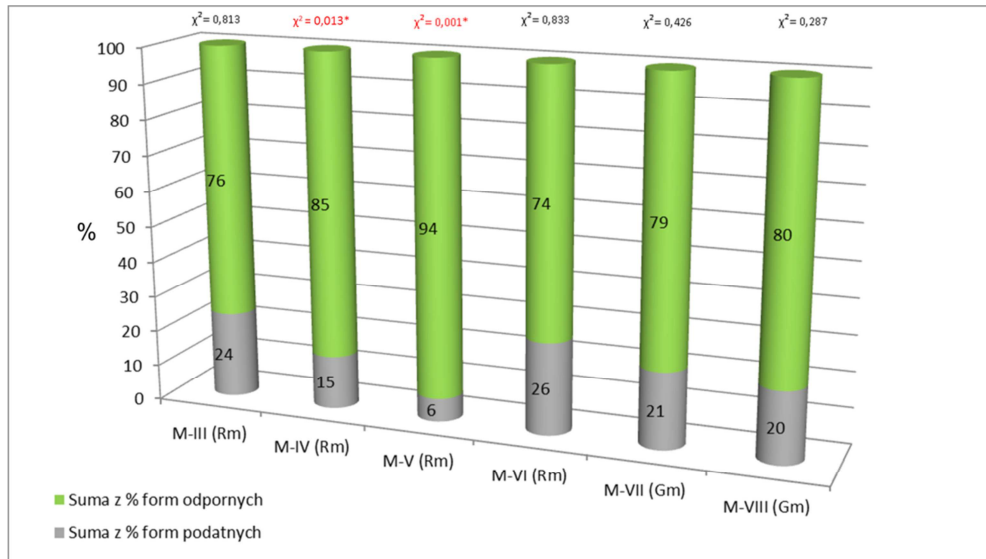
Ocena porażenia wtórnego rodów pochodzących z 6 populacji 4x zakażanych mechanicznie PVM w poprzednim sezonie

Celem tematu było wyróżnienie rodów 4x wysoko odpornych na wirus M ziemniaka.

Wyniki

W ramach tematu 3 przeprowadzono ocenę porażenia wtórnego rodów pochodzących z 6 populacji 4x z segregującym genem *Rm* z *S. megistacrolobum* i *Gm* z *S. gourlayi* zakażanych mechanicznie PVM. Ze wszystkich 580 ocenianych genotypów wyróżniono rody podatne na PVM ($n = 48$) i odporne ($n = 538$). W każdej z 6 ocenianych populacji

uzyskaliśmy przewagę form odpornych nad podatnymi. Dla czterech ocenianych populacji (M-III, M-IV, M-VII, M-VIII) uzyskano rozkład form odpornych i podatnych, zgodny z rozkładem oczekiwanym (3:1) (rys. 2). Zgodność wyników potwierdzono testem chi-kwadrat (χ^2). Rody wysoko odporne na PVM, z poprawną oceną cech morfologicznych, bez wad zewnętrznych i wewnętrznych zostały umieszczone w kolekcji genotypów odpornych na wirus M ziemniaka.



Rys. 2. Udział genotypów podatnych i odpornych na wirus M ziemniaka w 6 tetraploidalnych populacjach (wyniki dwuletnie)

Wnioski

- W testach oceniających porażenie wtórne wyróżniono z każdej populacji rody odporne na PVM.
- Frekwencja form odpornych do podatnych dla 4 populacji była zgodna z oczekiwaną.
- Rody odporne mogą zostać wykorzystane jako formy rodzicielskie, w przyszłych programach hodowlanych.

TEMAT 4

Ocena porażenia wtórnego rodów ocenianych w doświadczeniu szczegółowym:

- ocena porażenia wtórnego (testy ELISA) wytypowanych rodów 4x (*Rm* i *Gm*) poddanych kompleksowej ocenie odporności na wirus M ziemniaka w poprzednim sezonie.
- ocena porażenia wtórnego (analizy Real-Time PCR) wytypowanych rodów 4x (*Rm* i *Gm*) poddanych kompleksowej ocenie odporności na wirus M ziemniaka w poprzednim sezonie.

Celem tematu było do charakteryzowanie (poprzez ocenę porażenia wtórnego) reakcji odpornościowej wybranych rodów ziemniaka przy zastosowaniu różnych źródeł zmienności.

Wyniki

W ramach tematu 4 oceniano reakcję odpornościową na PVM 12 rodów należących do 4 populacji mających w swym pochodzeniu gen *Rm* i dwóch populacji z genem *Gm*. Porównywano wpływ kilku czynników (genotypu, szczepu wirusa i temperatury) na poziom porażenia oceniany po zakażeniu mechanicznym roślin i po szczepieniu. Ocena zawartości wirusa w komórkach roślinnych była oceniana w doświadczeniach na roślinach pochodzących z próby oczkowej (porażenie wtórne). Obecność PVM była oceniana w testach ELISA (Wasilewicz-Flis, 2001) i metodą Real-Time PCR. Wyniki z porażenia wtórnego dla rodów z populacji *Rm* i *Gm* potwierdziły poziom odporności uzyskany dla nich w porażeniu pierwotnym. Uzyskano bardzo wysoką korelację pomiędzy wynikami uzyskanymi dla roślin z porażenia pierwotnego i wtórnego we wszystkich układach doświadczeń.

Wnioski

- Rody należące do populacji *Rm* i *Gm* w ocenie porażenia wtórnego potwierdziły swój poziom odporności na wirus M ziemniaka uzyskany z porażenia pierwotnego.
- Dla genotypu M-III-130 odnotowano istotny wpływ temperatury i szczepu na namnażanie się wirusa w komórkach roślinnych.
- Odporność na PVM pochodząca od *S. megistacrolobum* i warunkowana genem *Rm* w naszych badaniach nie była rasowo specyficzna. Wyjątek stanowił ród M-III-130.
- Odporność na PVM warunkowana genem *Rm* dla dwóch genotypów z populacji M-III w dużym stopniu zależała od temperatury inkubacji.
- Odporność na PVM pochodząca od *S. gourlayi* przejawia się w szerokiej skali temperatur i nie zależy od szczepu wirusa użytego do zakażeń oraz związana jest ze zjawiskiem tolerancji (brak objawów fenotypowych na roślinach i brak spadku wigoru roślin).
- Rody odporne z genem *Gm* mogą stanowić doskonały materiał hodowlany i wprowadzać do programów hodowlanych wysoki poziom odporności na PVM.
- Zakażenia mechaniczne roślin wydają się być wystarczające do przeprowadzenia fenotypowej oceny poziomu odporności na PVM.

LITERATURA

- 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.
- Wasilewicz-Flis I. 2001. Selekcja rodów hodowlanych odpornych na wirus M ziemniaka (PVM), w których odporność determinowana jest genami *Gm* i *Rm*. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików, IHAR Monografie i Rozprawy Naukowe 10/2001: 49 — 51.

KRZYSZTOF TREDER**MATEUSZ MIELCZAREK****ANNA PAWŁOWSKA****BOGUMIŁA ZACHARZEWSKA****MARIA FEDCZAK**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie, Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii

Kierownik Tematu: dr Krzysztof Trederek Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział w Boninie, Bonin 3, 76-009 Bonin, tel. 943423031 w. 207, e-mail: k.trederek@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 58.

Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka

Development of sensitive methods for detection of the most important potato viruses

Słowa kluczowe: test ELISA, RT-PCR, RT-LAMP, wirusy ziemniaka, wykrywanie, ziemniak

Sprawcami największych strat plonu w Polsce są: wirus ziemniaka Y (PVY, Y), wirus liściozwoju ziemniaka (PLRV, L) oraz wirus ziemniaka M (PVM, M). Głównym celem Zadania nr 58 jest opracowanie czułych metod wykrywania tych wirusów w różnych tkankach ziemniaka. Cel ten jest realizowany w postaci pięciu 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 za pomocą koktajl i DAS ELISA. (IV) Adaptacja i optymalizację metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach *in vitro*. (V). Opracowanie testów diagnostycznych do szybkiego wykrywania wirusów.

Zdrowotność sadzeniaków jest oceniana za pomocą tzw. próby oczkowej, która stanowi połączenie testu biologicznego z immunologicznym. Próba oczkowa polega na wycięciu fragmentów bulw z pojedynczymi oczkami, chemicznym przerwaniu ich spoczynku, podkiełkowaniu w 21°C w ciemności, a następnie wysadzeniu w szklarni

i wykonaniu testu DAS-ELISA wg Clark i Adams (1977) z użyciem soku z próbek liści pobranych z 4–6 tyg. roślin. Wykrywanie wirusów metodą ELISA prowadzone jest metodą pośrednią z roślin, ze względu na znaczący wzrost koncentracji cząstek wirusa w roślinach, co zwiększa szansę na wykrycie testem ELISA wirusów o bardzo niskiej koncentracji w bulwach. Bezpośrednie badanie bulw byłoby optymalne, jednak Hill i Jackson (1984) wykazali, że czułość testu ELISA jest za mała do wykrycia wirusów w bulwach. Podejmowano próby zwiększenia czułości tego testu. Wstępne wyniki wskazywały, że koktajlowa wersja testu umożliwia wykrywanie PVY i PLRV w bulwach (Treder i in., 2009). Wieloletnie badania prowadzone w ramach Zadania nr 58 wykazały, że test był wiarygodny jedynie dla PLRV i PVM. W przypadku PVY uzyskiwano zarówno wyniki zgodne z próbą oczkową, jak również wykazujące mniejszą skuteczność testu w porównaniu z próbą oczkową. W celu wyjaśnienia tej rozbieżności podjęto badania nad wpływem odporności odmian na skuteczność wykrywania wirusów w bulwach. Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników stwierdzono, że wzrost odporności odmian ma negatywny wpływ na wykrywalność PVY. W celu zwiększenia czułości testu prowadzone są prace nad możliwością wykorzystania różnych metod zagęszczania cząstek wirusowych z większych objętości. Obiecujące wyniki uzyskano stosując cząstki magnetyczne pokryte przeciwciałami. Obecnie badana jest możliwość wykorzystania membran jonowymiennych w tym samym celu.

Alternatywą dla próby oczkowej może być test na kielkach opracowany dla PLRV przez Syllera (1988). W Zadaniu nr 58 prowadzone są prace nad wykrywaniem wirusów Y, M i L w tym organie. Potwierdzono dobrą zgodność wykrywania wirusów Y, M i L w kielkach z próbą oczkową. Do wykrywania w bulwach można także stosować testy molekularne — RT-PCR lub RT-LAMP, (Singh i in., 1995; Boonham i in., 2008). Koszt testów molekularnych można obniżyć zastępując komercyjne zestawy do izolacji RNA krzemionką (Zacharzewska i in., 2014) lub cząstkami magnetycznymi (Treder i in., 2018).

Metody molekularne mogą być również przydatne do oceny stanu zdrowia roślin wprowadzanych do kolekcji zasobów genowych ziemniaka. Taką kolekcję (Bank Genów Ziemniaka) posiada Pracownia Zasobów Genowych i Kultur *in vitro*, wchodząca w skład Oddziału IHAR — PIB w Boninie. Rutynowa ocena kolekcji na obecność wirusów wykonywana jest za pomocą ELISA. Koszt testu RT-PCR jest zbyt wysoki do oceny kolekcji. Można go obniżyć stosując multipleksowy wariant (m-RT-PCR) testu (Du i in., 2008). W ramach Zadania nr 58 opracowano wariant klasycznego m-RT-PCR do jednoczesnego wykrywania Y, M i L w tej samej próbce. Za pomocą opracowanego testu stwierdzono, że przebadane 150 genotypy ziemniaka z kolekcji podstawowej Banku Genów są wolne od wirusów Y, M i L. Dalsze usprawnienie testu wymaga opracowania m-RT-PCR w czasie rzeczywistym.

Rozwój metod izotermicznej amplifikacji kwasów nukleinowych umożliwił opracowanie metod diagnostycznych, które można wykonać poza laboratorium (Boonham i in., 2008). W ramach Zadania nr 58 opracowano szybki test fluorescencyjny RT-LAMP do wykrywania PVY (Przewodowska i in., 2015) oraz jego czulszy wariant, umożliwiający różnicowanie serotypów PVY (Treder i in., 2018) i kolorymetryczne wykrywanie wirusa poprzez obserwację zmiany barwy badanych prób (Treder i in.,

2017). Zmiana barwy była specyficzna dla prób RNA izolowanego z roślin z wirusem i nie zachodziła w próbach, do których dodawano RNA z roślin zdrowych. Opracowano również procedurę wykrywania wirusów Y, M i L za pomocą testu RT-LAMP bezpośrednio w soku z roślin, bez izolacji RNA. Metoda działała dobrze we fluorescencyjnej wersji RT-LAMP. W kolorymetrycznym RT-LAMP, zmiana barwy następowała zarówno po dodaniu do prób soku wyciśniętego z roślin z badanymi wirusami, jak i po dodaniu soku z roślin zdrowych.

Celem projektu w 2018 r. było: (I) opracowanie metody zagęszczania wirusów z większych objętości poprzez wiązanie cząstek wirusa na membranach jonowymiennych, (II) zbadanie, czy odporność odmian wpływa na wykrywalność wirusów bezpośrednio w bulwach, (III) ocena przydatności kielków do wykrywania wirusów, (IV) opracowanie multipleksowego RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, M i L; (V) opracowanie metody przygotowania soków do RT-LAMP, eliminującej z soku czynniki wywołujące zmianę barwy błękitu hydroksynaftolowego (HNB).

W roku 2018 w ramach prac nad metodą zagęszczania wirusów z większych objętości na membranach jonowymiennych stwierdzono, że PVM wiązał się silnie a PLRV słabo ze złożem Q. Oba wirusy nie wiązały się ze złożem S. W skład populacji PVY wchodziły wiriony o słabym i silnym wiązaniu do złoża Q oraz o słabym i silnym wiązaniu do złoża S. Zagęszczanie cząstek wirusów na membranie Q miało pozytywny wpływ na wykrywanie PVY. Dla PVM zabieg ten zwiększał dwukrotnie czułość wykrywania wirusa, jednak negatywnie wpływał na wysokość absorbancji w teście ELISA. Zateżnienie cząstek wirusa nie powiodło się dla PLRV, prawdopodobnie z uwagi na słabe oddziaływanie tego wirusa ze złożem Q w zastosowanych warunkach. W 2018 r. w doświadczeniu polowym porażenie PVY było wysokie w porównaniu z ubiegłymi sezonami a porażenie PVM i PLRV bardzo niskie, podobnie jak w ubiegłych sezonach. Dla PVY potwierdzono wpływ odporności odmian na spadek wykrywalności wirusa w bulwach. Badając wykrywalność wirusów w bulwach i kielkach ziemniaka potwierdzono dobrą zgodność wykrywania wirusów w kielkach z próbą oczkową. Wyższą skutecznością wykazał się test koktajl ELISA niż DAS-ELISA dla kielków. Stwierdzono wyższą skuteczność wykrywania PVM bezpośrednio w bulwach niż za pomocą próby oczkowej. Test RT-qPCR był bardziej skuteczny w ocenie porażenia liści, kielków i bulw wirusem Y niż RT-LAMP i DAS-ELISA. Wyniki prac nad optymalizacją metod molekularnych do wykrywania wirusów w roślinach *in vitro* w 2018 r. potwierdziły, że pojedynczy RT-PCR w czasie rzeczywistym pozwalał na wykrycie wszystkich badanych wirusów. Multipleksowy test RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, L i M wymaga dalszych badań. W roku 2018 wykazano, że stosując chloroform można wizualnie wykrywać PVY za pomocą kolorymetrycznego testu RT-LAMP z barwnikiem HNB bez izolacji RNA z badanych prób. Dodanie do prób alfa-kazeiny istotnie skracало czas wykrycia w próbach o niskiej koncentracji PVY. Czułość wizualnej detekcji z HNB była taka sama jak czułość wykrywania PVY za pomocą fluorescencyjnego testu RT-LAMP.

LITERATURA

- Boonham N., Glover R., Tomlinson J., Mumford R. 2008. Exploiting generic platform technologies for the detection and identification of plant pathogens. *Eur. J. Plant Pathol.* 121: 355 — 363.
- Clark M. F., Adams A. N. 1977. Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34: 475 — 483.
- Du Z., Chen J. and Hiruki C. 2006. Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. *Plant Disease* 90: 185 — 189.
- Hill S. A., Jackson E. A. 1984. An investigation of the reliability of ELISA as a practical test for detecting potato leafroll virus and potato virus Y in tubers. *Plant Pathol.* 33: 21 — 26.
- 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. *Am. J. Potato Res.*, 92: 303 — 311.
- Singh R. P., Kurz J, Boiteau G., Bernard G. 1995. Detection of potato leafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. *J. Virol. Methods* 55: 133 — 43.
- Syller J. Detection of potato leaf roll virus in intact sprout disks by enzyme-linked immunosorbent assay. *Journal of Phytopathology*, 121: 58 — 64.
- 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. DOI:10.1007/s00705-017-3635-3, *Archives of Virology* 163: 447 — 458.
- 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 Breed. Seed Sci.* 75: 77 — 85.
- Treder K., Przewodowski W., Barnyk A. 2009. Factors influencing detection of potato leafroll virus and potato virus Y in potato tuber extracts. *Plant Breed. Seed Sci.* 59: 65 — 74.
- 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.

WŁODZIMIERZ PRZEWODOWSKI

KATARZYNA SALAMOŃSKA

DOROTA SZAREK

DOROTA MICHAŁOWSKA

WIOLETA STOCHŁA

AGNIESZKA PRZEWODOWSKA

GRZEGORZ GRYŃ

MILENA PIETRASZKO

KATARZYNA FRANKE

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: dr hab. inż. Włodzimierz Przewodowski Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin

Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Oddział W Boninie, 76-009 Bonin 3, tel. 94 3423031 w. 211,

e-mail: w.przewodowski@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 57.

**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**

Słowa kluczowe: bakterioza pierścieniowa ziemniaka, *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus*,
diagnostyka, nowoczesne metody, próby środowiskowe, ziemniak

CEL TEMATU ORAZ PROWADZONYCH BADAŃ

Celem realizowanego projektu było opracowanie materiałów i procedur do selektywnej izolacji kwarantannowej bakterii — *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* (Cms) z różnych prób środowiskowych oraz opracowanie i weryfikacja wysoce czułych i specyficznych metod identyfikacji tej bakterii.

Założony cel osiągnięto poprzez realizację założeń poszczególnych tematów badawczych projektu.

OPIS WYNIKÓW

Wyniki uzyskane w temacie 1 pozwoliły na opracowanie materiałów do konstrukcji immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z badanych prób. Na podstawie opracowanych antygenów, w procesie immunizacji królików uzyskano 3 surowice z IgG anty-Cms, które po oczyszczeniu badano pod kątem czułości i specyficzności względem stosowanych szczepów bakteryjnych. Do opracowania immunopodłoża użyto przeciwciał dających najlepszy stosunek miana do specyficzności. Opracowane materiały pozwoliły na opracowanie funkcjonalnego immunopodłoża do izolacji bakterii Cms z soku ziemniaka w warunkach laboratoryjnych oraz polowych.

Badania związane z weryfikacją metody izolacji DNA z zawiesin Cms o różnej zawartości śluzów bakteryjnych, potwierdziły skuteczność opracowanej metody zarówno w obecności wody, jak i komponentów soku ziemniaka. Jakość wyizolowanego DNA oceniano na podstawie pomiaru spektrofotometrycznego oraz analizy elektroforegramów zawierających produkty amplifikacji DNA po przeprowadzeniu testu PCR. W porównaniu do zalecanej obecnie metody izolacji DNA, którą stosowano jako odnośną, opracowana metoda pozwalała na uzyskanie wyższej czułości w przypadku prób z wody, ale była jednocześnie bardziej wrażliwa na komponenty soku ziemniaka. Wprowadzenie modyfikacji w opracowanej metodzie w trakcie izolacji DNA z ekstraktów roślinnych pozwoliło na uzyskanie czułości adekwatnej do metody odnośnej.

Wyniki uzyskane w ramach tematu 3 związane z porównaniem stopnia porażenia badanych roślin oraz bulw potomnych pozwoliły potwierdzić funkcjonalność opracowanych materiałów oraz metodyki izolacji DNA. Badane odmiany wykazały podobnie jak w poprzednim roku zróżnicowaną podatność na sztuczną inokulację bakteriami Cms obu szczepów. Pomimo odmiennych do poprzednich lat warunków pogodowych, stopień porażenia bakteriami Cms zależał zarówno od stosowanego profilu glebowego, jak i użytego do inokulacji szczepu Cms. Wyniki wskazały na większą efektywność szczepu silnie mukoidalnego. Najmniejszą podatność uzyskano dla odmian Courage i Ikar, natomiast największe porażenie bulw zanotowano u odmian Gwiazda i Sagitta. Stosowanie profilu glebowego miało wpływ na wysokość plonu i liczbę bulw potomnych. Metody IFAS i PCR w znacznym stopniu korelowały ze sobą potwierdzając wyższy indeks porażenia prób z bulw, niezależnie od wykrywanego szczepu Cms.

Wyniki badań uzyskane w ramach tematu 4, pozwoliły ocenić wpływ obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin *in vitro*. Badane odmiany wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność poszczególnych szczepów bakterii Cms. W porównaniu do wcześniejszych badań z użyciem mieszaniny 3 szczepów Cms, przy zastosowaniu pojedynczych szczepów i analogicznych koncentracji komórek bakterii w mieszaninie inokulacyjnej, oddziaływanie fitotoksyczne było znacznie słabsze. Obecność bakterii Cms oceniona testem PCR potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych, często pomimo braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach oraz zamgleń w podłożach wskazujących na silne porażenie bakteriami Cms.

Badania dotyczące zapobiegania kontaminacjom bakteriami Cms podłoży stosowanych do hodowli roślin *in vitro* ziemniaka, pozwoliły na ocenę wpływu obecności koloidu złota na działanie mieszaniny dwóch innych koloidów o działaniu antymikrobiologicznym. Obserwowano różną wrażliwość badanych odmian ziemniaka na mieszaninę koloidów, zależnie od stosowanej koncentracji. Niższe stężenia badanych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi, natomiast zwiększenie koncentracji nanocząsteczek w mieszaninie powodowało wyższą aktywność antymikrobiologiczną w stosunku do Cms.

WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

1. Przeciwciała skierowane na komórki bakterii Cms uzyskane w ramach pierwszego z tematów badawczych w porównaniu z IgG z roku 2017 roku cechowały się wysoką specyficnością oraz relatywnie niższym mianem wobec badanych bakterii Cms. Odpowiednia modyfikacja podłoży oraz zastosowanie opracowanych w roku poprzednim IgG pozwoliły na opracowanie powtarzalnego immunopodłoża do specyficznej izolacji komórek bakterii Cms niezależnie od stopnia mukoidalności badanych szczepów Cms, jak również wczesności i zawartości skrobi badanych odmian ziemniaka. Opracowany test immuno-PCR w porównaniu do poprzedniego roku został ulepszony, ale wymaga jeszcze dopracowania i optymalizacji w celu poprawienia czułości.
2. Badania dotyczące opracowania warunków izolacji DNA bakteryjnego pozwoliły porównać i wyznaczyć warunki, przy których uzyskano najwyższą i najniższą czułość testu PCR bakterii Cms izolowanych z wody oraz z ekstraktu z bulw ziemniaka. Z uwagi na znaczne oddziaływanie inhibitorów reakcji PCR w próbach z ekstraktu ziemniaka, do dalszych badań w ramach zadania wybrano metodę wysokosolną z proteinazą K stosując 10-krotne rozcieńczenie izolowanego DNA.
3. W temacie trzecim wykazano zróżnicowaną podatność badanych odmian na sztuczną inokulację badanymi szczepami bakterii Cms. Odmianami najmniej podatnymi na porażenie roślin i bulw potomnych przez badane szczepy Cms były Courage, Ikar i Jurek, natomiast porażenie bulw w wysokim stopniu obserwowano u odmian Annabelle, Gwiazda i Sagitta. Wysokie porażenie pędów przekładało się na wysokie porażenie plonu. Obserwowane w trakcie wegetacji zmiany w postaci chloroz na liściach u odmian Sagitta i Gwiazda potwierdzone zostały wysokim indeksem porażenia obliczonym na podstawie obserwacji mikroskopowej. Wyższy indeks porażenia łodyg i bulw stwierdzono w preparatach pochodzących z roślin, których sadzeniaki były inokulowane mukoidalnym szczepem Cms NCPPB 4053 i były uprawiane na glebie ciężkiej, gliniastej profilu VI. Metody IFAS i PCR w znacznym stopniu korelowały ze sobą potwierdzając wyższy indeks porażenia prób z bulw, niezależnie od wykrywanego szczepu Cms.
4. Badania przeprowadzone w ramach kolejnego zadania pozwoliły ocenić wpływ obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cms na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin

- in vitro*. Badane odmiany wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność poszczególnych szczepów bakterii Cms. Najbardziej wrażliwą odmianą była się odmiana Sagitta, natomiast najmniej podatną na obecność badanych szczepów Cms, odmiana Courage. Obecność bakterii Cms oceniona testem PCR potwierdzono praktycznie w większości badanych prób pozytywnych często pomimo braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach oraz zamgleń w podłożach wskazujących na silne porażenie bakteriami Cms.
5. W ramach tematu 5 oceniono wpływ obecności koloidu złota na działanie mieszaniny koloidów srebra i miedzi na bakterie Cms, jak również na wzrost i namnażanie badanych roślin *in vitro*. Obecność złota zwiększyła działanie toksyczne nanocząsteczek w stosunku do mukoidalnego szczepu patogenicznych bakterii Cms już przy koncentracji 0,1% docelowego stężenia nanocząsteczek w podłożu mikrobiologicznym. Obserwowano różną wrażliwość badanych odmian ziemniaka w postaci kultur *in vitro* na mieszaninę koloidów, zależnie od stosowanej koncentracji. Niższe stężenia badanych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi.

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.
- Gryń G., Pastuszewska T., Przewodowski W. 2016. Ocena patogeniczności wybranych szczepów *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* pochodzących z kolekcji NCPPB w Wielkiej Brytanii. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 56 (1): 73 — 78. DOI: 10.14199/2016-013.
- Nowacki W. 2009. Problemy profilaktyki i zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka wywoływanej przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 49 (2): 678 — 685.
- Pastuszewska T., Gryń G., Franke K. 2010. Podatność odmian ziemniaka na porażenie przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 50: 244 — 248.
- Pastuszewska T., Gryń G. 2012. Przeżycie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na powierzchniach wybranych materiałów w warunkach różnych temperatur. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 52 (2): 443 — 446.
- 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. <https://doi.org/10.1007/s12230-017-9629-6>.
- Przewodowski W. 2009. Nowoczesne metody w diagnostyce bakterii *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. Prog. Plant Prot. / Post. Ochr. Rośl. 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*. PLoSONE12(1):e0169785. DOI:10.1371/journal.pone.0169785.
- Salamońska K., Stochła W., Przewodowski W. 2016. Nowoczesne metody diagnostyczne w identyfikacji molekularnej bakterii kwarantannowych ziemniaka Ziemn. Pol. 2016, 4: 41 — 45.
- Stochła W., Przewodowski W., Przewodowska A. 2014. Wybrane metody otrzymywania przeciwciał służących do wykrywania i identyfikacji patogenów ziemniaka. Ziemn. Pol. 3: 46 — 49.

- Stochła W., Przewodowska A., Przewodowski W. 2015. Przydatność przeciwciał króliczych uzyskiwanych dwiema metodami do wykrywania *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* testem DAS-ELISA. Prog. Plant Prot. /Post. Ochr. Rośl. 55: 352 — 357.
- 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.

DARIUSZ GRZEBELUS

GABRIELA MACHAJ

ALICJA MACKO-PODGÓRNI

KORNELIA KWOLEK

RAFAŁ BARAŃSKI

WOJCIECH WESOŁOWSKI

MARCELINA WAJDZIK

ANNA SZLACHTOWSKA

BEATA DOMNICZ

PRZEMYSŁAW GIERSKI

MAREK SZKLARCZYK

Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Kierownik Tematu: prof. dr. hab. Dariusz Grzebelus Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytet Rolniczy w Krakowie Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, tel. 12 6625399, e-mail: d.grzebelus@urk.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.802.8.2018, Zadanie 45.

Opracowanie metod globalnej analizy polimorfizmów w genomie buraka cukrowego

Development of methods for global analysis of polymorphisms in the genome of sugar beet

Słowa kluczowe: BNYVV, cytoplazmatyczna męska sterylność, ekspresja genów, genotypowanie, markery molekularne, rizomania

PRZYGOTOWANIE I FENOTYPOWANIE SEGREGUJĄCYCH POPULACJI BURAKA CUKROWEGO

Cele tematu

Uzyskanie roślin buraka cukrowego o zróżnicowanej reakcji na rizomanię oraz ich przygotowanie do analiz molekularnych; uprawa roślin rosnących w kontakcie z wirusem BNYVV oraz w warunkach kontrolnych do badań molekularnych; uzyskanie kwitnących roślin F₁ z krzyżowań typu obiekt męskosterylny (MS) × kandydat na linię dopełniającą (linię O) oraz ocena fenotypu płodności tych roślin; uzyskanie nasion BC1 na bazie

wybranych roślin męskopłodnych z potomstw F_1 ; uzyskanie korzeni wysadkowych nowych pokoleń BC1 i BC2 z segregacją genów restorerowych.

Opis wyników

Wszystkie materiały roślinne zostały uzyskane i ocenione zgodnie z harmonogramem. Rośliny o zróżnicowanej reakcji na rizomanię zostały ocenione w komercyjnym teście genetycznym (marker SNP) określającym podatność na BNYVV.

W bieżącym roku w dwóch spośród sześciu kwitnących potomstw nie wystąpiło oczekiwane rozszczepienie na rośliny męskosterylne, męskopłodne i (ewentualnie) częściowo-męskopłodne. Jeden obiekt cechowała wyraźna nadreprezentacja roślin płodnych, co może wynikać z obecności więcej niż jednego restorera. W jednym obiekcie wszystkie rośliny były męskosterylne, co wskazuje na brak genu restorerowego.

Wnioski

- Duża liczba badanych linii hodowlanych pozwoliła na przetestowanie materiału o zróżnicowanym pochodzeniu. Test komercyjny potwierdził, że cechowały się one kontrastującymi genotypami w odniesieniu do rejonu *Rz1* warunkującego odporność na rizomanię.
- Uzyskano korzenie wysadkowe dziesięciu potomstw typu BC, w których oczekuje się segregacji na rośliny męskosterylne i męskopłodne.
- Segregacja fenotypowa w obrębie czterech z sześciu kwitnących potomstw gwarantuje ich użyteczność w analizie genów restorerowych.

ANALIZY BIOINFORMATYCZNE

Cele tematu

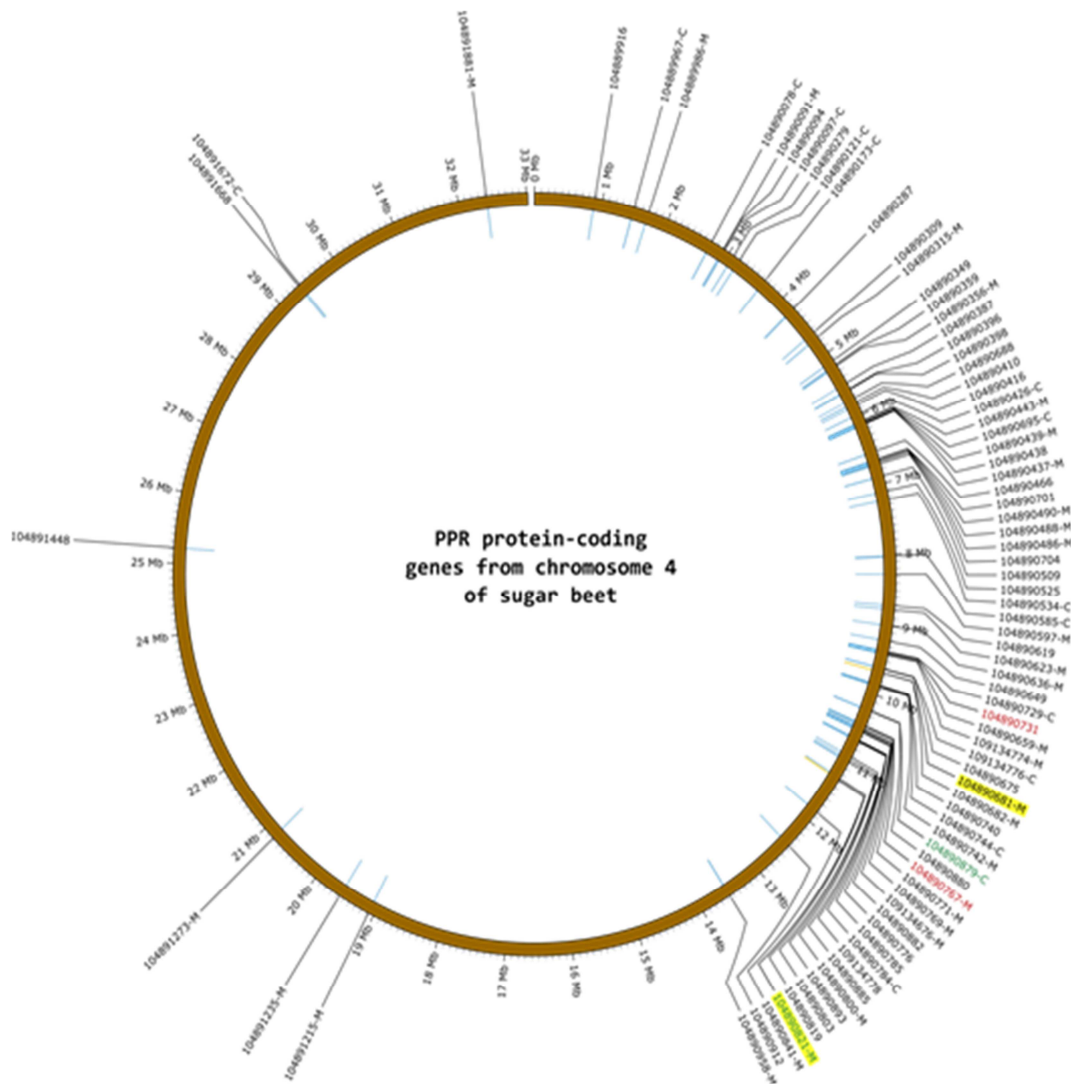
Analiza poziomu ekspresji genów potencjalnie zaangażowanych w warunkowanie odporności na rizomanię u roślin wrażliwych i odpornych; określenie specyficznych cech sekwencji aminokwasowej białek kodowanych w locus *X/x* (*Rfl/rfl*) u roślin męskosterylnych i u roślin z przywróconą płodnością; określenie poziomu transkrypcji genów kodujących białka PPR u roślin męskosterylnych i u roślin z płodnością przywróconą przez gen *Z* (*Rf2*).

Opis wyników

Materiał badawczy stanowiły trzy odporne i trzy wrażliwe na BNYVV rośliny wcześniej poddane genotypowaniu markerami sprzężonymi z genem *Rz1*. Badane rośliny były eksponowane na działanie wirusa podczas wzrostu w warunkach szklarniowych. Kontrolę stanowiły trzy odporne i trzy wrażliwe na BNYVV (wg wyników genotypowania) rośliny, wzrastające na glebie nie zarażonej wirusem. Oceniono ekspresję sześciu genów.

Bazą dla analizy przywracania płodności były dane RNA-seq wygenerowane dla obiektu 3S1185 w roku 2016. Uzyskane dla pojedynczych roślin odczyty sekwencyjne zostały zmapowane do wyekstrahowanych z chromosomu IV 82 genów kodujących białka PPR. Wyliczone dla poszczególnych genów wartości pokrycia były miarą ich ekspresji na poziomie RNA. Wśród genów cechujących się silniejszą ekspresją u roślin męskopłodnych najwyraźniejsze różnice odnotowano dla 104890821 i 104890879.

Z kolei spośród genów cechujących się silniejszą ekspresją u roślin męskosterylnych najwyraźniejsze różnice odnotowano dla 104890731 oraz 104890767 (rys. 1).



Rys. 1. Mapa fizyczna chromosomu 4 buraka cukrowego z zaznaczeniem pozycji genów kodujących białka PPR, czcionka czerwona — geny o wyższej ekspresji u roślin męskosterylnych, czcionka zielona — geny o wyższej ekspresji u roślin męskopłodnych, żółte cieniowanie — geny, których markery CAPS wykazują kosegregację z fenotypem, M — geny dla białek PPR kierowanych do mitochondriów, C — geny dla białek PPR kierowanych do plastydów

Wnioski

- Poziom ekspresji genów wytypowanych jako istotne dla warunkowania reakcji odporności roślin buraka cukrowego na BNYVV (*RPP13-like*; LOC104888806 i LOC104888807) okazał się być różny w zależności od genotypu rośliny i kontaktu z wirusem.
- Wyniki qPCR częściowo potwierdziły zmiany ekspresji obserwowane w oparciu o analizy transkryptomów w odniesieniu do roślin różniących się reakcją na rizomanię.
- Fizycznie sprzężone geny *RPP13-UP* i *RPP13-DOWN* (LOC104888806 i LOC104888807) mogą łącznie warunkować reakcję odporności na BNYVV, konstytuując *locus Rz1*.
- Obecnie najwiarygodniejszym kandydatem na restorer *Z/Rf2* jest gen 104890821 kodujący kierowane do mitochondriów białko PPR.

OPRACOWANIE PLATFORMY GENOTYPOWANIA BURAKA CUKROWEGO DLA SELEKCJI WSPOMAGANEJ MARKERAMI

Cele tematu

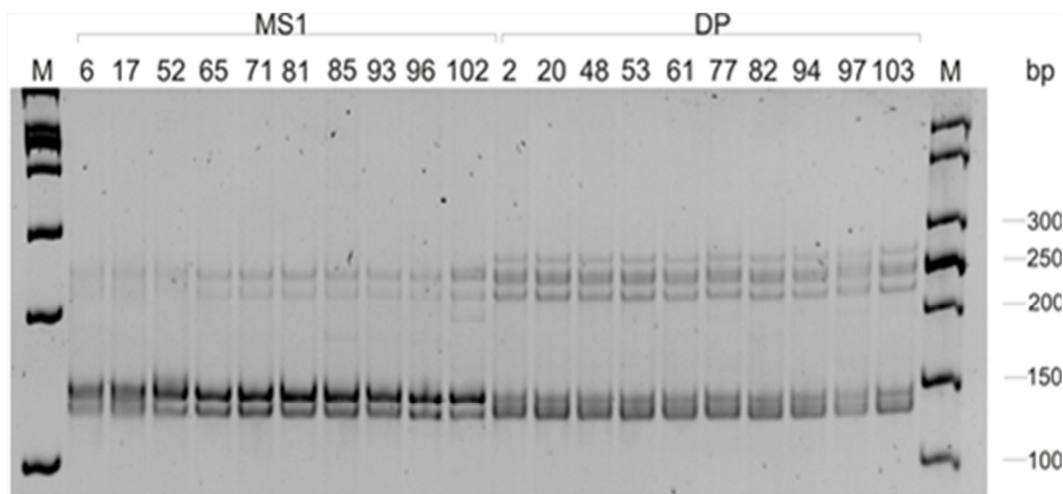
Opracowanie markerów molekularnych identyfikujących polimorfizmy w rejonach kodujących geny o zróżnicowanej ekspresji w grupie roślin odpornych i wrażliwych na rizomanię; określenie, czy genotypy *loci Rf/rf* wykazują zależność od genotypów w wybranych *loci* markerowych; opracowanie kolejnych markerów dla *locus Z/z (Rf2/rf2)*; określenie genów restorerowych obecnych w nowej puli segregujących populacji.

Opis wyników

Walidacja markerów molekularnych obejmowała genotypowanie 299 roślin należących do 59 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 a komercyjnym markerem SNP wykazała, że w przypadku 38 populacji otrzymano zasadniczo zgodne wyniki.

W ramach analizy nierównowagi sprzężeń dziesięć linii męskosterylnych poddano genotypowaniu trzema markerami dla genu *X (Rf1)* i dwoma markerami dla genu *Z (Rf2)*. Najwięcej przypadków zmienności wewnątrzliniowej odnotowano przy użyciu dwóch markerów dla genu *X*. Ogólnie w badanym zestawie obiektów wszystkie testowane markery cechowała dominacja jednego lub dwóch profili markerowych, a w przypadku jednego z markerów dla genu *Z* w ogóle nie stwierdzono polimorfizmu. Profile tego typu należy uznać za związane z allelami dopełniającymi analizowanych *loci* restorerowych.

Identyfikację genów restorerowych wykonano dla czterech populacji segregujących na rośliny męskosterylne i męskopłodne — wykorzystano do tego po cztery markery dla genów *X* i *Z*. Kosegregację z fenotypem obserwowano wyłącznie dla przy wykorzystaniu markerów dla genu *X*, co wskazuje, iż w badanych populacjach występuje właśnie ten restorer (rys. 2).



Rys. 2. Obraz markera Rfl-Mors uzyskany dla wybranych roślin męskosterylnych (MS1) i męskopłodnych (DP) z populacji 3s 13 175. M — wzorzec wielkości fragmentów DNA

Wnioski

1. Wyniki genotypowania markerami CAPS sprzężonymi z rejonem *Rz1* w genomie buraka cukrowego, warunkującym odporność na rizomanię, są zasadniczo zgodne z wynikami genotypowania komercyjnym systemem SNP.
2. Obserwowane rozbieżności dotyczyły ok. 30% genotypowanych roślin i były związane przede wszystkim z:
 - nadreprezentacją heterozygot w systemie komercyjnym (15%),
 - określeniem roślin jako wrażliwych w teście komercyjnym, ale odpornych w systemie CAPS (9%), przy czym wyniki takie były ograniczone do 10 badanych populacji, co wskazuje na mniejszą uniwersalność jednego z testów,
 - prawdopodobnymi sporadycznymi błędami technicznymi w obu testach.
3. Nowo opracowany marker InDel dla rejonu *Rz1* pozwolił na skuteczne rozróżnienie roślin odpornych i wrażliwych w populacjach, które cechowały się haplotypem determinującym wrażliwość z obecnością insercji. W pozostałych przypadkach wynik genotypowania InDel roślin wrażliwych nie różnił się od wyniku uzyskanego dla roślin odpornych. Marker InDel jest zatem mniej uniwersalny niż markery CAPS.
4. Genotypowanie linii męskosterylnych wykazało u większości roślin obecność profili charakterystycznych dla fenotypu męskosterylnego, bądź profili do tej pory nieobserwowanych. Tylko w przypadku markera 20L-int u ponad 60% przebadanych roślin stwierdzono obecność profili wcześniej korelowanych z fenotypem męskopłodnym. Wynik taki wskazuje na równowagę sprzężeń pomiędzy *loci* markera i restorera.

5. Genotypowanie czterech segregujących populacji ośmioma markerami dla *loci* restorerowych wykazało, iż w badanym materiale roślinnym za przywracanie płodności odpowiada gen *X*. Maksymalny odnotowany poziom kosegregacji testowanych markerów z fenotypem przekraczał 90%.

SANDRA CICHORZ**MAŁGORZATA MALICKA****MARIA GOŚKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: dr Sandra Cichorz, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut

Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, Oddział, Bydgoszcz, Al. Powstańców Wielkopolskich 10,

85-090 Bydgoszcz, tel. 52 5816918, e-mail: s.cichorz@ihar.bydgoszcz.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.802.19.2018, Zadanie 46.

Badania nad mechanizmami warunkującymi proces embriogenezy gametycznej u buraka cukrowego

The research on the mechanisms responsible for gametic embryogenesis in sugar beet

Słowa kluczowe: AGP, *Beta vulgaris*, gynogeneza, haploidy

W ostatnich kilkunastu latach nieodzownym elementem strategii tworzenia nowych materiałów wyjściowych dla hodowli, jak również doskonalenia odmian buraka cukrowego stało się wykorzystanie najnowszych osiągnięć w dziedzinie biotechnologii. Otrzymanie haploidów tego gatunku okazało się możliwe dopiero w latach 80. z wykorzystaniem kultur *in vitro* niezapłodnionych zalążków i zalążni (Van Geyt i in., 1987; Doctrinal i in., 1989; Gośka, 1997), podczas których dochodzi do regeneracji haploidalnych pędów z komórek jajowych woreczka zalążkowego. Rośliny haploidalne są nieplodne, z tego względu niezbędna jest ich diploidyżacja dla uzyskania stabilnych genetycznie i cytologicznie linii podwojonych haploidów (linii DH). Jednak wykorzystanie linii DH w hodowli roślin w znacznym stopniu uwarunkowane jest efektywną metodą ich wyprowadzenia z różnych materiałów wyjściowych. Wpływ genotypu uważany jest za najważniejszy czynnik warunkujący efektywność prawie wszystkich rodzajów kultur tkankowych, a w szczególności embriogenezy gametycznej. Obecnie niewiele wiadomo na temat mechanizmów molekularnych, w tym udziału poszczególnych genów związanych z indukcją powyższego procesu. Przy czym warto podkreślić, iż identyfikacja genotypów o wysokim potencjale gynogenetycznym byłaby

wysoce pożądana. Dlatego też, aby poszerzyć wiedzę na temat genetycznych mechanizmów warunkujących rozwój haploidalnych zarodków nieodzowne są badania prowadzone na szeroką skalę, szczególnie genotypów o wysokim i niskim potencjale gynogenetycznym buraka cukrowego (Bohanec, 2009).

Z powyższych względów punktem wyjścia prowadzonych prac była między innymi cytologiczna charakterystyka komórek załączka buraka. Zaobserwowano, iż podczas prowadzenia kultur zapłodnionych załączków buraka cukrowego, dochodzi do zmian w obrębie ścian komórek integumentum (Bruun, 1991). Zgodnie z danymi literaturowymi, obecność poszczególnych komponentów ściany, jak też ich przestrzenna organizacja są potencjalnymi czynnikami odzwierciedlającymi lub w pewnym stopniu warunkującymi właściwości morfogenetyczne komórek i tkanek. Badania prowadzone na 3 liniach kalusa buraka cukrowego (normalnego, nieorganogenicznego i rakowego) 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 wzrostu łagiewki pyłkowej, wydłużania i różnicowania komórek, a także regulacji somatycznej embriogenezy (Capataz-Tafur i in., 2011). Ponadto wykazano obecność AGP w organach wegetatywnych i generatywnych roślin, w tym również w załączkach (Acosta-Garcia i Vielle-Calzada, 2004; Qin i Zhao, 2006). Wyniki przytoczonych prac eksperymentalnych sugerują, że proteoglikany AGP pełnią istotną rolę w procesach morfogenezy roślin.

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 wybranych proteoglikanów i pektyn.

Obserwacje histologiczne w mikroskopie świetlnym prowadzone na skrawkach cienkich (1 μm) wykazały, że izolacja niezapłodnionych załączków z roślin donorowych odbyła się między 1–3 dniem przed stadium antezy, zaś woreczek załączkowy był w pełni rozwinięty, dojrzały i prawidłowo zorganizowany. W przypadku genotypów o wyższym potencjale embriogenetycznym po 7 dniach od wyłożenia na pożywki regeneracyjne w niezapłodnionych załączkach woreczek załączkowy powiększył się, zaś synergidy uległy resorpcji. Na kolejnym etapie (po 9 dniach) widoczne były pierwsze podziały komórki jajowej i tworzenie się dwukomórkowego prazarodka. Natomiast po 14 dniach zaobserwowano rozwój trzykomórkowego prazarodka. W przypadku genotypów o niższym potencjale embriogenetycznym zaobserwowano degradację komórek w woreczku załączkowym, a także nieprawidłowy rozwój tumorowatych struktur w jego wnętrzu, czyli wtórną embriogenezę.

Obecność i dystrybucja epitopów charakterystycznych dla jednego typu proteoglikanów AGP i pektyn została wstępnie zbadana w tkankach niezapłodnionych zalążków buraka cukrowego o wysokim i niskim potencjale embriogenetycznym, utrwalonych na czterech etapach rozwojowych (w dniu pobrania oraz po 7, 9 i 14 dniach od wyłożenia na pożywki indukcyjne). Detekcję przeprowadzono na skrawkach półcienkich (0,5 μm). Miejsce wiązania przeciwciał przez antygeny komórkowe uwidoczniło *in situ* po przyłączeniu przeciwciał wtórnych znakowanych izotiocyanianem fluoresceiny (FITC) zgodnie z metodyką opisaną przez Wiśniewską i Majewską (2007). Preparaty analizowano w mikroskopie fluorescencyjnym Jenalumar. Obserwacje mikroskopowe ujawniły występowanie w znacznych ilościach relatywnej zawartości domen strukturalnych charakterystycznych dla pektyn rozpoznawanych przez przeciwciało LM6. Natomiast obecności domen strukturalnych rozpoznawanych przez przeciwciało JIM14 odnotowano w śladowych ilościach. Analiza detekcji powyższych komponentów ściany komórkowej wykazała, że ich rozmieszczenie przebiegało według schematu porównywalnego dla wszystkich genotypów. Reakcje kontrolne do powyższych analiz, wykonane z pominięciem etapu inkubacji z przeciwciałem pierwotnym, wykazały brak znakowania komórek zalążka, co świadczy o poprawnym wykonaniu analiz immunocytochemicznych.

Epitopy charakterystyczne dla pektyn zlokalizowano przy pomocy przeciwciała LM6. W zalążkach przed wyłożeniem na pożywki regeneracyjne wyraźne znakowanie obserwowano głównie w ścianie komórkowej woreczka zalążkowego oraz nieco słabsze w ścianach komórek nucellusa sąsiadujących z biegunem mikropylarnym. W pozostałych komórkach nucellusa, osłonek i podstawy zalążka odnotowano słabsze, lecz równomierne znakowanie. W miarę inicjacji i rozwoju prazarodka (7, 9, 14 dzień kultury) obecność epitopów polisacharydowych wokół woreczka zalążkowego zanikała, utrzymując nieco wyższy poziom znakowania w części mikropylarnej nucellusa. Ponadto, widoczne sygnały wskazujące na obecność AGP zawierających epitopy reagujące z LM6 odnotowano w formujących się ścianach dwu- i trzykomórkowego prazarodka.

W przypadku lokalizacji epitopów charakterystycznych dla polisacharydowej części proteoglikanów AGP rozpoznawanych przez przeciwciało JIM14 w zalążkach przed wyłożeniem na pożywki regeneracyjne wyraźne znakowanie obserwowano w ścianie komórkowej woreczka zalążkowego oraz ścianach komórek nucellusa sąsiadujących z biegunem mikropylarnym. W pozostałych komórkach nie stwierdzono znakowania powyższych epitopów. W kolejnych dniach prowadzenia inicjacji regeneracji obecność epitopów polisacharydowych wokół woreczka zalążkowego zanikała, utrzymując niski poziom znakowania w komórkach kolumnowych kanału mikropylarnego.

Z powyższych względów uznano, iż obecność i lokalizacja określonych domen cukrowych może mieć istotny wpływ na proces embriogenezy gametycznej buraka cukrowego, co wymaga potwierdzenia większą liczbą obserwacji w toku kolejnych badań.

LITERATURA

- Acosta-García G., Vielle-Calzada J. P. 2004. A Classical Arabinogalactan Protein Is Essential for the Initiation of Female Gametogenesis in Arabidopsis. *Plant Cell* 16: 2614 — 2628.
- Bohanec, B. 2009. Doubled haploids via gynogenesis. In: *Advances in Haploid Production in Higher Plants* (Touraev A., Forster B. P., Jain S. M. eds). Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag: 35 — 46.
- Bruun L. 1991. Histological and semi-quantitative approaches to in vitro cellular responses of ovule, embryo and endosperm in sugar beet, *Beta vulgaris* L. *Sex Plant Reprod* 4: 64 — 72.
- Doctrinal M., Sangwan R.S., Sangwan-Norreel B.S. 1989. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris* L.: Effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. *Plant Cell Improvement* 12: 346 — 357.
- Capataz-Tafur J., Trejo-Tapia G., Rodríguez-Monroy M., Sepúlveda-Jiménez G. 2011. Arabinogalactan proteins are involved in cell aggregation of cell suspension cultures of *Beta vulgaris* L. *Plant Cell Tiss. Org.* 106: 169 — 177.
- Gośka 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.
- Pavoković D., Poljuha D., Horvatić A., Ljubesčić N., Hagege D., Kršnik-Rasol M. 2012. Morphological and proteomic analyses of sugar beet cultures and identifying putative markers for cell differentiation. *Plant Cell Tiss. Org.* 108: 111 — 119.
- Qin Y., Zhao J. 2006. Localization of arabinogalactan proteins in egg cells, zygotes, and two-celled proembryos and effects of β -D-glucosyl Yariv reagent on egg cell fertilization and zygote division in *Nicotiana tabacum* L. *Exp. Bot.* 57: 2061 — 2074.
- 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.
- Van Geyt J. P. C., Speckmann G. J., D'Halluin K., Jacobs M. 1987. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) *Theor. Appl. Genet.* 73: 920 — 925.

MAREK SZKLARCZYK
WOJCIECH WESOŁOWSKI
MARCELINA WAJDIK
ANNA SZLACHTOWSKA
BEATA DOMNICZ
ANNA BURDA

Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Kierownik Tematu: dr hab. Marek Szklarczyk Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, tel. 12 6625328, e-mail: marek.szklarczyk@urk.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.802.8.2018, Zadanie 68.

Analiza czynników genetycznych związanych z przywracaniem płodności roślin buraka ćwikłowego

Analysis of genetic factors linked to fertility restoration in table beet

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, genotypowanie, geny restorerowe, markery molekularne

TEMAT BADAWCZY 1: UZYSKANIE POPULACJI MAPUJĄCYCH TYPU BC1

Cele tematu

Uzyskanie segregujących populacji do mapowania genów przywracających płodność

Opis wyników

Badany materiał roślinny stanowiły cztery kwitnące potomstwa wywodzące się z oryginalnego krzyżowania 4357A × BS. Uprawę prowadzono w polu z wysadków uzyskanych w roku ubiegłym. W czasie kwitnienia roślin wizualnie sprawdzano u nich obecność pyłku. Dla każdej rośliny obserwacje poczyniono minimum dwukrotnie w różnych terminach. Wizualna ocena płodności była weryfikowana poprzez mikroskopową analizę żywotności pyłku. Pomimo, iż wszystkie badane obiekty segregowały na rośliny męskosterylne i męskopłodne, w świetle analizy żywotności pyłku oczekiwane rozszczepienie (1:1) uzyskano tylko dla jednej populacji.

Wnioski

- Segregacja fenotypowa tylko jednej z badanych populacji gwarantuje jej użyteczność w analizie genów restorerowych.

TEMAT BADAWCZY 2: GENOTYPOWANIE SEGREGUJĄCYCH POPULACJI MAPUJĄCYCH PRZY ZASTOSOWANIU METODY GBS

Cele tematu

Masowa identyfikacja polimorfizmów GBS u roślin różniących się statusem płodności

Opis wyników

Genotypowaniu poddano dwie populacje z cytoplazmą S i segregacją pod względem fenotypu płodności — 506 oraz 740. Analiza ta była wykonywana w ramach usługi zleconej firmie Novogene (Chiny). Biblioteki przygotowano z użyciem restryktazy *ApeKI*. Do sekwencjonowania wysokoprzepustowego wykorzystano platformę firmy Illumina. Zastosowano wariant sekwencjonowania ze sparowanymi końcami i 150 cyklami syntezy (PE150). Długość odczytanych sekwencji wahała się od ok. 300 do ok. 550 Mb dla pojedynczej rośliny. Wskaźniki Q20 i Q30 wyniosły odpowiednio 96 i 91%, a udział par GC 36–37%.

Wnioski

- Dla obydwu badanych populacji uzyskano wystarczającą ilość danych sekwencyjnych. Przy założeniu, iż w genomie buraka sekwencje unikalne stanowią ok. 37% (210 Mb, Dohm i in., 2014), ich przeciętne pokrycie u pojedynczej rośliny wyniosło ok. 1,4–2,6×.
- Wysoki procent nukleotydów osiągających wskaźniki jakości Q20 i Q30 gwarantuje przydatność otrzymanych danych sekwencyjnych dla analiz bioinformatycznych zmierzających do identyfikacji polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP).

TEMAT BADAWCZY 3: ANALIZA BIOINFORMATYCZNA DANYCH SEKWENCYJNYCH

Cele tematu

Określenie genomowej lokalizacji zidentyfikowanych markerów GBS i genów restorerowych

Opis wyników

Analizom poddawano dane sekwencyjne wygenerowane w bieżącym roku dla populacji 506 oraz 740. Przefiltrowane odczyty sekwencyjne były mapowane do sekwencji genomu referencyjnego (AYZS00000000.2) — średni odsetek zmapowanych odczytów wyniósł 96,4%. Średnio 12,3% genomu referencyjnego było pokryte odczytami sekwencyjnymi (wykazywało pokrycie przynajmniej 1×). W wyniku mapowania odczytów do genomu referencyjnego zidentyfikowano ok. 1,6 mln polimorfizmów sekwencyjnych, które następnie poddawano kilkustopniowej filtracji. Obejmowała ona kolejno selekcję markerów: biallelicznych o wysokiej jakości, z maksymalnie pięcioma nieokreślonymi genotypami, o genotypach odpowiadających charakterowi badanej populacji, o właściwej segregacji oraz oddalonych od siebie o więcej niż 10 kb.

W rezultacie do mapowania genetycznego wykorzystano ok. 2 200 markerów z populacji 506 oraz ok. 1 000 markerów z populacji 740. Uzyskano dziewięć grup sprzężeń odpowiadających dziewięciu chromosomom buraka. W przypadku populacji 506 całkowita długość mapy wynosiła 577,2 cM ze średnią długością pojedynczej grupy sprzężeń wynoszącą 64,1 cM. Gen restorerowy wraz z 61 markerami GBS zmapował się na chromosomie 3. Najbliższy restorerowi marker GBS zmapował się w odległości 1,7 cM. W przypadku populacji 740 całkowita długość mapy wynosiła 526,1 cM ze średnią długością pojedynczej grupy sprzężeń wynoszącą 58,5 cM. W utworzonych grupach sprzężeń nie odnotowano obecności restorera.

Wnioski

- Przy wykorzystaniu technologii GBS otrzymano dane sekwencyjne, które pozwoliły na bardzo wydajną identyfikację markerów i uzyskanie — przynajmniej lokalnie — wysoko wysyconych map genetycznych. Dzięki dostępności sekwencji referencyjnej określono chromosomową lokalizację zidentyfikowanych grup sprzężeń.
- Restorer z populacji 506 zmapował się w obrębie chromosomu 3, co wskazuje, iż jest nim gen *X (Rfl)* Owena.

TEMAT BADAWCZY 4: KONWERSJA POLIMORFIZMÓW SPRZEŻONYCH Z GENAMI RESTOREROWYMI W MARKERY TYPU SCAR, CAPS I TETRA-PRIMER ARMS-PCR

Cele tematu

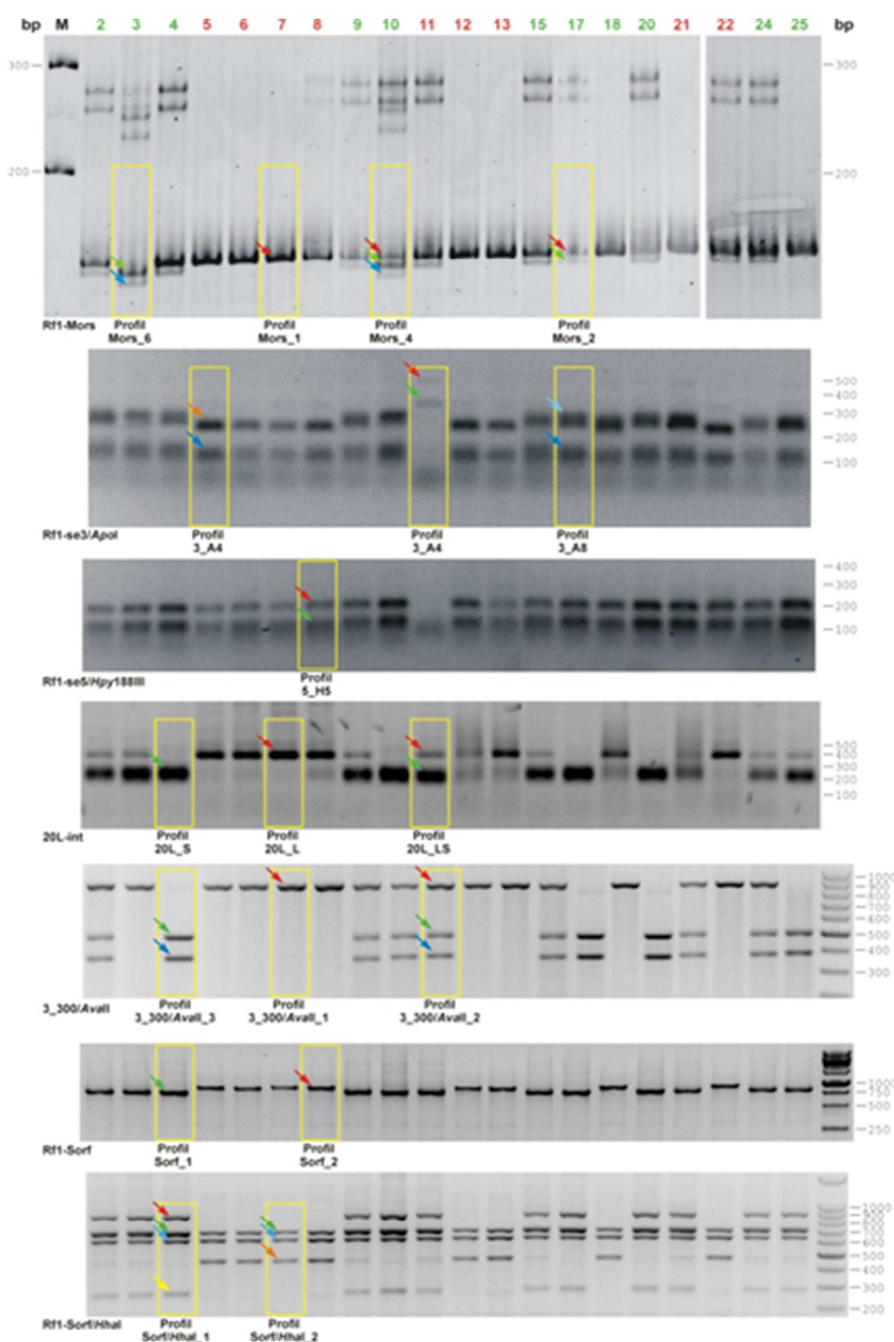
Opracowanie markerów PCR do wnioskowania o obecności alleli restorerowych

Opis wyników

Badany materiał roślinny stanowiły cztery populacje segregujące pod względem fenotypu płodności. Analiza wstępna była prowadzona na 10 roślinach (5 męskopłodnych i 5 męskosterylnych). Markery kosegregujące z fenotypem były użyte do genotypowania całych populacji. Wykorzystywane markery reprezentowały typy CAPS i SCAR. Projektowanie markerów CAPS zautomatyzowano stosując napisany w toku niniejszych prac program VCF2CAPS (Wesołowski). W trzech populacjach testowane markery kosegregowały fenotypem na poziomie do ok. 80%. Były to markery dla genu *X (Rfl)* (rys. 1). W jednej z analizowanych populacji testowane markery najczęściej nie wykazywały polimorfizmu.

Wnioski

- Markery CAPS projektowano na bazie zidentyfikowanych uprzednio markerów GBS. Do tego celu wykorzystano autorski program VCF2CAPS (Wesołowski) umożliwiający masową konwersję wykrytych technikami NGS polimorfizmów sekwencyjnych w markery CAPS.
- W trzech populacjach z fenotypem kosegregowały markery z chromosomu 3, co potwierdza/wskazuje na występowanie w nich restorera *X/Rfl*. Wartość kosegregacji wynosiła średnio ok. 80%.



Rys. 1. Profile siedmiu markerów genu *X (Rf1)* u wybranych roślin z populacji 398. Czerwona czcionka — rośliny męskosterylne, zielona czcionka — rośliny męskopłodne. M — wzorec wielkości fragmentów DNA

TEMAT BADAWCZY 5: ANALIZA NIERÓWNOWAGI SPRZĘŻEŃ — GENOTYPOWANIE ZESTAWU MĘSKOSTERYLNYCH OBIEKTÓW HODOWLANÝCH PRZY ZASTOSOWANIU OPRACOWANYCH MARKERÓW PCR

Cele tematu

Określenie, czy genotypy *loci* restorerowych wykazują zależność od genotypów w wybranych *loci* markerowych

Opis wyników

Badany materiał roślinny stanowiła kolekcja 12 linii męskosterylnych, testowano po 10 roślin każdej z linii. Poddano je genotypowaniu czterema markerami dla genu *X* (*Rf1*) i dwoma markerami dla genu *Z* (*Rf2*). Markery te reprezentowały typy CAPS i SCAR. W badanym zestawie linii męskosterylnych markery dla genu *Z/Rf2* (ppr681/*Hpa*II i ppr821/*Fsp*BI) były monomorficzne. Spośród przetestowanych markerów dla genu *X/Rf1* dwa (*Rf1_Mors*, *Rf1-se3/Apo*I) cechowała dominacja jednego profilu elektroforetycznego — w obrębie ośmiu (*Rf1_Mors*) / dziewięciu (*Rf1-se3/Apo*I) linii był on obserwowany u wszystkich badanych roślin. Pozostałe dwa markery dla genu *X/Rf1* cechowała wyraźna segregacja między- i wewnątrz obiektowa obserwowanych profili elektroforetycznych.

Wnioski

— Dane wskazujące na istnienie nierównowagi sprzężeń pomiędzy allelami *loci* markerowych oraz allelem w *locus* restorera uzyskano dla obydwu markerów genu *Z* (*Rf2*) i dwóch (spośród czterech testowanych) markerów genu *X* (*Rf1*).

GRZEGORZ BARTOSZEWSKI

RENATA SŁOMNICKA

HELENA OLCZAK-WOLTMAN

ALEKSANDRA KORZENIEWSKA

TERESA GAŁECKA

KAROLINA KAŻMIŃSKA

KATARZYNA NIEMIROWICZ-SZCZYTT

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Wydział Ogrodnictwa Biotechnologii i Architektury
Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie

Kierownik tematu: dr hab. Grzegorz Bartoszewski prof. Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin,
Wydział Ogrodnictwa Biotechnologii i Architektury Krajobrazu, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego
w Warszawie, ul. Nowoursynowska 159, 02-776 Warszawa, tel. 22 5932177,

e-mail: grzegorz_bartoszewski@sggw.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.802.17.2018, Zadanie 100.

Doskonalenie ogórka (*Cucumis sativus* L.) pod względem odporności na kanciastą plamistość

Improvement of cucumber (*Cucumis sativus* L.) in terms of angular leaf spot resistance

Słowa kluczowe: *Cucumis sativus* L., *P. syringae* pv. *lachrymans*, resistance, QTL, RNA-seq

CEL ZADANIA

Celem badań w 2018 roku była konstrukcja ulepszonej mapy genetycznej ogórka i jej zagęszczenie w rejonach *loci* odporności na kanciastą plamistość. Opracowano zestaw nowych markerów PCR i SSR, a następnie wykorzystano je do genotypowania populacji mapującej Gy14×B10. Przeprowadzono bioinformatyczną analizę funkcjonalną genów ulegających zróżnicowanej ekspresji po zainfekowaniu roślin ogórka *P. syringae* pv. *lachrymans* i wykonano analizę ekspresji Real-Time PCR dla wybranych genów.

WYNIKI

Wykorzystując skonstruowaną dla populacji mapującej Gy14×B10 mapę genetyczną i sekwencje markerów flankujących *loci* odporności na kanciastą plamistość oraz

dostępność sekwencji genomów linii rodzicielskich zidentyfikowano rejon genomu ogórka zawierający główny psl odporności psl5.1. W przypadku genomu wrażliwej linii B10 zidentyfikowano ciągłą sekwencję odpowiadającą psl5.1 o długości 895 kpz, zaś u linii odpornej Gy14 zidentyfikowano kontigi sekwencyjne reprezentujące ten rejon. W wyniku przyrównania wskazano insercje-delecje różnicujące te linie. Spośród różnic zidentyfikowanych *in silico*, dla 30 indeli uzyskano wydajną amplifikację PCR, polimorficzne na liniach rodzicielskich były 24 markery, a w obrębie 8 linii RIL 23 markery. Ostatecznie 19 markerów segregowało zgodnie z oczekiwaniami 1:1 na całej populacji mapującej, co potwierdziło ich przydatność do mapowania.

Skonstruowano ulepszoną mapę genetyczną dla populacji mapującej Gy14×B10, składającą się z 7 grup sprzężeń odpowiadających chromosomom ogórka. Całkowita długość mapy wyniosła 599,9 cM. Łącznie na mapę naniesiono 717 markerów SSR i DARtseq, 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 chromosomie 5 w pozycji 2,0 cM i dwa *loci* QTL związane z ilościowym nasileniem objawów *psl* 5.1 i *psl*5.2. Gen *psl* ulokował się w obrębie *locus psl5.1* (Słomnicka i in., 2018). Podjęto próbę zagęszczenia mapy w obrębie *loci* odporności na kanciastą plamistość, wykorzystując nowe markery. Finalnie na mapę naniesiono 13 markerów, które zagęściły głównie obszar wokół genu *psl* i *locus psl5.1*. Zagęszczanie mapy genetycznej spowodowało jednak jej rozciągnięcie i nie udało się zawęzić regionu genomu związanego z odpornością na kanciastą plamistość. Markerami najbliższymi sprzężonymi z *loci* odporności były markery: UW085415, 16327616, IS_16325300, IS_16326693i P066_SSR. Markery te mogą w przyszłości znaleźć zastosowanie w hodowli ogórka, gdzie źródłem odporności jest linia Gy14 lub linie hodowlane wywodzące się z tej linii.

W wyniku sekwencjonowania RNA-seq uzyskano profile transkrypcyjne dla linii Gy14 i B10 w trzech punktach czasowych: przed inokulacją oraz dzień i trzy dni po inokulacji (0, 1 i 3 dpi) a następnie zidentyfikowano geny ulegające zróżnicowanej ekspresji w pierwszych stadiach kanciastej plamistości. Stwierdzono, że znacznie więcej genów ulegało zmianom ekspresji w przypadku linii odpornej Gy14 (4268 genów w pierwszym dniu i 4654 w trzecim dniu po infekcji) w porównaniu z linią podatną B10 (o 40% mniej genów w 1 dniu i o 15% mniej w 3 dniu po infekcji). Sugeruje to bardziej złożoną odpowiedź obronną linii odpornej na porażenie *P. syringae* pv. *lachrymans* w porównaniu z linią podatną. Dla genów ulegających zróżnicowanej ekspresji wykonano analizy funkcjonalne. Stwierdzono, że największą grupę stanowią geny związane z procesami metabolicznymi i komórkowymi, kodujące białka o właściwościach katalitycznych i posiadających zdolność wiązania kofaktorów (Olczak-Woltman i in., 2018). Dla wybranych genów ulegających zróżnicowanej ekspresji wykonano analizy BLAST i wykazano, że ich produkty mogą być zaangażowane w biosyntezę hormonów roślinnych, reakcje obronne i inne procesy. Dla 30 wybranych genów wykonano analizy Real-Time PCR, które potwierdziły zróżnicowaną ekspresję genów w pierwszych stadiach kanciastej plamistości. Badane geny prezentowały różne profile ekspresji, co pozwala wskazać niektóre z nich jako potencjalne markery ekspresyjne stresu

biotycznego u ogórka. Jako gen kandydacki markera wczesnej reakcji ogórka na stres można wskazać gen kodujący białko dehydrynowe DHN19, którego ekspresja wzrastała w pierwszym, a spadała w trzecim dniu po inokulacji. Geny kodujące białka PR-1 i PR-4 związane z patogenezą można wskazać jako geny kandydackie markerów późnej odpowiedzi na stres biotyczny, gdyż ich ekspresja przed inokulacją i jeden dzień po inokulacji była bliska zeru, natomiast dynamicznie wzrastała w trzecim dniu po inokulacji.

WNIOSKI

1. Dostępność sekwencji genomów linii Gy14 i B10 ogórka umożliwia identyfikację nowych markerów molekularnych w rejonie *loci* odporności na kanciąstą plamistość.
2. Wszystkie zidentyfikowane w populacji mapującej Gy14×B10 *loci* odporności na kanciąstą plamistość zmapowano w tym samym rejonie genomu ogórka — na górnym ramieniu chromosomu 5.
3. Zidentyfikowane markery sprzężone z *loci* odporności na kanciąstą plamistość mogą znaleźć potencjalne zastosowanie w hodowli ogórka, gdzie źródłem odporności jest linia Gy14 lub wyprowadzone z niej linie hodowlane.
4. Analizy funkcjonalne wykonane dla genów ogórka ulegających zróżnicowanej ekspresji we wczesnych etapach przebiegu kanciąstej plamistości pokazały, że wśród tych genów najliczniejsza jest grupa genów kodujących białka związane z procesami metabolicznymi i komórkowymi o właściwościach katalitycznych.
5. Geny kodujące dehydrynę DHN19 i białka związane z patogenezą PR-1 i PR-4 są interesującymi genami kandydackimi na markery ekspresyjne stresu u ogórka.

LITERATURA

- 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.
- Słomnicka R., Olczak-Woltman H., Korzeniewska A., Gozdowski D., Niemirowicz-Szczytt K., Bartoszewski G. 2018. Genetic mapping of *psl* locus and quantitative trait loci for angular leaf spot resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) Mol. Breed. 38: 111.

URSZULA KŁOSIŃSKA
MARZENA NOWAKOWSKA
WOJCIECH SZCZECHURA
KATARZYNA NOWAK
WALDEMAR TREDER
KRZYSZTOF KLAMKOWSKI
KATARZYNA WÓJCIK

Instytut Ogrodnictwa ul Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Kierownika Tematu: dr Urszula Kłosińska Instytut Ogrodnictwa, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,
Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,
tel. 46 834-66-54, e-mail: urszula.klosinska@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 102.

Opracowanie genetycznych, fizjologicznych i biochemicznych podstaw tolerancji ogórka na stres niedoboru wody

Development of genetic, physiological and biochemical basis of cucumber tolerance to water deficit stress

Słowa kluczowe: *Cucumis sativus* L., deficyt wody, mechanizm dziedziczenia, parametry biochemiczne i fizjologiczne, tolerancja, transkryptomy

Celem podjętego tematu jest 1) identyfikacja genotypów ogórka tolerancyjnych na niedobór wody, 2) wyjaśnienie genetycznych i fizjologiczno-biochemicznych czynników odpowiedzialnych za tę cechę oraz 3) analizy zmian transkryptomów tolerancyjnych i wrażliwych linii ogórka metodą macierzy ekspresyjnych, które umożliwią poznanie mechanizmów molekularnych zawiadujących tolerancją tego gatunku na niedobór wody.

Celem badań prowadzonych w roku 2018 było porównanie cech morfologicznych roślin, w tym wielkości systemów korzeniowych, wybranych linii ogórka uprawianych w warunkach stresu suszy oraz optymalnej wilgotności gleby oraz określenie

mechanizmu dziedziczenia tolerancji ogórka na stres deficytu wody w fazie kiełkowania nasion.

WYNIKI

Analiza zeskanowanych systemów korzeniowych 11 linii ogórka w fazie rozsady rosnących w ryzoboksach w warunkach suszy glebowej oraz optymalnego nawadniania wykazała różnice w długości korzeni pomiędzy badanymi obiektami. Niezależnie od zadanego poziomu nawodnienia największą długością korzenia charakteryzowała się linia SU 9. Podobnie jak w roku poprzednim niedobór wody stymulował wzrost korzeni u linii PW 2, której długość korzenia była większa względem kontroli o 25%, co może wskazywać na jej wyższy poziom tolerancji na stres suszy. Po sześciu tygodniach badań dokonano pomiarów wysokości roślin, powierzchni liścia, świeżej masy korzenia i masy części nadziemnej roślin. Zanotowano duże zróżnicowanie pomiędzy liniami pod względem ocenianych cech morfologicznych. W warunkach kontrolnych największą masą części nadziemnej i korzenia oraz największą wysokością rośliny charakteryzowała się linia SU 9. Natomiast największą powierzchnię liścia stwierdzono u linii SU 7 przy jednocześnie najmniejszej wysokości rośliny. Największą średnią redukcję w warunkach deficytu wody obserwowano dla masy części nadziemnej (47%), następnie dla masy korzenia (42%), powierzchni liścia (33%), a najmniejszą dla wysokości roślin (37%). Największe straty wszystkich ocenianych parametrów morfologicznych zanotowano u linii SU 5, a najmniejsze u PW 2. Należy zaznaczyć, że wysokość roślin u linii SU 7 wzrosła w warunkach stresu suszy o 15% względem kontroli, natomiast u linii PW 2 pozostała na poziomie roślin optymalnie nawadnianych. Najmniejszą redukcję masy części nadziemnej oraz powierzchni liścia zanotowano u linii PW 2, natomiast najmniejszą stratę masy korzenia względem kontroli stwierdzono u linii B 3.

Celem kolejnego zadania badawczego realizowanego w ramach niniejszego tematu była charakterystyka tła genetycznego tolerancji ogórka na niedobór wody w fazie kiełkowania nasion. Materiał do badań stanowiły nasiona dwóch komponentów rodzicielskich: linii B 3 (P_1) o bardzo dobrej zdolności kiełkowania w warunkach deficytu wody i niekiełkującej w stresie suszy linii SU 6 (P_2) oraz ich populacje mieszańcowe: F_1 , RF_1 , F_2 , Bc_1P_1 , Bc_1P_2 . Najlepszą zdolnością kiełkowania w warunkach stresu suszy fizjologicznej wywołanego 18% PEG charakteryzowała się linia B 3, która skiełkowała w 80% w pierwszej dobie trwania testu, osiągając 100% w drugiej dobie. Natomiast drugi komponent rodzicielski SU 6 odznaczył się najslabszą energią kiełkowania osiągając 21% w 7 dobie. Spośród badanych populacji mieszańcowych bardzo dobrą zdolnością kiełkowania charakteryzowało się pokolenie F_1 i Bc_1P_1 kiełkując w drugiej dobie odpowiednio w 100 i 95%. Podobną energią kiełkowania (54%) do drugiej doby odznaczyły się populacje RF_1 i F_2 osiągając w 7 dobie odpowiednio 100 i 83%. Najslabszą dynamikę kiełkowania obserwowano w pokoleniu Bc_1P_2 , które skiełkowało w 43 i 78% odpowiednio w drugiej i siódmej dobie. Zaobserwowano także istotne różnice pomiędzy poszczególnymi populacjami pod względem wskaźnika DTG określającego średni czas kiełkowania nasion. Najkorzystniejszym, czyli najniższym

parametrem DTG charakteryzowała się odporna linia rodzicielska B 3 (DTG = 1,2). Na drugim miejscu uplasowały się pokolenia Bc₁P₁ i F₁, których wartości DTG (odpowiednio 1,4 i 1,5) nie różniły się istotnie od linii B 3. W następnej kolejności było pokolenie F₂ z średnim czasem kiełkowania wynoszącym 2,0. Podobne wartości parametru DTG (odpowiednio 2,5 i 2,6) zanotowano dla populacji Bc₁P₂ oraz RF₁. Natomiast najwyższy wskaźnik DTG = 5,8 zaobserwowano u linii SU 6. Na podstawie energii i siły kiełkowania badanych populacji w warunkach stresu suszy wyodrębniono 3 grupy genotypów: tolerancyjne (kiełkujące w dwóch pierwszych dobach, tak jak odporna linia rodzicielska B 3), średnio tolerancyjne (kiełkujące od 3 do 7 doby) oraz wrażliwe (niekiełkujące w trakcie trwania doświadczenia). W pokoleniu F₂ i Bc₁P₂ obserwowano 3 grupy genotypów: tolerancyjne, średnio tolerancyjne oraz wrażliwe. Natomiast osobniki populacji RF₁ i Bc₁P₁ segregowały na dwie grupy: tolerancyjne oraz średnio tolerancyjne. Najmniejszą zmiennością charakteryzowała się populacja F₁, w której obserwowano tylko fenotypy tolerancyjne. Na podstawie uzyskanych wyników przeprowadzono analizę genetyczną dziedziczenia cechy tolerancji ogórka na deficyt wody w fazie kiełkowania dla modelu dziedziczenia jedno-, dwu- i trzygenowego. Rozkład fenotypów w poszczególnych pokoleniach istotnie odbiegał od teoretycznego, co zostało potwierdzone testem χ^2 i wskazuje, że badana cecha warunkowana jest poligenicznie. Następnie zbadano, czy w dziedziczeniu zdolności kiełkowania nasion w warunkach deficytu wody istotną rolę odgrywają niealleliczne interakcje genowe. Przeprowadzona w tym celu analiza populacji F₂ z zastosowaniem testu χ^2 wykazała istnienie epistazy dominującej i recesywnej z teoretyczną segregacją osobników 13:3 (13/16 tolerancyjnych i średnio tolerancyjnych — kiełkujących w ciągu 7 dni i 3/16 wrażliwych — niekiełkujących) dla wartości $\chi^2 = 0,39$ przy P = 0,53. Stosunek segregujących osobników w populacji Bc₁P₂ do rodzica wrażliwego SU 6 wynosił 3:1 (3/4 tolerancyjnych i średniotolerancyjnych, 1/4 osobników wrażliwych) dla wartości $\chi^2 = 0,71$ przy P = 0,40 i potwierdził, że zdolność kiełkowania nasion ogórka w stresie suszy warunkowana jest współdziałaniem dwóch genów o charakterze epistazy dominującej i recesywnej.

WNIOSKI

1. Obserwowano duże zróżnicowanie pomiędzy badanymi liniami ogórka w fazie rozsady pod względem większości analizowanych parametrów morfologicznych, zarówno w warunkach optymalnego zaopatrzenia w wodę, jak i w warunkach deficytu wody.
2. Niedobór wody ograniczył wzrost i rozwój roślin ogórka, co znalazło odzwierciedlenie w redukcji wszystkich ocenianych parametrów morfologicznych. Najsilniej została obniżona masa części nadziemnej, a najmniej — wysokość roślin.
3. Najmniejszą redukcję masy części nadziemnej oraz powierzchni liścia zanotowano u linii PW 2, natomiast najmniejszą stratę masy korzenia względem kontroli stwierdzono u linii B 3. Ponadto niedobór wody stymulował wzrost korzeni o 25%

względem kontroli u linii PW 2, co może wskazywać na wyższy poziom tolerancji tych linii na stres wodny.

4. Przeprowadzona analiza genetyczna dla skrzyżowania linii B 3 i SU 6 wykazała, że zdolność kiełkowania nasion w warunkach deficytu wody warunkowana jest czynnikami nieallelicznymi, o czym świadczy istnienie epistazy dominującej i recesywnej z segregacją osobników zgodną z teoretycznym rozkładem 13 tolerancyjnych i średnio tolerancyjnych: 3 wrażliwych.

MAŁGORZATA CZERNICKA¹

KINGA KĘSKA¹

MAREK SZKLARCZYK¹

MICHAŁ DZIURKA³

ANNA KOŁTON²

IWONA KAMIŃSKA²

URSZULA PIENIAŻEK¹

DOROTA CHACHŁOWSKA¹

¹ Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

² Zakład Botaniki i Fizjologii Roślin, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków

³ Instytut Fizjologii Roślin PAN w Krakowie, ul. Niezapominajek 21, 30-239 Kraków

Kierownik Tematu: dr Małgorzata Czernicka Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, tel. 126625367, e-mail: malgorzata.czernicka@urk.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.802.8.2018, Zadanie 98.

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.)

Słowa kluczowe: hipoksja, ogórek, pomidor, stres, zalanie

CEL BADAŃ

W hodowli roślin znany jest proces wzbudzania odporności roślin poprzez działanie czynnikiem stresowym o umiarkowanej intensywności. Celem zadania badawczego jest zastosowanie stresu obniżonego stężenia tlenu w glebie (hipoksji) w stadium rozsady do uaktywnienia mechanizmów odporności (tolerancji) na czynniki środowiskowe u pomidora i ogórka. W 2018 roku zrealizowano dwa tematy badawcze, tj. (1) Analiza genetycznych, biochemicznych i fizjologicznych podstaw odpowiedzi różnych genotypów pomidora i ogórka na hipoksję, (2) Ocena efektywności działania stresu

hipoksji w stadium siewki na zwiększenie odporności roślin na stres obniżonego stężenia tlenu w glebie. Celem podjętych badań była ocena wpływu hipoksji w obrębie systemu korzeniowego pomidora i ogórka na morfologię roślin, na aktywność wybranych związków o charakterze antyoksydacyjnym i aktywność fotosyntetyczną, na akumulację fitohormonów (auksyn, cytokinin, kwasu abscysynowego i prekursora etylenu — ACC), ekspresję genów i wybranych białek. Ponadto cel badań stanowiło porównanie dynamiki wzrostu roślin oraz wielkości i jakości plonu owoców pomidora i ogórka traktowanych i nietraktowanych stresem hipoksji w fazie rozsady.

MATERIAŁ I BADANIA

Obiektami badań były 2 genotypy pomidora oraz 2 linie DH ogórka. Rośliny po osiągnięciu stadium 2–4 liści właściwych podzielono na 3 grupy roślin:

1. pierwsza grupa (kontrolna) uprawiana była bez zastosowania warunków stresowych,
2. druga grupa (oznaczona jako 1×H) została potraktowana stresem obniżonej zawartości tlenu w obrębie systemu korzeniowego poprzez zalanie wielodoniczek wodą przez okres 7 dni,
3. trzecia grupa (oznaczona jako 2×H) została potraktowana stresem hipoksji poprzez 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.

WYNIKI BADAŃ

Wyniki dotyczące oceny cech morfologicznych badanych obiektów pomidora i ogórka wskazują na zróżnicowaną odpowiedź genotypów na stres zalania. Wykazano zróżnicowanie międzygenotypowe oraz międzygatunkowe. U pomidora siedmiodniowy stres zalania spowodował wolniejszy przyrost roślin genotypu wrażliwego na stres ograniczonego dostępu tlenu. Z kolei u badanych linii DH ogórka na skutek 7 dni stresu nie wykazano zróżnicowania w wysokości roślin kontrolnych i roślinami poddanymi stresowi zalania. Różnicę w wysokościach roślin ogórka zaobserwowano dopiero po 28 dniach trwania doświadczenia, gdzie wysokość roślin potraktowanych podwójnie stresem hipoksji była znacznie niższa w stosunku do roślin kontrolnych. Świeża masa części nadziemnej roślin badanych genotypów pomidora i ogórka zwiększała się wraz z czasem trwania doświadczenia. W przypadku obiektów wrażliwych na stres zalania, stwierdzono większą masę roślin nietraktowanych stresem w porównaniu do roślin zalanych przez okres 7 dni. Zaobserwowano tworzenie się korzeni bocznych zarówno u pomidora, jak i ogórka u roślin poddanych stresowi zalania. U pomidora więcej korzeni bocznych zaobserwowano u genotypu określonego jako wrażliwy, natomiast w przypadku ogórka u genotypu tolerancyjnego na stres hipoksji.

Na podstawie analizy zawartości dwóch związków o charakterze antyoksydacyjnym, tj. kwasu askorbinowego i glutationu stwierdzono, że zastosowane warunki hipoksji wpływają na zmiany w układzie antyoksydacyjnym roślin pomidora i ogórka. Zawartość glutationu zmieniła się u roślin tolerancyjnych na stres zalania poddanych dwukrotnie

stresowi, tj. wzrosła u pomidora, a zmniejszyła się u ogórka, co wskazuje to wyraźnie na odmienne reakcje roślin o wyższej i niższej wrażliwości na stres hipoksji. W przypadku badanych genotypów ogórka i pomidora nie zaobserwowano istotnych statystycznie zmian w zawartości kwasu askorbinowego.

W wyniku analizy fitohormonów u pomidora stwierdzono dwukrotnie wyższą zawartość auksyn (IAA i IBA) w liściach pomidora wrażliwego na hipoksję. Spośród wolnych cytokinin największą akumulację w liściach wykazała *cis*-zeatina (c-ZEA). U obydwu genotypów pomidora zaobserwowano akumulację ABA w liściach po 48 godzinach od zalania roślin jednokrotnie. W efekcie drugiego zalania po 48 godzinach stwierdzono najniższą zawartość ABA, ale tylko u genotypu tolerancyjnego na hipoksję. Wzrost poziomu ACC w liściach stwierdzono po 24 godzinach od pierwszego zalania roślin u genotypu tolerancyjnego na stres zalania.

W oparciu o immunodetekcję wybranych białek w warunkach hipoksji w korzeniach pomidora stwierdzono obecność dehydrogenazy alkoholowej (ADH) wyłącznie u roślin traktowanych stresem hipoksji. Wyższą akumulację ADH zarejestrowano u wrażliwego na stres hipoksji obiektu, a powtórna hipoksja nie zintensyfikowała akumulacji ADH. Z kolei tolerancyjny na hipoksję obiekt pomidora cechowała niższa akumulacja białka Rap2.12 stanowiącego czynnik transkrypcyjny biorący udział w aktywacji ekspresji genów odgrywających kluczową rolę w aklimatyzacji roślin na stres hipoksji.

Zsekwencjonowanie transkryptomów związanych z regulacją ekspresji genów (mikroRNA) aktywowanych pod wpływem hipoksji u dwóch obiektów pomidora pozwoliła zidentyfikować od 258 do 314 cząsteczek miRNA, z czego tylko 95 były to cząsteczki miRNA opisane w bazie MiRBase dla pomidora. Szczegółowa analiza poziomów ekspresji miRNA pozwoliła wskazać cząsteczki miRNA specyficzne dla obiektu tolerancyjnego na hipoksję oraz wrażliwego genotypu. Stwierdzono większą liczbę miRNA o zróżnicowanej ekspresji dla roślin poddanych dwukrotnemu zalaniu. Wśród transkryptów regulowanych przez cząsteczki miRNA zidentyfikowano transkrypty kodujące białka związane z mechanizmami odpowiedzi na stres hipoksji.

Analiza poziomu ekspresji transkryptów zidentyfikowanych *in silico* u dwóch genotypów ogórka w warunkach hipoksji wykazała różnice w ekspresji badanych genów pomiędzy roślinami nietraktowanymi a traktowanymi stresem hipoksji. Stwierdzono również różnice we względnym poziomie ekspresji genów między badanymi liniami DH ogórka. Genotyp wrażliwy ogórka charakteryzował się zwiększoną aktywnością genu dehydrogenazy alkoholowej związanej z przekształceniem aldehydu do etanolu, przy jednoczesnej oksydacji NADH do NAD⁺. Na podstawie analizy ekspresji genu kodującego długołańcuchową syntazę acylo-CoA (*lacs*) można wnioskować, że linia ogórka tolerancyjna na stres hipoksji uruchamia intensywnie mechanizmy związane z aktywnością systemu antyoksydacyjnego. Stwierdzono różnice w poziomie ekspresji genu oksydazy 1-aminocyklopropano-1-karboksylanu (*aco*) w odpowiedzi na stres hipoksji u badanych linii ogórka wykazujących się przeciwstawną reakcją na ograniczony dostęp tlenu, co świadczy o zróżnicowanym mechanizmie związanym z odpowiedzią na ww. stres.

W wyniku porównania dynamiki wzrostu roślin oraz wielkości i jakości plonu owoców pomidora i ogórka traktowanych i nietraktowanych stresem hipoksji w stadium rozsady stwierdzono zróżnicowanie międzygenotypowe i międzygatunkowe w odpowiedzi na stres hipoksji u roślin pomidora i ogórka w fazie owocowania. Potraktowanie roślin ogórka linii wrażliwej stresem hipoksji w fazie rozsady spowodowało uzyskanie większego plonu w porównaniu do roślin nietraktowanych stresem. Podwójny stres hipoksji w fazie rozsady spowodował zmniejszenie zawartości kwasu askorbinowego w owocach pomidora i zwiększenie zawartości cukrów rozpuszczalnych u linii ogórka wrażliwej na badany stres.

WOJCIECH SZCZUCHURA
MARZENA NOWAKOWSKA
URSZULA KŁOSIŃSKA
KATARZYNA NOWAK
KRZYSZTOF RUTKOWSKI

Instytut Ogrodnictwa

Kierownik Tematu: mgr Wojciech Szczuchura Instytut Ogrodnictwa, Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin

Warzywnych, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, tel. 46 8346718,

e-mail: wojciech.szczuchura@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 96.

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***

Słowa kluczowe: fitohormony, inhibitory biosyntezy etylenu, mączniak rzekomy, zaraza ziemniaka

Celem podjętego tematu jest 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. Badania prowadzone w 2018 roku miały natomiast na celu: (i) określenie zmian w poziomie ekspresji wybranych genów kodujących białka zaangażowane w mechanizmy obronne u pomidora w odpowiedzi na infekcję *P. infestans*, (ii) określenie roli etylenu w regulacji reakcji odpornościowych w procesie patogenezы i generowaniu reakcji odpornościowych u ogórka i pomidora, przed i po infekcji patogenami, oraz (iii) zbadanie możliwości indukcji systemicznej

odporności przy pomocy egzogennych fitohormonów: jasmonian metylu (Me-JA), kwasu salicylowego (SA) oraz kwasu DL- β -aminobutyrowego (BABA) w obu patosystemach.

WYNIKI

Analiza zmian w poziomie względnej ekspresji wybranych genów zaangażowanych w indukcję mechanizmów obronnych roślin pomidora przed patogenami, w tym: syntazy kalozy (*CalSyn*), białek związanych z patogenezą (PR, ang. pathogenesis related, *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5*, *PR6*, *PR7*), markerów biosyntezy i transdukcji kwasu jasmonowego (*LOX2*, *AOS*, *AOC2*, *OPR3*) i kwasu salicylowego (*pAD4*, *cpr1*), oraz wakuolarniej endoproteazy (*VPE*). Obiektem badań było 5 linii dzikich gatunków pomidora zróżnicowanych pod względem reakcji na porażenie przez *P. infestans*: 'WV 700', LA 1604, L 3708, LA 1033 oraz LA 722 (Nowakowska i in., 2014). Dynamikę zmian ekspresji ww. genów analizowano w komórkach liści pomidora, przed i po inokulacji roślin *P. infestans* w różnych odstępach czasowych po: 2, 4, 6, 12, 24, 48, 72 godzinach od inokulacji (hpi). Zauważono różnice w poziomie ekspresji większości analizowanych transkryptów w zależności od poziomu odporności na *P. infestans* badanych linii. Niezależnie od badanego transkryptu bardzo zbliżony wzór zmian ekspresji odnotowano u linii LA 1604 i L 3708. U linii LA 1033 zaobserwowano wyraźną indukcję ekspresji genów *PR-1*, *PR-2* i *PR-5* począwszy od 2 lub 4 godziny po inokulacji. Podwyższony poziom ww. transkryptów zauważono również u podatnej linii LA 722, jednak w odróżnieniu od odpornej linii LA 1033 ich aktywacja następowała znacznie później, bo dopiero po 72 hpi. Warto jednak dodać, że poziom ekspresji badanych transkryptów w linii LA 722 był wielokrotnie wyższy w porównaniu z linią LA 1033. W przypadku pozostałych linii odpornych ('WV 700, L 3708, LA 1604) poziom akumulacji ww. transkryptów praktycznie nie zmieniał się w odpowiedzi na porażenie przez *P. infestans*. Podobne zależności zaobserwowano w przypadku poziomu ekspresji genów związanych z biosyntezą kwasu salicylowego (*pAD4*, *cpr1*). U trzech linii: WV 700, L 3708, LA 1604 zaobserwowano aktywację transkryptu *VPE* już w 4 godzinie po inokulacji, co może sugerować na występowanie reakcji nadwrażliwości w tych liniach. Na uwagę zasługują również podwyższony poziom ekspresji genu kodującego syntazę kalozy u linii LA 1033, którego maksymalny poziom występował w 48 hpi. U pozostałych linii pomidora poziom akumulacji tego transkryptu nie ulegał większym zmianom w odpowiedzi na inokulację roślin patogenem. Przeprowadzone w poprzednim roku dla pięciu populacji ogórka (trzy odporne: 'Ames 2354', PI 197088, PI 330628, dwie podatne: PI 175695, 'Coolgreen') analizy ekspresji wybranych genów: *PAL*, *LiPOX*, *CalSyn*, *PR1b*, *PR2a*, *PR2b*, *PR3a*, *PR3b*, *PR5*, *PR7*, *MT2bL-1*, *LOX2*, *AOS*, *AOC2*, *OPR3*, *PDF1.2*, *pAD4*, *cpr1*, *VPE* związanych z reakcją na porażenie *P. cubensis* wykazały, że w genotypach podatnych (PI 175695, 'Coolgreen') do aktywacji badanych genów dochodziło po 36 hpi, natomiast w liniach odpornych: 'Ames 2354', PI 197088, PI 330628 ich akumulacja następowała wcześniej, bo już w 8 hpi. Szczególnie wyraźnie ten trend był obserwowany dla transkryptów *PR2*, *PR3* i *PR5*. Należy jednak dodać, że podobnie jak w przypadku podatnej linii pomidora, ekspresja ww. transkryptów u roślin genotypów podatnych była

zdecydowanie większa w porównaniu do linii odpornych. Stwierdzono także wyższy poziom ekspresji syntazy kalozy w liniach odpornych w porównaniu do obiektów podatnych. Na uwagę zasługuje również to, że u 'Ames 2354' i PI 175695 odnotowano wzmożoną indukcję transkryptu *VPE*. Znakowanie fluorescencyjne DCF-DA pozwoliło na wykrycie nagromadzenia reaktywnych form tlenu w zainfekowanych tkankach ogórka.

Celem określenia roli etylenu w regulacji reakcji odpornościowych w procesie patogenezы i generowaniu reakcji odpornościowych, rośliny obu gatunków przed inokulacją patogenami potraktowano inhibitorami jego biosyntezy: aminotoksywinyloglicyną (AVG) oraz tiosiarczanem srebra (STS). W przypadku ogórka, u wszystkich badanych odmian/linii niezależnie od ich poziomu odporności na *P. cubensis* (odporne: 'Ames 2354', PI 197088, PI 330628, podatna PI 175695) potraktowanie roślin przed inokulacją roztworem AVG ograniczyło produkcję etylenu w porównaniu do kontroli (rośliny nietraktowane inhibitorem, ale opryskane inokulum), nie miało jednak wpływu na stopień porażenia roślin przez patogena. W wyniku opryskania roślin roztworem STS odnotowano wzrost produkcji etylenu w porównaniu do kontroli, przy czym był on zdecydowanie większy w przypadku linii odpornych (5 do 10 razy). U wszystkich linii STS wpłynął korzystnie na zmniejszenie objawów mączniaka rzekomego, co szczególnie było widoczne u roślin podatnej linii PI 175695. Podobne zależności w zakresie stosowania AVG i STS stwierdzono w przypadku pomidora. Oprysk AVG ograniczył produkcję etylenu nie wpływając jednak na stopień porażenia roślin przez *P. infestans*. Natomiast potraktowanie roślin roztworem STS było bardziej efektywne prowadząc do zmniejszenia objawów zarazy ziemniaka u wszystkich badanych linii pomidora ('WV 700', LA 1604, L 3708, LA 1033, LA 722).

Oceniano również wpływ egzogennie podanych: SA, Me-JA i BABA na przebieg patogenezы i indukcję odporności na *P. cubensis* u ogórka (PI 175695 i 'Coolgreen') oraz na *P. infestans* u pomidora ('Rumba', LA 722). Niezależnie od badanego patosystemu, opryskiwanie roślin przed inokulacją zarówno roztworem SA (1 mM), jak i Me-JA (1.7 mM) nie miało wpływu na stopień porażenia roślin przez *P. cubensis* i *P. infestans*. Zarówno rośliny traktowane, jak i nie nietraktowane ww. substancjami cechowały się podobnym, wysokim stopniem porażenia w testach fitopatologicznych. Badania z zastosowaniem kwasu DL- β -aminobutyrowego w stężeniu 2000 $\mu\text{g/l}$ (BABA) przeprowadzone na dwóch odmianach ogórka (PI 175695 i 'Coolgreen') wykazały jego istotny wpływ na zwiększenie odporności odmian podatnych. Dwukrotne potraktowanie roślin przed inokulacją patogenem roztworem BABA spowodowało ograniczenie objawów mączniaka w stosunku do kontroli o odpowiednio 60 (PI 175695) i 45% ('Coolgreen'), po 7 dpi. W przeciwieństwie do ogórka, w przypadku pomidora nie stwierdzono korzystnego wpływu roztworu BABA (1000 $\mu\text{g/l}$) na nasilenie objawów zarazy ziemniaka u obu testowanych odmian.

WNIOSKI

1. Dla każdego z badanych patosystemów, poziom ekspresji wybranych do badań genów był zależny od poziomu odporności testowanych linii/odmian. Generalnie

aktywacja genów kodujących białka zaangażowane w mechanizmy obronne u pomidora i ogórka takich jak: *PR1*, *PR3*, *PR5*, *cpr1*, *pad4*, w odpowiedzi na infekcję odpowiednio *P. infestans* oraz *P. cubensis* następowała szybciej w liniach/odmianach odpornych niż w podatnych.

2. 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.
3. Szybka aktywacja (4 hpi) oraz nadekspresja transkryptu *VPE* w WV 700, L 3708, LA 1604 może świadczyć o reakcji nadwrażliwości w badanych liniach pomidora.
4. Potraktowanie roślin pomidora i ogórka przed inokulacją patogenami roztworem STS spowodowało indukowanie odporności u odmian podatnych. Znaczny wzrost produkcji etylenu na skutek potraktowania roślin roztworem STS może sugerować, iż etylen może uczestniczyć w mechanizmach odpornościowych.
5. Ani jasmonian metylu ani kwas salicylowy nie indukuje odporności pomidora na zarzę ziemniaka i ogórka na mączniaka rzekomego. Zastosowanie roztworu BABA miało korzystny efekt na ograniczenie objawów mączniaka rzekomego u ogórka, natomiast u pomidora nie indukowało mechanizmów odporności u roślin podatnych.

LITERATURA

- Nowakowska M., Nowicki M., Kłosińska U., Maciorowski R., Kozik E. U. 2014. Appraisal of artificial screening techniques of tomato to accurately reflect field performance of the late blight resistance. PLoS One, October 3, 2014.

MARZENA NOWAKOWSKA

URSZULA KŁOSIŃSKA

KATARZYNA NOWAK

WOJCIECH SZCZECURA

Instytut Ogrodnictwa

Kierownik Tematu: dr inż. Marzena Nowakowska Instytut Ogrodnictwa, Pracownia Genetyki i Hodowli

Roślin Warzywnych, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, tel. 46 834-67-18,

e-mail: marzena.nowakowska@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 66.

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

Słowa kluczowe: bakteryjna plamistość, funkcjonalna męska sterylność, fuzaryjne więdnienie, selekcja wspomagana markerami

Celem badań było opracowanie molekularnej procedury umożliwiającej identyfikację genów warunkujących następujące cechy użytkowe pomidora: odporność na bakteryjną plamistość pomidora [*Xanthomonas vesicatoria*; (Xv), rasa T2] oraz fuzaryjne więdnienie [*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*).

WYNIKI

W przypadku bakteryjnej plamistości badania rozpoczęto od określenia czynników genetycznych warunkujących odporność linii PI 114490 (*S. lycopersicum* var. *cerasiformae*) na Xv. Mechanizm dziedziczenia opracowano na podstawie populacji mieszańcowych: F₁, RF₁, F₂, Bc₁P₁, Bc₁P₂ pochodzących ze

skrzyżowania linii PI 114490 (P_1) z podatną odmianą Rumba (P_2). Analiza uzyskanych wyników 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 Xv nie jest uwarunkowana czynnikiem maticznym. 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). Należy jednak podkreślić, że rozkład roślin w poszczególnych klasach wyraźnie odbiegał od rozkładu normalnego, a najliczniejszą grupę w pokoleniu F_2 stanowiły rośliny o najwyższym stopniu podatności (59%). Przeprowadzona 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, co zostało potwierdzone testem χ^2 . Nie stwierdzono również nieallelicznych interakcji dla dwóch genów. W związku z powyższym, analizę cechy odporności na Xv u PI 114490, rozpoczęto od zbadania modelu dziedziczenia addytywno-dominującego testami skali Mathera parametrów A, B, C. Na podstawie otrzymanych wyników odrzucono model addytywno-dominujący dziedziczenia cechy odporności, ponieważ wartość przynajmniej jednego parametru C była istotnie różna od zera. Analiza według sześcioparametrowego modelu dziedziczenia Jinksa i Jonesa (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 poszukiwano polimorfizmu DNA formy odpornej (PI 114490) i podatnej ('Rumba') na Xv wykorzystując do tego celu 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 (41 markerów SSR, 22 markery RAPD, 4 markery CAPS) posłużyły do konstrukcji szkieletowej mapy genetycznej populacji mapującej F_2 ('Rumba' x PI 114490) liczącej 114 roślin. 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 więdnienie wywołane przez rasę 1 *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Scott i in., 2004) zidentyfikowano 19 markerów CAPS, dla których obserwowano różnice w wielkościach produktów trawienia analitycznego między odporną na *Fol* linią LA 3475 i podatną A 100. Sprzężenie wyróżnionych markerów polimorficznych z genem *I* oceniano na podstawie porównania oceny fenotypowej i molekularnej populacji $F_{2:3}$ przy pomocy metody BSA. Wykorzystanie populacji F_2 , której poziom odporności/podatności oceniano na podstawie reakcji roślin F_3 , miało

na celu uwiarygodnienie oceny fenotypowej pojedynków F_2 , umożliwiając jednocześnie dokładniejszą weryfikację markerów polimorficznych. Przeprowadzono trzy niezależne testy fitopatologiczne, w których oceniano stopień porażenia roślin 100 linii F_3 . Testy infekcyjne przeprowadzono zgodnie z wytycznymi CPVO-TP/0044/3 wykorzystując do inokulacji izolat PRI 20698 charakteryzujący się wysoką agresywnością oraz stabilnością i powtarzalnością w wywoływaniu objawów chorobowych. Uwzględniając reakcję roślin linii F_3 na porażenie przez rasę 1 *Fol*, dokonano następnie oceny poziomu odporności/podatności poszczególnych pojedynków F_2 . 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 markerów różnicujących formy rodzicielskie na wyselekcjonowanych próbach DNA z pojedynków populacji mapującej F_2 o skrajnych fenotypach, umożliwiły wytypowanie markerów potencjalnie sprzężonych z genem *I*. Z 19 przeanalizowanych markerów do dalszych etapów badań zaklasyfikowano 10 markerów. 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 poziomu odporności/podatności 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 jako homozygoty dominujące (odporne) lub heterozygoty (odporne) 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* pochodzących z zasobów genowych TGRC (University of California, Davis, USA). 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 immunnej odporności na rasę 1 *Fol* linii LA 0276, rośliny tej linii w przeprowadzonym teście fitopatologicznym były podatne.

W ramach realizacji niniejszego projektu opracowywano również molekularną metodę identyfikacji genów warunkujących funkcjonalną męską sterylność (*ps*, *ps-2*) pomidora na potrzeby selekcji wspieranej markerami. 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 *CER6* opracowano dwa markery CAPS (T1535/*Mbo*I, Cer6-3/*Taq*I). Celem zweryfikowania przydatności wyróżnionych markerów do selekcji roślin *ps* przeprowadzono 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. Niezależnie od użytego markera, analiza produktów restrykcyjnych wykazała obecność produktów charakterystycznych dla allelu *ps* u 19 spośród 21 badanych funkcjonalnie męskosterylnych linii. W profilach pozostałych dwóch linii *ps* (W-1.10, 2-303) 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 amplikonu (dla obu markerów) 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 w identyfikacji genu *ps*. Uzyskane wyniki genotypowania dla wybranych do badań linii męskosterylnych o różnym pochodzeniu oraz dwóch różnych populacji F_2 , pozostają jednak w sprzeczności z konkluzją Leide i in. (2011) według której mutacja *ps* nie jest tożsama z mutacją *slcer6*. Wniosek nasz 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 (liście, łodyga, działki kielicha, płatki, słupek, pylnik, skórka owocu czerwonego w pełni dojrzałego, skórka i miąższ w pełni wykształconego owocu zielonego). W przypadku genu *ps-2* weryfikowano użyteczność dwóch markerów: *ps-2ABL* (Gourget i in., 2009) i *C4-30* (Staniaszek i in., 2012) na zróżnicowanym materiale (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*). Uzyskane wyniki wskazują jednoznacznie na wyższą informatywność markera *ps-2ABL* opracowanego na podstawie sekwencji sklonowanego genu *ps-2* w porównaniu z markerem *C4-30*.

WNIOSKI

1. 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 wykorzystanie wysokoprzepustowych metod genotypowania generujących mapy o wysokim zagęszczeniu na skutek detekcji wielu tysięcy SNP-ów.
2. 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.
3. 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*.
4. Markery opracowane na podstawie sekwencji genu *CER6* (T1535/MboI, Cer6-3/Taq1) mogą być rutynowo stosowane w diagnostyce molekularnej do identyfikacji roślin *ps*.

5. Obniżony poziom ekspresji genu *SLCER6* we wszystkich analizowanych organach linii męskosterylnych może sugerować iż mutacje *slcer6* oraz *ps* są tożsame.

LITERATURA

- Gorguet, B., Schipper D., van Lammeren A., Visser R., van Heusden A. 2009. *Ps-2*, the gene responsible for functional sterility in tomato, due to non-dehiscent anthers, is the results of a mutation in novel polygalacturonase gene. *Theor. Appl. Genet.* 118: 1199 — 1209.
- Jinks J. L., Jones R.M. 1958. Estimation of the components of heterosis. *Genetics* 43: 223 — 234.
- Leide J., Hildebrandt U., Vogt G., Riederer M. 2011. The positional sterile (*ps*) mutation affects cuticular transpiration and wax biosynthesis of tomato fruits. *J. Plant Physiol.* 168: 871 — 877.
- Mather K., Jinks J. L. 1982. *Biometrical Genetics. The study of continuous variation.* Third edition. London, New York. Chapman and Hall.
- Scott J. W., Agram H. A. A., Jones J. P. 2004. RFLP — based analysis of recombination among resistance genes to fuzarium wilt races 1, 2 and 3 in tomato. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 129 (3): 394 — 400.
- Smirnova A., Leide, J., Riederer M. 2013. Deficiency in a very-long-chain fatty acid β -ketoacyl-coenzyme A synthase of tomato impairs microgametogenesis and causes floral organ fusion. *Plant Physiology* 161 (1): 196 — 209.
- Staniaszek M., Szajko K., Kozik E. U., Nowakowska M., Marczewski W. 2012. The novel *ps* and *ps-2* specific markers for selection functional male sterile lines in breeding programs and hybrids seed production. *J. of Agric. Sci.*, vol. 4, (10): 61 — 67.

URSZULA KŁOSIŃSKA

MARZENA NOWAKOWSKA

WOJCIECH SZCZUCHURA

KATARZYNA NOWAK

WALDEMAR TREDER

KRZYSZTOF KLAMKOWSKI

KATARZYNA WÓJCIK

Instytut Ogrodnictwa ul Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Polska

Kierownik Tematu: dr Urszula Kłosińska Instytut Ogrodnictwa, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,

Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,

tel. 46 834 66 54, e-mail: urszula.klosinska@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 104.

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

Słowa kluczowe: cebula, deficyt wody, mechanizm dziedziczenia, parametry biochemiczne, tolerancja

CEL BADAŃ

Celem podjętego tematu jest charakterystyka 300 linii/odmian cebuli pod względem reakcji na niedobór wody w trzech fazach rozwojowych, a następnie wyjaśnienie genetycznych, fizjologiczno-biochemicznych i molekularnych mechanizmów warunkujących tę cechę. Celem badań prowadzonych w roku 2018 była optymalizacja metody wywoływania stresu niedoboru wody w fazie kiełkowania nasion, wzrostu siewek i wiązania cebul oraz ocena reakcji 150 populacji cebuli na stres suszy w różnych fazach wzrostu i rozwoju.

WYNIKI

Optymalizację metodyki testowania tolerancji cebuli na suszę w fazie kiełkowania nasion oraz w fazie siewek prowadzono w warunkach laboratoryjnych z wykorzystaniem dwóch linii hodowli PlantiCo Zielonki (ZS/8 i ZS/49) oraz odmiany 'Sochaczewska' (PNOS Ożarów Mazowiecki). Stres suszy indukowano poprzez zastosowanie obniżającego potencjał wody poliglikolu etylenowego (PEG) w czterech stężeniach: 0, 10, 15 i 20%. Analizy porównawcze wykazały istotny wpływ wielkości stężenia PEG na siłę i energię kiełkowania nasion badanych obiektów. Wraz ze wzrostem stężenia PEG zdolność kiełkowania nasion malała. Nie obserwowano istotnych różnic w energii i sile kiełkowania pomiędzy 10 a 15% PEG. Natomiast zastosowanie 20% PEG znacznie zahamowało zdolność kiełkowania względem kontroli (redukcja o 50–88%), dlatego też do dalszych badań wytypowano 18% stężenie PEG.

Również w fazie siewek, stwierdzono istotny wpływ traktowania różnymi stężeniami PEG na długość korzeni i liścieni. U wszystkich genotypów cebuli, 20% PEG całkowicie zahamował wzrost korzeni i bardzo silnie ograniczył długość siewek (o 86% względem kontroli). Stosunkowo dużą redukcję długości korzeni oraz liścieni zanotowano również dla 15% PEG (średnia redukcja długości korzeni i liścieni dla linii/odmian — odpowiednio 62 i 58%), przy czym przy zastosowaniu tego stężenia nie obserwowano większych różnic pomiędzy badanymi obiektami. Natomiast zastosowanie 10% PEG w największym stopniu różnicowało badane obiekty, dlatego też stężenie to zostało wytypowane do dalszych badań.

Badania przeprowadzone w warunkach szklarniowych (susza glebowa) wykazały liniową zależność masy cebul w zależności od zastosowanego poziomu nawadniania: 100, 75, 50 i 25% pojemnikowej pojemności wody. Wraz ze wzrostem deficytu wody u badanych obiektów cebuli obserwowano większe straty masy cebul względem kontroli. Średnie dla linii straty masy cebul wynosiły 35, 70 i 87%, odpowiednio dla 75, 50 i 25% pojemnikowej pojemności wody.

W kolejnym etapie badań przetestowano 150 obiektów cebuli pod względem ich tolerancji na stres suszy w fazie kiełkowania nasion, siewek oraz w fazie wiązania cebul według metodyki zoptymalizowanej w wyżej opisanym zadaniu. Stwierdzono duże różnice pomiędzy badanymi liniami/odmianami cebuli pod względem energii i siły kiełkowania nasion w warunkach stresu suszy fizjologicznej (18% PEG). Spośród wszystkich badanych obiektów, najlepszymi parametrami kiełkowania w warunkach stresu wyróżniły się odmiany z firmy 'Polan Kraków': 'Polanowska', 'Wolska' oraz P 15, których nasiona skiełkowały odpowiednio w 80,7, 73,3 i 68,7%. W przypadku odmiany 'Polanowska' zdolność kiełkowania w PEG-u była obniżona tylko o 4,7% w porównaniu do kombinacji kontrolnej. W następnej kolejności należy również wyróżnić odmianę Topolska, u której nie obserwowano różnic w zdolności kiełkowania między 18% PEG a kontrolą. Najbardziej wrażliwe na stres suszy fizjologicznej w fazie kiełkowania okazały się linie: ZS/19, ZS/8, ZS/13, ZS/12, ZS/11, które mimo wysokiej zdolności kiełkowania w warunkach kontrolnych (97–87%) nie skiełkowały w ogóle

w 18% PEG-u. U 45 kolejnych obiektów liczba skielkowanych nasion w PEG-u nie przekroczyła 20%.

Podobnie jak w fazie kiełkowania, również w fazie siewek zaobserwowano zróżnicowaną reakcję badanych obiektów cebuli na stres suszy (10% PEG). Najbardziej tolerancyjne na badany stres okazały się dwie linie: ZS/3 i ZS/39, u których świeża masa była większa o odpowiednio 9 i 3% w porównaniu do kontroli. U czterech kolejnych obiektów: 171344, ZS/4, P 15 i ZS 15 zaobserwowano niewielki wpływ czynnika stresującego na ograniczenie badanej cechy (redukcja o odpowiednio 0,6; 1,6; 4,5; 6,7%). W następnej kolejności należy wymienić 7 obiektów (ZS/41, P 11, Topolska, ZS/37, ZS/35, P 15, ZS/34, ZS/14), u których zastosowanie 10% PEG-u spowodowało ograniczenie świeżej masy siewek o 10,8-16,8%. Natomiast najbardziej wrażliwe na stres były cztery obiekty: 171330, NOE5, 171333 i 171232, których świeża masa siewek była zredukowana względem kontroli o odpowiednio 60,8, 61,4, 61,4 i 64,7%.

Zaobserwowano duże zróżnicowanie pomiędzy liniami pod względem średniej masy cebul niezależnie od zadanego poziomu nawodnienia. Średnia masa cebuli w warunkach optymalnego nawadniania równała się 34,3 g, w suszy — 11,3 g, zaś średni % strat względem kontroli wyniósł 66. Największą średnią masę cebuli (52,1–62,4 g) w warunkach kontrolnych zanotowano dla dziesięciu obiektów, natomiast najmniejszą (16,5–18,5 g) dla sześciu. W warunkach suszy największą masę cebul (17,5–24,4 g) stwierdzono dla 6 genotypów, a najmniejszą wynoszącą poniżej 10 g (od 3,7–9,9 g) odnotowano dla 29 linii/odmian cebuli. U większości linii stres suszy bardzo silnie obniżył masę cebul. U 99 obiektów obserwowano redukcję tej cechy względem kontroli od 50 do 74%, natomiast straty powyżej 75% stwierdzono u 23 genotypów. Redukcję masy cebuli poniżej 50% stwierdzono u 8 genotypów (ZS 21, ZS 29, NOE 17, NOE 35, P 10, P 11, P 12, ‘Wolska’), które stanowią 6% badanej populacji.

WNIOSKI

1. Na podstawie uzyskanych wyników z testów w warunkach laboratoryjnych, do dalszych badań nad wpływem stresu suszy fizjologicznej na zdolność kiełkowania i wzrost siewek cebuli, jako czynnik stresujący stosowany będzie 18% PEG (kiełkowanie) i 10% PEG (siewki).
2. Podsumowując wyniki uzyskane w warunkach suszy glebowej stwierdzono, iż najkorzystniejsze dla rozróżnienia genotypów cebuli pod względem reakcji na stres suszy w fazie wiązania cebul będzie zastosowanie w dalszym etapie badań deficytu wodnego na poziomie 50% pojemnikowej pojemności wodnej w odniesieniu do kontroli. Stres o wytypowanym natężeniu istotnie obniżał masę cebul względem kontroli i równocześnie nie powodował trwałego zasychania roślin.
3. Badane obiekty cebuli charakteryzują się poszukiwaną zmiennością pod względem tolerancji na stres suszy w różnych fazach wzrostu i rozwoju wegetatywnego. Dzięki temu stanowią cenny materiał do badań polimorfizmu genomowego cebuli przy wykorzystaniu platformy DArTseq.

4. Wytypowano do dalszych badań linie skrajnie tolerancyjne i wrażliwe na stres niedoboru wody, które posłużą do wygenerowania populacji mieszańcowych (F_1 , F_2 , BC_1) niezbędnych do określenia czynników genetycznych warunkujących tolerancję cebuli na deficyt wody.

DARIUSZ GRZEBELUS
ALICJA MACKO-PODGÓRNI
KATARZYNA STELMACH
KORNELIA KWOLEK
DARIUSZ KADŁUCZKA
ZBIGNIEW GAJEWSKI
RAFAŁ BARAŃSKI

Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Kierownik Tematu: Prof. dr hab. Dariusz Grzebelus Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, tel. 12 6625399, e-mai: d.grzebelus@urk.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.802.8.2018, Zadanie nr 69.

Opracowanie i wykorzystanie wysokowydajnych technik selekcji genomowej w doskonaleniu warzyw

Development and application of high-throughput techniques for genomic selection in the improvement of vegetable crops

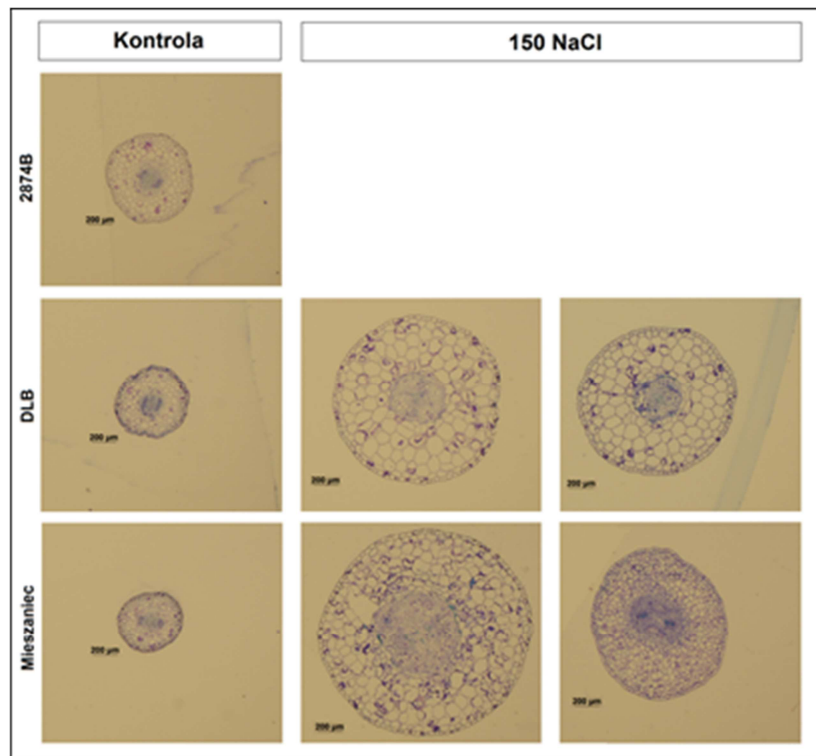
Słowa kluczowe: genotypowanie, korzeń spichrzowy, mapowanie asocjacyjne, marchew, stres abiotyczny, struktura zmienności genetycznej

FENOTYPOWANIE ROŚLIN

Cel tematu: określenie fenotypu roślin odpornych na stres zasolenia na poziomie komórkowym.

Opis wyników

Analiza mikroskopowa przekrojów korzeni roślin kontrolnych wskazała na ich typową budowę i charakterystyczny układ tkanek. U roślin traktowanych 150 mM NaCl stwierdzono znaczne pogrubienie korzeni. W przypadku roślin F2 zaobserwowano silniejsze grubienie pod wpływem zasolenia niż dla roślin populacji rodzicielskiej tolerancyjnej na stres zasolenia (DLB), co było spowodowane powiększeniem komórek kory pierwotnej, a także większej liczby komórek u roślin F2 (rys. 1). Obserwowano również różnice w budowie walca osiowego u roślin poddanych stresowi, w porównaniu do roślin kontrolnych.



Rys. 1. Budowa anatomiczna korzeni siewek marchwi rosnących w warunkach kontrolnych (Kontrola) i w warunkach stresu zasolenia (150 NaCl). 2874B — linia rodzicielska wrażliwa na stres zasolenia, DLB — rodzicielska odmiana lokalna tolerancyjna na stres zasolenia, Mieszaniec — F2 (2874B × DLB). Nie uzyskano roślin linii 2874B w warunkach stresu zasolenia

Wnioski

- Anatomia korzeni siewek marchwi tolerancyjnych na stres zasolenia rosnących na podłożu z dodatkiem 150 mM NaCl różni się od typowej anatomii roślin kontrolnych.
- Grubienie korzeni roślin rosnących na podłożu z dodatkiem 150 mM NaCl jest spowodowane wzrostem objętości komórek miękiszowych (w przypadku roślin tolerancyjnej odmiany lokalnej DLB oraz jednej z roślin F2) lub wzrostem liczby komórek miękiszowych (w przypadku jednej z roślin F2).
- Rośliny F2 cechowały się bardziej znaczącymi nieprawidłowościami budowy anatomicznej korzenia niż tolerancyjna forma rodzicielska (DLB), obejmującymi niewłaściwie wykształcone wiązki przewodzące, przestwory między komórkami miękiszu i ich bardziej nieregularny kształt, przy czym obserwowane zmiany były różne dla każdej z roślin F2. Wskazuje to na kompleksowy charakter tolerancji na stres zasolenia, którego poszczególne komponenty u roślin F2 prawdopodobnie zostały utracone.

WYSOKOWYDAJNE GENOTYPOWANIE

Cel tematu: genotypowanie roślin reprezentujących kolekcję odmian marchwi jadalnej w oparciu o polimorfizmy insercji transpozonów *DcSto*

Opis wyników

Genotypowanie w oparciu o panel markerów molekularnych *DcSto* zostało przeprowadzone dla 156 roślin reprezentujących 78 odmian marchwi z kolekcji zgodnie z metodyką opracowaną w roku 2014. Każda odmiana była reprezentowana przez jedną roślinę. Dla 73 *loci* otrzymano dwa warianty alleliczne odpowiadające obecności elementu *DcSto* lub jego brakowi. 27 *loci* charakteryzowało się obecnością dodatkowego wariantu allelicznego u przynajmniej jednej z genotypowanych populacji.

Wnioski

- Genotypowanie markerami *DcSto* 156 roślin z 78 populacji pozwoliło na identyfikację 73% *loci* w układzie biallelicznym, a pozostałe 23% cechowało się obecnością przynajmniej jednego dodatkowego wariantu.

ANALIZA BIOINFORMATYCZNA I IDENTYFIKACJA POLIMORFIZMÓW
DIAGNOSTYCZNYCH

Cele tematu: analiza struktury zmienności genetycznej w kolekcji odmian uprawnych marchwi w oparciu o wyniki genotypowania GBS i *DcSto*-ILP; mapowanie asocjacyjne w oparciu o wyniki fenotypowania i genotypowania GBS; identyfikacja i charakterystyka genów kandydujących warunkujących morfologię korzenia.

Opis wyników

Wyniki uzyskane w toku genotypowania panelem markerów *DcSto*-ILP oraz GBS dla 78 odmian z kolekcji zmienności genetycznej marchwi uprawnej typu zachodniego zostały poddane analizom struktury zmienności genetycznej przy wykorzystaniu oprogramowania STRUCTURE. Do analizy struktury zmienności genetycznej opartej na insercjach elementów *DcSto* wybrano 93 *loci*. Analizę struktury zmienności genetycznej w oparciu o polimorfizmy pojedynczego nukleotydu przeprowadzono w oparciu o 2354 markery SNP. Stwierdzono, że najbardziej prawdopodobna struktura zmienności genetycznej badanej kolekcji odmian to:

- trzy, cztery lub siedem grup ($K = 3$, $K = 4$ lub $K = 7$) przy analizie struktury zmienności wynikającej z polimorfizmu insercji transpozonów *DcSto*;
- trzy, cztery lub pięć grup ($K = 3$, $K = 4$ lub $K = 5$) przy analizie struktury zmienności wynikającej z polimorfizmu pojedynczych nukleotydów (SNP).

Do przeprowadzenia genomowego mapowania asocjacyjnego (GWAS) wykorzystano 127155 polimorfizmów SNP zidentyfikowanych w wyniku genotypowania GBS dla 327 roślin reprezentujących różne grupy odmian marchwi. Zidentyfikowano rejon zlokalizowany na chromosomie 1, zasocjowany z szerokością korzenia. W jego obrębie znajdowało się osiem markerów o wartości $-\log_{10}e < 5,52$ i były one zlokalizowane w rejonie obejmującym dwa geny.

Wnioski

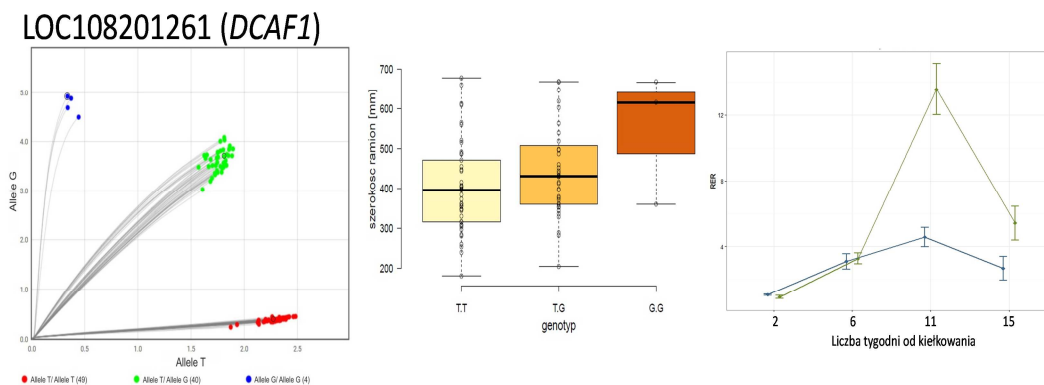
- Struktura zmienności genetycznej populacji marchwi typu zachodniego odzwierciedla podział odmian marchwi na typy użytkowe oraz morfologię korzenia spichrzowego.
- Typy Amsterdam i Chantenay są wyraźnie odrębne od pozostałych typów.
- Przyporządkowanie odmian w oparciu o markery SNP jest nieco inne niż to obserwowane dla markerów *DcSto*.
- Wysoki poziom admiksji wskazuje na stosunkowo częste wykorzystywanie przez hodowców krzyżowań pomiędzy materiałami należącymi do różnych typów użytkowych.
- Przy wykorzystaniu strategii mapowania asocjacyjnego (GWAS) zidentyfikowano gen kandydujący (*LOC108201261*), związany z determinacją przyrostu korzenia marchwi na szerokość.
- Kształt korzenia marchwi jest determinowany poligenicznie, poprzez wiele *loci* charakteryzujących się małymi efektami.

KONWERSJA WYBRANYCH POLIMORFIZMÓW DO MARKERÓW SPECYFICZNYCH

Cel tematu: konwersja polimorfizmów GBS-SNP do markerów specyficznych i ich walidacja

Opis wyników

Do genotypowania w rejonie dwóch genów kandydujących (gen warunkujący przyrost korzenia marchwi na szerokość i gen potencjalnie związany z reakcją roślin marchwi na stres zasolenia) wykorzystano cztery markery SNP identyfikowane w systemie TaqMan. Przeprowadzono również ocenę poziomu ekspresji tych samych genów. Marker *chr1_26632616* różnicował rośliny marchwi pod względem współczynnika kształtu korzenia w zależności od genotypu (rys. 2). Przeciwnastawne allele zasocjowanego genu cechowały się podobnym profilem ekspresji, osiągając maksimum w okresie 11 tygodnia od kiełkowania, ale wzrost poziomu ekspresji dla allelu warunkującego intensywniejszy przyrost korzenia marchwi na szerokość był znacznie silniejszy niż dla allelu przeciwnastawnego (rys. 2). Wskazuje to na prawdopodobny związek tego genu z determinacją kształtu korzenia marchwi. Trudność z oznaczeniem homozygot alternatywnych dla markera w obrębie rejonu determinującego reakcję siewek marchwi na zasolenie i ich identyfikacja jako heterozygoty w technice TaqMan, może świadczyć o istnieniu w tym rejonie strukturalnej rearanżacji. Wytypowany gen kandydujący ulegał wyciszeniu w odpowiedzi na stres zasolenia u roślin tolerancyjnych.



Rys. 2. Wyniki walidacji markera SNP chr1_26632616 zasocjowanego z szerokością korzenia spichrzowego marchwi. Genotypowanie 90 roślin o różnym kształcie korzenia w systemie TaqMan (lewy panel), wykres box-plot obrazujący rozkład wartości szerokości ramion dla tych samych roślin, w zależności od identyfikowanego genotypu (środkowy panel), ekspresja genu *LOC108201261* w korzeniach roślin o przeciwstawnych wariantach allelicznych markera SNP chr1_26632616 (GG — kolor zielony, TT — kolor niebieski) w czterech terminach odpowiadających fazom rozwojowym korzenia spichrzowego marchwi (prawy panel)

Wnioski

- Dla jednego z dwóch testowanych *loci* (chr1_26632616) obserwowano oczekiwany polimorfizm pojedynczego nukleotydu.
- Marker SNP chr1_26632616 identyfikowany przy użyciu technologii TaqMan wydajnie genotypował rośliny w obrębie segregujących populacji.
- Zaobserwowano statystycznie istotną różnicę pod względem szerokości korzenia pomiędzy roślinami homozygotycznymi o przeciwstawnych wariantach allelicznych markera SNP chr1_26632616.
- Gen *LOC108201261* jest zaangażowany w przyrost korzenia spichrzowego na grubość, mający miejsce około 10–11 tygodnia od kiełkowania.
- Wyniki genotypowania TaqMan genu *DCAR_006211* potencjalnie zaangażowanego w warunkowanie tolerancji marchwi na stres zasolenia wskazują na prawdopodobne rearanżacje (możliwą tandemową duplikację) w genotypowanym rejonie. Zastosowanie markera HRM zakotwiczonego w miejscu flankującym kwestionowany rejon pozwoliło na jednoznaczne przyporządkowanie roślin do właściwych genotypów.
- Ekspresja genu *DCAR_006211* u roślin o przeciwstawnych wariantach allelicznych w warunkach kontrolnych była podobna. U roślin tolerancyjnych poddanych stresowi zasolenia (150 mM NaCl) jego ekspresja została silnie obniżona.

MAREK SZKLARCZYK
WOJCIECH WESOŁOWSKI
MARCELINA WAJDZIK
ANNA SZLACHTOWSKA
BEATA DOMNICZ
STEFAN STOJAŁOWSKI

Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa; Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie
Kierownik Tematu: dr hab. Marek Szklarczyk Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków; 12 662 5328; e-mail: marek.szklarczyk@urk.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.802.8.2018, Zadanie 97.

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 plants

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, genotypowanie, geny restorerowe, markery molekularne, samozgodność

TEMAT BADAWCZY 1: UZYSKANIE POPULACJI SEGREGUJĄCYCH POD WZGLĘDEM CECH STERYLNOŚCI/PŁODNOŚCI ORAZ SAMOZGODNOŚCI/SAMONIEZGODNOŚCI

Cele tematu

1) Uzyskanie populacji marchwi i cebuli z segregacją genów odpowiedzialnych za przywracanie płodności. 2) Uzyskanie materiałów kapusty z segregacją genów odpowiedzialnych za samozgodność / samoniezgodność.

Opis wyników

Wysiano osiem potomstw BC marchwi uzyskanych w rezultacie zapylenia roślin męskosterylnych pyłkiem heterozygotycznych roślin męskopłodnych. W sześciu potomstwach występowała cytoplazma Sa, natomiast w dwóch — Sp. W rezultacie przeprowadzonych upraw uzyskano korzenie wysadkowe, które po zbiorze z pola

umieszczono w chłodni. Na bazie tych korzeni w kolejnym sezonie wegetacyjnym planuje się uzyskać kwitnące rośliny do analizy fenotypu płodności.

Doprowadzono do kwitnienia trzy populacje BC cebuli. W czasie kwitnienia roślin wizualnie sprawdzano u nich obecność pyłku. Wizualna ocena płodności była weryfikowana poprzez mikroskopową analizę żywotności pyłku. Dwie z badanych populacji segregowały na rośliny męskopłodne i męskosterylne w oczekiwanym stosunku 1:1. Natomiast w jednej populacji wystąpiły wyłącznie rośliny męskosterylne. W ramach prac nad cebulą uzyskano także wysadki dwóch potomstw z cytoplazmą C, w których oczekuje się segregacji pod względem fenotypu płodności.

Po udanej jarowizacji doprowadzono do kwitnienia rośliny F3 kapusty, na których wykonano samozapylenia w otwartym kwiecie (dla oceny poziomu samonieźgodności) oraz w pąku (dla reprodukcji materiału). Analizowane rośliny F3 segregowały pod względem fenotypu samonieźgodności/samozgodności. Miarą tego fenotypu był stosunek liczby nasion do liczby łuszczyń, który zawierał się w przedziale od 0 do 21. Podobnej analizie fenotypowej poddano także cztery rody wyprowadzone w celu weryfikacji dziedziczenia samozgodności. W nich także wystąpiła segregacja, ale maksymalne wartości wspomnianego stosunku były wyraźnie mniejsze.

Wnioski

- Uzyskano wysadki ośmiu potomstw marchwi i dwóch potomstw cebuli, w których oczekuje się segregacji na rośliny męskosterylne i męskopłodne.
- Segregacja fenotypowa w obrębie dwóch kwitnących populacji cebuli i wszystkich kwitnących materiałów kapusty gwarantuje ich przydatność do analiz markerowych.

TEMAT BADAWCZY 2: GENOTYPOWANIE METODĄ GBS – POSZUKIWANIE POLIMORFIZMÓW DNA SPRZĘŻONYCH Z BADANYMI CECHAMI

Cele tematu

1) Masowa identyfikacja polimorfizmów sekwencyjnych u roślin cebuli różniących się statusem płodności. 2) Masowa identyfikacja polimorfizmów sekwencyjnych u roślin kapusty różniących się statusem samonieźgodności.

Opis wyników

Genotypowaniu poddano trzy populacje cebuli segregujące na rośliny męskosterylne i męskopłodne — 8, 307 i 308, oraz jedną populację kapusty — o numerze 2 — segregującą na rośliny samozgodne i samonieźgodne. Analiza ta była wykonywana w ramach usługi zleconej firmie Novogene (Chiny). Do sekwencjonowania wysokoprzepustowego wykorzystano platformę firmy Illumina. Zastosowano wariant sekwencjonowania ze sparowanymi końcami i 150 cyklami syntezy (PE150). W przypadku populacji kapusty długość odczytanych sekwencji wahała się od ok. 200 do ok. 430 Mb dla pojedynczej rośliny. Wskaźniki Q20 i Q30 wyniosły odpowiednio 94 i 86%, a udział par GC 40–42%.

Wnioski

- Dla obydwu badanych populacji uzyskano wystarczającą ilość danych sekwencyjnych. Przeciętne pokrycie sekwencji unikalnych u pojedynczej rośliny wyniosło ok. 0,5–1×.

- Wysoki procent nukleotydów osiągających wskaźniki jakości Q20 i Q30 gwarantuje przydatność otrzymanych danych sekwencyjnych dla analiz bioinformatycznych zmierzających do identyfikacji polimorfizmów pojedynczego nukleotydu (SNP).

TEMAT BADAWCZY 3: ANALIZY BIOINFORMATYCZNE — IDENTYFIKACJA GENOTYPÓW I MAPOWANIE POLIMORFIZMÓW

Cele tematu

Określenie genomowej lokalizacji zidentyfikowanych markerów GBS oraz genów kontrolujących przywracanie płodności u cebuli oraz samozgodność u kapusty.

Opis wyników

W przypadku roślin kapusty (populacja) przefiltrowane odczyty sekwencyjne były mapowane do sekwencji genomu referencyjnego (GenBank: JJMF00000000.1) — średni odsetek zmapowanych odczytów wyniósł 94,7%. Średnio 13% genomu referencyjnego było pokryte odczytami sekwencyjnymi (wykazywało pokrycie przynajmniej 1×). W wyniku mapowania odczytów do genomu referencyjnego zidentyfikowano ok. 1,5 mln polimorfizmów sekwencyjnych, które następnie poddawano kilkustopniowej filtracji. Obejmowała ona kolejno selekcję markerów: biallelicznych o wysokiej jakości, z maksymalnie pięcioma nieokreślonymi genotypami, o genotypach odpowiadających charakterowi badanej populacji, o właściwej segregacji oraz oddalonych od siebie o więcej niż 10 kb. W rezultacie do mapowania genetycznego wykorzystano ok. 700 markerów. Uzyskano dziewięć grup sprzężeń odpowiadających dziewięciu chromosomom kapusty. Całkowita długość mapy wynosiła 721 cM ze średnią długością pojedynczej grupy sprzężeń wynoszącą 80,1 cM. Analiza programem R/qtl nie wykazała obecności QTLi skorelowanych z cechą samozgodności — wartość LOD dla żadnego zmapowanego markera nie przekroczyła wartości krytycznej.

Wnioski

- Przy wykorzystaniu technologii GBS otrzymano dane sekwencyjne, które pozwoliły na wydajną identyfikację markerów GBS i otrzymanie — przynajmniej lokalnie — wysoko wysyconych map genetycznych. Dzięki dostępności sekwencji referencyjnej określono chromosomową lokalizację zidentyfikowanych grup sprzężeń.
- Regresyjne mapowanie interwałowe nie wykazało obecności QTLa mającego wpływ na ekspresję cechy samozgodności w populacji C2.

TEMAT BADAWCZY 4: GENOTYPOWANIE MARKERAMI MIKROSATELITARNYMI (CEBULA)

Cele tematu

Zmapowanie chromosomowo-specyficznych markerów mikrosatelitarnych w obrębie grup sprzężeń utworzonych z markerów GBS.

Opis wyników

Analizami objęto trzy populacje cebuli — AI/10, AI/15 i 601, które segregowały na rośliny męskosterylne i męskopłodne. Populacje te genotypowano markerami SSR wytypowanymi w poprzednim roku badań. Rośliny z populacji AI/10 poddano

genotypowaniu przy użyciu markerów AMS-10, AMS-12 oraz AMS-23; rośliny z populacji AI/15 poddano genotypowaniu przy użyciu markerów AMS-08, AMS-10 oraz AMS-12; natomiast rośliny z populacji 601 poddano genotypowaniu przy użyciu markerów AMS-10 oraz AMS-23. Analiza profili elektroforetycznych potwierdziła segregację tych markerów w odpowiednich populacjach. Mapy markerów GBS uzyskane w poprzednich latach próbowano uzupełnić o loci segregujących markerów SSR. Udało się to tylko dla populacji 601 — markery AMS10 i AMS23 zmapowały się do dwóch różnych grup sprzężeń.

Wnioski

- Grupa sprzężeń z markerem AMS-10 reprezentuje chromosom II a grupa sprzężeń z markerem AMS-23 — chromosom III.

TEMAT BADAWCZY 5: KONWERSJA SPRZEŻONYCH Z DOCELOWYMI GENAMI
POLIMORFIZMÓW DNA W MARKERY SEKWENCYJNIE SPECYFICZNE — CAPS,
TETRA-PRIMER ARMS-PCR ORAZ TAQMAN

Cele tematu

Opracowanie markerów PCR do wnioskowania o obecności alleli restorerowych i alleli (allelu) samozgodności.

Opis wyników

Analizy przeprowadzono dla jednej populacji marchwi, jednej populacji cebuli oraz dla dwóch populacji kapusty. Populacje marchwi i cebuli segregowały na rośliny męskosterylne i męskopłodne. Z kolei rośliny z populacji kapusty cechował zróżnicowany poziom samozgodności. Z każdej populacji analizowano po pięć roślin o zróżnicowanych fenotypach — męskosterylnych i męskopłodnych (marchew, cebula), samoniezgodnych i najsilniej samozgodnych. Markery CAPS projektowano na bazie wskazań programu VCF2CAPS (Wesołowski). Dla większości takich markerów uzyskano monomorficzne profile elektroforetyczne. Polimorfizm odnotowano tylko po użyciu czterech markerów marchwianych oraz po użyciu jednego markera kapuścianego, jednak różnicował on rośliny tylko w jednej z dwóch badanych populacji kapusty. Wszystkie wykryte markery polimorficzne wykazywały kosegregację z odpowiednimi fenotypami.

Wnioski

- Dla populacji marchwi z cytoplazmą Sp zidentyfikowano cztery polimorficzne markery. Wykazywały one kosegregację z fenotypem płodności/sterylności roślin.
- Dla jednej z badanych populacji kapusty zidentyfikowano jeden marker polimorficzny. Wykazywał on kosegregację z fenotypem samozgodności/samoniezgodności roślin.

EWA GRZEBELUS**MAREK SZKLARCZYK****RAFAŁ BARAŃSKI****ANETA MALEC**

Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Kierownik Tematu: dr hab. Ewa Grzebelus Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, tel. (12) 6625190, e-mail: e.grzebelus@urk.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.802.8.2018, Zadanie 101.

Transfer cytoplazmatycznej męskiej sterylności poprzez somatyczną hybrydyzację u marchwi

Transfer of cytoplasmic male sterility through somatic hybridization in carrot

Słowa kluczowe: białka fluorescencyjne, elektrofuzja protoplastów, inaktywatory genomów organellowych i jądrowego, wczesna selekcja cybryd, utrwalenie wariantów allelicznych

OPRACOWANIE MARKERÓW DNA PRZYDATNYCH DO IDENTYFIKACJI FORM CYBRYDOWYCH ORAZ STABILIZACJA GENETYCZNA I SELEKCJA FORM DONOROWYCH

Celem tematu było: (1) uzyskanie korzeni wysadkowych potomstw z samozapylenia roślin męskopłodnych wyselekcjonowanych w poprzednim roku badań, (2) produkcja nasion donora i akceptorów CMS do wykorzystania w eksperymentach fuzji protoplastów, (3) weryfikacja obecności i utrwalenia pożądaných markerowych wariantów allelicznych w partiach nasion donora i akceptorów CMS oraz (4) weryfikacja plazmotypów reprezentowanych przez partie nasion donora i akceptorów CMS.

Opis wyników

Dla badanych sublinii poszukiwano markerów o utrwalonym charakterze tzn. występujących u wszystkich prób zbiorczych w wariacie wskazującym na homozygotyczność. Przykładowo, w przypadku markera chr1-DcS15 męskopłodne sublinie 174-9, 176-12, 188-7, 188-20 i 189-5 generowały wyłącznie profil odpowiadający homozygotom 650/650. Z kolei przy zastosowaniu tego samego markera

dla męskosterylnej sublinii 4503/4 × 4501/5 uzyskano wyłącznie profil odpowiadający homozygotom 880/880. Jeżeli — jak w podanym przykładzie — sublinia męskosterylna zawiera inny homozygotyczny allel markerowy niż któraś z sublinii męskopłodnych, regeneraty otrzymane z wykorzystaniem tych komponentów rodzicielskich będzie można weryfikować przy zastosowaniu wspomnianego markera (w podanym przykładzie chr1-DcS15). Pomimo nieznacznej heteroplazmii odnotowanej u części linii męskosterylnych (znikoma „domieszka” produktu o wielkości 360 bp) dla analizowanych w bieżącym roku materiałów uzyskano bardzo czytelny i zgodny z oczekiwaniami obraz reprezentowanego przez nie plazmotypu. Potwierdza to możliwość wykorzystania analizowanych sublinii męskosterylnych jako donorów cytoplazmy sterylizującej, a sublinii męskopłodnych jako jej akceptorów. Ponadto, w ramach reprodukcji komponentów rodzicielskich do eksperymentów fuzji, uzyskano korzenie wysadkowe i nasiona.

REGENERACJA PROTOPLASTÓW GATUNKÓW POKREWNYCH I OKREŚLENIE PARAMETRÓW INAKTYWACJI ICH GENOMÓW JĄDROWYCH

Celem tematu była optymalizacja parametrów inaktywacji genomu jądrowego kolendry siewnej i kminu rzymskiego.

Opis wyników

W sumie przeanalizowano wpływ 4 dawek UV w zakresie od 1500 do 3000 J·m⁻² na rozwój protoplastów w pożywce bazowej oraz w wzbogaconej o fitosulfokinę (PSK) i putrescynę (Pu).

W warunkach kontrolnych kmin charakteryzował się niemal dwukrotnie większą zdolnością do tworzenia agregatów komórkowych w porównaniu do kolendry. Po zastosowaniu promieniowania UV, komórki obu obiektów reagowały podobną, obniżoną zdolnością do formowania agregatów komórkowych. Po 2 miesiącach kultury obserwowano większą ilość tkanki kalusowej w wariantach wzbogaconych w PSK i Pu w stosunku do pożywki bazowej, przy czym kmin wykazywał większą intensywność formowania tkanki kalusowej niż kolendra. Podczas dalszego prowadzenia kultury kalusa na pożywce regeneracyjnej jedynie u kminu zaobserwowano regenerację roślin.

Ogólnie, lepsza zdolność regeneracyjna kminu skutkowałą zastosowaniem wyższej dawki promieniowania UV w celu inaktywacji genomu jądrowego niż w przypadku kolendry. Dawka UV o wartości 2000 J m⁻² była dawką letalną dla protoplastów kolendry — stwierdzono brak wzrostu tkanki kalusowej, mimo niskiej (lecz nie zerowej) wydajności kultury. Przy tej wartości dawki UV obserwowano jeszcze u kminu słabą intensywność formowania tkanki kalusowej, której nie odnotowano już przy dawce 2500 J·m⁻² na pożywce niesuplementowanej.

ELEKTROFUZJA PROTOPLASTÓW MARCHWI Z WYKORZYSTANIEM RÓŻNYCH INAKTYWATORÓW GENOMÓW ORGANELLOWYCH

Celem tematu było uzyskanie komórek cybrydowych po inaktywacji genomów organellowych biorcy CMS (1) kwasem jodooctowym (IOA) oraz (2) amidem kwasu jodooctowego (IOAA).

Opis wyników

Komponentami fuzji były protoplasty wyizolowane z populacji wyselekcjonowanych pod względem określonych wariantów allelicznych markerów jądrowych i plazmotytów organellowych, tak, aby możliwa była skuteczna i pewna identyfikacja zregenerowanych cybryd. W celu bezpośredniej selekcji cybryd po elektrofuzji, protoplasty akceptora CMS (traktowane IOA lub IOAA) barwiono izotiocjanianem rodaminy, natomiast protoplasty donora CMS (traktowane promieniowaniem UV) barwiono dioocetanem fluoresceiny (FDA). Do inaktywacji genomów organellowych wytypowano 4 sublinie biorcy CMS.

Zastosowana procedura izolacji protoplastów oraz parametry inaktywacji i elektrofuzji umożliwiły uzyskanie komórek cybrydowych po inaktywacji genomów organellowych biorcy CMS zarówno kwasem jodooctowym, jak i amidem kwasu jodooctowego. Fluorochromy w zastosowanych stężeniach umożliwiły identyfikację komórek cybrydowych, charakteryzujących się podwójną fluorescencją. W celu ograniczenia wycieku barwników z komórek oraz zmniejszenia labilności błon komórkowych, protoplasty przed jak i po fuzji inkubowano w niskiej temperaturze. Dzięki temu zastosowane barwniki wykazywały silną fluorescencję i długo utrzymywały się w komórkach, co umożliwiło wczesną selekcję komórek cybrydowych.

SELEKCJA, REGENERACJA I WZROST ROŚLIN HYBRYDOWYCH

Celem tematu była: (1) selekcja komórek cybrydowych bezpośrednio po przeprowadzonej fuzji protoplastów, (2) aktywacja podziałów mitotycznych u wyselekcjonowanych produktów fuzji poprzez wykorzystanie systemu niańki oraz (3) regeneracja roślin cybrydowych.

Opis wyników

Wczesna selekcja cybryd przeprowadzona za pomocą mikromanipulatora sprzężonego z mikroskopem odwróconym była skuteczna. W sumie wyselekcjonowano 200 cybryd, po 50 z każdego wariantu elektrofuzji. Podziały mitotyczne u wyselekcjonowanych komórek cybrydowych były aktywowane poprzez wykorzystanie kultury niańki. W tym celu w jednym naczyniu hodowlanym, ale odseparowane membraną insertu, umieszczano protoplasty cybryd oraz protoplasty niańki czyli protoplasty charakteryzujące się wysoką aktywnością mitotyczną. Podczas prowadzenia kultury komórek cybrydowych obserwowano tworzenie się pojedynczych agregatów komórkowych, pierwsze z nich pojawiały się między 10 a 20 dniem kultury. Ogólna liczba tworzących się agregatów była stosunkowo niska, gdyż jedynie 1,5% z 200 wyselekcjonowanych cybryd weszło w podziały komórkowe. Zaproponowany układ eksperymentalny, tj. fuzja komplementarna w połączeniu z bardzo wczesną selekcją komórek cybrydowych

z wykorzystaniem mikromanipulatora, testowany był po raz pierwszy. W trakcie realizacji tegorocznych eksperymentów udało się poznać słabe punkty tak zaplanowanego układu i w przyszłości będzie można je wyeliminować. Te słabe punkty to głównie umiejętności techniczne pozwalające na szybkie wyławianie komórek cybrydowych, które są bardzo delikatne i przy tego typu manipulacjach mogą bardzo łatwo zostać uszkodzone. Dodatkowym mankamentem w tegorocznych doświadczeniach były nieoczekiwane trudności, związane z kiełkowaniem nasion wytypowanych do eksperymentów sublinii biorcy i dawcy CMS, co skutkowało przesunięciem zaplanowanych pierwotnie terminów fuzji. W związku z powyższym wyselekcjonowane cybrydy są wciąż na etapie regeneracji.

ADELA ADAMUS**AGNIESZKA KIELKOWSKA****MAREK SZKLARCZYK**

Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Adela Adamus Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet

Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, tel. 12 6625188,

e-mail: a.adamus@urk.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.802.8.2018, Zadanie 64.

Wykorzystanie metod biotechnologicznych do poszerzenia zmienności genetycznej warzyw kapustnych

Biotechnological methods for broadening of the genetic diversity in brassica vegetables

Słowa kluczowe: protoplasty, elektrofuzja, markery molekularne, androgeniza, linie DH

ZADANIE 1. OPRACOWANIE METODY OTRZYMANIA MIESZAŃCÓW SOMATYCZNYCH KAPUSTY GŁOWIASTEJ (*BRASSICA OLERACEA* VAR. *CAPITATA*) Z NOWYMI, WARTOŚCIOWYMI CECHAMI

Badania nad elektrofuzją protoplastów kapusty głowiastej prowadzone w roku 2018 wykazały, że efektywność fuzji zależała od ploidalności łączonych ze sobą protoplastów i więcej komórek ulegających połączeniu obserwowano po fuzji obiektów diploidalnych niż haploidalnych. Działanie polem elektrycznym nie wpływało negatywnie na proces regeneracji ściany komórkowej ani na żywotność protoplastów, ale miało wpływ na podziały komórkowe i obniżało aktywność mitotyczną (do 6%) w porównaniu z kontrolą (14–21%). Liczba rozwijających się kalusów zależała od genotypu, a w kombinacjach fuzyjnych więcej ich było po połączeniu protoplastów haploidalnych. Na pożywce regeneracyjnej otrzymane kalusy sukcesywnie tworzą pędy.

Analiza cytometryczna kalusa otrzymanego w wyniku fuzji symetrycznej wykazała różnice w wielkości komórek pomiędzy frakcją embriogenną i nieembriogenną. Pędy otrzymane w wyniku fuzji protoplastów haploidalnych były 2n lub 1n, a otrzymane w wyniku fuzji protoplastów dwu obiektów diploidalnych były 4x lub 2n. Ponadto

analiza wykazała znaczny udział pędów o niezbalansowanej ploidalności, które były miksploidami. W jądrach komórkowych kalusa pochodzącego z kultur poddanych fuzji obserwowano więcej (6–10%) komórek z wieloma jąderkami (4–5 szt.) w porównaniu do kontroli (1–2%). Zwiększona liczba jąderek w jądrze komórkowym może być skorelowana w wyższą ploidalnością tych komórek.

Walidacja metodyki inaktywacji genomu cytoplazmatycznego wykazała różnice w reakcji na jodoacetamid (IOA) między badanymi obiektami. W pierwszej dobie po izolacji obserwowano spadek żywotności protoplastów wraz ze wzrostem stężenia IOA i czasem działania. Podziały komórkowe zostały zahamowane po zastosowaniu 1 lub 5 mM IOA przez 20 min. (zależnie od obiektu).

W badaniach nad otrzymaniem cybrydów inaktywacja jądra komórkowego przeprowadzona została za pomocą promieniowania UV, a genomu cytoplazmatycznego za pomocą IOA. Wydajność fuzji asymetrycznej zależała od jakości protoplastów po traktowaniu IOA i była wyższa, gdy obniżono do 4°C temp. podczas inaktywacji mitochondriów. Aktywność mitotyczna komórek po fuzji asymetrycznej była zahamowana (2%) w porównaniu z kontrolą (30–39%). Przyczynę takiego stanu upatruje się w negatywnym wpływie obydwu stresów (IOA w połączeniu z działaniem pola elektrycznego) podczas fuzji protoplastów. Powyższe wyniki wskazują na potrzebę optymalizacji metodyki fuzji asymetrycznej uwzględniającej jednoczesne testowanie wpływu IOA oraz pola elektrycznego na jakość protoplastów i wydajność fuzji.

ZADANIE 2. OPRACOWANIE MARKERÓW MOLEKULARNYCH DO OCENY STATUSU MIESZAŃCOWOŚCI REGENERANTÓW OTRZYMANYCH W WYNIKU EKSPERYMENTÓW FUZJI

Celem tematu badawczego było określenie pochodzenia genomu jądrowego i typu cytoplazmy u regenerantów uzyskanych w wyniku fuzji protoplastów. Prowadzono także zapylenia w celu otrzymania nasion pokoleń F3 i BC1S1 do mapowania genów odporności na kiłę.

Przy zastosowaniu markerów jądrowych, które różnicowały rodziców, u żadnego z badanych regenerantów — produktów różnych kombinacji fuzji protoplastów nie wykazano charakteru mieszańcowego. Zastosowanie markerów cytoplazmatycznych wykazało obecność cytoplazmy normalnej (N) lub sterylizującej Ogura u badanych regenerantów.

Uzyskano kolejne pokolenia F3 i BC1S1 — po skrzyżowaniu obiektu wrażliwego i odpornego na kiłę kapusty. Otrzymane z tych nasion rośliny można poddać testowi odpornościowemu oraz genotypowaniu na skalę genomową, co pozwoli uzyskać informację o lokalizacji genetycznych determinant odporności na kiłę kapusty. Otrzymane pokolenia można także wykorzystać do uzyskania linii wsobnych (RIL/IBC) z utrwaloną zmiennością w zakresie odporności na kiłę. Linie tego typu pozwolą na wielokrotną (w powtórzeniach) i wieloaspektową analizę badanej cechy.

ZADANIE 3. OTRZYMYWANIE I CHARAKTERYSTYKA PODWOJONYCH HAPLOIDÓW
KAPUSTY PEKIŃSKIEJ (*BRASSICA RAPA* L. SUBSP. *PEKINENSIS*)

Badania nad roślinami DH, a następnie liniami DHR1 oraz DHR2 otrzymanymi w wyniku indukcji androgenyzy u kapusty pekińskiej wykazały, że indukcja androgenyzy w 2016 roku zakończyła się otrzymaniem 58 roślin, które pochodziły z androgenicznych zarodków Enduro F1 i Janin F1. Androgeniczna populacja składała się z roślin o różnej ploidalności: 59% roślin było diploidami a 41% tetraploidami. Kwiatostany roślin DH były rozwinięte prawidłowo a żywotność pyłku wahała się od 55 do 97%. Wykonano zapylenia wsobne, aby otrzymać nasiona DHR1. 33% zapylnych roślin DH zawiązało nasiona. W grupie roślin bez nasion przeważały formy o ploidalności 4 \times , pomimo wysokiej żywotności pyłku. Zebrano ponad 1700 nasion DHR1. Ocena biometryczna roślin 14 linii DHR1 wykazała wyrównanie cech wewnątrz liniowe. U większości obiektów główki były kształtu cylindrycznego, średnio zwarte, półotwarte, średnia masa główki wahała się od 0,7 do 1,2 kg, z przewagą główek o masie 0,9 kg. Analiza markerem SSR (starter ACMP 790) wykazała homozygotyczność wszystkich badanych roślin pokoleń DHR1.

Z androgenyzy w 2015, w 2018 wysiano nasiona 13 wyselekcjonowanych linii DHR1 w celu otrzymania pokolenia DHR2. Zakwitło 117 roślin DHR1. Żywotność pyłku była wysoka (średnia 90%). Wykonano zapylenia wsobne i zebrano ponad 6 tys. nasion DHR2.

Z androgenyzy w 2014, w 2018 oceniono 14 linii DHR2 pochodzących z mikrospor YU i Kilakin F1. Analiza biometryczna cech morfologicznych i zdrowotności wykazała bardzo wysokie wyrównanie wewnątrz badanych linii DHR2 i była zgodna z oceną ich wyjściowego pokolenia DHR1. Natomiast analiza molekularna linii DHR2 za pomocą markera SSR (starter ACMP 790) wykazała, że w przypadku 13 z 14 przebadanych linii DHR2 profil markerowy pokrywał się z profilem rośliny DH, z której pochodziły i rośliny tych linii były homozygotami. Jedynie wśród roślin jednej linii obserwowano obraz świadczący o braku wyrównania genetycznego. Otrzymane wyniki wskazują, że w przypadku kapusty pekińskiej haploidyzyacja pozwala na znacznie skrócenie czasu (do ok. 3 lat) potrzebnego do otrzymania homozygotycznych linii, które mogą być włączone do programów hodowlanych.

PIOTR KAMIŃSKI

MAŁGORZATA PODWYSZYŃSKA

AGNIESZKA MARASEK-CIOŁAKOWSKA

MICHAŁ STARZYCKI

ELŻBIETA STARZYCKA-KORBAS

Instytut Ogrodnictwa, ul Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, Polska

Kierownik Tematu: dr Piotr Kamiński Instytut Ogrodnictwa, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,

Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Warzywnych, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,

tel. 46 8334193, tel. bezpośr. 46 8346652, e-mail: piotr.kaminski@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 67.

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

Słowa kluczowe: *Brassica* sp., krzyżowania oddalone, embryo-rescue, FCM, FISH, cechy morfologiczne

CEL BADAŃ

Celem podjętego tematu jest 1) wygenerowanie nowej zmienności genetycznej w wyniku prowadzenia krzyżowań pomiędzy uprawnymi formami z rodzaju *Brassica oleracea* oraz *Brassica rapa* a genotypami oddalonymi i dzikimi w obrębie gatunków z rodzaju *Brassica*, 2) analiza nowo wytworzonych form mieszańcowych z uwzględnieniem cech anatomicznych, cytogenetycznych i morfologicznych oraz ich rozmnożenie generatywne 3) ocena przydatności kolejnych pokoleń generatywnych form hybrydowych jako źródła cennych gospodarczo cech jakościowych oraz odporności na stropy biotyczne i abiotyczne dla hodowli warzyw kapustowatych.

Celem badań prowadzonych w roku 2018 było wytworzenie nowych form mieszańcowych pokolenia BC₁ oraz BC₂ pomiędzy uprawnymi gatunkami oraz genotypami oddalonymi i dzikimi z rodzaju *Brassica oleracea*, *Brassica napus* i *Brassica rapa* w wyniku zastosowania technik *in vitro* izolowanych zarodków oraz krzyżowań

klasycznych, ocena nowo wytworzonych mieszańców pod względem cech anatomicznych, morfologicznych, cytologicznych cytogenetycznych oraz pod względem zdolności do rozmnażania generatywnego, a także ocena przydatności nowych form użytkowych jako źródła cennych gospodarczo cech jakościowych oraz odporności.

WYNIKI

Dla dwunastu mieszańców międzygatunkowych *B. oleracea* × *B. napus* pokolenia R₁ wykonano 25 krzyżowań wstecznych na około 1041 kwiatach i pąkach kwiatowych, następnie dokonano izolacji 8 prawidłowo wykształconych zarodków mieszańcowych oraz przeprowadzono klonowanie *in vitro* oraz *in vivo* (w kulturach hydroponicznych) roślin pokolenia BC₂ oraz BC₁ × F₁ mieszańców międzygatunkowych otrzymując 35 roślin. Zastosowana technika adaptacji w kulturach hydroponicznych pozwoliła na regenerację i otrzymanie zdrowych, ukorzenionych form mieszańcowych charakteryzujących się dobrą zdrowotnością, wigorem oraz brakiem anomalii rozwojowych. Krzyżowania wsteczne metodami hodowli tradycyjnej prowadzono dla dwunastu genotypów (*B. napus* × *B. oleracea*) pokolenia BC₂ otrzymanych techniką izolowanych zarodków, czterech męskosterylnych linii wsobnych kapusty głowiastej białej (*B. oleracea* var. *capitata*), oraz pięciu alloplazmatycznych mieszańców pokolenia F₁.

Dla 70. krzyżowań i zapyleń wsobnych mieszańców (*B. napus* × *B. oleracea*) wykonanych na 1565 kwiatach i pąkach kwiatowych uzyskano łącznie 1157 nasion. Dla 28 zapyleń uzyskano od 1 do 142 nasion. Dla 42 krzyżowań i zapyleń wsobnych nasion nie otrzymano, co może świadczyć o występowaniu silnych barier niezgodności krzyżowej pomiędzy tymi gatunkami.

Nowo wytworzone mieszańce międzygatunkowe *B. oleracea* × *B. napus* zostały ocenione pod względem cech anatomicznych, morfologicznych i cytogenetycznych. Zgodnie z harmonogramem, dokonano oceny zawartości jądrowego DNA (wielkość genomu) mieszańców *B. oleracea* × *B. napus* metodą cytometrii przepływowej (30 genotypów). Przeprowadzono także cytogenetyczną identyfikację mieszańców *Brassica oleracea* × *Brassica napus* oraz form rodzicielskich (24 genotypy) oraz analizę pokolenia F₂, F₃, BC₁ i BC₂ form mieszańcowych *Brassica oleracea* × *Brassica napus* w warunkach szklarniowych w fazie wegetatywnej i generatywnej (17 genotypów). Dla oceny cech morfologicznych, wartości użytkowej oraz poziomu odporności międzygatunkowych mieszańców z rodzaju *Brassica* w warunkach uprawy polowej przeznaczono 20 eksperymentalnych mieszańców międzygatunkowych otrzymanych w roku 2017 w wyniku otwartego zapylenia (OP) pomiędzy oddalonymi gatunkami z rodzaju *Brassica*. Oceniana populacja mieszańców była pokoleniem silnie segregującym i odznaczała się dużą zmiennością badanych cech.

WNIOSKI

1. Technika izolowanych zarodków pozwoliła na otrzymanie nowych 35 roślin mieszańcowych pokolenia BC₁ (*B. napus* × *B. oleracea*) × *B. oleracea*.

2. Potwierdzono występowanie wysokiej śmiertelności zarodków pokolenia BC₁ (*B. napus* × *B. oleracea*) × *B. oleracea*, która była spowodowana zanikiem chlorofilu w trakcie regeneracji.
3. Przeprowadzenie adaptacji w kulturach hydroponicznych pozwoliło na regenerację roślin mieszańców międzygatunkowych i przygotowanie ich do jarowizacji w warunkach szklarniowych.
4. W wyniku swobodnego zapylenia otrzymano prawidłowo wykształcone nasiona mieszańców pokolenia F₁, F₂ oraz pojedyncze nasiona międzygatunkowych mieszańców pokolenia BC₁ oraz BC₁ × F₁ *B. napus* × *B. oleracea*
5. Mieszańce międzygatunkowe *B. oleracea* × *B. napus* pokolenia F₁, F₂, BC₁, BC₁ × (F₁ × F₂) wykazywały duże zróżnicowanie pod względem wielkości genomu jądrowego.
6. Zastosowanie fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* z sondami rDNA pozwoliło na identyfikację chromosomów markerowych w formach rodzicielskich oraz w analizowanych formach mieszańcowych.
7. Różnice w liczbie i wzorze *loci* rDNA w analizowanych mieszańcach wskazują na liczne reorganizacje zachodzące w genomach poliploidalnych (wynikające z nie równomiernego crossing-over oraz rearanzacji chromosomowych).
8. Mieszańce międzygatunkowe *B. napus* × *B. oleracea* pokolenia BC₁, BC₁ × F₁/F₂ i F₁ × F₂ charakteryzowały się wyraźnym zróżnicowaniem cech anatomiczno-morfologicznych zarówno w fazie wegetatywnej jak i generatywnej. Trzy mieszańce pokolenia BC₁ × F₁/F₂ wytwarzały kwiaty męskopłodne.
9. Oceniana populacja była silnie zróżnicowana zarówno pod względem cech anatomiczno-morfologicznych, użytkowych, zdrowotności i wyrównania. W wyniku prowadzonych badań otrzymano bogatą kolekcję genotypów, która może zostać wykorzystana do tworzenia nowych form użytkowych.

LITERATURA

- Dickson G. R. 2006. Vegetable *Brassic*as and related crucifers. In: Crop Production Science in Horticulture 14. CAB International ed. Dickson M.H. & Kyle M. 1987.
- Harsh G., Banga S., Bansal P., Chnaya A., Banga S. 2007. Hybridizing *Brassica rapa* with wild crucifers *Diplotaxis eruroides* and *Brassica maurorum*. Euphytica 156: 417 — 424. DOI: 10.1007/st10681-007-9391-9.
- Hasterok R., Wolny E., Hosiawa M., Kowalczyk M., Kulak-Książczyk S., Kaneko Y., Bang S. W., Matuzawa Y. 2009. Distant Hybridization. in: Biology and breeding of crucifers. Gupta ed. CRC Press: 207 — 247.
- Kaneko Y., Bang S. W., Matsuzawa Y. 2009. Distant hybridization. In: Gupta SK (ed.) Biology and breeding of crucifers. CRC Press, Boca Raton, London, New York: 207 — 247.
- Książczyk T., Heneen W.K., Maluszynska J. 2006. Comparative Analysis of rDNA distribution in chromosomes of various species of Brassicaceae. Annals of Botany 97: 205 — 216.
- Xiong Z., Pires J. C. 2011. Karyotype and identification of all homoeologous chromosomes of allopolyploid *Brassica napus* and its diploid progenitors. Genetics 187: 37 — 49.

WOJCIECH ŚWIECICKI
MAGDALENA GAWŁOWSKA
ANDRZEJ GÓRNY
DOMINIKA RATAJCZAK
ALICJA NIEWIADOMSKA
LECH BOROS

Instytut Genetyki Roślin PAN

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Wojciech Świecicki Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34,
60-479 Poznań tel. (+48 61) 65 50263, 65 50255 fax: (+48 61) 6550301, e-mail: wswi@igr.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.802.18.2018, Zadanie 40.

Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stresy abiotyczne

**Identification of the regions in the pea genome, responsible for selected parameters
of physiological efficiency, as an important element of resistance to the abiotic
stresses**

Słowa kluczowe: efektywność wykorzystania azotu i fosforu u grochu, markery molekularne, QTL,
współczynnik tolerancji na stres

Uzyskany postęp hodowlany w minionych kilkudziesięciu latach był przede wszystkim konsekwencją poprawiania indeksu żniwnego. Dalsze rezerwy w zwiększaniu produktywności roślin tkwią w odporności na stresy abiotyczne i biotyczne. Dlatego szczególne znaczenie mają badania nad efektywnością procesów fizjologicznych roślin. Groch wykorzystuje azot atmosferyczny poprzez jego biologiczne wiązanie. Proces zachodzi z wykorzystaniem energii zgromadzonej podczas fotosyntezy. W warunkach optymalnych proces ten zabezpiecza zapotrzebowanie rośliny na azot. Jednak w warunkach stresu, wpływającego na fotosyntezę (susza, niedobór fosforu) zaopatrzenie w azot okazuje się niewystarczające (Fischinger i Schulze, 2010). Przypuszcza się, że lokalizacja

w genomie rejonów efektywności wykorzystania azotu i fosforu u grochu pozwoli na określenie wzajemnych relacji ze sprawnością fotosyntezy i wylegania roślin. Poprawa architektury i stabilności łanu grochu, ilościowe i jakościowe ulepszanie plonu, zwiększenie efektywności procesu wykorzystania azotu oraz odporność na stresy biotyczne i abiotyczne należą do kluczowych kierunków badań z zakresu postępu biologicznego.

W 2018 doświadczenie szklarniowe i polowe dotyczyło dwóch różnych populacji: szklarnia [Carneval×MP1401, *afila*×*afila*], doświadczenie polowe [Wt10245×Wt11238, *acacia*×forma tradycyjna]. Plon z doświadczenia szklarniowego był zbliżony w warunkach optymalnych i w warunkach stresowych do plonu z 2017 r., dla tej samej populacji mapującej. Linia MP1401 wytwarzała wyższy plon niż linia Carneval (warunki szklarniowe, warunki stresowe). Charakteryzowała się lepszymi lub podobnymi do drugiej linii parametrami wykorzystania azotu, natomiast gorszymi parametrami wiązania azotu. W badanych liniach potomnych, w warunkach kontrolowanych, w stresie azotowym malał parametr wykorzystania azotu — azotowy indeks plonu NHI. Wartość efektywności wykorzystania azotu w formowaniu masy generatywnej (NER_{gen}) również malała. Parametry wiązania azotu wzrastały w niedoborze azotu. Stresowe warunki polowe redukowały plon w populacji [Wt10245×Wt11238] o ok. 24% w Przebędowie i o 17% w Wiatrowie na stanowisku słabym. Indeks plonu pozostawał na zbliżonym poziomie. Stwierdzone wartości, efektywności wykorzystania azotu w formowaniu ziarna (NER_{gen}) i aktywności nitrogenazy w populacji [Wt10245×Wt11238] były niższe, niż stwierdzone w tej samej populacji w roku poprzednim. Wartość azotowego indeksu plonu (NHI) była wyższa niż w roku 2017.

W warunkach kontrolowanych zaobserwowano istotną, pozytywną korelację ($p < 0,05$) pomiędzy plonem z rośliny, a azotowym indeksem plonowania i efektywnością wykorzystania azotu w formowaniu masy nasion. W warunkach niedoboru azotu korelacje pomiędzy plonem, a parametrami gospodarki azotowej malały. W warunkach polowych stwierdzono istotne korelacje ($p < 0,01$) pomiędzy plonem z rośliny, a efektywnością wykorzystania azotu w kształtowaniu nasion (NER_{gen}) (Wiatrowo optym. 0,72, Wiatrowo niskie 0,67, Przebędowo stresowe 0,62). Istotna była również negatywna korelacja pomiędzy plonem z rośliny, a efektywnością wykorzystania azotu w formowaniu masy wegetatywnej (NER_{veg}) (Wiatrowo optym. -0,65, Wiatrowo niskie -0,62, Przebędowo stresowe -0,44). Parametry gospodarki azotowej u grochu znacząco wpływały na wysokość plonu. Im bardziej stresogenne środowisko, tym niższy był udział parametrów fizjologicznych w kształtowaniu plonu w badanym w tym roku zestawie linii. W warunkach polowych widoczny był wzrost aktywności nitrogenazy w porównaniu z warunkami szklarniowymi (810 wobec 70 nMC_2H_4 /roślinę/godzinę w warunkach optymalnych; 271 wobec 99,4 nMC_2H_4 /roślinę/godzinę w warunkach stresowych). Należy pamiętać, że w warunkach szklarniowych i polowych testowano 2 różne populacje mapujące. Linia rodzicielska Wt10245 wykazała mniejszą wartość współczynnika tolerancji w porównaniu do linii Wt11238 dla obydwu polowych lokalizacji stresowych w odniesieniu do lokalizacji optymalnej. Doświadczenie szklarniowe pozwoliło na wyznaczenie współczynnika tolerancji na niedobór azotu

(warunki kontrolowane). Linia Carneval wykazała wyższą tolerancję na niedobór azotu niż linia MP1401. Natomiast współczynniki tolerancji wyznaczone z doświadczeń polowych wskazywały na tolerancję nie tylko na niedobór azotu, ale również na nadmiar fosforu, potasu, wapnia, niedobór Fe, Zn, Mn. Przebędowo uznano za lokalizację stresową ze względu na niedobór zawartości azotu, duży nadmiar wapnia, niedobór Fe, Mn, wysokie pH.

Efektywność wykorzystania azotu i fosforu u grochu to parametry silnie skorelowane ze wzrostem i produktywnością roślin. Jednym ze sposobów zwiększania wykorzystania fosforu jest minimalizowanie akumulacji P w glebie w formach związków organicznych i mineralnych. Z tej przyczyny dla praktyki rolniczej niezbędne jest rozpoznanie możliwości stopnia wykorzystania fosforu przez roślinę, który w przeszłości uległ nagromadzeniu. Poprzez właściwy dobór gatunków roślin możliwe jest utrzymanie żyzności gleby i ograniczenie strat składnika. Główna idea uprawy roślin nastawiona jest na zwiększenie udziału roślin motylkowatych w procesie efektywniejszego wykorzystania fosforu (Gaj, 2013). Linia rodzicielska Wt10245 miała wyższą niż Wt11238 wartość fizjologicznej efektywności wykorzystania azotu NERg, ale niższą fosforu PERg. Efektywność wykorzystania fosforu PERg była niższa o 18% niż w 2016 (157 w 2016 mg/mg, 128 mg/mg w 2017).

Średnia zawartość lignin, dla badanej grupy 20 linii grochu, była niższa od notowanej w 2017 roku o 1,9%. Linia Carneval była linią mniej wylegającą niż MP1401 w III terminie. Analiza korelacji pomiędzy procentową zawartością lignin w łodydze, a wyleganiem i wysokością roślin wykazała negatywną istotną korelację ($p < 0,01$) pomiędzy zawartością lignin w łodydze, a wyleganiem w I terminie oraz z wysokością roślin, a także pozytywną w III terminie. Łączy się to z wcześniejszymi wynikami uzyskanymi w ramach Postępu Biologicznego. Stwierdzono wówczas ujemną korelację wylegania w 1 i 2 terminie z wysokością rośliny.

Prace nad uzupełnieniem mapy genetycznej zmierzały do nałożenia QTL gospodarki azotowej grochu. Wykryto 18 QTL dla cech związanych z gospodarką azotową w warunkach kontrolowanych oraz 23 QTL w populacji [Wt10245×Wt11238]. Ciekawym rejonem wydaje się być rejon w VB grupie sprzężeń w pobliżu markera *GAPA* w pop. [Carneval×MP1401] i markerów *cp*, *te* w populacji [Wt10245×Wt11238] warunkującej NERg efektywność wykorzystania azotu w formowaniu masy nasion, w pop. [Carneval×MP1401] i NAC ilość pobranego azotu/ wazon oraz NERv efektywność wykorzystania azotu w formowaniu masy vegetatywnej w populacji [Wt10245×Wt11238].

LITERATURA

- Fischinger S. A., Schulze J. 2010. The importance of nodule CO₂ fixation for the efficiency of symbiotic nitrogen fixation in pea at vegetative growth and during pod formation. *J. Exp. Bot.* 61 (9): 2281 — 2291.
- Gaj R. (red.) 2013. Efektywne wykorzystanie składników mineralnych z nawozów we współczesnym rolnictwie. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie, Oddział w Poznaniu, Poznań.

JERZY NAWRACAŁA**DANUTA KURASIAK-POPOWSKA****AGNIESZKA KACZMAREK**

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Kierownik Tematu: dr hab. Jerzy Nawracała Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań, tel. 61 8487720, e-mail: jnawrac@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 43.

Analiza bioróżnorodności zasobów genowych soi przydatnej do hodowli w warunkach klimatycznych Polski i opracowanie metodyki krzyżowania międzygatunkowego *Glycine max* × *Glycine soja*

Analysis of biodiversity of soybean gene resources useful for breeding in climatic conditions of Poland and development of interspecific *Glycine max* × *Glycine soja* crossing methodology

Słowa kluczowe: banki genów, *Glycine max*, *Glycine soja*, kolekcje, krzyżowanie międzygatunkowe, materiały wyjściowe

CEL BADAŃ

Brak odpowiednich materiałów wyjściowych, dostosowanych do warunków klimatycznych Polski w dużym stopniu ogranicza możliwości hodowli nowych odmian. Szczególnie istotne jest znalezienie genotypów soi tolerancyjnych na zmianę długości dnia oraz zawiązujących strąki w temperaturach niższych niż optimum biologiczne. Wykorzystanie genotypów dzikiego gatunku *Glycine soja*, pochodzących z rejonów naszej szerokości geograficznej może dać szansę na wyselekcjonowanie genotypów dobrze zaadaptowanych do naszego klimatu. Dlatego też głównym celem projektu jest gromadzenie i stała analiza światowych zasobów genowych soi pod kątem ich przydatności do warunków klimatycznych Polski, ocena przydatności dzikiego gatunku *Glycine soja* jako materiału wyjściowego do hodowli, opracowanie efektywnych metod krzyżowania soi i otrzymanie mieszańców międzygatunkowych pomiędzy *Glycine max* i *Glycine soja*.

W ramach zdania nr 43 w 2018 r. realizowano dwa tematy badawcze. Celem pierwszego była charakterystyka cech fenologicznych, morfologicznych oraz cech komponentów plonu genotypów soi zgromadzonych w latach 2016, 2017 i 2018 oraz ocena potencjału plonowania najlepszych genotypów soi *G. max* z genotypów zgromadzonych w 2014 i 2015 roku. Celem drugiego tematu było przeprowadzenie obserwacji kwitnienia w warunkach polowych i szklarniowych genotypów *G. soja* oraz ocena zmienności roślin pokolenia F₃ otrzymanych z roślin pokolenia F₂ mieszańców międzygatunkowych *G. max* × *G. soja*

METODYKA I WYNIKI

W ramach realizacji pierwszego tematu założono pięć doświadczeń polowych, w których materiałem do badań było łącznie 289 genotypów soi zgromadzonych w KG i HR w latach 2014–2018, a otrzymanych z banków genów i kolekcji z USA (Soybean Germplasm Collection), Kanady (Gene Resources of Canada), Japonii (Japanese Soybean Core Collection), Rosji (Leguminous Crops Genetic Resources Department z N.I. Vavilov RIPI) oraz z zasobów różnych państw europejskich. Do doświadczeń włączono, jako genotypy kontrolne odmiany: Augusta, Mavka, Aligator, Petrina i Merlin.

Doświadczenia zostały założone w RGD Dłóż i w Szelejewie — Danko HR Sp. z o.o. (1 doświadczenie). Powierzchnia poletka 2 m², a w doświadczeniach z oceną potencjału plonowania 9 m² (układ bloki losowane w trzech powtórzeniach). We wszystkich doświadczeniach przeprowadzono obserwacje faz fenologicznych oraz opracowano biometryczne cechy morfologiczne i komponentów plonu (5 lub 10 typowych roślin). W doświadczeniach z oceną potencjału plonowania zważono również masę nasion z poletka i przeliczono na plon z 1 ha.

W trzech pierwszych doświadczeniach oceniono 269 genotypów, które różniły się znacznie pod względem przebiegu kwitnienia, długości okresu wegetacji oraz analizowanych cech komponentów plonu. Na podstawie oceny genotypów w doświadczeniu pierwszym stwierdzono, w obu lokalizacjach, bardzo zbliżone wyniki dotyczące wysokości roślin, wysokości osadzenia pierwszego strąka, czy liczby nasion w strąku. W doświadczeniu w Szelejewie analizowane genotypy posiadały zdecydowanie więcej pędów bocznych, a tym samym większą liczbę nasion z rośliny w porównaniu do RGD Dłóż. Średnio w obu lokalizacjach zanotowano zbliżoną średnią MTN oraz bardzo duży zakres zmienności tej cechy. W doświadczeniu drugim genotypy otrzymane z kolekcji z Japonii, jako genotypy o bardzo krótkim okresie wegetacji, w warunkach RGD Dłóż charakteryzowały się bardzo zróżnicowanym okresem wegetacji (od połowy sierpnia do połowy października). Stosunkowo duża liczba analizowanych genotypów odznaczało się dużą MTN, ale przy małej liczbie nasion i małej masie nasion z rośliny. W doświadczeniu trzecim (100 nowych genotypów) obserwowano dużą liczbę interesujących genotypów: o bardzo wysokim osadzeniu pierwszego strąka, o dużej liczbie pędów bocznych i liczbie strąków z rośliny.

Oceniane pod względem plonu w doświadczeniu czwartym genotypy soi plonowały niżej niż odmiana kontrolna Aligator (32,96 dt/ha). Na uwagę zasługuje genotyp K 9922,

który plonował zaledwie o 1,48 dt/ha mniej niż odmiana kontrolna. Zdecydowana większość genotypów analizowanych w doświadczeniu piątym charakteryzowała się średnim potencjałem plonowania. Plon genotypu D 80 wyniósł 30,74 dt/ha (plon odmiany Aligator w tym doświadczeniu wynosił 34,81 dt/ha). Wyniki doświadczeń 4 i 5 potwierdzają fakt, że wśród sprowadzonych w latach 2015–2016 genotypów kolekcyjnych nie ma takich o wyższym plonie od zarejestrowanych odmian kontrolnych.

W temacie badawczym drugim przeprowadzono obserwacji kwitnienia 5 genotypów *G. soja* otrzymanych z kolekcji: Soybean Germplasm Collection (USA): PI 522184, PI 538411A, PI 538411B, PI 507825 i PI 464870. Z gatunku *G. max* wysiane, jako odmiany kontrolne odmiany soi wczesne i późne: Augusta, Merlin, Mavka, Aligator i Petrina. Nasiona zostały wysiane w warunkach polowych w Ogrodzie Doświadczalnym KGiHR w Poznaniu w 3 terminach: 18.04, 08.05, i 04.06.2018 r. a w szklarni w terminach: 25.04., 11.05. i 22.05.2018. Odmiany kontrolne w szklarni Augusta i Aldana. Obserwacje roślin w dotyczyły faz fenologicznych: terminu kwitnienia, długości okresu kwitnienia i długości okresu wegetacji.

Ocena zmienności roślin pokolenia F_3 otrzymanych z roślin pokolenia F_2 mieszańców międzygatunkowych *G. max* × *G. soja*. przeprowadzono w RGD Dłóż. Wysiano 99 potomstw roślin zebranych w 2017 r. z 2 kombinacji krzyżowania Mavka × PI507825, Annushka × PI507825, W rozstawie 50 cm wysiano od 1 do 20 rzędów każdego potomstwa o długości 3 m. Pomiedzy potomstwami wysiano odmiany mateczne Mavka i Annushka oraz odmiany wzorcowe Augusta i Aligator. Obserwacje dotyczyły cech fenologicznych kwitnienia oraz zebrano wybrane dojrzałe rośliny i opracowano cechy komponentów plonu.

Przebieg kwitnienia soi w 2018 r. różnił się znacznie od przebiegu kwitnienia w poprzednich latach. Przyjęte 3 terminu siewu w wydłużonych odstępach czasu: kwiecień, maj i czerwiec nie zapewniły podaży kwiatów do krzyżowania pomiędzy genotypami *G. max* i *G. soja*. Spowodowane to było głównie wysokimi temperaturami w całym okresie wegetacji soi i w konsekwencji znacznym skróceniem długości okresu kwitnienia szczególnie genotypów *G. max*. Wysokie temperatury spowodowały również, że trudno było znaleźć kwiaty *G. soja* odpowiednie do przeprowadzenia zapylenia.

W potomstwach rośliny mieszańcowych pokolenia F_3 otrzymanych w wyniku krzyżowania międzygatunkowego *G. max* × *G. soja* obserwowano silną segregację pod względem wszystkich obserwowanych cech. Zdecydowana większość roślin charakteryzowała się cechami dzikiego rodzica *G. soja*: niezdeterminowanym typem i bardzo długim okresem wegetacji i z tego powodu nie została zebrana. Wśród roślin z obydwu kombinacji krzyżowania wybrano jednak segreganty korzystne z punktu widzenia celów hodowli soi w Polsce: rośliny wysokie, wysoko zawiązujące I strąk, rośliny zawiązujące dużą liczbę strąków i nasion z rośliny, rośliny, z których zebrano dużą masę i rośliny o dużej MTN. Duża liczba tych roślin, szczególnie z potomstw z kombinacji krzyżowania Mavka × PI507825, może stanowić cenny materiał wyjściowy do dalszej hodowli.

JERZY NAWRACAŁA
MICHAŁ KSIĄŻKIEWICZ
DANUTA KURASIAK-POPOWSKA
JANETTA NIEMANN
SANDRA RYCHEL
AGNIESZKA TOMKOWIAK
DOROTA WEIGT
BOGDAN WOLKO

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Kierownik Tematu: dr hab. Jerzy Nawracała Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań, tel. 61 8487720, e-mail: jnawrac@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 105.

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 development of methodology of obtaining homozygous soybean plant**

Słowa kluczowe: fotoneutralność, geny wczesności, homozygotyczność, metoda pojedynczych nasion, soja

WSTĘP

Niedostosowanie większości genotypów soi do szerokości geograficznej Polski wynika z faktu, że soja jest gatunkiem dnia krótkiego. Dlatego też, genotypy soi przeniesione w warunki dnia długiego wydłużają okres wegetacji i nie dojrzewają lub dojrzewają zbyt późno w warunkach Polski. Długość okresu wegetacji zależy od wielu genów (*E1-E10*) i QTL kontrolujących czas kwitnienia i dojrzewania u soi, wpływających jednocześnie na reakcję fotoperiodyczną roślin. Drugą istotną cechą jest typ kończenia wzrostu pędu, rzutujący również na długość okresu kwitnienia roślin. W warunkach Polski do uprawy korzystny jest semizdeterminowany typ wzrostu warunkowany przez dominujący allel genu *Dt2*. Znajomość układu alleli genów wczesności i determinacji pędu w materiałach wyjściowych pozwoli na lepsze dobranie

genotypów do programów hodowli w warunkach Polski. W związku ze wzrostem zainteresowania uprawą soi w Polsce bardzo ważne jest szybkie wyhodowanie nowych odmian. Jedną z szans na przyspieszenie hodowli jest zastosowanie metody pojedynczych nasion (SSD — single seed descend).

CELE ZADANIA

W ramach zadania 105 w 2018 r. realizowano trzy cele: 1) uzyskanie metodyki genotypowania soi markerami molekularnymi gwarantującej powtarzalność i odtwarzalność pomiarów w zakresie wariantów allelicznych pięciu genów wczesności kwitnienia i dwóch genów zdeterminowania wzrostu u soi przy użyciu linii referencyjnych oraz wybranych materiałów kolekcyjnych o różnym fenotypie, 2) przeprowadzenie obserwacji fenotypowych (terminu kwitnienia i dojrzewania) 150 genotypów referencyjnych i kolekcyjnych soi w warunkach polowych oraz 3) przeprowadzenie doświadczenia szklarniowego w celu otrzymania 2 pokoleń soi w jednym roku.

W pierwszym temacie badawczym materiałem do badań było 20 genotypów soi wybranych z materiałów kolekcyjnych KG i HR, w tym genotypów referencyjnych o znanym układzie alleli genów wczesności sprowadzonych z Soybean Germplasm Collection (USA), z kolekcji Japanese Soybean Core Collection (Japonia) i z kolekcji Plant Gene Resources of Canada (Kanada).

WYNIKI

Wstępną optymalizację procedur diagnostycznych przeprowadzono na kilku liniach dla wszystkich opublikowanych markerów (36) w celu rozeznania możliwości wykorzystania ich do genotypowania materiałów hodowlanych (wybrania 20 markerów do analiz). Wykazano, że tradycyjnymi metodami można określić polimorfizm dla 33 markerów. Na podstawie przeprowadzonej optymalizacji wybrano 20 markerów, dla których wykonano analizę genotypów referencyjnych (stosując trzy powtórzenia biologiczne i 2 powtórzenia techniczne w celu weryfikacji powtarzalności uzyskiwanych wyników). Analizy genotypów referencyjnych wykazały, że np. genotyp nr 1 (Fiskeby V) ma następujący układ alleli (genotyp): *dt1-b*, *dt2*, *e2*, *e4-SORE-1*, *E7*, *e9-toyo*, *e10*. Natomiast genotyp nr 13 — odmiana Harosoy należąca do II grupy wczesności (bardzo późna) ma układ alleli: *Dt1*, *Dt2*, *E2-ln*, *E3*, *E4*, *E9* i *e10*. Uzyskano wysoką powtarzalność wyników i wydajność amplifikacji PCR dla wszystkich analizowanych 20 markerów. W przypadku markerów flankujących polimorfizm krótkich powtórzeń sekwencji (SSR) zaobserwowano występowanie kilku alleli (marker nr 7 dla genu *Dt2* i marker nr 27 dla genu *E7*). Wielkość produktu tych alleli jest zgodna z wielkościami podawanymi w danych literaturowych.

WNIOSKI

- Polimorfizm 33 z 36 markerów jest możliwy do odczytania przy użyciu typowych procedur diagnostycznych stosowanych w laboratoriach (PCR, elektroforeza, trawienie restrykcyjne).
- Analizę 26 markerów można przeprowadzić przy użyciu standardowego żelu agarozowego, zaś 7 wymaga agarozy wysokiej rozdzielczości.
- Walidacja 20 markerów w puli 20 linii referencyjnych molekularnych potwierdziła ich przydatność do oceny podłoża molekularnego wczesności kwitnienia i zdeterminowania wzrostu w zróżnicowanym materiale genetycznym pochodzącym z europejskich, azjatyckich i amerykańskich kolekcji soi.

W drugim temacie badawczym materiałem do badań były genotypy referencyjne o znanym układzie alleli genów wczesności badane w temacie 1 oraz linie własne i odmiany wczesne wybrane z kolekcji KGiHR. Razem w doświadczeniu oceniano 150 genotypów soi.

Doświadczenie założono 20.04.2018 na polu doświadczalnym KG i HR w RGD Dłóż. W doświadczeniu jedno-powtórzeniowym wysiewano od 20 do 50 nasion w zależności od liczby nasion otrzymanych z banków genów. Nasiona wysiewano na poletkach o wielkości 2 m² w rozstawie 50 cm. Przeprowadzono obserwacje faz fenologicznych oraz opracowano biometryczne cechy morfologiczne i komponentów plonu.

WNIOSKI

- Oceniane w doświadczeniu 150 genotypów soi różniło się znacznie pod względem przebiegu kwitnienia, długości okresu wegetacji oraz analizowanych cech morfologicznych i komponentów plonu.
- Długość okresu wegetacji genotypów referencyjnych była zróżnicowana (118–178 dni), co świadczy o ich prawidłowym wyborze i umożliwi powiązanie układów allelicznych genów wczesności z ich wpływem na dojrzewanie roślin soi w warunkach klimatycznych Polski.
- Zmienność cech morfologicznych i komponentów plonu genotypów referencyjnych odzwierciedlała zmienność badanych cech w całym doświadczeniu, a średnie wartości cech genotypów referencyjnych były takie same jak średnie wartości cech całego doświadczenia.

Trzeci temat badawczy dotyczący otrzymania 2 pokoleń soi w jednym roku metodą pojedynczych nasion był realizowany w szklarni KG i HR oraz szklarni w Szelejewie (Danko Hodowla Roślin Sp. z o. o.). Materiałem do doświadczenia były 2 pokolenia mieszańcowe soi (F₃ i F₄) z 2 kombinacji krzyżowania międzyodmianowego (Szelejewo) i 2 kombinacji krzyżowania międzygatunkowego *G. max* x *G. soja* (KG i HR). Założono łącznie 4 doświadczenia w 2 (Szelejewo) i 3 (KG i HR) powtórzeniach. W doświad-

czeniu badano wpływ obsady roślin na 1 m² na zawiązanie strąków i nasion. Zastosowano obsady: 156, 363 i 630 roślin/m².

WYNIKI

Doświadczenie w terminie wiosennym, z pokoleniem F₃, założono w KG i HR i w Szelejewie w podobnym czasie 5 i 11 kwietnia. W Szelejewie rośliny zebrano 11 lipca, tj. po 98 dniach od siewu, natomiast w KG i HR dojrzewanie roślin było w obrębie palet bardzo zróżnicowane. W konsekwencji tego zbierano z roślin dojrzałe strąki od 11 do 18 lipca, tj. po 91–98 dniach od siewu. Zebrane z roślin pokolenia F₃ nasiona wysiano w KG i HR 3 sierpnia, a w Szelejewie 22 sierpnia. Pomimo wcześniejszego o 19 dni siewu, rośliny soi w szklarni KG i HR, pochodzące z krzyżowania międzygatunkowego, zbierano w okresie 4–20 grudnia, podczas gdy w Szelejewie rośliny zebrano 19 listopada, tj. po 89 dniach od siewu.

WNIOSKI

- Średnia liczba strąków i nasion z rośliny była najwyższa przy najmniejszej obsadzie roślin i malała wraz ze wzrostem obsady. Największa obsada roślin 630/m² zapewniała otrzymanie z rośliny średnio 3,15–5,6 nasion, co jest wystarczającą liczbą nasion dla metody pojedynczych nasion.
- W warunkach szklarniowych zarówno w KG i HR, jak i w Szelejewie można otrzymać dwa pokolenia soi w jednym roku.

RENATA GALEK¹**BARTOSZ KOZAK**¹**DARIUSZ ZALEWSKI**¹**EWA SAWICKA-SIENKIEWICZ**¹**ADELA ADAMUS**²**AGNIESZKA KIELKOWSKA**²¹ Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa² Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i NasiennictwaKierownik Tematu: dr hab. Renata Galek prof. nadzw. Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Zakład Genetyki i Biotechnologii Roślin, pl. Grunwaldzki 24a, 50-363 Wrocław, tel. 713201815 lub 713201826, e-mail: renata.galek@upwr.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.802.14.2018, Zadanie 108.

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

Słowa kluczowe: androgeneza, gynogeneza, haploidy, identyfikacja haploidów, krzyżowanie oddalone, łubin wąskolistny

WSTĘP

Łubin wąskolistny obok łubinu żółtego jest podstawowym gatunkiem uprawnym z rodzaju *Lupinus*. Do wzrostu jego znaczenia w ostatnich latach przyczyniło się obniżenie poziomu alkaloidów w nasionach i wyselekcjonowanie form o polowej odporności na antraknozę. Jest on głównie uprawiany, jako roślina rotacyjna ze zbożami, oraz pastewna wykorzystywana w żywieniu zwierząt. Przełomem w badaniach genetycznych u łubinu wąskolistnego było wyprowadzenie przez badaczy australijskich rekombinowanych linii wsobnych RILs, co umożliwiło opracowanie pierwszej mapy genetycznej. Kolejnym krokiem w badaniach genetycznych było zsekwencjonowanie genomu odmiany Tanjil, której genom został przyjęty jako referencyjny dla tego gatunku. Istotnym również etapem było wyprowadzenie w latach 2002–2010 linii RILs techniką

SDS, w oparciu o rodzime tło genetyczne (Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa Wrocław) i skonstruowanie mapy genetycznej (Kozak, 2014).

Na tle osiągnięć u innych gatunków próby uzyskania haploidów i dihaploidów u *Fabaceae* są ciągle na etapie wstępnych badań. Z kilkuset gatunków zaliczanych do tej rodziny, zaledwie u 16 otrzymano zregenerowane pojedyncze rośliny haploidalne na drodze androgenezy wykorzystując kultury pylnikowe lub izolowane mikrospory. Przeprowadzone dotychczas prace skupiały się nad podniesieniem wydajności procesu haploidyzacji. Pierwsze haploidalne tkanki kalusa w androgenicznej kulturze pylników *Pisum sativum* otrzymali Gupta i współpracownicy 1972 roku. Następnie Mokhtaarzaden i Constantin (1978) opisali możliwość zastosowania kultur pylnikowych do wyprowadzenia haploidalnych roślin u *Trifolium alexandrinum*, *Glycine max*. W rodzaju *Lupinus* podejmowane były próby indukcji haploidów również w kulturach pylnikowych oraz izolowanych mikrospor, ale kończyły się tylko otrzymaniem tkanki kalusowej, wielokomórkowych struktur czy prozarodków (Omerod i Caligari, 1994; Skrzypek i in., 2008; Kozak i in., 2012). Opracowanie metod indukcji haploidów i dihaploidów przyczyniłoby się do postępu w badaniach genetyczno-hodowlanych u łubinu wąskolistnego oraz poznania genetycznego podłoża haploidyzacji. Proponowany projekt badawczy stanowi nowość, ponieważ w światowej literaturze brak jest aktualnych informacji na temat poznania procesów gametycznej embriogenezy u tego gatunku.

CEL BADAŃ

Realizacja projektu w pierwszym roku badań — 2018 została podzielona na trzy części, których celami zasadniczymi były:

- analiza wpływu pyłku obcego gatunku oraz indukcji gynogenezy na rozwój komórek woreczka zalążkowego,
- charakterystyka procesu androgenezy u wybranych genotypów *L. angustifolius* oraz przygotowanie bibliotek cDNA,
- opracowanie zestawu markerów SNP do identyfikacji haploidów i linii homozygotycznych oraz 20 sekwencji sond do FISH.

METODY BADAŃ

W pierwszej części projektu do krzyżowania oddalonego wykorzystano 4 genotypy łubinu wąskolistnego ('Emir', 'Karo', 'Graf', LAE1) oraz pyłek dwóch genotypów łubinu andyjskiego (LM 13 oraz LM 34) i pyłek dwóch genotypów łubinu żółtego (500 oraz Prz1.). Słupki na drugi dzień po przepyleniu traktowano 2,4 D (100 mg/l). Z kwiatów usuwano przed zapyleniem oddalonym pylniki (jak osiągnęły 2/3 długości szyjki słupka) a zapylenia dokonywano na drugi i trzeci dzień. Dla prześledzenia zachowania się obcego pyłku zostały pobrane słupki/rozwijające się strąki po 48, 96 i 168 h od momentu zapylenia obcym pyłkiem. Materiał po utrwaleniu został przeznaczony do sporządzenia preparatów z wykorzystaniem błękitu aniliny i mikroskopu z fluorescencją. Prześledzono między innymi zachowania się pyłku na znamionach oznaczając

intensywność osadzania się pyłku w skali od 1 do 3 (1 — pojedyncze ziarna pyłku 2 — kilkanaście ziaren pyłku 3 — znamię prawie całe pokryte ziarnami pyłku), % udział znamion z pyłkiem, % udział znamion i szyjek słupka z przerastającymi łagiewkami, % udział zalążków z łagiewkami. Do dalszych etapów projektu pozostały utrwalone preparaty do przeanalizowania zmian w zalążkach w roku 2019. Wykładano izolowane zalążki, z ww. krzyżowań oddalonych na dwa rodzaje podłoży (P2 i P3), po wcześniejszej ich dezynfekcji. Po 30 dniach kultury określono % udział zalążków regenerujących w tkankę kalusową, określono rodzaj tkanki kalusowej (I, II, III) i udział zalążków z poszczególnymi rodzajami, a także określono wielkość poszczególnych rodzajów tkanki kalusowej. Ponadto dla wybranych 4 genotypów zostały założone kultury *in vitro* zalążków po 2–3 dniach od momentu kastrowania dla zaindukowania procesu gynogenezy. W przypadku uzyskania regenerantów w układach krzyżowania oddalonego i gynogenezy przeprowadzono oznaczenia poziomu ploidalności za pomocą cytometru przepływowego CyFlow® Ploidy Analyser (Sysmex).

Ponadto w pierwszej części projektu dla sprawdzenia rozwoju zarodków zygotycznych w zależności od terminu izolacji były 4 ww. genotypy łubinu wąskolistnego, z których izolowano zarodki w dwóch terminach A — po 14 dniach od samozapylenia oraz B — 28 dniach. Dezynfekcji powierzchniowej poddawano całe strąki, a następnie izolowano zarodki na pożywkę MS, potem B5 z dodatkiem 0,6 g/l węgla aktywnego. Po miesiącu od założenia kultury dokonano oceny rozwoju części podziemnej (obecność lub brak korzenia,) i nadziemnej (rozwój lub brak).

Do drugiej części projektu materiałem roślinnym do badań nad indukcją androgenezy były dwie odmiany *L. angustifolius*: Karo i Graf. W celu ustalenia optymalnego stadium rozwojowego mikrospor z kwiatostanów obydwu obiektów pobrano pąki kwiatowe o różnej długości w celu wytypowania pąków, w których występują mikrospory w fazie jednojądrowej — optymalnej do indukcji androgenezy. W pąkach oceniono stadium rozwoju pyłku poprzez obserwację preparatów rozgniotowych, barwionych DAPI i obserwowanych w mikroskopie fluorescencyjnym Axiovert S 100 wyposażonym w lampę HBO 50 W/AC (Zeiss).

Następnie kwiatostany pobrane z roślin donorowych zawierające mikrospory w odpowiednim stadium podzielono na dwie części. Z jednej części od razu po przyniesieniu do laboratorium pobierano pąki kwiatowe odkażano i prowadzono procedurę izolacji mikrospor. Natomiast drugą część kwiatostanów poddano wstępnemu traktowaniu poprzez chłodzenie przez 1 lub 3 dni w temperaturze 4°C i po tym czasie odkażano i prowadzono izolację mikrospor. Mikrospory w pożywce NLL lub MS umieszczano w termostacie w temperaturze 32°C lub 4°C na 1 lub 3 dni bez dostępu światła. Następnie szalki przenoszono do temperatury 25°C. Po około trzech tygodniach szalki z termostatu przenoszono na wytrząsarkę (ok. 30 rpm), gdzie pozostawały do końca kultury.

W drugiej części tego zadania zaplanowano utworzenie biblioteki cDNA, do w przyszłości analizy ekspresji genów. W pierwszym roku badań całkowite RNA wyizolowane zostało z mikrospor dwóch genotypów łubinu wąskolistnego (Graf i Karo) w początkowych etapach mikrosporogenezy (stadium jednojądrowe) i androgenezy (ziarna pyłku po stresie temperaturowym). Do izolacji wykorzystany został zestaw

Total RNA Mini (AA Biotechnology). Jakość wyizolowanego RNA sprawdzono za pomocą zestawu Qiaxcel RNA QC kit v2.0 (Qiagen) na urządzeniu QIAxcel. Na urządzeniu Qiaxcel zmierzone zostały również takie parametry jak RIS oraz stężenie całkowitego RNA. Wyizolowane RNA przepisano na cDNA w reakcji odwrotnej transkrypcji. Reakcję przeprowadzono za pomocą zestawu TranScriba (AA Biotechnology) zgodnie z instrukcją producenta.

Do trzeciej części badań w pierwszym roku wykorzystano wybrane linie RILs (20 linii) wyprowadzone metodą SDS w KGHRiN. Markery SNP (80) do oceny stopnia homozygotyczności pochodziły z puli markerów opracowanych dla łąbinu wąskolistnego w ramach badań prowadzonych w KGHRiN. Do badań wybrano markery o najwyższej wartości PIC. Dodatkowym istotnym kryterium podczas ich wyboru była lokalizacja na mapie genetycznej „ExL” opracowanej w ramach badań prowadzonych w KGHRiN. Genomowe DNA do genotypowania zostało wyizolowane za pomocą zmodyfikowanej metody CTAB (Clements i in., 2013). *Loci* SNP genotypowano metodą KASP z wykorzystaniem odczynnika KASP MasterMiX KBE V2.0 (LCG Genomic) zawierającego wszystkie niezbędne składniki reakcji. Genotypowanie przeprowadzono na urządzeniu Illumina Eco. Genotyp oznaczano manualnie w programie illumina ECO, a następnie eksportowano jako pliki tekstowe do dalszych analiz. Przygotowanie sond FISH zostało wykonane na podstawie sekwencji genomowych oraz markerów SNP z mapy „ExL”. W tym celu dla każdego chromosomu łąbinu wąskolistnego z genomu referencyjnego (Hane i in., 2017) wybrana została jedna odpowiadająca mu grupa sprzężeń z mapy ‘ExL’. Dla każdej z 20 wyselekcjonowanych w ten sposób grup wybrane zostały markery lokalizujące się w środkowej części grupy. W kolejnym etapie sekwencje wybranych markerów przyrównano do genomu referencyjnego łąbinu wąskolistnego (Hane i in., 2017) za pomocą algorytmu BLASTn (Altschul i in., 1990). W ten sposób wybrane zostały fragmenty genomu referencyjnego długości do 15 kbp dla których przygotowano zostaną sondy FISH wykorzystane w analizach w kolejnych etapach projektu. Analizy markerów, BLASTn oraz wybór odpowiednich fragmentów genomu referencyjnego wykonano po utworzeniu skryptu języka Python (<https://www.python.org/>) z wykorzystaniem bibliotek pandas (<https://pandas.pydata.org/>), NumPy (<http://www.numpy.org/>), Biopython (<https://biopython.org/>) oraz pybedtools (<https://daler.github.io/pybedtools/index.html>).

WYNIKI

W pierwszym roku badań na wstępie konieczne było poznanie i określenie możliwości synchronizacji terminów kwitnienia w kontrolowanych warunkach w szklarni oraz polu form matecznych oraz gatunków używanych jako zapylaczy w krzyżowaniu oddalonym. Z uwagi na to przeprowadzono wysiew w warunkach szklarniowych oraz polowych wybranych genotypów. Obserwacje dowiodły, że rośliny *L. mutabilis* trzeba wysiewać wcześniej o 3 tygodnie od *L. angustifolius* a *L. luteus* o dwa. Optymalne stadium rozwojowe woreczka zalążkowego zostało ustalone w oparciu o porównanie zmian zachowania się okwiatu w procesie samozapylenia i zmian morfologicznych w kolorze

płatków w porównaniu do zmian w trakcie nanoszenia obcego pyłku na znamiona *L. angustifolius*. W pierwszej części projektu przeanalizowano wpływ pyłku obcego gatunku — łubinu żółtego (52 chromosomy) oraz łubinu andyjskiego (48 chromosomów) na rozwój woreczka zalążkowego po zapyleniu roślin łubinu wąskolistnego (40 chromosomów). U odmiany Emir pyłek średnio najwięcej osadzał się przy wykorzystaniu jako zapylacza *L. mutabilis* — LM 13 oraz *L. luteus* — 500 — 54–58%, 1,4–1,3 w skali. Dla ‘Karo’ najlepsze osadzanie się pyłku stwierdzono po użyciu jako donora pyłku do zapylenia *L. luteus* — 500 (75%), zaś dla LAE1 *L. mutabilis* — LM 34 (67%). Na słupkach ‘Karo’ odnotowano najlepszą intensywność osadzania się pyłku średnio 1,6. Interesujące wyniki uzyskano dla ‘Graf’, gdyż % udział słupków z osadzonym pyłkiem był porównywalny we wszystkich czterech układach krzyżowania i w trzech zawierał się 54% do 64% z 2 do 1,6-stopniową oceną intensywnością osadzania się pyłku. Wykorzystanie krzyżowania oddalonego w niniejszym projekcie odniosło zdecydowanie pozytywny wpływ na rozwój strąków, co skutkowało rozwojem tkanki kalusowej z zalążków, w tym haploidalnej. Zalążki izolowane po 2–3 dniach od usunięcia pylników, nie poddane działaniu pyłku obcego gatunku nie podjęły regeneracji w zadawalającym procencie. Zastosowanie cytometrii przepływowej nie umożliwiło identyfikacji poziomu ploidalności tkanki kalusowej, z uwagi na jej znikomą ilość. Badania nad indukcją procesu gynogenezy będą kontynuowane w kolejnych etapach projektu.

U zalążków otrzymanych z krzyżowania oddalonego obserwowano 3 rodzaje kalusa: igiełkowaty I, kryształkowy II, uwodniony III. Zalążki regenerowały z różną częstotliwością w zależności od genotypu, układu krzyżowania oddalonego i rodzaju pożywki. U odmiany Emir największy odsetek zalążków ze zmianami po 30 dniach — 98% obserwowano w przypadku użycia jako zapylacza *L. luteus* 500 na obu rodzajach pożywki — P2 i P3, co okazało się zbliżone z wynikami dla osadzania się pyłku przy tym układzie krzyżowania. Przeważał u tego obiektu rodzaj III i II tkanki kalusowej o wielkości 1–5 mm. Dla ‘Graf’ pyłek *L. luteus* 500 również okazał się najkorzystniejszym zapylaczem, ponieważ powodował regenerację 63% oraz 78% zalążków odpowiednio na pożywce P3 i P2. U zalążków tego genotypu dominował 3 rodzaj tkanki kalusowej, a jej rozwój był znacznie słabszy (0,5–2 mm) niż u odmiany Emir. Zalążki ‘Karo’ uległy w największym stopniu zmianom biorąc pod uwagę rozwój kalusa we wszystkich wariantach zapylaczy i zastosowanej pożywki. Wielkość rozwijającej się tkanki była stosunkowo obfita we wszystkich wariantach w porównaniu do innych obiektów. Przeważał rodzaj II i III. Zalążki LAE-1 pozytywnie zareagowały na zastosowane zapylacze, ale wyraźnie ograniczający wpływ miała pożywka.

Uzyskane wyniki z cytometru przepływowego wskazały, że regenerujący kalus był na poziomie 1x oraz 2x na każdym z analizowanych zalążków. Tylko w przypadku regenerujących zalążków odmiany Karo × *L. mutabilis* LM 13 oraz linii LAE-1 × *L. luteus* 500 na pożywce P2 poziom ploidalności był 1x. Badania w zakresie zmian w woreczku zalążkowym jako rezultatu krzyżowania oddalonego są zaplanowane w następnych etapach projektu. W tym przypadku możemy mieć do czynienia z partenogenezą indukowaną lub eliminacją chromosomów z zarodka mieszańcowego.

Zweryfikowanie tego stanowiska będzie możliwe po przeanalizowaniu preparatów sporządzonych z utrwalonych załączków. Wcześniejsze badania związane z otrzymywaniem mieszańców oddalonych w rodzaju *Lupinus* nie dały jednoznacznej odpowiedzi czy mamy do czynienia z procesem haploidyzacji czy otrzymywaniem mieszańców oddalonych (Przyborowski i Packa, 1997; Przyborowski, 2003; Wilson i in., 2008; Galek, 2010). Konieczne będzie też dopracowanie pożywek dla konwersji komórek tkanki kalusowej w rośliny na drodze morfo i organogenezy

Rozwój zarodków zygotycznych pobranych po 14 dniach od momentu samozapylenia przebiegał wolniej niż pobranych po 28 dniach. Ponadto obserwowano spore zaburzenia w rozwoju systemu korzeniowego u wcześniej wyizolowanych zarodków zygotycznych — stadium A. Część pędowa rozwijała się u wszystkich zarodków, które formowały korzenie. Zarodki pobrane w starszym stadium charakteryzowały się lepszym ukorzeniem powyżej 70% i długością korzeni od 2 do 3,6 cm po 14 dniach kultury. Zarodki pobrane w stadium A ukorzeniały się w zakresie od 31 do 75% a średnia długość korzeni była o 1 cm krótsza. Zarodki zygotyczne podjęły regenerację i konwersję w rośliny zwłaszcza, gdy użyto starszych zarodków (28 dni od samozapylenia), co z pewnością można wykorzystać do przyspieszenia otrzymywania linii homozygotycznych na drodze SDS.

Zebrane wyniki dotyczące analizy mikrosporoogenezy, w celu ustalenia optymalnego stadium rozwojowego mikrospor do założenia kultury, 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. Uzyskane wyniki potwierdzają doniesienia literaturowe dla łubinu (Kozak i in., 2012) jak i innych gatunków z rodziny strączkowych (Croser i in., 2006). Stan taki stwarza trudności w uzyskaniu jednorodnej zawiesiny komórek w celu indukcji androgenozy w kulturach mikrospor. Kolejnym problemem było uzyskanie właściwej gęstości kultury. Jak podaje literatura w celu stymulacji rozwoju mikrospor roślin strączkowych wymagana jest stosunkowo wysoka gęstość zawiesiny wynosząca ok. 100 tys. mikrospor/ ml pożywki (Bayliss i in., 2004; Ochatt i in., 2009; Croser i in., 2006). Uzyskane wyniki wykazały, że w całym kwiatostanie w którym przeciętnie znajduje się od 14–20 pąków tylko średnio 2 z nich zawierały mikrospory w optymalnym stadium do indukcji androgenozy. Stan taki powoduje zużycie dużej liczby materiału roślinnego efektem, czego było założenie 1 do 2 szalek z pojedynczej izolacji. Jest to sytuacja bardzo odmienna w porównaniu do np. roślin kapustnych gdzie z pojedynczego kwiatostanu można uzyskać znaczną liczbę pąków dającą gwarancję założenia kultur obejmujących znaczącą populację komórek (Custers, 2003). W niniejszych badaniach zastosowano stres temperaturowy aplikowany zarówno na kwiatostany, jak i mikrospory w kulturze. Pomimo zastosowania zróżnicowanych kombinacji doświadczenia (szoki temperaturowe, pożywki) w większości kultur obserwowano brak rozwoju mikrospor. W nielicznych przypadkach udało się zaindukować podziały mikrospor, które doprowa-

dziły do otrzymania kalusa, co jest obiecujące, gdyż dotychczas opisane próby indukcji haploidów za pomocą androgenyzy kończyły się otrzymaniem struktur wielojądrowych lub struktur zarodkopodobnych, które nie podejmowały dalszego rozwoju (Croser i in., 2006; Skrzypek i in., 2008; Kozak i in., 2012).

Dla obu badanych genotypów uzyskane wartości stężenia i RIS pozwalają stwierdzić, że wyizolowane RNA nadawało się do utworzenia biblioteki cDNA, a następnie w kolejnym etapie do zsekwencjonowania i analiz DE (differential expression — analiza różnicowania ekspresji). Proces izolacji nie był łatwy, z uwagi na konieczność nagromadzenia dużej liczby mikrospor, co w przypadku łubinu wąskolistnego nie jest rzeczą łatwą.

Ilość i jakość RNA ma kluczowe znaczenie dla powodzenia eksperymentów typu RNAseq. Jakość RNA wpływa na jakość przygotowanej biblioteki. Biblioteki złej jakości nie pozwalają na generowanie odczytów wysokiej jakości w procesie sekwencjonowania. Odczyty słabej jakości nie pozwalają na przeprowadzenie wiarygodnej analizy DE (Wang i in., 2009; Wang i in., 2012). Dlatego tak ważne jest uzyskanie po izolacji RNA wysokiej jakości. Ponadto stężenie i jakość RNA muszą zostać precyzyjnie określone. W przypadku przygotowywania próbek do analiz RNAseq standardem jest kontrola RNA przy pomocy urządzenia bioanalyzer (Udvardi i in., 2008). Nie mniej jednak na rynku istnieją także inne systemy, które mogą z powodzeniem zostać wykorzystane do kontroli jakości próbek RNA. Jednym z takich systemów jest Qiaxcel RNA QC kit v2.0 (Sidova i in., 2015; Unger i in., 2015). Do określenia jakości RNA za pomocą Qiaxcel RNA qC kit v2.0 służy parametr RIS (RNA Integrity Score) określający stosunek 18S rRNA do 28S rRNA (Sidova i in., 2017). System ten został wykorzystany z powodzeniem w naszych badaniach.

Genotypowanie markerami SNP 20 wybranych linii RILs za pomocą 80 markerów SNP pozwoliło na ocenę stopnia homozygotyczności wybranych linii. Na 20 analizowanych linii 18 wykazało pełną homozygotyczność w 80 badanych *loci*. Dwie analizowane linie wykazały heterozygotyczność w trzech (linia EL/02/1/53) oraz pięciu (linia EL/02/1/7) analizowanych *loci*. Analiza markerów DArTseq pozwoliła na wytypowanie 46 z nich zlokalizowanych w centralnej części grup sprzężeń mapy ExL. Najwięcej markerów zlokalizowanych było na chromosomie NLL-16 — 9 markerów. Na ośmiu chromosomach zlokalizowano po jednym markerze (NLL-01, NLL-02, NLL-03, NLL04, NLL-07, NLL-09, NLL-10, NLL-18). Na pozostałych chromosomach lokalizowało się od 2 do 4 markerów. Sekwencje sond zapisano w pliku fish.fasta. Osiemnaście z dwudziestu sond mają długość 15 kpz, natomiast sondy chromosomu NLL-05 oraz NLL-08 9710 pz oraz 8826 pz. W obrębie 15 sond zlokalizowanych zostało po jednym markerze DArTseq. Dla pozostałych były to dwa lub trzy markery. Opracowane markery i sondy FISH będą podstawą w przyszłości do identyfikacji haploidów, czy podwojonych haploidów.

WNIOSKI

1. Zarodki zygotyczne podjęły regenerację i konwersję w rośliny zwłaszcza, gdy użyto starszych zarodków (28 dni od samozapylenia), co z pewnością można wykorzystać

- do przyspieszenia otrzymywania linii homozygotycznych z wykorzystaniem procedury SDS.
2. Generalnie pyłek obcych gatunków osadzał się na znamionach analizowanych 4 genotypów *L. angustifolius*, kiełkował i docierał do zalążka. Procesy te przebiegały w różnym nasileniu. Planowane badania w roku 2019 powinny dostarczyć informacji, czy mamy do czynienia z powstawaniem zygot i późniejszą eliminacją chromosomów czy partogenezą.
 3. Jako zapylacza proponuje się pyłek *L. luteus* 500 w krzyżowaniach oddalonych lub *L. mutabilis* LM 34.
 4. Zalążki 'Karo' uległy w największym stopniu zmianom biorąc pod uwagę rozwój kalusa we wszystkich wariantach zapylaczy i zastosowanej pożywki.
 5. Uzyskano przy wykorzystaniu krzyżowania oddalonego kalus na poziomie 2x i 1x, a tylko w przypadku regenerujących zalążków odmiany Karo × *L. mutabilis* LM 13 oraz linii LAE-1 × *L. luteus* 500 na pożywce P2 poziom ploidalności był 1x.
 6. Optymalne stadium rozwojowe do zakładania kultur izolowanych mikrospor znajduje się w środkowej części kwiatostanu.
 7. Odmiana Graf w kulturze pylników okazała się przydatna do indukcji tkanki kalusowej, aczkolwiek zbyt mała jej ilość nie pozwoliła na ocenę poziomu ploidalności.
 8. Izolacja RNA i utworzenie biblioteki cDNA daje podstawy do kontynuowania badań nad genetycznym podłożem procesu androgenezы.
 9. Opracowane markery i sondy FISH będą podstawą do identyfikacji haploidów, czy podwojonych haploidów.

LITERATURA

- Altschul S. F., Gish W., Miller W., Myers E. W., Lipman, D. J. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215 (3): 403 — 410.
- 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.
- Clements J., Galek R., Kozak B., Michalczyk D. J., Piotrowicz-Cieślak A. I., Sawicka-Sienkiewicz, E., Zalewski, D. 2014. Diversity of selected *Lupinus angustifolius* L. genotypes at the phenotypic and DNA level with respect to microscopic seed coat structure and thickness. *PloS one*, 9(8), e102874.
- 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 the *Fabaceae*: progress, constraints, and opportunities. *Crit. Rev. Plant Sci.* 25: 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.
- Duijs 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.
- Galek R. 2010. Studia nad zmiennością wybranych cech morfologicznych i użytkowych rodzaju *Lupinus*, ze szczególnym uwzględnieniem mieszańców wewnątrz i międzygatunkowych. 122 s
- Hane J. K., Ming Y., Kamphuis L. G., Nelson M. N., Garg G., Atkins C. A., Edwards D. 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.

- Kozak B. 2014. Charakterystyka markerów molekularnych przydatnych do selekcji wybranych cech u łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.). Rozprawa doktorska.
- Kozak K., Galek R., Waheed M.T., Sawicka-Sienkiewicz E. 2012. Anther culture of *Lupinus angustifolius*: callus formation and the development of multicellular and embryo-like structures. *Plant Growth Regul* 66: 145 — 153.
- Lichter R. 1982. Induction of haploid plants from isolated pollen of *Brassica napus*. *Pflanzenphysiol* 105: 427 — 434.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473 — 497.
- 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 and organ culture*, 36 (2): 227 — 236.
- Przyborowski A. J., Packa D. 1997. Embryo development after interspecific hybridisation of *Lupinus albus* L., *L. mutabilis* Sweet and *L. angustifolius* L. *J. Appl. Genet.* 38 (2): 131 — 141.
- Przyborowski J. A. 2003. Pre- i postzygotyczne bariery przy krzyżowaniu wybranych gatunków z rodzaju *Lupinus*. *Rozprawy i Monografie.* 78: 1 — 53.
- Sidova M., Tomankova S., Abaffy, P., Kubista, M., Sindelka, R. 2015. Effects of post-mortem and physical degradation on RNA integrity and quality. *Biomolecular detection and quantification* 5: 3 — 9.
- Skrzypek E., Czyczyło-Mysza I., Marcińska I., Wędzony M. (2008). Prospects of androgenetic induction in *Lupinus* spp. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 94: 131 — 137.
- Udvardi M. K., Czechowski T., Wolf-Rüdiger S. 2008. Eleven 2008 rules of quantitative RT-PCR. *The Plant Cell* 20, 7: 1736 — 1737.
- Unger C., Kofanova O., Sokolowska K., Lehmann D., Betsou, F. 2015. Ultraviolet C radiation influences the robustness of RNA integrity measurement. *Electrophoresis* 36 (17): 2072 — 2081.
- Wang L., Shengqin W., Li W. 2012. RSeQC: quality control of RNA-seq experiments. *Bioinformatics* 28.16: 2184 — 2185.
- Wang Z., Gerstein M., Snyder M. 2009. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics* 10,1: 57.
- Wilson J. G., Clements J. C., Quealy J., Yang H. 2008. Development of an interspecific hybridization protocol for *Lupinus*. *Proc. of the 12th Int. Conf., Fremantle, Western Australia 14–18 September 2008:* 147 — 151.

MICHAŁ KSIAŻKIEWICZ

PIOTR PLEWIŃSKI

SANDRA RYCHEL

MAGDALENA TOMASZEWSKA

ANETA SAWIKOWSKA

WOJCIECH BIELSKI

BARBARA NAGANOWSKA

BOGDAN WOLKO

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Kierownik Tematu: dr Michał Książkiewicz Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, tel. 61 6550268, e-mail:mksi@igr.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.802.18.2018. Zadanie 39.

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

Słowa kluczowe: termin kwitnienia, wernalizacja, phenotypowanie, mapowanie genetyczne, sekwencjonowanie DNA, sekwencjonowanie RNA

TEMAT BADAWCZY 1

Realizację zadania podzielono na cztery tematy badawcze.

Celem tematu badawczego 1 było otrzymanie linii pokolenia F5 z krzyżówek łubinu żółtego ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14 oraz poznanie wymagań wernalizacyjnych wybranych linii z kolekcji łubinu białego.

W stacji Hodowli Roślin Smolice, Oddział w Przebędowie, wysiano nasiona z pokolenia F4: ♀PRH444/14×♂Parys i ♀Parys×♂PRH444/14. Uzyskano plon z 200 linii z każdej kombinacji krzyżówkowej w ilości wystarczającej (z rezerwą na ewentualne powtórzenia) do kontynuacji prac w następnych latach.

Doświadczenie ukierunkowane na ocenę terminu kwitnienia łubinu białego założono w warunkach szklarniowych (z wernalizacją i bez wernalizacji). Badano 110 linii z kolekcji (Poznańska Hodowla Roślin, Oddział Wiatrowo) oraz 2 linie rodzicielskie populacji mapującej (Kiev Mutant i P27174). Doświadczenie wykazało, że w kolekcji

występuje znaczna zmienność zarówno terminu wiązania pąków, kwitnienia, dojrzewania strąków, jak i odpowiedzi w zakresie tych trzech cech na wernalizację. Dla linii wernalizowanych średni termin od wysiania do wiązania pąków zawierał się w zakresie 26–50 dni, zaś nie poddanych wernalizacji: 31–76 dni. Średnia liczba dni do inicjacji kwitnienia wynosiła 33–61 dni dla roślin wernalizowanych (w 2015 roku: 38–77 dni) i 37–80 dni dla niewernalizowanych (w 2015 roku: 43–87 dni). Zaobserwowano duże zróżnicowanie odpowiedzi na wernalizację — od przyspieszenia kwitnienia o 34 dni do całkowitej termoneutralności. Są to wyniki podobne do tych uzyskanych w 2015 roku (zakres od -36 do +2 dni). Linie wczesne po wernalizacji przyspieszały termin kwitnienia o 1–6 dni. Największe zróżnicowanie tej cechy występowało w liniach późnych (przyspieszenie o 10–32 dni). Wpływ wernalizacji na termin dojrzewania strąków był statystycznie istotny dla linii pośrednich i późnych — średnie przyspieszenie terminu dojrzewania wynosiło około 7 dni.

Wnioski

- Cecha wczesności kwitnienia łubinu białego jest cechą ilościową, warunkowaną przez kilka niesprzężonych ze sobą genów.
- Linie rodzicielskie populacji mapującej łubinu białego istotnie różnią się terminem kwitnienia i wymaganiami wernalizacyjnymi.

TEMAT BADAWCZY 2

Celem tematu badawczego 2 była identyfikacja miejsc polimorficznych różnicujących linie rodzicielskie populacji mapującej oraz wybrane linie wczesne i późne łubinu żółtego w obrębie sekwencji homologów znanych genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia i opracowanie na tej podstawie markerów molekularnych. Zestaw sekwencji obejmował następujące geny:

- integratory szlaków indukcji kwitnienia: *FLOWERING LOCUS T (FTa1a, FTa1b, FTc1, FTc2)*, *UNIFOLIATA (UN1a, UN1b)*;
- geny ze szlaku wernalizacyjnego: *FRIGIDA*, *VERNALIZATION INDEPENDENCE 3*;
- geny ze szlaku autonomicznego: *FLOWERING LOCUS D*, *FLOWERING PROTEIN A (FPAa, FPAb)*, *FY*, *SQUAMOSA6*;
- gen inicjujący kwitnienie w odpowiedzi na stresy abiotyczne: *BROTHER OF FT AND TFL1*;
- geny indukujące kwitnienie w zależności od temperatury *TERMINAL FLOWER 1 (TFL1a, TFL1b)*, *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 4*;
- gen ze szlaku fotoperiodycznego: *CYCLIC DOF FACTOR 3*;
- gen regulujący dojrzewanie nasion: *MOTHER OF FT AND TFL1*;
- geny indukcji kwitnienia w ramach rytmu dobowego: *EARLY FLOWERING 1*, *EARLY FLOWERING 3*, *EARLY FLOWERING 4*, *SKI-INTERACTING PROTEIN 1*;
- gen zlokalizowany w obrębie jednego z *loci* QTL wczesności kwitnienia łubinu białego: *DNAJ10*.

Loci polimorfizmu pojedynczego nukleotydu (SNP) pomiędzy liniami rodzicielskimi polskiej populacji mapującej (PRH444/14 × Parys) zidentyfikowano dla 8 genów, zaś

pomiędzy liniami rodzicielskimi australijskiej populacji mapującej (Wodjil × P28213) dla 19 genów. Polimorfizm insercji/delecji zidentyfikowano dla 3 genów (PRH444/14 × Parys) oraz dla 10 genów (Wodjil × P28213). Zaprojektowano 2 markery typu PCR, 6 CAPS i 2 dCAPS (PRH444/14×Parys) oraz 3 markery typu PCR, 19 CAPS i 1 dCAPS (Wodjil × P28213).

Wnioski

- Obserwowany poziom polimorfizmu między liniami wczesnymi a późnymi łubinu żółtego jest zbliżony do tego, który występuje u łubinu wąskolistnego i białego.
- Zaprojektowane markery polimorficzne zakotwiczone w sekwencjach genów związanych z procesem indukcji kwitnienia będą mogły być wykorzystane do mapowania genetycznego w obrębie dwóch populacji mapujących łubinu żółtego — polskiej i australijskiej.

TEMAT BADAWCZY 3

Celem tematu badawczego 3 było poznanie profilu ekspresji i sekwencji genów kwitnienia dla linii rodzicielskich populacji mapującej oraz wybranych linii wczesnych i późnych łubinu żółtego metodą sekwencjonowania nowej generacji.

Materiałem badawczym było 5 linii wybranych na podstawie obserwacji fenotypowych, polimorfizmu markerów DNA oraz danych literaturowych: Wodjil — wczesna, termoneutralna, z Australii; P28213 — późna, wymagająca wernalizacji, z Portugalii; Population Sewilla-4 — późna, wymagająca wernalizacji, z Hiszpanii; Parys — pośrednia, z Polski; PRH 444/14 — bardzo wczesna, termoneutralna, z Polski.

Doświadczenie zostało założone w warunkach kontrolowanych w Centrum Uprawy Roślin IGR PAN (z wernalizacją i bez wernalizacji): temperatura 18°C (noc) / 22°C (dzień), fotoperiod 16 godzin, wilgotność 50–70%. Do izolacji RNA i sekwencjonowania RNA pobrano tkankę liści 28 i 35 dni po wysianiu nasion.

Analiza różnicowa ekspresji genów wykazała, że większość homologów znanych genów kwitnienia była aktywna ekspresyjnie we wszystkich badanych wariantach/genotypach. Dla niektórych genów zaobserwowano zróżnicowanie poziomu ekspresji dla poszczególnych kopii w zależności od terminu, genotypu lub zastosowanej wernalizacji. Określono geny kandydujące, które mogą odpowiadać za cechę wczesności kwitnienia u linii termoneutralnych.

Wnioski

- Niektóre homologi genów indukcji kwitnienia u łubinu żółtego uległy duplikacji i subfunkcjonalizacji (dywergencji).
- Zidentyfikowano dwa geny kandydujące, które prawdopodobnie odpowiadają za zniesienie wymagań wernalizacyjnych i wczesność kwitnienia linii PRH444/14.

TEMAT BADAWCZY 4

Celem tematu badawczego 4 było opracowanie markerów do rutynowego genotypowania głównych QTL cechy wczesności kwitnienia łubinu białego i określenie za ich pomocą profilu tych QTL w światowej kolekcji tego gatunku.

Podczas realizacji tego zadania w latach 2016–2018 określono 5 *loci* QTL wczesności kwitnienia (*1N-5N*), które były wspólne dla wszystkich doświadczeń, w których nasiona nie były wernalizowane (doświadczenia polowe w latach 2004, 2005, 2015 i doświadczenie szklarniowe w 2016). Do genotypowania wybrano 10 markerów, po 2 na każde *locus* QTL wczesności kwitnienia. Użycie markerów zakotwiczonych w genach kandydujących pozwoliło na analizę frekwencji alleli odpowiadających za późne kwitnienie linii P27174 w kolekcji i częstości rekombinacji wokół tych *loci*. Zidentyfikowano, że allel „późny” *4N* zawiera jedna linia, allel „późny” *1N* zawierają dwie linie, allel „późny” genu *2N* posiadają 4 linie, allel „późny” genu *5N* ma 18 linii, zaś allel późny genu *3N* — 33 linie. Zaobserwowano szybki spadek współczynnika nierównowagi sprzężeń w miarę oddalania się od genów kandydujących za wyjątkiem *locus 5N*.

Wnioski

- Uzyskany zestaw markerów pozwala na wiarygodną identyfikację alleli dla wszystkich pięciu głównych *loci* wczesności kwitnienia łubinu białego.
- Wprowadzenie odporności na antraknozę z dzikich linii etiopskich do linii udomowionych jest możliwe jedynie przy użyciu linii wczesnych i termoneutralnych niespokrewnionych z linią Kiev Mutant.
- W kolekcji znajdują się co najmniej cztery linie, które mogą być użyte jako donory wczesności kwitnienia w krzyżowaniach z komponentami z Etiopii.

WOJCIECH RYBIŃSKI¹
WOJCIECH ŚWIĘCICKI¹
PAWEŁ BARZYK²

¹ Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

² Poznańska Hodowla Roślin, Oddział w Wiatrowie

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Wojciech Rybiński, Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu,
ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, tel. 61 65 50252, e mail: wryb@igr.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.802.18.2018, Zadanie 42.

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

Słowa kluczowe: alkaloidy, antraknoza, łubin biały, krzyżowania zbliżające, mutageneza, tłuszcz, wczesność

CEL TEMATU I BADAŃ

Łubin biały ma jeden z najstarszych rodowodów spośród gatunków uprawianych w Europie. Jego uprawa w Egipcie datuje się na rok 330 p.n.e., skąd poprzez Grecję dotarł do Włoch. Z uwagi na mniej korzystne warunki klimatyczne w Centralnej Europie gatunku tego nie uprawiano, a dopiero udane doświadczenia Wulfena w Niemczech w roku 1810 zwróciły uwagę na wartość roślin łubinu białego w użyźnianiu gleby. Dotąd łubin biały np. w Polsce i w Niemczech nie stał się tak rozpowszechniony (głównie z powodu braku odpowiednich odmian) jak łubin żółty, a zwłaszcza wąskolistny. Jest gatunkiem mało poznany od strony genetycznej. Aby zwiększyć jego powierzchnię uprawy i wykorzystanie należy ulepszyć w odmianach uprawnych kilka cech: wczesność i odporność na antraknozę oraz obniżyć zawartość alkaloidów i podwyższyć zawartość tłuszczu. Celem proponowanych badań w aspekcie wieloletnim jest zidentyfikowanie i selekcja pożądanych cech łubinu białego w światowych zbiorach kolekcyjnych lub wśród mutacji indukowanych, określenie sposobu dziedziczenia oraz łączna introdukcja cech do genotypów o wysokiej wartości użytkowej. Równoległe opracowanie populacji mapującej, której typ określa się w literaturze jako „magic population” stanowić będzie

punkt wyjścia do pogłębionych badań genetyczno-molekularnych. Realizacja powyższego jest niezbędnym warunkiem, aby łubin biały stał się cenionym gatunkiem uprawnym, konkurencyjnym dla głównych roślin strączkowych, źródłem wysokoenergetycznej paszy białkowej dla drobiu i trzody chlewnej.

WYNIKI

W ramach zdania 42 badania realizowano w trzech następujących tematach badawczych:

1. **Temat badawczy 1: Indukowanie mutacji.** Selekcja w mutagenie łubinu białego jest ukierunkowana na identyfikację zmutowanych form o wczesnym dojrzewaniu i korzystnym hodowlanie fenotypie obserwowanym w polu. W roku 2014 traktowano chemomutagenem (MNU) nasion krajowej odmiany uprawnej Butan trzema wybranymi dawkami mutagenu dla uzyskania populacji mutacyjnych w kolejnych latach i pokoleniach. Prace w bieżącym roku obejmowały pokolenie M_5 .
2. **Temat badawczy 2: Krzyżowania zbliżające.** Uwzględniają one dwie cechy (zawartość tłuszczu i wczesność dojrzewania) i zróżnicowane podłoże genetyczne (odmiany uprawne). Druga para cech w krzyżowaniach zbliżających uwzględnia zawartość alkaloidów i odporność na antraknozę i zróżnicowane podłoże genetyczne (odmiany uprawne). W bieżącym roku rozpoczęto prace nad oceną sposobu dziedziczenia alkaloidów jak również nad łączną inkorporacją cechy wczesności i wysokiej zawartości tłuszczu do jednego genotypu na drodze krzyżowania zbliżającego.
3. **Temat badawczy 3: Wyprowadzanie populacji mapującej.** W roku ubiegłym z krzyżówki formy dzikiej z odmianą uprawną (AL. 22 × Boros) uzyskano nasiona roślin F_2 , a w roku bieżącym rośliny pokolenia F_3 .

TEMAT 1

W bieżącym roku (pokolenie M_5) oceniano stopień wczesności 123 form wczesnych lub dojrzewających na poziomie odmiany Butan wybranych w ubiegłorocznym pokoleniu M_4 . Materiał obejmujący 68 form z dawki mutagenu 0,8 mM i 55 z dawki 1,2 mM potwierdził obecność form wczesnych w tegorocznym pokoleniu M_5 i trafność ich selekcji w roku ubiegłym. Na podstawie obserwacji polowych z ocenianego materiału pochodzącego z obydwu dawek mutagenu ujawniono 18 najwcześniejszych form w porównaniu z odmianą kontrolną Butan. Część obiektów (24 formy mutacyjne) dojrzewało jeden lub dwa dni później. Pozostałe formy zaliczono do grupy wczesnych, dojrzewających na poziomie odmiany Butan, uznawanej w krajowych wykazie odmian łubinu białego za wcześnie dojrzewającą. Pod względem cech struktury plonu generalnie formy mutacyjne ustępowały wysokopiennej odmianie Butan, aczkolwiek zidentyfikowano nieliczne formy mutacyjne plenniejsze lub plonujące co najmniej na jej poziomie. O właściwym doborze dawek mutagenu może świadczyć ich efektywność w kierunku pojawiania się między innymi roślin o zmianach morfologicznych, roślin

chlorotycznych i o zmienionej barwie kwiatów. Na szczególne wyróżnienie zasługuje zidentyfikowanie jednej formy o znacznej tolerancji na fusarium, jak i dwóch form epigonalnych, przy tradycyjnym charakterze wzrostu jaki reprezentuje odmiana wyjściowej Butan.

TEMAT 2

W odniesieniu do pierwszej pary cech (trzy kombinacje: forma o zwiększonej tolerancji na antraknozę × odmiana i formy niskoalkaloidowe × odmiana) w roku bieżącym analizowano rośliny pokolenia F₄

Analizy na zawartość alkaloidów w potomstwie mieszańcowym pokolenia F₄ pochodzącym z trzech kombinacji krzyżówkowych pozwoliły ujawnić szeroki zakres zmienności tej cechy jak i w dalszej kolejności dokonać wyboru mieszańców o bardzo niskiej zawartości alkaloidów w porównaniu z wzorcem, którą była odmiana uprawna Butan. Wykazano, że najkorzystniejszą kombinacją krzyżówkową była krzyżówka B17 (niskoalkaloidowa odmiana Amiga × odmiana uprawna Pikador) w której ujawniono najwięcej niskoalkaloidowych mieszańców w zakresie zmienności od 0,0004% do 0,0395%, przy średniej zawartości alkaloidów na poziomie 0,0242% w nasionach wzorca, odmiany Butan. Dla 11 form o najniższej zawartości alkaloidów zakres zmienności tej cechy zamykał się w przedziale od 0,0004% do 0,0008%. Dla określenia sposobu dziedziczenia alkaloidów wykonano krzyżowania dialleliczne w 10 kombinacjach krzyżówkowych, z wykorzystaniem pięciu linii o możliwie szerokim zakresie zróżnicowania zawartości alkaloidów. Pośród ocenianych obiektów kolekcyjnych po infekcji roślin w szklarni przez grzyb *Colletotrichum lupini*, nie zidentyfikowano form o pełnej odporności na antraknozę. Stwierdzono natomiast szeroki zakres reakcji roślin na infekcję wyrażony zróżnicowanym stopniem porażenia w odniesieniu do poszczególnych obiektów kolekcyjnych. Formy o najmniejszym stopniu podatności (zwiększonej tolerancji) na antraknozę w zakresie 1–2 i 2–3 w 9-stopniowej skali (9 — całkowite porażenie) mogą zostać wykorzystane w dalszych etapach prac zadania badawczego.

W odniesieniu do drugiej pary cech, zastosowane kombinacje krzyżowań obiektów kolekcyjnych o podwyższonej zawartości tłuszczu i wcześniejszym dojrzewaniu z wybranymi odmianami uprawnymi pozwoliły na uzyskanie mieszańców pokolenia F₅ o poszerzonym zakresie zmienności ocenianych cech w stosunku do ich form rodzicielskich. Pod względem efektywności uzyskiwania najwcześniejszych mieszańców podobnie jak w roku ubiegłym (pokolenie F₄) najlepszą okazała się kombinacja B1 (Damascus × Boros), z której wyselekcjonowano mieszańce F₅ o najwcześniejszym dojrzewaniu w porównaniu z mieszańcami z pozostałych pięciu kombinacji i rodzin. Nie mniej wartościowymi okazały się także dwie dalsze kombinacje: B2 (Damascus × Pikador) i B6 (MJS208-1 × Wat). Wskazuje to na znaczenie odpowiedniego doboru komponentów rodzicielskich do krzyżowań i wysoką zdolność kombinacyjną wspomnianych krzyżówek z ukierunkowaniem segregacji w kierunku pojawiania się form o najwcześniejszym dojrzewaniu.

Na podstawie wcześniej wykonanych analiz chemicznych, potwierdzono trafność wyboru do badań w roku 2017 (F₄) kombinacji krzyżówkowej AL 22 × Kalina. Pozwoliło to uzyskać w potomstwie mieszańcowym szeroki zakres zmienności cechy zawartości tłuszczu i składu kwasów tłuszczowych, a w efekcie finalnym zidentyfikować mieszańce wysokotłuszczowe o korzystnym z żywieniowego punktu widzenia profilu kwasów tłuszczowych. Wysoka wartość kombinacyjną tej krzyżówki potwierdzono w tegorocznym pokoleniu F₅. Nasiona mieszańców w tym pokoleniu okazały się bogatym źródłem zmienności zawartości tłuszczu w szerokim zakresie od 12,1% do 15,6%. Umożliwiło to wybrać obiekty wysokotłuszczowe o zawartości powyżej 14%, a także 15% w nasionach trzech mieszańców. W odniesieniu do danych literaturowych, nasiona wysokotłuszczowych form łubinu białego przewyższają pod tym względem nasiona zarówno łubinu żółtego jak i wąskolistnego. Na podstawie ocenianych mieszańców potwierdzono wystąpienie korzystnego stosunku kwasów omega-3 do omega-6, (obserwowano to także we wszystkich wcześniejszych pokoleniach), to jest kwasu linolenowego do linolowego na poziomie 1:2. Według danych literaturowych stosunek obydwu nienasyconych kwasów uważany jest za prawie idealny z diecie ludzi jak żywieniu zwierząt. Dla łącznej inkorporacji cechy wczesności i wysokiej zawartości tłuszczu w jeden genotyp wykonano krzyżowania obejmujące najwartościowsze mieszańce pod względem obydwu cech. W roku bieżącym uzyskano rośliny pokolenia F₂.

TEMAT 3

Prace nad położeniem genów i oceną grup sprzężeń pozwalają na utworzenie mapy genetycznej. Bardzo ważnym etapem jest tu opracowanie i wytworzenie adekwatnych populacji mapujących. Populacje te winny odznaczać się dużym zróżnicowaniem między liniami, ale ponadto linie winny być jednolite, czyli wysoce homozygotyczne. W ramach prowadzonego tematu rozpoczęliśmy prace nad uzyskaniem krajowej populacji mapującej w łubinie białym. Dla uwzględnienia możliwie szerokiego polimorfizmu wybór form rodzicielskich oparto na dużej liczbie przeciwstawnych alleli genów warunkujących badane cechy użytkowe (linia dzika × odmiana uprawna). Warunki te spełnia linia 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. Z wysianych nasion rozmnażanych na polu doświadczalnym w Wiatrowie w roku ubiegłym zebrano rośliny pokolenia F₂ których nasiona umożliwiły w bieżącym roku uzyskanie roślin pokolenia F₃. Uzyskane nasiona pozwolą na kontynuację wyprowadzania populacji mapującej poprzez rozmnożenia w kolejnych latach.

WOJCIECH ŚWIECICKI¹**MAGDALENA KROC¹****PAWEŁ BARZYK²****KATARZYNA CZEPIEL¹****PAULINA WILCZURA¹**¹ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk² Poznańska Hodowla Roślin, TulceKierownik Tematu: prof. dr hab. Wojciech Świecicki Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk,
ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań; tel. 61 6550291, e-mail: wswi@igr.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.802.18.2018, Zadanie 41.

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

Słowa kluczowe: alkaloidy, antraknoza, *Fusarium*, łubin

CEL

1. Testowanie genów kandydatów, w celu wytypowania genów zaangażowanych w odporność na wędnięcie fuzaryjne.
2. Połączenie niskiej zawartości alkaloidów z odpornością na patogeny grzybowe (*Colletotrichum lupini* i *Fusarium* sp.) w zróżnicowanym podłożu genotypowym o dużej wartości użytkowej.

OPIS WYNIKÓW

Ad 1.

W bieżącym roku na podstawie wyników analizy ekspresji różnicowej, adnotacji funkcjonalnej genów oraz dostępnej literatury wybrano 6 genów kandydackich, potencjalnie zaangażowanych w proces odporności/podatności na fuzariozę łubinu żółtego, których ekspresję analizowano z zastosowaniem metody qPCR. Wybrano geny, których adnotacja funkcjonalna bezpośrednio sugerowała udział w procesach odpornościowych (*bPRI*, *TIFY6b*, *ABP19a*), które miały związek z organizacją/modyfikacją ściany komórkowej (NTPCR), a także geny których podwyższona ekspresja może wpływać na zwiększoną podatność roślin (DMR6-OX, BON1). Znormalizowaną wartość względnego poziomu ekspresji genów badanych w liniach porażonych analizowano względem kalibratora (prób nieporażonych). W przypadku trzech genów (*bPRI*, *TIFY6b*, *ABP19a*) wykazano spadek ekspresji u linii podatnych przy jednocześnie niewielkim wzroście ekspresji u linii odpornych, a dla jednego genu wykazano znaczny spadek ekspresji u linii podatnych oraz niewielki spadek ekspresji u linii odpornych. Dla dwóch genów kandydackich wykazano znaczny wzrost ekspresji u linii podatnych oraz niewielki wzrost ekspresji u linii odpornych. Wykazany znaczny spadek ekspresji genów *bPRI*, *TIFY6b*, *ABP19a* oraz *NTPCR* u linii podatnych może wskazywać na zaangażowanie tych genów w odporność na patogena, natomiast zwiększona ekspresja genów DMR6-OX i BON1 u linii podatnych może wpływać na podwyższenie podatności na infekcję *Fusarium*.

Ad 2.

Zbadano zawartość ogólną i skład jakościowy alkaloidów 80 prób nasion łubinu żółtego i wąskolistnego. W znacznej części u obu gatunków wykazano zawartość ogólną alkaloidów na poziomie tysięcznych części procenta, co świadczy o dużej skuteczności prowadzonej selekcji i wskazuje na możliwość dalszego obniżenia poziomu alkaloidów w nasionach.

Uzyskano 9 nowych kombinacji mieszańcowych łubinu wąskolistnego i żółtego, łączących genotypy odmian uprawnych ze źródłami odporności przeciwko fuzariozie i antraknozie: W-508 (Sonate × Bolero), W-511 (W-336 × Bolero), W-659 (W-350 × Rumba), W-663 (W-411 × Koral), Z-747 (Z-525 × Bursztyn), Z-741 (Z-525 × Talar), Z-758 (Z-525 × Perkoz), Z-794 (Z-687 × Baryt), Z-795 (Z-687 × WTD2811).

Przetestowano 20 obiektów łubinu wąskolistnego (tab. 1) oraz 40 obiektów łubinu żółtego (tab. 1) pod względem odporności na *Fusarium* sp. Silna presja selekcyjna umożliwiła wskazanie obiektów odpornych, mogących być źródłem genetycznej odporności — szczególnie Z-566, R26/16 i R45/16 i W-461.

Przetestowano 40 obiektów łubinu żółtego pod względem odporności na antraknozę w warunkach polowych. Wyniki umożliwiają selekcję negatywną i wskazanie obiektów mogących posiadać odporność genetyczną: Z-717, Z-704, Z-724, Z-687, Z-718 (tab. 2).

Przetestowano 40 obiektów łubinu żółtego pod względem odporności na antraknozę w warunkach szklarniowych. Obiekty o średnim porażeniu w szklarni poniżej 3,5 stopnia

w skali 0–9, oraz z połowym indeksem porażenia poniżej 70 (Z-715, Z-720, Z-718), można wskazać jako źródła odporności (tab. 2).

Tabela 1

Przeżycie roślin łubinu wąskolistnego i żółtego na polu fuzarialnym (2018)

Gatunek	Nazwa obiektu	Średnio przeżycie w stadium dojrzewania [%]
1	2	3
<i>L. angustifolius</i>	* Kalif	99,0
<i>L. angustifolius</i>	W-461	94,3
<i>L. angustifolius</i>	W-464	90,9
<i>L. angustifolius</i>	W-440	90,8
<i>L. angustifolius</i>	W-439	87,8
<i>L. angustifolius</i>	W-462	86,6
<i>L. angustifolius</i>	W-450	85,8
<i>L. angustifolius</i>	W-460	85,4
<i>L. angustifolius</i>	W-438	83,1
<i>L. angustifolius</i>	W-441	81,3
<i>L. angustifolius</i>	W-444	74,7
<i>L. angustifolius</i>	W-443	62,3
<i>L. angustifolius</i>	W-468	61,6
<i>L. angustifolius</i>	W-451	56,7
<i>L. angustifolius</i>	W-449	47,2
<i>L. angustifolius</i>	W-457	37,0
<i>L. angustifolius</i>	W-466	25,7
<i>L. angustifolius</i>	W-456	24,9
<i>L. angustifolius</i>	W-445	24,6
<i>L. angustifolius</i>	W-447	20,8
<i>L. angustifolius</i>	* Sonet	19,0
<i>L. angustifolius</i>	W-446	14,6
<i>L. luteus</i>	Z-566	75,7
<i>L. luteus</i>	R26/16	66,7
<i>L. luteus</i>	R45/16	64,3
<i>L. luteus</i>	* PARYS	58,3
<i>L. luteus</i>	* LORD	53,6
<i>L. luteus</i>	Z-597	50,0
<i>L. luteus</i>	Z-605	50,0
<i>L. luteus</i>	R14/16	47,6
<i>L. luteus</i>	Z-563	47,5
<i>L. luteus</i>	R51/16	46,7
<i>L. luteus</i>	Z-598	41,7
<i>L. luteus</i>	Z-617	41,7
<i>L. luteus</i>	Z-561	41,7
<i>L. luteus</i>	Z-525	41,7
<i>L. luteus</i>	R54/16	38,1
<i>L. luteus</i>	Z-526	37,5
<i>L. luteus</i>	Z-603	36,7
<i>L. luteus</i>	Z-559	36,5
<i>L. luteus</i>	Z-619	36,5
<i>L. luteus</i>	R32/16	34,7
<i>L. luteus</i>	R47/16	31,3
<i>L. luteus</i>	Z-478	30,0
<i>L. luteus</i>	Z-533	25,0
<i>L. luteus</i>	Z-612	25,0
<i>L. luteus</i>	R40/16	25,0
<i>L. luteus</i>	Z-618	22,9
<i>L. luteus</i>	Z-608	20,0

Łubin

c.d. Tabela 1

1	2	3
<i>L. luteus</i>	R15/16	15,5
<i>L. luteus</i>	Z-476	12,5
<i>L. luteus</i>	Z-607	12,5
<i>L. luteus</i>	Z-616	12,5
<i>L. luteus</i>	R20/16	12,5
<i>L. luteus</i>	R48/16	11,1
<i>L. luteus</i>	R50/16	11,1
<i>L. luteus</i>	Z-606	10,0
<i>L. luteus</i>	R38/16	10,0
<i>L. luteus</i>	R44/16	10,0
<i>L. luteus</i>	R35/16	6,3
<i>L. luteus</i>	R11/16	5,6
<i>L. luteus</i>	R34/16	5,6
<i>L. luteus</i>	Z-611	0,0
<i>L. luteus</i>	R53/16	0,0

Tabela 2

Porażenie antraknozą siewek łubinu żółtego w doświadczeniu szklarniowym (2018) i zestawienie z rankingiem polowym

Lp.	Obiekt	Średnie porażenie	Grupy jednorodnie statystycznie	Polowy indeks porażenia	Ranking polowy	
1	2	3	4	5	6	
1	Z-715	2,086		S	42,5	16
2	Z-707E	2,453		R S	---	35
3	Z-720	2,905		Q R S	65,5	25
4	Z-686E	2,922		Q R S	---	35
5	Z-718	3,307		P Q R	28,0	5
6	Z-731	3,755		O P Q	66,5	28
7	Z-668	3,889		O P Q	92,5	34
8	Z-704	3,889		O P Q	26,0	2
9	Z-721	3,980		O P Q	29,5	10
10	Z-669	4,093		N O P	91,5	33
11	Z-698	4,253	M N O P		56,0	20
12	Z-711	4,366	M N O P		65,0	22
13	Z-712	4,886	L M N O		65,0	21
14	Z-726	5,140	K L M N		65,5	24
15	Z-714	5,166	K L M N		41,5	14
16	Mister	5,168	K L M		29,0	6
17	Z-701E	5,536	J K L		---	35
18	Z-696	5,583	J K L		---	35
19	Z-706	5,645	J K L		---	35
20	Z-668E	5,682	J K L		66,0	26
21	Z-694	5,751	I J K L		52,0	17
22	Z-729	5,781	I J K L		40,5	13
23	Z-716	5,808	I J K L		39,5	12
24	Z-695	6,035	H I J K		---	35
25	Z-688	6,090	H I J K		29,5	7
26	Z-717	6,141	G H I J K		15,5	1
27	Teo	6,428	F G H I J		90,5	32
28	Z-687	6,429	F G H I J		28,0	4
29	Z-703E	6,504	E F G H I J		---	35
30	Z-708	6,607	D E F G H I J		52,5	19
31	Z-681	6,753	C D E F G H I		76,5	29
32	Z-703	6,920	B C D E F G H		65,5	23

1	2	3	4	5	6
33	Z-689E	7,177	A B C D E F G	---	35
34	Z-725	7,215	A B C D E F G	79,5	31
35	Z-709	7,356	A B C D E F	42,0	15
36	Z-724	7,486	A B C D E	26,5	3
37	Z-691	7,666	A B C D	66,5	27
38	Z-723	7,671	A B C D	29,5	9
39	Z-677	7,736	A B C	52,5	18
40	Z-730	7,844	A B	78,5	30
41	Z-732	7,980	A B	29,5	8
42	Z-692	8,256	A	30,0	11

WNIOSKI

- Wyniki qPCR potwierdziły udział wybranych genów kandydackich w procesach odpornościowych roślin łąbinu żółtego po porażeniu *Fusarium*, co może wpływać na zdolność lub niezdolność linii do ograniczenia wzrostu i rozwoju patogena. Zaangażowanie genów uczestniczących w różnych mechanizmach odpornościowych może wskazywać, że odporność na wędnięcie fuzaryjne u tego gatunku warunkowana jest wielogenowo.
- Wśród analizowanych prób łąbinu żółtego i wąskolistnego na wyróżnienie zasługuje bardzo niska zawartość alkaloidów — na poziomie dziesięciotysięcznych części procenta.
- Genotypy o bardzo wysokiej odporności na wędnięcie fuzaryjne są nieliczne w łąbinie wąskolistnym, jednak test na polu fuzarialnym pozwala na ich wyodrębnienie spośród badanych materiałów. Znalaziono 9 genotypów o bardzo wysokim poziomie odporności, w tym jeden mogący być jej źródłem.
- W łąbinie żółtym przeciętny poziom odporności na wędnięcie fuzaryjne jest wyższy i liczba obiektów posiadających geny odporności jest większa, co utrudnia wyodrębnienie najlepszych genotypów, jednak wyjątkowo silna presja selekcyjna pozwoliła wskazać co najmniej 3 obiekty, które mają wysoką odporność i mogą być źródłem genów odporności.
- Znalazienie genetycznej odporności na antraknozę jest trudne i wymaga kompleksowej oceny w różnych warunkach wegetacji. Wysoka skuteczność testu szklarniowego i zgodność wyników obserwacji z doświadczeń polowych i szklarniowych pozwoliła w tym roku wskazać przynajmniej 3 genotypy, mogące być źródłem genetycznej odporności przeciwko antraknozie.

MARCIN PRZYBYŚ**URSZULA SKOMRA****GRAŻYNA KORBECKA-GLINKA**

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy, Puławy

Kierownik Tematu: dr Marcin Przybyś Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa — Państwowy Instytut Badawczy, Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, tel. 81 4786 934,

e-mail: mprzybys@iung.pulawy.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.802.11.2018, Zadanie 107.

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

Słowa kluczowe: AFCVd, ArMV, CBCVd, chmiel, HpLV, HpSVd, wirusy

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 metody molekularnej opartej o 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 (HpSVd), wiroida wyboistości jabłek (AFCVd) oraz wiroida pęknięcia kory cytrusowych (CBCVd). W pierwszej kolejności opracowano molekularne metody detekcji poszczególnych patogenów. Oparte były one 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 płaszcz (CP), a w przypadku

detekcji wiroidów amplifikowano pełne genomy patogenów. Kolejnym etapem badań było gromadzenie próbek chmielu z plantacji produkcyjnych zlokalizowanych we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce: lubelskim, wielkopolskim, dolnośląskim. Próbkę pobierano zarówno z odmian typu goryczkowego, jak i aromatycznego. Dodatkowo gromadzono próbki z kolekcji odmian chmielu utrzymywanej w IUNG — PIB w Puławach. Próbkę 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 w roku 2018 zgromadzono 905 próbek chmielu pochodzących z 32 plantacji produkcyjnych i kolekcji odmian IUNG — PIB. 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, HpSVd). Występowanie wirusa HpLV stwierdzono we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce (tab. 1).

Tabela 1

Występowanie wirusów i wiroidów w chmielu w Polsce						
Rejon uprawy	Patogen					
	HpLV			HSVd		
	Odmiana	WNP*	l. próbek	Odmiana	WNP*	l. próbek
Lubelski	Marynka	1	2		0	0
Wielkopolski	Marynka	1	2	Magnum	1	2
Dolnośląski	Hallertau Tradition	1	1		0	0
	Magnum	1	1			
Kol. IUNG — PIB		0	0		0	0
	Razem	4	6		1	2

* WNP — liczba plantacji na jakiej stwierdzono występowania patogena

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. Hop latent virus (HpLV) należy do rodzaju Carlavirus. Wirus ten pierwszy raz w historii został opisany już w latach sześćdziesiątych XX wieku (Schmidt, 1966). Obecnie znane są przypadki jego występowania we Francji (Eppler, 1989), Nowej Zelandii (Hay i in., 1992), Australii (Pethybridge, 2000), Chinach (Yu i Liu, 1987), Południowej Afryce (Von Weschmar i in., 1989) i Japonii (Kanno i in., 1993). Zakażenie chmielu tym wirusem jest niebezpieczne ponieważ nie wywołuje żadnych widocznych objawów przez co może rozprzestrzeniać się na plantacji w sposób niekontrolowany. (Ziegler, i in., 2014). Wirus przenoszony jest przez mszyce w sposób nietrwały. Głównym wektorem jest mszyca śliwowo-chmielowa (*Phorodon humuli*) (Adams i Barbara, 1982). Inne wektory, to mszyca brzoskwiniowo-ziemniaczana (*Myzus persicae*) i mszyca ziemniaczana (*Macrosiphum euphorbiae*) (Crowle i in., 2006). HpLV nie ma innych poza chmielem naturalnych gospodarzy. Na podstawie badań przepro-

wadzonych w 2018 r. występowanie HpSVd stwierdzono, tylko w wielkopolskim rejonie uprawy chmielu, na jednej plantacji produkcyjnej na odmianie Magnum. Podobnie jak w przypadku HpLV, HpSVd wykryto w próbkach gromadzonych w drugim i trzecim terminie. *Hop stunt viroid* (HpSVd) należy do rodzaju *Hostuviroid*. HpSVd po raz pierwszy został odkryty w Japonii już w latach siedemdziesiątych XX wieku, kolejne doniesienia mówiły o jego występowaniu w Korei Południowej i USA (Yamamoto i in., 1973; Sano, 1989; Lee i in., 1990; Pethybridge, 2008). W roku 2012 po raz pierwszy stwierdzono jego występowanie w Europie (Radisek i in., 2012). HSVd powoduje zahamowanie wzrostu porażonych roślin, co w efekcie prowadzi do spadku plonów i obniżenia zawartości alfa-kwasów (Sano, 2003). Typowym objawem zakażenia jest zwijanie i żółknięcie liści oraz wytwarzanie małych szyszek. Zahamowanie wzrostu roślin obserwuje się po 3–5 lat od zakażenia (Eastwell i Nelson, 2007). Podobnie jak inne wiroidy przenoszony jest w sposób mechaniczny. Posiada wielu gospodarzy: śliwy, brzoskwinie, cytrusy i winorośl (Sano i in., 1989, Diener i in., 1988, Matoušek i in., 2003), które mogą być rezerwuarem patogena. Ogółem w 2018 r., HpLV wykryto w 6 próbkach pochodzących z 4 plantacji produkcyjnych, natomiast HpSVd w 2 próbkach pochodzących z jednej plantacji produkcyjnej. W żadnej z badanych próbek nie stwierdzono obecności wirusa mozaiki gęsiówki (*Arabid mosaic virus*, ArMV), wiroida wyboistości jabłek (*Apple fruit crinkle viroid*, AFCVd) oraz wiroida pęknięcia kory cytrusowych (*Citrus bark cracking viroid*, CBCVd). Monitoring występowania chorób wirusowych u roślin jest bardzo istotnym działaniem mającym wspierać wczesne wykrywanie zagrożeń i zapobieganie późniejszemu rozprzestrzenianiu się chorób. Należy podkreślić, że uzyskane wyniki wskazują, że największym zagrożeniem upraw chmielu w Polsce są HpLV i HpSVd. Pomimo niestwierdzenia obecności CBCVd, AFCVd i ArMV nie można wykluczyć, że ten problem nie istnieje szczególnie, że zakażenia tymi patogenami są znane w Europie (Pethybridge, 2008, Radisek, 2012). Ponieważ nieznaną są genetyczne źródła odporności na HpLV i HpSVd, dlatego tak ważne jest utrzymywanie wysokiej zdrowotności plantacji poprzez stosowanie wysokiej jakości materiału sadzonkowego i przestrzeganie zaleceń fitosanitarnych, co będzie zabezpieczało plantacje przed zakażeniem, a potem rozprzestrzenianiem się infekcji.

WNIOSKI

1. Opracowane protokoły wykrywania poszczególnych wirusów i wiroidów umożliwiają detekcję wszystkich badanych patogenów.
2. Na plantacjach chmielu w Polsce w roku 2018 nie stwierdzono występowania ArMV, AFCVd i CBCVd.
3. Występowanie HpLV na plantacjach produkcyjnych stwierdzono we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce.
4. HpSVd wykryto na jednej plantacji produkcyjnej w rejonie wielkopolskim.

LITERATURA

- Adams A. N., Barbara D. J. 1982. Host range, purification and some properties of two Carla viruses from hop (*Humulus lupulus*): hop latent and American hop latent. *Ann. Appl. Biol.* 101 (3): 483 — 494.
- Crowle D. R., Pethybridge S. J., Wilson C. R. 2006. Transmission of hop latent and hop mosaic carlaviruses by *Macrosiphum euphorbiae* and *Myzus persicae*. *J. Phytopathol.* 154: 745 — 747.
- Diener T. O., Smith D. R., Hammond R. H., Albanese G., Larosa R., Davino M. 1988. Citrus-B viroid identified as a strain of hop stunt viroid. *Plant Dis.* 72: 691 — 693.
- Eastwell K. C., Nelson, M. E. 2007. Occurrence of viroids in commercial hop (*Humulus lupulus* L.) production areas of Washington State. Online. *Plant Health Progress*, DOI: 10.109/PHP2007-1127-01-RS.
- Eppler A. 1989. Presence of viruses in the hop growing region of Alsace (France). Page 209 in: *Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis.* Giessen.
- Hay F. S., Close R. C., Fletcher J. D., Ashby J. W. 1992. Incidence and spread of viruses in hop (*Humulus lupulus* L.) in New Zealand. *N.Z. J. Crop Hortic. Sci.* 20:319 — 327.
- Kanno Y., Yoshikawa N., Takahashi T. 1993. Some properties of hop latent and apple mosaic viruses isolated from hop plants and their distributions in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59: 651 — 658.
- Lee J. Y., Lee S. H., Sanger H. L. 1990. Viroid diseases occurring on Korean hop plants. *Korean J Plant Pathol.* 6: 256 — 260.
- Matoušek J., Orctova L., Patzak J., Svoboda P., Ludvikova I. 2003. Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant, Soil Environ.* 49 (4): 168 — 175.
- Pethybridge S. J., Hay F. S., Barbara D. J., Eastwell K. C., Wilson C. R. 2008. Viruses and Viroids Infecting Hop: Significance, Epidemiology, and Management, *Plant Dis.* 92 (3): 324 — 338.
- Pethybridge S. J., Wilson C. R., Sherriff L. J., Leggett G. W., Munro D. 2000. Virus incidence in Australian hop (*Humulus lupulus* L.) gardens and cultivar differences in susceptibility to infection. *Aust. J. Agric. Res.* 51: 685 — 689.
- Radisek S., Majer A., Jakse J., Javornik B., Matoušek J. 2012. First Report of Hop stunt viroid Infecting Hop in Slovenia, *Dis. Notes* 96 (4): 592.
- Sano T. 2003. Hop stunt viroid. In: Hadidi A, Flores R., Randles J. W., Semancik J. S. (eds.): *Viroids*. Collingwood, Australia, CSIRO Press: 207 — 212.
- Sano T., Hataya T., Terai Y., Shikata E. 1989. Hop stunt viroid strains from dapple fruit disease of plum and peach in Japan. *J. Gen. Virol.*, 70: 1311 — 1319.
- Schmidt H. E. 1966. Mechanical transmission of a rod-shaped Hop virus to herbaceous test plants. *Zentralbl. Bakteriol. B* 120: 461 — 466.
- 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 of grapevine leafroll-associated virus 3 in grapevine cultivars. *Plant Pathol.* 61: 977 — 985.
- Von Weschmar W. B., Brits G., Coleman T. 1989. Viruses in hops and aspects of virus epidemiology and hop production in South Africa at 34° southern latitude. *Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis.* Giessen: 33 — 42.
- 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. *J. Virol. Methods* 101 (1–2): 63 — 69.
- Yamamoto H., Kagami Y., Kurokawa M., Nishimura S., Ukawa S., Kubo S. 1973. Studies on hop stunt disease in Japan. *Rep. Res. Lab. Kirin Brewery Co., Ltd.* 16: 49 — 62.
- Yu J., Liu Y. 1987. The occurrence of three viruses in hop (*Humulus lupulus* L.) in China. *Plant Pathol.* 36: 38 — 44.
- 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 Kultur Pflanzen* 66 (7): 248 — 254.

ELŻBIETA CZEMBOR**WŁODZIMIERZ MAJTKOWSKI****JAN SCHMIDT****SEWERYN FRASIŃSKI****DAMIAN MARCINIAK**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: dr hab. Elżbieta Czembor prof. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy

Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, tel. 607 131 140, e-mail: e.czembor@ihar.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.802.19.2018, Zadanie nr 36.

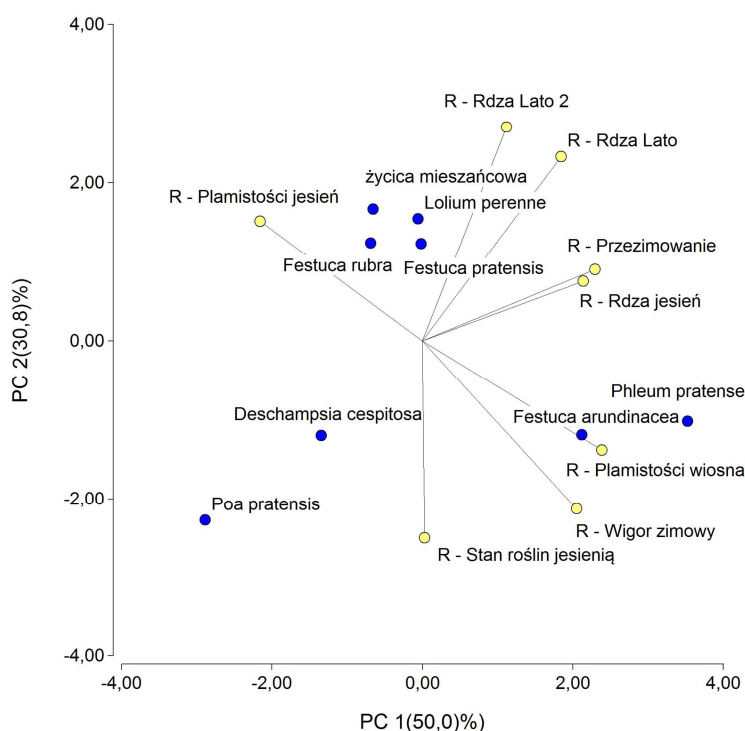
Gromadzenie i ocena kolekcji ekotypów traw wieloletnich z uwzględnieniem cech warunkujących ich wykorzystanie na cele alternatywne

Creation perennial grasses ecotypes collection and evaluation their suitability for the special purposes

Słowa kluczowe: ekotypy, rekultywacja, trawy wieloletnie

Obecnie dużą uwagę przywiązuje się do funkcji nieprodukcyjnych traw wieloletnich, które ściśle wiążą się z zagospodarowaniem terenów ekologicznych, porolnych, zdegradowanych, parków, terenów rekreacyjnych i zurbanizowanych. Na terenach odłogowanych szybko pojawiają się chwasty, głównie dwuliścienne, a następnie ulegają one zakrzaczeniu. Charakterystyka zmienności genetycznej w obrębie różnych kolekcji ekotypów zebranych na terenie Polski dla ważnych cech gospodarczych, prowadzona jest od wielu lat i wyniki tych badań zostały opisane w pracach, takich jak: Czembor i in. (2001 a, b, 2002 a, b), Czembor (2003, 2004). W ramach bieżących prac do badań włączono dwie kolekcje traw wieloletnich, łącznie ponad 250 obiektów. Obie kolekcje charakteryzowano w warunkach polowych w użytkowaniu kośnym i nasiennym oraz w warunkach kontrolowanych pod względem odporności na niskie pH gleby oraz niedobór wody.

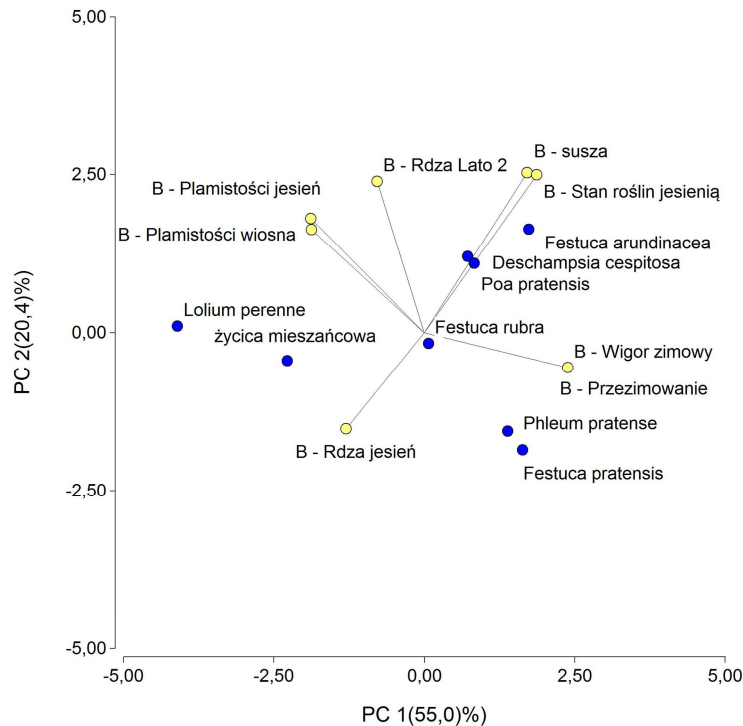
Cele szczegółowe realizowane w roku 2018 to: (1) poznanie zmienności w obrębie Kolekcji II ekotypów kostrzewy czerwonej, łąkowej i trzcinowej, śmiałka darniowego, tymotki łąkowej, wiechlina łąkowej i życicy trwałej w użytkowaniu kośnym i nasiennym w trzecim roku pełnego użytkowania oraz (2) założenie doświadczeń w siewie gęstym w użytkowaniu nasiennym i kośnym dla ekotypów z Kolekcji I i Kolekcji II, które zostały wytypowane do dalszych badań jako te, które charakteryzowały się podwyższoną odpornością na stesy biotyczne i abiotyczne zarówno w warunkach polowych na przestrzeni lat, jak i w warunkach szklarniowych, wysokim potencjałem plonowania w użytkowaniu kośnym i nasiennym w siewie gęstym oraz ich charakterystyka w roku startowym.



Rys. 1. Odporność gatunków badanych w ramach kolekcji II na stesy biotyczne i abiotyczne w trzecim roku pełnego użytkowania w Radzikowie w układzie dwóch pierwszych składowych głównych

W trzecim roku pełnego użytkowania w grupie cech świadczących o odporności roślin na stesy biotyczne i abiotyczne oceny wigoru roślin w okresie zimowym i po zimie oraz oceny stopnia odporności na rdze w okresie jesiennym w sposób najbardziej istotny różnicowały badany materiał roślinny. Stopień odporności na rdze w okresie jesiennym w sposób istotny wpływał na stan roślin przed zimą. W trzecim roku pełnego użytkowania gatunkami najbardziej podatnymi na rdze były wiechlina łąkowa, i śmiełek darniowy, podobnie jak i w drugim roku pełnego użytkowania (rys. 1, 2). Zakres

zmienności dla tej cechy był największy w obrębie kostrzewy łąkowej i pozwalał wyodrębnić genotypy średnio odporne. 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. Wyjątkiem była wiechlina łąkowa, w obrębie której zakres zmienności na rdze był niski.



Rys. 2. Odporność gatunków badanych w ramach kolekcji II na stresy biotyczne i abiotyczne w trzecim roku pełnego użytkowania w Bydgoszczy w układzie dwóch pierwszych składowych głównych

W roku startowym potwierdzono, że wiechlina łąkowa to gatunek, którego okres wschodów jest najdłuższy w grupie traw wieloletnich, i która jest szczególnie narażona na niekorzystne warunki środowiskowe. Zdolność kiełkowania nasion śmiałka darniowego była niska i wschody słabe. Kostrzewa łąkowa, kostrzewa trzcinowa i życica trwała to gatunki, których zdolność kiełkowania była wysoka, szybko krzewiły się a ich stan przed zimą określono jako dobry.

LITERATURA

- Czembor E. 2003. Resistance of Kentucky bluegrass (*Poa Pratensis* L.) ecotypes from Polish Gene Bank to melting out (*Drechslera poae*) under field conditions in 1998–2000. Genet. Res. Crop Evol. 50: 747 — 756.

- Czembor E. 2004. Resistance of Kentucky bluegrass ecotypes to melting out (*Drechslera poae*) under greenhouse conditions. *Australasian J. Phytopathology* 33: 437 — 439.
- Czembor E., Feuerstein U., Żurek G. 2001 a. Powdery mildew resistance in Kentucky bluegrass ecotypes from Poland. *Plant Breed. Seed Sci.* 45 (2): 21 — 27.
- Czembor E., Feuerstein U., Żurek G. 2001 b. Preliminary observations on resistance of Kentucky bluegrass ecotypes from Poland to rust diseases. *J. Phytopathol.* 149: 83 — 89.
- Czembor E., Feuerstein U., Żurek G. 2002 a. Diversity of Polish ecotypes of Kentucky bluegrass in green mass production. In: "Broad Variation and Precise Characterization — Limitation for the Future" Świącicki W. K., Naganowska B., Wolko B. (eds.), IGR, IPGRI, IHAR, Poznań, Poland: 307 — 309.
- Czembor E., Feuerstein U., Żurek G. 2002 b. Some characteristics of Kentucky bluegrass ecotypes from Poland. In: "Broad Variation and Precise Characterisation — Limitation for the Future" Świącicki W. K., Naganowska B., Wolko B. (eds.), IGR PAN, IPGRI, IHAR, Poznań, Poland: 310 — 311.

ARKADIUSZ KOSMAŁA¹
ADAM AUGUSTYNIAK¹
DAWID PERLIKOWSKI¹
IZABELA PAWŁOWICZ¹
WŁODZIMIERZ ZWIERZYKOWSKI¹
AGNIESZKA PŁAŻEK²
EUGENIUSZ PASZKOWSKI³

¹ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk

² Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

³ DANKO Hodowla Roślin

Kierownik Tematu: dr hab. Arkadiusz Kosmała Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań, tel. 61 6550285, e-mail: akos@igr.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.802.18.2018, Zadanie nr 35.

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*

Słowa kluczowe: cor14b, mrozoodporność, odporność na choroby, odporność na suszę, trawy, Wcor80, zimotrwałość

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

Trawy pastewne, a pośród nich kostrzewy (*Festuca*) i życice (*Lolium*) są doskonałymi gatunkami do badań molekularnej kontroli cech związanych z tolerancją stresów środowiskowych. *Lolium multiflorum* Lam. (życica wielokwiatowa) to gatunek trawy o wysokiej jakości paszowej, lecz niskiej tolerancji stresów abiotycznych i biotycznych. Z kolei *F. pratensis* Huds. (kostrzewa łąkowa) i *F. arundinacea* Schreb. (kostrzewa trzinowa) — charakteryzują się wysokim stopniem odporności na patogeny oraz tolerancji mrozu, suszy i wysokiego zasolenia (Kosmała i in., 2006, 2009, 2012). Gatunki *Lolium* i *Festuca* krzyżują się ze sobą. Stwarza to możliwość przeniesienia korzystnych

cech z gatunków jednego rodzaju do gatunków drugiego rodzaju na drodze krzyżowania. Alloheksaploidalny gatunek *F. arundinacea* wykorzystywany jest głównie jako źródło genów tolerancji suszy (Kosmala i in. 2012; Perlikowski i in., 2016 a, b; Augustyniak i in., 2018). *Festuca pratensis* jest z kolei gatunkiem wykorzystywanym jako źródło genów tolerancji mrozu (Kosmala i in., 2006, 2009). Wykazano również, że dzięki obecności sub-genomu kostrzewy łąkowej w genomie kostrzewy trzcinowej, ten drugi gatunek może być także doskonałym źródłem genów odpowiedzialnych za zimotrwałość, w tym mrozoodporność (Kosmala i in., 2007; Augustyniak i in., 2018). W niniejszym zadaniu badawczym prowadzone są prace zmierzające do selekcji genotypów, które wykazują stosunkowo wysoki poziom tolerancji sekwencji stresów susza/zima i odporności na podstawowe choroby oraz do wyznaczenia fizjologicznych i molekularnych wskaźników tolerancji/odporności na analizowane stresy abiotyczne i biotyczne. Odporność na suszę jest cechą poligeniczną i wielokomponentową. Na szczególną uwagę w przypadku badania mechanizmów tej odporności u roślin zasługują jej trzy główne komponenty — unikanie suszy (ang. drought avoidance), tolerancja suszy (ang. drought tolerance) i regeneracja po ustąpieniu warunków stresowych (ang. recovery). W niniejszym zadaniu badawczym analizowano wszystkie trzy komponenty odporności na suszę. Ważnym czynnikiem wpływającym na plonowanie roślin jest również potencjał ich odporności na stresy biotyczne, w tym choroby grzybowe i wirusowe (Płażek i in., 2018). Podstawowe cele badań w roku 2018 obejmowały:

- analizę profilu akumulacji transkryptów, kodujących *Cor14b* dla dwóch wyselekcjonowanych form introgresywnych *L. multiflorum/F. arundinacea*, różniących się potencjałem mrozoodporności,
- analizę profilu akumulacji białek *Wcor80* i *Cor14b* dla dwóch wyselekcjonowanych form introgresywnych *L. multiflorum/F. arundinacea*, różniących się potencjałem mrozoodporności,
- przeprowadzenie testów tolerancji suszy polowej w eksperymencie „pod daszkami” form introgresywnych (BC6),
- ocenę stopnia podatności roślin na podstawowe choroby (w okresie letnim i jesiennym).

Materiał badawczy do analiz molekularnych (ekspresja genu *cor14b* i poziom akumulacji białek *Wcor80* i *cor14b*) stanowiły dwie formy introgresywne pokolenia BC5 *L. multiflorum/F. arundinacea* wyselekcjonowane w roku 2015 — forma o stosunkowo wysokim potencjale mrozoodporności (180/30/138) i forma o stosunkowo niskim potencjale odporności (180/30/19). Analizy prowadzono w 5 punktach czasowych: warunki kontrolne, 3, 7, 14 i 21 dzień hartowania na mróz (cele badawcze nr 1 i 2). Materiał badawczy do realizacji celu nr 3 i 4 stanowiły cztery populacje form introgresywnych pokolenia BC6 *L. multiflorum/F. arundinacea* (185/4, 6, 10 i 12) oraz populacja roślin kontrolnych *L. multiflorum* odm. Atos.

OPIS WYNIKÓW

Uzyskano dwa profile akumulacji transkryptu dla genu *cor14b* — jeden dla formy introgresywnej 180/20/138 i jeden dla formy introgresywnej 180/30/19. W trakcie trwania hartowania na mróz obserwowano stopniowy wzrost ekspresji genu *cor14b* u obu analizowanych form, aż do piątego dnia hartowania. Następnie obserwowano spadek poziomu akumulacji transkryptu. W trakcie hartowania na mróz, poziom transkrypcji genu *cor14b* był zawsze wyższy u formy introgresywnej 180/30/138.

Uzyskano cztery profile akumulacji białek: (i) dwa profile akumulacji białka Wcor80 — jeden dla formy introgresywnej 180/20/138 i jeden dla formy introgresywnej 180/30/19 oraz (ii) dwa profile akumulacji białka Cor14b. Zaobserwowano istotne różnice międzygenotypowe w poziomie akumulacji białek Wcor80 i Cor14b u form introgresywnych o różnym poziomie mrozoodporności.

Na podstawie średnich wartości badanych parametrów plonowania dla poszczególnych populacji, stwierdzono, że najwyższym potencjałem tolerancji warunków suszy cechowała się populacja form introgresywnych 185/4 (bonitacja 6,1; sucha masa 11,2 g; zielona masa 69,5 g). Natomiast najniższym stopniem tolerancji — populacja form introgresywnych 185/12 (bonitacja 4,3; sucha masa 6,9 g; zielona masa 41,5 g). Średnie parametry plonowania uzyskane dla populacji 185/12 były istotnie niższe w odniesieniu do średnich parametrów plonowania uzyskanych dla populacji form kontrolnych *L. multiflorum* odm. Atos (bonitacja 4,7; sucha masa 9,1 g; zielona masa 49,3 g). Pozostałe dwie badane populacje form introgresywnych, 185/6 i 185/10, cechowały się średnimi wyższymi w odniesieniu do populacji roślin kontrolnych, lecz niższymi w stosunku do populacji 185/4. Jednocześnie obserwowano stosunkowo szeroki zakres tolerancji warunków suszy w obrębie poszczególnych analizowanych populacji roślin.

W czerwcu na roślinach uprawianych w namiotach odnotowano występowanie głównie mączniaka traw. Porażenie to nie było duże, głównie w stopniu 1 i 2, w skali 0–5. W roku 2018 odnotowano zdecydowanie więcej przypadków porażenia wirusem (98 roślin), powodującym żółte smugi liści, w porównaniu do lat wcześniejszych, ale porażenie to występowało tylko w stopniu 1–2; u kilku roślin w stopniu 3 i 4.

Na podstawie średnich wartości badanych parametrów plonowania dla poszczególnych populacji, stwierdzono, że najwyższym potencjałem regeneracji po ustąpieniu suszy cechowała się populacja form introgresywnych 185/4 (odrost 4,4; sucha masa 5,9 g; zielona masa 35,8 g). Natomiast najniższym stopniem regeneracji — populacja form introgresywnych 185/12 (odrost 2,2; sucha masa 1,7 g; zielona masa 10,6 g). Średnie parametry plonowania uzyskane dla populacji 185/12 były istotnie niższe w odniesieniu do średnich parametrów plonowania uzyskanych dla populacji form kontrolnych *L. multiflorum* odm. Atos (odrost 2,3; sucha masa 1,8 g; zielona masa 10,7 g). Pozostałe dwie badane populacje form introgresywnych, 185/6 i 185/10, cechowały się średnimi wyższymi w odniesieniu do populacji roślin kontrolnych, lecz niższymi w stosunku do populacji 185/4. Jednocześnie obserwowano stosunkowo szeroki zakres regeneracji roślin po ustąpieniu warunków suszy w obrębie poszczególnych analizowanych populacji. Ponadto, w każdej z badanych

populacji roślin były genotypy zarówno o stosunkowo wysokim poziomie regeneracji po ustąpieniu warunków suszy, jak i genotypy o stosunkowo niskim poziomie regeneracji.

Druga ocena porażenia przeprowadzona jesienią (po wtórnym nawodnieniu) nie wykazała również, podobnie jak latem, występowania ostrych objawów chorobowych. Rośliny uprzednio traktowane suszą wykazywały niewielkie porażenie mączniakiem i plamistościami liści (ocena wahała się w granicach 1–3), natomiast w ogóle nie występowała na nich rdza. Zaobserwowane objawy wskazywały na sporadyczne występowanie na badanych roślinach takich grzybów, jak *Drechslera siccans*, *D. dictyoides* oraz *Bipolaris sorokiniana*.

WNIOSKI Z PROWADZONYCH BADAŃ

1. Profile relatywnej ekspresji genu *cor14b* w warunkach hartowania na mróz mogą być dobrym markerem tolerancji niskiej temperatury u form introgresywnych *L. multiflorum*/*F. arundinacea*.
2. Profile akumulacji białek Cor14b i Wcor80 w warunkach hartowania mogą być również dobrym markerem tolerancji niskiej temperatury u badanych form introgresywnych.
3. Wyselekcjonowano formy introgresywne BC₆ *L. multiflorum*/*F. arundinacea* o wysokim potencjale tolerancji suszy, regeneracji metabolizmu po ustąpieniu warunków suszy i odporności na choroby.

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.
- Perlikowski D., Kierszniowska S., Sawikowska A., Krajewski P., Rapacz M., Eckhardt Ä., Kosmala A. 2016. Remodeling of leaf cellular glycerolipid composition under drought and re-hydration conditions in grasses from the *Lolium-Festuca* complex. *Front. Plant Sci.* 7:1027. DOI: 10.3389/fpls.2016.01027.
- Perlikowski D., Czyżniejewski M., Marczak Ł., Augustyniak A., Kosmala A. 2016. Water deficit affects primary metabolism differently in two *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea* introgression forms with a distinct capacity for photosynthesis and membrane regeneration. *Front. Plant Sci.* 7:1063. DOI: 10.3389/fpls.2016.01063.
- 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.

GRZEGORZ ŻUREK¹**DANUTA MARTYNIAK**¹**KAMIL PROKOPIUK**¹**AGNIESZKA RACHWAŁSKA**²**EUGENIUSZ PASZKOWSKI**³**MACIEJ JURKOWSKI**⁴

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, Zakład Traw, Roślin Motylkowatych i Energetycznych

² Zakład Doświadczalny Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Grodkowice

³ DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.

⁴ Małopolska Hodowla Roślin, Sp. z o.o.

Kierownik Tematu: dr hab. Grzegorz Żurek prof. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, tel. 22 7334571, e-mail: g.zurek@ihar.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.802.19.2018, Zadanie nr 38.

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

Słowa kluczowe: *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, produktywność generatywna, wiechlina łąkowa, zmienność, życica trwała

WSTĘP

Cechy decydujące o zdolności reprodukcyjnej traw wieloletnich są ze sobą powiązane i zaburzenie jakiegokolwiek elementu tego złożonego procesu powoduje zachwianie potencjału reprodukcyjnego. Dla właściwej oceny wpływu wielu cech warunkujących efektywność reprodukcji generatywnej traw niezbędne jest określenie ich zmienności, a następnie zidentyfikowanie kierunku oraz siły zależności pomiędzy tymi cechami. Celem zadania w roku 2018 było określenie zróżnicowania wewnątrz- i międzyobiektowego badanych form traw wieloletnich w obrębie zestawu cech związanych z plonowaniem generatywnym, jak również wybranych cech fizjologicznych

jak np. zawartość azotu w liściach, określana pośrednio za pomocą pomiaru zawartości chlorofilu w pierwszym pełnym roku wegetacji traw.

MATERIAŁ I METODA

Badano 14 obiektów w dwóch gatunkach: wiechlinie łąkowej (*Poa pratensis* L.): odmiany Alicja, Balin, Bila, Compact, Limagie i rody: NI-400, NI-401 oraz życicy trwałej (*Lolium perenne* L.): Amarant 4n, Bajka 2n, Brawa 4n, Nira 2n i rody: DS-117, NI-402, NI-403. Badania realizowano w układzie doświadczenia ścisłego 3-powtórzeniowego w 4 lokalizacjach w kraju: Radzików, Szelejewo, Nieznanice i Grodkowice. Oceniano 50 roślin na obiekt w ramach każdego z 3 powtórzeń w każdej z lokalizacji, pod względem 18 cech: przezimowanie, pokrój, początek kłoszenia i kwitnienia, szacunkowy plon zielonej masy w pełni kłoszenia, wysokość roślin w pełni kwitnienia, długość i szerokość liścia podflagowego, względna zawartość chlorofilu, zawartość azotu w roślinach, liczba pędów generatywnych na roślinie, plon nasion z kwiatostanu, plon nasion z rośliny, plon nasion z poletka, długość kwiatostanu, osypywanie nasion, ciężar 1000 nasion oraz zdolność kiełkowania.

WYNIKI I DYSKUSJA

Czynnikiem niezbędnym dla wykształcenia odpowiedniej ilości żywotnych nasion są opady, rozmieszczone równomiernie na wiosnę oraz wczesnym latem (Griffiths i in., 1978). Warunki panujące w sezonie wegetacyjnym 2018 były przeciwieństwem takiego wzorcowego układu. Na wiosnę było sucho i chłodno a w lipcu i sierpniu — bardzo mokro. Miało to istotne znaczenie dla stopnia ekspresji poszczególnych badanych cech.

W przypadku wiechliny łąkowej, stwierdza się dominujący wpływ genotypu jako nośnika genetycznych cech plonowania nasiennego oraz istotną zależność plonu nasion od interakcji genotypowo-środowiskowej (Godshalk i in., 1998). W niniejszych badaniach w roku 2018 zanotowano taką interakcję dla długości kwiatostanu, liczby pędów generatywnych oraz plonu nasion z rośliny. Obiektem o najwyższych plonach nasion, ze znaczną liczbą pędów generatywnych była odmiana Compact (średnio 14,4 grama nasion z rośliny, 217 pędów generatywnych). Nieco mniej zanotowano dla Ni-401 oraz Limagie (odpowiednio: 13,4 grama nasion i 221 pędów oraz 11,1 g nasion i 187 pędów).

Wiechlina łąkowa, z racji systemu rozmnażania zwanego apomiksją fakultatywną, uważana jest z gatunek mało zmienny w obrębie genotypów oraz bardziej zmienny pomiędzy genotypami (Huff, 2010). Zależność ta potwierdziła się w roku 2018 dla odmiany Compact oraz Limagie dla kilku cech. Jednakże dla obiektów, takich jak Alicja i Balin zanotowano zależność odwrotną. Podobnie było dla Ni-400 oraz Ni-401, co można wytłumaczyć trwającymi w tych rodach pracami hodowlanymi, które mają dopiero doprowadzić do ich ujednolicenia.

U życicy trwałej rośliny o najdłuższych kwiatostanach wytworzyły: odmiana Amarant (średnio 22,1 cm) oraz ród DS.-117 (średnio 22,0 cm). Dłuższe kwiatostany miały odmiany tetraploidalne (Amarant i Brawa — średnio 21,9 cm) w porównaniu do odmian

diploidalnych (Bajka i Nira — średnio 16,9 cm). To jednak nie przekładało się na różnice w liczbie pędów generatywnych, których u odmian diploidalnych było więcej średnio o 60 sztuk na roślinę w porównaniu do odmian tetraploidalnych. Największe ilości pędów generatywnych na roślinę stwierdzono w Szelejewie (średnio 269), natomiast najmniejsze — w Radzikowie i Nieznanicach (średnio 178 i 179). Najwyższe plony nasion z rośliny stwierdzono dla odmiany Amaran (średnio 23,6 g), natomiast najniższe — dla rodu Ni-402 (12,8 g). Najlepiej badane obiekty plonowały w Radzikowie (średnio 21,4 g nasion na roślinę) a najgorzej w Nieznanicach (średnio 7,5 g nasion na roślinę).

Zmienność wewnątrzobiektoowa odmian życicy trwałej Bajka i Brawa była niższa od zmienności międzyobiektowej po względem: przezimowania, szacunkowego plonu biomasy, zawartości chlorofilu i azotu (Bajka) oraz pokroju, liczba dni do kłoszenia (Brawa) jak również liczby dni do kwitnienia (obydwie odmiany). Zmienność wewnątrz obiektoowa rodów przewyższała zmienność między obiektową. Dotyczyło to zwłaszcza rodu DS.-117 w cechach: przezimowanie, liczba dni do kwitnienia, długość liścia podflagowego, zawartość chlorofilu i azotu.

Pod względem cech bezpośrednio związanych z plonowaniem nasiennym porównanie zmienności międzyobiektowej i wewnątrzobiektowej wskazuje na większą zmienność pomiędzy badanymi obiektami niż wewnątrz nich w cechach takich jak: liczba pędów generatywnych, plon nasion z poletka oraz masa tysiąca nasion. Z kolei dla plonu nasion z kwiatostanu stwierdzono relację odwrotną. W przypadku rodów Ni-402 oraz Ni-403 stwierdzono przewagę zmienności wewnątrzobiektowej nad międzyobiektową dla liczby pędów generatywnych, plonu nasion z kwiatostanu oraz długości kwiatostanu.

Dla określenia, które z ocenianych w 2018 roku cech związane były najsilniej z plonowaniem nasiennym, przeprowadzono analizę regresji wielokrotnej, metodą krokową wsteczną (tab. 1).

Tabela 1

Współczynniki analizy regresji wielokrotnej dla plonu nasion z rośliny

Cecha/predyktor	<i>Lolium perenne</i>			<i>Poa pratensis</i>		
	b *	b	p	b *	b	p
Liczba pędów generatywnych	0,436	0,055	0,000	0,783	0,055	0,000
Plon nasion z kwiatostanu	0,459	71,109	0,000	0,595	87,733	0,000
Szacunkowy plon zielonej masy	0,089	1,095	0,061	0,150	0,504	0,017
Wysokość roślin	0,152	0,066	0,008	-	-	-
Długość liścia	0,284	0,692	0,016	-0,171	-0,887	0,008
Długość kwiatostanu	0,165	0,347	0,132	-0,076	-0,228	0,262
Zawartość azotu	-0,031	-1,099	0,606	0,038	2,136	0,360
Przezimowanie	-0,108	-0,840	0,032	0,101	0,359	0,045
Szerokość liścia	0,134	1,628	0,017	-0,164	-1,307	0,238
Pokrój roślin	-0,136	-1,032	0,007	-	-	-
Liczba dni do kwitnienia	-0,172	-0,404	0,003	-0,066	-0,126	0,137
R ² skorygowane		0,744			0,831	
p		0,000			0,000	
Błąd estymacji		3,891			1,998	

Objaśnienie:

W tabeli podano współczynniki regresji standaryzowane (b*), niestandaryzowane (b) oraz istotność (p) poszczególnych predyktorów

Uzyskane wyniki wskazują na różną liczbę cech, których zmienność jest najsilniej związana ze zmiennością plonu nasion z rośliny. Dla życicy trwałej takich cech było 11, a dla wiechliny łąkowej — 9. Cechami o zmienności najsilniej związanej ze zmiennością plonu nasion z rośliny badanych obiektów życicy trwałej były: liczba pędów generatywnych, plon nasion z kwiatostanu oraz długość liścia. Nieco mniejsze wartości parametru b skorygowanego stwierdzono dla: wysokości roślin, długości kwiatostanu i szerokości liścia. Zależność pomiędzy wielkością aparatu fotosyntetycznego (szerokość i długość liścia) a plonem nasion stwierdzono już w badaniach nad kostrzewą łąkową (Fang i in., 2004). W przypadku wiechliny łąkowej takich zależności nie stwierdzono w roku 2018. Dla tego gatunku cechą o najwyższej wartości parametru b skorygowanego była liczba pędów generatywnych. Nieco niższą wartość tego parametru obliczono dla plonu nasion z kwiatostanu, szacunkowego plonu zielonej masy oraz długości liścia (dla tej cechy relacja ujemna).

W roku 2018 stwierdzono również dodatnią, istotną statystycznie wartość współczynnika korelacji pomiędzy zawartością azotu w roślinach życicy trwałej a plonem nasion z kwiatostanu (tab. 2). Dla pełniejszej analizy tego typu zależności niezbędne są kolejne lata badań.

Tabela 2

Średnie wartości zawartości azotu w roślinach, plonu nasion oraz współczynniki korelacji między tymi cechami

Nazwa odmiany / Numer rodu	Zawartość azotu (%)		Plon nasion z:			
	X _{śr.}	S _e	kwiatostanu (g) :		poletka (kg):	
			X _{śr.}	S _e	X _{śr.}	S _e
<i>Życica trwała (Lolium perenne L.)</i>						
Amarant	1,36	0,03	0,15	0,017	1,19	0,14
Bajka	1,14	0,02	0,09	0,011	0,93	0,12
Brawa	1,32	0,032	0,13	0,011	0,96	0,12
Nira	1,17	0,045	0,11	0,022	0,8	0,08
DS.-117	1,62	0,061	0,11	0,011	0,81	0,1
Ni-402	1,16	0,025	0,07	0,009	0,64	0,06
Ni0403	1,10	0,043	0,07	0,012	0,9	0,13
Współczynniki korelacji zawartości azotu z:			plonem nasion z kwiatostanu		plonem nasion z poletka	
			0,268 **		0,156 n.i.	
<i>Wiechlina łąkowa (Poa pratensis L.)</i>						
Alicja	1,27	0,021	0,08	0,005	0,3	0,03
Balin	1,16	0,024	0,08	0,007	0,29	0,02
Bila	1,22	0,017	0,11	0,009	0,24	0,03
Compact	1,22	0,016	0,08	0,012	0,49	0,04
Limagie	1,07	0,014	0,08	0,010	0,39	0,03
Ni-400	1,14	0,014	0,11	0,009	0,31	0,02
Ni-401	1,11	0,015	0,07	0,006	0,44	0,04
Współczynniki korelacji zawartości azotu z:			plonem nasion z kwiatostanu		plonem nasion z poletka	
			0,207 n.i.		-0,145 n.i.	

Objaśnienie:

X_{śr.} — wartość średnia cechy,

S_e — błąd standardowy,

** istotność wsp. korelacji na poziomie $\alpha > 0,05$

LITERATURA

- Fang C., Aamlid T. S., Jørgensen Ø., Rognli O. A. 2004. Phenotypic and genotypic variation in seed production traits within a full-sib family of meadow fescue. *Plant Breeding* 123: 241 — 246.
- Huff D. R. 2010. Bluegrasses. In: Boller B. (ed.) *Fodder Crops and Amenity Grasses. Handbook of Plant Breeding* 5, Springer Science+Business Media, LLC: 345 — 379.
- Godshalk E. B., Shenk J. S., Rincker C. M. 1984. Genotype, environment and genotype × environment interaction effects on orchardgrass seed and forage production. *Agronomy Abstracts*, ASA, Madison: p. 67.
- Griffiths D. J., Roberts H. M., Bean E. W., Lewis J., Pegler R. A. D., Carr A. J. H., Stoddart J.L. 1978. Principles of herbage seed production. Technical Bulletin no. 1. Welsh Plant Breeding Station, Plas Gogerddan near Aberystwyth, Wales: 1 — 149.

MAŁGORZATA KORBIN**SYLWIA KELLER-PRZYBYŁKOWICZ****AGNIESZKA MASNY****BOGUSŁAWA IDCZAK****KRYSTYNA STRĄCZYŃSKA**

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Małgorzata Korbin Instytut Ogródnictwa w Skierniewicach, Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin

ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice; +48 46 834 52 54; e-mail: sylwia.keller@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 74.

Badania nad saturacją mapy genetycznej ‘Elsanta’ × ‘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*)**

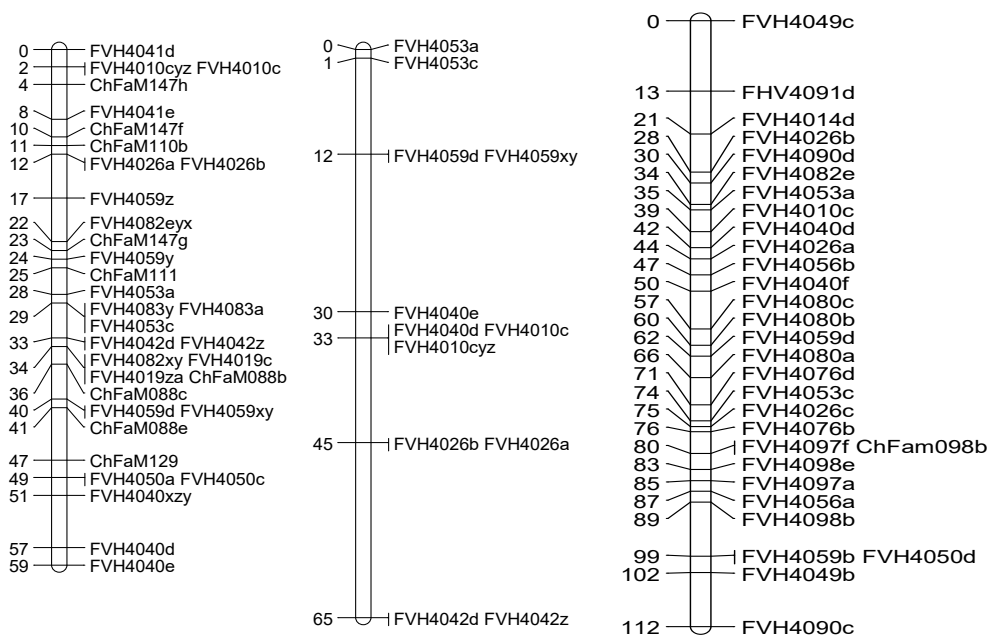
Słowa kluczowe: jakość owoców, korelacja fenotypowo-genotypowa, mapa genetyczna, QTL, stres suszy, truskawka

Celem badań było pozyskanie subpopulacji segregującej ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’ (oznaczonej jako subpopulacja G) i ocena fenotypowa roślin mieszańcowych należących do tej populacji pod kątem tolerancji na stres suszy, a także ocena wybranych parametrów jakości owoców pojedynków należących do przygotowanej do tego celu subpopulacji A utrzymywanej w kwaterze polowej. Pojedynki z subpopulacji G po ocenie czystości genetycznej włączono do populacji bazowej dla zagęszczenia mapy genetycznej (analizy molekularne), na bazie której przeprowadzono ocenę korelacji fenotypowo-genotypowych oraz analizę terminalną wytypowanych grup sprzężeń.

Rośliny mieszańcowe z populacji A (min. 100 genot.) i G (132 genot.) poddano analizie fenotypowej pod kątem parametrów jakości owoców (subpop. A) oraz wytrzymałości na deficyt wodny (subpop. G). Rozkład fenotypowy cechy tolerancji

na stres suszy oraz cech warunkujących jakość owoców wskazał na wystąpienie zjawiska segregacji w uzyskanej puli genotypów mieszańcowych.

Do analiz segregacji alleli markerów SSR w obrębie populacji mapującej wytypowano 100 starterów mikrosatelitarnych (Sargent, 2006, 2007, 2008, 2009, 2012; Zorrilla-Fontanesi, 2011). Na podstawie przeprowadzonych testów PCR-SSR, zidentyfikowano 583 alleli polimorficznych, segregujących w genomach roślin mieszańcowych (Van Ooijen, 2001). Uzyskana zintegrowana mapa genetyczna truskawki (2 386,5 cM) zawiera 76 grup sprzężeń, stanowiących fragmenty siedmiu chromosomów genomu gatunku *Fragaria* (rys. 1).



Rys. 1. Fragment zintegrowanej mapy genetycznej grupy sprzężeń 1 (homologia do chromosomu I) genomu gatunku *Fragaria* (analiza populacji ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’)

Ocenę korelacji fenotypowo-genotypowych w subpopulacjach badanych w latach 2014–2018 (A i G), przeprowadzono po potwierdzeniu statusu mieszańców (analiza polimorfizmu DNA po amplifikacji z 5 oligonuleotydami mikrosatelitarnymi). W wyniku przeprowadzonych testów z początkowej puli roślin mieszańcowych wyeliminowano 4 genotypy pochodzące z nieplanowanego zapylenia.

Analiza zależności pomiędzy *loci* alleli markerów SSR oraz wartościami ocenianych parametrów fenotypowych w roślinach mieszańcowych potwierdziła, że markery SSR zlokalizowane w grupie sprzężeń LG 2 genomów obu odmian wykazywały istotny stopień korelacji ze wszystkimi badanymi cechami (współ. korelacji $K^* = 2,2-11,2$). Ponadto, wysoki poziom wpływu odnotowano pomiędzy markerami zlokalizowanymi

w grupie sprzężeń LG 7 genomu odmiany ‘Senga Sengana’ ($K^* > 6$) oraz ‘Elsanta’ ($K^* > 9$) a cechą tolerancji roślin truskawki na stres suszy. Wysoki stopień korelacji ($K^* > 9$) dla cechy wytrzymałości na deficyt wody odnotowano także z markerami zlokalizowanymi w grupie LG 2 genomu odmiany ‘Elsanta’. Ponadto istotną zależność pomiędzy jędrnością owoców, zawartością ekstraktu oraz witaminy C a markerami zlokalizowanymi odpowiednio w grupach LG 4 (Vit. C i jędrność), 6 i 7 (Bix i Vit. C) zidentyfikowano w genomach obu badanych form rodzicielskich (Sujeet, 2017), (tab. 1).

Tabela 1

Zidentyfikowane regiony QTL w genomach odmian ‘Elsanta’ i ‘Senga Sengana’ oraz współczynnik korelacji (K^*) cechy z markerami zlokalizowanymi w grupach sprzężeń mapy genetycznej truskawki ($p = 0,05$)

LG	‘Elsanta’	‘Senga Sengana’	Badana cecha
LG 2	$K^* 11,2$	$K^* 11$	jakość owoców (wszystkie parametry)
LG 7	$K^* 9$	$K^* 6$	stres suszy
LG 4,	$K^* 4,5$	$K^* 8$	jędrność
LG 6, 7	$K^* 10$	$K^* 10,8$	zaw. ekstraktu, wit.C
LG 2	-	$K^* 9,6$	stres suszy

Na tym etapie badań wytypowano markery (FVH4076a, FVH4059z, ChFaM094xz, FVH4059z, ChFaM092, ChFv2013-13, ChFaM092) regulujące parametry warunkujące jakość owoców (dane z trzech sezonów badawczych), dla których odnotowano stabilną wartość współczynnika korelacji. Markery, te mogą stanowić bazę dla selekcji genotypów produkujących wysokiej jakości owoce truskawki, uzyskanych w programach hodowlanych.

Dodatkowo, na podstawie analiz segregacji 68 alleli 30 markerów SSR, różnicujących analizowane formy rodzicielskie przeprowadzono analizę terminalną wybranych regionów QTL. *Loci* segregujących alleli zidentyfikowano w obrębie 18 zmapowanych fragmentów chromosomów odmiany ‘Elsanta’ (383 cM) oraz piętnastu zmapowanych fragmentów chromosomów genomu odmiany ‘Senga Sengana’ (237 cM). Wydzielony region genomu ‘Elsanta’ zawiera 43 allele, a odmiany ‘Senga Sengana’ — 39 alleli markerów SSR.

WNIOSKI

1. Rozkład cech tolerancji na deficyt wody oraz wybranych cech warunkujących jakość owoców w badanej populacji wskazuje na wystąpienie zjawiska segregacji w puli genotypów mieszańcowych, a więc jest to właściwa dla badań genetycznych populacja mapująca.
2. Zagęszczona mapa genetyczna ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’ stanowi bazę *loci* genów przydatną do dalszej identyfikacji regionów QTL sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki.
3. Rozkład alleli pochodzących z form rodzicielskich wskazuje, że genotypy wykorzystane dla celów zagęszczania mapy genomów truskawki mają status mieszańców z planowanego zapylenia.

4. Wstępna analiza regionów QTL w grupach sprzężeń LG 2, 4, 6 i 7 genomów badanych odmian truskawki wskazuje na korelacje markerów z badanymi cechami użytkowymi tego gatunku.

LITERATURA

- Sargent D. J., Clarke J., Simpson D. W., Tobutt K. R., Arús P., Monfort A., Vilanova S., Denoyes-Rothan B., Rousseau M., Folta K. M., Bassil N. V., Battey N. H. 2006. An enhanced microsatellite map of diploid *Fragaria*. *Theor. Appl. Genet.* 112: 1349 — 1359.
- Sargent D. J., Rys A., Nier S., Simpson D. W., Tobutt K. R. 2007. The development and mapping of functional markers in *Fragaria* and their transferability and potential for mapping in other genera. *Theor. Appl. Genet.* 114: 373 — 384.
- Sargent D. J., Cipriani G., Vilanova S., Gil-Ariza D., Arús P., Simpson D. W., Tobutt K.R., Monfort A. 2008. The development of a bin mapping population and the selective mapping of 103 markers in the diploid *Fragaria* reference map. *Genome* 51: 120 — 127.
- Sargent D., Fernández-Fernández F., Ruiz-Roja J., Sutherland B., Passey A., Whitehouse A., Simpson D. 2009. A genetic linkage map of the cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) and its comparison to the diploid *Fragaria* reference map. *Mol. Breeding* 24 (3): 293 — 303.
- Sargent D. J., Passey T., Šurbanovski N., Girona L. L., Kuchta P., Davik J., Harrison R., Passey A., Whitehouse A. B., Simpson D. W. 2012. A microsatellite linkage map for the cultivated strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) suggests extensive regions of homozygosity in the genome that may have resulted from breeding and selection. *Theor. Appl. Genet.* 124: 1229 — 1240.
- Sujeet Verma, Zurn Jason D., Salinas Natalia, Mathey Megan M., Denoyes Beatrice, Hancock James F., Finn Chad E, Bassil Nahla V., Whitaker Vance M. 2017. Clarifying sub-genomic positions of QTLs for flowering habit and fruit quality in U.S. strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) breeding populations using pedigree-based QTL analysis. *Horticulture Research* 4, 17062; DOI:10.1038/hortres.2017.62.
- Van Ooijen J. W., Voorrips R. E. 2001. JoinMap (R) 3.0, Software for the calculation of genetic linkage maps. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands.
- Zorrilla-Fontanesi Y., Cabeza A., Torres A.M. 2011. Development and bin mapping of strawberry genic-SSRs in diploid *Fragaria* and their transferability across the Rosoideae subfamily. *Mol. Breed.*, 27: 137 — 156.

AGNIESZKA MASNY

MONIKA MIESZCZAKOWSKA-FRĄC

ANITA KURAS

EDWARD ŻURAWICZ

MAŁGORZATA KORBIN

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Kierownik Tematu: dr inż. Agnieszka Masny Instytut Ogrodnictwa, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych,

ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice, tel. 46 8345273; 501622880; e-mail: agnieszka.masny@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 76.

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

Słowa kluczowe: antocyjany, jakość owoców, kwas L-askorbinowy, polifenole, truskawka

Prace badawcze nad poszerzaniem zmienności genetycznej u truskawki obecnie ukierunkowane są głównie na poprawę zewnętrznej i wewnętrznej jakości owoców. Celem zadania jest 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 w obrębie rodzaju *Fragaria*.

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

W 2018 r. realizowano trzy podzadania (tematy badawcze), których celem była:

- ocena plonowania, jakości zewnętrznej i wewnętrznej owoców oraz podatności roślin na ważne gospodarczo choroby liści 180 mieszańców F_1 z rodzaju *Fragaria*, wyselekcjonowanych z populacji 12 451 siewek i rozmnożonych w latach 2016–2017;
- szczegółowa analiza zawartości wybranych związków z grupy polifenoli w owocach 30 genotypów, dla których wyniki podstawowej analizy składu chemicznego potwierdziły najwyższą zawartość w owocach polifenoli i antocyjanów ogółem;
- zweryfikowanie statusu mieszańca dla 20 genotypów z rodzaju *Fragaria*, wyselekcjonowanych w latach 2017–2018 roku ze względu na dużą zawartość związków polifenolowych i antocyjanów w owocach.

OPIS WYNIKÓW

W temacie pierwszym wykonano ocenę fenotypową cech jakości owoców badanych 180 klonów (pomiar ich wielkości, a także ocena bonitacyjna wielkości, atrakcyjności, kształtu, barwy i połysku skórki oraz jędrności), która pozwoliła na wyodrębnienie genotypów o najwyższych wartościach wymienionych cech. Są to: T-201426-03 (rodowód ‘Konfitura’ × ‘Grandarosa’), T-201428-02 (‘Konfitura’ × ‘Elsanta’), T-201430-01 (‘Madeleine’ × ‘Pink Rosa’), T-201436-04 i T-201436-05 (‘Onda’ × ‘Grandarosa’), T-201444-01 i T-201444-02 (‘Roxana’ × ‘Pink Rosa’), T-201457-10 i T-201457-16 (‘Grandarosa’ × ‘Elsanta’), T-201458-05 i T-201458-08 (‘Pink Rosa’ × ‘Elsanta’), T-201462-02 (*F. chiloensis* Del Norte × ‘Matis’), T-201501-03 (‘Alba’ × ‘Grandarosa’), T-201511-01 (‘Asia’ × ‘Panvik’), T-201512-05 (‘Camarosa’ × ‘Panvik’), T-201514-01 i T-201514-08 (‘Candiss’ × ‘Panvik’) oraz T-201536-03 (‘Clery’ × ‘Grandarosa’). Najwyższym poziomem kwasu askorbinowego w owocach (powyżej 75 mg/100 g) odznaczały się klony: T-201488-12, T-201488-07, T-201488-13 i T-201488-06 (‘Vibrant’ × ‘Matis’), T-201459-01 (*F. chiloensis* Del Norte × ‘Grandarosa’), T-201458-09 (‘Pink Rosa’ × ‘Elsanta’), T-201457-11 (‘Grandarosa’ × ‘Elsanta’), T-201436-01 (‘Onda’ × ‘Grandarosa’), T-201536-16, T-201536-08 i T-201536-06 (‘Clery’ × ‘Grandarosa’), T-201525-01 (‘Cifrance’ × ‘Panvik’), T-201560-02 (‘Onda’ × ‘Panvik’) oraz T-201501-03 (‘Alba’ × ‘Grandarosa’). Z kolei, najwyższym poziomem związków fenolowych (powyżej 180 mg/100 g) w owocach wyróżniały się genotypy: T-201486-04 (‘Camarosa’ × ‘Matis’), T-201458-01, T-201458-13, T-201458-07 i T-201458-06 (‘Pink Rosa’ × ‘Elsanta’), T-201424-04 (‘Honeoye’ × ‘Pink Rosa’) oraz T-201442-01 (‘Patty’ × ‘Elsanta’). Bardzo wysoką zawartość antocyjanów stwierdzono w owocach klonów T-201462-01 (*F. chiloensis* Del Norte × ‘Matis’), T-201488-07 (‘Vibrant’ × ‘Matis’), T-201437-01 (‘Onda’ × ‘Pink Rosa’), T-201444-01 (‘Roxana’ × ‘Pink Rosa’), T-201536-09 (‘Clery’ × ‘Grandarosa’), T-201506-02 (‘Alice’ × ‘Pink Rosa’), T-201508-01 (‘Alice’ × ‘Matis’), T-201514-02 i T-201514-08 (‘Candiss’ × ‘Panvik’), T-201512-03 (‘Camarosa’ × ‘Panvik’), T-201513-03 (‘Candiss’ × ‘Matis’) oraz T-201560-11 (‘Onda’ × ‘Panvik’).

W temacie drugim wykazano, że badane klony różniły się profilem antocyjanów, jednak zawsze dominującym związkiem był glukozyd-3-pelargonidyny, którego udział procentowy mieścił się w przedziale 66,7%–91,1%, następnym antocyjanem stanowiącym udział w przedziale 1,4%–25,3% był malonyloglikozyd-3-pelargonidyny. Pozostałe

antocyjany: glukozyd-3-cyjanidyny, rutozyd-3-pelargonidyny i malonyloglukozyd-3-cyjanidyny stanowiły maksymalnie 13,2; 8,3 i 1,7% wszystkich antocyjanów. Najwyższą zawartość tych składników stwierdzono w owocach pięciu genotypów: T-201437-01 ('Onda' × 'Pink Rosa') i T-201449-01 ('Sophie' × 'Matis') — 41 mg/100 g świeżej masy owoców; T-201442-01 ('Patty' × 'Elsanta') i T-201458-06 ('Pink Rosa' × 'Elsanta') — 47 mg/100 g oraz T-201488-07 ('Vibrant' × 'Matis') — 62 mg/100 g. Owoce dwóch klonów: T-201436-02 ('Onda' × 'Grandarosa') i T-201458-01 ('Pink Rosa' × 'Elsanta') posiadały bardzo niski poziom antocyjanów w porównaniu z pozostałymi badanymi genotypami, odpowiednio 7 mg/100 g i 9 mg/100 g.

Zawartość kwasu elagowego w owocach większości badanych klonów truskawki wynosiła od 30 do 40 g/100 g świeżej masy owoców. Najwyższą zawartość tego składnika stwierdzono w owocach klonów: T-201458-17 ('Pink Rosa' × 'Elsanta') — 51 mg/100 g, T-201437-01 ('Onda' × 'Pink Rosa') — 52 mg/100 g i T-201458-06 ('Pink Rosa' × 'Elsanta') — 58 mg/100 g. Najniższą zawartość kwasu elagowego oznaczono w owocach genotypu T-201436-02 ('Onda' × 'Grandarosa') — 17 mg/100 g.

W temacie trzecim przeprowadzono łącznie 1674 reakcje amplifikacji. W reakcji amplifikacji z 9 parami starterów (BFACT045, ARSFL009, ARSFL015, COBRA-R, EMFvi003, EMFv003, FAC001, FrH4177, FrH4163) uzyskano 468 amplikonów, z których 89% było polimorficznych. Długość amplikonów wahała się od 170 do 450 pz. Analizowane genotypy truskawki scharakteryzowano na podstawie 8–18 polimorficznych fragmentów DNA. Status mieszańca potwierdzono dla 19 z 20 testowanych. Określono również procentowy udział amplikonów pochodzących od formy matecznej, który wynosił od 100% do 18%. Najwyższy udział fragmentów DNA charakterystycznych dla formy matecznej obserwowano na matrycy DNA wydzielonych z genotypów nr: 3, 6 ('Grandarosa' × 'Elsanta') oraz 10, 12 i 15 ('Pink Rosa' × 'Elsanta'), najniższy zaś dla mieszańców nr 13 i 14 ('Pink Rosa' × 'Elsanta').

WNIOSKI

1. Klony T-201436-05 ('Onda' × 'Grandarosa'), T-201444-01 ('Roxana' × 'Pink Rosa'), T-201457-16 ('Grandarosa' × 'Elsanta'), T-201458-05 ('Pink Rosa' × 'Elsanta'), T-201462-02 (*F. chil.* Del Norte × 'Matis'), T-201501-03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201511-01 ('Asia' × 'Panvik'), T-201512-03 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201514-01 i T-201514-08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201536-03 i T-201536-15 ('Clery' × 'Grandarosa'), T-201537-01 ('Clery' × 'Matis') i T-201555-02 ('Marmolada' × 'Grandarosa'), ze względu na wysoką jakość owoców i odporność lub małą podatność na choroby liści, są genotypami perspektywnymi do uprawy towarowej.
2. Owoce klonów T-201430-01 ('Madeleine' × 'Pink Rosa') i T-201444-01 ('Roxana' × 'Pink Rosa'), a także T-201424-04 ('Honeoye' × 'Pink Rosa'), T-201436-02 ('Onda' × 'Grandarosa'), T-201457-05 i T-201457-17 ('Grandarosa' × 'Elsanta'), T-201458-01 i T-201458-12 ('Pink Rosa' × 'Elsanta') oraz T-201536-03 ('Clery' × 'Grandarosa') i T-201560-02 ('Onda' × 'Panvik'), ze względu na wysoką zawartość takich

związków bioaktywnych, jak: związki polifenolowe, antocyjany, a także kwas askorbinowy, są szczególnie cenne dla diety człowieka.

3. Owoce klonów T-201437-01 ('Onda' × 'Pink Rosa') i T-201458-06 ('Pink Rosa' × 'Elsanta'), z uwagi na bardzo wysoką zawartość kwasu elagowego oraz związków z grupy antocyjanów, stanowią cenny składnik żywności funkcjonalnej.
4. Istnieje możliwość kontrolowanego zapylania genotypów w obrębie rodzaju *Fragaria* (status mieszańca pochodzącego z planowanego zapylenia uzyskało 19 z 20 testowanych mieszańców F₁).

STANISŁAW PLUTA
DANUTA KUCHARSKA
ŁUKASZ SELIGA

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Kierownik Tematu: dr hab. Stanisław Pluta prof. Instytutu Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3,
96-100 Skierniewice, tel. 46 8345315; e-mail: stanislaw.pluta@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 72.

Ocena potencjału genetycznego wybranych genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w oparciu o czynnikiowy układ krzyżowań

Evaluation of the genetic potential of selected genotypes of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) based on a factorial crossing design

Słowa kluczowe: GCA, SCA, jakość owoców, ocena fenotypowa, odmiany

CEL I BADAŃ

Celem planowanych w 2018 roku badań było określenie zdolności kombinacyjnej (efekty GCA i SCA) 12 genotypów rodzicielskich i 35 rodzin mieszańcowych poprzez ocenę fenotypową populacji siewek F₁ (2100 szt.) borówki wysokiej rosnących doświadczeniu polowym, zoptymalizowanie warunków rozmnażania i ukorzenia in vitro wytypowanych genotypów tego gatunku oraz ocena sensoryczna i instrumentalna jakości owoców najwartościowszych pojedynków.

OPIS WYNIKÓW

Materiał badawczy stanowiła populacja 2100 siewek pokolenia F₁ borówki wysokiej należących do 35 rodzin mieszańcowych, uzyskana ze skrzyżowania w układzie czynnikowym 7 form matecznych — ‘Aurora’, ‘Bluecrop’, ‘Brigitta Blue’, ‘Chandler’, ‘Draper’, ‘Duke’ i ‘Northland’ oraz 5 form ojcowskich — ‘Earliblue’, ‘KazPliszka’,

'Polaris', 'Toro' i 'Weymouth'. Siewki posadzono jesienią 2014 roku w doświadczeniu polowym, w układzie bloków losowych, w 4 powtórzeniach po 15 siewek.

Tabela 1

Siła wzrostu siewek borówki wysokiej rosnących w doświadczeniu polowym, Sad Pomologiczny w Skierniewicach, 2018 r. (średnie z: 4 powtórzenia × 15 siewek /poletko), I termin — ocena wykonana 21–22. 05. 2018 r. II termin — ocena wykonana 17–18. 10. 2018 r.)

Lp.	Nr komb.	Rodowód ♀ × ♂	Siła wzrostu siewek					
			ocena bonitacyjna (1-9)*		wysokość (cm)		szerokość (cm)	
			I termin	II termin	I termin	II termin	I termin	II termin
1	1\1	Aurora × Earliblue	4,5	6,0	29,6	51,0	30,0	46,0
2	1\2	Aurora × KazPliszka	4,2	5,2	26,2	44,0	32,3	44,0
3	1\3	Aurora × Polaris	5,5	6,9	38,8	62,9	39,2	63,9
4	1\4	Aurora × Toro	5,2	5,5	39,1	58,2	44,9	57,9
5	1\5	Aurora × Weymouth	4,0	4,8	20,1	32,7	25,3	33,9
		średnia	4,7	5,7	30,8	49,8	34,3	49,1
6	2\1	Bluecrop × Earliblue	5,0	5,8	27,5	56,7	31,4	48,4
7	2\2	Bluecrop × KazPliszka	5,2	6,2	30,5	63,1	33,7	61,4
8	2\3	Bluecrop × Polaris	5,5	6,4	35,7	61,0	37,5	59,3
9	2\4	Bluecrop × Toro	5,0	6,2	31,5	62,6	34,6	56,2
10	2\5	Bluecrop × Weymouth	5,5	6,8	35,5	69,1	45,0	71,9
		średnia	5,2	6,3	32,2	62,5	36,4	59,4
11	3\1	Brigitta B. × Earliblue	5,2	6,0	31,4	53,6	33,8	51,8
12	3\2	Brigitta B. × KazPliszka	5,5	6,3	45,0	37,3	40,5	34,4
13	3\3	Brigitta B. × Polaris	4,7	5,8	22,8	41,1	26,4	42,2
14	3\4	Brigitta B. × Toro	4,8	6,4	24,2	43,5	30,4	42,1
15	3\5	Brigitta B. × Weymouth	4,6	5,9	25,5	46,7	30,6	44,9
		średnia	5,0	6,1	29,8	44,5	32,3	43,1
16	4\1	Chandler × Earliblue	4,6	6,2	24,5	40,8	27,5	37,7
17	4\2	Chandler × KazPliszka	4,0	5,4	18,7	35,6	34,2	34,6
18	4\3	Chandler × Polaris	6,7	7,6	35,7	70,0	30,3	66,0
19	4\4	Chandler × Toro	5,0	6,2	25,1	56,1	30,3	51,0
20	4\5	Chandler × Weymouth	4,5	5,3	22,3	37,9	25,8	33,3
		średnia	5,0	6,1	25,3	48,1	29,6	44,5
21	5\1	Draper × Earliblue	4,8	6,1	27,2	48,2	29,0	47,0
22	5\2	Draper × KazPliszka	5,0	6,5	33,4	59,1	42,7	65,6
23	5\3	Draper × Toro	5,5	6,8	34,4	56,8	40,8	57,5
24	5\4	Draper × Polaris	4,6	5,5	25,8	38,8	40,0	36,8
25	5\5	Draper × Weymouth	4,8	6,0	28,9	52,5	34,0	48,3
		średnia	4,9	6,2	29,9	51,1	37,3	51,0
26	6\1	Duke × Earliblue	5,4	7,0	37,7	62,1	34,7	62,4
27	6\2	Duke × Polaris	5,4	5,8	31,7	49,5	35,5	46,1
28	6\3	Duke × KazPliszka	5,0	5,6	27,4	45,2	31,7	48,2
29	6\4	Duke × Toro	5,3	6,2	28,9	63,8	36,4	65,6
30	6\5	Duke × Weymouth	5,2	6,5	35,0	67,3	42,5	65,6
		średnia	5,3	6,2	32,1	57,6	36,1	57,6
31	7\1	Northland × Earliblue	5,7	6,4	36,9	48,1	42,9	52,6
32	7\2	Northland × KazPliszka	4,0	5,0	25,0	32,2	35,0	33,2
33	7\3	Northland × Polaris	4,2	5,2	25,9	39,9	29,0	42,1
34	7\4	Northland × Toro	4,5	6,4	22,9	65,5	31,5	70,0
35	7\5	Northland × Weymouth	5,6	6,8	33,6	66,6	44,4	69,1
		średnia	4,8	6,0	28,9	50,5	36,6	53,4

Objaśnienia: * ocena bonitacyjna 1–9, gdzie: 1 — siewki najslabiej rosnące, 5 — średnio silnie rosnące, 9 — siewki rosnące najsilniej

W 2018 roku wykonano ocenę fenotypową siewek pod względem siły wzrostu (pomiar wysokości i szerokości roślin). Wykazano, że młode rośliny należące do 35 rodzin mieszańcowych różniły się siłą wzrostu. Najsilniej rosły siewki należące do następujących rodzin mieszańcowych: 'Aurora' × 'Polaris', 'Aurora' × 'Toro', 'Bluecrop' × 'Polaris', 'Chandler' × 'Polaris', 'Draper' × 'KazPliszka', 'Draper' × 'Toro', 'Duke' × 'Earliblue', 'Duke' × 'Toro', 'Duke' × 'Weymouth' i 'Northland' × 'Weymouth' (tab. 1).

Na podstawie wyników oceny fenotypowej populacji mieszańców określono zdolność kombinacyjną (GCA i SCA) w/w odmian rodzicielskich borówki wysokiej pod względem siły wzrostu. Wykazano, że badane genotypy różniły się wartościami efektów GCA i SCA pod względem tej cechy. Spośród 12 genotypów rodzicielskich tylko 5 odmian miało istotne (na plus lub minus) wartości efektów GCA dla siły wzrostu (tab. 2).

Tabela 2

Wartości efektów GCA dla siły wzrostu 12 odmian borówki wysokiej krzyżowanych w układzie czynnikowym (7 × 5), Skierniewice, 2018; program statystyczny SERGEN

Nr matki lub ojca	Formy rodzicielskie	Wysokość roślin (cm)		Szerokość roślin (cm)	
		ocena efektu głównego	statystyka F dla efektu głównego	ocena efektu głównego	statystyka F dla efektu głównego
Analiza względem matek (♀)					
1	Aurora	-2,22	1,70	-2,04	1,38
2	Bluecrop	10,51**	38,00	8,26**	22,64
3	Brigitta Blue	-7,54**	19,54	-8,08**	21,66
4	Chandler	-3,91	5,26	-6,66**	14,72
5	Draper	-0,91	0,29	-0,13	0,01
6	Duke	5,59**	10,75	6,42**	13,66
7	Northland	-1,52	0,79	2,23	1,65
Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie		0,1	2,76	0,1	2,76
		0,05	3,93	0,05	3,93
		0,01	6,89	0,01	6,89
Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie		0,1	6,21	0,1	6,21
		0,05	7,54	0,05	7,54
		0,01	10,75	0,01	10,75
Analiza względem ojców (♂)					
8	Earliblue	-0,49	0,12	-1,74	1,51
9	KazPliszka	-6,16**	19,56	-5,56**	15,39
10	Polaris	1,85	1,77	2,99	4,46
11	Toro	3,51	6,37	3,06	4,69
12	Weymouth	1,28	0,84	1,26	0,79
Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie		0,10	2,76	0,10	2,76
		0,05	3,93	0,05	3,93
		0,01	6,89	0,01	6,89
Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie		0,10	5,59	0,10	5,59
		0,05	6,89	0,05	6,89
		0,01	10,06	0,01	10,06

Objaśnienie: * - wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,05$

** - wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,01$

Istotnie dodatnie efekty GCA dla wysokości i szerokości roślin wykazano dla odmian: 'Bluecrop' i 'Duke', zaś ujemne efekty GCA — dla 'Brigitta Blue', 'KazPliszka' i 'Chandler'. Oznacza to, że badane odmiany rodzicielskie, posiadające dodatnie efekty GCA, są donorami genów warunkujących silny wzrost u potomstwa ocenianych siewek,

podczas gdy genotypy rodzicielskie wykazujące ujemne efekty GCA przekazują potomstwu słaby wzrost siewek. Oszacowane efekty SCA dla 5 rodzin mieszańców przyjmowały istotnie pozytywne wartości dla wysokości roślin, a istotne negatywne — dla innych 5 rodzin. Nieco więcej istotnych efektów SCA oszacowano dla szerokości siewek. Pozytywne efekty stwierdzono dla 6 rodzin mieszańców, zaś negatywne efekty SCA — dla 4 rodzin mieszańcowych. Oznacza to, że genetyczne współdziałanie obu genotypów rodzicielskich w ramach tych rodzin mieszańcowych warunkuje z dużym prawdopodobieństwem wysoki/niski lub szeroki/wąski charakter wzrostu u potomstwa siewek.

Zoptymalizowano warunki rozmnażania i ukorzenia *in vitro* i *in vivo* wytypowanych genotypów borówki wysokiej. Materiałem badawczym były kultury *in vitro* 20 wybranych pojedynków oraz 2 odmian standardowych ('Bluecrop' i 'Duke'). Te same genotypy rozmnożono tradycyjnie przez sadzonki zielne w warunkach szklarniowych. Uzyskane wyniki wskazują, że efektywność rozmnażania *in vitro* gatunków z rodzaju *Vaccinium* spp., w tym borówki wysokiej, jest bardzo różna i zależna od genotypu, składu pożywki, rodzaju i stężenia hormonów wzrostu w pożywce i świadczą o dużej trudności namnażania i ukorzenia w kulturach *in vitro* genotypów borówki. Współczynnik namnażania kultur określany jako liczba pędów na eksplantat wynosił od 0,7–0,9 dla pojedynków 9P i 10P do 8,1; 8,2 oraz 8,6 odpowiednio dla pojedynków 51, 68 i 69. Najtrudniej było uzyskać nowe pędy dla pojedynków 75 i 10P, które wykazują bardzo słabą zdolność namnażania w kulturach *in vitro*, spowodowaną obecnością bakterii endogennych. Efektywność ukorzenia *in vitro* była wysoka i wynosiła od 68,6 do 97,8%. Efektywność ukorzenia sadzonek zielnych była również zależna od genotypu i wynosiła od 12,5 do 74,2%. Uzyskane rośliny 22 genotypów z *in vitro* oraz z sadzonek zielnych posłużyły do założenia jesienią 2018 roku polowego doświadczenia odmianowo-porównawczego. Doświadczenie założono w układzie bloków losowych w 3 powtórzeniach, po 5 roślin na poletku. W kolejnych 2 latach prowadzona będzie ocena fenotypowa badanych genotypów pod względem cech morfologicznych, plonowania roślin, wielkości i jakości owoców.

Wykonano ocenę sensoryczną i instrumentalną owoców 20 wybranych pojedynków borówki wysokiej dla uzyskania informacji, czy w oparciu o użyte formy rodzicielskie możliwe jest uzyskanie nowych genotypów o ulepszonych cechach jakościowych owoców. Materiał badawczy stanowiły próbki owoców o masie od 25 do 100 g. Ocena sensoryczna owoców, obejmująca atrakcyjność i smak owoców, wykonana była przy użyciu skali bonitacyjnej 1–9. Ocena instrumentalna obejmowała zawartość ekstraktu i witaminy C. Dodatkowo wykonano identyczną ocenę jakości owoców dla 12 odmian rodzicielskich.

Wstępne wyniki pokazują, że owoce badanych pojedynków i odmian rodzicielskich borówki wysokiej różniły się pod względem atrakcyjności i smaku owoców oraz zawartości ekstraktu i witaminy C. Najatrakcyjniejsze owoce miał pojedynek (23C/1), o rodowodzie 'Draper' × 'Toro', zaś najsmaczniejsze — 5 pojedynków (29B/14, 18C/6, 8B/3, 26A/1 i 23C/1). Najwięcej ekstraktu zawierały owoce 3 pojedynków (31B/10,

1A/14 i 26A/1). Najbogatsze w witaminę C były owoce 3 pojedynków (24A/3, 1A/14 i 25A/5).

WNIOSKI

1. Siewki borówki wysokiej charakteryzują się słabym i powolnym wzrostem po posadzeniu w doświadczeniu polowym. Wraz z wiekiem siła wzrostu młodych siewek (wysokość i szerokość roślin) jest bardziej zróżnicowana w obrębie poszczególnych rodzin mieszańców i między nimi.
2. Badane genotypy rodzicielskie borówki wysokiej różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem siły wzrostu siewek, ocenianej na podstawie pomiaru wysokości i szerokości roślin. Oszacowane efekty GCA i SCA dla wybranych form rodzicielskich borówki wysokiej przyjmują wartości dodatnie i ujemne. Zatem odmiany te, użyte w krzyżowaniach, mogą przyczynić się do poprawy lub pogorszenia siły wzrostu u potomstwa.
3. Powodzenie namnażania i ukorzenia *in vitro* borówki jest silnie uzależnione od genotypu. Rozmnożenie kultur *in vitro* jest trudne dla pojedynków 75 i 10P, a łatwe dla pojedynków oznaczonych numerami 51, 68 i 69. Zaproponowany w badaniach sposób ukorzenia pędów *in vitro* w perlicie, nasączonym płynną pożywką jest najbardziej efektywny.
4. Odsetek ukorzenionych sadzonek rozmnażanych tradycyjną metodą (sadzunki zielne) był uzależniony od genotypu borówki wysokiej
5. Owoce badanych pojedynków i odmian rodzicielskich borówki wysokiej różnią się pod względem atrakcyjności i smaku.
6. Zawartość ekstraktu i witaminy C w owocach testowanych pojedynków są w dużym stopniu uzależnione od genotypu.

LITERATURA

- Baker R. J. 1978. Issues in diallel analysis. *Crop Science*, 18 (4): 533 — 536.
- Griffing B. 1956 a. A generalised treatments of diallel crosses in quantitative inheritance. *Heredity* 10: 31 — 50.
- Griffing B. 1956 b. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. *Austr. J. Biol. Sci.* 9: 463 — 493.
- Mądry W., Ubysz-Borucka L. 1982. Biometryczna analiza zdolności kombinacyjnej w niekompletnym układzie diallel cross. Cz. I. Model stały dla cech ilościowych. *Rocz. Nauk Roln. Ser. A*, 105: 9 — 27.
- Ubysz-Borucka L., Mądry W., Muszyński S. 1985. Podstawy statystyczne genetyki cech ilościowych w hodowli roślin. Wydawn. SGGW — AR, Warszawa: 220 ss.
- Chandler C. K., A. D. Draper. 1986. Effect of zeatin and 2iP on shoot proliferation of three highbush blueberry clones *in vitro*. *HortScience* 21: 1065 — 1066.
- Debnath S. C. 2007. Propagation of *Vaccinium in vitro*: A review — *International Journal of Fruit Science*, — Taylor & Francis: 47 — 71.
- Gonzalez M. V., Lopez M., Valdes A. E., Ordas R. J. 2000. Micropropagation of three berry fruit species using nodal segments from field-grown plants. *Ann. Appl. Biol.* 137: 73 — 78.
- Morrison, S., J. Smagula M., Litten W. 2000. Morphology, growth, and rhizome development of *Vaccinium angustifolium* Ait. seedlings, rooted softwood cuttings, and micropropagated plantlets. *HortScience* 35: 738 — 741.

- Noè N., Echer T. 1994. Influence of irradiance on *in vitro* growth and proliferation of *Vaccinium corymbosum* (highbush blueberry) and subsequent rooting *in vivo*. *Physiol. Plant.* 91: 273 — 275.
- Orlikowska T. 1986. Micropropagation of highbush blueberry. *Fruit Sci. Rep.* 13: 105 — 115.
- Ostrolucká M. G., Gajdošová A., Libiaková G. 2007 Protocol for micropropagation of selected *Vaccinium* spp. Chapter 41 In: Protocol for micropropagation of Woody Trees and Fruits. Springer: 445 — 455.
- Reed B. M., Abdelnour-Esquivel A. 1991. The use of zeatin to initiate *in vitro* cultures of *Vaccinium* species and cultivars. *HortScience* 26: 1320 — 1322.
- Ružić D., Vujović T., Libiaková G. 2012. Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) *Journal of Berry Research* 2: 97 — 103.

AGNIESZKA MASNY
DANUTA KUCHARSKA
MONIKA MIESZCZAKOWSKA-FRĄC
ANITA KURAS
EDWARD ŻURAWICZ

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice

Kierownik Tematu: dr inż. Agnieszka Masny Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych, Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych, Instytut Ogrodnictwa, ul. Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice, tel. 46 8345273; 501622880, e-mail: agnieszka.masny@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 75.

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

Słowa kluczowe: hodowla maliny, odmiany maliny, siewki maliny

CELE TEMATÓW BADAWCZYCH I PROWADZONYCH BADAŃ

W zasobach genetycznych Instytutu Ogrodnictwa znajduje się wiele genotypów maliny właściwej (*Rubus idaeus*) różniących się wieloma cechami biologicznymi. Celem prowadzonych badań jest weryfikacja hipotezy zakładającej, że metodą hodowli konwencjonalnej możliwe jest poszerzenie istniejącej zmienności genetycznej w obrębie gatunku *Rubus idaeus* pod względem wielu cech fenotypowych, poprzez wykorzystanie potencjału genetycznego dziesięciu odmian maliny właściwej (form rodzicielskich), pochodzących z różnych regionów geograficznych świata.

W ramach Zadania 75 w roku 2018 realizowano 4 tematy szczegółowe, których celem była:

- ocena fenotypowa wybranych cech maliny właściwej: plonowanie, jakość owoców, siła wzrostu, pokrój, kolczastość pędów. Badania prowadzono w oparciu o populację siewek 55 rodzin mieszańców (otrzymanych ze skrzyżowania w układzie diallelicznym, II metoda Griffinga) oraz 10 form rodzicielskich maliny: ‘Canby’,

‘Glen Ample’, ‘Laszka’, ‘Polana’, ‘Polka’, ‘Radziejowa’, ‘Schönemann’, ‘Sokolica’, ‘Veten’, ‘Willamette’.

- optymalizacja warunków rozmnażania *in vitro* i rozmnożenie *in vitro* pojedynczych maliny właściwej, wyselekcjonowanych w latach 2016–2017, dla założenia kolekcji klonów.
- wykonanie analiz chemicznych owoców 40 wyselekcjonowanych genotypów dla uzyskania informacji, czy możliwa jest poprawa jakości wewnętrznej owoców maliny właściwej, w oparciu o użyte w badaniach odmiany rodzicielskie.
- wykonanie analiz molekularnych 10 klonów w celu weryfikacji statusu mieszańca z planowanego zapylenia genotypów maliny właściwej i opracowanie dla nich profili genetycznych („DNA-fingerprinting”).

OPIS WYNIKÓW

Wykazano, że oceniane siewki maliny, bardzo różnią się pod względem ocenianych cech fenotypowych. Siewki ocenianej populacji mieszańców w różnym stopniu łączą cechy fenotypowe form rodzicielskich, tworząc genotypy o cechach, których nie posiadały formy rodzicielskie. Uzyskane wyniki oceny fenotypowej wskazują na możliwe połączenie w jednym genotypie zdolności do wytwarzania wysokiej jakości owoców (jakość zewnętrzna i wewnętrzna), letnio-jesiennego owocowania, bezkolcowości pędów, małej podatności na choroby i szkodniki oraz wysokiego stopnia samopłodności (Żurawicz i in., 2018). Jednakże dalsza ocena powinna być wykonana na co najmniej kilku roślinach uzyskanych z rozmnożenia pojedynczych, wówczas możliwe będzie zebranie reprezentatywnych prób owoców dla wykonania analiz chemicznych.

Zainicjowano kultury *in vitro* 10 najwartościowszych pojedynczych. Stwierdzono różną zdolność użytych genotypów do rozmnażania *in vitro*. Wzrostu nie podjęło 0–85,7% pąków inicjalnych. Odsetek pąków pozostałych w kulturach do dalszego namnożenia zależał od genotypu i pory pobierania pąków. Najślabiej przebiegała izolacja w terminie od stycznia do marca. Wiele pąków inicjalnych zamierających w warunkach *in vitro* miało zawiązki kwiatostanów i objawy szklistości. Efektywniejsze były izolacje w miesiącach wiosennych maj-czerwiec. Widoczne były duże różnice w potencjale rozmnożeniowym genotypów tzw. ‘łatwych’, z których uzyskanie pędów do ukorzenienia nie sprawiało trudności. Jednak dla większości genotypów uzyskanie pędów do ukorzenienia wymagało 2–3 pasaży. Współczynnik namnażania wahał się od 1,6–4,4 pędów z jednego eksplantatu. Efektywność ukorzenienia *in vitro* i aklimatyzacji *ex vitro* była również zależna od genotypu i wahała się od 52,3–100%, średnio wynosiła 88,2%.

Wykonano analizy chemiczne owoców, uzyskanych z 40 różnych genotypów maliny, w tym kilku odmian rodzicielskich. Badane genotypy były zróżnicowane pod względem zawartości badanych związków chemicznych w owocach. Zawartość polifenoli ogółem w badanych próbkach mieściła się w przedziale 250–505 mg/100 g, najwyższą zawartość polifenoli miały owoce odmiany ‘Laszka’. Zawartość antocyjanów w próbach owoców mieściła się w zakresie 21–57 mg/100 g. Dominującym kwasem organicznym w mali-

nach jest kwas cytrynowy, którego zawartość w owocach kształtowała się na poziomie 1307–2420 mg/100 g. Poziom kwasu askorbinowego w owocach badanych genotypów wynosił 19–50 mg/100 g. W wyniku skrzyżowania formy rodzicielskiej ‘Canby’ z odmianami ‘Radziejowa’ lub ‘Sokolica’ otrzymano klony o wyższej zawartości polifenoli ogółem i kwasu askorbinowego, ale niższej zawartości kwasu jabłkowego. Natomiast klon, uzyskany ze skrzyżowania odmian ‘Canby’ × ‘Polana’ wykazywał niższe wartości wszystkich badanych składników chemicznych w owocach, w porównaniu z odmianą rodzicielską ‘Canby’. Klony, pochodzące od odmiany ‘Glen Ample’, charakteryzowały się wyższą zawartością związków fenolowych w owocach oraz zdecydowanie wyższą zawartością antocyjanów w porównaniu do formy rodzicielskiej, co sugeruje, że odmiana ta może przyczynić się do poprawienia zawartości tych związków w owocach genotypów potomnych. Z kolei, klony wywodzące się od odmiany ‘Laszka’ wykazały niższą zawartość składników fenolowych w owocach, w tym antocyjanów i kwasu askorbinowego, w porównaniu do formy rodzicielskiej. Tak więc krzyżując odmianę ‘Polka’ z odmianami ‘Sokolica’, ‘Radziejowa’ lub ‘Veten’ można uzyskać klony o zdecydowanie wyższej zawartości polifenoli ogółem, chociaż o niższej zawartości antocyjanów.

Przeprowadzono 1326 reakcji amplifikacji, w których wygenerowano 180 amplikonów, w tym 169 polimorficznych o długości 120–520 pz. Każdy z testowanych genotypów został oceniony na podstawie 7–10 charakteryzujących go fragmentów DNA. Status mieszańca potwierdzono dla 9 z 10 testowanych genotypów. Określono udział amplikonów pochodzących od formy matecznej (22–100%). Oszacowano udział alleli pochodzących od formy ojcowskiej (25–78%). Najwyższy udział fragmentów DNA charakterystycznych dla formy matecznej obserwowano na matrycy DNA wydzielonych z genotypu ‘Polana’ × ‘Sokolica’, najniższy dla genotypu ‘Glen Ample’ × ‘Polana’. Dla wszystkich testowanych genotypów opracowano profil genetyczny „DNA-fingerprinting” metodą SSR z wytypowanymi 5 parami oligonukleotydów. Nie potwierdzono statusu mieszańca z planowanego zapylenia dla genotypu ‘Polana’ × ‘Sokolica’. W genotypach o potwierdzonej mieszańcowości najwyższy procentowy udział alleli pochodzących od formy matecznej obserwowano u genotypów roślin ‘Polana’ × ‘Schönemann’ i ‘Polka’ × ‘Sokolica’ odpowiednio 70 i 75%. Na matrycy wydzielonej z mieszańców: ‘Canby’ × ‘Radziejowa’, ‘Polka’ × ‘Veten’, ‘Polka’ × ‘Radziejowa’, ‘Polana’ × ‘Polka’, ‘Canby’ × ‘Polana’ i ‘Laszka’ × ‘Polka’ zamplifikowano fragmenty DNA charakterystyczne dla formy matecznej (42–60%). Po analizie wzorów DNA uzyskanych dla mieszańców: ‘Polka’ × ‘Sokolica’, ‘Polana’ × ‘Schönemann’ i ‘Laszka’ × ‘Polka’ obserwowano najniższy udział fragmentów DNA charakteryzujący formę ojcowską, który wynosił 25, 30 i 40%. Najwyższy udział amplikonów DNA charakterystycznych dla formy ojcowskiej 78%, oszacowano dla mieszańca ‘Glen Ample’ × ‘Polana’.

WNIOSKI

1. Uzyskano populację siewek o bardzo zróżnicowanych cechach fenotypowych, poszerzających istniejącą zmienność genetyczną gatunku *Rubus idaeus*. Cennym elementem nowej zmienności jest połączenie w jednym genotypie tego gatunku owocowania w terminie letnio-jesiennym z tworzeniem pędów bez kolców oraz wysoką jakością owoców.
2. Inicjację kultur *in vitro* genotypów maliny można prowadzić z pąków zimowych, jak też wiosennych i letnich, a powodzenie inicjacji oraz dalszych etapów rozmnażania w kulturach *in vitro* zależy od genotypu maliny.
3. Owoce ocenianych genotypów maliny różnią się pod względem zawartości ekstraktu, polifenoli, antocyjanów, kwasu askorbinowego, kwasu jabłkowego i kwasu cytrynowego. Posiadają zarówno wyższą, jak i niższą zawartość związków chemicznych w porównaniu do odmian rodzicielskich.
4. Mieszańce o potwierdzonym statusie stanowią 9 z 10 testowanych mieszańców F₁ maliny właściwej.

LITERATURA

- 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.). *Scientia Horticulturae* 235: 253 — 257.

DANUTA KUCHARSKA

DANUTA WÓJCIK

STANISŁAW PLUTA

ŁUKASZ SELIGA

LUCYNA OGÓREK

BARBARA WIOSNA

STANISŁAW BODEK

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Kierownik Tematu: dr inż. Danuta Kucharska Instytut Ogrodnictwa, Zakład Biologii Stosowanej

ul. Konstytucji 3 Maja 1/3 96-100 Skierniewice; tel. 46 8345506 lub 46 8345532

e-mail: danuta.kucharska@inhort.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.802.20.2018, Zadanie nr 79.

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

Słowa kluczowe: agrest, DNA, kultury *in vitro*, organogeneza, polimorfizm

TEMAT BADAWCZY 1

Założenie doświadczenia odmianowo-porównawczego i wykonanie oceny fenotypowej roślin agrestu z rozmnożenia tradycyjnego oraz z *in vitro*

Cel

Ocena fenotypowa roślin agrestu rozmnożonych w kulturach *in vitro* i tradycyjnie rosnących w warunkach polowych.

Opis wyników

Materiał do badań stanowiły młode rośliny 8 odmian i 7 klonów hodowlanych agrestu, rozmnożone w kulturach *in vitro* oraz metodą tradycyjną przez sadzonki zielne, rosnące w doświadczeniu odmianowo-porównawczym. Zdecydowana większość roślin

z rozmnożenia tradycyjnego, jak również z *in vitro*, była w bardzo dobrej kondycji po zimie. Tylko pojedyncze rośliny doznały lekkich uszkodzeń mrozowych. U dwóch sadzonek *in vitro*, z klonów 86 i 108 zaobserwowano silne uszkodzenia mrozowe. Obserwacje siły wzrostu, pokroju oraz tworzenia nowych pędów wskazują, że najsilniej rosnącą odmianą był 'Captivator' oraz klony hodowlane. Rośliny rozmnożone *in vitro* wykazywały bardziej rozłożysty pokrój oraz większą szerokość w porównaniu do roślin rozmnożonych z sadzonek zielnych. Wstępne wyniki pokazują, że największe porażenie roślin przez mączniaka stwierdzono u odmiany 'Biały Triumf', niezależnie od metody rozmnażania. Na młodych roślinach pozostałych genotypów nie stwierdzono objawów tej choroby. Wszystkie testowane genotypy agrestu wykazywały różny stopień porażenia roślin przez opadzinę liści. Niezależnie od metody rozmnażania, najwięcej symptomów porażenia obserwowano na liściach odmian 'Biały Triumf' i 'Hinonnmaki Rot' oraz klonów 86 i 117.

Wnioski

- Odmiana 'Captivator' oraz klony hodowlane w obu metodach rozmnażania wykazywały największą siłę wzrostu.
- Rośliny rozmnożone *in vitro* w porównaniu do roślin rozmnożonych z sadzonek zielnych charakteryzowały się bardziej rozłożystym pokrojem oraz większą szerokością.
- Odmiana 'Biały Triumf', niezależnie od metody rozmnażania, wykazywała największą wrażliwość na amerykańskiego mączniaka agrestu, a genotypy 'Biały Triumf', 'Hinonnmaki Rot' oraz klony 86 i 117 wykazywały najwięcej symptomów porażenia przez antraknozę liści niezależnie od metody rozmnażania.

TEMAT BADAWCZY 2

Określenie wpływu mikrorozmnażania agrestu na zachowanie jednorodności genetycznej i powstawanie zmienności somaklonalnej w obrębie gatunku

Cel

Optymalizacja techniki izolacji genomowego DNA agrestu z liści roślin matecznych oraz pochodzących z kultur *in vitro*.

Opis wyników

Badania prowadzono na 5 odmianach agrestu: 'Captivator', 'Hinonnmaki Rot', 'Hinsel', 'Invicta' i 'Resika'. Porównano skuteczność izolacji DNA zestawami: DNeasy Plant Mini Kit® oraz NucleoSpin Plant II. Preparaty DNA analizowano elektroforetycznie w żelu oraz spektrofotometrycznie do obliczenia stężenia genomowego DNA w poszczególnych preparatach oraz oceny czystości. Zestawem DNeasy Plant Mini Kit® przeprowadzono izolację DNA z 71 roślin z *in vitro*. Stężenie genomowego DNA wahało się od 8,70 do 49,2 ng/μl, natomiast współczynnik 260/280 nm wynosił od 1,74 do 1,99. Zaobserwowano różnicę w wydajności izolacji genomowego DNA pomiędzy poszczególnymi genotypami. Najwyższe stężenia genomowego DNA uzyskano w preparatach wyizolowanych z odmian 'Invicta' i 'Captivator' odpowiednio 31,9 i 30,7 ng/μl, niższe stężenia uzyskano z odmiany 'Resika' i 'Hinsel' 26,4

i 24,5 ng/μl, najniższą zawartość DNA miały preparaty odmiany 'Hinnonmaki Rot' 16,1 ng/μl. Najwyższe stężenie DNA uzyskano stosując zestaw NucleoSpin Plant II z użyciem buforu PL1 (średnio 44,5 ng/μl), natomiast izolacja przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini Kit[®] dała najniższe zawartości DNA średnio 28,6 ng/μl. Współczynnik 260/280 nm dla preparatów izolowanych zestawem DNeasy Plant Mini Kit[®] wynosił od 1,76 do 1,84, wyższe wartości współczynnika uzyskano zestawem NucleoSpin Plant II: od 1,83 do 1,90 w izolacji z buforem PL1 oraz od 1,85 do 1,92 w preparatach izolowanych buforem PL2.

Wnioski

- Sprawdzone metody izolacji DNA pozwoliły na uzyskanie preparatów DNA przydatnych do dalszej analizy techniką AFLP.
- Do izolacji genomowego DNA agrestu najbardziej efektywny jest zestaw NucleoSpin Plant II, metoda z buforem PL1.
- Wydajność izolacji genomowego DNA była uzależniona od odmiany.

TEMAT BADAWCZY 3

Analiza polimorfizmu DNA genotypów agrestu przy użyciu techniki AFLP

Cel

Analiza polimorfizmu DNA 15 genotypów agrestu techniką AFLP z zastosowaniem 6 kombinacji starterów w różnicujących reakcjach amplifikacji.

Opis wyników

Badania prowadzono na 15 genotypach agrestu. Izolację genomowego DNA wykonano z użyciem DNeasy Plant Mini Kit[®] oraz z zestawem NucleoSpin Plant II z buforem ekstrakcyjnym PL1. Spektrofotometrycznie obliczono stężenie genomowego DNA oraz oceniono czystość preparatów. Analizę AFLP polimorfizmu DNA prowadzono według Zabeau i Vos (1993). Preparaty DNA trawiono enzymami restrykcyjnymi MseI oraz PstI. Do fragmentów restrykcyjnych przyłączano adaptery o znanej sekwencji. Fragmenty DNA poddano wstępnej amplifikacji z użyciem starterów komplementarnych do sekwencji adapterowych. Do reakcji różnicowego PCR wytypowano 6 par starterów: Pst-AT/Mse-CG, Pst-CA/Mse-TG, Pst-GT/Mse-AC, Pst-TA/Mse-GA, Pst-AG/Mse-CT i Pst-TC/Mse-AG. Produkty rozdzielano w 6% żelu poliakrylamidowym i wybarwiano azotanem srebra. Oceniano liczbę produktów AFLP-PCR ich zróżnicowanie pomiędzy genotypami oraz polimorfizm produktów PCR. W analizie AFLP z sześcioma parami starterów uzyskano 283 produkty amplifikacji, z czego 87 (30,7%) było polimorficznych. Testowane pary starterów AFLP generowały polimorficzne produkty amplifikacji w reakcji różnicowej PCR. Testowane pary starterów różniły się w ilości generowanych produktów PCR, których liczba wahała się od 22 dla pary starterów Pst-TC/Mse-AG do 91 ze starterami Pst-AG/Mse-CT.

Wnioski

- Preparaty DNA uzyskane zestawami do izolacji DNA: DNeasy Plant Mini Kit[®] i NucleoSpin Plant II są odpowiednie do analizy techniką AFLP.

- Polimorfizm DNA pomiędzy piętnastoma genotypami agrestu oceniony na podstawie analizy AFLP z sześcioma parami starterów wyniósł 30,7%.
- Wszystkie testowane pary starterów AFLP generowały polimorficzne produkty w reakcji różnicowej amplifikacji, co potwierdza skuteczność techniki AFLP w uzyskaniu markerów pozwalających na identyfikację genotypów.

LITERATURA

Zabeau M., Vos P. 1993. Selective restriction fragment amplification: a general method for DNA fingerprinting. European Patent Application 92402629.7, Publication number 0 534 858 A1.

BOGUMIŁA BADEK**STANISŁAW PLUTA****MAŁGORZATA KORBIN**

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Kierownik Tematu: dr Bogumiła Badek Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach, 96-100 Skierniewice, ul. Pomologiczna 18, tel. +48 468345460,

e-mail: bogumila.badek@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 78.

Charakterystyka markerów molekularnych, sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)

Characteristics of molecular markers linked with the resistance to gall mite (*Cecidophyopsis ribis*)

Słowa kluczowe: mapa genetyczna, marker, porzeczka czarna, wielkopąkowiec porzeczkowy

Wielkopąkowiec porzeczkowy (*Cecidophyopsis ribis*) jest najgroźniejszym szkodnikiem w uprawie czarnej porzeczki, zasiedlającym większość uprawianych odmian. *C. ribis* jest wektorem rewersji porzeczki czarnej (Black currant reversion virus — *BRV*), która redukuje plon, prowadząc w konsekwencji do likwidacji plantacji (Pluta i Żurawicz, 2002; Łabanowska i in., 2015). Ograniczanie liczebności populacji wielkopąkowca porzeczkowego oraz pozyskanie odmian porzeczki czarnej o zwiększonej odporności na szpeciela i *BRV* są niezwykle istotne dla praktyki ogrodniczej. Wiele jednostek naukowych w Europie zajmuje się badaniami nad identyfikacją markerów molekularnych, sprzężonych z dwoma odrębnymi typami odporności Ce i P. Źródłem odporności typu Ce w ww. badaniach jest agrest (*R. grossularia*) (Knight i in., 1974), a typu P–*R. nigrum* ssp. *Sibiricum* (Anderson, 1971). Również w Instytucie Ogrodnictwa w Skierniewicach prowadzone są badania dotyczące poszukiwania sprzężeń między odpornością a zlokalizowaniem warunkujących ją fragmentów genomu na mapie genetycznej porzeczki czarnej.

Celem badań prowadzonych w 2018 roku była: 1) ocena polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony związane z cechą odporności porzeczki na *C. ribis*, oparta na metodzie sekwencjonowania, 2) zagęszczanie kolejnych grup sprzężeń mapy genetycznej odmian ‘Ceres’ i ‘Bona’ oraz 3) weryfikacja 10 wytypowanych sekwencji markerowych pod kątem ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i podatnych na wielkopąkowca porzeczkowego.

Materiał badawczy do analiz molekularnych stanowiły rośliny pochodzące z kolekcji IO i rodziny mieszańców ‘Ceres’ × ‘Bona’, poddane corocznej ocenie fenotypowej pod względem stopnia zasiedlenia przez wielkopąkowca (57% mieszańców ‘Ceres’ × ‘Bona’ oraz 74% odmian z kolekcji).

Do monitorowania regionów genomu porzeczki czarnej użyto markerów mikrosatelitarnych SSR z dostępnych map genomowych (Brennan i in., 2008; Mazeikiene i in., 2012), bazujących na reakcji PCR ze starterami komplementarnymi do unikalnych sekwencji flankujących motywy satelitarne. Ocena polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P dwunastu genotypów *Ribes* (kolekcja IO), zróżnicowanych pod względem odporności na *C. ribis*, oparto na metodzie CAPS-PCR z czterema enzymami restrykcyjnymi (*HpaII*, *PflFI*, *DpnII* i *HpyCH4IV*) oraz sekwencjonowaniu matryc DNA (100 fragmentów DNA). Uzyskane sekwencje DNA porównano z danymi NCBI. Analizę sekwencji przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego CEQ 8000 software v.9.0. Uzyskane z odczytów kontigi ‘składano’ przy użyciu programu SeqMan (pakiet Lasergen v.7). Zróżnicowanie nukleotydowe sekwencji analizowano przy użyciu programu MegAlign (pakiet Lasergen v.7). Analiza porównawcza wykazała zróżnicowanie układu sekwencji ampliconów genotypów odpornych i wrażliwych, najprawdopodobniej sklasyfikowanych jako polimorfizm jednonukleotydowy (SNP). Taka hipoteza wymaga jednak dalszych badań, które są przewidziane na kolejne lata realizacji projektu. Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano po jednej parze specyficznych oligonukleotydów.

W następnym etapie badań zaplanowanych na 2018 rok skupiono się na zagęszczaniu uzyskanego w 2017 roku szkieletu mapy genetycznej porzeczki czarnej. Konstrukcję mapy oparto łącznie na 20 markerach SSR zlokalizowanych na mapach referencyjnych rodzaju *Ribes* (Brennan i in., 2008; Mazeikiene i in., 2012). Na podstawie analizy profili markerów SSR wytypowanych dla genotypów rodzicielskich i 149 mieszańców ‘Ceres’ × ‘Bona’, zidentyfikowano 177 alleli polimorficznych segregujących dla genotypów mieszańcowych. Analiza segregacji alleli, różnicujących formy rodzicielskie (allele heterozygotyczne) pozwoliła na określenie typu segregacji oraz rozkładu alleli w populacji mapującej (test X^2). Na podstawie frekwencji rekombinacji pomiędzy allelami oszacowano odległości mapowe (cM) między poszczególnymi markerami SSR/ częstość rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami w badanej populacji mapującej. Uzyskany w bieżącym roku szkielet mapy wzbogacony został o 62 allele i obecnie zawiera 11 grup sprzężeń, stanowiących fragmenty siedmiu chromosomów (I–VII) o łącznej długości 537 cM. Analiza porównawcza uzyskanych grup sprzężeń z ich odpowiednikami na mapach referencyjnych, opublikowanych dla innych przedstawicieli rodzaju *Ribes*, wykazała 63% homologię. 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.

Ostatni etap badań zaplanowanych do realizacji w 2018 r. dotyczył poszukiwania markerów sprzężonych z genami *Ce* i *P*, które umożliwiłyby charakterystykę genotypów rodzaju *Ribes*, zróżnicowanych pod względem odporności na wielkopąkowca porzeczkowego. Poszukiwanie i identyfikacja takich markerów ma na celu skrócenie cyklu hodowlanego, gdyż selekcję materiału roślinnego można przeprowadzić już w stadium siewki, niezależnie od tego, w jakiej fazie rozwojowej rośliny ujawnia się dana cecha. Na 100 wytypowanych do badań genotypach przeprowadzono weryfikację 10 markerów SCAR pod kątem ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i podatnych na *C. ribis*. Łącznie przeprowadzono 3 000 testów. Wykorzystując w reakcji PCR startery właściwe dla (potencjalnych) markerów SCAR stwierdzono występowanie oczekiwanych produktów amplifikacji zarówno w przypadku genotypów odpornych, jak i wrażliwych na *C. ribis*. Na obecnym etapie badań, przeprowadzone przez nas wstępne badania weryfikujące wytypowane sekwencje markerowe, nie potwierdziły ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i wrażliwych na wielkopąkowca porzeczkowego.

WNIOSKI

1. Wyniki badań dotyczące oceny polimorfizmu fragmentów różnicujących genotypy rodzaju *Ribes* (odporne/ podatne) uzyskane na matrycach DNA roślin wybranych z kolekcji stanowią podstawę bazy sekwencji sprzężonych z cechą odporności na *C. ribis* i będą kontynuowane w kolejnych latach realizacji projektu, zgodnie z harmonogramem.
2. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić brak pełnej kolinearności uzyskanej mapy z mapą referencyjną. O zjawisku tym świadczy fakt, że wygenerowane grupy sprzężeń LG1, LG2, LG3, LG4, LG5, LG6 i LG7 wykazują homologię z chromosomami I, II, III, IV, V, VI i VII map referencyjnych, niemniej odnotowano zmiany w lokalizacji oraz kolejności sekwencji alleli.
3. Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono korelacji między testowanymi markerami a cechą odporności na wielkopąkowca porzeczkowego.

LITERATURA

- Anderson M. M. 1971. Resistance to gall mite (*Phytoptus ribis* Nal.) in the Eucoreosma section of *Ribes*. *Euphytica* 20: 422 — 426.
- Brennan R., Jorgensen L., Gordon S., Loades K., Hackett C., Russell, J. 2008. The development of a PCR-based marker linked to resistance to the blackcurrant gall mite (*Cecidophyopsis ribis* Acari: *Eriophyidae*). *Theor. Appl. Genet.* 118: 205 — 211.
- Knight R. L., Keep E., Briggs J. B., Parker J. 1974. Transference of resistance to black currant gall mite *Cecidophyopsis ribis*, from gooseberry to black currant. *Ann. Appl. Biol.* 76: 123 — 130.
- Łabanowska B. H., Piotrowski W., Gruchała M. 2015. Blackcurrant gall mite — *Cecidophyopsis ribis* (Westw.), harmfulness and possibility to control with fenpyroximate (Ortus 05 SC). *Prog. Plant Prot.* 55 (3): 305 — 311.

- Mazeikiene I., Bendokas V., Stanys V., Siksnianas T. 2012. Molecular markers linked to resistance to the gall mite in blackcurrant. *Plant Breeding* 131: 762 — 766.
- Pluta S., Żurawicz E. 2002. Effect of reversion virus on the yield and fruit size in blackcurrant *Ribes nigrum* L. Proceedings 8th International Symposium *Rubus* and *Ribes*. Scotland, Dundee. July 2001. *Acta Horticulturae* 585 (1): 393 — 398.

SYLWIA KELLER-PRZYBYŁKOWICZ

MARIUSZ LEWANDOWSKI

MAŁGORZATA KORBIN

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach

Kierownik Tematu: dr Sylwia Keller-Przybyłkiewicz Pracownia Niekonwencjonalnych Metod Hodowli Roślin, Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach ul Pomologiczna 18, 96-100 Skierniewice, tel.+48 46 8345254; e-mail: sylwia.keller@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 73.

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

Słowa kluczowe: adnotacja, EST, jabłoń, qPCR, RNAseq, sekwencjonowanie NGS, transkryptom

Celem tematu była analiza fenotypowa 17 podkładek jabłoni z kolekcji IO z zastosowaniem oceny nasilenia reakcji obronnej badanych roślin po przemrożeniu oraz oceny zmian ekspresji genów kandydujących (CG) (qPCR), wytypowanych na podstawie sekwencjonowania transkryptomu dwóch podkładek wzorcowych i 15 innych z kolekcji Instytutu, a także wytypowanie nowych fragmentów EST genów o zróżnicowanej ekspresji w podkładkach wzorcowych, dla poszerzenia dotychczasowej bazy markerów mrozoodporności.

Badania fenotypowe prowadzono na podkładkach 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) sztucznie przemrażanych w komorze BINDER GmbH (temp: -10°C, -12°C i -14°C). Próby kontrolne stanowiły podkładki nie traktowane ww. temperaturami.

Ocenę stopnia reakcji badanych obiektów po zastosowaniu niskich temperatur, przeprowadzono w układzie genotyp/podkładka/temperatura. Dla wszystkich badanych podkładek wykonano pomiary: średnicy pędu przewodnikowego podkładki (mm), stopnia regeneracji podkładek (skala 1–5); wysokości pędu przewodnikowego podkładki (cm); długości przyrostów jednorocznych (cm); świeżej masy korzeni podkładek (g).

W przeprowadzonym doświadczeniu zaobserwowano, że żadna z temperatur nie spowodowała śmierci całej puli badanych genotypów, ale kondycja roślin pod koniec okresu wegetacji była słabsza niż roślin kontrolnych. Największy wigor posiadały podkładki przemrażane w temperaturze -10°C . Najślabszym wigorem charakteryzowały się podkładki przemrażane w temperaturze -14°C . Dla podkładek P 66, P 67 i P 68 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 (Żurawicz i Lewandowski, 2014). Bazując na wartościach średnich ocenianych parametrów dla trzech temperatur, w obrębie skolekcjonowanych podkładek można wyróżnić dwie grupy — mniej i bardziej wrażliwe na przemarzanie. Do pierwszej grupy można zakwalifikować podkładki P 59, P 60, P 66, P 67, P 68, M.7, MM.106, PB-4 i Siewkę Antonówki, a do grupy drugiej podkładki pozostałe, czyli P 2, P 14, P 16, P 22, CG 11, CG 16, M.9 i M.26.

Skolekcjonowaną w ramach zadania bazę sekwencyjną z eksperymentów RNAseq z dwóch sezonów badawczych (2016 i 2017) poddano weryfikacji metodą qPCR. W tym celu, z tej samej puli roślin, do badań molekularnych dotyczących oceny zmian ekspresji genów kandydujących (CG) (qPCR) zachodzących w podkładkach wzorcowych oraz w podkładkach z kolekcji Instytutu, wyizolowano matryce RNA (Zeng i Yang, 2000). Całkowite RNA ($1\mu\text{g}$) poddano transkrypcji do stabilnego cDNA (AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit, Agilent). Do amplifikacji fragmentów dsDNA użyto par oligonukleotydów zaprojektowanych do sekwencji 30 genów (EST, 2016 i 2017) wytypowanych na podstawie odczytów sekwencji transkryptomów wzorcowych podkładek jabłoni. W pierwszym etapie badań przeprowadzono ocenę zmian profilu 15 fragmentów EST (2016) w genomach 17 podkładek jabłoni. Wytypowane sekwencje kodują: białka hydrolaz (Md664464, Md475472, Md288837, Md321783, Md303946), białka sekrecyjne i składniki błon komórkowych oraz wakuoli (Md321783, Md881546, Md203983, Md145463, Md580263), białko transkrypcyjne (Md546831) oraz białka: wiążące jony Zn^{2+} , białko receptorowe, białko będące składnikiem chloroplastów i białko o aktywności kinazy (odpowiednio Md196401, Md161758, Md253080, Md707995).

W przeprowadzonych testach zaobserwowano: wzrost ilości transkryptu genów o adnotacjach *Md161758*, *Md203983*, *Md196401* oraz spadek ekspresji genów: *Md664464*, *Md321783*, *Md217803*, *Md28837* we wszystkich podkładkach (-10°C). Osiem genów (*Md161758*, *Md203983*, *Md707995*, *Md664464*, *Md145463*, *Md253080*, *Md303946*, *Md546231*) podlegało inhibicji w podkładkach wrażliwych (P22, P26, P67, P68, M7, M.9, M.26, MM106, GC11, GC16, PB4, Antonówka) (-12°C , -14°C), natomiast gen *Md475472* — aktywacji (wzrost 100x) (-12°C , -14°C).

W drugim etapie badań przeprowadzono ocenę zmian w profilu ekspresji 15 EST (RNAseq, 2017) w genomach podkładek wzorcowych: wrażliwej M.9 i tolerancyjnej P 60.

RNA wyizolowane z tkanek ksylemu i korzenia z roślin traktowanych oraz kontrolnych, przepisane na stabilne cDNA, stanowiło matrycę do reakcji amplifikacji fragmentów dsDNA, do których użyto par oligonukleotydów komplementarnych do sekwencji transkryptów o zróżnicowanej ekspresji.

Ocenę zmian ekspresji przeprowadzono dla EST: czterech genów biorących udział w wiązaniu kationów regulujących reakcje chemiczne — *Md32326*, *Md22724*, *Md425030*, *Md843015*; pięciu genów kodujących białka transportowe błon komórkowych — *Md318613*, *Md139165*, *Md165140*, *Md163192*, *Md312901*; czterech genów kodujących komponenty komórkowej błony foso-lipidowej — *Md432351*, *Md240736*, *Md247173*, *Md843015*; dwóch genów, które podlegają aktywacji pod wpływem czynników stresu — *Md834597*, *Md668869* oraz genu kodującego białka z rodziny auksyn regulujących rozpoczęcie fazy spoczynku roślin (Velasco i in., 2010; Bai i in., 2014)

Na podstawie testów qPCR dla podkładki M.9, wytypowano grupę genów, aktywowanych w korzeniu i w tkankach przewodzących (*Md318613*, *Md425030*, *Md432351*, *Md39165*, *Md163192*). Druga grupa genów (*Md222724*, *Md240736*, *Md165140*) podlegała aktywacji w tkankach ksylemu i inhibicji w tkankach korzenia, natomiast dla dwóch genów (*Md385497* i *Md285927*) odnotowano indukcję w korzeniu a inhibicję w tkankach przewodzących podkładki M.9. W przypadku tolerancyjnej podkładki P 60 dla pięciu genów (*Md32326*, *Md240736*, *Md318613*, *Md425030*, *Md163192*) zaobserwowano aktywację ekspresji zarówno w korzeniu jak i w tkankach przewodzących. Cztery z wytypowanych genów (*Md222724*, *Md385497*, *Md165140*, *Md285927*) ulegały inhibicji w ksylemie, ale indukcji w tkankach korzenia, natomiast dwa (*Md139165* i *Md432251*) wykazały odwrotną aktywność w testowanych tkankach podkładki P 60.

Dodatkowo, na podstawie przeprowadzonych testów walidacyjnych (RNAseq vs. qPCR) (Imelfort i Edwars, 2009) wytypowano łącznie 13 fragmentów EST, dla których odnotowano zróżnicowaną regulację w układzie genotyp/ gen/ temperatura przemrażania.

Ostatnim etapem badań była analiza transkryptomu jabłoni, poprzez sekwencjonowanie NGS oraz wytypowanie specyficznych fragmentów EST (sprzężonych z cechą mrozoodporności). Sekwencjonowanie i analiza porównawcza w układach genotyp podkładki/ kontrola vs. genotyp podkładki/ temperatura mrożenia próbek (M.9 — wrażliwa i P 60 — tolerancyjna) pozwoliła na odczyt 233 606 825 sekwencji (tj. 500 tys. transkryptów) (Xu, 2010).

Spośród adnotowanych sekwencji wybrano 15 EST kodujących: 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 oraz białka stresów abiotycznych i regulujących komórkowe systemy naprawcze.

WNIOSKI

1. Podkładki P 66, P 67 i P 68 można uznać za tolerancyjne na stres niskich temperatur.

2. Poziom ekspresji badanych genów zależy od genotypu podkładki, badanej tkanki roślinnej (ksylem / korzeń) i stosowanej temperatury przemrażania.
3. Trzynaście EST, o odrębnym typie regulacji w podkładkach tolerancyjnych i wrażliwych na mróz, zidentyfikowano jako potencjalne markery tolerancji na stres niskiej temperatury.
4. Wytypowane i adnotowane sekwencje transkryptomu jabłoni poszerzają bazę danych, z której wyłonione zostaną przypuszczalne markery funkcjonalne badanej cechy podkładek jabłoni.

LITERATURA

- Bai Y., Dougherty L., Xu K. 2014. Towards an improved apple reference transcriptome using RNA-seq. *Mol. Genet Genomics*, vol. 289: 427 — 438.
- Imelfort M., Edwards D. 2009. De novo sequencing of plant genomes using second-generation technologies. *Briefings in Bioinformatics*, Vol. 10, Issue 6: 609 — 618
- Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J., Dhingra A., Cestaro A., Kalyanaraman A., Fontana P., Bhatnagar S.K., Troglio M., Pruss D., Salvi S., Pindo M., Baldi P., Castelletti S., Cavaiuolo M., Coppola G., Costa F., Cova V., Dal Ri A., Goremykin V., Komjanc M., Longhi S., Magnago P., Malacarne G., Malnoy M., Micheletti D., Moretto M., Perazzolli M., Si-Ammour A., Vezzulli S., Zini E., Eldredge G., Fitzgerald L.M., Gutin N., Lanchbury J., Macalma T., Mitchell J.T., Reid J., Wardell B., Kodira C., Chen Z., Desany B., Niaz F., Palmer M., Koepke T., Jiwan D., Schaeffer S., Krishnan V., Wu C., Chu V.T., King S. T., Vick J., Tao Q., Mraz A., Stormo A., Stormo K., Bogden R., Ederle D., Stella A., Vecchietti A., Kater M. M., Masiero S., Lasserre P., Lespinasse Y., Allan A. C., Bus V., Chagné D., Crowhurst R. N., Gleave A. P., Lavezzo E., Fawcett J.A., Proost S., Rouzé P., Sterck L., Toppo S., Lazzari B., Hellens R. P., Durel C. E., Gutin A., Bumgarner R. E., Gardiner S.E., Skolnick M., Egholm M., Van de Peer Y., Salamini F., Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42 (10): 833 — 841, DOI:10.1038/ng.654.
- Xu. 2010. The Apple genome: A delicious promise. *New York Fruit Quarterly*, 18 (4).
- Żurawicz E., Lewandowski M. 2014. Controlled Freezing as a Low-Temperature Tolerance Test for Apple Rootstocks. *Acta Horticulture* 1058: 451 — 456.

MARIUSZ LEWANDOWSKI
SYLWIA KELLER-PRZYBYŁKOWICZ
MAŁGORZATA KORBIN
EDWARD ŻURAWICZ

Instytut Ogrodnictwa, Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice

Kierownik Tematu: dr inż. Mariusz Lewandowski ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice,
tel. 46 8345410; e-mail: mariusz.lewandowski@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 71.

Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juwenilnego 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

Słowa kluczowe: faza juwenilna, jabłoni, jakość owoców, markery molekularne

W ramach Zadania 71 w roku 2018 realizowano 2 tematy badawcze.

- Ocena fenotypowa populacji siewek pokolenia F₁ (2800 siewek) pod kątem siły wzrostu, wczesności wchodzenia w okres kwitnienia i owocowania oraz odporności roślin na ważne gospodarczo choroby (parch jabłoni, mączniak jabłoni), a także ocena efektów GCA, SCA dla badanych form rodzicielskich pod względem wybranych cech fenotypowych.
- Zagęszczanie mapy genetycznej genomów odmian ‘Free Redstar’ oraz ‘Oliwka Żółta’, reprezentujących wysoki stopień polimorfizmu genetycznego oraz istotnie różniących się długością fazy juwenilnej.

CEL PODJĘTEGO TEMATU I PROWADZONYCH BADAŃ

- Oszacowanie efektów GCA i SCA dla badanych form rodzicielskich pod względem wybranych cech fenotypowych (siła wzrostu, wczesność wchodzenia w okres

kwitnienia i owocowania, intensywność kwitnienia i owocowania, odporność roślin na choroby) w oparciu o ocenę potomstwa 28 rodzin mieszańców.

- Zagęszczenie istniejących i nowych grup sprzężeń mapy genetycznej odmian ‘Free Redstar’ i ‘Oliwka Żółta’, poprzedzone analizą segregacji alleli markerów SSR w populacji mapującej uzyskanej ze skrzyżowania obu form rodzicielskich, odmiennych pod względem długości fazy juwenilnej.

OPIS WYNIKÓW

Obliczenia dotyczące estymacji efektów GCA i SCA dla układu czynnikowego ($\text{♀}4 \times \text{♂}7$) wykonano za pomocą programu komputerowego SERGEN (Caliński i in., 2003). Wśród 11 genotypów rodzicielskich jabłoni, tylko 6 odmian: ‘Free Redstar’, ‘Alwa’, ‘Koksa Pomarańczowa’, ‘Golden Delicious’, ‘Kosztela’ i ‘Oliwka Żółta’ miało istotne (na plus lub minus) wartości efektów GCA dla siły wzrostu siewek (tab. 1).

Tabela 1

Ocena efektów GCA dla siły wzrostu siewek 11 odmian jabłoni krzyżowanych w układzie czynnikowym ($\text{♀}4 \times \text{♂}7$), Dąbrowice, 2018; program statystyczny SERGEN

Nr matki lub ojca	Formy rodzicielskie	Siła wzrostu siewek			
		średnica pędu przewodnikowego		wysokość pędu przewodnikowego	
		ocena efektu głównego	statystyka F dla efektu głównego	ocena efektu głównego	statystyka F dla efektu głównego
Analiza względem form matecznych - ♀					
1	Free Redstar	0,494**	16,41	1,38**	17,31
2	Gold Milenium	0,225	3,40	-0,54	2,70
3	Alwa	0,113	0,86	1,49**	20,11
4	Golden Delicious	-0,832**	46,56	-2,32**	49,04
Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie		0,10	2,77	0,10	2,77
		0,05	3,95	0,05	3,95
		0,01	6,95	0,01	6,95
Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie		0,10	5,21	0,10	5,21
		0,05	6,52	0,05	6,52
		0,01	9,72	0,01	9,72
Analiza względem form ojcowskich - ♂					
1	Glogierówka	0,716	5,38	1,80	3,79
2	Kosztela	-1,048**	11,53	-0,84	0,82
3	Malinowa Oberlandzka	-0,451	2,14	-0,36	0,15
4	Kronselska	0,694	5,05	1,86	4,09
5	Oliwka Żółta	-0,746	5,83	-3,22**	12,16
6	Koksa Pomarańczowa	1,197**	15,04	0,08	0,01
7	McIntosh	-0,361	1,37	0,68	0,54
Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie		0,10	2,77	0,10	2,77
		0,05	3,95	0,05	3,95
		0,01	6,95	0,01	6,95
Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie		0,10	6,26	0,10	6,26
		0,05	7,60	0,05	7,60
		0,01	10,88	0,01	10,88

Objaśnienie:

* wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,05$

** wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,01$

Odmiany: ‘Free Redstar’, ‘Alwa’, ‘Koksa Pomarańczowa’ wykazują istotnie dodatnie wartości efektów GCA dla tej cechy. Odmiany te użyte w programach krzyżowań będą więc donorami silnego wzrostu u potomstwa siewek tego gatunku. Natomiast odmiany Golden Delicious’, ‘Kosztela’ i ‘Oliwka Żółta’ miały istotnie negatywne efekty GCA dla tej cechy. Odmiany te użyte jako formy rodzicielskie są więc donorami genów warunkujących słaby wzrost u potomstwa siewek jabłoni. Należy jednak pamiętać, że w przypadku drzew jabłoni, część odmian początkowo po posadzeniu w polu rośnie silnie, a po wejściu w okres owocowania siła ich wzrostu maleje. Przekłada się to na uzyskiwanie większej liczby owoców, o bardziej atrakcyjnym wyglądzie (Rejman, 1994). Wyniki analizy ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla stopnia porażenia siewek przez parcha jabłoni pokazują, że wartość ujemną efektów GCA dla tej cechy roślin oszacowano dla odmian: ‘Free Redstar’ i ‘Gold Milenium’, a dla odmiany ‘Free Redstar’ dodatkowo dla stopnia porażenia roślin przez mączniaka jabłoni (tab. 2).

Tabela 2

Ocena efektów GCA dla stopnia porażenia przez parcha i mączniaka jabłoni siewek 11 odmian jabłoni krzyżowanych w układzie czynnikowym (♀4 x ♂7), Dąbrowice, 2018; program statystyczny SERGEN

Nr matki lub ojca	Formy rodzicielskie	Stopień porażenia siewek			
		parch jabłoni		mączniak jabłoni	
		ocena efektu głównego	statystyka F dla efektu głównego	ocena efektu głównego	statystyka F dla efektu głównego
Analiza względem form matecznych - ♀					
1	Free Redstar	-0,339**	98,50	-0,064**	12,96
2	Gold Milenium	-0,132**	14,94	-0,039	4,84
3	Alwa	0,050	2,14	0,082**	21,16
4	Golden Delicious	0,421**	151,97	0,021	1,44
	Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie	0,10 0,05 0,01	2,77 3,95 6,95	0,10 0,05 0,01	2,77 3,95 6,95
	Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie	0,10 0,05 0,01	5,21 6,52 9,72	0,10 0,05 0,01	5,21 6,52 9,72
Analiza względem form ojcowskich - ♂					
1	Glogierówka	0,238	4,81	0,054	3,10
2	Kosztela	0,188	3,00	-0,040	1,75
3	Malinowa Oberlandzka	-0,143	1,73	0,029	0,88
4	Kronselska	-0,287	6,95	-0,015	0,25
5	Oliwka Żółta	-0,218	4,01	0,029	0,88
6	Koksa Pomarańczowa	0,182	2,81	-0,040	1,75
7	McIntosh	0,038	0,12	-0,015	0,25
	Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie	0,10 0,05 0,01	2,77 3,95 6,95	0,10 0,05 0,01	2,77 3,95 6,95
	Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie	0,10 0,05 0,01	6,26 7,60 10,88	0,10 0,05 0,01	6,26 7,60 10,88

Objaśnienie:

* wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,05$

** wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha = 0,01$

Genotypy te są donorami genów warunkujących odporność lub małą podatność na parcha i mączniaka jabłoni u potomstwa siewek jabłoni. Natomiast odmiany ‘Golden Delicious’ i ‘Alwa’ miały istotnie dodatnie efekty GCA, odpowiednio dla stopnia porażenia roślin przez parcha i mączniaka jabłoni. Obie odmiany użyte jako formy rodzicielskie są więc donorami genów warunkujących podatność na parcha i mączniaka jabłoni u potomstwa siewek jabłoni. Nasze wyniki mają potwierdzenie w literaturze, która wskazuje, że genotypy ‘Free Redstar’ i ‘Gold Milenium’ są odmianami odpornymi na parcha jabłoni (V_f), zaś genotypy ‘Golden Delicious’ i ‘Alwa’ są odmianami średnio podatnymi na tego patogena (Rejman, 1994; Żurawicz, 2003; Lewandowski i Żurawicz, 2007; Żurawicz i in., 2013). W badaniach prowadzonych przez Lewandowskiego i Żurawicza (2007) stwierdzono także, że odmiana ‘Free Redstar’ jest odmianą odporną lub mało podatną na mączniaka jabłoni.

Do sporządzenia map genetycznych nowych odmian jabłoni wykorzystywane jest zjawisko konserwatywności (kolinearności) markerów, których sekwencje zidentyfikowane mogą być w genomach innych roślin tego samego lub innego gatunku (Gianfranceschi i in., 1998; Velasco i in., 2010). Zjawisko to wykorzystano w niniejszych badaniach podczas wyboru sekwencji markerów umożliwiających wysycenie mapy genetycznej jabłoni odmian ‘Free Redstar’ i ‘Oliwka Żółta’. W wyniku reakcji amplifikacji przeprowadzonych z 50 markerami SSR zidentyfikowano 108 polimorficznych alleli, segregujących w badanej populacji mapującej, dla których określono *loci* w genomach obu badanych form rodzicielskich. Analiza typu segregacji oraz frekwencji rekombinacji pomiędzy zidentyfikowanymi allelami pozwoliła na sporządzenie szkieletu grup sprzężeń stanowiących homologi chromosomów I, VII oraz VIII genomu jabłoni. Uzyskany szkielet mapy wybranych chromosomów obejmuje fragment genomu gatunku *Malus* o długości 595 cM. Na podstawie analizy łącznie 230 zidentyfikowanych (lata 2015–2018) heterozygotycznych alleli, różnicujących genomy odmian ‘Free Redstar’ oraz ‘Oliwka Żółta’, określono typ segregacji oraz ich rozkład w populacji mapującej (test χ^2), uzyskanej w wyniku skrzyżowania obu form rodzicielskich. Po określeniu typu segregacji oszacowano, że 86 wprowadzonych na mapę alleli markerów występujących w siewkach potomnych pochodziło z genomu odmiany ‘Free Redstar’, natomiast 89 z genomu odmiany ‘Oliwka Żółta’. W przypadku 55 markerów zidentyfikowano allele, które pochodziły z genomów obu form rodzicielskich. Na tym etapie badań sporządzono odrębne mapy genetyczne genomów jabłoni odmian ‘Free Redstar’ i ‘Oliwka Żółta’. Sporządzona mapa genomu odmiany ‘Free Redstar’ zawiera 36 grup sprzężeń, w obrębie których zidentyfikowano *loci* 127 alleli markerów SSR, segregujących w populacji mapującej. Uzyskane fragmenty wykazały istotny stopień homologii do chromosomów XIV, V, XVI, XIII, III, X, IX, XVIII, VII, VI, VIII, XII, II oraz I, referencyjnego genomu jabłoni. Natomiast na sporządzonej mapie genomu odmiany ‘Oliwka Żółta’ zlokalizowano 180 alleli markerów SSR sprzężonych w 43 grupach sprzężeń homologicznych do chromosomów I, IX, VI, XVI, X, XIII, V, XV, XVII, XIV, VIII oraz III genomu *Malus*. Wielkość zmapowanego genomu odmiany ‘Free Redstar’ wyniosła 1 522 cM, natomiast genomu odmiany ‘Oliwka Żółta’ — 2 130 cM. Stopień kolinearności zmapowanych fragmentów genomów obu odmian jabłoni z odczytami

referencyjnej mapy rodzaju *Malus* oszacowano na 58% (analiza porównawcza dla mapy zintegrowanej 'Free Redstar' × 'Oliwka Żółta') (Liebhard i in., 2002, 2003).

WNIOSKI

1. Badane genotypy rodzicielskie jabłoni różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem siły wzrostu siewek, wyrażonej średnicą i wysokością pędu przewodnikowego oraz pod względem stopnia porażenia siewek przez parcha i mączniaka jabłoni.
2. Oszacowane efekty GCA i SCA 11 form rodzicielskich przyjmują wartości dodatnie i ujemne. Odmiany te użyte w krzyżowaniach mogą przyczynić się do poprawy lub pogorszenia siły wzrostu u potomstwa, a także warunkować zwiększenie lub obniżenie podatności na parcha i mączniaka jabłoni u siewek jabłoni.
3. Nie obserwuje się pełnej kolinearności konstruowanej przez nas mapy genetycznej jabłoni 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta' z referencyjną mapą genomu *Malus* (poziom 58%).
4. Utworzone w Instytucie mapy genetyczne stanowią precyzyjną bazę do dalszych badań nad lokalizacją genów oraz regionów genomów, warunkujących długość fazy juvenilnej i poprawy jakości owoców, a także innych ważnych cech użytkowych badanych odmian jabłoni dla potrzeb hodowli twórczej gatunku.

LITERATURA

- Caliński T., Czajka S., Kaczmarek Z., Krajewski P. 2003. Podręcznik użytkownika programu SERGEN 4. Metodyka statystyczna i obsługa programu SERGEN (Wersja 4 dla Windows) przeznaczonego do serii doświadczeń odmianowych i genetyczno-hodowlanych. Wyd. IGR PAN w Poznaniu: 77.
- Gianfranceschi L., Seglias N., Tarchini R., Komjanc M., Gessler C. 1998. Simple sequence repeats for the genetic analysis of apple. *Theor. Appl. Genet.* 96: 1069 — 1076.
- Lewandowski M., Żurawicz E. 2007. Plonowanie nowych parchoodpornych odmian jabłoni hodowli Instytutu Sadownictwa i Kwiaciarnictwa w Skierniewicach na różnych typach podkładek. *Roczniki AR Poznań CCCLXXXIII, Ogrodnictwo* 41: 333 — 337.
- Liebhard R., Gianfranceschi L., Koller B., Ryder C. D., Tarchini R., van de Weg E., Gessler C. 2002. Development and characterization of 140 new microsatellites in apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Mol. Breed.* 10: 217 — 241.
- Liebhard R., Koller B., Gianfranceschi L., Gessler C. 2003. Creating a saturated reference map for the apple (*Malus × domestica* Borkh.) genome. *Theor. Appl. Genet.* 106: 1497 — 1508.
- Rejman A. 1994. Jabłonie. W: Rejman A. (ed.). *Pomologia — odmianoznawstwo roślin sadowniczych*. PWRiL, Warszawa: 19 — 130.
- Velasco R., Zharkikh A., Affourtit J., Dhingra A., Cestaro A., Kalyanaraman A., Fontana P., Bhatnagar S.K., Troggio M., Pruss D., Salvi S., Pindo M., Baldi P., Castelletti S., Cavaiuolo M., Coppola G., Costa F., Cova V., Dal Ri A., Goremykin V., Komjanc M., Longhi S., Magnago P., Malacarne G., Malnoy M., Micheletti D., Moretto M., Perazzolli M., Si-Ammour A., Vezzulli S., Zini E., Eldredge G., Fitzgerald L. M., Gutin N., Lanchbury J., Macalma T., Mitchell J.T., Reid J., Wardell B., Kodira C., Chen Z., Desany B., Niazi F., Palmer M., Koepke T., Jiwan D., Schaeffer S., Krishnan V., Wu C., Chu V.T., King S. T., Vick J., Tao Q., Mraz A., Stormo A., Stormo K., Bogden R., Ederle D., Stella A., Vecchietti A., Kater M. M., Masiero S., Lasserre P., Lespinasse Y., Allan A.C., Bus V., Chagné D., Crowhurst R. N., Gleave A. P., Lavezzo E., Fawcett J.A., Proost S., Rouzé P., Sterck L., Toppo S., Lazzari B., Hellens R. P.,

- Durel C. E., Gutin A., Bumgarner R. E., Gardiner S. E., Skolnick M., Egholm M., Van de Peer Y., Salamini F., Viola R. 2010. The genome of the domesticated apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42 (10): 833 — 841. DOI:10.1038/ng.654.
- Żurawicz E. 2003. Pomologia — odmianoznawstwo roślin sadowniczych. Aneks. Wyd. PWRiL, Warszawa.
- Żurawicz E., Lewandowski M., Pruski K. 2013. Productivity of selected Polish scab resistant apple cultivars grown on different rootstocks. *Acta Hort.* 976: 141 — 146.

MAŁGORZATA PODWYSZYŃSKA

MONIKA MARKIEWICZ

IWONA SOWIK

AGNIESZKA WOJTANIA

KRZYSZTOF KLAMKOWSKI

AGATA BRONIAREK-NIEMIEC

DOROTA KUCZYŃSKA

TADEUSZ MALINOWSKI

JOANNA PUŁAWSKA

Instytut Ogrodnictwa, Skierniewice

Kierownik Tematu: dr hab. Małgorzata Podwyszynska Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3
96-100 Skierniewice tel. +48 468345353, e-mail: malgorzata.podwyszynska@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 70.

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

Słowa kluczowe: *Malus × domestica*, *in vitro*, poliploidyzacja, tetraploidy, zmienność genetyczna,
AFLP, MSAP

WSTĘP

Jednym z ważnych źródeł zmienności jest proces poliploidyzacji. Poliploidy — genotypy o zwielokrotnionej liczbie chromosomów są szeroko wykorzystywane w programach hodowlanych wielu roślin użytkowych, gdyż charakteryzują się bujnym wzrostem i często większą odpornością na czynniki stresowe biotyczne lub abiotyczne. W poprzednich latach badań, dzięki opracowanej efektywnej metodzie poliploidyzacji *in vitro*, uzyskano liczne tetraploidy sześciu odmian jabłoni ‘Free Redstar’, ‘Gala Must’, ‘Pinova’, Co-op 32 (‘Pristine’), ‘Redchief’ i ‘Sander’. Celem badań jest 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 roku 2018 badania obejmowały ocenę uzyskanych autotetraploidów po względem cech morfologicznych, parametrów fizjologicznych oraz podatności na ww. patogeny, a także zmian w strukturze i stopniu metylacji DNA oraz wielkości genomu. Prace prowadzono w ramach 5 tematów badawczych.

TEMAT 1

Ocena *in vitro* podatności na porażenie przez *Erwinia amylovora* uzyskanych tetraploidów wytypowanym testem w odniesieniu do ich diploidalnych genotypów wyjściowych

Wykorzystano wyizolowany z jabłoni szczep *E. amylovora* nr 659 o średniej wirulencji. Pędy długości 4–5 cm inokulowano bakteriami poprzez usunięcie wierzchołka pędu skalpelem zanurzonym w inokulum (10^5 jtk/ml), następnie pędy inkubowano przez 6 tyg. na pożywce do namnażania, wykonując cotygodniowe obserwacje stopnia porażenia. Doświadczenie wykonano z udziałem 17 kolejnych genotypów tetraploidalnych 6 odmian; do badań włączono także odmianę referencyjną ‘Lobo’ o wysokim stopniu podatności na patogen. U trzech odmian ‘Free Redstar’, ‘Pinova’ i ‘Sander’ wykryto w sumie 8 klonów tetraploidalnych charakteryzujących się istotnie niższym stopniem porażenia bakteriozą w porównaniu do odmiany macierzystej i referencyjnej ‘Lobo’.

TEMAT 2

Ocena efektywności ukorzenia i aklimatyzacji w warunkach *ex vitro* roślin klonów tetraploidalnych

Porównywano efektywność aklimatyzacji pędów klonów tetraploidalnych w odniesieniu do ich diploidalnych odpowiedników w zależności od metody ukorzenia pędów: 1) *in vitro* oraz 2) *ex vitro*. Metodą *in vitro* ukorzeniano pędy 15 klonów tetraploidalnych 5 odmian. Pędy inkubowano przez 6–7 dni na pożywce indukcyjnej (1 IBA + 1 IAA + putrescyna 13 [mg l^{-1}]), następnie 14–21 dni na pożywce bez auksyn, po czym sadzono je *ex vitro* w miniszklarenkach; po 6 tyg. wykonywano obserwacje.

W drugiej metodzie pędy sadzono *ex vitro* bezpośrednio po 6–7-dniowej indukcji ukorzenia na pożywce indukcyjnej (jw.). Wykorzystano 38 klonów tetraploidalnych 6 odmian. W porównaniu do metody ukorzenia *in vitro*, dzięki zastosowaniu bezpośredniego ukorzenia poprzedzonego 6-dniową indukcją rizogenezy *in vitro*, znacznie zwiększono efektywność aklimatyzacji mikrosadzonek jabłoni zarówno diploidów (np. u odm. ‘Redchief’ z 28,5% do 58%), jak i tetraploidów — średnio z 29% do 45,7%.

TEMAT 3

Ocena zmian genetycznych/epigenetycznych uzyskanych tetraploidów w odniesieniu do diploidalnych odmian wyjściowych

Zmiany genetyczne oceniano wykorzystując analizę AFLP, do której użyto 5 par starterów. Badano 12 kolejnych genotypów tetraploidalnych 4 odmian. Podjęto także próbę wykrycia mutacji u autotetraploidów metodą sekwencjonowania genomowego DNA. Sekwencjonowanie DNA klonu tetraploidalnego odmiany 'Redchief' (najbardziej zmienione genetycznie według AFLP) w porównaniu do diploida wykonano, wykorzystując '1D Ligation Sequencing Kit', na sekwencjonatorze MinION sterowanym za pomocą komputera. Ponadto w celu wykrycia zmian spowodowanych dużymi delecjami/inwersjami czy aneuploidalnością, u kolejnych tetraploidów oceniano wielkość genomu (zawartość jądrowego DNA), wykorzystując analizę cytometrii przepływową. Z kolei zmienność epigenetyczną oceniano wykonując analizę stopnia metylacji z wykorzystaniem markerów MSAP. Analizę tę prowadzono w celu wyjaśnienia przyczyn zahamowania wzrostu niektórych tetraploidów. Analizowano po 2 genotypy tetraploidalne dwóch odmian charakteryzujących się skłonnością do przedwczesnego wchodzenia w spoczynek (rośliny o zahamowanym wzroście, będące w spoczynku i aktywnie rosnące, przed i po chłodzeniu) w odniesieniu do genotypów wyjściowych. Wykorzystano 8 par starterów MSAP.

Wyniki badań potwierdziły, iż proces poliploidyzacji indukuje zmiany genetyczne. Średni stopień zróżnicowania genetycznego badanych 8 tetraploidów 4 odmian analizowany przy użyciu markerów AFLP wynosił 2,4% w porównaniu do diploidalnych roślin wyjściowych. Natomiast nie wykryto zmian w zawartości jądrowego DNA. Z kolei wyższy stopień metylacji wykazywały rośliny tetraploidów wchodzące w okres spoczynku.

Wykorzystując platformę Oxford Nanopore MinION odczytano sekwencje dwóch bibliotek cDNA przygotowanych dla diploida i tetraploida odmiany 'Redchief'. Jednak uzyskane stosunkowo niskie całkowite liczby odczytów oraz poziom pokrycia sekwencji referencyjnych nie pozwoliły na przeprowadzenie wiarygodnej analizy ewentualnych mutacji w badanym tetraploidzie. Mimo to uzyskane wyniki wskazują na wielki potencjał tej metody, ponad 70% uzyskanych odczytów miało długości z przedziału 5000–25000 nt.

TEMAT 4

Ocena morfologiczna oraz parametrów fizjologicznych wytypowanych tetraploidów w odniesieniu do genotypów wyjściowych

Ocenie morfologicznej poddano 6–7-miesięczne rośliny 22 kolejnych tetraploidów, a parametry fizjologiczne badano u 12 tetraploidalnych genotypów. Poliploidyzacja jabłoni spowodowała wyraźną zmianę fenotypu. W porównaniu z diploidami, nowo otrzymane autotetraploidy miały krótsze pędy i mniejsze liście o zmienionym kształcie, natomiast zawartość chlorofilu u tetraploidów była wyższa. Natężenie transpiracji

i przewodność szparkowa były z reguły wyższe u tetraploidów. Aktywność fotosyntetyczna i maksymalna wydajność kwantowa PSII (Fv/Fm), u tetraploidów były porównywalne do obserwowanych u diploidów.

TEMAT 5

Ocena podatności uzyskanych poliploidów na porażenie przez *Venturia 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 powietrza, następnie przenoszono do standardowych warunków szklarniowych. Ocenę porażenia liści tetraploidów w odniesieniu do diploidalnych odmian wyjściowych oraz wrażliwej odmiany referencyjnej 'Lobo' przeprowadzono po 4 tyg. od inokulacji przy użyciu 5-stopniowej skali. Doświadczenie wykonano z udziałem 25 kolejnych genotypów tetraploidalnych 5 odmian. Tetraploidy odmian o dużej i średniej podatności na parcha ('Redchief' i 'Gala Must'), charakteryzowały się podobną podatnością na *V. inaequalis* jak odmiana macierzysta i odmiana referencyjna 'Lobo'. Natomiast u odmian o małej podatności: 'Free Redstar' — badane tetraploidy w ogóle nie były porażone, natomiast u 'Pinova' — połowa badanych tetraploidów była porażona w znikomym stopniu, a pozostałe — podobnie jak diploid.

Badania wykazały, że w wyniku poliploidyzacji uzyskano kilka genotypów tetraploidalnych wykazujących znacznie mniejszy stopień porażenia przez *E. amylovora* oraz *V. inaequalis* niż odmiany wyjściowe. Ponadto wszystkie uzyskane tetraploidy w mniejszym lub większym stopniu różniły się morfologicznie od swoich diploidalnych odpowiedników. Zasadnicze różnice morfologiczne (krótsze pędy, zmieniony kształt liści, większe aparaty szparkowe i wyższa zawartość chlorofilu) wynikają z podwojenia liczby chromosomów. Ponadto wykazano, że tetraploidy tej samej odmiany różnią się pomiędzy sobą, np. pod względem podatności na choroby. Różnice w obrębie tetraploidów danej odmiany są prawdopodobnie wynikiem zmian genetycznych i epigenetycznych na co wskazuje zmienność w strukturze DNA i stopniu metylacji, wykryta przy użyciu analizy AFLP i MSAP.

MAREK SZYMAJDA
BOGUSŁAWA IDCZAK
ANITA KURAS
MAŁGORZATA KORBIN
EDWARD ŻURAWICZ

Instytut Ogrodnictwa

Kierownik Tematu: mgr inż. Marek Szymajda Pracownia Genetyki i Hodowli Roślin Sadowniczych, Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96-100 Skierniewice, tel. 46 8345406, e-mail: marek.szymajda@inhort.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.802.20.2018, Zadanie 77.

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*

Słowa kluczowe: krzyżowanie międzygatunkowe, mieszańce międzygatunkowe, *Prunus*, embryo rescue

WSTĘP

Hybrydyzacja gatunków w obrębie rodzaju *Prunus* jest dość trudna, a jeśli już zachodzi, to charakteryzuje się niską efektywnością. Celem badań była ocena możliwości zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus* poprzez zastosowanie hybrydyzacji oddalonej gatunków *Prunus cerasifera*, *Prunus armeniaca*, *Prunus salicina*, *Prunus domestica* metodą hodowli klasycznej przy wykorzystaniu techniki *embryo-rescue*. Przyjęta hipoteza badawcza zakłada, że przy pomocy metod konwencjonalnych (hodowla i technika *embryo rescue*) możliwy jest transfer genów warunkujących cenne cechy biologiczne między wymienionymi gatunkami i uzyskanie

nowych nie występujących w naturze genotypów, posiadających skumulowane cenne cechy, występujące obrębie różnych gatunków z rodzaju *Prunus*. Zakłada się, że pozwoli to poszerzyć istniejącą bioróżnorodność w obrębie tego rodzaju.

CELE TEMATÓW BADAWCZYCH

W ramach zadania 77 w roku 2018 realizowano 6 tematów badawczych, których celem było:

- Ocena żywotności pyłku form ojcowskich moreli, śliwy japońskiej i ałyczy, użytych do krzyżowań, oraz jego zdolności do kiełkowania (wytwarzania łagiewki pyłkowej).
- Ocena kompatybilności genetycznej wybranych genotypów moreli, śliwy japońskiej, śliwy domowej i ałyczy, użytych jako formy rodzicielskie w programie krzyżowań.
- Ocena zdolności kiełkowania nasion uzyskanych z programu hybrydyzacji oddalanej lub w wyniku wolnego zapylenia kwiatów różnych genotypów ałyczy, moreli, śliwy japońskiej i śliwy domowej, dla określenia form matecznych wytwarzających nasiona o wysokiej zdolności kiełkowania.
- Optymalizacja warunków dla prawidłowego rozwoju 10 tygodniowych zarodków, uzyskanych w wyniku hybrydyzacji oddalanej w obrębie rodzaju *Prunus*.
- Opracowanie profili genetycznych dla form rodzicielskich, użytych w zrealizowanym programie krzyżowań oraz zweryfikowanie statusu mieszańca z planowanego zapylenia dla roślin potomnych uzyskanych w 2017 r.
- Ocena wybranych cech biologicznych siewek mieszańcowych uzyskanych w latach 2013–2016 dla wytypowania najbardziej wartościowych pojedynków.

OPIS WYNIKÓW

W temacie pierwszym barwienie acetoorceiną wykazało, że żywotność pyłku form ojcowskich, wykorzystanych do krzyżowań w 2018 r., wynosi od 36% do 100%. Żywotność pyłku wyrażona jego zdolnością do kiełkowania na pożywkach była niższa od zaobserwowanej po barwieniu acetoorceiną. Metodę acetoorceinową można więc stosować tylko do badań wstępnych, gdyż może wybarwiać ziarna pyłku nieaktywne fizjologicznie. Niezależnie od zastosowanej pożywki najniższą zdolność kiełkowania miał pyłek śliwy japońskiej (0–3% kiełkujących ziaren), a najwyższą moreli (30–72%). Obserwacje wzrostu łagiewek pyłkowych przez tkankę transmisyjną szyjki słupka (*in vivo*), po zapyleniu wewnątrzgatunkowym (kontrola), wykazały, że dorastają one do poziomu zalążka po upływie 48 godzin od naniesienia pyłku na znamię słupka. Natomiast obserwacje prowadzone dla kombinacji krzyżowań międzygatunkowych wykazały, że łagiewki pyłkowe dorastają do zalążka dopiero po upływie 72 godzin po zapyleniu.

W temacie drugim wykonano 20 kombinacji krzyżowań oddalonych i zapyłono 4 740 kwiatów. Duża liczba zawiązków mieszańcowych opadła w ciągu kilku tygodni po wykonaniu zapyleń, co prawdopodobnie spowodowane było wystąpieniem postzygotycznych barier krzyżowalności. Ostatecznie uzyskano 642 owoce/zawiązki owoców, co stanowi tylko 13,5% zapyłonych kwiatów. Najlepsze zawiązywanie owoców

w stosunku do liczby zapylnych kwiatów uzyskano w krzyżowaniach mieszańca (ałyca \times śliwa japońska) \times śliwa japońska (42,6%) i śliwa japońska \times ałyca (23,6%).

Badania w temacie trzecim prowadzono na 788 nasionach mieszańcowych, uzyskanych z krzyżowania genotypów śliwy japońskiej, moreli i ałyczy, z których 724 (91,9%) były to nasiona dobrze wykształcone, czyli żywotne. Pozostałe 64 nasiona (8,1%) miały silnie zdeformowane liścienie, a więc były to nasiona nieżywotne. Ocenie zdolności kiełkowania poddano tylko nasiona dobrze wykształcone. Pomimo długotrwałej stratyfikacji i pozbawienia nasion endokarpów nie wszystkie nasiona były zdolne do kiełkowania. Łącznie spośród 788 nasion dobrze wykształconych sskiełkowało 686, co stanowi 94,8%. Najlepiej kiełkowały nasiona form macecznych OSL 58, OSL 65 i 'Najdiena' (100% sskiełkowanych nasion), natomiast nieco słabiej nasiona formy macecznej 'Trumlar' (92,6% sskiełkowanych nasion).

Badania w temacie czwartym prowadzono na 81 zarodkach, uzyskanych z krzyżowania międzygatunkowego śliwy japońskiej, ałyczy i moreli oraz na 180 zarodkach (kontrola) uzyskanych w wyniku zapłodnienia wewnątrzgatunkowego (z wolnego zapylenia). Po 10 tygodniach stratyfikacji pozostało 57 żywotnych zarodków z krzyżowań międzygatunkowych i 145 z wolnego zapylenia. W fitotronie uzyskano odpowiednio 31 i 105 roślin. Z zarodków wyłożonych na pożywki MS (Murashige i Skoog) i WPM (Lloyd i McCown) uzyskano więcej roślin niż z zarodków wyłożonych na C2d (Chee i Pool). Z zarodków śliwy japońskiej D 17-73 oraz 'Czernuszka', uzyskano więcej zregenerowanych roślin niż z zarodków ałyczy 'Amelia'.

W temacie piątym przeprowadzono 1722 reakcje amplifikacji, w których wygenerowano 192 amplikony, w tym 173 polimorficznych o długości od 120 do 520 pz. Do opracowania profilu genetycznego klonu nr MMG K4 13 2013 22/1 zastosowano zestaw 20 par oligonukleotydów, w reakcji z którymi uzyskano 44 amplikony o długości od 90 do 300 pz. Status mieszańca z planowanego zapylenia potwierdzono dla 38 z 40 testowanych genotypów.

W temacie szóstym obserwacje prowadzono na 180 siewkach mieszańcowych śliwy japońskiej, ałyczy i moreli, z których zaowocowało 69 genotypów, czyli tylko 38,3% ocenionej populacji. Duża część ocenionych siewek wykształciła zdeformowane kwiaty, w których znajdowało się od kilku do kilkunastu słupków, przy jednoczesnym braku płatków kwiatowych. Wskazuje to na zaburzenia genetyczne siewek, co zapewne spowodowane jest słabą kompatybilnością genetyczną krzyżowanych form rodzicielskich. Wyróżniającą się populacją były siewki z kombinacji krzyżowania mieszańca śliwy japońskiej i ałyczy 'Najdiena' ze śliwą japońską 'Blue Gigant'. W trzecim roku (drugi rok po posadzeniu w polu) każda z ocenionych siewek w tej kombinacji zakwitła i zawiązała owoce. Z 14 ocenionych genotypów w tej kombinacji, 7 siewek dobrze owocowało i wytwarzało atrakcyjne owoce. Owoce, wytwarzane przez niektóre z tych siewek, odznaczały się dobrym odchodzeniem miąższu od pestki, co w przypadku owoców śliwy japońskiej jest rzadką cechą.

WNIOSKI

1. Okres 72 godzin po zapyleniu jest wystarczający do zapłodnienia komórki jajowej w kombinacjach krzyżowań międzygatunkowych w obrębie rodzaju *Prunus*.
2. Tradycyjna hybrydyzacja oddalona gatunków morela, śliwa japońska i ałycza jest mało efektywna. Uzyskuje się małą liczbę owoców i nasion mieszańcowych w stosunku do zapylnych kwiatów, ale możliwe jest uzyskanie nasion mieszańcowych krzyżowanych gatunków.
3. Duża część nasion uzyskanych w krzyżowaniach oddalonych śliwa japońska × morela to nasiona nieprawidłowo wykształcone.
4. Efektywność regeneracji zarodków mieszańcowych śliwa japońska × morela i ałycza × morela w warunkach *in vitro* zależy od genotypu zarodków i rodzaju zastosowanej pożywki.
5. Za pomocą wytypowanego zestawu siedmiu oligonukleotydów możliwe jest potwierdzenie tożsamości mieszańców międzygatunkowych śliwy japońskiej, moreli i ałyczy.
6. Najlepszymi cechami fenotypowymi odznaczają się siewki uzyskane ze skrzyżowania genotypów ‘Najdiena’ i ‘Blue Gigant’ [(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska].

SPIS TREŚCI — CONTENTS

Pszenica

- Paweł Czembor, Dariusz Mańkowski, Piotr Słowacki, Dominika Piaskowska 3
Mapowanie asocjacyjne genów odporności na rdzę brunatną (*Puccinia triticina*) i septoriozę paskowaną liści (*Septoria tritici*) w pszenicy
Association mapping for resistance genes to leaf rust (*Puccinia triticina*) and *Septoria tritici* blotch (*Septoria tritici*) in wheat
- Tadeusz Adamski, Maria Surma, Zygmunt Kaczmarek, Anetta Kuczyńska, 9
Krzysztof Mikołajczak, Michał Kempa, Piotr Ogrodowicz, Elżbieta Adamska,
Renata Trzeciak, Alina Anioła, Renata Holewińska
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
- Tomasz Góral, Halina Wiśniewska, Paweł Czembor, Piotr Ochodzki, Magdalena 13
Radecka-Janusik, Maciej Majka, Jarosław Przetakiewicz
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
- Anna Nadolska-Orczyk, Karolina Barchacka, Sebastian Gasparis, Hanna 21
Ogonowska, Maciej Kała
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
- Marcin Rapacz, Barbara Jurczyk, Monika Sasal 27
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
- Mirosław Tyrka, Grzegorz Fic, Magdalena Szeliga, Marcin Jaromin, Paweł 31
Krajewski, Paweł Milczarski, Tadeusz Drzazga, Przemysław Matysik, Róża
Mazur, Teresa Sikora, Edward Witkowski, Justyna Buczkowicz, Dorota Tyrka
Selekcja genomowa pszenicy ozimej
Genomic selection of winter wheat
- Aleksandra Pietrusińska 35
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 brown rust (*Puccinia triticina*) in winter wheat
- Halina Wiśniewska, Maciej Majka, Magdalena Gawłowska, Marek Korbas, 41
Jolanta Belter
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*

Wacław Orczyk, Marta Dmochowska-Boguta, Yuliya Kloc	45
Tolerancja na stresy abiotyczne — genotypowanie pszenicy w oparciu o strategię genów kandydujących	
Tolerance for abiotic stresses — genotyping of wheat based on candidate gene strategy	
Magdalena Szechyńska-Hebda, Natalia Hordyńska, Stanisław Grzesiak, Maciej Grzesiak, Lidia Sas-Paszt, Anna Lisek, Beata Sumorok, Edyta Derkowska, Krzysztof Weszczak, Mateusz Frąc, Michał Przybył, Paweł Trzciniński, Sławomir Głuszek	47
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-Hebda, Natalia Hordyńska, Maria Pilarska, Ireneusz Ślesak, Maria Wędzony, Joanna Troczyńska, Zofia Banaszak	49
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	
Piotr T. Bednarek, Renata Orłowska	53
Analiza zmienności somaklonalnej indukowanej w kulturach <i>in vitro</i> u roślin zbożowych	
Analysis of somaclonal variation induced in cereals tissue cultures	
Pszenżyto	
Piotr T. Bednarek, Marzena Wasiak, Agnieszka Niedziela	59
Poszukiwanie markerów molekularnych genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS Tt	
Exploration the markers linked to the pollen sterility genes in triticale with CMS Tt	
Stefan Stojałowski, Marta Orłowska, Martyna Sobczyk, Anna Bienias, Marcin Berdzik, Beata Myśków, Halina Góral, Magdalena Simlat, Tomasz Warzecha, Wojciech Wesołowski, Marek Szklarczyk, Mirosław Pojmaj	63
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 cytoplasms and perspectives of its utilization for development of CMS system in wheat	
Edward Arseniuk, Lidia Kowalska	67
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: <i>Parastagonospora nodorum</i> (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 and tolerance to septoria leaf and glume [agent: <i>Parastagonospora nodorum</i> (Berk.), (Quaedvlieg, Verkley & Crous.)]	
Edward Arseniuk, Jakub Walczewski, Piotr Ochodzki	71
Toksyny białkowe <i>Parastagonospora nodorum</i> i ich związek z patogennością oraz odpornością pszenżyta i pszenicy na septoriozę liści i plew	
<i>Parastagonospora nodorum</i> proteinaceous toxins and their connection with wheat and triticale susceptibility and resistance on <i>stagonospora nodorum</i> blotch	

Halina Wiśniewska, Tomasz, Góral, Piotr Ochodzki, Maciej Majka, Dorota Walentyn-Góral, Jolanta Belter	75
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	
Anna Linkiewicz, Krzysztof Michalski	81
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	
Justyna Leśniowska-Nowak, Michał Nowak, Magdalena Sozoniuk	83
Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone	
Development of new genetic sources of triticale based on wide crosses	
Michał Nowak, Piotr T. Bednarek, Justyna Leśniowska-Nowak, Magdalena Sozoniuk, Karolina Dudziak, Magdalena Kawęcka, Karolina Różaniecka	89
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	
Jęczmień	
Mirosław Kwaśniewski, Karolina Chwiałkowska, Urszula Nowakowska, Małgorzata Nawrot, Janusz Jelonek, Grażyna Skawińska-Zydroń, Agnieszka Bielska	95
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	
Jerzy Czembor, Aleksandra Pietrusińska, Kinga Smolińska	101
Współdziałanie odporności na mączniaka (<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>) warunkowanej genem <i>mlo</i> z wartością cech gospodarczych jęczmienia ozimego	
Interaction between powdery mildew (<i>Blumeria graminis</i> f.sp. <i>hordei</i>) resistance determined by <i>mlo</i> gene and economical value characteristics in winter barley	
Damian Gruszka	105
Badania nad wpływem brasinosteroidów na tolerancję roślin jęczmienia na stres niedoboru wody	
Research on influence of brassinosteroids on tolerance of barley plants to drought stress	
Renata Orłowska, Piotr Tomasz Bednarek, Sławomir Bany	111
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	
Iwona Żur, Ewa Dubas, Sabina Malaga, Franciszek Janowiak, Anna Janeczko, Marcin Rapacz, Tomasz Hura, Piotr Waligórski, Agnieszka Ostrowska, Magdalena Wójcik-Jagła	113
Identyfikacja czynników determinujących odporność jęczmienia ozimego (<i>Hordeum vulgare</i> L.) na suszę i mróz	
Identification of factors which determine drought and freezing tolerance in barley (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	

Anetta Kuczyńska, Maria Surma, Tadeusz Adamski, Paweł Krajewski, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogrodowicz, Michał Kempa, Hanna Ćwiek-Kupczyńska, Renata Trzeciak	117
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	
Iwona Szarejko, Monika Gajecka, Mirosław Kwaśniewski, Marek Marzec, Beata Chmielewska, Janusz Jelonek, Justyna Zbieszczyk	123
Molekularne podstawy zjawiska albinizmu w kulturach izolowanych mikrospor jęczmienia	
Molecular basis of albinism in barley isolated microspore culture	
Żyto	
Tomasz Kosiada, Roman Andrzejak, Marcin Wieczyński, Patrycja Marciniak	127
Badania nad zwiększeniem odporności żyta na sporysz i na fuzariozę kłosów przez poznanie interakcji pasażer — 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 Fusarium head blight by studying the host-parasite-environment relationship using genetic sources of resistance to <i>Claviceps purpurea</i> and <i>Fusarium</i> genus	
Ewa Dubas, Kamil Zieliński, Monika Krzewska, Iwona Żur, Anna Nowicka, Katarzyna Juzoń	135
Identyfikacja czynników determinujących efektywność otrzymywania podwojonych haploidów żyta (<i>Secale cereale</i> L.) metodami androgenezы i krzyżowań oddalonych	
Identification of factors determining the efficiency of doubled haploids production in rye (<i>Secale cereale</i> L.) through androgenesis and distant crosses	
Sylwia Mikołajczyk, Dorota Weigt, Agnieszka Tomkowiak, Zbigniew Broda, Jan Bocianowski	139
Haploidyżacja żyta — diagnostyka molekularna oraz wpływ nanomolekuł na wspomaganie indukcji i regeneracji roślin w warunkach <i>in vitro</i>	
Haploidization of the rye — the molecular diagnostics and the influence of nanomolecules on supporting the induction and regeneration of plants in <i>in vitro</i> conditions	
Piotr Bednarek, Agnieszka Niedziela, Marzena Wasiak, Sławomir Bany	145
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	
Stefan Stojalowski, Marta Orłowska, Martyna Sobczyk, Anna Bienias, Beata Myśków, Przemysław Tomczak, Wojciech Wesołowski, Marek Szklarczyk, Waldemar Brukwiński, Katarzyna Banaszak, Monika Hanek, Renata Krysztofik, Marek Zajac	151
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 Stojalowski, Marta Orłowska, Martyna Sobczyk, Anna Bienias, Beata Myśków, Marzena Ostrowska, Marek Zajac, Róża Mazur, Dorota Jasińska	155
Badania wewnętrznej struktury genetycznej odmian żyta oraz dziedzicznego podłoża efektu heterozji	
Study on internal genetic structure of rye cultivars and genetic background of heterosis	

Janusz Zimny, Katarzyna Makowska, Aleksandra Zimny, Andrzej Czaplicki, Sylwia Oleszczuk	159
Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury <i>in vitro</i> The study on rye microspore reaction to stress and <i>in vitro</i> culture conditions	
Henryk Bujak, Kamila Nowosad, Agnieszka Łącka	163
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	
Owies	
Grzegorz Lemańczyk, Aleksander Łukanowski, Anna Baturo-Cieśniewska	165
Poszukiwanie źródeł odporności owsa (<i>Avena sativa</i> L.) na nowy patogeniczny i mykotoksynotwórczy gatunek — <i>Fusarium langsethiae</i> Searching for oat (<i>Avena sativa</i> L.) resistance to a new pathogenic and mycotoxigenic species — <i>Fusarium langsethiae</i>	
Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa, Aneta Koroluk, Joanna Toporowska, Ewelina Marek, Piotr Bednarek	169
Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego Linkage and association mapping of oat	
Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa, Aneta Koroluk, Joanna Toporowska, Ewelina Marek	173
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	177
Badanie składników determinujących wartość odżywczą i funkcjonalną owsa oraz ich relacji w ziarnie obłuszczonej i oplewionym Components determining the nutritive and functional values of oat and its relation between hulled and dehulled grains	
Sylwia Okoń, Tomasz Ociepa, Aleksandra Nucia	181
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 oats and the pyramidization of effective resistance genes in the oat genome	
Rzepak	
Iwona Bartkowiak-Broda, Alina Liersch, Marcin Matuszczak, Katarzyna Mikołajczyk, Wiesława Popławska, Joanna Wolko, Joanna Nowakowska	183
Badanie genomu rzepaku ozimego przy wykorzystaniu markerów molekularnych The investigations of winter rapeseed genome with the use of molecular markers	
Teresa Cegielska-Taras, Katarzyna Sosnowska, Laurencja Szała	189
Wprowadzanie nowych alleli z pul genowych różnych gatunków z rodzaju <i>Brassica</i> do bazy genowej rzepaku ozimego Introduction of new alleles from gene pools of various <i>Brassica</i> species to the winter oilseed rape genome	

Danuta Boros, Kinga Gołębiowska	193
Badanie czynników determinujących niską strawność białka śruty uzyskanej z nasion rzepaku ozimego	
Components determining the low protein digestibility of meal obtained from seeds of winter rapeseed	
Krzysztof Michalski, Renata Daleka, Mariola Ebertowska, Czesława Fink, Justyna Karauda	195
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 working in range 400–2500 nm destined to evaluate and study of variability glucosinolates, protein, NDF, ADF and sterols content in oilseeds	
Janetta Niemann, Małgorzata Jędrzycka, Joanna Majka, Marek Mrówczyński, Joanna Kaczmarek, Dorota Weigt	199
Introdukcja genów odporności na choroby i owady oraz męskiej sterility z pokrewnych gatunków rodzaju <i>Brassica</i> do rzepaku (<i>Brassica napus</i> L.)	
Introduction of disease and pest resistance genes and male sterility from <i>Brassica</i> relatives to rapeseed (<i>Brassica napus</i> L.)	
Stanisław Spasibionek, Katarzyna Mikołajczyk, Marcin Matuszczak, Magdalena Walkowiak, Joanna Nowakowska	203
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	
Michał Starzycki	207
Badanie bioróżnorodności gatunków z plemienia <i>Brassicaceae</i> w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny	
Biodiversity studies of species of <i>Brassicaceae</i> to obtain forms of oilseed rape improved in terms of resistance to pathogens	
Monika Markiewicz, Lech Michalczuk, Agnieszka Czajka, Beata Kowalska, Piotr Kamiński	211
Badanie molekularnego mechanizmu odporności na kiłę kapusty (<i>Plasmodiophora brassicae</i>) u roślin z rodzaju <i>Brassica</i>	
Studies on molecular mechanism of clubroot (<i>Plasmodiophora brassicae</i>) in <i>Brassica</i> plants	
Małgorzata Jędrzycka, Joanna Kaczmarek, Joanna Majka, Janetta Niemann, Ewa Jajor, Witold Irzykowski, Marek Korbas	219
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 search of resistance sources to clubroot and the characterisation of the current population of the pathogen in Poland	
Kukurydza	
Elżbieta Czembor, Seweryn Frasiński	223
Poszukiwanie form kukurydzy o wysokiej odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi powodowane przez grzyby z rodzaju <i>Fusarium</i> spp.	
Identification of new sources of resistance for ear rot and stalk rot diseases caused by <i>Fusarium</i> spp.	

Marcin Wit, Piotr Ochodzki, Roman Warzecha, Ada Zawadzka, Monika Żurek, Ewa Mirzwa-Mróż, Emilia Jabłońska, Dorota Bylicka, Józef Adamczyk, Anna Rogacka, Janusz Rogacki, Krzysztof Wójcik, Wojciech Wakuliński	227
<i>Fusarium temperatum</i> — znaczenie i szkodliwość w uprawie kukurydzy, poszukiwanie i charakterystyka źródeł odporności	
<i>Fusarium temperatum</i> — importance and harmfulness in maize crops, search and characterization of resistance sources	
Henryk Bujak, Kamila Nowosad, Agnieszka Łącka, Jerzy Nawracała, Agnieszka Tomkowiak, Danuta Kurasiak-Popowska, Dorota Weigt	231
Określenie zróżnicowania genetycznego linii wsobnych kukurydzy za pomocą markerów molekularnych	
Evaluation of genetic diversity of inbred maize lines using molecular markers	
Ziemniak	
Dominika Boguszevska-Mańkowska, Krystyna Zarzyńska, Krzysztof Treder, Bogumiła Zacharzewska	235
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	
Bogdan Flis, Beata Tatrowska	239
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	
Renata Lebecka, Zofia Murawska, Katarzyna Szajko, Janusz Dębski, Michał Kistowski, Waldemar Marczewski, Ewa Zimnoch-Guzowska	243
Badania ekspresji i genetyczna charakterystyka odporności na bakterie <i>Dickeya solani</i> w wyróżnionych źródłach odporności w ziemniaku na poziomie diploidalnym	
Research on the expression and genetic characterization of the resistance to bacteria <i>Dickeya solani</i> in selected for resistance diploid potato	
Dorota Milczarek, Bogdan Flis	247
Wyróżnianie form ziemniaka o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak przy wykorzystaniu metod konwencjonalnych i molekularnych. Charakterystyka nowego źródła odporności na <i>Globodera pallida</i> znalezione w <i>Solanum gourlayi</i>	
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 <i>Globodera pallida</i> found in <i>Solanum gourlayi</i>	
Dorota Michałowska, Agnieszka Przewodowska, Włodzimierz Przewodowski, Paulina Buryło	251
Eliminacja patogenów niekwartantowych (bakterie endogenne i wirusy) oraz kontrola zdrowotności roślin ziemniaka w banku <i>in vitro</i>	
Elimination of non-quarantine pathogens (viruses and endophytic bacteria) and control of potato plantlets healthiness in the <i>in vitro</i> bank	
Beata Tatarowska, Bogdan Flis, Iwona-Wasilewicz Flis	255
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	

Krzysztof Treder, Mateusz Mielczarek, Anna Pawłowska, Bogumiła Zacharzewska, Maria Fedczak	261
Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka Development of sensitive methods for detection of the most important potato viruses	
Włodzimierz Przewodowski, Katarzyna Salamońska, Dorota Szarek, Dorota Michałowska Wioleta Stochła, Agnieszka Przewodowska, Grzegorz Gryń, Milena Pietraszko, Katarzyna Franke	265
Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czulej identyfikacji bakterii <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych Research and development of selective isolation and sensitive identification methods of <i>Clavibacter michiganensis</i> ssp. <i>sepedonicus</i> bacteria in difficult diagnostic environmental samples	
Burak cukrowy	
Dariusz Grzebelus, Gabriela Machaj, Alicja Macko-Podgórn, Kornelia Kwolek, Rafał Barański, Wojciech Wesołowski, Marcelina Wajdzik, Anna Szlachetowska, Beata Domnicz, Przemysław Gierski, Marek Szklarczyk	271
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 Goška	277
Badania nad mechanizmami warunkującymi proces embriogenezy gametycznej u buraka cukrowego The research on the mechanisms responsible for gametic embryogenesis in sugar beet	
Burak ćwikłowy	
Marek Szklarczyk, Wojciech Wesołowski, Marcelina Wajdzik, Anna Szlachetowska, Beata Domnicz, Anna Burda	281
Analiza czynników genetycznych związanych z przywracaniem płodności roślin buraka ćwikłowego Analysis of genetic factors linked to fertility restoration in table beet	
Ogórek	
Grzegorz Bartoszewski, Renata Słomnicka, Helena Olczak-Woltman, Aleksandra Korzeniewska, Teresa Gałęcka, Karolina Kaźmińska, Katarzyna Niemirowicz-Szczytt	287
Doskonalenie ogórka (<i>Cucumis sativus</i> L.) pod względem odporności na kanciastą plamistość Improvement of cucumber (<i>Cucumis sativus</i> L.) in terms of angular leaf spot resistance	
Urszula Kłosińska, Marzena Nowakowska, Wojciech Szczehura, Katarzyna Nowak, Waldemar Treder, Krzysztof Klamkowski, Katarzyna Wójcik	291
Opracowanie genetycznych, fizjologicznych i biochemicznych podstaw tolerancji ogórka na stres niedoboru wody Development of genetic, physiological and biochemical basis of cucumber tolerance to water deficit stress	
Pomidor	
Małgorzata Czernicka, Kinga Kęska, Marek Szklarczyk, Michał Dziurka, Anna Kołton, Iwona Kamińska, Urszula Pieniążek, Dorota Chachłowska	295
Analiza wpływu hipoksji na zwiększenie tolerancji na stresy u pomidora <i>Lycopersicon esculentum</i> L.) i ogórka (<i>Cucumis sativus</i> L.) Analysis of the effects of exposure to hypoxia on increase stress tolerance at tomato (<i>Lycopersicon esculentum</i> L.) and cucumber (<i>Cucumis sativus</i> L.)	

Wojciech Szczechura, Marzena Nowakowska, Urszula Kłosińska, Katarzyna Nowak, Krzysztof Rutkowski	299
Badania cytologicznych i biochemicznych mechanizmów odporności roślin w patosystemach pomidor — <i>Phytophthora infestans</i> oraz ogórek — <i>Pseudoperonospora cubensis</i> Studies of cytological and biochemical mechanisms of plant resistance in the pathosystems tomato — <i>Phytophthora infestans</i> and cucumber — <i>Pseudoperonospora cubensis</i>	
Marzena Nowakowska, Urszula Kłosińska, Katarzyna Nowak, Wojciech Szczechura	303
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	
Cebula	
Urszula Kłosińska, Marzena Nowakowska, Wojciech Szczechura, Katarzyna Nowak, Waldemar Treder, Krzysztof Klamkowski, Katarzyna Wójcik	309
Analiza genetycznych i biochemicznych podstaw tolerancji cebuli (<i>Allium cepa</i> L.) na stres niedoboru wody Analysis of genetic and biochemical basis of onion (<i>Allium cepa</i> L.) tolerance to water deficit stress	
Marchew	
Dariusz Grzebelus, Alicja Macko-Podgórn, Katarzyna Stelmach, Kornelia Kwolek, Dariusz Kadłuczka, Zbigniew Gajewski, Rafał Barański	313
Opracowanie i wykorzystanie wysokowydajnych technik selekcji genomowej w doskonaleniu warzyw Development and application of high-throughput techniques for genomic selection in the improvement of vegetable crops	
Marek Szklarczyk, Wojciech Wesołowski, Marcelina Wajdzik, Anna Szlachetowska, Beata Domnicz, Stefan Stojalowski	319
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 plants	
Ewa Grzebelus, Marek Szklarczyk, Rafał Barański, Aneta Malec	323
Transfer cytoplazmatycznej męskiej sterylności poprzez somatyczną hybrydyzację u marchwi Transfer of cytoplasmic male sterility through somatic hybridization in carrot	
Kapusta głowiasta, Kapusta pekińska, Rośliny kapustowate	
Adela Adamus, Agnieszka Kielkowska, Marek Szklarczyk	327
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	331
Otrzymanie nowej zmienności genetycznej warzyw kapustowatych przy wykorzystaniu krzyżowań oddalonych w rodzaju <i>Brassica</i> Development of the new genetic diversity of vegetable brassicas by the use of distant hybridization	

Groch	
Wojciech Świącicki, Magdalena Gawłowska, Andrzej Górny, Dominika Ratajczak, Alicja Niewiadomska, Lech Boros	335
Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stesy abiotyczne Identification of the regions in the pea genome, responsible for selected parameters of physiological efficiency, as an important element of resistance to the abiotic stresses	
Soja	
Jerzy Nawracała, Danuta Kurasiak-Popowska, Agnieszka Kaczmarek	339
Analiza bioróżnorodności zasobów genowych soi przydatnej do hodowli w warunkach klimatycznych Polski i opracowanie metodyki krzyżowania międzygatunkowego <i>Glycine max</i> × <i>Glycine soja</i> Analysis of biodiversity of soybean gene resources useful for breeding in climatic conditions of Poland and development of interspecific <i>Glycine max</i> × <i>Glycine soja</i> crossing methodology	
Jerzy Nawracała, Michał Książkiewicz, Danuta Kurasiak-Popowska, Janetta Niemann, Sandra Rychel, Agnieszka Tomkowiak, Dorota Weigt, Bogdan Wolko	343
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 development of methodology of obtaining homozygous soybean plant	
Łubin	
Renata Galek, Bartosz Kozak, Dariusz Zalewski, Ewa Sawicka-Sienkiewicz, Adela Adamus, Agnieszka Kiełkowska	347
Badania nad gametyczną embriogenezą u <i>Lupinus angustifolius</i> L. — indukcja haploidów i analiza genetycznego podłoża tego procesu Research on gametic embryogenesis in <i>Lupinus angustifolius</i> L. — haploid induction and analysis of the genetic basis of this process	
Michał Książkiewicz, Piotr Plewiński, Sandra Rychel, Magdalena Tomaszewska, Aneta Sawikowska, Wojciech Bielski, Barbara Naganowska, Bogdan Wolko	357
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 Rybiński, Wojciech Świącicki, Paweł Barzyk	361
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 Świącicki, Magdalena Kroc, Paweł Barzyk, Katarzyna Czepiel, Paulina Wilczura	365
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	

Chmiel	
Marcin Przybyś, Urszula Skomra, Grażyna Korbecka-Glinka	371
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	
Trawy wieloletnie	
Elżbieta Czembor, Włodzimierz Majtkowski, Jan Schmidt, Seweryn Frasiński, Damian Marciniak	375
Gromadzenie i ocena kolekcji ekotypów traw wieloletnich z uwzględnieniem cech warunkujących ich wykorzystanie na cele alternatywne	
Creation perennial grasses ecotypes collection and evaluation their suitability for the special purposes	
Arkadiusz Kosmala, Adam Augustyniak, Dawid Perlikowski, Izabela Pawłowicz, Włodzimierz Zwierzykowski, Agnieszka Płazek, Eugeniusz Paszkowski	379
Identyfikacja genów związanych z ekspresją zimotrwałości i tolerancji suszy u form introgresyjnych <i>Lolium multiflorum/Festuca arundinacea</i>	
Identification of genes associated with winter-hardiness and drought tolerance in the introgression forms of <i>Lolium multiflorum/Festuca arundinacea</i>	
Grzegorz Żurek, Danuta Martyniak, Kamil Prokopiuk, Agnieszka Rachwalska, Eugeniusz Paszkowski, Maciej Jurkowski	383
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	
Małgorzata Korbin, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Agnieszka Masny, Bogusława Idczak, Krystyna Strączyńska	389
Badania nad saturacją mapy genetycznej ‘Elsanta’ × ‘Senga Sengana’ pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (<i>Fragaria × ananassa</i>)	
Research on saturation of the genetic map of ‘Elsanta Senga’ × ‘Sengana’ for locating genes linked to important traits of strawberry (<i>Fragaria × ananassa</i>)	
Agnieszka Masny, Monika Mieszczakowska-Frąc, Anita Kuras, Edward Żurawicz, Małgorzata Korbin	393
Badania nad możliwością zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w owocach truskawki na drodze hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju <i>Fragaria</i>	
Studies on possibilities of increasing of bioactive compounds in strawberry fruits through intra- and interspecific hybridization within <i>Fragaria</i> genus	
Borówka wysoka	
Stanisław Pluta, Danuta Kucharska, Łukasz Seliga	397
Ocena potencjału genetycznego wybranych genotypów borówki wysokiej (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) w oparciu o czynnikiowy układ krzyżowań	
Evaluation of the genetic potential of selected genotypes of highbush blueberry (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.) based on a factorial crossing design	

Malina

- Agnieszka Masny, Danuta Kucharska, Monika Mieszczakowska-Frać, Anita Kuras, Edward Żurawicz 403

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, Stanisław Pluta, Łukasz Seliga, Lucyna Ogórek, Barbara Wiosna, Stanisław Bodek 407

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

- Bogumiła Badek, Stanisław Pluta, Małgorzata Korbin 411

Charakterystyka markerów molekularnych, sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)

Characteristics of molecular markers linked with the resistance to gall mite (*Cecidophyopsis ribis*)

Jabłoń

- Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Mariusz Lewandowski, Małgorzata Korbin 415

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

- Mariusz Lewandowski, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Małgorzata Korbin, Edward Żurawicz 419

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

- Małgorzata Podwyszyńska, Monika Markiewicz, Iwona Sowik, Agnieszka Wojtania, Krzysztof Klamkowski, Agata Broniarek-Niemiec, Dorota Kuczyńska, Tadeusz Malinowski, Joanna Puławska 425

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

Prunus

- Marek Szymajda, Bogusława Idczak, Anita Kuras, Małgorzata Korbin, Edward Żurawicz 429

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*