

BIULETYN Nr 291 / 2020

ISSN 0373-7837

suplement 1

E-ISSN 2657-8913

INSTYTUTU HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN

BULLETIN

OF PLANT BREEDING AND ACCLIMATIZATION INSTITUTE



**POSTĘP BIOLOGICZNY
KOMUNIKATY**

Pole IHAR. Fot. Aleksandra Pindor

RADZIKÓW 2020
INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
RADZIKÓW, 05-870 BŁONIE

NR 291 (1) / 2020
Suplement do wydania



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

2020 r.

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, Renata Lebecka, 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, Wiesław Podyma


Czasopismo ukazuje się od 1951 roku

Redaktor techniczny i skład komputerowy: Aleksandra Pindor

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

Paweł Czembor , Dariusz Mańkowski, Piotr Słowacki, Dominika Piaskowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
Zakład Genetyki i Hodowli Roślin,
 e-mail: p.czembor@ihar.edu.pl, tel. 22 7334555

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie nr 4.

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

Rdza brunatna (czynnik sprawczy *Puccinia triticina*) i septorioza paskowana liści (ang. Septoria Tritici Blotch, STB) (czynnik sprawczy *Septoria tritici*) są jednymi z ważniejszych chorób mogących spowodować znaczne straty plonu ziarna w uprawie pszenicy (Eyal i in. 1987, McKendry i in. A1995), stąd duży nacisk na poszukiwanie nowych źródeł odporności i odwołę hodmian odpornych.

W ramach pierwszego tematu badawczego w roku 2019 oceniono stopień porażenia zestawu 200 odmian/linii pszenicy ozimej (obejmującego 175 odmian/linii europejskich oraz 25 odmian/linii różnicujących) przez wybrany izolat *S. tritici*. W tym celu jesienią 2018 roku założono doświadczenie w układzie dwóch losowych bloków, wysiewając odmiany/linie pojedynczych jednodniowych rzędkach. Wiosną rośliny z rozwiniętym w pełni liściem flagowym zakażono izolatem *S. tritici* IPO86036 i po trzech tygodniach przeprowadzono ocenę reakcji fenotypowej każdego obiektu. Precyzyjne określenie parametrów chorobowych wykonano przy użyciu komputerowej analizy obrazu porażonych liści (WinCam 2010, Regent Instruments Inc., Kanada). W celu wyróżnienia odmian charakteryzujących się podobną reakcją zastosowano analizę skupień aglomeracyjnego grupowania hierarchicznego (ang. agglomerative hierarchical clustering, AHC) przy użyciu algorytmu UPGA (ang. unweighted pair-group

average)(program komputerowy Genstat 19, VSNI, W. Brytania). W wyniku analizy otrzymano 6 grup obiektów. Najliczniejsza grupa składała się z 130 obiektów, w tym 11 obiektów o wysokim poziomie odporności na STB (pokrycie nekrozą <30% oraz pokrycie piknidiami <10%). Wśród nich znalazły się odmiany Kranich, Desamo, Lear, Jenga, Zappa, Intro, Glaucus i Erasmus oraz 3 linie/odmiany z zestawu różnicującego: M3 synthetic (W-7976) (*Stb16q* (3DL) + *Stb17* (5AL)), Solitar (QTL na chromosomach 5A, 6D i 7D) i Tuareg (QTL na chromosomach 4B i 6B + *Stb6*). W ramach drugiego tematu badawczego przy zastosowaniu technologii DArT-seq wykonano genotypowanie zestawu 188 obiektów wybranych spośród linii/odmian wykorzystanych w testach fitopatologicznych. Uzyskane dane zostaną wykorzystane w badaniach asocjacji w skali całego genomu (GWAS – ang. genome-wide association studies) zaplanowanych na następny rok realizacji tematu.

Literatura

- Eyal, Z., Scharen, A.L., Prescott, J.M., van Ginkel, M. (1987). The Septoria diseases of wheat: concepts and methods of disease management. CIMMYT, Mexico
- McKendry, A.L., Henke, G.E., Finney, P.L. (1995). Effects of septoria leaf blotch on soft red winter wheat milling and baking quality. Cereal Chemistry 72: 142–146.

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

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

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

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań,
✉ e-mail: tada@igr.poznan.pl, tel. 6550271

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR. ln. 802.2.2019. Zadanie 3.

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

Celem badań wieloletnich jest stwierdzenie, czy obecne w niektórych odmianach pszenicy translokacje 1B/1R mają wpływ na efektywność uzyskiwania form haploidalnych i linii podwojonych haploidów na drodze krzyżowania pszenicy z kukurydzą oraz zmienność i stabilność uzyskanych na tej drodze genotypów. W 2019 r. badano strukturę interakcji genotypowo-środowiskowej wybranych cech plonotwórczych i technologicznych ziarna linii DH i SSD pszenicy pszenicy ozimej, wyprowadzonych z mieszańców form translokowanych z nietranslokowanymi, na podstawie serii doświadczeń polowych założonych w czterech lokalizacjach. Każde z doświadczeń założono w dwóch powtórzeniach w układzie czynnikowym z zastosowaniem schematu split-blok o blokach kompletnych.

Materiał do badań stanowiły trzy populacje linii DH i SSD pszenicy ozimej: SM/TB1, AND130 i KAREN. w skład każdej z badanych populacji wchodziły w tej samej liczbie linie DH i SSD zawierające translokacje 1B/1R i bez translokacji. Łącznie każde doświadczenie obejmowało 120 linii. Obserwacje dotyczyły wysokości roślin, masy 1000 ziaren, plonu z poletka, zawartości białka w ziarnie (% s.m.), zawartości glutenu (%) oraz wskaźnika sedymentacji Zeleny'ego (cm³), a także wytrzymałości ciasta na rozciąganie.

Uzyskane wyniki obserwacji obliczono statystycznie stosując jednowymiarową (ANOVA)

i wielowymiarową (MANOVA) analizę wariancji i pokrewne metody wielu zmiennych. Formy translokowane porównano z nietranslokowanymi poprzez ocenę i testowanie kontrastów między nimi pod względem poszczególnych cech. Dokonano także szczegółowej analizy linii DH i SSD oceniając ich efekty główne. W analizie wariancji wyodrębniono jako źródła zmienności środowiska, genotypy oraz interakcję genotypy × środowiska (GE) z rozbiem na regresję względem środowiska i odchylenia od regresji, a także błąd doświadczenia. Pozwoliło to na weryfikację hipotez ogólnych o braku efektów głównych środowisk, braku interakcji GE oraz braku odchyleń od regresji. W kolejnym kroku dokonano szczegółowej analizy każdej linii poprzez podanie oceny jej efektu głównego dla badanych cech plonotwórczych i technologicznych oraz wielkości interakcji GE mierzonej za pomocą statystyki F.

Istotny wpływ translokacji na średnie wartości efektów głównych zaobserwowano tylko w populacji AND130 w odniesieniu do wysokości roślin. Średni efekt główny dla linii SSD nietranslokowanych (SSDn) wynosił 6,2 cm, podczas gdy dla linii SSDt (translokowanych) przybierał wartości ujemne (-3,94 cm). Podobna tendencja wystąpiła również w tej populacji dla linii DH. Dla masy 1000 ziaren w badanych populacjach nie obserwowano istotnego wpływu translokacji na średni efekt główny.

Pod względem plonu z poletka większość

z badanych linii DH i SSD, zarówno zawierających translokację jak i bez translokacji, nie odbiegała od średniej dla wszystkich genotypów. Tylko nieliczne linie DH lub SSD, zarówno translokowane jak i nietranslokowane, odznaczały się dodatnimi wartościami efektów głównych punktów. Uwagę zwraca populacja AND130, w której średnia dla grupy linii SSD z translokacjami istotnie przewyższała średnią dla wszystkich genotypów.

Celem badań było także określenie związku między występowaniem translokacji pszenno-żytnich a kształtowaniem się parametrów technologicznych ziarna pszenicy. Parametry technologiczne ziarna określono za pomocą spektrofotometru typu DA7200 firmy Perten. Oznaczono procentową zawartość białka w s.m., zawartość glutenu (%) oraz wskaźnik sedymentacji Zeleny'ego (cm^3). Linie SSD z translokacją 1B/1R w populacjach AND130 i KAREN w porównaniu do linii SSD nietranslokowanych odznaczały się na ogół niższymi od średniej dla wszystkich genotypów wartościami wskaźnika sedymentacji Zeleny'ego. Nie stwierdzono istotnego wpływu translokacji na kształtowanie się pozostałych cech.

W 40 liniach wybranych losowo z populacji AND130 oraz SM/TB1 określono wytrzymałości ciasta na rozciąganie. Analizy przeprowadzono na analizatorze tekstury z przystawką Kieffer'a (TA XT plus Texture Analyser Dough & Gluten Extensibility Rig). Stwierdzono, że w populacji SM/TB1 linie z translokacją 1B/1R charakteryzowały się większą wytrzymałością ciasta na zrywanie i niewiele większym oporem w porównaniu do form bez translokacji żytniej. Uzyskane wyniki wskazują, że obecność translokacji 1B/1R w niektórych populacjach linii DH i SSD może wpływać korzystnie na wytworzenie wystarczająco silnej struktury ciasta do zapewnienia korzystnego miesienia równomiernego i stabilnego rozkładu pęcherzy powietrza podczas fermentacji i relaksacji ciasta.

Przeprowadzona seria doświadczeń pozwoliła na zbadanie, czy obecność translokacji pszenno-żytnich ma wpływ na reakcję linii pszenicy

na zróżnicowane warunki środowiskowe, a więc na ich stabilność pod względem wybranych cech agronomicznych i technologicznych. Stabilność linii analizowano za pomocą programu komputerowego SERGEN (Caliński i in. 2005). Stwierdzono, że większość zarówno translokowanych jak i nietranslokowanych linii DH i SSD pszenicy była stabilna pod względem analizowanych cech. Spośród badanych populacji uwagę zwraca AND130; której linie SSD zawierające translokację były stabilne pod względem plonu z poletka w różnych warunkach środowiska i zarazem odznaczały się wysokimi zdolnościami adaptacyjnymi. Podobne zależności wystąpiły w liniach SM/TB1.

Interesujących wyników dostarczyła, wykonana dla każdej populacji odrębnie, analiza linii DH i SSD pod względem wysokości roślin, masy 1000 ziaren oraz plonu z poletka analizowanych łącznie. W kombinacji krzyżówkowej AND130 usytuowanie na płaszczyźnie w układzie dwóch pierwszych składowych głównych punktów z czterech ocenianych grup linii (SSDn, SSDt, DHn, DHt) jednoznacznie wskazuje, że punkt opisujący linie SSDn jest znacznie oddalony od punktów przedstawiających pozostałe linie. Podobne zależności wystąpiły między badanymi formami w populacji KAREN, gdzie linie SSDn istotnie odbiegały od SSDt. W populacji SM/TB1 odległości między grupami badanych linii okazały się nieistotne, co wskazuje na podobne kształtowanie się cech agronomicznych w liniach DH i SSD translokowanych i nietranslokowanych. Uzyskane wyniki sugerują, że translokacja 1B/1R może mieć wpływ na kształtowanie się badanych cech i poziom ich interakcji ze środowiskiem. Analiza serii eksperymentów dała możliwość wyboru linii, które są stabilne i odznaczają się korzystnymi wartościami cech z punktu widzenia hodowli roślin.

Literatura

- Caliński, T., Czajka, S., Kaczmarek, Z., Krajewski, P., Pilarczyk, W. (2005). SERGEN. Analysis of series of plant Genetic and breeding experiments. Computer program for IB-PC, IGR PAN Poznań.

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

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

Tomasz Góral ¹✉, Halina Wiśniewska², Paweł Czembor¹, Piotr Ochodzki¹, Magdalena Radecka-Janusik¹, Maciej Majka², Jarosław Przetakiewicz¹

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

²Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań,

✉ e-mail: t.goral@ihar.edu.pl, tel. 22 7334636

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.802.3.2019, Zadanie nr 6.

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

Cele projektu

- Ocena stopnia porażenia kłosów genotypów pszenicy ozimej przez *Fusarium* celem wyboru form odpornych pod względem odporności typu 1 (na infekcję pierwotną) oraz 2 (na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie) na fuzariozę kłosów
- Ocena odporności na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (typ odporności 3) oraz tolerancji genotypów pszenicy na fuzariozę kłosów (typ odporności 4) celem wyboru form odpornych
- 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*
- Ocena odporności na fuzariozę kłosów dla linii po selekcji molekularnej oraz rozmnożenie co najmniej pięciu wybranych rodzin F₃BC₂.

Odporność na fuzariozę kłosów genotypów pszenicy testowano w warunkach polowych w IHAR Radzików oraz w IGR PAN w Poznaniu. 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 lokalizacjach. W doświadczeniach tych wysiano nowe genotypy, których odporność nie była dotychczas badana. Metodyka doświadczenia była podobna jak 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 2018 analizowana była zawartość DNA *F. culmorum* i chemotypów 3ADON i NIV. Wykorzystano technikę real-time PCR zgodnie z metodyką opisaną przez Nicolaisen i in. (2009) i Nielsen i in. (2014). 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 (deoksyniwaleol [DON], 3-acetyl deoksyniwaleol [3AcDON], 15-acetyl deoksyniwaleol [15AcDON], niwaleol [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.

W kolejnym doświadczeniu wykorzystano nasiona zebrane z roślin pokolenia F₂BC₂ wybrane po selekcji wspomaganej markerami molekularnymi (MAS) przeprowadzonej w roku 2018. Rośliny te pochodziły z pięciu kombinacji krzyżówkowych. Do testów fitopatologicznych wybrano linie zawierające gen *Fhb1*, tzn. homozygotyczne w typie rodzica dawcy w loci markerów sprzężonych z genem oraz (w miarę możliwości) homozygotycznych w typie rodzica wypierającego w loci markerów flankujących. Dodatkowo wybrano linie kontrolnych (obiekty po krzyżowaniach wstecznych, ale bez genu *Fhb1*), w których nie wykryto genu odporności, wzorce odporne (w większości z genem *Fhb1*) i wzorce podatne oraz odmiany o różnej podatności. Badano odporność typu 1 i 2 na fuzariozę kłosów.

Po zakończeniu doświadczenia z każdej rodziny F₃BC₂ zebrano nasiona, które zostaną wykorzystane w kolejnym roku badań.

Średni indeks fuzariozy kłosów (IFK) dla badanych genotypów w Poznaniu wyniósł 3,5 %, natomiast w Radzikowie 20,0%. Średnie wartości IFK różniły się istotnie. Zmienność IFK była wyższa w Radzikowie i wynosiła 0 – 34,8% w Poznaniu oraz 1,0 – 56,0 % w Radzikowie. Zidentyfikowano

genotypy o niskiej podatności na porażenie kłosa. Indeksy fuzariozy kłosów w Radzikowie i Poznaniu korelowały istotnie ($r = 0,669$).

Średnia odporność typu 1 wyniosła 1,54 punktów infekcji (pi), zakres zmienności od 1,00 pi do 2,89 pi. Średnia odporność typu 2 wyniosła 2,1 porażonych kłosków (lpk), zakres zmienności od 0,4 lpk do 5,8 lpk. Zidentyfikowano genotypy o wysokiej odporności typu 1 lub typu 2. Odporności typu 1 dla 4 grup genotypów nie różniły się istotnie statystycznie. W przypadku odporności typu 2 była ona najwyższa u wzorców odpornych (z genem *Fhb1*), a najniższa dla wzorców podatnych i odmian. Brak było korelacji obu typów odporności. Odporność typu 1 nie korelowała z IFK. Z IFK korelowała natomiast odporność typu 2 ($r = 0,592$) oraz połączone odporności typu 1+2 ($r = 0,603$). Odporność typu 2 korelowała z IFK w warunkach polowych w Poznaniu i Radzikowie.

W doświadczeniach w 5 dodatkowych lokalizacjach uszeregowanie genotypów pod względem IFK podlegało silnym wpływom środowiska. W związku z tym wyliczone współczynniki korelacji były istotne, jednakże miały zróżnicowane wartości. Średni IFK uzyskany w Radzikowie i Poznaniu korelował istotnie ze średnim indeksem z 4 lokalizacji ($r = 0,616$). Analiza składowych głównych pozwoliła na zidentyfikowanie genotypów wykazujących odporność na porażenie kłosa we wszystkich środowiskach. Znalezione również genotypy podatne we wszystkich środowiskach.

Średnie uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium* (FDK) w obu doświadczeniach wyniosło FDK masa = 3,3% oraz FDK liczba = 5,3%. Zakres zmienności wynosił dla FDK masa od 0,2 do 12,2% oraz dla FDK liczba od 0,5 do 17,2%. Zidentyfikowano genotypy o niskim uszkodzeniu ziarniaków. Średni IFK korelował istotnie ze wartościami średnimi FDK m i FDK L ($r = 0,783$ oraz $r = 0,814$).

Redukcja plonu ziarna z kłosa na skutek porażenia kłosów przez *Fusarium* wyniosła średnio 14,6%. Zakres zmienności cechy 0 – 39,1%. Liczba ziarniaków w kłosie została zredukowana średnio o 18,9%. Zakres zmienności cechy 0 – 25,3%. Masa tysiąca ziarniaków została zredukowana średnio o 12,6%. Zakres zmienności cechy 0,9 – 26,3%. Zidentyfikowano genotypy o małej redukcji komponentów plonu ziarna. Średni IFK i FDK korelowały istotnie z redukcjami komponentów plonu. Zidentyfikowano genotypy łączące odporność na porażenie kłosa, uszkodzenie ziarniaków oraz niską redukcję plonu ziarna.

Koncentracja DNA *F. culmorum* w ziarnie pszenicy wyniosła średnio 8541 pg na 1 μg DNA

pszenicy. Zakres zmienności wynosił od 1402 pg/μg do 31064 pg/μg. Koncentracja DNA chemotypu 3ADON wyniosła średnio 3748 pg na 1 μg DNA pszenicy. Zakres zmienności wynosił od 123 pg/μg do 14075 pg/μg. Koncentracja DNA chemotypu NIV wyniosła średnio 2254 pg/μg. Zakres zmienności wynosił od 68 pg/μg do 10542 pg/μg. Nie stwierdzono istotnej korelacji pomiędzy koncentracją DNA *F. culmorum* lub chemotypów a zawartością trichotecenów B w ziarnie.

Średnia zawartość DON w ziarnie badanych genotypów wynosiła 1750 μg/kg). Zakres zmienności od 92 do 8863 μg/kg. Stwierdzono obecność w ziarnie pszenicy pochodnej acetylowej DON – 3AcDON. Zawartości tej toksyny były bardzo niskie i wyniosła średnio 76 μg/kg. Średnia zawartość NIV w ziarnie badanych genotypów była niższa niż zawartość DON i wynosiła 477 μg/kg. Zakres zmienności od 13 do 1657 μg/kg. Średnia sumaryczna zawartość trichotecenów z grupy B w ziarnie genotypów pszenicy wynosiła 2304 μg/kg. Zakres zmienności od 124 do 10940 μg/kg. Zawartość ZEN w ziarnie była bardzo niska i jedynie w 15 próbach (na 144 analizowane) przekroczyła limit detekcji. Średnia zawartość ergosterolu w ziarnie pszenicy wyniosła 5,25 mg/kg. Zakres zmienności mieścił się w granicach od 1,60 mg/kg do 18,36 mg/kg. Indeks fuzariozy kłosów i uszkodzenie ziarniaków korelowały istotnie z zawartością trichotecenów i ergosterolu. Stężenie DON korelowało istotnie z zawartością NIV. Analiza wieloczynnikowa pozwoliła na identyfikację genotypów o niskiej akumulacji ergosterolu i trichotecenów z grupy B.

Wyniki uzyskane w badaniu odporności typu 1 dla 49 linii pszenicy z genem *Fhb1* pochodzących ze wszystkich pięciu rodzin F₃BC₂ zawierały się w przedziale od 1 do 2,4 pi (punkty infekcji), natomiast dla typu 2 od 1 do 3,2 pk (porażone kłoski). Wyniki dla 15 linii kontrolnych mieściły się w przedziałach 1,2 – 2,0 pi i 1,4 – 3,6 pk odpowiednio dla typów 1 i 2. Średnie wartości odporności typu 1 i 2 dla linii z genem *Fhb1* wyniosły odpowiednio 1,6 pi i 1,7 pk. Dla linii kontrolnych wartości te wyniosły

1,6 pi i 2,7 pk. Linie z genem *Fhb1* i linie kontrolne nie różniły się od siebie istotnie pod względem odporności typu 1. Nie wykryto również istotnych różnic pomiędzy badanymi liniami a wzorcami odpornymi (w większości z genem *Fhb1*) i podatnymi. Różnice wykryto natomiast w odporności typu 2. Linie z genem *Fhb1* wykazywały istotnie wyższą odporność na rozprzestrzenianie się *Fusarium* w kłosie w porównaniu do linii kontrolnych, odmian i wzorców podatnych oraz istotnie mniejszą odporność w porównaniu do wzorców odpornych.


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.
- Nielsen, L.K., Jensen, J.D., Rodríguez, A., Jørgensen, L.N., Justesen, A.F. (2012). *TRI12* based quantitative real-time PCR assays reveal the distribution of trichothecene genotypes of *F. graminearum* and *F. culmorum* isolates in Danish small grain cereals. *Int. J. Food Microbiol.* 157: 384 — 392.
- Perkowski, J., Buśko, M., Stuper, K., Kostecki, M., Matysiak, A., Sz wajkowska-Michałek, L. (2008). Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia* 63(4): 542 — 547.
- Perkowski, J., Wiwart, M., Buśko, M., Laskowska, M., Berthiller, A., Kandler, S., Krska, R. (2007). *Fusarium* toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from northeastern Poland in 2003. *Food Additiv. Contam.* 24(11): 1292 — 1298.

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

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

Anna Nadolska-Orczyk , Karolina Szala

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie,
 e-mail: a.orczyk@ihar.edu.pl, tel. 22 7334619

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.802.19.2019, zadanie nr 5.

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

Celem tegorocznego tematu badawczego była kontynuacja oceny 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_2 ; poszerzenie puli genotypów - minimum 10).

Wykonano cztery dalsze krzyżowania niezbędne do oceny 10 mieszańców pokolenia F_1 oraz wytypowano kolejny zestaw 10 genotypów pszenicy na podstawie informacji uzyskanych z dotychczas przeprowadzonych badań. W wytypowanych genotypach oraz segregujących pojedynkach F_2 z otrzymanych wcześniej 6 mieszańców pokolenia F_1 oceniono poziom ekspresji względnej genów *TaCKX1*, *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A* w korzeniach siewek i genów *TaCKX1*, *TaCKX2.1/2.2* oraz *TaNAC2-5A* w dojrzewających kłosach (7 dni po pyleniu = 7 DAP). Dane te były korelowane z masą korzenia siewek, produktywnością i innymi ważnymi cechami. Poziom ekspresji badanych genów w korzeniach siewek dla 10 genotypów oraz 36 segregantów pokolenia F_2 pochodzących z 6 różnych krzyżowań przedstawiono w tab. 1. Stwierdzono istotne statystycznie korelacje pomiędzy ekspresją genu *TaNAC2-5A* a ekspresją genu *TaCKX6*. Poziom ekspresji genów *TaCKX1*, *TaCKX2.1/2.2* oraz *TaNAC2-5A* w kłosach 7 DAP dla wytypowanych genotypów oraz 36 segregantów pokolenia F_2 przedstawiono w tab. 2. Odnotowano istotną statystycznie, silną korelację pomiędzy

ekspresją *TaCKX1* a *TaCKX2.1*, a *TaCKX2.2* oraz *TaNAC2-5A*, a także między ekspresją *TaCKX2.1* a *TaCKX2.2* oraz *TaNAC2-5A*.

Wykonano pomiary morfometryczne najważniejszych cech fenotypowych jak masa korzenia siewek i produktywność. Wyniki masy korzenia pobranych z wybranych 10 genotypów oraz średnie dla 6 pojedynków F_2 pochodzących z 6 krzyżowań zamieszczono w tab. 1. Nie stwierdzono wyraźnej korelacji między masą korzenia i ekspresją genów *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A*. Dla genu *TaCKX1* wykazano istotną statystycznie korelację z masą korzenia.

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 genotypów oraz 36 segregantów pokolenia F_2 pochodzących z 6 różnych krzyżowań były korelowane z poziomem ekspresji badanych genów. Odnotowano kilka istotnych statystycznie korelacji pomiędzy ekspresją genów *TaCKX* dla kłosów 7 DAP w fitotronie. Dla genu *TaCKX1* stwierdzono istotną statystycznie, negatywną korelację ekspresji z liczbą nasion i masą nasion, a także istotną statystycznie, pozytywną korelację z masą korzenia. Dla genu *TaCKX2.2* odnotowano istotną statystycznie, pozytywną korelację między masą korzenia a ekspresją tego genu w kłosach 7 DAP. Stwierdzono istotną korelację pomiędzy ekspresją genu *TaNAC2-5A* a masą nasion. Natomiast dla ekspresji genu *TaCKX2.1* nie odnotowano istotnej korelacji z cechami fenotypowymi.

Istotna statystycznie, silna korelacja pomiędzy ekspresją genów *TaCKX1*, *TaCKX2.1* a *TaCKX2.2* oraz *TaNAC2-5A*, a także między ekspresją *TaCKX2.1* a *TaCKX2.2* oraz *TaNAC2-5A* w dojrzewających kłosach 7 DAP w fitotronie świadczy o silnej współregulacji tych genów.

Pozytywna korelacja pomiędzy ekspresją genu *TaCKX1* w kłosach 7 DAP oraz masą korzenia potwierdza możliwość użycia tej wartości jako miernika do oceny wzrostu korzeni siewek a tym samym prognozowania produktywności roślin.

Negatywna korelacja ekspresji genu *TaCKX1*

w korzeniu z masą korzenia potwierdza przydatność poziomu ekspresji tego genu jako znacznika masy korzenia a tym samym produktywności.

Istotne, dodatnie lub ujemne korelacje genów *TaCKX1*, *TaCKX2.2*, *TaNAC2-5A* z cechami plonotwórczymi świadczą o ich udziale w produktywności.

Krzyżowanie linii różniących się poziomem ekspresji (w kłosach 7 DAP i korzeniach siewek) oraz cechami plonotwórczymi dostarczy nam informacji na temat dziedziczenia ekspresji tych genów i współdziedziczenia z nimi cech plonotwórczych.

Tabela 1

Poziom ekspresji względnej genów *TaCKX1*, *TaCKX6* oraz *TaNAC2-5A* oraz masa korzenia w korzeniach siewek 10 genotypów oraz średnie wartości dla 6 pojedynków F_2 pochodzących z 6 krzyżówek (11-16).

L.p.	10 genotypów oraz średnie 6 x 6 F_2	Masa korzenia [g]	<i>TaCKX1</i>	<i>TaCKX6</i>	<i>TaNAC2-5A</i>
1	S3C	0,037	0,001	0,006	0,156
2	S5C	0,080	0,001	0,005	0,205
3	S6C	0,053	0,002	0,003	0,144
4	S12B	0,044	0,001	0,001	0,039
5	S8	0,075	0,001	0,002	0,047
6	P6	0,089	0,001	0,001	0,044
7	P9	0,101	0,000	0,002	0,127
8	Torridon	0,084	0,001	0,002	0,098
9	D16	0,098	0,001	0,002	0,058
10	D19	0,108	0,001	0,002	0,073
11	1K	0,046	0,001	0,002	0,076
12	2K	0,078	0,002	0,002	0,107
13	3K	0,063	0,001	0,001	0,120
14	4K	0,070	0,001	0,001	0,079
15	5K	0,075	0,001	0,002	0,091
16	6K	0,073	0,002	0,002	0,097
	średnia	0,073	0,001	0,002	0,098
	OS	0,021	0,001	0,001	0,045

Tabela 2


Poziom ekspresji genów *TaCKX1*, *TaCKX2.1*, *TaCKX2.2* oraz *TaNAC2-5A* w dojrzewających kłosach wytypowanych genotypów oraz średnie wartości dla 6 pojedynków F_2 pochodzących z 6 krzyżówek (11-16).

L.p.	10 genotypów oraz średnie 6 x 6 F_2	<i>TaCKX1</i>	<i>TaCKX2.1</i>	<i>TaCKX2.2</i>	<i>TaNAC2-5A</i>
1	S3C	0,070	0,011	0,001	0,061
2	S5C	0,089	0,024	0,001	0,043
3	S6C	0,073	0,020	0,001	0,031
4	S12B	0,026	0,014	0,001	0,025
5	S8	0,044	0,011	0,001	0,028
6	P6	0,055	0,017	0,001	0,038
7	P9	0,074	0,016	0,001	0,025
8	Torridon	0,038	0,012	0,002	0,062
9	D16	0,088	0,029	0,001	0,074
10	D19	0,053	0,015	0,001	0,034
11	1K	0,064	0,014	0,001	0,101
12	2K	0,049	0,012	0,001	0,050
13	3K	0,061	0,014	0,001	0,017
14	4K	0,059	0,017	0,001	0,049
15	5K	0,085	0,018	0,001	0,020
16	6K	0,069	0,016	0,002	0,055
	średnia	0,062	0,016	0,001	0,045
	OS	0,018	0,005	0,000	0,022

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

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

Marcin Rapacz , Barbara Jurczyk, Monika Sasal

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,
 e-mail: rrapacz@cyf-kr.edu.pl, tel. 12 4253301, w. 50

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.802.11.2019, Zadanie nr 11.

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 był poprzez wieloletnie i wielopunktowe doświadczenia polowe z pomocą metod umożliwiających modelowanie wpływu różnych parametrów pogodowych/klimatycznych na badane cechy. W roku 2019 realizowane były dwa tematy badawcze.

Temat badawczy 1: Ocena zimotrwałości oraz mrozoodporności 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 2018/19. Oceniana była: przeżywalność roślin w teście polowo-laboratoryjnym oraz mrozoodporność aparatu fotosyntetycznego (mrozoodporność na poziomie komórkowym) z pomocą pomiarów fluorescencji chlorofilu po mrożeniu odciętych liści. Badania mrozoodporności roślin testem polowo-laboratoryjnym oraz mrozoodporności liści testem fluorescencyjnym przeprowadzone zostały w dwóch seriach doświadczalnych. Polowa zimotrwałość

roślin w 7 punktach doświadczalnych dla pszenicy, a w 6 dla pszenżyta określana była zgodnie z danymi GUS dla obszaru na którym zlokalizowany był punkt doświadczalny.

Dla oceny mrozoodporności w serii 1 temperaturę obniżono od 0 °C do –15 °C z szybkością 2°C na godzinę. Po 2 godz. mrożenia w –15°C temperatura została podniesiona do +2°C z podobną szybkością.

W serii 2 przeprowadzony został test przedłużonego mrożenia (Waaen et al., 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.

Stwierdzono, że:

- 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 (–8°C przez 7 dni). Test przedłużony zdaje się być rozsądną alternatywą dla testu klasycznego ze względu na dużo niższe ryzyko całkowitego zniszczenia słabo zahartowanych roślin.
- W przypadku obydwu sposobów testowania mrozoodporności alternatywnie do oceny przeżywalności roślin można stosować pomiary fluorescencji chlorofilu wykonywane na odciętych liściach. Bez względu na długość/temperaturę mrożenia wyniki pomiarów fluorescencji chlorofilu są w podobnym stopniu zgodne z wynikami oceny przeżywalności roślin.

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 2018/19.

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 et al., 2013). W badaniach uwzględniono też opracowane w poprzednich latach realizacji projektu termiczne wskaźniki rozhartowywania roślin (Rapacz et al., 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 2018/19 była bardzo łagodna i nie spowodowała ona strat w uprawach pszenicy i pszenżyta. Przebieg pogody był podobny we wszystkich lokalizacjach. Intensywność zimy wahała się pomiędzy nimi bardzo nieznacznie, podobnie jak ilość dni z temperaturą $<5^{\circ}\text{C}$ i jedynie średnia ważona grubość okrywy śniegowej była wyraźnie wyższa w Dębinie niż w pozostałych lokalizacjach (Tabela 1). Najwyższą wartość indeksu mrozowego odnotowano w Laskach (142,3) a najniższą w Kobierzycach (50,4). Dla porównania zima 2017/18, podczas której obserwowano obniżone zimowanie pszenicy w dwóch lokalizacjach charakteryzowała się widelkami indeksu mrozowego pomiędzy lokalizacjami od 127,6 do 288,7.

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

W przypadku pszenicy badany model w bardzo wiarygodny sposób wiąże dane o przebiegu pogody ze stopniem przezimowania roślin. Dane empiryczne korelują z wartościami przewidywanymi na poziomie 0,867. Dla pszenżyta wartość tego współczynnika była niższa (0,406). Niższa predyktywność modelu dla pszenżyta wynika zapewne ze słabszego zróżnicowania zimotrwałości tego zboża w punktach doświadczalnych i kolejnych latach badań. W przypadku pszenicy największe znaczenie dla kształtowania zimotrwałości miały następujące parametry: termiczny wskaźnik wegetacji (parametr wyliczany dla okresu XII-III), liczba dni z temperaturą minimalną $<5^{\circ}\text{C}$ (temperatur hartujących) w październiku oraz temperatury minimalne w miesiącach X-XI (kiedy to rośliny nie były jeszcze w pełni zahartowane), parametry opisujące proces rozhartowywania roślin, liczba dni z okrywą śniegową w styczniu, intensywność zimy i temperatury minimalne w lutym. W przypadku pszenżyta największe znaczenie miały: ilość cykli zamrażania/rozmrężania w miesiącach III, I, XII, liczba dni z oblodzeniem roślin (II, III), temperatury minimalne i grubość okrywy śniegowej w lutym. Indeksy rozhartowywania miały mniejsze znaczenie dla kształtowania zimotrwałości, niż w przypadku pszenicy.

Literatura:

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

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. Przeżywalność roślin oszacowana na podstawie danych GUS.

Punkt doświadczalny	Średnia zimotrwałość	termiczny wskaźnik wegetacji	$DI_{T_{max}}$	$DI_{T_{mean}}$	Indeks mrozowy	Intensywność zimy	ilość dni <-5°C	temp. min.	Średnia ważona grubość okrywy śniegowej (cm)	Ilość cykli mrozowych	Ilość dni z lodem
Pszenica											
Dębina	9	81,3	-39,7	-75,6	121,2	2,76	16	-12,8	3,73	11	9
Kobierzyce	9	265,1	-18,2	-54,1	50,4	2,52	17	-9,7	0,34	9	0
Nagrodowice	9	218,3	-20,0	-51,6	57,3	2,05	12	-9,6	0,31	12	1
Polanowice	9	94,3	-10,3	-44,1	105,5	2,76	26	-11,8	1,35	12	1
Smolice	9	164,0	-37,6	-69,5	72,5	2,13	12	-7,9	0,55	13	0
Radzików	9	160,4	-15,4	-40,9	104,3	3,07	22	-11,8	0,88	10	0
Strzelce	9	176,4	-47,0	-73,8	95,1	2,44	18	-10,6	0,33	11	0
Pszenżyto											
Choryń	9	176,4	-27,1	-59,7	53,3	2,05	11	-9,5	0,11	12	1
Dębina	9	81,3	-39,7	-75,6	121,2	2,76	16	-12,8	3,73	11	9
Laski	9	89,7	-40,3	-59,9	142,3	3,09	24	-13,4	1,16	12	3
Radzików	9	160,4	-15,4	-40,9	104,3	3,07	22	-11,8	0,88	10	0
Strzelce	9	176,4	-47,0	-73,8	95,1	2,44	18	-10,6	0,33	11	0
Szelejewo	9	164,0	-37,6	-69,5	72,5	2,13	12	-7,9	0,55	13	0

Selekcja genomowa pszenicy ozimej

Genomic selection of winter wheat

Mirosław Tyrka ¹✉, Tadeusz Drzazga ², Paweł Krajewski ³, Przemysław Matysik ⁴, Róża Mazur ⁵, Teresa Sikora ⁶, Edward Witkowski ⁷, Grzegorz Fic ¹, Magdalena Szeliga ¹, Marcin Jaromin ¹, Justyna Buczkowicz ¹, Dorota Tyrka ¹

¹ Politechnika Rzeszowska, Zakład Biotechnologii i Bioinformatyki,

² Małopolska Hodowla Roślin,

³ Instytut Genetyki Roślin PAN, Poznań,

⁴ Hodowla Roślin Strzelce, Strzelce,

⁵ Poznańska Hodowla Roślin, Tulce,

⁶ DANKO Hodowla Roślin, Modzurów,

⁷ Hodowla Roślin Smolice, Smolice,

✉ 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 HOR.hn.802.6.2019 Zadanie nr 109.

Słowa kluczowe: mapowanie asocjacyjne, plon, *Triticum aestivum*

Rozwój technologii sekwencjonowania nowej generacji (NGS) kształtuje nowoczesne metody selekcji roślin wspomagane markerami DNA. Systemy wykrywania mutacji punktowych są wydajne i pozwalają na skanowanie różnic genetycznych pomiędzy genotypami. Obok zmienności genetycznej, w warunkach adaptacji do środowiska i pod wpływem presji selekcyjnej w hodowli roślin, może występować zmienność epigenetyczna, która odpowiada za dziedziczne zmiany związane z modyfikacją chemiczną nukleotydów. Znanych jest wiele metod badania zmienności epigenetycznej [Kurdyukov i Bullock 2016; Harrison i in. 2011] i wiele z nich wykorzystuje wrażliwość enzymów restrykcyjnych do fragmentacji DNA w zależności od statusu metylacyjnego. Celem przeprowadzonych badań była optymalizacja metody fragmentacji DNA pszenicy do NGS pod kątem uzyskania informacji o zmienności genetycznej i epigenetycznej, ocena zmienności fenotypowej w doświadczeniu porównawczym w wybranych lokalizacjach oraz analiza asocjacyjna i konwersja wybranych markerów.

Wyniki:

Przeprowadzono symulację rozkładu fragmentów DNA uzyskiwanych po trawieniu genomu pszenicy wielkości 14.54 Gpz uzyskanego z bazy Ensembl po zastosowaniu 43 enzymów restrykcyjnych z uwzględnieniem wielkości fragmentów,

ich unikalności i ich rozkładu w genomie podzielonym na partycje wielkości 300 kpz. W drugim etapie symulacji przewidziano ilości i rozkład fragmentów po dodatkowym trawieniu redukcyjnym enzymem restrykcyjnym wrażliwym na metylację. Na podstawie symulacji komputerowej wybrano 5 kombinacji enzymów. Biblioteki uzyskane po zastosowaniu wybranych kombinacji enzymów przetestowano na 12 odmianach pszenicy zwyczajnej. 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. Liczba fragmentów unikalnych dla zestawu enzymów restrykcyjnych wynosiła od 63.5% do 92.5%. W wyniku przeprowadzonych badań wdrożono metodę skanowania genomu pszenicy w oparciu o fragmenty uzyskiwane po trawieniu enzymem NarI z dodatkową redukcją złożoności enzymem MspI. Ze względu na rozpoznawane miejsca restrykcyjne (GG'CGCC i C'CGG) metoda ta jest szczególnie wrażliwa na zmienność metylacyjną.

W wyniku sekwencjonowania bibliotek uzyskanych dla enzymu NarI uzyskiwano od 22.1 do 25.4 mln odczytów sekwencji DNA, które

po oczyszczeniu dawały od 20.9 do 24.4 mln sekwencji. Uzyskiwane dane z sekwencjonowania po wstępnym oczyszczeniu rozdzielono na poszczególne próbki, w wyniku kontroli jakości (QC) uzyskanych sekwencji usunięto fragmenty o błędach przekraczających 1 nukleotyd na 100. Korekta jakościowa dotyczyła głównie sekwencji o długości powyżej 100 nukleotydów. Oczyszczone dane posłużyły do wydzielenia puli 906352 fragmentów unikalnych nielosowych (występujące przynajmniej dwukrotnie). Uzyskano segregację 3258 markerów NarI-MspI w panelu 200 genotypów pszenicy w tym 1130 miało liczbę danych brakujących poniżej 20%.

Do analiz asocjacyjnych wykorzystano segregację 12979 markerów DArTseq. Analizę DArTseq wykonano w ramach zlecenia w firmie Diversity Arrays Technology (Bruce, Australia). Uzyskane dane genotypowe po połączeniu z danymi fenotypowymi uzyskanymi w 2019 roku, wykorzystano do analizy asocjacji w programie Tassel 5.2.58. Do identyfikacji istotnych związków z wysokością plonu wykorzystano metody ogólnego modelu liniowego (GLM) i mieszanego modelu liniowego (MLM). Wybrano markery o istotnym związku z plonem liczonym jako procentowe odchylenie od wzorców. Liczba markerów zasocjowanych ze zmianami plonu przy $p < 0.01$ wyniosła 707, natomiast przy $p < 0.001$ wybrano 336 markerów. Poziom istotności markerów ustalono na podstawie poprawki Bonferroni ($0.1/12979 = -\log_{10}(P) = 5.11$). Przy tym poziomie istotności wybrano jedynie 31 markerów (Tab. 1).

Jako punkt wyjścia do selekcji markerów do konwersji przyjęto $p < 0.01$. Do porównania segregacji markerów wykorzystano program PAST. Wybrano 62 markery reprezentujące 39 grup markerów o zbliżonej segregacji i lokalizacji. Markery te wykazywały istotne związki z plonem w równocześnie w 2–7 środowiskach (średnia 3.3). Dla wybranych markerów oznaczono mutację punktową a następnie korzystając z bazy URGI zlokalizowano markery na mapie fizycznej i rozszerzono oryginalną sekwencję (maksymalnie 69 nukleotydów) o dodatkowe odcinki przed i za mutacją (dodatkowe 100 nukleotydów z każdej

strony). Tak przygotowane sekwencje wykorzystano do projektowania starterów allelospecyficznych dostosowanych do technologii KASP z wykorzystaniem programu PRIMER3 oraz PolyMarker. Wysokie podobieństwo genomów pszenicy stanowi duże utrudnienie w projektowaniu specyficznych markerów wykrywających mutacje punktowe i jedynie 6 SNP było położonych w rejonach, które dawały szansę skuteczniejszej konwersji na markery KASP (Kompetitive allele-specific PCR). Do innych przyczyn utrudniających konwersję markerów na system PCR należały wysoka zawartość GC w rejonach mutacji oraz występowanie sekwencji powtarzalnych i determinujących powstawanie struktur szpilki do włosów. Pomimo tych utrudnień, wstępne testy na 8 genotypach (DL1, DL2, KBP_15–10, DL_322–13–7, KBP_15–11 i AND_4017–14) wskazywały na zgodność segregacji 5 markerów KASP z markerami DArT (1107139, 3938110, 978347, 1101436, 4993084).

W ramach przeprowadzonych badań 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. Uzyskano dane o plonowaniu 200 linii pszenicy ozimej z trzylecia przydatne do optymalizacji systemu selekcji genomowej pszenicy ozimej. Rozkład cechy nie odbiegał od normalnego a odziedziczalność plonu w kolejnych seriach 1–4 wyniosła od 63.97% do 82.00%.

Na podstawie przeprowadzonych analiz asocjacyjnych wybrano markery DArTseq związane z wysokością plonowania. Uzyskane dane stanowią punkt wyjścia dla opracowania systemu selekcji genomowej pod kątem zwiększenia plonu u pszenicy zwyczajnej.

Literatura

- Kurdyukov, S., Bullock, M. (2016). DNA Methylation Analysis: Choosing the Right Method. *Biology* 5:3.
- Harrison, A., Parle-McDermott, A. (2011). DNA methylation: A timeline of methods and applications. *Front Genet* 2:1 — 13.

Tabela 1

Markery zasocjowane z plonem, wybrane metodą GLM na podstawie poziomu istotności LOD >5.11

Marker	Chromosom	Pozycja fizyczna	p-val	MarkerR2
988391	1D	359778599	8.29E-08	0.14151
3938110	2B	22018131	4.54E-06	0.11026
1101436	3B	498344378	7.36E-06	0.11795
1026962	5A	52596646	1.06E-06	0.12095
1107174	5B	586524432	2.46E-08	0.16725
1132319	5D	465364017	7.94E-07	0.13699
1108448	6A	14493318	1.79E-06	0.12568
1079853	6A	416649897	2.96E-06	0.09779
1120705	6B	474748647	1.35E-06	0.13143
1054930	6B	477699330	1.67E-06	0.11722
4911204	6B	489437050	1.12E-07	0.13915
1236326	6B	499577833	4.00E-08	0.14729
1019982	6B	501107267	4.94E-08	0.14835
5324496	6B	502319848	7.67E-09	0.16022
1107139	6B	504157152	4.52E-08	0.16029
2275960	6B	506126687	6.40E-08	0.14571
1087873	6B	506385690	8.88E-07	0.13044
1138009	6B	506726304	1.69E-06	0.12352
5324392	6B	507468647	3.53E-07	0.13097
1203839	6B	510724808	2.13E-07	0.13484
1100306	6D	300897486	2.66E-06	0.0985
1107840	6D	472359486	1.57E-06	0.11917
1030418	7B	68203172	5.08E-06	0.10804
4404192	7B	702227567	7.12E-06	0.1198
9722438	7D	457830442	7.42E-06	0.11502
1229099	7D	610923745	5.67E-06	0.1196
3956469	UN	295887961	1.28E-06	0.13704
5324724	UN2	2110	1.99E-06	0.1205
4396025	UN2	4930	4.84E-06	0.10844
5324139	UN2	5920	8.95E-08	0.1409
7491836	UN2	11150	6.12E-07	0.12608

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

Aleksandra Pietrusińska ✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie,
Krajowe Centrum Roślinnych Zasobów Genowych, 05-870 Błonie,
✉ e-mail: a.pietrusinska@ihar.edu.pl, tel. 22 7334507

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.802.3.2019, Zadanie nr 9.

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

Temat badawczy 1: Piramidowanie efektywnych genów odporności

Celem tematu badawczego 1 w 2019 roku była selekcja materiału roślinnego pod kątem uzyskanych we wcześniejszych latach kombinacji efektywnych genów w różnych segmentach odpornościowych. Cel ten składał się z następujących etapów:

- wykonanie krzyżowań wstecznych (wypierających) z 4 odmianami pszenic ozimych: (tab. 1.),
- przeprowadzenie selekcji fenotypowej materiału roślinnego pod kątem odporności / podatności na *P. recondita* oraz *B. graminis*,
- przeprowadzenie selekcji molekularnej przy wykorzystaniu specyficznych markerów molekularnych pod kątem identyfikacji piramid genowych,
- wytypowanie genotypów o spiramidyzowanym tle odpornościowym,
- wyznaczenie polimorficznego(ych) markera(ów) molekularnego(ych) do selekcji materiału roślinnego pod kątem obecności genu *Lr55*.

Selekcja fenotypowa i molekularna populacji mieszańcowych BIO

W 2019 roku sprawozdawczym łącznie przebadano cztery populacje mieszańcowe BIO (BIO1, BIO2, BIO3, BIO4).

Wykonano łącznie 15 kombinacji krzyżówek wstecznych (tab.1.), w których rodzicami wypierającymi były odmiany pszenic ozimych odpowiednio: Hondia, Formacja, RGT Bilanz oraz Euforia. Łącznie otrzymano 600 ziarniaków. Następnie w stadium drugiego liścia przeprowadzono inokulację roślin wykorzystując dwa różniące 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 (tab. 2.) przeprowadzono selekcję molekularną pod kątem identyfikacji określonych genów odporności. Do dalszych badań, wytypowano łącznie 135 linii o określonych piramidach genowych. Szczegółowe wyniki przedstawione są poniżej w tabelach od 1 do 4.

Analiza materiału roślinnego F_2 populacji mapujących: (Lr55×Bogatka), (Lr55×Nadobna)

Na podstawie analiz genetycznych przeprowadzonych dla dwóch populacji mapujących uzyskano niejednoznaczne wyniki. Dlatego też, zestawiono wyniki łącznie. W oparciu o jedną mapę genetyczną dla dwóch populacji [(Bogatka×Lr55)+(Nadobna× Lr55)] wyznaczono markery flankujące gen *Lr55* (dane w trakcie publikowania).

Wnioski do zadania badawczego 1

- Na drodze krzyżowań zbieżnych 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.
- Piramidowanie genów odporności w jednym genotypie umożliwia uzyskanie odmian o trwałej w czasie odporności na ważne gospodarczo patogeny grzybowe zbóż.
- W oparciu o wspólną mapę genetyczną [(Bogatka×*Lr55*)+(Nadobna×*Lr55*)] wyznaczono markery flankujące gen *Lr55*.
- Dodatkowe markerowanie w oparciu o technologię sekwencjonowania następnej generacji - DArTseq wyselekcjonowałyby prawdopodobnie dodatkowe markery do selekcji genu *Lr55*.

Temat badawczy 2: Poszukiwanie nowych źródeł odporności

W bieżącym roku sprawozdawczym, celem podjętego tematu było poszukiwanie nowych, potencjalnie efektywnych źródeł odporności na choroby grzybowe: mączniaka prawdziwego zbóż i traw oraz rdzę brunatną zbóż i traw.

Na podstawie przeprowadzonych testów fenotypowych określono reakcją badanego materiału roślinnego na zestaw izolatów *P. recondita* oraz *B. graminis*.

Doświadczenia fitopatologiczne obejmujące ocenę źródeł odporności pod kątem reakcji na populację *P. recondita* potwierdziły, że za efektywne źródła odporności nadal można uznać linie z genami: *Lr41*(=*Lr39*) oraz *Lr55*. Natomiast linia z genem odporności na rdzę brunatną *Lr47* daje odporność częściową na *P. recondita* aktualnie występującą w Polsce. Ponadto linia KS11WGR-C54-O(Overley), linia KS11WGR-C54-J(Jagger) oraz 2 obiekty pochodzące z KCRZG IHAR-PIB: *Triticum timophevii* (nr intro. 20767) oraz *Triticum timophevii* (nr intro. 5013) wykazywały niski lub bardzo niski poziom wirulencji. Pozostałe analizowane obiekty porażane były przez zastosowane izolaty Pt, o typie reakcji ocenianej w skali 3-4 jako podatne. Wyodrębniono 4 klasy genotypów: odporne, częściowo odporne, podatne oraz skrajnie podatne.

Doświadczenia fitopatologiczne obejmujące ocenę źródeł odporności pod kątem reakcji na populację *B. graminis* potwierdziły, że za efektywne źródła odporności nadal można uznać linie z genami: *Pm34*, *Pm37* oraz *Pm21*. Ponadto nowe źródła linia KS04WGRC48 została zaklasyfikowana do genotypów o częściowej odporności, podobnie jak obiekty: *Triticum timophevii* (nr intro. 20767 oraz 5013), a także odmiana Kolibri z genem *Pm3d* i Sappo o profilu genów *Pm1+2+4b+9*. Wyodrębniono 4 klasy genotypów: odporne, częściowo odporne, podatne oraz skrajnie podatne.

Wnioski do zadania badawczego 2

- Za efektywne źródła odporności na rdzę brunatną można uznać linie z genami: *Lr41* oraz *Lr55*, a także o odporności częściowej gen *Lr47*.
- Linia KS11WGR-C54-O(Overley) oraz KS11WGR-C54-J(Jagger), a także *Triticum timophevii* (89) i (91) charakteryzowały się wysoką odpornością na rdzę brunatną zbóż i traw.
- Za efektywne źródła na mączniaka prawdziwego można uznać linie z genami: *Pm21*, *Pm37* oraz *Pm34*.
- Linia KS04WGRC48 została scharakteryzowana jako genotyp o częściowej odporności na mączniaka prawdziwego zbóż i traw, podobnie jak obiekty: *Triticum timophevii* o nr intro. 20767 oraz 5013.
- Ważnym źródłem cennych cech abiotycznych i biotycznych stanowią zasoby genowe, czyli dawne i lokalne odmiany oraz dzikie gatunki pokrewne zbóż.

Temat badawczy 3: Ocena linii w różnych warunkach środowiskowych

Celem tematu badawczego 3 w 2019 roku była ocena materiału roślinnego przeprowadzona w trzech lokalizacjach (HR Strzelce, HR Smolice IHAR-PIB Radzików), pod kątem odporności / podatności na choroby grzybowe, a także pod kątem korzystnych cech gospodarczych. W ocenie materiału roślinnego uwzględniono łącznie 7 cech w tym: (1) przezimowanie, (2) kłoszenie, (3) wysokość, odporność na choroby: (4) rdza brunatna oraz (5) żółta, (6) mączniak prawdziwy, (7) septoriozy.

Jesienią 2018 roku, w trzech lokalizacjach: Radzików (IHAR-PIB), Strzelce (HR Strzelce) oraz Smolice (HR Smolice), założono selekcyjne doświadczenia jednopowtórzeniowe. Dla wszystkich punktów doświadczalnych materiał roślinny łącznie stanowiło 2340 linii pszenic ozimych

(po 260 linii po 3 torebki na jedną stację badawczą, razem 780 obiektów).

Przebieg doświadczenia w IHAR-PIB Radzików

Na polstkach doświadczalnych w Radzikowie wysiano łącznie 780 linii. W odniesieniu do każdego obiektu przeprowadzono ocenę przezimowania. Materiał roślinny powschodził oraz przezimował w 100%. W okresie wegetacji roślin przeprowadzono obserwacje polowe w cotygodniowych odstępach czasu w odniesieniu do odmian wzorcowych: Artist, Kilimandjaro, Ozon oraz Patras. Kłoszenie materiału roślinnego w Radzikowie (fazy BBCH 51-59), określono jako typ wczesny lub/ oraz średniowczesny. Polowa ocena materiału roślinnego w Radzikowie pod kątem porażania chorobami dokonano w odniesieniu do 9-cio stopniowej skali, gdzie: 1- oznacza całkowite porażenie, do 9- brak objawów porażenia. Podobnie jak w latach ubiegłych, gorąca i sucha pogoda w okresie wegetacji roślin, przyczyniły się do trudności w ocenie materiału roślinnego pod kątem porażenia przez *Blumeria graminis* (mączniak prawdziwy zbóż i traw). Porażenie materiału roślinnego przez *B. graminis* w Radzikowie miał miejsce w minimalnym stopniu na siewkach w okresie jesienno-zimowym. Natomiast w okresie letnim mączniak prawdziwy zbóż i traw wystąpił w niewielkim nasileniu, a sucha i gorąca pogoda uniemożliwiły mu dalszy rozwój choroby.

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 7 do 9. Reszta materiału roślinnego została wyeliminowana z dalszych etapów badań. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji polowych wyselekcjonowano do dalszych badań 235 linii. Materiał ten został zebrany i przekazany jesienią br. do HR Smolice oraz HR Strzelce w celu założenia doświadczeń selekcyjnych w ramach usługi badawczej w sezonie 2019/20.

Przebieg doświadczenia w HR Strzelce
Jesienią 2018 roku do Hodowli Roślin Strzelce

Sp. z o.o. Grupa IHAR wysiano 268 linii hodowlanych pszenicy ozimej. Wschody były zadawalające i rośliny optymalnie weszły w fazę spoczynku zimowego. Zima była dość łagodna dlatego też nie odnotowano różnic w przezimowaniu.

Pierwsze obserwacje wykonano w maju, dotyczyły pojawienia się objawów mączniaka prawdziwego. Posłużono się skalą 9-stopniową, gdzie 1 oznaczało bardzo silne porażenie, 9- brak objawów. Następnie wykonano obserwacje dotyczące daty kłoszenia. W czerwcu oceniono po raz drugi mączniaka prawdziwego, rdzę brunatną oraz rdzę żółtą. Oceny wskazują na dużą odporność opisywanych materiałów jednak trzeba zaznaczyć, że presja chorób w okresie wegetacyjnym 2018/19 w omawianym rejonie była bardzo niewielka. Dlatego też zdecydowano o powtórnym wysiewie całej szkółki w kolejnym sezonie.

Przebieg doświadczenia w HR Smolice

Na polstkach obserwacyjnych wysiano 780 linii pszenicy ozimej. W okresie wegetacji roślin dokonano obserwacji: kłoszenia, porażenia chorobami, wysokości i wylegania. Wszystkie badane materiały powschodziły i przezimowały bardzo dobrze. Mączniak prawdziwy zbóż i traw odnotowano w nielicznych przypadkach. Rdza żółta oraz brunatna nie wystąpiły. Wiele obiektów mocno poraziło się brunatną plamistością liści. Większość ocenianych obiektów wyległa w silnym stopniu.

Z 28 linii włączonych do oceny jesienią 2018 roku do doświadczeń zakładowych tylko jedną przeznaczono do dalszej hodowli, pozostałe plonowały na bardzo niskim poziomie (45-88% wzorca), bardzo poraziły się także rdzą brunatną oraz wyległy. Z materiałów badanych w sezonie 2018/2019 do dalszych ocen włączono 10 linii. Jesienią br. wysiano 705 nowych linii.

Wnioski do zadania badawczego 3

- Warunki atmosferyczne panujące w 3 lokalizacjach w sezonie 2018/2019 były niesprzyjające dla rozwoju mączniaka prawdziwego zbóż i traw.
- Zmieniający się klimat może przyczynić się do ograniczenia występowania chorób grzbowych zbóż, a tym samym migracji w kierunku klimatu bardziej wilgotnego (kierunek północ).
- Na podstawie przeprowadzonych obserwacji wytypowano genotypy do dalszych badań.

Tabela 1

Populacja mieszańcowa BIO_1

Lp.	Rodzic wypierający	Liczba roślin o profilu (Lr41+Pm21+Lr47) wyselekcjonowanych do dalszych badań realizowanych w 2020 roku
1.	Hondia (1)	5
2.	Formacja (2)	6
3.	RGT Bilanz (3)	4
4.	Euforia (4)	5
	RAZEM	20

Tabela 2

Populacja mieszańcowa BIO_2

Lp.	Rodzic wypierający	Liczba roślin wyselekcjonowanych do dalszych badań realizowanych w 2020 roku
1.	Hondia (5)	30 (<i>Lr41+Pm21</i>)
2.	Formacja (6)	10 (<i>Pm21+Lr47+Pm34</i>)
3.	RGT Bilanz (7)	9 (<i>Pm21+Lr47+Lr41</i>)
4.	Euforia (8)	5 (<i>Pm21+Lr47+Lr41+Pm34</i>)
	RAZEM	54

Tabela 3

Populacja mieszańcowa BIO_3

Lp.	Rodzic wypierający	Liczba roślin wyselekcjonowanych do dalszych badań realizowanych w 2020 roku
1.	Hondia (9)	28 (<i>Pm21+Lr47</i>)
2.	Formacja (10)	8 (<i>Pm21+Lr47+Pm37</i>)
3.	Euforia (11)	4 (<i>Pm21+Lr47+Lr41+Pm37</i>)
	RAZEM	40

Tabela 4

Populacja mieszańcowa BIO_4

Lp.	Rodzic wypierający	Liczba roślin wyselekcjonowanych do dalszych badań realizowanych w 2020 roku
1.	Hondia (12)	7 (<i>Lr47+Lr41+Pm34</i>)
2.	Formacja (13)	6 (<i>Lr41+Pm34+Pm37</i>)
3.	RGT Bilanz (14)	5 (<i>Lr47+Lr41+Pm37</i>)
4.	Euforia (15)	3 (<i>Lr47+Lr41+Pm34+Pm37</i>)
	RAZEM	21

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 yallundae* and *Oculimacula aciformis*

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

¹ Instytut Genetyki Roślin, Polskiej Akademii Nauk, Poznań,

² Instytut Ochrony Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Poznań,

✉ e-mail: hwis@igr.poznan.pl, tel. 662044293

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.802.2.2019, Zadanie nr 2.

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

Łamliwość źdźbła to ważna choroba pszenicy uprawnej (*Triticum aestivum* L.) oraz innych zbóż. Powodowana jest przez dwa grzyby patogeniczne *Oculimacula yallundae* i *O. aciformis*. Występuje często w rejonach, gdzie są łagodne zimy i chłodne wiosny. W trakcie wegetacji patogen rozwija się na podstawach źdźbeł, gdzie tworzy się watowata grzybnia i wówczas podstawa źdźbła próchnieje, powodując łamliwość źdźbła. Może to skutkować ubytkiem plonu nawet do 50%. Do tej pory zidentyfikowano dwa geny warunkujące odporność - *Pch1* i *Pch2*. Gen *Pch1* - najbardziej efektywny, został zidentyfikowany w *Aegilops ventricosa* i translokowany do długiego ramienia chromosomu 7D heksaploidalnej pszenicy i znacząco redukuje skale porażenia (Maia i in. 1967). Drugi gen *Pch2* w mniejszym stopniu warunkuje odporność na łamliwość źdźbła. Jego efektywność zapobiegania infekcji przez grzyby patogeniczne z rodzaju *Oculimacula* jest mniejsza od genu *Pch1* i dlatego gen *Pch2* może być traktowany jako dodatkowe źródło odporności na łamliwość źdźbła (Burt i in. 2014).

Cele badań w roku 2019:

- Piramidyzacja genów odporności (*Pch1* i *Pch2*) na łamliwość źdźbła u pszenicy.
- Identyfikowanie obecności genu *Pch1* przy użyciu markera izoenzymatycznego w postaci endopeptydazy *EpD1b* oraz genów *Pch1* i *Pch2* przy użyciu markerów SSR.

- Ocena porażenia siewek pszenicy (test siewkowy w fitotronie) i dojrzałych źdźbeł (test polowy) z użyciem zawiesiny grzybni i zarodników *O. yallundae* i *O. aciformis* oraz ocena
- naturalnego porażenia w kilku lokalizacjach w Polsce.
- Analiza elementów struktury plonu badanych form - określenie wpływu genów *Pch1* i *Pch2*
- na cechy agronomiczne.

Do krzyżowań wykorzystano komponenty krzyżówkowe wykazujące podwyższoną odporność na łamliwość źdźbła, posiadające zidentyfikowane przy pomocy markerów molekularnych i markera izoenzymatycznego dwa geny: *Pch1* i *Pch2*; genotypy, u których zidentyfikowano molekularnie gen *Pch1* lub *Pch2* oraz genotypy pszenicy bez genów *Pch1* i *Pch2*, lecz wykazujące dobre cechy agronomiczne. Geny *Pch1* i *Pch2* identyfikowano molekularnie w mieszańcach wewnątrzgatunkowych uzyskanych w 2018 roku, gdzie do piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2* warunkujących podwyższoną odporność na łamliwość źdźbła u pszenicy wykorzystano źródła posiadające te geny - **temat badawczy nr 1**.

Materiał do identyfikacji molekularnej genów *Pch1* i *Pch2* oraz do oceny podatności na łamliwość źdźbła w testach inokulacyjnych siewkowych stanowiło 165 genotypów pszenicy ozimej

o zróżnicowanym podłożu genetycznym, trzy odmiany kontrolne i odm. Rendezvous - wzorzec odporności. Doświadczenia inokulacyjne polowe wykonano na 113 genotypach pszenicy ozimej oraz odmianie Rendezvous – **temat badawczy nr 2 i 3.**

Wyniki

Temat badawczy 1: Krzyżowania wybranych na podstawie wcześniejszych badań genotypów pszenicy w celu piramidyzacji genów *Pch1* i *Pch2* i analiza molekularna obecności genów *Pch1* i/ lub *Pch2* w mieszańcach wewnątrzgatunkowych uzyskanych w 2018 roku

Wykonano krzyżowania wewnątrzgatunkowe (3 kombinacje) form pszenicy o stwierdzonej podwyższonej odporności na patogeny z rodzaju *Oculimacula*, form ze zidentyfikowanymi przy pomocy markerów molekularnych genami *Pch1* i *Pch2* oraz form bez genów *Pch1* i *Pch2*. Z wykorzystaniem markerów molekularnych dla genu *Pch1* i *Pch2* zidentyfikowano 123 formy pszenicy ozimej ze spiramidyzowanymi genami *Pch1* i *Pch2*.

Temat badawczy 2: Analiza sprzężeń wybranych markerów SSR z locus genów *Pch1* i *Pch2*, a także badania izoenzymatyczne w celu określenia obecności endopeptydazy *EpD1b* sprzężonej z genem *Pch1*

W badaniach wykorzystano cztery markery molekularne. Jeden marker izoenzymatyczny i dwa SSR dla genu *Pch1*: *XustSSR2001-7DL*, *Xorw* oraz dwa markery SSR dla genu *Pch2*: *Xwmc525*, *Xcfa2040*. Geny *Pch1* i *Pch2*, takie same jak u wzorcowej, odpornej odmiany Rendezvous stwierdzono u 6 genotypów pszenicy ozimej. W 19 genotypach z użyciem markera izoenzymatycznego i markera molekularnego *Xorw1* zidentyfikowano gen *Pch1* oraz z wykorzystaniem markerów *Xwmc525* i *Xcfa2040* gen *Pch2*, U 7 linii pszenicy zidentyfikowano tylko gen *Pch1*, nie stwierdzono genu *Pch2*. U dwóch linii pszenicy zidentyfikowano tylko gen *Pch1* z użyciem markera izoenzymatycznego oraz markera *Xorw1*. Nie zidentyfikowano u tych genotypów markera *XustSSR2001-7DL*, gdzie najprawdopodobniej, doszło do przełamania sprzężenia między locus *Pch1*, a locus markera *XustSSR-2001-7DL*. Natomiast u 99 linii pszenicy ozimej na podstawie obecności markerów molekularnych *Xwmc525* i *Xcfa2040* stwierdzono tylko gen *Pch2*

Temat badawczy 3: Ocena podatności pszenicy na łamliwość źdźbła w testach inokulacyjnych siewkowych (doświadczenia fitotronowe) i polowych (doświadczenie polowe, inokulacyjne w Kopaszewie). Analiza korelacji między parametrami struktury plonu badanych genotypów pszenicy, a ich

odpornością na łamliwość podstawy źdźbła. Wybór genotypów cechujących się występowaniem genów *Pch1* i *Pch2*

Obserwowano brak naturalnego porażenia grzybami z rodzaju *Oculimacula* w czterech z pięciu wybranych lokalizacji Polski. W dużej mierze wynikało to z warunków pogodowych panujących przez cały sezon wegetacyjny, które uniemożliwiły rozwój grzybów z rodzaju *Oculimacula*. Najmniejsze porażenie siewek stwierdzono u genotypów wykazujących obecność genu *Pch1* oraz *Pch1* i *Pch2*, a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*. Na podstawie wyników uzyskanych w ramach inokulacyjnego testu polowego stwierdzono, że genotypy pszenicy ozimej posiadające gen *Pch1* oraz *Pch1* i *Pch2* cechują się dużo niższą wartością wskaźnika porażenia źdźbła oraz procentowego udziału źdźbeł porażonych względem genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2*. Wykazano, że obecność genów *Pch1* i *Pch2* lub ich brak nie wpływała istotnie na plon ziarna (z poletka) oraz masę tysiąca ziarniaków.

Wnioski

- Przy pomocy markerów molekularnych wytypowano 123 formy pszenicy ozimej ze spiramidyzowanymi genami *Pch1* i *Pch2*, podwyższającymi odporność na patogeny z rodzaju *Oculimacula* - **temat badawczy 1.**
- U odmiany odpornej Rendezvous, a także u sześciu genotypów pszenicy stwierdzono przy pomocy markera izoenzymatycznego i markerów molekularnych obecność genu *Pch1* i obecność genu *Pch2* - **temat badawczy nr 2.**
- W 19 genotypach pszenicy ozimej z użyciem markera izoenzymatycznego i markera molekularnego *Xorw1* zidentyfikowano gen *Pch1*. Nie zidentyfikowano markera *XustSSR2001-7DL*, gdzie najprawdopodobniej, doszło do przełamania sprzężenia między locus *Pch1*, a locus markera *XustSSR2001-7DL* - **temat badawczy nr 2.**
- U 99 genotypów pszenicy stwierdzono tylko gen *Pch2* - **temat badawczy nr 2.**
- Najmniejsze porażenie siewek stwierdzono u genotypów posiadających gen *Pch1* oraz oba geny (*Pch1* i *Pch2*), a najwyższe dla genotypów, u których nie stwierdzono genów *Pch1* i *Pch2* - **temat badawczy nr 3.**
- 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 interspécifiques blés x *Aegilops*. *Comptes Rendus de l'Académie d'Agriculture de France* 53:149 — 155.

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

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

Yuliya Kloc, Marta Dmochowska-Boguta, Waclaw Orczyk ✉

Zakład Inżynierii Genetycznej, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB Radzików,
✉ 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.

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

Celem badań w roku 2019 jest rozszerzenie dotychczas wykonywanych eksperymentów na znaczną część całej zebranej kolekcji genotypów pszenic. W tym: 1. Sprawdzenie polimorfizmu wybranych markerów w minimum 30 genotypach pszenic pochodzących z różnych regionów klimatyczno-glebowych. 2. Poznanie sekwencji nukleotydowej wybranego regionu markerowego w minimum 20 genotypach pszenic.

Region Reg23-404 zawiera motyw (AG) 35 razy powtórzony. Profile rozdziałów w żelach, wykazały polimorfizm długości badanego regionu. W odmianach: #20277, Europa 90, Sava i Vireo S uzyskano produkty amplifikacji o długości - 649 pz. Długość amplikonów w odmianach: #21134, Triple Dirk S, CSDH 28, Pinka, Upi-301, #21186 i CS wynosiła – 690 pz. W odmianach Pobena, Mv-Koma, Bajka, Peking, Albena, SQ1, CSDH 143, CSDH 115, Ching -Chang, Bačka, Fundulea 490, Dobrudzia, Banija, Chi 4, Mironowska, Ne-66, Ns-55-25 i #20342 długości produktów amplifikacji wynosiły – 700 pz. W odmianach Kite, #22583 i Rusalka nie uzyskano żadnego produktu amplifikacji. Region Reg35-404 zawiera sekwencję SSR z motywem (AG) powtórzonym 18-19 razy. Podobnie jak w regionie Reg23-404, do regionu Reg35-404 zaprojektowano dwa zestawy starterów. W wyniku pierwszej reakcji amplifikacji na genomowym DNA 30 odmian pszenic uzyskano produkty o długości 815 pz, po czym wykonano PCR

zagnieżdżony przy użyciu drugiej pary starterów, amplifikujących fragmenty o długości 200 pz. Uzyskane wyniki wykazują na polimorfizm długości badanego regionu Reg35-404. Długość amplikonów w odmianach: Peking, #20342, Chi 4, Dobrudzia, #20277, Mironowska, Europa, SQ1, CS, Ns-55-25, CSDH 28 wynosiła – 200 pz. W odmianach: Kite, Banija, #21186 produkty amplifikacji wynosiły – 202 pz. W odmianach: Sava, Ching-Chang, Vireo S, Upi-301i Pinka długość amplikonów wynosiła – 204 pz. Odmiany: Fundulea 490, Albena, Pobena, Ne-66, #22583, CSDH 115, Bačka, Rusalka i Bajka charakteryzowały się nieco krótszymi długościami amplifikowanych produktów – 198pz. Długości produktów amplifikacji w odmianach: Triple Dirk S, #21134, CSDH 143, Mv-Koma wynosiły – 196pz. Sekwencje nukleotydowe Reg35-404 badano w 20 genotypach charakteryzujących się 1) polimorfizmem długości regionu SSR (na podstawie wyników rozdziału w żelach agarozowych) oraz 2) skrajnymi wartościami żywotności pyłku/stopnia wypełnienia kłosów (na podstawie wyników uzyskanych we wcześniejszych latach).

Podsumowanie i wnioski

- Badane genotypy pszenic zawierają polimorficzne sekwencje mikrosatelitarne w obydwu regionach: w Reg23-404 oraz Reg35-404, na co wskazuje polimorfizm długości produktów amplifikacji w każdym regionie po analizie rozdziałów w żelach agarozowych.

- Amplifikacja regionów mikrosatelitarnych SSR była utrudniona, ze względu na różnice sekwencji nukleotydowej w genomie referencyjnym i genomach badanych odmian oraz obecnością tzw. trudnych do sekwencjonowania fragmentów bogatych w powtarzające się motywy AT i GC oraz w sekwencje palindromowe.
- Analiza wyników sekwencjonowania potwierdziła (i) obecność regionów SSR oraz (ii) polimorfizm długości tych SSR w badanych genotypach pszenic.
- Bardzo duża zgodność sekwencji nukleotydowych uzyskana dla praktycznie wszystkich amplikonów i badanych genotypów pszenic wskazuje, że wybrana strategia eksperymentalna pozwala uzyskać wiarygodne i wewnętrznie spójne wyniki analizy sekwencji mikrosatelitarnych w bardzo dużym i złożonym (tj. alloheksaploidalnym) genomie pszenicy.
- Wykazano, że wartości wypełnienia kłosów w warunkach stresu suszy są zbieżne z charakterystyką polimorfizmu sekwencji mikrosatelitarnej (AG) w regionie Reg35-404. Region ten zlokalizowany jest w pobliżu genu lodującego inwertazę 1 pszenicy (*TaInv1*), w skafoldzie 4041295BL. Odległość genu *TaInv1* od Reg35-404 wynosi tylko 13kb co może wskazywać na pełne genetyczne sprzężenia obydwu regionów gDNA.
- Biorąc pod uwagę potencjalną rolę genu *TaInv1* zarówno w przebiegu mikrosporogenezy jak i tolerancji tego procesu na stres suszy, a także nasze wyniki analizy ekspresji tego genu w odmianach o skrajnej reakcji na stres suszy (wyniki w roku 2016) można przypuszczać, że polimorfizm sekwencji SSR w regionie Reg35-404 jest sprzężony z tolerancją na stres suszy w czasie mikrosporogenezy.

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 ¹✉, Natalia Hordyńska ¹, Stanisław Grzesiak ¹, Maciej Grzesiak ¹, Lidia Sas-Paszt ², Anna Lisek ², Beata Sumorok ², Edyta Derkowska ², Krzysztof Weszczak ², Mateusz Frąc ², Michał Przybył ², Paweł Trzciński ², Sławomir Głuszek ²

¹ Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN,

² Instytut Ogrodnictwa,

✉ 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.802.1.2019 Zadanie nr 103.

Słowa kluczowe: mikroorganizmy pożyteczne, pszenica, ryzosfera, susza

Zmiany klimatu w Polsce i na świecie powodują m. in. przedłużające się okresy suszy. Zjawisko to stanowi coraz większy problem w uprawie zbóż, szczególnie pszenicy jarej. 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 obecnie badania łączą i znacząco rozszerzają te zagadnienia. Celem jest bowiem określenie specyficznych genotypowo interakcji roślina-mikroorganizmy glebowe, które determinują odporność roślin na stres suszy na poziomie systemu korzeniowego. Dla zweryfikowania tych zależności w ramach zadań zostały określone cele szczegółowe obejmujące: (1) kontrolę biomasy systemu korzeniowego i zielonej biomasy nadziemnej rośliny, potencjału wody gleby, potencjału wody korzeni i potencjału wody liści, oraz wczesnych markerów poziomu stresu w liściach dla sześciu genotypów pszenicy jarej, uprawianej w 4 typach warunków uwodnienia (kontrola + trzy długości okresu suszy); (2) charakterystyka i określenie składu mikroorganizmów ryzosfery, pobranych

ze stanowisk glebowych 4 genotypów roślin pszenicy, odpornych i nieodpornych na suszę, uprawianych w tunelu hodowlanym w dwóch typach warunków uwodnienia (kontrola + susza) oraz opracowanie konsorcjów mikroorganizmów na podstawie wyizolowanych i oczyszczonych mikroorganizmów ryzosfery roślin odpornych i nieodpornych na suszę.

Między genotypami odpornymi i wrażliwymi podczas suszy zaobserwowano różnice w gęstości korzeni w górnych częściach struktury systemu korzeniowego. W odpornych genotypach narażonych na suszę zaobserwowano tendencję do zwiększania liczby korzeni w górnej części gleby – korzenie zajmowały przestrzeń powyżej kąta 45°. W pojemnikach „root-box” podczas suszy, genotypy wrażliwe wykazywały znacznie zmniejszoną wysokość, mniejszą suchą masę pędu i korzeni. Liczba liści roślin wrażliwych nie różniła się znacząco w przypadku roślin traktowanych suszą i roślin kontrolnych. Wrażliwe genotypy wykazały również znaczący spadek długości korzenia długości korzeni głównych i korzeni bocznych, ich mniejszą suchą masę podczas suszy. Susza nieznacznie zmniejszyła parametry wzrostu genotypów odpornych na suszę, z wyjątkiem całkowitej suchej masy korzenia, długości korzeni bocznych i średniej długości

korzeni bocznych, które były podobne dla genotypów kontrolnych i traktowanych suszą. W eksperymencie „root-basket” susza zmniejszyła wysokość wszystkich roślin i suchą masę ich pędów. Co istotne, liczba liści znacznie spadła dla roślin odpornych, ale nie wrażliwych, natomiast sucha masa korzeni znacznie spadła dla roślin wrażliwych, ale nie odpornych. W rezultacie stosunek pędów do korzeni spadł znacznie tylko dla odpornych genotypów. Ponadto u roślin wrażliwych na suszę, rosnących w pojemnikach typu „root-basket” wszystkie zmierzone cechy korzeni, tj. sucha masa korzeniowa, liczba korzeni bocznych i długość korzeni bocznych, rosnących pod kątem $60^\circ - 90^\circ$, znacznie spadły w wyniku suszy w porównaniu do warunków kontrolnych. Przeciwnie tendencje wystąpiły dla roślin odpornych, w których susza zwiększyła suchą masę korzeni rosnących pod kątem $0^\circ - 30^\circ$, a także liczbę korzeni węzłowych i długość korzeni węzłowych rosnących pod kątem $0^\circ - 60^\circ$.

Parametry fluorescencji chlorofilu α określono po 1 tygodniu zastosowania różnych warunków suszy lub 1, 2, 3 tygodniach suszy na tym samym poziomie dla stwierdzenia, czy różnice w parametrach mogą stanowić wczesny marker wrażliwości na suszę zależnej genotypowo. Wartość F_v/F_m spadała wraz z wzrostem intensywności suszy dla wszystkich badanych obiektów, jednakże istotne statystycznie różnice pomiędzy kontrolą i suszą obserwowano dopiero po zastosowaniu warunków suszy intensywniejszej. Ponadto, niższe wartości F_v/F_m stwierdzono u odmian wrażliwych na suszę względem odmian tolerancyjnych. Wartość parametru ABS/RC wzrastała wraz ze wzrostem intensywności suszy dla wszystkich badanych genotypów. ABS/RC było wyższe dla odmian wrażliwych, w porównaniu do odmian tolerancyjnych. Podobnie, TRo/RC wzrastało wraz ze wzrostem intensywności suszy dla wszystkich badanych genotypów. W warunkach kontrolnych odmiany tolerancyjne charakteryzowały się niższą wartością parametru w porównaniu do roślin wrażliwych. ETo/RC i Dio/RC również wzrastało wraz ze wzrostem intensywności suszy dla wszystkich badanych genotypów, ale w warunkach kontrolnych nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic pomiędzy badanymi genotypami. Parametr P.I. obniżał się wraz ze wzrostem intensywności suszy dla odmian Struna i SMJ 2115, natomiast pozostałe genotypy reagowały wzrostem parametru w warunkach niższej intensywności suszy, ale spadkiem w warunkach suszy intensywniej. Odmiany tolerancyjne w warunkach kontrolnych charakteryzowały wyższe wartości P.I.

Wartości potencjału osmotycznego dla roślin

kontrolnych (optymalne nawodnienie, wysoka zawartość wody) mierzone obniżeniem temperatury zamrażania próbek oraz przeliczone na wartości osmolarności wskazały większe różnice pomiędzy glebą i pędami dla roślin odpornych. Zawartość wody była znacząco niższa, a zawartość substancji osmotycznie czynnych, znacząco wyższa dla pędów roślin odpornych względem roślin wrażliwych. Podobne wyniki otrzymano dla korzeni, różnice potencjału pomiędzy glebą (wysoka zawartość wody) i korzeniami (niska zawartość wody, wysoka zawartość substancji osmotycznie czynnych) były znaczące. W okresie suszy tendencje utrzymywały się, chociaż spadek zawartości wody powodował zmniejszenie różnic pomiędzy pędem i glebą oraz korzeniem i glebą. Wyrównanie różnic potencjałów obserwowane było w najostrzejszej suszy dla genotypów tolerancyjnych, jako konsekwencja silnego obniżania zawartości wody w glebie, przy jednocześnie dużej stabilności parametrów potencjału w pędach i korzeniach

Analiza mikroskopowa powierzchni dolnej blaszki liściowej wskazała wyższą liczbę aparatów szparkowych w optymalnych warunkach nawodnienia oraz obniżanie liczby aparatów szparkowych na powierzchni liści rozwijających się liściach w warunkach suszy. Obserwowano liniowy spadek liczby aparatów szparkowych wraz z postępującą intensywnością zastosowanych warunków suszy. Najniższą liczbę aparatów szparkowych stwierdzono dla genotypów tolerancyjnych dla których liście rozwijały się podczas trzech kolejnych tygodni suszy. Dodatkowo stwierdzono, różnice w wielkości aparatów szparkowych w warunkach kontrolnych i suszy. Zmniejszenie aparatów szparkowych obserwowano dla wszystkich genotypów w warunkach suszy.

Genotyp rośliny nie jest jedynym czynnikiem determinującym ostateczny rezultat jakim jest przetrwanie warunków suboptymalnych. System korzeniowy rośliny nawet najlepiej wykształcony, w warunkach suszy nie będzie określał potencjału przeżycia rośliny w systemie zerojedynkowym. Dopiero kompleksowe oddziaływania fizykochemiczne w systemie ryzosfera-gleba, oraz interakcje systemu korzeniowego z mikroorganizmami o różnej aktywności w danym podłożu, będą decydować o ostatecznym plonowaniu roślin i przetrwaniu warunków stresu suszy. Doświadczenia pozwoliły na weryfikację oddziaływania mikroorganizmów na wzrost i plonowanie wybranych genotypów. Umożliwiły też potwierdzenie hipotezy badawczej zakładającej, że: istnieją specyficzne genotypowo interakcje roślina-mikroorganizmy

glebowe, determinujące odporność roślin na stres suszy; w strefie korzeniowej roślin odpornych i nieodpornych rozwija się jakościowo i ilościowo odmienna kompozycja mikroorganizmów glebowych; specyficzna kompozycja mikroorganizmów ryzosfery determinuje fizyczne i biochemiczne warunki glebowe (m. in. stosunki wodno-powietrznych, obecność substancji aktywnych produkowanych przez mikroorganizmy), jak również indukuje ścieżki sygnałowe/mechanizmy/reakcje fizjologiczne umożliwiające roślinie aklimatyzację i przetrwanie stresu suszy.

Zależność genotypowa tolerancji pszenicy na suszę jest czynnikiem krytycznym. Odmiany Telimena, Sirocco, Goplana wybrano jako genotypy wrażliwe na stres suszy; Struna, SMJ 2115, Sharki jako genotypy odporne na stres suszy. Zmniejszanie powierzchni części nadziemnej roślin (liczby liści, suchej masy, liczby aparatów szparkowych), przy jednoczesnym utrzymaniu wysokiej efektywności procesu fotosyntezy (parametry fluorescencji), ograniczenie uwodnienia roślin i zwiększenie zawartości substancji osmotycznie czynnych, są cechami części nadziemnej roślin, które determinują tolerancję warunków suszy przez rośliny pszenicy. Specyficzną cechą roślin tolerancyjnych jest mocno rozgałęziony, głęboki system korzeniowy, umożliwiający uniknięcie stresu suszy/zmniejszenie skutków suszy. Jednakże rozbudowana architektura korzeni musi być równomierna, wzrost korzeni również w górnej warstwie gleby jest niezbędny, aby zapewnić roślinom przewagę konkurencyjną w pobieraniu składników pokarmowych i determinuje ostateczny plon. W programach hodowlanych,

których celem jest poprawa pobierania wody z gleby i stabilizacja plonów w warunkach stresu wodnego, należy wziąć pod uwagę selekcję roślin o korzeniach głębokich, ale i rozgałęzionych w całym profilu glebowym. Cechy korzenia, takie jak długość, głębokość i gęstość struktury powinny być rozpatrywane jednocześnie z cechami determinującymi wzrost korzenia pod szerokim kątem.

Aplikacja konsorcjów mikroorganizmów wpłynęła korzystnie na zwiększenie formowania struktur arbuskularnych grzybów mykoryzowych i zasiedlenia korzeni przez grzyby mykoryzowe, w porównaniu do korzeni roślin nieinokulowanych mikroorganizmami w optymalnych warunkach nawadniania oraz w warunkach stresu suszy. W ryzosferze roślin pszenicy odnotowano zwiększenie ogólnej liczebności bakterii oraz bakterii wytwarzających formy przetrwalnikowe dla odmiany Telimena w warunkach optymalnego nawadniania, oraz dla odmiany Sharki rosnącej w warunkach stresu suszy. Odnotowano zwiększenie populacji bakterii syntetyzujących kwas indoliloctowy w glebie ryzosferowej roślin pszenicy odmian Telimena i Sharki po zastosowaniu Konsorcjów mikroorganizmów. Aplikacja konsorcjów mikrobiologicznych ogranicza negatywne skutki stresu suszy u roślin pszenicy poprzez stymulację interakcji mikroorganizmów glebowych z ryzosferą roślin. Ze względu na istotne różnice pomiędzy kompozycją mikroorganizmów ryzosfery roślin odpornych i nieodpornych na suszę, pozyskano mikroorganizmy i przygotowano specyficzne konsorcja do testów inokulacji roślin w warunkach glebowych i *in vitro* w 2020 roku.

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

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

Magdalena Szechyńska-Hebda ¹✉, Natalia Hordyńska ¹, Maria Wędzony ², Dyda Mateusz ², Joanna Troczyńska ³

¹ Instytut Fizjologii Roślin im. F. Górskiego PAN,

² Uniwersytet Pedagogiczny w Krakowie,

³ DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o.,

✉ 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.802.1.2019 Zadanie nr 80.

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. Celem badań jest określenie 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. Postawiono hipotezy badawcze: rozwój plastydów może być modyfikowany na najwcześniejszych etapach androgenyzy przez aplikację odpowiednich czynników abiotycznych; krótkie okresy wysokiej temperatury i wysokiego natężenia światła mogą być stosowane alternatywnie do indukcji chłodowej oraz ograniczać zjawisko albinizmu; zjawisko albinizmu jest rezultatem niezbalansowania ROS, który prowadzi do autoeliminacji komórek gametycznych zdolnych do przeprogramowania rozwoju w kierunku sporofitycznym

Badania prowadzone są dla genotypów scharakteryzowanych wcześniej jako podatne na zjawisko albinizmu *vs* genotypy regenerujące ce wysoki procent roślin zielonych. Porównano

czynniki abiotyczne stosowane standardowo w fizjologii roślin do testowania funkcjonowania chloroplastów i potencjalnie indukujące androgenezę: (1) standardowo stosowany chłód, (2) stres wysokiej temperatury, (3) krótki okres działania wysokiego natężenia światła o określonej kompozycji spektralnej. Wpływ czynników indukcyjnych zbadano na wczesnych etapach powstawania mikrospor oraz w początkowej fazie podziałów komórkowych – bezpośrednio po zastosowaniu określonego stresu. Przeprowadzono kontrolę indukcji androgenyzy i poziomu albinizmu w warunkach *in vitro* po zastosowaniu stresów. Określono zbalansowanie reaktywnych form tlenu (ROS) w sposób pośredni, analizując ekspresję genów markerowych kodujących białka systemu antyoksydacyjnego. Określono również rolę programowanej śmierci komórki w autoeliminacji mikrospor zdolnych do przeprogramowania rozwoju w kierunku sporofitycznym po aplikacji stresu na podstawie analizy TUNEL.

Zależność genotypowa jest czynnikiem krytycznym w procesie androgenyzy i determinuje regenerację roślin zielonych/albinotycznych. Czynnikiem modyfikującym proces androgenyzy może być termin zbioru kłosów. Względnie wyższy poziom stresu gwarantować może lepszą efektywność regeneracji roślin zielonych. Stres chłodu jest pozytywnym regulatorem

przeprogramowania rozwoju mikrospor z gametofitycznego do sporofitycznego i regeneracji roślin zielonych, wysoka temperatura w przypadku genotypów pszenżyta i pszenicy nie wpływa na zwiększenie efektywności procesu androgenezy, natomiast stres wysokiego natężenia światła może częściowo zastępować stres niskiej temperatury lub stosowany jako czynnik dodatkowy może zwiększać efektywność regeneracji roślin. Poziom ekspresji genu SOD jest zależny od genotypu i rodzaju zastosowanego stresu. Najwyższą ekspresję genu SOD indukuje stres wysokiej temperatury w kłosach genotypów pszenżyta o niskiej podatności na proces androgenezy, oraz stres niskiej temperatury dla genotypu pszenżyta o wysokiej podatności na androgenezę. Zmiany ekspresji genu CAT nie odgrywają istotnej roli w procesie androgenezy, ekspresja genu nie jest specyficzna genotypowo i nie koreluje z rodzajem traktowania. Podwyższenie ekspresji genu SSIII dla genotypu pszenżyta o wysokiej podatności na androgenezę jest istotne na każdym etapie androgenezy, natomiast dla pozostałych genotypów ekspresja genu jest niska. Wszystkie czynniki stresowe

podwyższają wartość ekspresji genu SSIII, najsilniejszy efekt indukuje traktowanie światłem o wysokim natężeniu. Najwyższy poziom ekspresji genu kodującego białko D1 obserwowane jest po zastosowaniu stresu niskiej temperatury oraz wysokiego natężenia światła dla genotypu podatnego na proces androgenezy. Morfologia mikrospor po traktowaniu niską temperaturą wykazała, że są one w odpowiednim stadium rozwojowym dla indukcji procesu androgenezy, tzn. dwujądrowym, po symetrycznym podziale jądra, bez zaznaczonej ściany komórkowej. Traktowanie wysokim natężeniem światła korzystnie wpływa na rozwój mikrospor genotypów podatnych na proces androgenezy, natomiast wysoka temperatura i wysokie natężenie światła dereguluje rozwój mikrospor opornych genotypów. PCD indukowane jest w mikrosporach genotypów opornych na proces androgenezy, oraz po traktowaniu stresem wysokiej temperatury i światłem EL. W komórkach kalusa, PCD indukowane jest dla większości genotypów. W przypadku zielonych liści indukcja PCD była widoczna w jądrach komórek szparkowych i komórek mezofilu, a także w chloroplastach.

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

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

Piotr Tomasz Bednarek ¹✉, Marzena Wasiak ¹, Agnieszka Niedziela ¹, Sławomir Bany ¹, Mirosław Pojmaj ²

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

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

✉ e-mail: p.bednarek@ihar.edu.pl., tel. 22 7254533

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.802.3.2019, Zadanie nr 15.

Słowa kluczowe: cytoplazmatyczna męska sterylność, hodowla heterozyjna, markery genetyczne

Hodowla heterozyjna pszenżyta bazuje na cytoplazmatycznej męskiej sterylności typu *Triticum timopheevii* (cms Tt). W chwili obecnej jest to jedyny typ cms wykorzystywany na skalę przemysłową umożliwiającą prowadzenie męskosterylnych linii matecznych. Ten typ cytoplazmy sterylizującej jest łatwy do przywrócenia co stanowi duży problem w hodowli pszenżyta heterozyjnego. Dodatkowo, słabo poznane są genetyczne podstawy zjawiska. Wiadomo, że cms Tt jest warunkowana szeregiem QTLi o relatywnie niewielkich efektach. Dane literaturowe sugerują, że QTL e cechy występują praktycznie na wszystkich chromosomach gatunku. Brak jest jednak danych molekularnych o szczegółowej lokalizacji wszystkich QTLi oraz ich roli w ekspresji cechy.

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

W roku 2019 zadanie było realizowane w ramach 3 tematów badawczych:

Temat badawczy 1: markerowanie genetyczne (DArTseq/silicoDArT) linii rekombinacyjnych.

Genotypowanie linii RIL8: MS 114 (5)-2–1 dop. x Borwo za pomocą markerów DArTseq.

W wyniku genotypowania populacji RIL8:

MS 114 (5)-2–1 dop. x Borwo uzyskano 300663 markerów DArTseq w postaci macierzy z segregacjami oraz 58867 markerów silicoDArT (łącznie 89530 markerów DArT).

Wnioski z prowadzonych badań:

1. Profilowanie populacji RIL8: MS 114(5)-2-1 dop. x Borwo pozwoliło na uzyskanie łącznie 89530 markerów DArTseq i silicoDArT.

Temat badawczy 2: identyfikacja markerów cechy (mapowanie genetyczne i/lub asocjacyjne).

Cel podjętego tematu i prowadzonych badań:

- Mapowanie genetyczne populacji RIL8: MS 114(5)-2-1 dop. x Borwo w oparciu o markery DArTseq oraz/lub silicoDArT.
- Ocena zawiązywania ziaren dla krzyżówki BC1F8: MS 114 (5)-2–1 cms Tt x [RIL8: MS 114 (5)-2–1 dop. x Borwo] oraz BC1F8: MS HT 352 cms Tt x [RIL8: MS HT 352 dop. x Borwo].
- Poszukiwanie markerów związanych z QTLami utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt z wykorzystaniem populacji BC1F8: MS 114 (5)-2–1 cms Tt x [RIL8: MS 114 (5)-2–1 dop. x Borwo].

Mapowanie genetyczne wykonane dla populacji RIL8: MS 114 (5)-2–1 dop. x Borwo umożliwiło identyfikację 21 grup sprzężeń, które przypisano do odpowiednich chromosomów pszenżyta. Na mapie znalazło się łącznie 44655 markerów (1181 markerów szkieletowych, 10705 redundantnych i 32769 dodanych). Najmniej

liczna pod względem liczby markerów szkieletowych grupa sprzężeń 2R składała się z 18, natomiast najliczniejsza 5A z 91 markerów DArTseq i silicoDArT. Łącznie, wszystkie grupy sprzężeń pokrywały 2240.6 cM, przy czym średnio markery szkieletowe występowały co 2.13 cM.

Ocena zawiązywania ziaren będąca miarą utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta wykazała zróżnicowanie cechy dla krzyżówki BC1F8: MS 114 (5)-2-1 cms Tt x [RIL8: MS 114 (5)-2-1 dop. x Borwo] oraz BC1F8: MS HT 352 cms Tt x [RIL8: MS HT 352 dop. x Borwo]. Obserwowano zarówno rośliny sterylne jak i takie, u których liczba ziaren w kłosie dochodziła do ponad 50-ciu.

Mapowanie QTL z wykorzystaniem złożonego mapowania interwałowego (CIM, ang. Composite Interval Mapping) wykazało obecność QTLi utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z cms Tt w obrębie grup sprzężeń 2A, 3B, 4A, 5A, 7A i 7R. Wielokrotne mapowanie interwałowe (MIM, ang. Multiple Interval Mapping) potwierdziło obecność części QTLi występujących w obrębie chromosomów 2A, 3B i 5A.

Wnioski z prowadzonych badań:

- Opracowana mapa genetyczna dla populacji RIL8: MS 114 (5)-2-1 dop. x Borwo jest dobrze wysycona markerami molekularnymi i może być wykorzystana do mapowania kompozytowego oraz wielokrotnego mapowania interwałowego.
- Mapowanie QTLi utrzymania męskiej sterylności/ przywracania płodności pyłku u pszenżyta z CMS Tt potwierdziło złożoność cechy oraz jej warunkowanie wieloma QTLami, specyficznymi dla różnych populacji mapujących. Maksimum funkcji LOD dla QTLi badanej cechy wykazują silne sprzężenie z markerami otaczającymi te QTL. Markery te mają zwykle wiele markerów redundantnych. Stwarza

to perspektywy uzyskania markerów specyficznych.

- Wydaje się, że selekcja wsparta markerami molekularnymi w wariacie klasycznym możliwa jest wyłącznie z wykorzystaniem linii RIL danej populacji mapującej i będzie mieć ograniczony skutek (problemem będzie dobór form rodzicielskich do krzyżowań).

Temat badawczy 3: testowanie markerów molekularnych na szerszej populacji genotypów.

Cel podjętego tematu i prowadzonych badań:

Identyfikacja markerów pracujących na różnych genotypach lub wytypowanie markerów najsilniej sprzężonych/asocjowanych z najmocniejszymi QTL cechy.

Duża różnorodność QTLi występujących w obrębie pięciu badanych populacji mapujących RIL8: MS 114 (5)-2-1 dop. x Borwo; RIL8: DB2 x B2, RIL6: MS HT 352 dop. x Borwo, RIL6: MS 112 (15)-2-1 dop. x Borwo oraz RIL5: DB1 x RB1 nie pozwoliła na wytypowanie markerów wspólnych dla wszystkich z nich. Najwyraźniej dla każdej z badanych populacji należy typować inne markery molekularne sprzężone z najsilniejszymi QTLami cechy. Należy jednak pamiętać, że QTLi wytypowane dla poszczególnych populacji mapujących mogą, ze względu na rodzaj i sposób prowadzenia materiału badawczego, mieć nadmierne (przecenione) wartości QTLi.

Wnioski z prowadzonych badań

- Zróżnicowanie badanych populacji mapujących pod względem występowania QTLi utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS Tt uniemożliwia wytypowanie wspólnych markerów.
- Dla każdej z badanych populacji należy typować inne markery molekularne sprzężone z najsilniejszymi QTLami cechy.

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

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.))

Edward Arseniuk ✉, Lidia Kowalska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin,

✉ e-mail: e.arseniuk@ihar.edu.pl, tel. 22 7254536, fax. 22 7334505

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr Dz.U.poz.1170. z późn. zmianami, Zadanie nr 81.

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

Współczesne rolnictwo jest uzależnione od stosowania pestycydów. Ochrona chemiczna środkami grzybobójczymi jest skuteczna, jednak nie zawsze ekonomicznie uzasadniona i może być szkodliwa dla środowiska (Cook, 1999). Nowoczesne odmiany powinny charakteryzować się lepszym dostosowaniem do zmieniających się warunków środowiska, wyższą odpornością na choroby i szkodniki oraz wysokim plonowaniem bez obniżenia jakości plonu i konieczności stosowania intensywnego nawożenia i ochrony roślin. Jedną z najważniejszych chorób zbóż jest septorioza liści i plew, wywołana przez nekrotroficzny grzyb *Parastagonospora nodorum*. W wyniku porażenia odnotowywany jest spadek plonu ziarna do około 40% (Arseniuk i in.; 2002). Prace nad podniesieniem odporności zbóż na septoriozy przez stosowanie konwencjonalnych metod są długie i kosztowne. Można je wspomóc technikami biotechnologii stosując somatyczną embriogenezę i androgenezę.

Celem projektu jest porównanie efektywności i wykorzystanie biotechnologicznych

metod poszerzających zmienność genetyczną i skracających cykl hodowlany pszenicy ozimej i pszenżyta ozimego pod względem odporności i tolerancji zbóż na septoriozę liści i plew. Linie somaklonalne i dihaploidalne otrzymane w ramach projektu zostały poddane testom odporności na septoriozę liści i plew oraz wrażliwości na toksynę białkową produkowaną przez *P. nodorum*, Tox3.

Otrzymane wyniki wskazują na wyższą odporność na *P. nodorum* genotypów pszenżyta, zarówno w warunkach polowych jak i kontrolowanego środowiska. Udział porażonej tkanki dla obiektów pszenżyta ozimego wyniósł 35% w warunkach polowych i 13,9% w fitotronie, natomiast dla obiektów pszenicy ozimej porażenie wyniosło odpowiednio 41,4% i 14,2%. Również w ubiegłych latach realizacji projektu otrzymano podobne wyniki. W roku 2018 średnia powierzchnia porażenia tkanek liści pszenżyta wyniosła 14%, natomiast dla genotypów pszenicy zaobserwowano 18% porażonej tkanki liści. Arseniuk i Fried (1991) w pracy wykazali wyższą odporność na septoriozę

liści i plew dla obiektów pszenicy ozimej. W swoich badaniach porównywalność dwóch genotypów pszenżyta ozimego i sześciu genotypów pszenicy ozimej na prezentowany patogen. Średnia powierzchnia porażenia liści wyniosła u pszenicy 17,2% podczas gdy u pszenżyta aż 30,5%. Jedną z przyczyn przełamania odporności pszenicy może być ewolucja patogena. W dotychczasowych badaniach na uwagę zasługuje linia D-44, która pochodzi ze skrzyżowania odmian Borwo i Tomko. W tym roku porażenie tkanki liści dla tej linii wyniosło 33,3% w warunkach polowych i 8,4% w fitotronie. Przedstawione w pracy wyniki wskazują, że somatyczna embriogeneza zwiększa zmienność reakcji na *P. nodorum* wśród genotypów pszenżyta ozimego. Otrzymane wyniki testów odporności na septoriozę liści i plew w warunkach polowych i kontrolowanego środowiska są zbieżne z wynikami z lat ubiegłych. Somaklony pszenżyta ozimego wykazują najwyższą odporność na *P. nodorum*. Średnia wartość porażonej tkanki wyniosła 32,3%, podczas gdy w przypadku somaklonów pszenicy zaobserwowano 42,3% porażenia. W 2017 roku udział zainfekowanej tkanki wyniósł 17% dla somaklonów pszenicy i 10% dla somaklonów pszenżyta, natomiast w 2018 odpowiednio 47% i 37%. Podobne wyniki uzyskali Arseniuk i in. (1998) badając odporność linii somaklonalnych pszenżyta.

Nekrotroficzny grzyb *P. nodorum* produkuje kilka rodzajów białek wywołujących w tkankach gospodarza indukcję zmian nekrotycznych i w rezultacie rozwój choroby. Wrażliwość odmian na toksynę Tox3 jest bardzo powszechna. 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%. Ponadto w badaniach Kar-Chun Tan i in., (2014) po przetestowaniu 46 komercyjnych odmian pszenicy, u 91% zaobserwowano wrażliwość na toksynę

Tox3. Wyniki uzyskane podczas badań dla genotypów pszenżyta są zbieżne. Podatność na toksynę Tox3 zaobserwowano dla 69,8% genotypów pszenżyta ozimego oraz 48,1% obiektów pszenicy ozimej.

Wyniki otrzymane w projekcie potwierdzają możliwość poprawy odporności genotypów pszenicy i pszenżyta ozimego w procesie somatycznej embriogenezy. Włączenie do uprawy genotypów zbóż o podwyższonej odporności na *P. nodorum* oraz toksynę Tox3 może być efektywnym środkiem ochrony roślin przed spadkami plonu wywołanymi przez septoriozę liści i plew.

Literatura:

- Arseniuk E., Czembor H. J., Zimny J., Scharen A. L., Ludański Z. (1998). Somaclonal variation as a tool for improvement of triticale resistance to *Stagonospora nodorum*. Proc. 4th International Triticale Symp., July 26-31, 1998, Red Deer, Canada: 124–147.
- Arseniuk E., Fried P. M., Winzeler H., Czembor H. J. (1991). Comparison of resistance of triticale, wheat and spelt to *Septoria nodorum* blotch at the seedling and adult plant stages. *Euphytica* 55: 43–48.
- Arseniuk E., Sodkiewicz W. (2002). Study of phenotypic traits of partial resistance to *Stagonospora nodorum* in winter triticale introgressive lines, commercial cultivars and dihaploid lines. Proceedings of the 5th International Triticale Symposium, IHAR Radzików, Poland, June 30 – July 5, 2002. Vol. 1, p. 163–177.
- Cook, R. J., (1999): Management by chemicals. w: Lucas J. A., Bowyer P., Anderson H. M., *Septoria on Cereals: a Study of Pathosystems*, 286-298. CAB Int., New York.
- Tan K. C., Waters O. D. C., Rybak K., Antoni E., Furuki E., Oliver R. P. (2014). Sensitivity to three *Parastagonospora nodorum* necrotrophic effectors in current Australian wheat cultivars and the presence of further fungal effectors. *Crop Pasture Sci.* 65:150–158.
- Walczewski J., Arseniuk E., Ochodzki P. (2017). Toksyny białkowe *Parastagonospora nodorum*. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka Dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych, Zakopane.

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

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

Jakub Walczewski, Edward Arseniuk ✉

Zakład Fitopatologii. Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB w Radzikowie,
✉ e-mail. e.arseniuk@ihar.edu.pl, tel. 22 7334630

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi Dz. U. poz. 1170 z późn. Zm. Zadanie nr 10.

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

Septorioza liści i plew (SNB) jest chorobą zbóż wywołaną przez grzyb *Parastagonospora nodorum*. W Polsce choroba ta najczęściej występuje na pszenicy i pszenżycie. Z doniesień w literaturze przedmiotu wynika, że patogen wywołujący tę chorobę jest obecny niemal we wszystkich rejonach świata, w których uprawia się pszenicę i pszenżyto. W warunkach wysokiej wilgotności i umiarkowanej temperatury SNB osiąga rozmiary epidemii skutkującej wysokimi ilościowymi i jakościowymi stratami w plonie ziarna. *P. nodorum* jest grzybem nekrotroficznym, co oznacza, że do odżywiania i rozmnażania potrzebuje martwej tkanki żywiciela. W ostatnim czasie opisano molekularne mechanizmy wykorzystywane przez tego patogena do inicjacji zmian nekrotycznych. W procesie infekcji produkowane są białkowe toksyny wchodzące w interakcję z produktami specyficznych genów gospodarza aktywując szlaki sygnałowe prowadzące do programowanej śmierci komórek (Friesen i Faris 2010). Dotychczas opisano 8 toksyn, zwanych też efektorami białkowymi, oraz 9 korespondujących z nimigenów żywiciela. Wrażliwość na dany efektor białkowy jest zależna od obecności w genomie dominującego allelu pojedynczego genu. Wpływ interakcji efektor-gen rośliny żywiciela na rozwój SNB ma przeważnie charakter addytywny. Dotychczasowe badania nad wpływem efektorów na rozwój choroby były prowadzone na jednolitych populacjach segregujących wrażliwość na określone toksyny, z wykorzystaniem pojedynczych

izolatów patogena. W takich warunkach wykazano pozytywny wpływ wrażliwości na toksyny na odporność rośliny na patogena zarówno w stadium siewki w warunkach kontrolowanego środowiska (Liu i inni 2009) jak i w warunkach polowych (Friesen i inni 2019).

W realizowanej pracy postawiono sobie za cel określenie wpływu, jaki wywierają poszczególne efekторы na rozwój choroby w obiektach reprezentujących zróżnicowaną pulę genową polskich programów hodowlanych pszenicy i pszenżyta, w warunkach zbliżonej do naturalnej presji patogena. Takie podejście umożliwia uszeregowanie genów wrażliwości na efekторы białkowe pod względem korzyści dla odporności genotypów zbóż na SNB płynących z ich eliminacji z programów hodowlanych.

Lokalna populacja patogenu została scharakteryzowana przy pomocy badań PCR dla toksyn Tox1, Tox3 i ToxA, oraz z wykorzystaniem testów biologicznych dla toksyny Tox5. Z badań wynika, że większość izolatów *P. nodorum* z terenu Polski zawiera geny kodujące Tox1, Tox3 i Tox5. Toksyna ToxA występuje tylko u około 10% przebadanych izolatów. Dane te zostały wykorzystane przy wyborze izolatów do testów fenotypowania tak, aby odzwierciedlały one populację *P. nodorum* występującą na terenie Polski.

W ramach zadania przebadano na odporność na SNB genotypy pszenicy i pszenżyta w dwóch stadiach rozwojowych, siewki w warunkach kontrolowanego środowiska, oraz w stadium

rośliny dojrzałej w doświadczeniu polowym.

Zbadano również wrażliwość genotypów na toksyny Tox1, Tox3, Tox5 oraz ToxA. Materiałem do badań były ekstrakty uzyskane w wyniku ekspresji genów toksyn w *Pichia pastoris*. W przypadku toksyny Tox5 wykorzystano ekstrakt oczyszczony metodami chromatograficznymi z hodowli *Parastagonospora nodorum*. W przebadanych obiektach wrażliwość na toksynę Tox3 była najbardziej rozpowszechniona. Większość przebadanych linii pszenżyta (56%) i 28% obiektów pszenicy jest wrażliwych na tę toksynę. Wrażliwość na toksynę Tox5 występuje w ok. 36% genotypów pszenżyta i około 13% pszenicy. Na toksynę ToxA wrażliwych było 13% genotypów pszenżyta i 5% genotypów pszenicy, z kolei na toksynę Tox1 wrażliwych było tylko około 5% obiektów obu gatunków.

Dane dotyczące odporności fenotypowej oraz wrażliwości na toksyny zostały zestawione ze sobą w celu wykrycia ewentualnych związków korelacyjnych (Rysunek 1). W tegorocznych badaniach toksyna Tox3 stanowiła główny czynnik rozwoju choroby w stadium siewek u obydwu gatunków zbóż. Wrażliwość na tę toksynę determinowała 37% i 24% objawów chorobowych u pszenicy i pszenżyta. W tegorocznych badaniach polowych pszenicy i pszenżyta nie stwierdzono statystycznie istotnego związku między wrażliwością na Tox3 a fenotypową odpornością polową. Z uwagi na suszę już w trzecim tygodniu po zaobserwowaniu pierwszych objawów, rozpoczęło się zasychanie roślin, co najprawdopodobniej przyczyniło się do niewykrycia statystycznie istotnego związku korelacyjnego między wrażliwością na tę toksynę a odpornością polową. Należy podkreślić, że taki statystycznie istotny związek był obserwowany rutynowo w poprzednich latach.

Ponadto wykryto statystycznie istotny związek korelacyjny między wrażliwością na toksynę Tox5 a odpornością pszenżyta w stadium siewki. Toksyna Tox5 determinowała 7.9% tej zależności. Analiza wariacji wyników wykazała również, że wrażliwość na toksynę Tox5 w sposób statystycznie

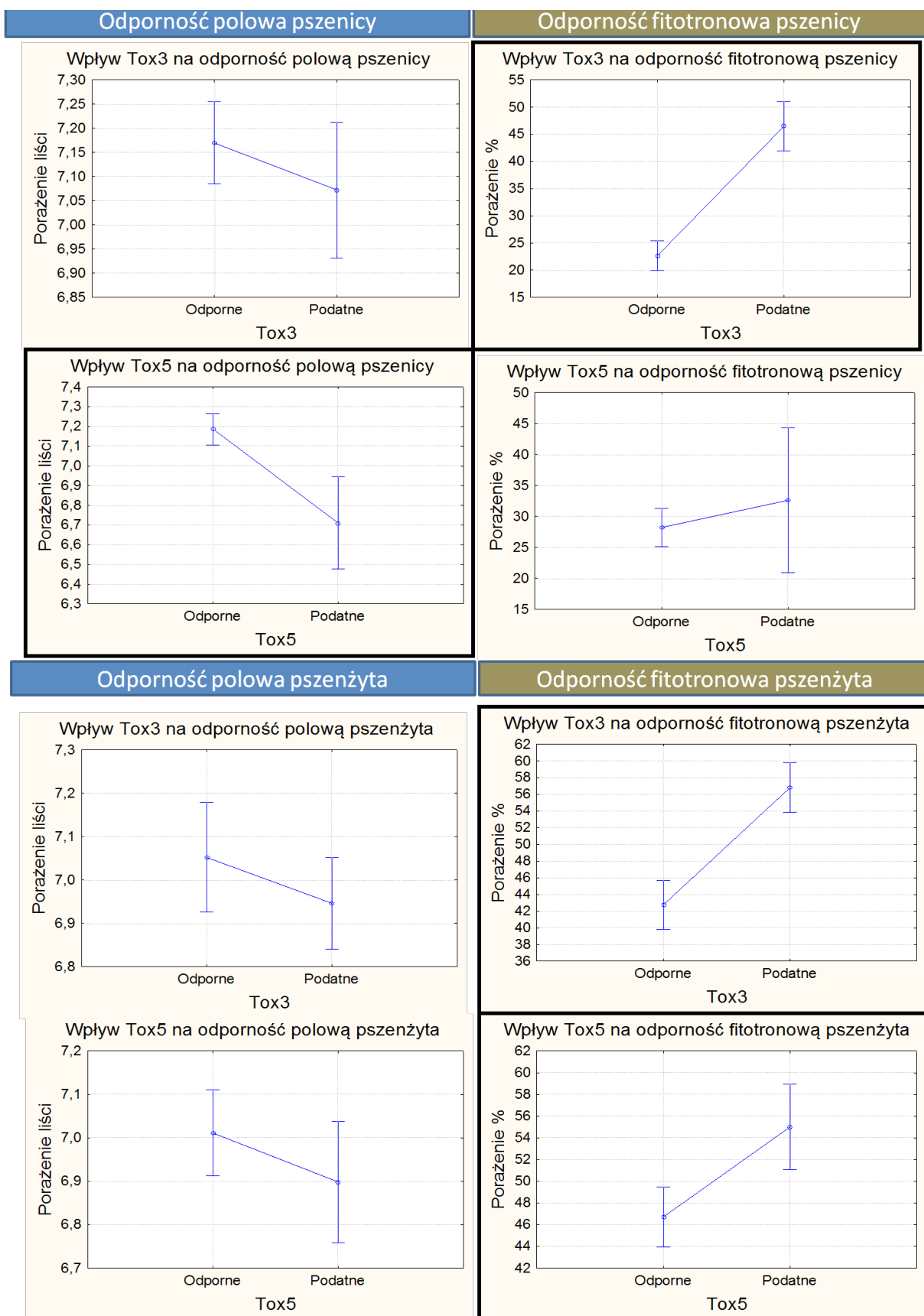
istotny wyjaśnia 7.8% zmienności w odporności fenotypowej pszenżyta na SNB w stadium rośliny dorosłej w doświadczeniu polowym.

W przeprowadzonych doświadczeniach nie zaobserwowano statystycznie istotnych interakcji między wrażliwością na toksyny Tox1 i ToxA a odpornością fenotypową na SNB. Prawdopodobnymi przyczynami tego są małe ilości obiektów wrażliwych na te toksyny, maskowanie efektów ich działania przez bardziej rozpowszechnione wrażliwości, oraz w przypadku ToxA niski udział w inokulum izolatów produkujących tę toksynę. Z uwagi na przykłady takich oddziaływań w specjalnie dla tych toksyn optymalizowanych doświadczeniach opisanych w literaturze nie można jednak wykluczyć istotności takich oddziaływań.

Wykryte związki korelacyjne między wrażliwością na toksyny Tox3 i Tox5 a odpornością na SNB wskazują na zasadność usunięcia z puli obiektów hodowlanych obiektów wrażliwych na te toksyny. Rutynowa bonitacja wrażliwości na toksyny kandydatów na rodziców, oraz wczesnych materiałów hodowlanych może być szybką i wygodną metodą wspierania decyzji hodowlanych prowadzących do zwiększenia odporności na SNB.

Literatura:

- Friesen, T. L., Faris, J. D. (2010). Characterization of the wheat-*Stagonospora nodorum* disease system: what is the molecular basis of this quantitative necrotrophic disease interaction? *Can J Plant Pathol-Rev Can Phytopathol* 32:20–28.
- Liu, Z., Faris, J. D., Oliver, R. P., Tan, K. C., Solomon, P. S., McDonald, M. C., McDonald, B. A., Nunez, A., Lu, S., Rasmussen J. B., Friesen, T. L. (2009). SnTox3 acts in effector triggered susceptibility to induce disease on wheat carrying the Snn3 gene. *PLoS Pathog* 5: e1000581.
- Friesen, T. L., Chu, C. G., Liu, Z. H., Xu, S. S., Halley, S., Faris, J. D. (2009). Host-selective toxins produced by *Stagonospora nodorum* confer disease susceptibility in adult wheat plants under field conditions. *Theor Appl Genet* 118: 1489–1497.



Rys. 1. Wpływ wrażliwości na toksyny Tox3 i Tox5 na odporność fenotypową. Ocena w warunkach polowych prowadzona w skali: 9 – odporny, 1 – podatny; ocena w warunkach fitotronowych wyrażona przez % porażonej powierzchni liści. Ramką zaznaczono istotne statystycznie zależności dla $p < 0.05$. Pionowe słupki oznaczają 0.95 przedziały ufności.

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

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

Halina Wiśniewska ¹✉, Adriana Twardawska ¹, Tomasz Góral ², Piotr Ochodzki ², Maciej Majka ¹, Dorota Walentyn-Góral ², Jolanta Belter ¹

¹Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań,

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

✉ e-mail: hwis@igr.poznan.pl, tel. 662044293

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.802.2.2019, Zadanie nr 14.

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

Nowe odmiany pszenżyta wykazują podatność na fuzariozę kłosów, a także na kumulację toksyn fuzaryjnych. Szczególnym problemem związanym z fuzariozą kłosów jest skażenie ziarna mykotoksynami, które stanowią duże zagrożenie dla zdrowia ludzi oraz zwierząt.

Odporność na grzyby patogeniczne z rodzaju *Fusarium* warunkowana jest przez wiele locus cech ilościowych (QTL), przy czym główne źródło stanowi locus genu *Fhb1* odpowiadający za bardzo wysoką i stabilną odporność na fuzariozę, który obecny jest w odmianie pszenicy Sumai 3. Aktualnie poszukiwane są nowe źródła odporności

Cele projektu:

- Badanie odporności typu 1 (na infekcje pierwotną) i 2 (na rozprzestrzenianie się patogena w kłosie) na fuzariozę kłosów u wybranych genotypów pszenżyta ozimego w dwóch lokalizacjach z wykorzystaniem markerów fenotypowych.
- Fenotypowanie porażenia kłosów wybranych genotypów pszenżyta w doświadczeniach infekcyjnych w dodatkowych lokalizacjach oraz kolejne krzyżowania wsteczne i analiza molekularna mieszańców uzyskanych z przekrzyżowań.
- Ocena odporności na uszkodzenie ziarna (typ odporności 3) oraz określenie redukcji parametrów struktury plonu w testowanych genotypach po inokulacji (typ odporności 4).

— Określenie odporności typu 5, kumulacja/degradacja toksyn.

Materiał badawczy stanowiły: pszenżyto ozime o zróżnicowanym podłożu genetycznym – **temat badawczy 1, 2, 3 i 4**; genotypy pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy – **temat badawczy nr 1 i 2**; formy przekrzyżowań wstecznych (BC₄ i BC₅; linie pszenżyta ozimego z genem *Fhb1*; linie DH pszenżyta z genami odporności na rdzę brunatną oraz wysokoplonujące odmiany pszenżyta.

Badanie odporności genotypów pszenżyta wykonano metodą inokulacji (oprysk) zawiesiną zarodników *Fusarium culmorum* (typ odporności 1 i 2) w dwóch lokalizacjach oraz metodą inokulacji punktowej (typ odporności 2) w IHAR Radzików – **temat badawczy nr 1**; identyfikacja genu odporności *Fhb1* warunkującego podwyższoną odporność na fuzariozę w uzyskanych mieszańcach BC₄ i BC₅ z wykorzystaniem markera *UMN_10* oraz na jego podstawie nowo zaprojektowanych starterów – **temat badawczy nr 2**; analiza odporności typu 3 (na uszkodzenie ziarniaków przez *Fusarium*) poprzez wizualną ocenę proporcji ziarniaków uszkodzonych przez *Fusarium* (FDK) i ziarniaków wyglądających zdrowo (HLK). Analiza redukcji komponentów struktury plonu ziarna u badanych genotypów po inokulacji: masy ziarna z kłosa (MZK), liczby ziarniaków

w kłosie (LZK), masy tysiąca ziarniaków (MTZ) w odniesieniu do prób kontrolnych (typ odporności 4) - **temat badawczy nr 3**; analiza odporności typu 5 na kumulację/degradację toksyn fuzaryjnych w ziarniakach u genotypów o najwyższej odporności i najmniejszej obniżce plonu. Zawartość trichotecenów z grupy B analizowano przy wykorzystaniu chromatografii gazowej (Góral i in. 2019), zearalenonu (za pomocą ilościowego testu ELISA). Zawartości ergosterolu oznaczano metodą wysokosprawną chromatografią cieczową (Perkowski i in. 2007, 2008) - **temat badawczy nr 4**.

Wyniki:

Temat badawczy nr 1: Doświadczenia infekcyjne w IHAR-PIB Radzików i IGR PAN Poznań z genotypami pszenżyta ozimego.

Porażenie kłosów przez *Fusarium* w teście inokulacyjnym polowym w obu lokalizacjach było zróżnicowane. W lokalizacji Poznań-Cerekwica było niskie, pomimo zastosowania mikrozaszania. Wynikało to z niewielkich opadów w okresie kwitnienia pszenżyta w tej lokalizacji. Średnie porażenie kłosów (IFK%) u pszenżyta było wyższe w Radzikowie (11,6%) niż w Poznaniu (3,1%). Najniższe porażenie (<2%) obserwowano u trzech genotypów. Współczynnik korelacji pomiędzy indeksami fuzariozy kłosów w obu lokalizacjach był istotny, jednakże niski. Analiza składowych głównych wykazuje, że większość genotypów wybranych w latach poprzednich wykazała oporność na porażenie kłosa w obu środowiskach. Najwyższą odporność wszystkich badanych typów odporności stwierdzono u 7 genotypów.

Dodatkowo w lokalizacji Poznań-Cerekwica w warunkach polowych testowano 40 genotypów pszenżyta z introgresją chromatyny *Triticum monococcum* i substytucjami genomu D pszenicy. Oceniając porażenie kłosa (%IFK) u tych linii stwierdzono średnio dla wszystkich linii niewielkie porażenie poniżej 3%. Badano również dla tych genotypów w doświadczeniach w IHAR Radzików odporność typu I i II. Najwyższą odporność wszystkich badanych typów, na poziomie linii z genem *Fhb1*, wykazały dwie linie, a u jednej z nich stwierdzono również bardzo niskie porażenie w doświadczeniu inokulacyjnym w Poznaniu.

Temat badawczy nr 2: Doświadczenia infekcyjne w dodatkowych lokalizacjach. Krzyżowanie wybranych genotypów pszenżyta, rozmnażanie uzyskanych mieszańców

Inokulację kłosów pszenżyta 3 szczepami

F. culmorum przeprowadzono w dodatkowych lokalizacjach (Dębina, Borowo, Małyszyn, Szelejewo). Objawy fuzariozy kłosów wystąpiły jedynie w Dębnie. Indeksy fuzariozy kłosów z Radzikowa, Poznania oraz z Dębiny korelowały istotnie, jednakże miały niskie wartości. Zidentyfikowano 8 genotypów pszenżyta ozimego o niskiej podatności na fuzariozę kłosów, których reakcja była stabilna w 3 lokalizacjach doświadczalnych.

W 2019 roku wykonano przekrzyżowania wsteczne form BC₃i BC₄ (z odmianą Twingo lub linią MAH 7314). Uzyskano 116 ziarniaków pokolenia BC₄ oraz 546 ziarniaków pokolenia BC₅. Spośród nich 3 formy BC₄ oraz 24 formy BC₅ charakteryzowały się obecnością genu *Fhb1*.

W 2019 roku dla poszerzenia zmienności pszenżyta wykorzystano również przeanalizowane pod kątem obecności genu *Fhb1* linie pszenżyta ozimego z genem (*Fhb1*), linie DH pszenżyta z genami odporności na rdzę brunatną oraz żółtą oraz wysokoplonujące linie pszenżyta ozimego. Linie stanowiące komponenty krzyżówkowe. W wyniku krzyżowań uzyskano 1407 ziarniaków.

Temat badawczy nr 3: Analiza zebranego materiału pod kątem oceny odporności na uszkodzenie ziarniaków (typ odporności 3)

W lokalizacji Poznań stwierdzono niewielkie porażenie ziarna (średnio poniżej 3% FDK). W lokalizacji Radzików średnie porażenie było wyższe i wyniosło około 5% FDK. U siedmiu genotypów pszenżyta odnotowano niewielkie (do 1%) porażenie ziarna. Natomiast u 7 genotypów stwierdzono porażenie ziarna powyżej 5%.

Obserwowano różnice w wartościach parametrów struktury plonu dla genotypów pszenżyta inokulowanego szczepami *F. culmorum*. Średnio redukcja masy ziarna z kłosa wyniosła 7,0%, liczby ziarniaków w kłosie około 5% a redukcja masy tysiąca ziarniaków wyniosła średnio poniżej 5%. Redukcja parametrów struktury plonu korelowała istotnie z indeksem fuzariozy kłosów.

Najniższą redukcję plonu w połączeniu z niewielkim porażeniem kłosa i uszkodzeniem ziarniaków odnotowano u 9 genotypów pszenżyta.

Temat badawczy nr 4: Analiza zawartości toksyn fuzaryjnych w ziarnie, kumulacja/degradacja toksyn (typ odporności 5)

Badano akumulację toksyn fuzaryjnych: deoksynivalenolu (DON) i pochodnych acetylowych, niwalenolu (NIV) oraz zearalenonu (ZEN) w ziarnie genotypów pszenżyta ozimego po inokulacji trzema szczepami *F. culmorum*. We wszystkich próbach

stwierdzono obecność DON i NIV. Brak było pochodnej 15Ac-DON. Pochodna 3Ac-DON występowała w ilościach śladowych.

Zawartość trichotecenów w ziarnie pszenżyta była niska i wynosiła średnio - DON 0,660 mg/kg, NIV - 0,270 mg/kg, suma trichotecenów - 0,929 mg/kg.

Zawartość trichotecenów w ziarnie pszenżyta w Poznaniu była kilkakrotnie wyższa (1,584mg/kg) niż w Radzikowie (0,274mg/kg), natomiast zawartość zearalenonu była bardzo niska i tylko w jednej próbie ziarna była powyżej limitu detekcji.

Stwierdzono niską średnio (3,13mg/kg) zawartość ergosterolu (miernika ilości grzybni) w ziarnie pszenżyta.

Porażenie kłosa i porażenie ziarna korelowały istotnie z zawartością deoksyniwalenolu, niwale-nolu i sumaryczną zawartością trichotecenów B. Najwyższe współczynniki korelacji odnotowano pomiędzy liczbą porażonego ziarna a zawartościami trichotecenów B w ziarnie.

Podsumowanie:

Analiza wieloczynnikowa pozwoliła na identyfikację 8 genotypów łączących odporności różnych typów.

Literatura

- 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.
- Perkowski, J., Buśko, M., Stuper, K., Kostecki, M., Matysiak, A., Sz wajkowska-Michałek, L. (2008). Concentration of ergosterol in small-grained naturally contaminated and inoculated cereals. *Biologia* 63(4): 542–547.
- Perkowski, J., Wiwart, M., Buśko, M., Laskowska, M., Berthiller, A., Kandler, S., Krska, R. (2007). *Fusarium* toxins and total fungal biomass indicators in naturally contaminated wheat samples from northeastern Poland in 2003. *Food Additiv. Contam.* 24(11): 1292–1298.

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

Anna Linkiewicz ✉, Krzysztof Michalski, Sławomir Sowa

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
✉ e-mail: a.linkiewicz@ihar.edu.pl, tel. 22 7334517

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi Dz. U. poz. 1170. z późn. zmianami; Zadanie nr 13.

Słowa kluczowe: Crispr/Cas9, mutageneza, Triticale

W ramach tematu badawczego nr 1 prace obejmowały doświadczenia nad transformacją pszenżyta przy użyciu konstruktyw Crispr/Cas9 z sgRNA skierowanymi wobec 2 genów potencjalnie związanych z porastaniem pszenżyta. Wykonano transformację roślin pszenżyta konstruktywami z sgRNA1A, sgRNA1B, sgRNA2A, sgRNA2B i sgRNA6A dla genów PP2A i ABA8'OH, otrzymano regenerację roślin *in vitro* i uzyskano rośliny pokolenia T0. Konstrukty Crispr/Cas9 różniły się sekwencjami sgRNA do indukowania mutacji w genomie pszenżyta oraz zastosowanymi promotorami. Nawet w przypadku zastosowania wszystkich znanych zasad projektowania sgRNA, specyficzność i aktywność tych cząsteczek w dużym stopniu nie jest przewidywalna, dlatego polecane jest zaprojektowanie kilku różnych sekwencji sgRNA wobec genu, który zamierzamy edytować i eksperymentalne sprawdzenie ich skuteczności. W wyniku transformacji około 100 niedojrzałych zarodków pszenżyta na kombinację dla genów PP2A i ABA8'OH, uzyskano 67 roślin T0 odpornych na czynnik selekcyjny fosfinitrycynę. Wyselekcjonowane rośliny zostały przesadzone do szklarni w celu uzyskania pokolenia T1.

Równolegle, w ramach tematu badawczego 2 sprawdzano efektywności różnego typu konstruktyw do wywoływania mutacji w komórkach

pszenżyta.

Przejsiowa ekspresja konstruktów w wyniku transfekcji protoplastów z zastosowaniem PEG, stanowi metodę stosowaną do testowania konstruktyw wykorzystywanych do mutagenezy miejscowo-specyficznej w roślinach (Cermak *i in.*, 2015; Liang *i in.*, 2014; Shan *i in.*, 2014; Woo *i in.*, 2015). Poszczególne typy wektorów były testowane w układzie ekspresji przejściowej na komórkach protoplastów pszenżyta. W przypadku niskiej wydajności transfekcji protoplastów monitorowanej poprzez ekspresję genu markerowego (GFP), alternatywną metodą sprawdzenia konstruktyw była ich ocena poprzez mikrowstrzelanie do tkanek jęczmienia (Budhagatapalli, 2016) i ocena ekspresji w systemie transformacji przejściowej roślin metodą strzelby genowej, we współpracy z IPK Gatersleben. Analizy edytowanych sekwencji na poziomie DNA potwierdziły wystąpienie zmian typu delekcji w przewidywanych regionach genów PP2A i ABA8'OH u pszenżyta. Potwierdzono znaczące zwiększenie efektywności edycji genów dzięki zastosowaniu dodatkowych sekwencji Trex2 w wektorach stosowanych do transformacji. Generowane zmiany obserwowane w komórkach protoplastów pszenżyta mają charakter delekcji 3 do kilkunastonukleotydowych.

Trzeci realizowany temat badawczy dotyczył detekcji zmian mutacyjnych, określenie rodzaju i liczby zmian w poszczególnych edytowanych loci poprzez analizy DNA.

Wykrycie mutacji uzyskanych w wyniku działania miejscowo-specyficznych nukleaz zostaje wyzwaniem, szczególnie u roślin poliploidalnych (Wang i in., 2014; 2018). Efektywna metoda wykrywania mutacji jest szczególnie przydatna kiedy spodziewamy się niskiej wydajności w generowaniu mutacji lub kiedy badamy dużą populację (Liang i in., 2018). Ze względu na ograniczone możliwości wykrycia zmian mutacyjnych typu SNP w roślinach T0 pszenżyta poprzez zastosowanie endonukleazy T7 wykorzystano sekwencjonowanie NGS w celu określenia typu i częstości zmian mutacyjnych dla wybranych 19 roślin T0. Analiza sekwencji wykazała 9 zmian mutacyjnych, najczęściej o charakterze SNP lub delecji 1 lub 2 nukleotydowych o dużo niższym nasileniu niż w porównywanych próbach uzyskanych w wyniku transfekcji protoplastów pszenżyta konstruktami zawierającymi dodatkowy element- eksonukleazę TREX2.

Literatura

Budhagatapalli, N., Schedel, S., Gurushidze, M. *et al.* (2016). A simple test for the cleavage activity of custo-

mized endonucleases in plants. *Plant Methods* **12**, 18 doi:10.1186/s13007-016-0118-6.

Čermák, T., Baltes, N.J., Čegan, R. *et al.* (2015). High-frequency, precise modification of the tomato genome. *Genome Biol* **16**, 232 doi:10.1186/s13059-015-0796-9

Liang, Z., Zhang, K., Chen, K., Gao, C. (2014). Targeted Mutagenesis in *Zea mays* Using TALENs and the CRISPR/Cas System. *Journal of Genetics and Genomics* **41** (2):63–68.

Michalski, K., Linkiewicz, A.M. (2019). Projektowanie, konstrukcja i ocena nukleaz CRISPR/Cas9 w celu edycji genów związanych z porastaniem przedzmiwnym pszenżyta. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin* nr 285, str. 91.

Shan, Q., Wang, Y., Li, J. *et al.* (2014). Genome editing in rice and wheat using the CRISPR/Cas system. *Nat Protoc* **9**, 2395–2410, doi:10.1038/nprot.2014.157

Woo, J., Kim, J., Kwon, S. *et al.* (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* **33**, 1162–1164, doi:10.1038/nbt.3389

Wang, Y., Cheng, X., Shan, Q., Zhang, Y., Liu, J., Gao, C., Qiu, J.L. (2014). Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nat Biotechnol* **32**:947 — 951.

Wang, W., Simmonds, J., Pan, Q. *et al.* (2018). *Theor Appl Genet* **131**: 2463. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3166-7>

Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone

Development of new genetic sources of triticale based on wide crosses

Justyna Leśniowska-Nowak✉, Michał Nowak, Magdalena Sozoniuk

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie
✉ 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.802.8.2019, Zadanie nr 17.

Słowa kluczowe: dwarfism, triticale, wide crossing, yield components

Celem zadania 1 było uzyskanie mieszańców wstecznych (BC_2) w wyniku krzyżowania roślin pokolenia BC_1 otrzymanych z krzyżowania kocięnców z pszenicą i pszenżytem oraz jednokrotnego krzyżowania z odmianą uprawną.

Wyniki:

Wszystkie krzyżowane kłosa poddane były ocenie pod kątem liczby zawiązanych ziarniaków oraz wykastrowanych kwiatów. Na podstawie tych danych obliczona została zdolność kombinacyjna poszczególnych form wyrażona w%.

Dla każdego mieszańca oddalonego obliczono zdolność kombinacyjną w krzyżowaniach wstecznych z pszenżytem wg wzoru: liczba zawiązanych ziarniaków/liczba wykastrowanych kwiatów*100. Zdolność kombinacyjna wahała się od 0% do 64% dla mieszańców oddalonych.

Obliczono również zdolność kombinacyjną dla wszystkich odmian i rodów pszenżyta, które

były wykorzystywane w krzyżowaniu mieszańców. Wahała się ona od 13% dla odmiany Baltiko do 3% dla Bokolo i Sorrento (Rys. 1).

W ramach zadania obliczono również zdolność kombinacyjną dla mieszańców pokolenia BC_1 . Wahała się ona od 64% dla mieszańca (Leontino x Ae78) x Baltiko do 0% dla mieszańców (Ae156 x Tomko) x Tomko i (Tomko x Ae89) x Meloman (Rys. 2).

Wnioski:

1. Zdolność kombinacyjna mieszańców wstecznych różniła się w zależności od kombinacji.
2. 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.



Rys. 1. Zdolność kombinacyjne odmian i rodów pszenżyta w krzyżowaniu z mieszańcami oddalonymi pszenżyta.



Rys.2. Zdolność kombinacyjna dla mieszańców oddalonych pszenżyta w krzyżowaniu wstecznym.

Celem zadania 2 była analiza wysokości oraz podstawowych elementów plonu mieszańców oddalonych z kowieńcami

Analiza statystyczna wysokości roślin mieszańcowych i form rodzicielskich wykazała, że forma karłowa 84A/1 była istotnie niższa zarówno od mieszańców jak i wysokiego komponentu rodzicielskiego. Mieszańce miały pośrednią wysokość istotnie niższą od rodu 541 i istotnie wyższą od rodu 84A/1. Analiza długości kłosa głównego wykazała, że kłos karłowej formy był istotnie krótszy a niżeli kłos form mieszańcowych i rodu wysokiego. Pod względem długości kłosa mieszańców i roślin formy 541 nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic. Wykazano natomiast, że liczba kłosek w kłosie głównym jest istotnie wyższa jedynie u form wysokich w porównaniu z mieszańcami i rodem karłowym. Najwyższą liczbę ziarniaków w kłosie miały rośliny mieszańcowe. Liczba ta była istotnie wyższa od liczby ziarniaków u matecznej formy 541. Nie różniła się natomiast od formy ojcowskiej. Mieszańce F_2 charakteryzowały się ponadto masą ziarniaków z kłosa, która była istotnie wyższa od obu form rodzicielskich. Pod względem zbitości kłosa oraz MTZ nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy mieszańcami a formami rodzicielskimi. Wykazano natomiast, że płodność kłosa w mieszańcach była istotnie wyższa w porównaniu z rodem 541.

Wnioski:

1. Formy mieszańcowe wykazywały istotnie wyższą masę ziarniaków z kłosa w porównaniu do form rodzicielskich
 2. Krzyżowanie nie powodowało redukcji ani wzrostu MTZ w pokoleniu F_2
 3. Mieszańce charakteryzowały się istotnie wyższą liczbą ziarniaków z kłosa głównego
- Celem zadania 3 było zwiększenie

wydajności uzyskiwania mieszańców międzyrodzajowych pszenicy i pszenżyta z kowieńcami poprzez zastosowanie techniki ratowania zarodków.

Wyniki:

Do rozwoju w kulturach in vitro przekazano 10 zarodków (Tab. 1). Pozostałe ziarniaki zostały wysiane bezpośrednio do ziemi. Spośród wyłożonych 10 zarodków uzyskano 5 roślin Daje to wydajność na poziomie 50%.

Wnioski:

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

Cel zadania 4.

Celem tematu była konwersja markerów sprzężonych z genem karłowatości zmapowanym na chromosomie 5R pszenżyta w populacji CZR876/01×CZR891/01

Wyniki:

Spośród rekordów uzyskanych dla testowanych markerów wybrano sekwencję XM_020326708.1 pochodzącą z *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii*, w obrębie której algorytmy megablast oraz blastn zidentyfikowały cztery markery DArT (ryc. 1.). W obrębie początkowej części sekwencji zlokalizowano marker 3045942, w obrębie środkowej części sekwencji zlokalizowano trzy markery (3604723, 4344398 oraz 3610345), które były skupione obok siebie.

Do dalszej analizy wybrano markery 4344398, 3604723 oraz 3610345. W celu przedłużenia ich sekwencji zaprojektowano 3 pary starterów amplifikujące fragmenty sekwencji, w obrębie których zidentyfikowano w/w markery DArT.

Na żelu agarozowym nie stwierdzono różnic w długości produktów, dlatego amplikony

Tabela 1

Kombinacje krzyżówkowe przekazane do Embryo Rescue.

Lp.	Kombinacja z pszenżytem	L. zarodków	L. roślin
1	(54×Bokolo)/1 × Bokolo × Bokolo	1	0
2	(54×Bokolo)/2 × Bokolo × Bokolo	1	0
3	(Ae125×Lombardo)/1 × Lombardo × Lombardo	1	0
4	(Ae128×Lombardo)/1 × Alzo × Lombardo	1	1
5	(Ae52×Baltiko)/1 × Baltiko × Baltiko	1	1
6	(Ae52×Baltiko)/4 × Baltiko × Baltiko	1	0
7	(Leontino×Ae78) × Baltiko × Baltiko	1	1
8	(Tomko×Ae87)/3 × Tomko × Meloman	1	1
9	[(Algoso×Ae102) × Algoso]/1 × Leontino	1	0
10	[(Meloman×Ae83) × Sekret]/1 × Sorento	1	1
		10	5

poddano sekwencjonowaniu w celu identyfikacji potencjalnych SNP.

Przeanalizowano w następnej kolejności zestawienia wielosekwencyjne wygenerowane przez program ClustalOmega pochodzące z porównania sekwencji uzyskanych dla form rodzicielskich (niski x wysoki) przy pomocy zaprojektowanych par starterów. Przeprowadzono analizę każdego z otrzymanych zestawień w celu identyfikacji potencjalnych miejsc pozwalających odróżnić formę wysoką od niskiej. Ze szczególnym uwzględnieniem przeanalizowano nukleotydy zdegenerowane (kod IUPAC). Nie znaleziono miejsc jednoznacznie różniących formę niską od wysokiej. Wykryte różnice na początkach analizowanych zestawień uznano za błędy powstałe podczas sekwencjonowania.

W celu ujawnienia potencjalnych błędów sekwencjonowania, które mogłyby maskować SNP odróżniające formę niską od wysokiej

zestawiono razem trzy sekwencje wygenerowane dla formy niskiej, trzy sekwencje wygenerowane dla formy wysokiej oraz wszystkie sześć sekwencji. Pozwoliło to na zidentyfikowanie dwóch potencjalnych SNP w obrębie analizowanych sekwencji.

Wnioski:

1. Uzyskane markery DArT sprzężone z cechą znajdują się w obrębie sekwencji oznaczonej *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii* receptor-like protein 12 (LOC109767969), transcript variant X2.
2. Amplifikacja PCR z wykorzystaniem starterów specyficznych dla sekwencji markerów sprzężonych z cechą karłowatości nie wykazała różnic w długości produktów.
3. Uzyskane SNP różnicujące badane sekwencje mogą wskazywać na potencjalne różnice specyficzne dla analizowanych form różniących się wysokością.

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

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

Michał Nowak ¹✉, Piotr T. Bednarek ², Justyna Leśniowska-Nowak ¹,
Magdalena Sozoniuk ¹, Magdalena Kawęcka ¹, Karolina Różaniecka ¹

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

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

✉ 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 decyzji HOR.hn.802.8.2019, Zadanie nr 82.

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

Konwersja wybranych markerów DArTseq na markery sekwencyjnie specyficzne.

Celem tematu badawczego w roku 2019 była konwersja na markery specyficzne wybranych markerów DArTseq, zlokalizowanych na chromosomach, które okazały się na wcześniejszych etapach realizacji projektu w największym stopniu przydatne w wyborze genotypów do krzyżowań i predykcji wystąpienia heterozji.

Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników analizy markerowej do dalszych prac wytypowano chromosomy 5A i 2B dla których w roku 2018 uzyskano najwyższe wartości współczynników MPH i BPH – odpowiednio 129% i 111% dla chromosomu 5A oraz 105% i 75% dla chromosomu 2B. W kolejnym etapie spośród markerów DArTseq zlokalizowanych na wybranych chromosomach wyselekcjonowano po 10, przyjmując założenie aby ich rozmieszczenie na chromosomie było równomierne. Wybrane markery zaprezentowano w tabeli 1.

W kolejnym etapie dla każdego z uzyskanych markerów zaprojektowano sekwencję specyficznych oligonukleotydów, pozwalających na wydłużenie sekwencji markerowej w obie strony, z wykorzystaniem sekwencjonowania Sangera. Uzyskane w ten sposób sekwencje stanowiły matrycę do projektowania sekwencyjnie specyficznych oligonukleotydów pozwalających na amplifikację sekwencji markerowej. Uzyskane

w wyniku konwersji markery poddawano walidacji. W przypadku gdy zaprojektowane oligonukleotydy nie dawały oczekiwanego rezultatu i występowała amplifikacja niespecyficzna, dokonano ponownego projektowania primerów i ponownej walidacji ich specyficzności. W ten sposób opracowano dla każdego z wyselekcjonowanych chromosomów po 5 par oligonukleotydów pozwalających na specyficzną amplifikację wybranych sekwencji markerowych.

Wnioski:

1. W wyniku przeprowadzonych prac zaprojektowano specyficzne oligonukleotydy pozwalające na specyficzną amplifikację fragmentów genomu, gdzie zlokalizowane były markery DArTseq użyteczne w predykcji wystąpienia zjawiska heterozji u pszenżyta. Opracowane markery molekularne muszą zostać poddane walidacji na szerszej puli materiału roślinnego. W przypadku potwierdzenia ich przydatności stanowią one wartościowe narzędzie w selekcji materiałów hodowlanych pszenżyta w kierunku zwiększenia prawdopodobieństwa wystąpienia efektu heterozji w pokoleniu F_1 .

Krzyżowanie wybranych genotypów, ocena mieszańców F_1 i oszacowanie efektu heterozji.

Celem tematu badawczego w roku 2019 było uzyskanie drugiej serii mieszańców F_1 na drodze krzyżowania ze sobą genotypów

charakteryzujących się największym zróżnicowaniem genetycznym, oszacowanym na podstawie analizy markerów DNA zlokalizowanych na poszczególnych chromosomach pszenżyta, dla potwierdzenia poprawności identyfikacji markerów pozwalających na najskuteczniejszą predykcję wystąpienia efektu heterozji.

W wyniku realizacji zadania uzyskano ziarniaki mieszańcowe F_1 dla 21 kombinacji krzyżówkowych wykonanych według uprzednio opracowanego schematu. Listę uzyskanych kombinacji przedstawiono w tabeli 2. Po osiągnięciu dojrzałości pełnej zebrano ziarniaki mieszańcowe z przeznaczeniem do wysiewu na sezon wegetacyjny 2019/2020.

Wnioski:

Celem zadania w roku 2019 było uzyskanie ziarniaków mieszańcowych i ich wysiew w warunkach doświadczenia polowego z założeniem oszacowania efektu heterozji w pokoleniu F_1 . Podjęte prace umożliwiły uzyskanie kombinacji krzyżówkowych zgodnie z założeniami przyjętymi w projekcie. Wnioskowanie na podstawie uzyskanych wyników możliwe będzie po uzyskaniu w roku 2020 końcowych rezultatów oceny plonowania form rodzicielskich i mieszańcowych.

Tabela 2

Kombinacje krzyżówkowe uzyskane w wyniku realizacji zadania 2 w roku 2019.

Lp.	Chromosom	Kombinacja krzyżówkowa
1	1A	BOH_2207-3 × DC 07064-16
2	1B	DL 678/12 × DANKO_12
3	1R	cD 175/08 × DS_4211/11
4	2A	L203 × DL 643/09
5	2B	B210 × DANKO_11
6	2R	DL 593/07 × DD_333/09
7	3A	CT 10240-48 × LAD_6/07
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 × L207
16	6A	BOH_1684-2 × LAD 21/11
17	6B	DC_08220-4 × DANKO_8
18	6R	B263 × CT 10104-74
19	7A	BOH_2039-2 × CT 08221/08
20	7B	B47 × DL_593/11
21	7R	DC 07004-4 × DD_293/11

Tabela 1

Markery DARtseq zlokalizowane na chromosomach 5A oraz 2B wyselekcjonowane do dalszych projektowania markerów sekwencyjnie specyficznych.

Lp.	Chromosom	Marker DARtseq	Sekwencja
1	5A	8515582	TGCAGCAGCGACAGCCGCGGGAGCCCCG
2		4218038	TGCAGATGGGTGGTGGGGAGTAGCGGTTGCGGTATCCG
3		4560236	TGCAGCTTCTCCGTGTTGGGCGCCTCTTCGCTCTCGCCGCCG
4		8523773	TGCAGGAAGCGGAGCTGGTGGGCGGCAGCCG
5		10497547	TGCAGCAGCCGACCACGGCCATGCTCGAGAAGCTCGTCTCCG
6		4205409	TGCAGCGTGACCCGCTGTTGGCAGTACCATCTGTGATCTGGAGAGCCG
7		4342189	TGCAGTCTCACCTTGCCGCCTGTGAACCGCCCCG
8		8539016	TGCAGATCGTTCCTCAGCGTCGAGCCACCAGCGACGCCCG
9		10501598	TGCAGGTGGGAGGCGCAATGGGAGGCCGACACGCGCCCCCTCACCCCCG
10		14476136	TGCAGGCTGGATACATGCATGTGGACACAGCCACGGCCACAGCTCCCCG
11	2B	8517354	TGCAGGGCACGGTGCGGCAGGTCCCCG
12		16357840	TGCAGCTGAGCTCGGTCATGCCG
13		3616542	TGCAGACCTGGGGTGAGGAAGTCCAGACGATGTAATTATCCG
14		4346951	TGCAGCAGGACGTTGTGGCTACGGATGTAAGCCCCG
15		4572122	TGCAGAGAGAGGAACAAGGCCCGGAGGAGGGGGCTTCAGTCTCCG
16		4341697	TGCAGCAGGACGCCGCGGGAGGCCGAGGCCG
17		8518632	TGCAGAAAATAGCATAACGCGGCCACCATGGCTACCAGGGCGATGCACCG
18		4360372	TGCAGAATCGCCAGATTGGAGCCCCG
19		4557699	TGCAGCCATGGCAAAGTAAGGTGACTGCTGCTGCCCCG
20		4354962	TGCAGCTCCCATCGCCGACGACCG

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

Jerzy H. Czembor ✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
✉ 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 decyzji HOR.hn.802.3.2019, Zadanie nr 27.

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

Hodowla odpornościowa to jeden z głównych elementów IPM (Lamichhane i in., 2018). Straty w plonie jęczmienia jarego i ozimego powodowane przez mączniaka prawdziwego sięgają 30%. Dla jęczmienia jarego zidentyfikowano wiele genów odporności (Piechota i in., 2019). Recesywny gen *mlo* warunkuje odporność form jarych jęczmienia na wszystkie znane dotychczas patotypy *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, sprawcy mączniaka prawdziwego (Czembor i in., 2016a). Brak jest komercyjnych odmian jęczmienia ozimego, których odporność na mączniaka prawdziwego jest warunkowana tym genem (Czembor i in. 2016b). Do badań w prowadzonych w ramach Zadania 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 2019 to: (1) charakterystyka wielośrodkowa w szkółce polowej z linii F_6BC_2 z uwzględnieniem przezimowania, odporności na choroby i innych cech fizjologicznych (2) Ocena pokolenia F_5BC_2

w doświadczeniach poletkowych z uwzględnieniem potencjału plonowania, odporności na choroby i innych cech morfologicznych i fizjologicznych

W warunkach polowych oceniono wielośrodkowo 200 linii wyprowadzonych z siewek pojedynczych roślin należących do 4 populacji mieszańcowych o genotypie $mlo mlo$ pokolenia F_6BC_2 jęczmienia ozimego (po około 50 linii na populację). Homozygotyczność genotypu $mlo mlo$ określona została testem fitopatologicznym i markerami molekularnymi w roku poprzednim. Populacje uzyskano na drodze krzyżowań prostych a następnie wstecznych. W każdej z populacji jedna z form rodzicielskich była donorem genu *mlo* (forma sześciorzędowa BKH 735 oraz dwurzędowa linia 42). W okresie jesiennym 2018 roku założono doświadczenia wielośrodkowe. Układ doświadczeń: doświadczenie 1-powtórzeniowe; poletka 1-rzędkowe; co 10 poletko odmiany wzorcowe – odpowiednio odmiany rodzicielskie dla poszczególnych kombinacji mieszańcowych: BKH 735, Souleyka, Titus, L42, SU Vireni, Metaxa. Liczba wysianych ziaren w rzędzie – 10. W okresie wegetacji kontynuowano oceny rozpoczęte w okresie jesiennym: stan roślin przed zimą (1) oraz po zimie (2), odporność na choroby: mączniak prawdziwy (3), rdza karłowa (4), żółta karłowatość jęczmienia (5), ryńchosporioza (6), oznaczony zostanie termin kłoszenia (7) oraz wysokość roślin (8) (zgodnie z metodyką

COBORU).

Dodatkowo, materiały badane w warunkach polowych ponownie włączono do testu fitopatologicznego w warunkach kontrolowanych – zakażenia sztuczne izolatem mączniaka prawdziwego (Bgh 19-70 13-11-2019) wirulentnym w stosunku do genu warunkującego odporność na mączniaka w genotypie, do którego wprowadzany jest gen *mlo*.

Stan roślin przed zimą i wiosną wszystkich badanych linii oceniono jako dobry (oceny w zakresie 8 – 9). Linie były natomiast podatne lub bardzo podatne na rdzę karłową (duże zrżnicowanie stwierdzono w Radzikowie i Szelejewie). W Wiatrowie porażenie *Puccinia hordei* było niskie. Średnio, podobnie jak w 2018 roku Linie pokolenia $F_6 BC_2$ należące do populacji (Titus \times BKH 735) \times Titus były w mniejszym stopniu porażone rdzą karłową w stosunku do pozostałych populacji. W żadnej z lokalizacji nie stwierdzono dużego nasilenia żółtej karłowatości jęczmienia i mączniakiem prawdziwym (jednak można było wydzielić grupę obiektów które oceniono na 6). Stwierdzono, że dla wczesności różnice pomiędzy liniami wynosiły ok. 10 dni w obrębie każdej populacji. Średnio w Radzikowie rośliny były niższe niż w Szelejewie, a różnice w obrębie populacji wynosiły od 10 cm do 20 cm. Stwierdzono bardzo duży zakres zmienności dla potencjalnego plonowania

Do doświadczeń poletkowych włączono 16 linii $F_5 BC_2 / F_6 BC_2$ jęczmienia ozimego, o genomie *mlo* określonym w ocenie fenotypowej i molekularnej - odpowiednio testem fitopatologicznym i markerami molekularnymi (wytypowane z grupy 35 linii na podstawie charakterystyki potencjału plonowania w doświadczeniu poletkowym prowadzonym w jednej lokalizacji – Radzikowie: 9 linii 6-rzędowych i 7 2-rzędowych).

W okresie wegetacji wykonano oceny (w skali stosowanej w COBORU): stan roślin przed zimą (1) oraz po zimie (2), porażenie przez choroby: mączniak prawdziwy (3), rdza karłowa (4), żółta karłowatość jęczmienia (5), rynchosporioza (6), oznaczony zostanie termin kłoszenia (7), wysokość roślin (8)

oraz plon (9). Na podstawie analiz statystycznych wykonanych za pomocą programu ADOWBLOK-(TP) wykazano istotne zróżnicowanie pomiędzy badanymi liniami w obrębie każdej populacji, oraz wskazano Linie charakteryzujące się wyższą wartością pod względem wybranej cechy od wzorca. Pod względem potencjału plonowania Linie były zbliżone do wzorców.

Należy podkreślić fakt, że kilkuletnia selekcja populacji mieszańcowych pod względem ważnych gospodarczo cech, wielośrodowiskowo w warunkach polowych oraz selekcja na mączniaka prawdziwego w warunkach kontrolowanych oraz wspomaganie tego procesu metodami molekularnymi umożliwia poszerzenie puli genowej jęczmienia ozimego i uzyskanie materiałów wyjściowych do hodowli nowych odmian odpornych na ważne pod względem gospodarczym choroby i o wysokiej plenności. (Czembor i in., 2016a, 2016b). 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)a. Wprowadzenie genu *mlo* do genomu jęczmienia ozimego. *Progress in Plant Protection* 56 (3): 379–387.
- Czembor, J. H., Pietrusińska, A., Czembor, H. (2016)b. 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.
- Lamichhane, J.R., Arseniuk, E., Boonekamp, P., Czembor, J.H. i in. (2018). Advocating a need for suitable breeding approaches to boost integrated pest management: a European perspective. *Pest Management Science* 74:1219–1227
- Piechota, U., Czembor, P., Słowacki, P., Czembor, J.H. (2019). Identifying a novel powdery mildew resistance gene in a barley landrace from Morocco. *J. Appl. Genet.* 60: 243–254.

Molekularna charakterystyka wpływu elementów mobilnych na zmienność genetyczną w zbożowych kulturach *in vitro*

Molecular characterization of the impact of transposable elements on genetic variation in cereals tissue cultures

Renata Orłowska ✉, Piotr Tomasz Bednarek, Sławomir Bany

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
✉ e-mail: r.orłowska@ihar.edu.pl, tel. 22 7334538

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.802.3.2019 Zadanie nr 89.

Słowa kluczowe: jęczmień, kultury tkankowe, MSTD, retrotranspozony, transpozony DNA

Roślinne kultury tkankowe są środowiskiem stresogennym, mogącym być źródłem zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* (Machczyńska i in. 2015, Orłowska i in. 2016) oraz zmienności stabilnie dziedzicznej w kolejnych cyklach generatywnych (Han i in. 2018). Zmienność ta na poziomie DNA może być wynikiem zmian w jego metylacji lub sekwencji, te ostatnie mogą być powodowane np. aktywacją elementów mobilnych, które w warunkach stresu mogą ulegać migracji (Hirochika i in. 1995). Elementy mobilne (EM) to fragmenty DNA, które posiadają zdolność przemieszczania się w genomie, gdy w wyniku czynników biotycznych lub abiotycznych zajdą procesy umożliwiające ich aktywację. Takim czynnikiem może być demetylacja DNA, zachodząca podczas regeneracji roślin w kulturach *in vitro*. U zbóż zidentyfikowano wiele EM a ich klasyfikacja jest złożona. Dane literaturowe sugerują, że nie wszystkie EM zidentyfikowane w genomie rośliny muszą być zawsze aktywne (Ishizaki i in. 2005). Wydaje się, że aktywacja, niektórych nadrodziny może zależeć od rodzaju stresu, jakiemu poddawane są rośliny.

Znanych jest wiele technik markerowych do analizy zmienności genetycznej i metylacyjnej, wśród nich są takie jak MSAP czy metAFLP, a niektóre z nich np. IRAP, REMAP, SSAP czy MSTD umożliwiają badanie aktywności EM. Metodą zaproponowaną w tym zadaniu jest wariant MSTD (Methyl-Sensitive Transposon Display) oparty na technice metAFLP. Taka kompilacja metod pozwoli na powiązanie zjawisk

dotyczących zmiany metylacji DNA z aktywnością poszczególnych nadrodziny EM w warunkach regeneracji roślin w kulturach *in vitro*. Celem całego zadania jest badanie poziomu zmienności indukowanej *in vitro* oraz dziedzicznej w cyklu generatywnym będącej wynikiem aktywacji EM, następnie określenie, jakie nadrodziny EM mogą być aktywne u jęczmienia, jako rośliny modelowej, oraz zbadanie, w jakim stopniu zmiany powodowane migracją poszczególnych EM są powiązane ze zmianami metylacji genomowego DNA zachodzącymi podczas regeneracji roślin metodą kultur *in vitro*.

W roku sprawozdawczym 2019 zaplanowano do wykonania cztery tematy badawcze z następującymi celami:

- Zliczanie autoradiogramów, przygotowanie matryc zerojedynkowych i określenie poziomu zmian genetycznych oraz metylacyjnych dla DNA regenerantów jęczmienia.
- Uzyskanie genomowego DNA z potomstwa generatywnego regenerantów jęczmienia do analiz technikami RP-HPLC oraz MSTD.
- Oszacowanie poziomu globalnej metylacji DNA dla 90 roślin potomnych regenerantów jęczmienia przy użyciu techniki RP-HPLC.
- Przygotowanie preparatów DNA z potomstwa generatywnego regenerantów do analiz techniką MSTD oraz wstępne sprawdzenie preparatów.

Wykonano rozdziały MSTD dla 80 regenerantów jęczmienia, oraz dla odpowiadających im roślin donorowych (4 rośliny) w dwóch układach

enzymów restrykcyjnych – *Acc65I/MseI* (A) i *KpnI/MseI* (K) wykorzystując 10 par selektywnych starterów. Amplifikowano w sumie 384 fragmenty DNA (od 24 do 68) w obydwu układach enzymów restrykcyjnych, średnio każda para starterów powieliała 38 fragmentów. Dla układu enzymów restrykcyjnych *KpnI/MseI* uzyskano 209 polimorficznych fragmentów DNA odpowiadających zmianom w sekwencji DNA, zaś dla *Acc65I/MseI* – 211, te dane odzwierciedlają zarówno zmiany w sekwencji jak i metylacji DNA. Różnice wynikające z zestawienia ze sobą profili uzyskiwanych dla *KpnI/MseI* i *Acc65I/MseI* skutkowały wyekstrahowaniem informacji dotyczących tylko zmian w metylacji DNA. Poziom polimorfizmu określony jako procent polimorficznych loci (%P) wynosił 27,02% dla układu enzymów *KpnI/MseI* oraz 33,72% dla układu enzymów *Acc65I/MseI*.

Analiza skupień oparta na danych molekularnych odnoszących się zarówno do wyników uzyskanych z cięcia DNA enzymami *KpnI/MseI* jak i *Acc65I/MseI* wykazała grupowanie się danych ze względu na pochodzenie regenerantów (skupianie się regenerantów pochodzących od jednej rośliny donorowej). W przypadku danych dla układu enzymów *Acc65I/MseI* rośliny donorowe JDH70 i JDH72 tworzyły jedną grupę, zaś JDH68 i JDH69 nie były razem zgrupowane, natomiast były umiejscowione w jednej grupie ze swoimi regenerantami (rys. 1). Podobny układ grupowania danych obserwowano dla wyników uzyskanych z cięcia DNA enzymami *KpnI/MseI*.

Bazując na danych molekularnych określono całkowity poziom zmienności indukowanej w kulturze *in vitro* (TTCIV), dla danych odnoszących się do retrotranspozonów oraz transpozonów DNA. Wartości te wynosiły odpowiednio 39% dla transpozonów DNA oraz ok. 14% dla retrotranspozonów. ANOVA wykazała istotne różnice między w/w typami elementów mobilnych. Ponadto analiza danych wykonana w obrębie typów elementów mobilnych wykazała istotne różnice między poszczególnymi charakterystykami metAFLP. Wśród charakterystyk metAFLP dla obydwu typów elementów mobilnych najwyższe wartości odnotowano dla zmienności sekwencyjnej (SV), natomiast zmiany odnoszące się do metylacji DNA były czterokrotnie niższe. Zarówno dla retrotranspozonów jak i transpozonów DNA zaobserwowano przewagę demetylacji (DMV) nad zdarzeniami odnoszącymi się do metylacji *de novo* (DNMV) (tab. 1).

Pozyskano DNA z 90 roślin potomnych regenerantów jęczmienia genotypu 2dh/8. Jakość DNA wyizolowanego z liści sprawdzono w żelu

agarozowym. Uzyskano preparaty DNA o odpowiedniej czystości i integralności do dalszych prac badawczych.

Zbadano poziom globalnej metylacji DNA u 90 roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy z czterech różnych roślin donorowych (D68, D69, D70, D72). Analiza całkowitej metylacji cytydyny (5mdC) genomowego DNA wykonana techniką RP-HPLC wykazała, że średnio około 20% cytydyny uległo metylacji.

Pozyskany DNA przygotowano odpowiednio do analiz techniką MSTD. Wstępna faza analiz molekularnych obejmowała rozdziały elektroforetyczne preparatów DNA z dwoma parami selektywnych starterów do reakcji PCR: BARE-1-5980/CpG-GCA oraz BAGY-1-C2043/CpXPG-AGA. W sumie amplifikowano 60 fragmentów DNA dla badanych par starterów. Analiza danych będzie możliwa po wykonaniu całości tematu badawczego w przyszłym roku, gdy analizy zostaną rozszerzone o kilka kolejnych par starterów.

Metoda MSTD oparta na założeniach techniki metAFLP pozwoliła oszacować zmiany genetyczne i epigenetyczne dla badanych regenerantów związane z obecnością różnych elementów mobilnych w genomie.

Badane typy elementów mobilnych różniły się między sobą w ramach całkowitej zmienności indukowanej *in vitro*, transpozony DNA wykazywały najwyższy poziom polimorfizmu.

Zmiany sekwencyjne były zdecydowanie wyższe niż zmienność związana z metylacją DNA.

Podjęte prace pozwoliły na przygotowanie preparatów DNA z potomstwa generatywnego regenerantów jęczmienia do analiz molekularnych.

Wykonana w temacie badawczym analiza RP-HPLC określiła poziom globalnej metylacji DNA dla 90 roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów jęczmienia.

Wstępne analizy molekularne uzyskanych preparatów DNA w oparciu o profile prążków DNA, pozwoliły na sprawdzenie jakości uzyskiwanych profili DNA w technice MSTD.

Wytypowano pary selektywnych starterów do analiz przewidzianych w kolejnym roku realizacji tematu.

Literatura

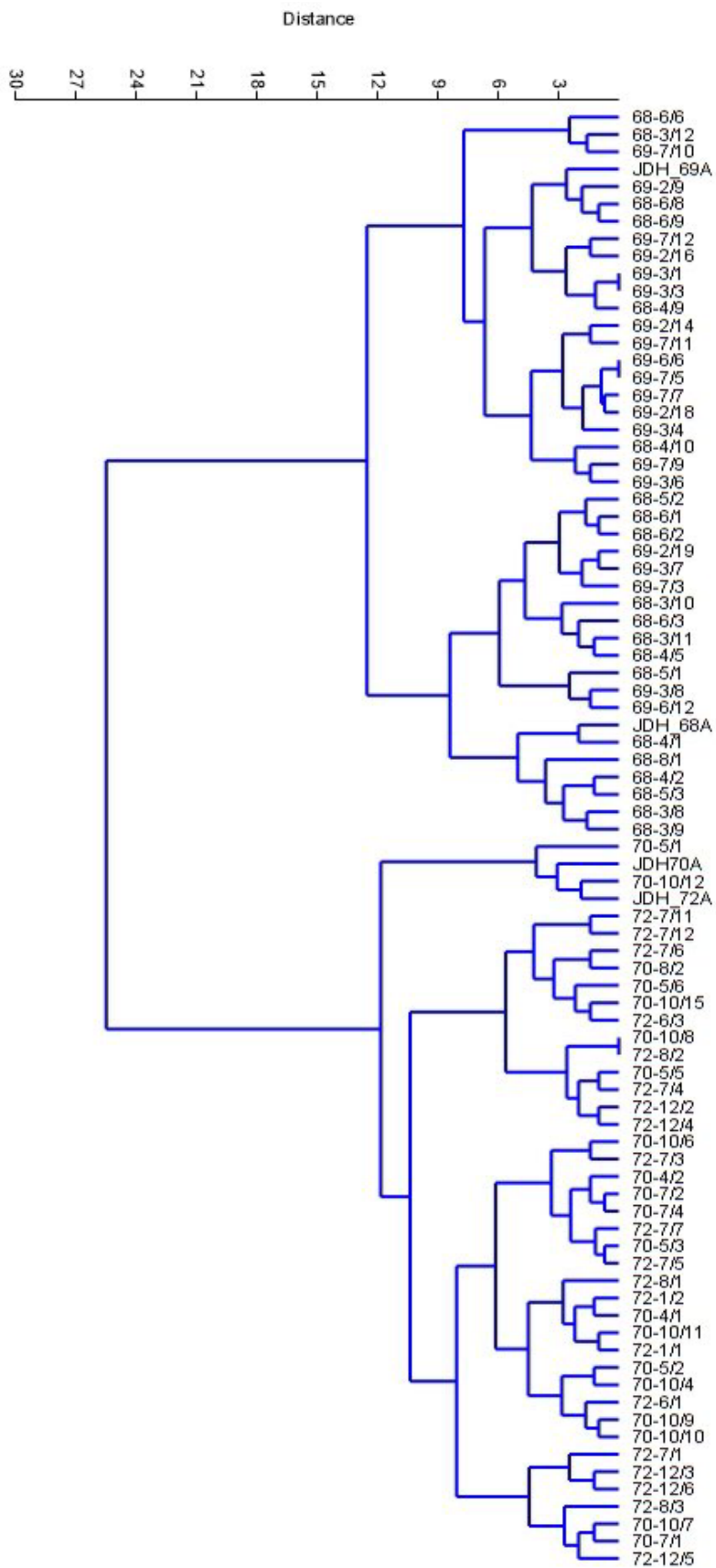
- Han, Z., Crisp, P. A., Stelpflug, S., Kaeppeler, S. M., Li, Q. i Springer, N. M. (2018). Heritable Epigenomic Changes to the Maize Methylome Resulting from Tissue Culture. *Genetics*. 209(4): 983–995.

- Hirochika, H. i Otsuki, H. (1995). Extrachromosomal circular forms of the tobacco retrotransposon *Tto*. *Gene*. 165:229–232.
- Ishizaki, T. i Kato, A. (2005). Introduction of the tobacco retrotransposon *Tto1* into diploid potato. *Plant Cell Reports*. 24(1): 52–58.
- Machczyńska, J., Zimny, J. i Bednarek, P. (2015). Tissue culture-induced genetic and epigenetic variation in triticale (*× Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. *Plant Molecular Biology*. 89(3): 279–292.
- Orłowska, R., Machczyńska, J., Oleszczuk, S., Zimny, J. i Bednarek, P. T. (2016). DNA methylation changes and TE activity induced in tissue cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Journal of biological research (Thessalonike, Greece)*. 23: 19–19.

Tabela 1.

ANOVA oraz średnie wartości charakterystyk metAFLP dla poszczególnych typów elementów mobilnych. TTCIV-calkowita zmienność indukowana *in vitro*, SV-zmienność sekwencyjna, DMV-demetylacja, DNMV-*de novo* metylacja. Litery oznaczają grupowanie wykonane testem Tukeya. F-wartość statystyki, p-prawdopodobieństwo.

ANOVA	Charakterystyki metAFLP			
	TTCIV	SV	DMV	DNMV
F	783,281	504,327	161,834	132,080
p	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001
Elementy mobilne				
Retrotranspozony	14,59 ^a	7,37 ^a	1,68 ^a	1,32 ^a
Transpozony DNA	39,00 ^b	20,41 ^b	6,91 ^b	4,86 ^b



Rysunek 1. Analiza aglomeracji (UPGMA) w oparciu o metodę Warda dla danych MSTD uzyskanych dla DNA ciętego enzymami *Acc65I/MseI* dla roślin donorowych (JDH68, JDH69, JDH70, JDH72) oraz ich regenerantów (oznaczenia 68-72 to DNA regenerantów pochodzących z odpowiadających im numerami roślin donorowych).

Wpływ stresu niedoboru wody na rozwój i architekturę systemu korzeniowego u jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.)

Effects of drought on the development and architecture of barley root system

Anetta Kuczyńska ✉, Tadeusz Adamski, Maria Surma, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogrodowicz, Michał Kempa, Monika Mokrzycka, Renata Trezciak, Renata Holewińska, Alina Anioła

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań,
✉ e-mail: akuc@igr.poznan.pl, tel. 61 6550232

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 lipca 2017 r.; Dz. U. 2017, poz. 1470, Zadanie nr 106.

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

Cel podjętego tematu i prowadzonych badań System korzeniowy odgrywa kluczową rolę w pobieraniu wody i składników odżywczych, a tym samym determinuje rozwój całej rośliny. Dobrze rozwinięty system korzeniowy może wpływać na wzrost produktywności roślin w zróżnicowanych warunkach środowiska. Z tego względu opracowanie nowych koncepcji analizowania fenotypu korzeni i poznanie zmian w ich architekturze w zmiennych warunkach środowiska nabiera coraz większego znaczenia.

Celem badań 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. Dla zrealizowania założonego celu wykonane zostało m.in. zastosowanie najnowszych technik obrazowania korzeni w warunkach kontrolnych oraz w warunkach deficytu wody na platformie do fenotypowania roślin, a także 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

(drugi rok trwania projektu)

W drugim roku trwania projektu przeprowadzono doświadczenia w warunkach polowych w celu określenia potencjału plonowania, zbadania rozwoju i architektury systemu korzeniowego, a także ustalenia stosunku części podziemnej do części nadziemnej rośliny wszystkich analizowanych w projekcie genotypów jęczmienia jarego. Doświadczenie prowadzone było w oparciu o informacje uzyskane w doświadczeniu pilotażowym, które zostało przeprowadzone w roku 2018. Poza metodyką manualnych obserwacji biometrycznych korzeni wykorzystane zostały również mierniki pracujące w oparciu o pomiar pojemności elektrycznej (ang. electrical capacitance) umożliwiające ocenę systemu korzeniowego *in situ* w czterech fazach: krzewienia (T1), strzelania w źdźbło (T2), kłoszenia (T3) i nalewania ziarna (T4). Pojemności elektryczne wahały się granicach dla T1: 1,34 (KWS Fabienne) – 98,67 (Basza), T2: 34,00 (STH4.1105) – 141,00 (Basza), T3: 84,33 (KWS Vermont) – 252,33 (POB 9917/14) oraz T4: 202,33 (DC 17-9) – 469,33 (Evelina). Wartości średnie dla cech związanych z systemem korzeniowym oraz wartości średnie dla cech związanych z częścią nadziemną roślin wahały się w przedziałach: biomasacałkowiata 9,57g (Olympic) – 40,80 g (Concerto), biomasa korzenia 0,53 g (DC 17-3) – 4,44 g (Concerto), długość korzenia 7,00 cm

(DC 17-3) – 16,33 cm (KWS Vermont), liczba źdźbeł produktywnych 4,67 (Beatrix) – 17,00 (DC 17-1), ogólna liczba źdźbeł 5,33 (POB 13085/14) – 21,33 (Conchita), wysokość roślin 42,67 cm (Xanadu) – 63,00 cm (Concerto), średnia długość kłosa 5,00 cm (Xanadu) – 9,57 cm (Vendela), średnia liczba ziarna z kłosa 12,93 (Beatrix) – 22,37 (Soldo), średnia masa ziarna z kłosa 0,34 g (Maresi) – 1,20 g (Soldo), masa ziarna z rośliny 3,03 g (Beatrix) – 16,28 g (Concerto) oraz masa tysiąca ziaren 34,76 g (Maresi) – 53,88 g (STH1016). Dodatkowo ustalony został stosunek części podziemnej do części nadziemnej (RS, %) jak również specyficzna długość korzenia (SRL, cm g⁻¹). Wartości RS wahały się w przedziale 0,03% (DC 17-3) – 0,19% (Argento), natomiast wartości SRL wahały się w przedziale 3,13 cm g⁻¹ (DC 17-10) – 20,35 cm g⁻¹ (MCam53). Jednocześnie przeprowadzono także ocenę parametrów systemu korzeniowego 50 genotypów poprzez 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. W eksperymencie pilotażowym badane genotypy jęczmienia jarego (Lubuski i CamB) różniły się pod względem takich cech jak długość korzenia głównego oraz gęstość korzeni bocznych. W warunkach kontrolnych Lubuski charakteryzował się większą wartością długości korzenia głównego natomiast odwrotna sytuacja została zauważona w warunkach stresowych (korzenie formy syryjskiej sięgały głębiej w poszukiwaniu wody). Na podstawie przeprowadzonych badań wydaje się, iż CamB potrafi lepiej eksploatować zasoby wodne w warunkach niedoboru wody, podczas gdy takie zasoby wodne pozostają niedostępne dla formy europejskiej. W eksperymencie głównym zarejestrowano z kolei niewielki przyrost korzeni bocznych w warunkach kontrolnych, co jest zgodne ze zjawiskiem osłabienia rozwoju przyrostu tego typu korzeni w warunkach glebowych o wysokim stopniu nawodnienia. W przypadku genotypu Class zanotowano długość korzenia w warunkach kontrolnych wynoszącą 59 cm. Natomiast w warunkach stresowych dla tej odmiany zarejestrowano wartość długości korzenia głównego wynoszącą 77 cm.

Wnioski z dotychczasowych badań (pierwszy rok trwania projektu)

Dowiedziano, że wzrost i rozwój systemu korzeniowego następuje szybciej w przypadku

zmieniających się czynników środowiskowych w porównaniu do zmian w rozwoju części nadziemnych roślin (Nagel i in. 2006). Korzenie wielu gatunków roślin potrafią łatwo adaptować się do zmieniających się warunków środowiskowych. Co więcej, morfologia oraz tempo rozwoju różnią się nie tylko pomiędzy poszczególnymi gatunkami, ale również w obrębie jednego gatunku (Falik i in., 2012). Dlatego też stosowanie wysokoprzepustowych, nieinwazyjnych metod fenotypowania w badaniach korzeni jest dzisiaj kluczowym narzędziem w kontekście reakcji roślin na suszę (Wasaya i in., 2018). W warunkach niedoboru wody obserwuje się zmniejszenie długości korzenia (Asseng i in. 1998), średnicy korzenia (Munoz-Romero i in. 2010) oraz gęstości systemu korzeniowego (Schweiger i in. 2009). Dobre wartości cech związane z systemem korzeniowym często mają odzwierciedlenie w większym plonie ziarna, a fakt ten znalazł potwierdzenie w przedstawionych wynikach badań. W badaniach prowadzonych przez Akmana (2017) wykazano, że jedną z najważniejszych cech tolerancji na suszę jest stosunek biomasy korzenia do biomasy części nadziemnej rośliny. Głęboko zakorzenione odmiany mogą wchłaniać wodę i składniki odżywcze z głębokiej gleby, podczas gdy woda gruntowa w płytkich warstwach gleby ulega szybkiemu wyczerpaniu w czasie uprawy. Większa liczba drobnych korzeni w głębokich warstwach gleby może dodatkowo pomóc w pobraniu wody i składników odżywczych. Jednym z efektów suszy dotyczących zbóż jest wzrost stosunku korzeni do pędów. W doświadczeniach przedstawionych przez Motzo i in. (1992) RS badanych odmian pszenicy wzrósł średnio o 37% w stadium krzewienia w warunkach niedoboru wody. Niezwykle istotnym jest fakt, że RS jest elastyczną i zależną od środowiska cechą korzeni. Inną często badaną cechą związaną z systemem korzeniowym jest specyficzna długość korzenia. Rośliny o wysokim SRL mogą pobierać wodę i składniki odżywcze w większych ilościach na jednostkę suchej masy (Pérez-Harguindeguy i in. 2013). Zatem genotypy o wyższych wartościach RS oraz SRL mogą potencjalnie być lepiej przystosowane i efektywniej wzrastać w warunkach stresu jakim jest niedobór wody. Wiedza na temat różnic w morfologii systemu korzeniowego jęczmienia jarego może posłużyć do selekcji odmian o korzystnych cechach korzeni oraz zdolnych efektywniej pobierać wodę i składniki odżywcze, co w rezultacie może być użyteczne dla firm hodowli roślin.

Literatura

- Akman, H., Akgun, N., Tamkoc, A. (2017). Screening for root and shoot traits in different wheat species and wild wheat relatives. *Botanical Sciences* 95(1): 147–154.
- Asseng, S., Ritchie, J.T., Smucker, A.J.M., Robertson, M.J. (1998). Root growth and water uptake during water deficit and recovering in wheat. *Plant Soil*. 201:265–273.
- Falik, O., Mordoch, Y., Ben-Natan, D., Vanunu, M., Goldstein, O., Novoplansky, A. (2012). Plant responsiveness to root-root communication of stress cues. *Ann. Bot.* 110:271–280.
- Motzo, R., Attene, G. Deidda, M. (1992). Genotypic variation in durum wheat root systems at different stages of development in a Mediterranean environment. *Euphytica* 66(3): 197–206.
- Munoz-Romero, V., Benitez-Vega, J., Lopez-Bellido, L., Lopez-Bellido, R.J. (2010). Monitoring wheat root development in a rainfed vertisol: Tillage effect. *Eur. J. Agron.* 33:182–187.
- Nagel, K., Schurr, U., Walter, A. (2006). Dynamics of root growth stimulation in *Nicotiana tabacum* in increasing light intensity. *Plant Cell Environ* 1936–1945.
- Pérez-Harguindeguy, N., Díaz S., Garnier, E., Lavorel, S., Poorter, H., Jaureguiberry, P., Bret-Harte, M. S., Cornwell, W. K., Craine, J. M., Gurvich, D. E., Urcelay, C., Veneklaas, E. J., Reich, P. B., Poorter, L., Wright, I. J., Ray, P., Enrico, L., Pausas, J. G., de Vos, A. C., Buchmann, N., Funes, G., Quétier F., Hodgson, J. G., Thompson, K., Morgan, H. D., ter Steege, H., Sack, L., Blonder, B., Poschlod, P., Vaieretti, M. V., Conti, G., Staver, A. C., Aquino, S., Cornelissen, J. H. C. (2013). New handbook for standardised measurement of plant functional traits worldwide. *Australian Journal of Botany* 61(3): 167–234.
- Schweiger, P., Petrasek, R., Hartl, W. (2009). Root distribution of winter wheat cultivars as affected by drought. In: *International Symposium Root Research and Applications, RootRAP, 2-4 September 2009, Boku, Vienna, Australia.*
- Wasaya, A., Zhang, X., Fang, Q., Yan, Z. (2018). Root phenotyping for drought tolerance. *A review Agronomy* 8: 241.

Haploidyzacja żyta – diagnostyka molekularna oraz wpływ nanomolekuł na wspomaganie indukcji 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

Sylwia Mikołajczyk ✉, Agnieszka Tomkowiak, Dorota Weigt,
Jan Bocianowski, Zbigniew Broda

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Wydział Rolnictwa i Bioinżynierii, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin,
✉ 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, HOR.hn.802.9.2019, Zadanie nr 86.

Słowa kluczowe: androgeneza, , ISSR, kultury pylników, RAPD, *SERC*, *SNAC1*

Temat Badawczy 1:

Ocena przydatności wyselekcjonowanych markerów RAPD i ISSR do selekcji form o podwyższonej zdolności do androgenozy oraz analiza ekspresji 2 wybranych genów: *SERC* i *SNAC1*.

Ze względu na szereg problemów związanych z indukcją haploidów żyta konieczne jest rozpoznanie podłoża molekularnego procesu androgenozy w połączeniu z poszukiwaniem markerów molekularnych powiązanych ze zdolnością do androgenozy żyta w aspekcie genetycznego uwarunkowania tej cechy.

Za odpowiedź w kulturach tkankowych żyta (TCR tissue culture response) odpowiadają geny *SERK* (*SERK* – *Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase*). Geny *SERK* zostały uznane jako markery molekularne dla procesu embriogenezy somatycznej. Związek genów *SERK* z embriogenezą somatyczną został opisany u wielu gatunków między innymi *Dactylis glomerata*, *Arabidopsis thaliana*, *Medicago truncatula* (Somleva i in., 2000; Hecht i in., 2001). Poziom ekspresji genów *SERK* wydaje się być kluczowym czynnikiem w różnicowaniu się komórek i oddziaływaniu auksyn na indukcję embriogenezy somatycznej (Santos i Aragão, 2009).

Kolejnym analizowanym genem był gen *SNAC1*, który odpowiada za reakcję na stres abiotyczny indukowany przez ABA (Taka-saki i in., 2015). Geny z rodziny czynników

transkrypcyjnych *NAC* odgrywają kluczową rolę w regulacji transkrypcji powiązanej z odpowiedzią roślin na czynniki stresowe o charakterze abiotycznym i biotycznym (Nuruzzaman i in., 2013).

Celem tematu badawczego 1 była ocena polimorfizmu DNA za pomocą markerów RAPD i ISSR oraz poszukiwanie markerów DNA powiązanych z efektywnością indukcji androgenozy i regeneracji roślin zielonych w kulturach pylników 16 genotypów żyta dla selekcji genotypów o wysokiej podatności na haploidyzację oraz analiza ekspresji genów *SERK* i *SNAC1* techniką RT-PCR w aspekcie oceny ich przydatności do selekcji form o wysokiej embriogenności mikrospor i poszukiwania form żyta o wysokiej embriogenności mikrospor i pylników.

Wyniki:

Genotypy żyta (16 genotypów będących materiałami hodowlanymi o zróżnicowanym pochodzeniu) poddane indukcji androgenozy w kulturze pylników stanowiły materiał roślinny do analizy polimorfizmu DNA z zastosowaniem markerów RAPD i ISSR oraz analizy ekspresji genów *SERK* i *SNAC1*. Do analizy polimorfizmu DNA techniką RAPD i ISSR zastosowano 40 starterów nukleotydowych, które wybrano na podstawie literatury i badań własnych.

Z przetestowanych 40 starterów oligonukleotydowych otrzymano polimorfizm prążkowy, który pozwolił na określenie podobieństwa

genetycznego pomiędzy badanymi 16 obiektami żyta. Podobieństwo genetyczne badanych 16 obiektów żyta za pomocą techniki RAPD mieściło się w zakresie od 74,4% pomiędzy genotypami S1321/18 i S1322/18 do 27,5% pomiędzy genotypami S1128/18 i PHR3/19. Podobne wartości podobieństwa genetycznego (GS) otrzymano techniką ISSR pomiędzy badanymi materiałami hodowlanymi żyta wyniosło od 78% dla genotypów PHR3/19 i PHR5/19 do 23% dla S1128/18 i S1278/18.

Na podstawie analizy produktów otrzymanych w reakcji ze starterami specyficznymi dla genów *SERK* i *SNAC1* stwierdzono obecność pojedynczych produktów polimorficznych niejednoznacznie różnicujących 16 badanych obiektów żyta. Na podstawie analizy ekspresji genów *SERK* i *SNAC1* wykazano, że najwyższy średni wzrost poziomu ekspresji badanych genów stwierdzono po 2 i 7 dniach traktowania kłosów temperaturą 4°C, natomiast po 14 dniach traktowania kłosów niską temperaturą poziom ekspresji 2 badanych genów spadał.

Wnioski:

W wyniku przetestowania 40 starterów (20 losowych 10 nukleotydowych dla RAPD i 20 o wybranej znanej sekwencji powtarzalnej nukleotydów dla ISSR) stwierdzono, że w reakcjach ISSR otrzymywano wyższą liczbę produktów, a wyniki analiz były bardziej powtarzalne.

Na podstawie analizy produktów otrzymanych w reakcji ze starterami specyficznymi dla genu *SERK* i *SNAC1* stwierdzono, występowanie nielicznych produktów polimorficznych, który uniemożliwił jednoznaczne zróżnicowanie badanych obiektów żyta stąd zdecydowano o analizie poziomu ekspresji w/w genów dla wybranych genotypów.

Przeprowadzona analiza ekspresji genów *SERK* – genu określanego jako marker embriogenezy somatycznej i genu *SNAC1* – odpowiadającego za reakcję na stres abiotyczny wykazała, że najsilniejsza reakcja w postaci zmiany ekspresji badanych genów występuje po traktowaniu kłosów żyta temperaturą 4°C przez 2 i 7 dni w porównaniu z kontrolą. Otrzymane wyniki mogą wskazywać, że optymalnym czasem stosowania stresu termicznego jest chłodzenie kłosów żyta przez 2 i 7 dni gdyż wtedy najsilniej zmienia się ekspresja badanych genów.

Temat badawczy 2

Testowanie pożywek o najwyższej zdolności do indukcji androgenozy z dodatkiem nanomolekuł Cu i Zn w kulturze pylników i izolowanych mikrospor żyta.

W pracach dotyczących kultur pylników i

izolowanych mikrospor ryżu i jęczmienia podkreślana jest konieczność poszukiwania nowych rozwiązań metodycznych niezbędnych dla przełamania braku zdolności regeneracyjnych u tzw. „opornych genotypów” (Silva, 2010; Cistue i in., 1999). W temacie badawczym dotyczącym doskonalenia metod haploidyzacji żyta w kulturach pylników przetestowano wpływ traktowania wstępnego kłosów i pylników temperaturą 4°C oraz dodatku jonów Zn i Cu na indukcję androgenozy i regenerację roślin haploidalnych żyta.

Stres termiczny wywoływany przez traktowanie kłosów żyta temperaturą 4°C jest niezbędny do zmiany rozwoju gametofitycznego mikrospor na sporofityczny. Badania nad androgenozą żyta wskazują, że najczęściej stosowanym czasem traktowania kłosów temperaturą 4°C jest 14 do 21 dni w chłodni (Immonen i Tenhola-Roininen, 2003; Immonen i Anttila, 1998; Tenhola-Roininen i in., 2005; Ma i in., 2004). Immonen i Tenhola-Roininen (2003) podają, że bardzo odporne genotypy mogą wymagać dłuższego stresu niskiej temperatury, nawet powyżej 28 dni.

Celem tematu badawczego 2 była ocena wpływu zoptymalizowanego traktowania wstępnego kłosów żyta (temperatura 4°C) oraz dodatku do pożywki C17 jonów Zn i Cu na indukcję androgenozy i regenerację roślin w kulturach pylników i izolowanych mikrospor żyta.

Wyniki

Kultury pylnikowe zakładano w 2 wariantach traktowania wstępnego kłosów (14 i 21 dni w temperaturze 4°C), a pylniki żyta wykładano na pożywkę C17 zawierającą mieszaninę auksyn (2,4-D i dikamby w proporcji 1 : 1 – kontrola) oraz pożywkę C17 kontrolną z dodatkiem Zn i Cu.

W trakcie realizacji tematu badawczego 2 wyłożono 43.200 pylników z 480 kłosów z 16 genotypów żyta wyprowadzonych w ramach usług badawczych, z których otrzymano 1372 kalusy mikrosporowe i 10 roślin zielonych. Średnia efektywność androgenozy na 100 wyłożonych pylników dla 16 badanych genotypów żyta, wynosiła 3,18%, a efektywność regeneracji roślin 0,03% w stosunku do liczby wyłożonych pylników, natomiast odsetek konwersji struktur kalusowych w rośliny zielone wynosił 0,73%. Najwyższą liczbę pylników tworzących struktury androgeniczne zaobserwowano dla genotypu PHR5/19 – 153 kalusy mikrosporowe na pożywce z dodatkiem Zn po 21 dniach chłodzenia kłosów, dlatego wybrano w/w genotyp do zakładania kultur izolowanych mikrospor. Genotyp PHR5/19 zregenerował także najwyższą liczbę roślin zielonych – 8 (2 rośliny na pożywce

kontrolnej C17 i po 3 rośliny zielone na pożywce z dodatkiem Zn i Cu).

Wnioski

Traktowanie ściętych kłosów żyta temperaturą 4°C przez 21 dni było najefektywniejsze dla indukcji androgenezy w kulturze pylników na pożywce C17 z dodatkiem Zn.

Na podstawie oceny efektywności indukcji androgenezy i regeneracji roślin w kulturach pylników 16 genotypów żyta stwierdzono, że traktowanie pylników temperaturą 4°C przez 21 dni wpłynęło pozytywnie na analizowane parametry androgenezy dla badanych 16 genotypów żyta, które tworzyły struktury androgeniczne z wyższą efektywnością na 3 kombinacjach pożywki C17 (kontrola, dodatek Zn i Cu).

Literatura

- Cistué, L., A. Ramos & A. M. Castillo (1999). Influence of anther pretreatment and culture medium composition on the production of barley doubled haploids from model and low responding cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 55: 159–166.
- Hecht, V., Vielle-Calzada, J.-P., Hartog m.V., Schmidt, E.D.L., Boutilie, K., Grossniklaus, U., de Vries, S.C. (2001). The Arabidopsis *SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1* gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* 127: 803–816.
- Immonen, S., Anttila A. (1998). Impact of microspore developmental stage on induction and plant regeneration in rye anther culture. *Plant Sci.*, 139: 213–222.
- Immonen, S., Tenhola-Roininen, T. (2003). Protocol for rye anther culture. M. Maluszynski et al. (eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants*, 141–149.
- Ma R., Y.-D. Guo & S. Pulli (2004). Comparison of anther and microspore culture in the embryogenesis and regeneration of rye (*Secale cereale*). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 76: 147–157.
- Naruzzaman, M., Sharoni, A. M., Kikuchi, S. (2013). Roles of *NAC* transcription factors in the regulation of biotic and abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Microbiology* 4: 248.
- Santos, M. O., Aragão, F. J. L. (2009). Role *SERK* genes in plant environmental response. *Plant Signaling & Behavior* 4: 1111–1113.
- Silva, T. D. (2010). Indica rice anther culture: Can the impasse be surpassed? *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 100 (1): 1–11.
- Somleva, M. N., Schmidt, E.D.L., de Vries, S.C. (2000). Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (*Poaceae*) explants identified by cell tracking and by *SERC* expression. *Plant Cell Reports* 19: 718–726.
- Takasaki, H., Maruyama, K., Takahashi, F., Fujita, M., Yoshida, T., Nakashima k., Myouga, F., Toyooka, K., Yamaguchi-Shinozaki k., Shinozaki, K. (2015). *SNAC-As*, stress responsive *NAC* transcription factors, mediate ABA-inducible leaf senescence. *The Plant Journal* 84: 1114–1123.
- Tenhola-Roininen, T., Tanhuanpää, P., Immonen, S. (2005). The effect of cold and heat treatment on the anther culture response of diverse rye genotypes. *Euphytica* 145: 1–9.

Poszukiwanie markerów molekularnych genów przywracania płodności pyłku u żyta (*Secale cereale* L.) z CMS-Pampa

Identification of pollen fertility restoration markers in rye (*Secale cereale* L.) with CMS-Pampa

Piotr Tomasz Bednarek ¹✉, Agnieszka Niedziela ¹, Zbigniew Rybka ¹, Waldemar Brukwiński ², Barbara Kozber ²

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

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

✉ e-mail: p.bednarek@ihar.edu.pl, tel. 22 7254533

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.802.3.2019, Zadanie nr 21.

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

Hodowla heterozyjna oraz produkcja nasion żyta bazuje na zjawisku cytoplazmatycznej męskiej sterility (CMS) indukowanej przez cytoplazmę typu Pampa (Geiger i Schnell, 1970). Sterylność jest cechą dziedziczną od linii matecznych z CMS Pampa 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, 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).

Celem zadania jest opracowanie markerów DNA silnie sprzężonych lub/i asocjowanych z możliwie jak najszerszym spektrum genów przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa występujących w obrębie badanych populacji RIL oraz określenie wkładu tych genów do zmienności fenotypowej.

W roku 2019 zadanie nr 21 było realizowane w ramach 2 tematów badawczych:

Temat badawczy 1: Markerowanie genetyczne linii rekombinacyjnych (DArT).

Cel podjętego tematu i prowadzonych badań:

Uzyskanie markerów DNA umożliwiających opracowanie mapy genetycznej dla populacji mapującej RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05).

Wyniki:

W wyniku profilowania DNA populacji RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05) uzyskano 36000 markerów DArTseq (marker SNP, ang. Single Nucleotide Polymorphism) oraz 128000 silicoDArT (marker dominujący). Wykorzystanie kontroli wewnętrznych oraz powtórzeń umożliwiło weryfikację powtarzalności genotypowania, które wynosiło około 99%. Różnice wynikały głównie ze sporadycznego występowania brakujących danych.

Wnioski z prowadzonych badań:

1. Metoda DArT umożliwiła identyfikację dużej liczby powtarzalnych markerów DArTseq i silicoDArT w obrębie analizowanej populacji RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05).
2. Zastosowanie powtórzeń i kontroli umożliwiło wyeliminowanie niejednoznaczności przy określaniu pochodzenia niektórych markerów. Natomiast kontrole wewnętrzne wykazały, że metoda DArTseq jest technologią bardzo wiarygodną.

Temat badawczy 2: Identyfikacja markerów cechy (mapowanie genetyczne/mapowanie asocjacyjne).

Cel podjętego tematu i prowadzonych badań:

Opracowanie zagęszczonej mapy genetycznej oraz mapowanie genów przywracania płodności pyłku.

Wyniki:

Na podstawie wyników segregacji markerów DArTseq i silicoDArT dla populacji RIL8 (S 64/04/01): S 305N/00 x SO 37R/05) opracowano mapę genetyczną składającą się z 7 grup sprzężeń odpowiadających poszczególnym chromosomom żyta (1R-7R). Na mapie umieszczono 643 markery szkieletowe, 2418 redundantne (3061 łącznie dla wszystkich chromosomów) oraz 1245 markerów dodanych (interpolowanych na mapę). Otrzymana mapa genetyczna pokrywa 1070.5 cM, a jej zagęszczenie wynosi od 1.52 markera/cM dla chromosomu 1R do 2.25 markera/cM dla chromosomu 4R. Na pojedynczy chromosom przypada średnio 92 markery szkieletowe, 345 markerów redundantnych i 1779 markerów dodanych.

Mapowanie QTL z wykorzystaniem metody regresji liniowej (SMA, ang. Single Marker Analysis), złożonego (CIM, ang. Composite Interval Mapping) i wielokrotnego (MIM, ang. Multiple Interval Mapping) mapowania interwałowego wykazało, że QTL przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa lokalizuje się w części dystalnej długiego ramienia chromosomu 4R. Wykres funkcji LOD dla wymienionych metod pokazuje, że osiąga ona wartość maksymalną na poziomie około 30.0 przy wyznaczonej krytycznej wartości ustalonej na podstawie testu permutacji ($p=1000$) równej 3.3. Identyfikowany QTL charakteryzuje się addytywnym sposobem działania oraz odziedziczalnością na poziomie ponad 50%. W obszarze QTL lokalizują się cztery markery silicoDArT oddalone o 0.01 - 3.5 cM od maksymalnej wartości funkcji LOD. Metody CIM oraz MIM wykazały, że w obrębie badanej populacji może występować słabszy QTL zlokalizowany na chromosomie 5R w pozycji 49.7 cM mapy sprzężeniowej. QTL na chromosomie 5R charakteryzuje się efektem addytywnym oraz niską odziedziczalnością.

Mapowanie asocjacyjne umożliwiło identyfikację 176 markerów DArTseq i silicoDArT

asocjowanych z genami przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa. Dodatkowo dla 37 z nich identyfikowano łącznie 650 markerów redundantnych. Stopień asocjacji określany za pomocą współczynnika determinacji (R^2) wynosił od 0.163 do 0.583 co świadczyło o silnych asocjacjach tych markerów z cechą. Markery o najwyższych wartościach asocjacji lokalizowały się na chromosomie 4R.

Analiza bioinformatyczna sekwencji markerów DNA występujących w obrębie QTL przywracania płodności pyłku oraz markerów o najwyższych współczynnikach asocjacji z cechą wykazała, że przynajmniej część z sekwencji markerowych jest homologiczna do sekwencji genów. Funkcja tych genów oraz ich ewentualne powiązanie ze zjawiskiem CMS wymaga potwierdzenia w dalszych analizach.

Wnioski z prowadzonych badań:

- Zidentyfikowano jeden silny QTL przywracania płodności pyłku u żyta z CMS Pampa występujący w obrębie chromosomu 4R oraz słaby QTL na chromosomie 5R.
- QTL identyfikowany na chromosomie 4R charakteryzuje się wysokim stopniem odziedziczalności.
- Metoda złożonego i wielokrotnego mapowania interwałowego oraz mapowania asocjacyjnego identyfikują identyczne markery szkieletowe wykazujące silne sprzężenie/asocjacje z badaną cechą.
- Pomiędzy markerami identyfikowanymi CIM znajduje się 202 markery dodane, które również mogą okazać się użyteczne w selekcji wspartej markerami molekularnymi.
- Markery asocjowane z cechą ze względu na wysoki poziom współczynnika determinacji mogą stanowić dodatkowe źródło markerów w selekcji materiałów niosących gen przywracania płodności pyłku u żyta.

Literatura

- Geiger, H. H., Schnell, F. W. (1970) Cytoplasmic male sterility in rye (*Secale cereale* L.). Crop Scien., 10/5:590–593.
- 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.

Badania wewnętrznej struktury genetycznej odmian żyta oraz dziedzicznego podłoża efektu heterozji w roku 2019

Study on internal genetic structure of rye cultivars and genetic background of heterosis in 2019

Stefan Stojalowski¹✉, Martyna Sobczyk¹, Anna Bienias¹, Marta Orłowska¹, Sylwia Czarnecka¹, Marek Zająć², Katarzyna Andrzejewska², Dorota Jasińska², Róża Martofel², Marek Szklarczyk³

¹ Zachodniopomorski Uniwersytet Technologiczny w Szczecinie,

² Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o.,

³ Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,

✉ e-mail: stefan.stojalowski@zut.edu.pl, tel. 91 4496404

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.802.12.2019, Zadanie nr 87.

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

Ideą nadrzędną prowadzonych badań jest poznanie struktury genetycznej populacji żyta reprezentowanych przez tradycyjne odmiany populacyjne, populacje syntetyczne i odmiany mieszańcowe. Dodatkowo planowane jest podjęcie prób utworzenia zestawu linii introgressyjnych, które mogą przyczynić się do lepszego poznania genetycznych mechanizmów kształtujących cechy użytkowe o złożonym dziedziczeniu. W 2019 roku prowadzono prace badawcze inspirowane następującymi celami:

- Ocena zmienności genetycznej występującej w obrębie sześciu populacji syntetycznych oraz ocena fenotypowa serii mieszańców liniowo-populacyjnych
- Ocena wartości gospodarczej sześciu populacji syntetycznych o zróżnicowanej strukturze genetycznej
- Tworzenie zestawu linii introgressyjnych i wstępna ocena ich zróżnicowania genetycznego

Analiza DArTseq wykonana na genotypach linii rodzicielskich i losowo wybranych 46-47 roślinach każdej z sześciu badanych populacji syntetycznych dostarczyła danych o 99097 markerach SilicoDArT. Dane wykorzystano do oceny podobieństwa genetycznego. Uzupełnieniem analiz DArTseq były wyniki otrzymane metodą PCR. Oceniono

polimorfizm między liniami rodzicielskimi przy zastosowaniu 20 markerów PCR o znanej lokalizacji chromosomowej. Wyniki oceny genetycznej czterech linii rodzicielskich wskazują, że wartości współczynników podobieństwa między każdą parą były na zbliżonym poziomie i mieściły się w granicach od 0,67 do 0,73. W analizach obejmujących populacje syntetyczne najwyższy poziom heterozygotyczności (ponad 31%) odnotowano w populacji SYN4. W pozostałych populacjach wartości te były o około 10% niższe.

Ocena fenotypowa mieszańców między czterema liniami hodowlanymi, a pojedynczymi roślinami z odmian populacyjnych żyta (mieszańców liniowo-populacyjnych) została wykonana dla 82 obiektów doświadczalnych. Wśród nich były 4 linie rodzicielskie (pełniące jednocześnie rolę wzorców przy określaniu efektu heterozji) oraz 78 mieszańców. Pierwsza z ocenionych cech to termin początku kwitnienia rośliny, który określano liczbą dni od 1 maja. Rośliny zakwitły na przełomie maja i czerwca 2019. Zakwitanie roślin w obrębie tego samego genotypu było względnie równomiernie o czym świadczą relatywnie niskie współczynniki zmienności. Heterozja roślin mieszańcowych zasadniczo objawiała się wcześniejszym kwitnieniem, ale w kilku kombinacjach krzyżowania zaobserwowano opóźnienie terminu zakwitania. Wysokość roślin była mocno

zróznicowana. Generalnie wszystkie mieszańce F1 były wysokie, znacząco wyższe niż mateczne linie wsobne. W obrębie pojedynczych genotypów zmienność fenotypowa najczęściej nie była duża i wartości współczynnika zmienności w nielicznych przypadkach przekraczały 10%. Krzewienie ogólne i produkcyjne charakteryzowało się bardzo dużą zmiennością losową w doświadczeniu. Średnia długość kłosa badanych obiektów doświadczenia mieściła się w granicach od niespełna 8 cm do ponad 12 cm. Przekładało się to na ponad 50% wzrost długości kłosa mieszańców względem wyjściowej linii matecznej. Zmienność fenotypowa w obrębie genetycznie tożsamy obiektów była na ogół niewielka (współczynniki zmienności poniżej 10%). Liczba kłosek w kłosie była ściśle związana z długością kłosa. Zawiązywanie ziaren u mieszańców było wyraźnie lepsze niż u linii rodzicielskich. Jeszcze większe różnice między mieszańcami, a matecznymi liniami wsobnymi były widoczne przy ocenie masy ziaren w kłosie.

Plonowanie sześciu populacji syntetycznych wraz z odmianami wzorcowymi (2 mieszańce i jedna populacja) badano w doświadczeniu polowym założonym w trzech powtórzeniach w dwóch lokalizacjach (Wiatrowo i NAGRADOWICE). Dwie wzorcowe odmiany mieszańcowe plonowały najlepiej ze wszystkich obiektów w doświadczeniu. Ich przewaga nad pozostałymi obiektami doświadczenia była wyraźna w obu lokalizacjach, a stabilność plonowania potwierdzają wartości współczynników zmienności nieprzekraczające 11%. Wzorcowa odmiana populacyjna plonowała wyraźnie gorzej od mieszańców, ale lepiej od wszystkich sześciu badanych populacji syntetycznych. Najlepiej plonujące syntetyki to SYN4, SYN5 i SYN2. Ich plony wykazywały dużą zmienność w zależności od środowiska – współczynniki zmienności we wszystkich trzech przypadkach przekraczały 20%. Najsłabiej plonującym obiektem doświadczenia był syntetyk SYN3. Jego plon był o ponad połowę mniejszy niż plony dwóch wzorcowych odmian mieszańcowych. Badane populacje syntetyczne charakteryzowały się średnią wysokością w granicach od 127 do 132 cm. Nie odbiegały pod tym względem znacząco od dwóch wzorcowych

odmian mieszańcowych (średnio ok. 127 cm wysokości). Najwyższą odmianą była populacja wzorcowa, której wysokość była o ok. 10 cm większa niż pozostałych badanych obiektów doświadczenia. Wysokość roślin badanych genotypów była porównywalna w różnych warunkach środowiska (odnotowano względnie niskie wartości współczynników zmienności). Różnice w wysokości roślin nie miały większego znaczenia dla poziomu wylegania. Spośród istotnych chorób żyta zaobserwowano tylko obecność rdzy brunatnej. Mączniak nie pojawił się w żadnej lokalizacji.

W 2019 roku pracami badawczymi objętych zostało 90 genotypów S3 stanowiących wyjściowy zestaw do wytworzenia dwóch zestawów linii introgressyjnych (InA i InB). Z roślin każdej linii pobrano fragmenty liści do analiz genetycznych. Wyizolowano z nich DNA metodą CTAB, a następnie zlecono wykonanie analiz molekularnych techniką DArTseq. Dodatkowo, badane obiekty objęto analizami PCR z użyciem 20 markerów o znanej lokalizacji chromosomowej. Na podstawie wyników analiz molekularnych oceniono zróznicowanie genetyczne między tworzonymi liniami.

Wnioski:

- Zróznicowanie genetyczne linii hodowlanych użytych do tworzenia populacji syntetycznych nie było związane z reprezentowaną przez nie pulą genetyczną
- W populacjach syntetycznych udział roślin powstałych na skutek samozapylenia linii rodzicielskich był znikomy i nie mógł znacząco wpływać na wartość użytkową syntetyków
- Wszystkie wytworzone populacje syntetyczne plonowały słabo w porównaniu do odmian wzorcowych.
- Tworzone dwa zestawy introgressyjnych linii wsobnych żyta w pokoleniu B3S4 charakteryzują się obniżoną częstotliwością heterozygot.
- Zestaw linii InA zawiera w większości genotypy wykazujące duże podobieństwo do wyjściowej linii rodzicielskiej
- Zestaw linii InB zawiera genotypy o umiarkowanym podobieństwie do wyjściowej linii rodzicielskiej (wskazane jest wykonanie dodatkowych krzyżowań wstecznych).

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

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

Janusz Zimny ✉, Andrzej Czaplicki, Aleksandra Zimny, Sylwia Oleszczuk

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie,
✉ 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 nr 85.

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

Celem zadania jest: określenie wpływu zastosowanych stresów przeprogramowania mikrospor i warunków kultury (rodzaj pożywki) na indukowanie androgenyzy, 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:

1. Sprawdzenie skuteczności stresów pozytywnie korelujących z regeneracją podwojonych haploidów. Celem badań była ocena regeneracji roślin drogą androgenyzy u 15 genotypów, w wyniku zastosowania 2 rodzajów stresu w 2 poziomach.

Wyniki uzyskane w roku bieżącym pokazują, że opracowana metoda zaindukowania androgenyzy daje pozytywny efekt dla większości genotypów, chociaż tworzenie embriogennej tkanki kalusowej nie zawsze przekłada się na uzyskiwanie zielonych regenerantów. Tylko z połowy badanych genotypów udało się zregenerować zielone rośliny w ilości kilkudziesięciu sztuk. Wydaje się, że przyczyną takiego stanu rzeczy jest po pierwsze zależność genotypowa, o czym wiadomo z publikacji, które ukazywały się na przestrzeni wielu lat. W przypadku niektórych gatunków jednoliciennych badaczom udało się znaleźć modelowy genotyp. Dla kupkówki (*Dactylis glomerata* L. Conger i in., 1989) jest to odm. Potomac, dla jęczmienia - odm. Igrī (Hoekstra i in., 1992), dla pszenżyta - odm. Bogo (Oleszczuk i in. 2004). W wyniku prowadzonych przez nas prac udało się wyselekcjonować takie modelowe genotypy

żyta, które pozwalają na testowanie czynników determinujących androgenezę. Dzięki znalezieniu modelowego genotypu żyta dalsze badania nad kulturami *in vitro* mogą być łatwiejsze i dawać bardziej powtarzalne wyniki. Wyraźnie istotnym czynnikiem indukowania androgenyzy był przedłużony okres chłodzenia kłosów: dla kombinacji stresowej z użyciem prekultury pylników w mannitolu do dwóch tygodni, a w przypadku stosowania samego chłodzenia do trzech tygodni. Poziom regeneracji roślin zielonych pozwala sądzić, że mamy do czynienia ze zjawiskiem kumulowania się zdolności do androgenyzy w niektórych genotypach.

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 modyfikacje składu pożywek zastosowanych na etapie indukcji procesu.

Wytypowano genotypy o wysokim potencjale regeneracyjnym. Poziom albinizmu wahał się w granicach od 0 do 90%, w zależności od rodzaju zastosowanego stresu i pożywki. Uzyskane dane wskazują na to, że poprzez dobór odpowiednich warunków kultury *in vitro*, zwłaszcza rodzaju stresu przeprogramowania mikrospor, możliwa jest redukcja poziomu albinizmu. Wydaje się, że najlepszym stresem, w kontekście zminimalizowania tego zjawiska jest chłodzenie kłosów w temperaturze 4°C przez okres 14 dni, a następnie inkubowanie wyizolowanych pylników w roztworze mannitolu przez kolejne

7 dni, w temperaturze 4°C. Próby ograniczenia albinizmu poprzez dodawanie tiosiarczanu srebra do pożywki (Würschum i wsp. 2015), jak też indukowania androgenezy na pożywce KBP (Kumlehn i in. 2006) nie przyniosły oczekiwanych rezultatów.

3. Zbadanie wpływu ustalonego stresu, warunków kultury i systemu podwajania liczby chromosomów na liczbę regenerowanych zielonych roślin. Celem prac było sprawdzenie wpływu wybranych warunków stresu i kultury *in vitro* na liczbę zregenerowanych zielonych roślin i efektywność podwojenia liczby chromosomów.

Potomstwo regenerantów od wczesnych etapów wzrostu wykazywało niejednakową intensywność rozkrzewiania. W obrębie jednej kombinacji genotypowej niewielkie różnice w budowie morfologicznej najlepiej można było zaobserwować począwszy od fazy strzelania w źdźbło. Dla większości linii długość kolejnych faz rozwojowych, do fazy pełnej dojrzałości, nie odbiegała od czasu trwania poszczególnych faz rozwojowych, charakterystycznych dla typowego żyta ozimego. Spowolniony wzrost i niski wigor dotyczył 5% ocenianych linii. Obserwowano rozpiętość w liczbie wytworzonych pędów (od 1 do 10), długości źdźbła (od 53 cm do 85 cm) oraz długości kłosów. Kłosa różniły się również kształtem, zbitością i ustawieniem w stosunku do źdźbła. Wszystkie rośliny wytworzyły kłosa i wykazały częściową płodność. Efektywność zawiązywania ziarniaków wynosiła 20-70%. Liczba nasion w kłosie była wyższa w przypadku obcozapylecia, a ziarniaki były w tym przypadku większe i lepiej wypełnione. Pierwsze pokolenie wytworzonych drogą androgenezy linii żyta charakteryzowało się dużą różnorodnością morfologiczną, którą trudno było odnieść do konkretnego stresu oraz genotypu. Zmienność wśród uzyskanych linii pochodzących z heterozygotycznego materiału wynikała z odmienności każdej komórki haploidalnej, co przekładało się na powstawanie regenerantów o unikalnej kombinacji genów, a tym samym odmiennych fenotypie niż rośliny rodzicielskie. Poza tym występowanie zjawiska zmienności somaklonalnej i gametoklonalnej w kulturach tkankowych zwiększa szanse na dodatkowe zróżnicowanie wśród wyprowadzonych roślin. Z tych powodów ważna jest ocena potomstwa wyprowadzonych regenerantów. Obserwowana zmienność w potomstwie regenerantów dotyczyła głównie częściowej płodności pojedynczych roślin niezależnie od ich

pochodzenia. Cytometryczna ocena diploidyacji regenerantów nie przekładała się na płodność ocenioną na etapie pełnej dojrzałości. Płodność regenerantów i efektywność zawiązywania ziarniaków nie były związane z rodzajem stresu indukującego androgenezę.

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.

W doświadczeniach użyto osobniki pochodzące z 3 genotypów, znajdujące się w stadium ukorzenia się/krzewienia na pożywce N6 z 2mg/l IAA, gdzie zastosowano przez 3 i 4 dni, następujące herbicydy w stężeniach: 5 μM oryzalina oraz 10 μM trifluralina. W obrębie badanych linii nie znaleziono powiązania pomiędzy liczbą regenerantów, które przeżyły/wypadły po wysadzeniu do gleby, a rodzajem związku antymitotycznego i czasem jego ekspozycji - otrzymane wskaźniki nie odbiegały od danych kontrolnych. Na tym etapie trudno było zaobserwować wpływ użytych związków na powstawanie zaburzeń rozwojowych. Skuteczne, indukowane podwojenie liczby chromosomów zależne jest od kilku czynników, gdzie do najważniejszych należą rodzaj eksplantatu/tkanki i wybór związku antymitotycznego. Ważnym aspektem jest określenie dawek inhibitorów mitotycznych najbardziej optymalnych i czasu inkubacji w ich obecności. Efektem zastosowania zbyt wysokich stężeń był spadek przeżywalności eksplantatów, zaś zbyt małych – niewielka efektywność diploidyacji.

Literatura:

- Conger, B.V., Hovanesian, J.C., Trigiano, R.N., Gray, D.J. (1989). Somatic embryo ontogeny in suspension cultures of orchardgrass. *Crop Science* 29: 448–452
- Hoekstra S, Van Zijderveld Mh, Louwerse Jd, Heidekamp F, and Van Der Mark, F. (1992). Anther and Microspore culture of *Hordeum vulgare* (L.) cv. Igri. *Plant Science* 86(1): 89–96.
- Kumlehn, J., Serazetdinova, L., Hensel, G., Becker, D., and Lörz, H. (2006). Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal*, 4: 251–261
- Oleszczuk s, Sowa S, and Zimny, J. (2004). Direct embryogenesis and green plants regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (\times Triticosecale Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Reports* 22: 885–893.

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

Würschum T, Tucker MR, Maurer HP, Leiser, W. (2015). Ethy-

lene inhibitors improve efficiency of microspore embryogenesis in hexaploid triticale. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 122:751–757

Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego

Linkage and association mapping of oat

Edyta Paczos-Grzęda ¹✉, Sylwia Sowa ¹, Joanna Toporowska ¹, Ewelina Marek ¹, Aneta Koroluk ¹, Piotr Bednarek ²

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

²Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB, Radzików,

✉ e-mail: edyta.paczos@up.lublin.pl, tel. 81 4456884

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, HOR.hn. 802.8.2019, Zadanie nr 30.

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

Rozwój badań nad owsem w dużej mierze jest limitowany brakiem konsensusowej mapy genetycznej opracowanej w oparciu o ogólnie dostępne markery molekularne. 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.

Celem zadania było precyzyjne fenotypowanie wczesnych pokoleń mieszańców i populacji RIL, kontynuowanie rozmnożeń materiałów przeznaczonych do uzyskania zaawansowanych międzyodmianowych i międzygatunkowych rekombinacyjnych linii wsobnych, genotypowanie i fenotypowanie populacji mapującej RIL E310, konstrukcja mapy oraz identyfikacja QTLi dla wybranych cech w międzyodmianowej populacji mapującej RIL E101 oraz fenotypowanie linii i odmian *A. sativa* przeznaczonych do analiz asocjacyjnych – weryfikacja fenotypów form skrajnych oraz markerów asocjowanych z wysokością roślin

W realizowanym projekcie wyprowadzono międzyodmianowe populacje mieszańcowe z połączonymi genami karłowatości *Dw4*, *Dw7*

i/lub *DwPD*) oraz międzygatunkowe pomiędzy *A. sterilis* i *A. fatua*. Kontynuowano rozmnożenia uprzednio uzyskanych międzyodmianowych i międzygatunkowych populacji w kierunku populacji RIL.

Przeprowadzono fenotypowanie międzygatunkowej populacji mapującej RIL E310 F_8 Celer \times STH9210. Analizowano wysokość, długość wiechy, liczbę kłosek, liczbę i masę ziarniaków z wiechy. Dokonano oceny 10 roślin z każdej linii RIL. W sumie ocenie poddano 300 linii, czyli 3000 roślin pokolenia F_8 oraz po 30 roślin rodzicielskich. Fenotypowaniu poddano również mieszańce populacji F_2 E958 (Trelle Dwarf \times North Carolina). Trelle Dwarf jest formą karłowatą, u której skrócona słoma jest efektem działania pojedynczego genu (prawdopodobnie *Dw4*), zaś North Carolina posiada gen *Dw7*. Fenotypowanie roślin F_2 polegało na ocenie wysokości roślin, liczby pędów produkcyjnych i niedogonów, długości wiechy, liczby kłosek oraz liczby i masy ziarniaków z wiechy. Z wysianych ziarniaków skielkowało i osiągnęło dojrzałość 141 roślin.

Fenotypowaniu pod względem sposobu osypywania poddano międzygatunkowe populacje F_2 E937 (*A. sterilis* 172 \times *A. fatua* 525) i E942 (*A. fatua* 523 \times *A. sterilis* 66). Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono, że dominującym sposobem osypywania jest charakterystyczny dla *A. sterilis* model osypywania całych kłosek. Osypywanie pojedynczych ziarniaków ma charakter recesywny.

W krzyżowaniach z *A. sativa*, forma udomowiona, której kłoski pozostają na wieszce po dojrzeniu ma charakter dominujący w stosunku do obu sposobów osypywania, które mają charakter recesywny. Rozkład fenotypów w populacji wskazuje na dziedziczenie jednogenowe.

Genotypowaniu metodą DArTseq poddano 130 linii reprezentujących populację RIL E310 (Celer × STH 9210) oraz formy rodzicielskie. Na podstawie segregacji markerów DArTseq w populacji mapującej RIL E101 Bingo × STH 9787 opracowano mapę genetyczną. Skonstruowana mapa obejmuje 21 grup sprzężeń, co odpowiada liczbie chromosomów heksaploidalnego owsa. Pełna długość mapy wynosi 1895 cM, obejmuje 478 markerów szkieletowych i 3860 markerów redundantnych. Identyfikację QTLi przeprowadzono dla 5 cech fenotypowych analizowanych w populacji E101 w poprzednim roku badań: wysokości roślin, długości wiechy, liczby kłosków w wieszce oraz liczby i masy ziarniaków w wieszce.

Mapowanie interwałowe wysokości roślin metodą CIM ujawniło obecność 4 QTL występujących w 4 grupach sprzężeń. W przypadku liczby kłosków CIM wyodrębniło siedem QTL. Dwa o odziedziczalności 16.5 oraz 11.5% zlokalizowane w obrębie LG03 i LG14. Analiza liczby ziarniaków wykazała obecność sześciu QTL. Największą wartość funkcji LOD obserwowano dla LG03 (odziedziczalność – 15%). Analiza występowania QTLi dla masy ziarniaków wyodrębniła siedem lokalizacji. Najsilniejsze QTL zidentyfikowano w obrębie LG18 i LG15. QTL e długości wiechy występują w obrębie czterech grup sprzężeń. Najsilniejszy, o największej odziedziczalności występuje na LG19 (LOD 12). Cechuje go odziedziczalność na poziomie 16%.

Z uwagi na duże różnice pomiędzy powtórzeniami w latach wartości cech fenotypowanych w obrębie 370 odmian i linii przeznaczonych do mapowania asocjacyjnego przeprowadzono ponowne fenotypowanie 200 wybranych odmian i linii. Oprócz wysokości roślin określono również wczesność, odporność na choroby oraz MTZ. Analiza asocjacyjna przeprowadzona w programie TASSEL umożliwiła identyfikację kolejnych 20 markerów silicoDArT oraz DArTseq, które asocjowały z wysokością roślin. Analiza asocjacyjna dla

wysokości roślin została wykonana ponownie dla 370 odmian i linii owsa w oparciu o wyniki genotypowania DArTseq i silicoDArT oraz fenotypowania poszerzonego o wyniki z roku 2019. Spośród 50 tys. markerów zaledwie 20 wykazało asocjację z wysokością roślin potwierdzoną testem Bonferroniego w jednym powtórzeniu, a spośród nich zaledwie dwa, jeden DArTseq – 5442565_GT_39 i jeden silicoDArT – 13736283 – asocjowały w dwóch powtórzeniach. Żaden z nowo zidentyfikowanych markerów nie był dotychczas rozpatrywany jako marker zasocjowany z wysokością.

Wnioski:


- Fenotypowanie międzyodmianowej populacji mapującej RIL F₈ E310 wykazało wysokie zróżnicowanie analizowanych cech.
- Analiza cech ilościowych w populacjach E958 oraz E310 wykazała, że nie mają one rozkładu normalnego, co wskazuje na obecność genów głównych.
- Odmiana Trelle Dwarf posiada gen odmienny aniżeli *Dw7* i jest to prawdopodobnie gen *Dw4*.
- Osypywanie typu 'sterilis' ma charakter dominujący w stosunku do osypywania typu 'fatua'.
- Skonstruowana mapa genetyczna złożona jest z 21 grup sprzężeń, co odpowiada liczbie chromosomów heksaploidalnego owsa. Pełna długość mapy wynosi 1895cM, obejmuje 478 markerów szkieletowych i 3860 markerów redundantnych.
- Najlepsze dopasowanie segregacji markera asocjowanego z wysokością roślin do fenotypu uzyskano dla pary starterów Aso_24_F1b i R1. Podobnie jak w roku poprzednim, największym dopasowaniem charakteryzował się marker uzyskany przy udziale starterów opracowanych w oparciu o sekwencję markera silicoDArT 3455024.


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.
- Rex, B. (2013). Genomewide Markers for Controlling Background Variation in Association Mapping. *Plant Gen.* 10.3835/plantgenome2012.11.0028.

Piramidyzacja genów odporności na rdzę koronową w genomie owsa oraz identyfikacja i lokalizacja markerów DNA dla tych genów

Crown rust resistance genes pyramiding in oat genome and identification of DNA markers for these genes

Edyta Paczos-Grzęda , Sylwia Sowa, Joanna Toporowska, Ewelina Marek, Aneta Koroluk

Instytut Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie,
 e-mail: edyta.paczos@up.lublin.pl, tel. 81 4456884

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.802.8.2019, Zadanie nr 31.

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

Chorobą najczęściej pojawiającą się na owsie, nie tylko w warunkach naszego kraju, ale również w centralnej i południowo-wschodniej Europie, basenie Morza Śródziemnego, Ameryce Płn. i Płd. oraz Australii jest rdza koronowa (Simons 1985, Nazareno i in. 2018). Czynnikiem infekcyjnym jest grzyb *Puccinia coronata* Cda. f. sp. *avenae* P. Syd. & Syd. (Simons 1985). Forma specjalna *avenae* atakuje wiele gatunków traw, ale nie poraża innych, poza owsem, gatunków zbóż. Grzyb może rozwijać się na wszystkich zielonych częściach roślin, głównie jednak liściach, pochwach liściowych i wiechach. Monitorowanie zmian w populacji patogenu oraz sukcesywne prace nad określeniem efektywnych na obszarze Polski genów odporności na rdzę koronową umożliwiając naturalne jego zwalczanie poprzez wprowadzanie genów odporności do nowych odmian i eliminując konieczność stosowania fungicydów, co jest korzystne ze względów ekonomicznych i sprzyja ochronie środowiska naturalnego.

Celem prowadzonych badań było określenie patogeniczności izolatów *Puccinia coronata* zebranych w roku 2018, identyfikacja efektywnych w Polsce genów *Pc* oraz uzyskanie złożonych kombinacji genów odporności na rdzę koronową. Ponadto celem podjętych badań była próba konwersji na markery specyficzne sekwencji DArTseq sprzężonych z obecnością genu *Pc60*.

W zadaniu określono patogeniczność izolatów

Puccinia coronata wyprowadzonych z populacji skolekcjonowanych w roku 2018 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 odpornością w stadium siewki charakteryzowały się linie zawierające geny *Pc52*, *Pc91* oraz *Pc104*, które nie zostały przełamane przez żaden z testowanych izolatów. Odporność warunkowaną genami *Pc51U*, *Pc59U*, *Pc59K*, *Pc51K*, *Pc98K*, *Pc50U*, *Pc57* oraz *Pc60* przełamały w niewielkim stopniu jedynie pojedyncze izolaty, ponadto wysokim poziomem odporności wykazały się linie z genami *Pc68*, *Pc71*, *Pc101*, a także *Pc46K*.

W roku 2019 najsilniejsze porażenie grzybem *P. coronata*, na poziomie ok. 72%, zaobserwowano w Polanowicach. W Czesławicach poziom wirulencji wyniósł 57%. Pełną odporność w warunkach naturalnej infekcji polowej, w stadium rośliny dorosłej, nadawały geny *Pc51U*, *Pc52*, *Pc59U*, *Pc59K*, *Pc68*, *Pc71*, *Pc91* oraz *Pc101*. Inne, wartościowe w stadium rośliny dorosłej geny to: *Pc50* i *Pc94* oraz *Pc60*, a także *Pc57*, *Pc97*, *Pc51K* oraz *Pc96U*. W przypadku genów *Pc51U*, *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

mieszkańców pomiędzy formami ze zdefiniowanymi genami odporności. W efekcie prowadzonych krzyżowań mieszkańców dwugenowych uzyskano kombinacje trójgenowe *Pc39U*, *Pc50U*, *Pc59U* oraz *Pc39U*, *Pc50K*, *Pc50U*. Krzyżowania pomiędzy mieszkańcami trójgenowymi doprowadziły do uzyskania form czterogenowych *Pc39+Pc52+Pc60+Pc91* oraz *Pc39+Pc52+Pc60+Pc70*. Coraz niższa efektywność krzyżowania obserwowana wraz ze wzrostem kumulowanych genów odporności może wynikać z ekspresji u mieszkańców genów niekorzystnie wpływających na zawiązywanie ziarniaków, a jednocześnie obniżających płodność. Należy to uwzględnić planując w przyszłości prace hodowlane.

Przeprowadzono ocenę segregacji genów odporności w 4 populacjach mieszkańców F_3 z genami *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* i *Pc59U*. Wytypowano izolaty umożliwiające identyfikację tych genów w kolejnych pokoleniach mieszkańców. W wyniku przeprowadzonych testów wytypowano również rośliny homozygotyczne – odporne i porażone, które w latach kolejnych mogą posłużyć do poszukiwania markerów molekularnych dla genów *Pc50K*, *Pc50U*, *Pc59K* i *Pc59U*.

Konwersji na markery specyficzne dla genu *Pc60* poddano 4 sekwencje o wysokim podobieństwie do znanych genów odporności u innych gatunków. Największą zgodność segregacji markera z cechą uzyskano dla pary 60_38_F1 + 60_38_R1 zaprojektowanej w oparciu o sekwencję markera silicoDArT 3278538 o wysokim podobieństwie do związanego z odpornością białka RPP-13-like u traw. Analiza sekwencji uzyskanego w wyniku amplifikacji z w/w starterami produktu o masie wielokrotnie przekraczającej masę produktu

oczekiwanego może przyczynić się do określenia genetycznych podstaw odporności warunkowanej genem *Pc60*.

Wnioski

- Najsilniejsze izolaty *Puccinia coronata* wyprodukowano z populacji skolekcjonowanych w roku 2018 w Polanowicach i Czesławicach.
- W roku 2019 najsilniejsze porażenie grzybem *P. coronata* w warunkach naturalnej infekcji polowej na poziomie ok. 72% zaobserwowano w Polanowicach.
- Najbardziej efektywne w warunkach Polski w latach 2018–2019 były geny *Pc52* oraz *Pc91*.
- Na podstawie segregacji markerów DArT i DArTseq zidentyfikowano sekwencje sprzężone z obecnością genu odporności *Pc60*. Skutecznej konwersji na markery specyficzne dla allelu dominującego genu *Pc60* poddano kilka z nich. Największą zgodność segregacji markera z cechą uzyskano dla pary 60_38_F1 + R1 zaprojektowanej w oparciu o sekwencję markera silicoDArT 3278538.
- Analiza BLAST sekwencji silicoDArT 3278538 wykazała jej podobieństwo do białka RPP-13 like.

Literatura

- Nazareno, E.S., Li, F., Smith, M., Park, R.F., Kianian, S.F., Figueroa, M. (2018). *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*: a threat to global oat production. *Mol. Plant Pathol.* 19(5), 1047–1060.
- Simons, M.D. (1985). *Crown rust*. W: *The Cereal Rusts: Vol. II. Diseases, Distribution, Epidemiology, and Control*. Red: Roelfs, A. P., Bushnell, W. R. Academic Press, Orlando, FL, 131–172.

Badanie genomu rzepaku ozimego przy wykorzystaniu markerów molekularnych

The investigation of winter rapeseed genome with the use of molecular markers

Iwona Bartkowiak-Broda ✉, Katarzyna Mikołajczyk, Alina Liersch, Marcin Matuszczak, Joanna Wolko, Joanna Nowakowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików,
✉ e-mail: ibart@nico.i.har.poznan.pl, tel. 61 8233721

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, Zadanie 48.

Słowa kluczowe: fenotyp, genotyp, markery molekularne, rzepak ozimy, (*Brassica napus* L.)

Nasiona rzepaku (*Brassica napus* L. var. *oleifera*) są źródłem oleju roślinnego znajdujące różnorodne zastosowanie zarówno do celów spożywczych jak i przemysłowych oraz dostarczają cennego białka paszowego w śrucie lub wytłokach (Bartkowiak-Broda 2009). Najważniejszymi obecnie realizowanymi kierunkami hodowli rzepaku ozimego jest podnoszenie plenności i wykorzystanie efektu heterozji w odmianach mieszańcowych, zwiększenie odporności na stropy biotyczne i abiotyczne, ulepszanie cech jakościowych nasion dla uzyskania oleju o różnym przeznaczeniu i wysokiej jakości surowca dla przemysłu paszowego i spożywczego (Wittkop i in. 2009, Spasibonek 2013).

Realizowane zadanie dotyczy problemu poznania i detekcji genotypów rzepaku charakteryzujących się ważnymi gospodarczo cechami użytkowymi. Skuteczna selekcja w hodowli roślin opiera się w coraz szerszym zakresie na analizach genomów. Umożliwiają one poznanie struktury genomów, wyznaczenie zmienności genetycznej w obrębie badanych form hodowlanych, identyfikację markerów genetycznych charakterystycznych dla danego genotypu (ang. fingerprinting), a także wytypowanie markerów genetycznych znajdujących zastosowanie w procesie hodowlanym (ang. MAB, marker-assisted breeding).

Celem zadania w 2019 roku było genotypowanie i fenotypowanie oraz analizy asocjacyjne kolekcji genotypów rzepaku zgromadzonej w IHAR-PIB, Oddział Poznań.

Zadanie realizowano w ramach trzech tematów badawczych:

1. Charakterystyka molekularna kolekcji genotypów rzepaku ozimego;
2. Charakterystyka fenotypowa badanych genotypów kolekcji PB17-20 w doświadczeniach polowych - kontynuacja z roku 2018;
3. Analizy asocjacyjne pomiędzy genotypami i ważnymi gospodarczo cechami ilościowymi badanej kolekcji PB17-20.

Materiał roślinny w badaniach stanowiły kolekcje: PB14-17 (25 genotypów), PB17-20 (25 genotypów), kolekcja heterozyjna IHAR – KH19 (20 genotypów) i kolekcja referencyjna KR19 (15 genotypów) – łącznie 85 genotypów. Kolekcje te obejmowały linie hodowlane, odmiany populacyjne i mieszańcowe rzepaku, linie rodzicielskie do tworzenia mieszańców, linie podwojonych haploidów, rekombinanty o zróżnicowanym składzie chemicznym nasion oraz formy *B. napus* otrzymane w wyniku resyntezy z gatunków ancestralnych.

W celu monitorowania obecności męsko-sterylnej cytoplazmy CMS *ogura*, genu restorera *Rfo* w kolekcji heterozyjnej KH19 zastosowano test „Multipleks SCAR” (Mikołajczyk i in., 2011), metodę SNaPshot do oceny obecności zmutowanych alleli genu desaturazy FAD3 oraz analizę kodominującymi markerami typu CAPS na obecność zmutowanych alleli genu desaturazy FAD 2 (Falentin i in., 2007) w wybranych dwudziestu genotypach z kolekcji PB14-17 i PB17. Określono zróżnicowanie genetyczne 50 genotypów dwóch kolekcji z zastosowaniem markerów 85 loci mikrosatelitarnych, a wyniki analiz przedstawiono graficznie w formie dendrogramu. Badane genotypy zostały pogrupowane w cztery odrębne

klastry. W bieżącym roku zaplanowano rozpoczęcie analiz genetycznych badanych kolekcji rzepaku z wykorzystaniem wysokoprzepustowej techniki, jaką stanowi analiza z zastosowaniem mikromacierzy SNP-chip 15K BRASSICA (85 genotypów), a szczegółowe opracowanie bioinformatyczne uzyskanych wyników będzie przedmiotem badań w 2020 roku. Ponadto genotypy kolekcji KH19 analizowano z wykorzystaniem wysokoprzepustowej mikromacierzy SNP-chip 60K BRASSICA (TraitGenetics GmbH, Gatersleben, Niemcy).

25 genotypów kolekcji PB17-20 fenotypowano (2. rok badań) w doświadczeniach polowych założonych w dwóch środowiskach, w układzie bloków kompletnie zrandomizowanych w trzech powtórzeniach. Badano następujące cechy: przezimowanie i obsadę roślin, plon nasion, cechy struktury plonu, zawartość tłuszczu, glukozyzolanów, białka, frakcji włókna ADF i NDF oraz skład kwasów tłuszczowych. Wszystkie badane w dwóch środowiskach genotypy rzepaku wchodzące w skład kolekcji PB17-20 wykazały istotne zróżnicowanie pod względem większości badanych cech.

Analizy asocjacyjne genotypu z fenotypem dla kolekcji genotypów PB17-20 przeprowadzono dla siedmiu cech: wczesność, długość kwitnienia, plon nasion i cechy struktury plonu (długość łuszczyń, liczba nasion w łuszczyń, MTN) oraz zawartości tłuszczu w nasionach z 640 markerami molekularnymi (2 markery typu SCAR-CMS i *Rfo*; 2 markery CAPS dla FAD2-HOR3 i HOR4, 4 markery typu SNaPshot dla FAD3, 10 kombinacji starterów AFLP oraz 85 loci STR). W sumie zaobserwowano 1241 asocjacji z przynajmniej jedną z siedmiu badanych cech w przynajmniej jednym środowisku. Procent całkowitej zmienności fenotypowej wyjaśnianej przez poszczególne markery wyniósł odpowiednio od 19,02 % dla plonu nasion do 40,35% dla zawartości tłuszczu.

Przedstawione wyniki stanowią także częściowe podsumowanie wyników badań uzyskanych w poprzednich latach. Badania te będą kontynuowane w kolejnym sezonie wegetacyjnym 2019/2020 (fenotypowanie i genotypowanie z wykorzystaniem wysoko-przepustowej mikromacierzy SNP-chip 15K BRASSICA).

Analizy genetyczne z zastosowaniem tradycyjnych markerów SCAR, SNaPshot, CAPS oraz wysokoprzepustowych analiz nowej generacji jakimi są mikromacierze SNP-chip 15K oraz 60K BRASSICA powinny stanowić istotny element procesu hodowli twórczej. Z jednej strony umożliwiają monitorowanie czystości materiału siewnego,

a z drugiej precyzyjną selekcję i odpowiedni dobór komponentów rodzicielskich do hodowli odmian mieszańcowych. Analizy z zastosowaniem *loci* STR charakteryzują się dużą powtarzalnością i stanowią obok dogodnego narzędzia do badań zróżnicowania genetycznego i tworzenia odrębnych pul, genowych możliwość przeprowadzenia analiz asocjacyjnych z cechami fenotypowymi związanymi z plonem i cechami struktury plonu oraz cechami jakościowymi wpływającymi na wartość agronomiczną linii hodowlanych. W przeprowadzonej analizie asocjacji zaobserwowano osiem markerów związanych z plonem nasion, przy czym siedem (STR - 3 i AFLP - 4) związanych było z wyższym poziomem plonowania badanych genotypów. Z najważniejszymi cechami struktury plonu związanych było odpowiednio: dziewięć markerów z długością łuszczyń, 10 markerów z liczbą nasion w łuszczyń, a 12 z MTN. Wyselekcjonowane markery dla cech fenotypowych zostaną zweryfikowane w kolejnym sezonie wegetacyjnym 2019/2020, na podstawie doświadczeń polowych w dwóch środowiskach.

Istotne jest, że podczas realizacji bieżącego zadania wdrażane są w IHAR-PIB, Oddział w Poznaniu metody analiz genetycznych nowej generacji z przeznaczeniem do wykorzystania w hodowli twórczej rzepaku ozimego.

Literatura

- Bartkowiak-Broda, I. (2009). Nowe odmiany rzepaku, nowa jakość oleju. W: Olej rzepakowy – nowy surowiec, nowa prawda. Teraz rzepak Teraz olej. Krzymański, J. (red). Polskie Stowarzyszenie Producentów Oleju, Warszawa, II: 7–24.
- Falentin, C., Brégeon, M., Lucas, M.-O., Renard, M. (2007). Genetic markers for high oleic content in plants. International Patent Publication WO 2007/138444
- Mikołajczyk, K., Bartkowiak-Broda, I., Popławska, W., Spasibionek, S., Dobrzycka, A., Dabert, M. (2011). A multiplex fluorescent PCR assay in molecular breeding of oilseed rape. W: Plant Breeding, wyd. przez InTech Open Access Publisher (red. Abdurakmonov, I. Y.), rozdz. 8, str. 185–200 (całość 352 str.)
- Spasibionek, S. (2013). Badania genetyczno-hodowlane mutantów rzepaku ozimego (BRASSICA NAPUS, L.) o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych. Genetic and breeding of winter oilseed rape mutants (BRASSICA NAPUS, L.) with changed fatty acid composition. Monografie i Rozprawy Naukowe IHAR-PIB, 47: 7–106.
- Wittkop, B., Snowdon, R.J., Friedt, W. (2009). Status and perspectives of breeding for enhanced yield and quality of oilseed crops for Europe. Euphytica, 170: 131–140.

Wprowadzanie nowych alleli z pul genowych różnych gatunków z rodzaju *Brassica* do bazy genowej rzepaku ozimego

Introduction of new alleles from the gene pools of various *Brassica* species in winter oilseed rape genome

Teresa Cegielska-Taras ✉, Laurencja Szała, Katarzyna Sosnowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, Oddział w Poznaniu, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych, Pracownia Kultur Tkankowych, ul. Strzeszyńska 36, 60-479 Poznań, ✉ e-mail: tceg@nico.ihar.poznan.pl, tel. 61 8464205, 61 8464206

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych ma rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.3.2019, Zadanie nr 51.

Słowa kluczowe: *Brassica napus* L., fenotypowanie, genotypowanie, linie semi-resyntetyzowane, mikromacierze, resynteza, rzepak

Celem badań było otrzymanie roślin mieszańcowych z krzyżowań międzygatunkowych *Brassica oleracea* i *Brassica rapa*, uzyskanie nasion z roślin rzepaku resyntetyzowanego (RS), krzyżowanie rzepaku RS z rzepakiem podwójnie ulepszonym oraz analiza genotypowa i fenotypowa „nowego” rzepaku.

Dla wprowadzenia rzepaku resyntetyzowanego do linii CMS *ogura* wykonano krzyżowania linii CMS z podwójnie ulepszonymi liniami DH semi-RS rzepaku: CMS 896 × semi-RS 25/4 oraz CMS 430 × semi-RS 27/25. W wyniku wprowadzenia rzepaku resyntetyzowanego do linii męskosterylnych uzyskany zostanie nowy komponent do tworzenia rzepaku mieszańcowego. Linia CMS *ogura* już po trzecim krzyżowaniu wstecznym z wybraną linią podwójnie ulepszoną może być użyta do tworzenia mieszańców F_1 .

Jednym ze sposobów ulepszania rzepaku RS jest krzyżowanie tych genotypów z rzepakiem naturalnym podwójnie ulepszonym i przeprowadzenie androgenyzy *in vitro* z uzyskanych mieszańców, czyli wytworzenie populacji linii DH semi-RS, spośród których można wyselekcjonować genotypy podwójnie ulepszone. Z dawcy oznaczonego D33, stosując opracowaną standardową metodę otrzymywania linii DH w kulturze izolowanych mikrospor, uzyskano 306 roślin z pięciu izolacji. Natomiast z dawcy 34 mimo wielokrotnych izolacji i stosowania wielu wariantów do stymulacji mikrospor do rozwoju sporofitowego uzyskano łącznie 30 zarodków

rozwijających się bardzo powoli zarówno w fazie wzrostu embrionalnego, jak i różnicowania w tkanki i organy. Ta sytuacja jest potwierdzeniem wcześniejszych wyników, że zdolność do stymulacji podziałów mikrospor w procesie androgenyzy *in vitro* i regeneracji roślin ma podłoże genetyczne, co jest od dawna podkreślane przez wielu autorów.

Wśród badanych 40 linii DH semi-RS nie wyselekcjonowano żadnej linii o jakości rzepaku podwójnie ulepszanego (tabela 1). Jednak kilka linii zeroerukowych i dwie linie o dopuszczalnej zawartości glukozyolanów (poniżej $15 \mu\text{M} \cdot \text{g}^{-1}$) będą mogły być komponentami do dalszych krzyżowań w celu uzyskania linii semi-RS spełniających kryteria rzepaku podwójnie ulepszanego.

Nowe techniki analizy wysokoprzepustowych danych genotypowych, szczególnie w połączeniu z nowo dostępną referencyjną sekwencją genomu, służą do badania skali różnorodności genetycznej niezbędnej w predykcji celowości krzyżowań np. w hodowli mieszańcowej. Na podstawie wyników mikromacierzy Illumina Infinium *Brassica* 60K SNP dokonano porównania linii rzepaku resyntetyzowanego z genotypami rodzicielskimi (*B. rapa* i *B. oleracea*). Analizowane linie rzepaku nowego typu wykazały różnorodność i liczne zmiany genomowe. Zróżnicowanie genetyczne linii RS względem linii rodzicielskich (*B. rapa* i *B. oleracea*) przedstawiono w formie graficznej w układzie dwóch pierwszych składowych głównych (rys. 1.). Dalsza szczegółowa analiza

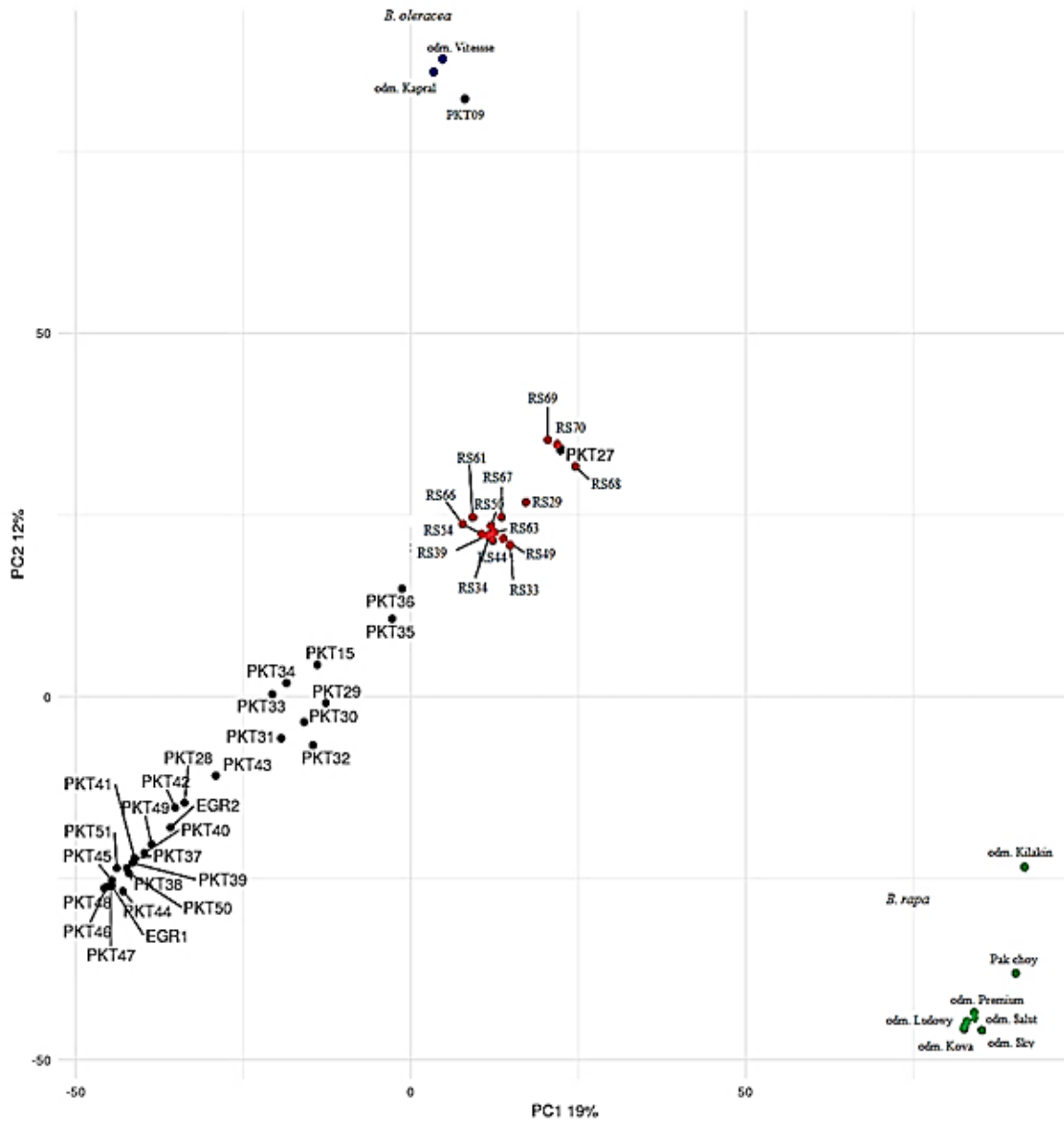
będzie prowadzona w układzie z danymi fenotypowymi badanych genotypów. Założono doświadczenie z genotypami *Brassica* ssp. będącymi komponentami linii RS. Obecnie rośliny rozwijają

się w warunkach naturalnych, dzięki czemu będzie możliwa prawidłowa ocena badanych genotypów pod względem wybranych cech fenotypowych.

Tabela 1

Zawartość kwasu erukowego i glukozynolanów w 40 liniach DH semi-RS

Linia	Zawartość	
	kw. erukowego (%)	GSL ($\mu\text{M g}^{-1}$ nasion)
D28-1	49,1	13,5
D28-2	28,5	57,7
D28-3	51,9	29,3
D28-4	50,8	64,2
D28-5	26,3	83,8
D28-6	25,5	20,3
D28-7	0,0	43,2
D28-8	28,2	53,1
D28-9	0,0	61,5
D28-10	19,8	36,7
D28-11	0,0	37,2
D28-12	28,7	82,9
D28-13	27,4	85,6
D28-14	28,6	81,6
D28-15	46,6	52,3
D28-16	42,3	65,6
D28-17	45,0	61,7
D28-18	43,8	52,8
D28-19	39,5	66,2
D28-20	34,9	79,0
D29-1	20,0	13,6
D29-2	22,5	49,9
D29-3	17,5	90,8
D29-4	23,3	109,3
D29-5	17,7	54,2
D29-6	0,0	36,9
D29-7	0,0	37,2
D29-8	38,6	96,3
D29-9	21,4	53,9
D29-10	0,0	26,6
D29-11	0,0	28,3
D29-12	0,0	42,7
D29-13	13,5	37,5
D29-14	16,3	29,9
D29-15	14,5	59,5
D29-16	0,0	33,7
D29-17	13,8	16,4
D29-18	16,5	36,4
D29-19	30,3	83,2
D29-20	28,8	54,6



Rys. 1. Rozmieszczenie linii RS względem linii rodzicielskich (*B. rapa* i *B. oleracea*) w układzie dwóch pierwszych składowych głównych.

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

Krzysztof Michalski ✉, Renata Daleka, Mariola Ebertowska, Czesława Fink, Justyna Karauda

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Radzików,
Oddział w Poznaniu Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych,
✉ e-mail: km2@nico.ihar.poznan.pl, tel. 61 8464207

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, nr HOR.hn.802.3.2019 Zadanie nr 55.

Słowa kluczowe: rzepak, NIRS, analiza, glukozynolany, białko, włókno

Temat badawczy 1

Określenie zmienności składu i zawartości glukozynolanów w próbkach nasion rzepaku.

Celem tematu jest rozbudowanie bazy danych o widma próbek nasion rzepaku reprezentatywnych dla zawartości glukozynolanów w 2019 roku. Analiza glukozynolanów w nasionach rzepaku wykonywana jest metodą chromatografii gazowej silylowych pochodnych desulfogukozynolanów (metoda ze wzorcem wewnętrznym – glukotropeoliną). Dane spektralne zbierane były za pomocą spektrometru NIRS 6500 i programu ISISCAN (FOSS). Zakres widma wynosi od 400 do 2500 nm. Do obliczeń użyto programu WINISI (FOSS).

Zebrany zbiór próbek obejmuje zmienność występująca w roku 2019 w obszarze Polski zachodniej (Borowo, Małyszyn Poznań), co pozwala wprowadzić do kalibracji zmienność geograficzną i gwarantuje bardziej równomierne wypełnienie kalibrowanego zakresu. Zbiór kalibracyjny zawierający próbki reprezentatywne dla całej populacji i obejmujący dane z kilku lat pozwala na otrzymanie równań bardziej odpornych na nieprzewidziane zmiany składu mierzonych próbek. W 2019 udało się

dodać próbki o dużej zawartości glukozynolanów (do 99 mikromol/g nasion). Całkowity udział próbek o skrajnych wartościach jest niewielki w danej populacji, co wymaga przebadania możliwie dużego zbioru próbek, aby zapewnić dostateczną liczbę próbek o pożądanym składzie chemicznym.

Temat badawczy 2

Określenie zmienności zawartości białka, tłuszczu i włókna w próbkach nasion.

Celem tematu jest wyselekcjonowanie we współpracy z hodowcami próbek rzepaku cechujących się zróżnicowaną zawartością białka w nasionach, zeskanowanie widm tychże oraz ich analiza referencyjna. W roku 2019 pozyskano do celów kalibracyjnych 104 próbki rzepaku o zróżnicowanych cechach jakościowych zebranych w różnych miejscowościach (Borowo, Małyszyn, Poznań). Zebrane próbki poddano analizie referencyjnej (analiza białka metodą Kjeldahla, analiza zawartości włókna metodą van Soesta, analiza zawartości tłuszczu na spektrometrze NMR model MQA 7005). Wybrane próbki obejmują zmienność występującą w roku 2019 w obszarze Polski zachodniej (Borowo, Poznań, Małyszyn),

Tabela 1

Wartości błędów kalibracji cząstkowych

Składnik	Błąd kalibracji 2014-2018	Błąd walidacji skrośnej 2014-2018	Błąd kalibracji 2014-2019	Błąd walidacji skrośnej 2014-2019	Dokładność 14-18 do 14-19	jednostki
Glukonapina	1,1	1,1	1,3	1,3	-	µM/g
Progoitryna	2,3	2,3	2,3	2,4	-	µM/g
Glukobrassyca	0,1	0,1	0,1	0,1	=	µM/g
4-hydroxyglukobrassyca	1	1	.997	1,26	-	µM/g
Suma glukozy-nolanów	3,3	3,4	3,7	3,8	--	µM/g
Suma steroli	4100	4600	3500	3800	++	ppb
Białko	0,76	0,86	1,0	1,0	-	% masy
Tłuszcz	0,8	0,85	1,1	1,2	--	% masy
NDF	1	1,1	1,4	1,6	-	% masy
ADF	0,96	1,1	1,3	1,4	-	% masy

co pozwala wprowadzić do kalibracji zmienność geograficzną i gwarantuje równomierne wypełnienie kalibrowanego zakresu, a w efekcie pozwala na otrzymanie równań odpornych na nieprzewidziane zmiany składu mierzonych próbek.

Pozyskano próbki o wysokiej zawartości tłuszczu (49,0%) a także zadowalającą zmienność zawartości włókna NDF i ADF oraz białka. Probki w połączeniu z danymi z roku 2014 - 2018 pozwalają wyliczyć równania kalibracyjne dla oznaczanych parametrów z dokładnością wystarczającą do celów pomiarowych.

Temat badawczy 3

Określenie zmienności w składzie i zawartości podstawowych steroli w oleju.

Pobrano próbki nasion rzepaku z linii i odmian będących w opracowaniu w IHAR O/Poznań i spółkach IHAR oraz z kolekcji odmian rzepaku w ilości 60 próbek. Zebrane próbki zeskanowano na spektrofotometrze NIRS 6500 i poddano analizie referencyjnej (analiza steroli w oleju metodą chromatografii gazowej na chromatografie HP7890a). Wybierając próby do zbioru kierowano się pochodzeniem próbek i zawartością steroli w próbce – preferowane były zróżnicowane zawartości steroli. Zebrany zbiór z lat 2014–2019 został wykorzystany do estymacji możliwości stworzenia równania. Otrzymane kalibracje pozwalają sądzić, iż przynajmniej niektóre sterole (cholesterol, campestanol, avenasterol) nadają się do kalibracji.

Temat badawczy 4

Opracowanie cząstkowych kalibracji NIRS, aby oszacować błąd metody.

Zebrane widma z wynikami referencyjnymi z lat 2014–2019 użyto do wyliczenia kalibracji na oznaczane parametry. W tabeli 1 zestawiono

wyniki błędów kalibracji i walidacji na próbkach zebranych w latach 2014–2019.

Jakość kalibracji ocenia się wykorzystując parametry statystyczne takie jak błąd kalibracji (SEC) liczony dla równania, współczynnik korelacji (Adj RSQ - choć ten zależy w dużym stopniu od zakresu chemicznego) oraz błąd walidacji skrośnej (SECV) lub błąd walidacji na zbiorze prób nie należących do zbioru kalibracyjnego (SEV).

Otrzymane wyniki kalibracyjne dla glukozy-nolanów dobrze estymują zawartość głównych glukozy-nolanów. Błąd pomiaru jest mniejszy od raportowanych w literaturze (ok. 4 µM/g).

Probki z 2019 pozwoliły poszerzyć zakres zmienności choć odbyło się to kosztem nieco mniejszej dokładności równania. Jednym z powodów takiej sytuacji jest pogorszenie dokładności analizy referencyjnej - powyżej 40 mikromoli/g nasion staje się nieliniowa. Współczynnik korelacji jest stosunkowo niski co wiąże się z zakresem dostępnej zmienności (większość próbek to próbki niskiej zawartości glukozy-nolanów).

Stworzony zbiór kalibracyjny praktycznie pokrywa całą zmienność glukozy-nolanów w rzepaku i może być podstawą do równania selekcyjnego.

Również dokładność równań dla białka, tłuszczu, włókna ADF i NDF jest wystarczająca dla ich praktycznego użytkowania.

Sterole nadal wymagają ulepszenia poprzez powiększenie bazy danych.

Porównanie błędów dla zbioru 2014–18, 2014–19 pokazuje stabilizację dokładności dla glukozy-nolanów, poprawę dokładności dla steroli oraz NDF i ADF i lekkie pogorszenie dla tłuszczu.

Porównując wyniki kalibracji z poprzednich lat z obecnymi można uznać, iż kalibracje się stabilizują i stają się odporne na losowe próbki.

Introdukcja genów odporności na choroby i owady oraz męskiej sterylności z pokrewnych gatunków rodzaju *Brassica* do rzepaku (*Brassica napus* L.)

Introduction of disease and pest resistance genes and male sterility from Brassica relatives to rapeseed (*Brassica napus* L.)

Janetta Niemann ✉, Dorota Weigt, Justyna Szwarc, Jan Bocianowski, Małgorzata Jędryczka, Joanna Kaczmarek, Witold Irzykowski, Joanna Majka, Marek Mrówczyński

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin,
Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań,
✉ e-mail: niemann@up.poznan.pl, tel. 61 8487758

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.802.9.2019, Zadanie nr 54.

Słowa kluczowe: fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (FISH), geny odporności, krzyżowanie, markery ISSR, mieszańce *Brassica*, rzepak

Realizowane zadanie badawcze dotyczy poszerzenia zakresu zmienności cech istotnych z punktu widzenia użytkowego wykorzystania rzepaku ozimego. Szczególne znaczenie mają cechy decydujące o odporności rzepaku na stesy biotyczne (choroby grzybowe – sucha zgnilizna kapustnych i mączniak, odporność na owady – śmietka kapuściana, mszyce i pchełka ziemna) oraz męska sterylność, jako niezmiernie istotna przy wytwarzaniu odmian mieszańcowych. W związku z powyższym, celem prowadzonych badań w roku 2019 było oszacowanie odporności na szkodniki i choroby grzybowe komponentów rodzicielskich i mieszańców pokolenia F_4 i F_5 , potwierdzenie mieszańcowego charakteru roślin pokolenia F_2 przy pomocy techniki FISH oraz określenie zróżnicowania genetycznego mieszańców metodą ISSR, a także identyfikacja sekwencji odpowiadających wybranym genom zaangażowanym w odporność na choroby u roślin metodami analizy obliczeniowej i molekularnej. W ramach zadania 54 w roku 2019 zrealizowano 3 tematy badawcze.

Celem tematu pierwszego było określenie odporności form mieszańcowych pokolenia F_4 i F_5 i odmian rzepaku na porażenie przez *Leptosphaeria maculans* (sucha zgnilizna kapustnych) i *Hyaloperonospora parasitica* (mączniak

rzekomy kapustnych) w warunkach polowych oraz w komorze klimatycznej, a także określenie zakresu zmienności istniejącej wśród odmian rzepaku ozimego oraz kombinacji mieszańcowych dotyczącej odporności na szkodniki takie jak: śmietka, pchełka i mszyca. Materiał badawczy stanowiło 46 odmian rzepaku ozimego oraz 25 kombinacji mieszańcowych pokoleń F_4 i F_5 pochodzące z kolekcji KGiHR. Jesienią 2019 roku podobnie jak w latach ubiegłych nie stwierdzono w warunkach polowych objawów powodowanych przez mączniak rzekomy. Aby oby ocenić odporność/podatność form mieszańcowych na *H. parasitica* przeprowadzono doświadczenie w kontrolowanych warunkach. W tym przypadku na wszystkich mieszańcach odnotowano objawy mączniaka rzekomego. W kontrolowanych warunkach najsilniej porażone były mieszańce *B. napus* × *B. fruticulosa* (7%), a najsłabiej *B. napus* × *B. rapa ssp. pekinensis* (1%).

Jesienią 2019 roku stwierdzono wyższe niż w ubiegłym roku stężenie zarodników *Leptosphaeria* spp. w powietrzu (www.spec.edu.pl), co miało swoje przełożenie na porażenie roślin. Odsetek roślin rzepaku z objawami powodowanymi przez grzyby z rodzaju *Leptosphaeria* wahał się od 2 do 12,67%. Najsłabiej porażone były odmiany Arsenal i Anderson (2%), posiadające gen odporności *Rlm7*, natomiast najsilniej

porażona była odmiana Darmor (12,67%).

Procent roślin mieszańcowych z objawami suchej zgnilizny kapustnych wynosił od 2,33 % do 16%. Najbardziej porażone były mieszańce *B. napus* cv. *Californium* × *B. juncea* acc. 633007

Obserwacje wykonane na doświadczeniach kolekcyjnych KGiHR odnośnie występowania szkodników wykazały różne nasilenie ich występowania pomiędzy analizowanymi genotypami roślin. W Dłoni, jeden spośród trzech ocenianych szkodników tj. śmietka kapuściana wystąpił w największym nasileniu. Natomiast sporadycznie obserwowano mszycę, a pchełki nie odnotowano wcale ani na testowanych odmianach ani na roślinach z pokoleń mieszańcowych. Przeprowadzone obserwacje wykazały znaczny stopień uszkodzenia roślin rzepaku przez śmietkę kapuścianą zarówno u odmian rzepaku (18,0-88,0%), jak i u analizowanych mieszańców (16,0-63,0%). W roku 2019 warunki pogodowe były bardzo sprzyjające dla występowaniu szkodników, a zwłaszcza mszycy, która w największym nasileniu żerowała na odmianach rzepaku tj. Razmus (32%) i Darmor (34%). Rośliny mieszańcowe pokolenia F₅ były uszkodzone przez mszycę od 18,0 do 33,0% w zależności od kombinacji krzyżowania.

Celem drugiego tematu badawczego była cytogenetyczna analiza roślin mieszańcowych *Brassica*, z wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz określenie stopnia zróżnicowania genetycznego mieszańców z rodzaju *Brassica* na podstawie markerów ISSR. W 2019 roku przeanalizowano cztery kombinacje mieszańcowe *Brassica* (20 genotypów), w których formą mateczną był allotetraploidalny gatunek *B. napus*. Zastosowanie sekwencji rDNA (5S i 35S rDNA) pozwoliło na charakterystykę składu genomowego oraz na identyfikację poszczególnych typów chromosomów u analizowanych mieszańców. Zaobserwowano stałą, całkowitą liczbę chromosomów, wynoszącą 38 oraz różnice w liczbie loci rDNA u mieszańców otrzymanych w wyniku krzyżowania *B. napus* × *B. carinata*. W kombinacji *B. napus* × *B. juncea* obserwowano również stałą liczbę chromosomów wynoszącą 37 chromosomów

oraz stałą liczbę loci 5S i 35S rDNA, tj. 10 i 12 loci rDNA. Natomiast pozostałe dwie analizowane kombinacje mieszańców tj. *B. napus* × *B. rapa* spp. *chinensis* i *B. napus* × *B. rapa* spp. *pekinensis* charakteryzowały się zmiennymi liczbami chromosomów i zmienną liczbą loci rDNA. Ponadto, przeprowadzone zostały analizy molekularne (ISSR) z zastosowaniem 30 starterów reakcji – 20 starterów, które generowały polimorfizm w poprzednich latach badań oraz 10 starterów nowych, wybranych na podstawie literatury. Grupowanie hierarchiczne przedstawione w formie dendrogramu potwierdziło mieszańcowe pochodzenie analizowanych roślin – mieszańce z danej grupy krzyżowań utworzyły odrębne klastry, a tym samym wykazały największe podobieństwo w obrębie roślin o tych samych komponentach rodzicielskich.

Temat badawczy nr 3 dotyczył identyfikacji sekwencji dla znanych genów odporności na choroby u wybranych roślin rodzicielskich i mieszańców *Brassica* z wykorzystaniem zaawansowanych technik molekularnych. W bieżącym roku wybrano osiem genów ortologicznych, których poszukiwano w analizowanym materiale roślinnym tzn. u sześciu wybranych form rodzicielskich z dwóch gatunków *Brassica* użytych do krzyżowań tj. *Brassica rapa* (ssp. *pekinensis*, *chinensis*, *trilocularis*, *dichotoma*) oraz *B. napus* (odmiany Jet Neuf oraz Monolit), a także u dwóch wybranych potomstw mieszańcowych. Wybrane do analiz geny związane były z odpornością na suchą zgniliznę kapustnych oraz na mączniaka i stanowiły punkt wyjścia do identyfikacji odpowiadających im genów homologicznych lub genów najbardziej do nich zbliżonych pod względem podobieństwa sekwencji i/lub kompozycji i struktury domen białkowych. Poszukiwanie sekwencji genów ortologicznych stwarza poważny problem zwłaszcza dla gatunków z rodzaju *Brassica*, w tym rzepaku (*B. napus*) u których występuje znaczna homologia pomiędzy genomami rodzicielskimi. W związku z powyższym, na podstawie przeprowadzonych do tej pory analiz nie udało się w sposób jednoznaczny dokonać porównania sekwencji wybranych genów odporności dla analizowanych mieszańców i ich form rodzicielskich.

Wykorzystanie nowej puli genowej dla uzyskania form rzepaku ozimego o zmienionych cechach jakościowych

The use of a new gene pool for obtaining forms of winter oilseed rape with changed quality characteristics

Stanisław Spasibionek ✉, Katarzyna Mikołajczyk, Marcin Matuszczak, Magdalena Walkowiak, Joanna Nowakowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — PIB, Oddział w Poznaniu,
Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych,
Pracownia Genetyki i Hodowli Jakościowej,
✉ e-mail: sspas@nico.ihar.poznan.pl, tel. 61 8464220

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.802.3.2019, Zadanie nr 53.

Słowa kluczowe: rzepak ozimy, kwasy tłuszczowe, markery genetyczne, glukozytolany, zawartość tłuszczu

Obecnie uprawiane odmiany rzepaku są źródłem oleju uniwersalnego, stosowanego do celów spożywczych i do przerobu w różnych technologiach. W skład oleju nasion wchodzi głównie jedno- i wielonienasycone kwasy tłuszczowe o osiemnastu atomach węgla w łańcuchu, oleinowy (C18:1, 62%), linolowy (C18:2, 20%) oraz linolenowy (C18:3, 10%). Ponadto, olej rzepakowy zawiera 7% kwasów nasyconych, palmitynowego (C16:0) i stearynowego (C18:0), a także 1% jednonienasyconego kwasu eikozenowego (C20:1). W wielu ośrodkach badawczych i hodowlanych na świecie prowadzone są prace nad wytworzeniem form hodowlanych rzepaku produkujących nasiona o cechach tzw. żywności funkcjonalnej, wspomagającej i poprawiającej zdrowie człowieka. W związku z tym prace koncentrują się na uzyskaniu odmian rzepaku wytwarzających olej o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego C18:1 do (ok. 75%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego C18:3 do (ok. 3%) określanych, jako typ HOLL (skrót od ang. *high oleic low linolenic*). Olej z tych odmian na cele spożywcze posiada wyższą termostabilność, co zwiększa jego trwałość w czasie głębokiego smażenia, a także ogranicza tworzenie szkodliwych dla zdrowia izomerów trans podczas procesu utwardzania.

Ponadto nasiona rzepaku zawierają w suchej masie ok. 46% oleju oraz od 21 do 24% białka. W śrucie występuje od 37% do 43% białka

pastewnego charakteryzującego się wysoką wartością żywieniową ze względu na korzystny skład aminokwasów. Możliwości wykorzystywania białka, które pozostaje po ekstrakcji lub wyłoczeniu oleju w śrucie bądź wyłokach są limitowane przez związki antyżywniowe występujące w nasionach rzepaku, jak glukozytolany alkenowe oraz włókno i fityniany. Stąd konieczne są badania nad formami pozbawionymi tych związków, głównie glukozytolanów alkenowych.

Celem badań było otrzymanie genotypów o pożądanym cechach biochemicznych (zróżnicowanej zawartości kwasów tłuszczowych jedno- i wielonienasyconych, wysokiej zawartości tłuszczu i ekstremalnie niskiej zawartości glukozytolanów) oraz o wysokiej wartości agronomicznej. Następnie wybór genotypów do przeprowadzenia szczegółowej analizy genetycznej w odniesieniu do ekspresji cech fenotypowych, decydujących o wartości gospodarczej danego genotypu oraz oszacowanie wartości kombinacyjnych oraz wpływu różnych środowisk na cechy ilościowe i jakościowe tych genotypów. Do badań włączono markery genetyczne monitorujące występowanie niezmutowanych i zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* w liniach typu HO, LL, HOLL.

Zadanie realizowano w ramach czterech tematów badawczych:

— Fenotypowanie roślin pod względem cech agronomicznych i biochemicznych

- Określenie determinacji genetycznej cech jakościowych
- Ocena genotypów w doświadczeniach porównawczych
- Genotypowanie roślin

W badaniach uczestniczyło 129 genotypów, w tym: 72 genotypy pokoleń F_8 - F_4 typu HO o wysokiej zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (do 83,1%) i typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (do 81,9%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (do 1,8%) oraz 57 linii typu HO&LGLS (skrót od ang. *high oleic & low glucosinolates*) pokoleń F_{10} - F_5 o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (do 81,1%) i niskiej zawartości glukozyolanów alkenowych (do $0,5\mu\text{M g}^{-1}$ nasion). Spośród 645 zaizolowanych roślin do dalszych badań wybrano populację 126 rekombinantów pokoleń F_9 - F_4 (z krzyżowań mutantów wysokooleinowych-HO i niskolinolenowych-LL) typu HOLL wykazujących wzrost zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (od 79,2-85,6%) i obniżenie zawartości kwasu linolenowego (od 1,4-4,2%) oraz typu HOLP (skrót od ang. *high oleic & low polyunsaturated fatty acids*) wykazujących wzrost zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (od 79,6-84,4%) i obniżenie zawartości sumy kwasów wielonienasyconych (linolowego i linolenowego) (od 8,5-13,4%). Rekombinaty typu HOLL i HOLP charakteryzowały się zawartością tłuszczu na poziomie (35,5-49,3%) natomiast zawartość sumy glukozyolanów wynosiła (od $4,3$ - $15,1\mu\text{M g}^{-1}$ nasion), a glukozyolanów alkenowych (od $0,4$ - $11,0\mu\text{M g}^{-1}$ nasion).

Do badań wykorzystano również kolekcję własną (uzyskaną w wyniku krzyżowań w obrębie gatunku *Brassica napus* L.) genotypów wysokooleinowych (HO) i niskoglukozyolanowych (LGLS). Z wyselekcjonowanych izolowanych pojedynczych roślin typu wysokotłuszczowego i niskoglukozyolanowego do dalszych badań wybrano 119 genotypów pokoleń F_{12} - F_5 o podwyższonej zawartości tłuszczu (do 48,9%) oraz o ustabilizowanej bardzo niskiej zawartości glukozyolanów alkenowych (od $0,1$ - $2,8\mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i sumy glukozyolanów (od $0,6$ - $9,1\mu\text{M g}^{-1}$ nasion). Zawartość kwasu oleinowego w badanych genotypach wahała się (od 73,2-84,2%).

Z najlepszymi genotypami przeprowadzono krzyżowania w układzie linia \times tester. Jako formy mateczne użytych zostało 7 linii rekombinacyjnych

typu HOLL z wysoką zawartością kwasu oleinowego (od 77,4-82,8%) i niską zawartością kwasu linolenowego (od 2,0-3,8%) oraz 4 linie typu HO o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (od 78,4-80,6%) i o ekstremalnie niskiej zawartości sumy glukozyolanów alkenowych ($0,5$ - $0,9\mu\text{M g}^{-1}$ nasion). Testerami ojcowskimi były 4 wysokopienne linie rekombinacyjne typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (od 80,3-80,8%) i niskiej zawartości kwasu linolenowego (od 2,0-5,3%). Uzyskane 44 kombinacje krzyżowań F_1 (linia \times tester), 11 linii i 4 testery wysiano na poletkach w IHAR-PIB w Poznaniu w celu oszacowania ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej. Na tej podstawie wytypowane zostaną pary rodzicielskie, które rokują otrzymanie potomstwa o szczególnie pożądanym, ze względów różnych cech tj. wartości agronomicznej, składu kwasów tłuszczowych oleju, głównie o podwyższonej zawartości kwasu oleinowego i obniżonej zawartości kwasu linolenowego oraz o obniżonej zawartości związków antyżywnościowych.

Wiosną 2019 roku kontynuowano (założone jesienią 2018 roku) I serię doświadczeń przedwstępnych PN1 dla określenia wartości rolniczej rodów (25 genotypów o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych typu HO, HOLL) o wysokiej zawartości tłuszczu oraz o ekstremalnie niskich zawartościach sumy glukozyolanów i glukozyolanów alkenowych w 3 powtórzeniach w 3 lokalizacjach: Stacja Hodowli Roślin: Borowo i Małyszyn „Spółka Hodowli Roślin Strzelce” i Łagiewniki „Spółka Hodowli Roślin Smolice”) w układzie bloków losowanych.

Z spośród badanej populacji najbardziej interesujące były genotypy dla których plon wzrósł powyżej średniej ogólnej. Do najlepiej plonujących w przedziale (31,3-24,6 dt/ha) zaliczono 14 genotypów. O niższej niż w latach poprzednich zawartości tłuszczu zdecydowały niekorzystne warunki pogodowe objawiające się długotrwałą suszą podczas dojrzewania nasion. Pod względem zawartości tłuszczu 5 genotypów (42,9-45,1%) istotnie przewyższyły odmianę Ilona (42,2%). Badane linie typu HO&LGLS utrzymały istotnie wysoką ustabilizowaną zawartość kwasu oleinowego w przedziale (79,3-80,5%), natomiast linie typu HOLL wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (77,7-81,4%) i obniżoną zawartość kwasu linolenowego na poziomie (2,7-4,9%) natomiast linie typu HOLP wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (79,1-80,1%) i obniżoną zawartość sumy kwasów wielonienasyconych (linolowego i linolenowego) na poziomie

(12,6-13,9%). Stwierdzono również wysoką istotność zróżnicowania genotypów pod względem zawartości związków antyżywnościowych: sumy glukozyolanów i glukozyolanów alkenowych. W stosunku do odmiany wzorcowej Ilona ($15,6 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion; $10,0 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion) niższą zawartością sumy glukozyolanów i glukozyolanów alkenowych charakteryzowały się wszystkie 24 badane genotypy odpowiednio ($5,9-13,3 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i ($1,8-9,1 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion). Przeprowadzono również analizę wariacji dla plonu nasion, zawartości tłuszczu, kwasów: oleinowego, linolenowego, glukozyolanów alkenowych i sumy wszystkich glukozyolanów. Stwierdzono istotne różnice u wszystkich badanych cech pomiędzy środowiskami. Wystąpiła istotna interakcja genotypów ze środowiskami pod względem plonu, zawartości tłuszczu, kwasu oleinowego, zawartości glukozyolanów alkenowych i sumy glukozyolanów. Opracowana dla plonu nasion analiza współdziałania poszczególnych genotypów ze środowiskami wskazuje, że 10 genotypów wykazała istotną interakcję z warunkami środowiska. Stabilnymi genotypami okazały się rody: (429-2i+3i+4i/18 HO, 433/1i+2i/18 HOLL, 437/1i+7i/18 HOLL, 439/1i+2i/18 HOLL, 440/1i+3i/18 HOLL, 441/1i+2i/18 HOLL, 446/1i+2i+3i/18 HOLL, 465/2i+3i+4i/18 HOLL, 488/1i+2i/18 HOLP, 490/1i+2i+3i/18 HOLP, 521/1i+2i+3i/18 HOLL, 525/1i+2i/18 HOLL).

Dla zawartości kwasu oleinowego 2 genotypy, dla zawartości kwasu linolenowego jeden genotyp, 7 genotypów dla zawartości tłuszczu, po 8 genotypów dla zawartości glukozyolanów alkenowych i sumy glukozyolanów wykazały istotną interakcję z warunkami środowiska.

Genotypy o wysokiej wartości agronomicznej charakteryzujące się wysoką zawartością kwasu oleinowego i niską linolenowego poddano analizie DNA. Do tych badań włączono 72 genotypy typu HOLL oraz HOLP pokoleń F_5 - F_4 uzyskanych z krzyżowań mutantów typu HO i LL. Wykonano 216 analiz DNA. W analizie przeprowadzonej metodą CAPS dla alleli genu *BnaA.FAD2* desaturazy FAD2 wśród badanych genotypów wykazano 112 homozygotycznych prób o zmutowanym genotypie typu HOR4 (HOR4/HOR4) oraz 41 prób wykazujących genotyp heterozygotyczny typu HOR4 (HOR4/Dziki). W pozostałych próbach wykazano genotyp homozygotyczny typu dzikiego (Dziki/Dziki). Natomiast przeprowadzone metodą SNaPshot analizy na obecność zmutowanych alleli desaturazy *FAD3* w genomach A i C *B. napus* zidentyfikowały 42 genotypy zmutowane i homozygotyczne w obu loci (genotyp aacc) oraz różne

formy heterozygotyczne: 7 fom heterozygotycznych (genotyp aaCC), 4 formy (genotyp aaCc), 5 form (genotyp AaCC), 1 formę (genotyp AaCc) w których stwierdzono obecność zmutowanych alleli w genomie A *B. napus*, 10 fom heterozygotycznych (genotyp Aacc), 78 fom heterozygotycznych (genotyp AAcc), 8 form (genotyp AACc), 1 formę (genotyp AaCc) w których stwierdzono obecność zmutowanych alleli w genomie C *B. napus*. W pozostałych formach typu dzikiego (genotyp AACC) nie stwierdzono obecności zmutowanych alleli zarówno w genomie A i C *B. napus*.

Uzyskano (z wykorzystaniem zmutowanych linii typu HO i LL) genotypy typu HOLL wykazujące wzrost zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (do 85,6%) oraz obniżenie zawartości kwasu linolenowego (do 1,4%) oraz genotypy typu HOLP wykazujące wzrost zawartości kwasu oleinowego w oleju nasion (do 84,4%) i obniżenie zawartości sumy kwasów wielonienasyconych (linolenowego i linolenowego) (do 8,5%).

Uzyskano również (z wykorzystaniem zmienności naturalnej) genotypy typu HO&LGLS charakteryzujące się bardzo wysoką zawartością kwasu oleinowego w oleju nasion (do 84,2%) oraz skrajnie niską zawartością glukozyolanów alkenowych (do $0,1 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i sumy glukozyolanów (do $0,6 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion).

Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń stwierdzono, że linia typu HOLL (491/18) osiągnęła najwyższy spośród badanych genotypów plon ($31,3 \text{ dt/ha}$), zbliżony do odmiany wzorcowej Ilona ($33,5 \text{ dt/ha}$).

Badane linie typu HO&LGLS utrzymały istotnie wysoką ustabilizowaną zawartość kwasu oleinowego w przedziale (79,3-80,5%) oraz znacznie obniżoną zawartość związków antyżywnościowych, glukozyolanów alkenowych do poziomu ($1,8 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion) a sumy glukozyolanów do poziomu ($5,9 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion) w porównaniu do odmiany Ilona, odpowiednio ($10,0 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion) i ($15,6 \mu\text{M g}^{-1}$ nasion).

Linie typu HOLL uzyskały wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (77,7-81,4%) i obniżoną zawartość kwasu linolenowego na poziomie (2,7-4,9%) natomiast linie typu HOLP wysoką zawartość kwasu oleinowego na poziomie (79,1-80,1%) i obniżoną zawartość sumy kwasów wielonienasyconych (linolenowego i linolenowego) na poziomie (12,6-13,9%).

Uzyskano rekombinanty znacznie wcześniejsze niż średnio wczesna odmiana populacyjna Ilona.

Analiza doświadczeń z genotypami uwzględ-

niająca badanie interakcji genotypowo-środowiskowej, umożliwiła wytypowanie najlepszych z punktu widzenia hodowlanego form, a także pozwoliła uzyskać informacje o ich stabilności w różnych środowiskach pod względem plonu, zawartości tłuszczu, kwasów tłuszczowych i glukozyolanów w nasionach.

Przeprowadzona analiza z wykorzystaniem markerów genetycznych pozwoliła precyzyjnie wyselekcjonować pożądane genotypy zmutowanych alleli genów desaturaz *FAD2* i *FAD3* wyrażających się fenotypem typu HO o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (od 81,0-81,3%), fenotypem typu HOLL o wysokiej zawartości kwasu

oleinowego (od 75,9-85,7%) i obniżonej zawartości kwasu linolenowego (od 1,1-4,3%) oraz fenotypem typu HOLP o wysokiej zawartości kwasu oleinowego (od 78,6-81,8%) i obniżonej zawartości sumy kwasów wielonienasyconych (linolowego i linolenowego) (od 11,2-13,0%).

Przeprowadzone badania poszerzyły pulę genową w postaci wyselekcjonowanych linii rekombinacyjnych typu HOLL, HOLP oraz HO&LGLS łączących cechy wysokiej wartości agronomicznej, wysokiej zawartości kwasu oleinowego i niskiej zawartości kwasów wielonienasyconych (linolowego i linolenowego) oraz niskiej zawartości związków antyżywnościowych (glukozyolanów).

Badanie bioróżnorodności gatunków z plemienia *Brassicaceae* w celu otrzymania form rzepaku ulepszonych pod względem odporności na patogeny

Biodiversity studies of species of *Brassicaceae* to obtain forms of oilseed rape improved in terms of resistance to pathogens

Michał Starzycki ✉, Elżbieta Starzycka-Korbas

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Poznaniu,
Samodzielna Pracownia Stresów Środowiskowych Roślin Oleistych,
✉ e-mail: m.starzycki@ihar.edu.pl, tel. 61 8464203

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.802.3.2019, Zadanie nr 49.

Słowa kluczowe: mieszańce międzygatunkowe, odporność na patogeny, rzepak

Celem pracy były badania odporności na patogeny z rodzaju *Alternaria* sp. oraz *Leptosphaeria* sp. w nowych rodach rzepaku otrzymanych z komponentów rodzicielskich z plemienia *Brassicaceae*. Przeprowadzone badania nad odpornością na stropy biotyczne roślin z plemienia *Brassicaceae* powstałych z krzyżowań międzygatunkowych in vitro zmierzają w kierunku otrzymywania roślin rzepaku zróżnicowanych genetycznie pod względem tolerancji lub odporności na najgroźniejsze patogeny [1, 2, 3, 4, 5, 6]. Wśród niektórych kapustowatych można spotkać gatunki tolerancyjne i częściowo odporne na czern krzyżowych. Odporność na *Alternaria* sp. badana przez niewielu autorów może być kontrolowana przez jeden lub kilka genów jądrowych w połączeniu z innymi genami modyfikatorami. Do badań nad mieszańcami międzygatunkowymi in vitro wykorzystano następujące podstawowe gatunki: kapustę brukselską *B. oleracea* var. *gemmifera* $2n = 18$ (CC), kapustę pastewną *B. oleracea* var. *acephala* $2n = 18$ (CC), kapustę jarmuż *B. oleracea* var. *acephala* subvar. *Lacinista* $2n = 18$ (CC), rzepik *B. campestris* o liczbie chromosomów $2n = 20$ (AA), *B. carinata* $2n = 34$ (BBCC), *B. nigra* $2n = 16$ (BB), *B. juncea* $2n = 36$ (AABB) oraz *Sinapis alba* L. W celu otrzymania rzepaku z cytoplazmą kapusty do krzyżowań wypierających został użyty rzepak oraz otrzymane w ubiegłych latach wybrane odporne mieszańce międzygatunkowe z cytoplazmą:

B. oleracea i *B. campestris* oraz mieszańce z cytoplazmą rzepaku *B. napus* (AACC). Na podstawie badań odporności indywidualnie ocenianych pod względem chorób (*Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp.) form donorowych z plemienia *Brassicaceae*, zostały wykonane prace w warunkach polowych w doświadczeniu wstępnym DW2. Każdy obiekt oceniany był indeksem porażenia (IP) na podstawie obserwacji 40 roślin na 1 powtórzenie (najczęściej 3 powtórzenia, 120 roślin). Przyjęto trójstopniową skalę oceny odporności (0-brak porażenia, 1-średnie, 2-silne porażenie). Analiza fitopatologiczna zróżnicowania odporności badanych obiektów rzepaku poza aspektami naukowymi posiada aspekt praktyczny pozwalając hodowcom dokonać wyboru najodporniejszych rodów *B. napus* do dalszej hodowli. Ponadto dla stwierdzenia odporności wybranych genotypów w stadium siewki otrzymanych roślin mieszańców międzygatunkowych na porażenie powodowane przez patogeny z rodzaju *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp. stosowano test Williamsa. Analizy te pozwalają na wybór odporniejszych genotypów, które kierowane są do dalszych badań i hodowli. Dla mieszańców międzygatunkowych i roślin kontrolnych wykonano także badania DNA w celu wyboru amplikonów, które będą mogły być kojarzone z odpornością roślin. Wykonane analizy wskazały na duży polimorfizm badanych obiektów. Potwierdzono, że jeden z wybranych starterów (OPY-10) amplifikujący fragment

DNA 1100pz wydaje się być dodatnio skorelowany z odpornością badanych roślin z cytoplazmą kapust. Po wykonaniu wielu testów odpornościowych z wykorzystaniem inokulum i kaleczenia łądyg, stwierdzono, że najbardziej obiecującymi gatunkami, które mogą być donorami genów odporności na chorobotwórcze patogeny: *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. jest *B. taurica* oraz inne wcześniej przetestowane na odporność odmiany botaniczne kapust. Na wybranych obiektach wykonano analizy GC dla wyeliminowania genotypów o zwiększonym udziale związków antyżywnościowych: glukozyolanów i kwasu erukowego.

Wnioski

- Potwierdzono przydatność testów laboratoryjnych *in vitro* do oceny odporności mieszańców międzygatunkowych oraz rzepaku w stadium siewki, które mogą być stosowane do preselekcji odporności mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* sp. i *Alternaria* sp.
- Metoda inokulacji patogenami *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp., polegającej na kaleczeniu i zakażaniu łądyg roślin pozwala na wyselekcjonowanie nowych genotypów odpornych i nieodpornych roślin z plemienia *Brassicaceae*.
- Stwierdzono przydatność startera OPY10, który może być kojarzony z podwyższoną odpornością mieszańców międzygatunkowych na *Leptosphaeria* sp. oraz *Alternaria* sp. Najbardziej odporne genotypy w większości przypadków posiadały DNA pochodzące

od gatunku *B. oleracea*, *B. taurica* oraz kapusty brukselskiej.

Literatura

- Boba, A., Kulma, A., Kostyn, K., Starzycki, M., Starzycka, E., Szopa, J. (2011). The influence of carotenoid biosynthesis modification on the *Fusarium culmorum* and *Fusarium oxysporum* resistance in flax. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 76 (2011): 39–47.
- Kamiński, P., Podwyszyńska, M., Starzycki, M., Starzycka-Korbas, E. (2015). Interspecific hybridisation of cytoplasmic male-sterile rapeseed with *Ogura* cytoplasm and *Brassica rapa* var. *pekinensis* as a method to obtain male-sterile Chinese cabbage inbred lines. *Euphytica*. DOI 10.1007/s10681-015-1595-9.
- Starzycka, E., Starzycki, M. (2008). Najważniejsze wyniki badań nad zgnilizną twardzikową w rzepaku przedstawione na XII Międzynarodowym Kongresie Rzepakowym w Wuhan. *Rośliny Oleiste Oilseed Crops t. XXIX*: 281–290.
- Starzycka, E., Kauzik, M., Starzycki, M., Cichy, H., Budzianowski, G., Woś, H. (2009). Odporność rzepaku na porażenie przez *Leptosphaeria* spp. i *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary oceniana w doświadczeniach PDO w dwóch miejscowościach: Małyszynie i Borowie, w latach 2008 i 2009. *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops t. XXX*: 207–222.
- Starzycka, E., Starzycki, M. (2011). *In vivo* and *in vitro* investigations on changes taking place under the influence of *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary fungus mycotoxin. *Phytopathologia*. 61: 43–49.
- Starzycki, M., Starzycka, E., and Pszczoła, J. (2007). Development of Alloplasmic Rape. *Advances in Botanical Research*, Elsevier Ltd. Vol. 45, 313–335.

Badanie molekularnego mechanizmu odporności na kiłę kapusty (*Plasmodiophora brassicae*) u roślin z rodzaju *Brassica*

Studies on molecular mechanism of clubroot (*Plasmodiophora brassicae*) in *Brassicaceae* plants

Monika Markiewicz ¹✉, Agnieszka Czajka ², Beata Kowalska ³

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,

¹Zakład Biologii Stosowanej,

²Zakład Fitopatologii,

³Zakład Mikrobiologii,

✉ e-mail: monika.markiewicz@inhort.pl, tel.: 46 8345447, 46 8345376

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.802.4.2019, Zadanie nr 99.

Słowa kluczowe: *Brassica* sp., cDNA-AFLP, kapusta, kiła kapusty, markery molekularne, odporność, *Plasmodiophora brassicae*

Celem zadania było ustalenie tożsamości transkryptów podlegających zróżnicowanej ekspresji u genotypów roślin z rodzaju *Brassica* infekowanych *Plasmodiophora brassicae* oraz ich mapowanie na genom kapusty, wytypowanie genów kandydackich biorących udział w reakcjach odpornościowych roślin kapustowatych oraz ich walidacja poprzez ilościową analizę ekspresji.

Przeprowadzono analizy BLAST dla 150 wyizolowanych fragmentów cDNA-AFLP ulegających zróżnicowanej ekspresji podczas infekcji. Wykazano, że 63% zidentyfikowanych fragmentów genów koduje białka o określonej funkcji, a 80% wykazuje podobieństwo do referencyjnych sekwencji genomów wykorzystanych do analiz: *B. napus* (AACC), *B. oleracea* (CC) oraz *B. rapa* (AA).

Do walidacji wytypowano 45 genów kandydujących, prawdopodobnie uczestniczących w reakcjach odpornościowych, a w roku 2019 analizy ekspresji wykonano dla 15 genów kodujących: 1) białka odpornościowe TIR-NBS-LRR; 2) kinazy serynowo-treoninowe; 3) hydrolazy i dehydrogenazy; 4) białka związane z syntezą metabolitów wtórnych oraz 5) białka receptorów błonowych. Materiał roślinny do badań stanowiło 7 genotypów roślin z rodzaju *Brassica* o różnym poziomie odporności na kiłę kapusty oraz genotyp wrażliwy, infekowane *P. brassicae* patotyp 2.

Analizie poddano geny kodujące białka

zaangażowane w reakcje odpornościowe: białko N, białko Pid3, białko PDCD1, białko MA3 oraz proteazę SBT3.3. Profile ekspresyjne dla genów kodujących białka N oraz PDCD1 były podobne u genotypów wykazujących niski stopień porażenia w ocenie makroskopowej: kapusty głowiastej ‘Kilaton F₁’, kapusty pekińskiej ‘Bilko F₁’, rzepaku ‘Mendel F₁’, brukwi ‘Wilhelmsburger’ oraz rzepy ECD03. Względny poziom ekspresji genów kodujących białka Pid3 oraz MA3 wzrastał w czasie infekcji u kapusty głowiastej ‘Kilaton F₁’. Inaczej wyglądał profil ekspresyjny genu kodującego proteazę SBT3.3, którego najwyższy poziom ekspresji obserwowano u kapusty głowiastej ‘Kilaton F₁’ oraz, w mniejszym stopniu u rzepaku ‘Mendel F₁’, brukwi ‘Wilhelmsburger’, rzepy ECD03 i kapusty pekińskiej ‘Bilko F₁’. Zarówno białko N, jak i PDCD1 określane są jako białka związane z HR oraz PCD, które ograniczają rozprzestrzenianie się patogena (McHale i wsp. 2006). Obronną funkcję białka Pid3 potwierdzono u ryżu (Lv i wsp. 2013), natomiast białka z domeną MA3 zaangażowane są w procesy indukowania PCD. Meyer i wsp. (2016) potwierdzili nadekspresję genu kodującego proteazę SBT3 w roślinach pomidora podczas mechanicznego zranienia i żerowania fitofagów, natomiast prezentowane wyniki sugerują, że nadekspresja tego genu może zachodzić także w tkankach nie uszkodzonych mechanicznie.

Analizie poddano także geny kodujące kinazy ATM, TMK1, cdc7 oraz At5g24010. Kinazy jako jedne z największych i najbardziej znaczących rodzin białkowych, mają wpływ na regulację niemal wszystkich procesów biochemicznych zachodzących w komórce, a grupa kinaz serynowo-treoninowych odgrywa znaczącą rolę w regulacji odpowiedzi na sygnały, często wywołujące stres oksydacyjny (Stone i Walker 1995; Chevalier i Walker 2005). U badanych genotypów obserwowano stosunkowo niski względny poziom ekspresji genu kodującego kinazę ATM. Prawdopodobnie nie jest ona bezpośrednio zaangażowana w procesy odpornościowe komórki podczas infekcji. Względna ekspresja pozostałych kinaz była najwyższa u genotypów z najmniejszym stopniem porażenia przez kiłę.

Analizie poddano geny kodujące hydrolazy Sgpp oraz ABH, a także dehydrogenazę B7. Ich ekspresja w roślinach infekowanych *P. brassicae* zależna była od genotypu. Najwyższy poziom względnej ekspresji genu kodującego hydrolazę Sgpp obserwowano u kapusty głowiastej 'Kilaton F₁' oraz rzepaku 'Mendel F₁', a hydrolazę ABH – jedynie u rzepaku 'Mendel F₁'. Najwyższy poziom względnej ekspresji genu kodującego dehydrogenazę B7 obserwowano u genotypów wykazujących niski stopień porażenia – kapusty głowiastej 'Kilaton F₁', rzepaku 'Mendel F₁', rzepy ECD03 oraz kapusty pekińskiej 'Bilko F₁'. Wykazano, że u wielu roślin geny kodujące dehydrogenazy ALDH, do których należy dehydrogenaza B7, ulegają nadekspresji podczas ekspozycji na wiele czynników stresogennych (brak wody, obecność metali ciężkich, wysokie zasolenie, ciepło, zimno, promieniowanie UV itp.) (Brocker i wsp. 2013), a nadekspresję genu kodującego hydrolazę Sgpp mogą wywoływać stresy abiotyczne oraz biotyczne. U *A. thaliana* nadekspresję genu *Sgpp* obserwowano w komórkach korzeni podczas ekspozycji na zasolenie oraz stres oksydacyjny (Caparrós-Martín i wsp. 2013).

Podsumowując, względny poziom ekspresji wytypowanych do badań genów był zróżnicowany i zależał od genotypu. Względne poziomy

ekspresji genów kodujących białka opornościowe z domeną TIR-NBS-LRR były najwyższe u genotypów, u których nie obserwowano objawów choroby. Względne poziomy ekspresji genów kodujących kinazy serynowo-treoninowe były najwyższe u jednego genotypu: rzepy ECD03, która w badaniach prowadzonych w latach 2016–2018 wykazywała najwyższą odporność na badane patotypy patogena oraz u kapusty głowiastej 'Kilaton F₁', która w ocenie makroskopowej nie wykazywała symptomów choroby.

Literatura

- Brocker, C., Vasiliou, M., Carpenter, S., Carpenter, C., Zhang, Y., Wang, X., Kotchoni, S.O., Wood, A.J., Kirch H-H., Kopečný, D., Nebert, D.W., Vasiliou, V. (2013). Aldehyde dehydrogenase (ALDH) superfamily in plants: gene nomenclature and comparative genomics. *Planta* 237 (1): 189–210
- Caparrós-Martín, J.A., McCarthy-Suárez, I., Culiáñez-Macià, F.A. (2013). HAD hydrolase function unveiled by substrate screening: enzymatic characterization of *Arabidopsis thaliana* subclass I phosphosugar phosphatase AtSgpp. *Planta* 237 (4): 943–954
- Chevalier, D., Walker, J.C. (2005). Functional genomics of protein kinases in plants. *Briefings in functional genomics and proteomics* 3 (4): 362–371
- Lv, Q., Xu, X., Shang, J., Jiang, G., Pang, Z., Zhou, Z., Wang, J., Liu, Y., Li, T., Li, X., Xu, J., Cheng, Z., Zhao, X., Li, S., Zhu, L. (2013). Functional analysis of Pid3-A4, an ortholog of rice blast resistance gene Pid3 revealed by allele mining in common wild rice. *Phytopathology* 103(6):594–9
- McHale, L., Tan, X., Koehl, P., Michelmore, R.W. (2006). Plant NBS-LRR proteins: adaptable guards. *Genome Biol* 7(4): 212
- Meyer, M., Huttenlocher, F., Cedzich, A., Procopio, S., Stroeder, J., Pau-Roblot, C., Lequart-Pillon, M., Pelloux, J., Stintzi, A., Schaller, A. (2016). The subtilisin-like protease SBT3 contributes to insect resistance in tomato. *J. Exp. Bot.* 67 (14): 4325–4338
- Stone, J.M., Walker, J.C. (1995). Plant Protein Kinase Families and Signal Transduction. *Plant Physiol.* (1995) 108: 451–457

Zastosowanie konwencjonalnych i molekularnych narzędzi fitopatologicznych w poszukiwaniu źródeł odporności na kiłę kapusty oraz charakterystyka aktualnej populacji patogenu w Polsce

The use of conventional and molecular phytopathological tools in searching for sources of resistance to clubroot and characterisation of the current pathogen population in Poland

Małgorzata Jędrzycka ✉, Witold Irzykowski, Joanna Majka, Janetta Niemann, Marek Korbas, Ewa Jajor

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Strzeszyńska 34, 60–479 Poznań,
✉ e-mail: mjed@igr.poznan.pl, tel. 61 6550271

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.802.2.2019, Zadanie nr 50.

Słowa kluczowe: *Brassica*, kiła kapusty, odporność rzepaku, *Plasmodiophora brassicae*

Identyfikacja źródeł odporności na kiłę kapusty w polskich i światowych zasobach genowych

Celem tematu było oznaczenie podatności 200 genotypów na 6 patotypów *Plasmodiophora brassicae*. Oceniono odporność 192 form mieszańcowych rzepaku o zmienionym składzie kwasów tłuszczowych, w tym linii HOLL (IHAR, Oddział Roślin Oleistych w Poznaniu) oraz 8 form standardowych. Badania wykonano za pomocą biotestów glebowych w komorach szklarniowych z regulacją temperatury, wilgotności i fotoperiodu. Doświadczenie prowadzono w doniczkach-paletach, w substracie z dodatkiem kwaśnego torfu. Testy wykonano w dwóch powtórzeniach biologicznych, z podziałem na okres wiosenny i jesienno-zimowy, w celu porównania wyników otrzymywanych w różnych porach roku. W przypadku wszystkich badanych izolatów stwierdzono rozszczepianie się cechy odporności i występowanie form wysoce podatnych, pośrednich i nieporażonych. Liczba poszczególnych form zależała od genotypu. Proporcja form odpornych do podatnych wynosiła zarówno 1:1, odnotowano również inne proporcje między formami odpornymi i podatnymi, a także formy całkowicie odporne (bardzo nieliczne) i w pełni podatne. Nie stwierdzono istotnych rozbieżności między wynikami uzyskanymi w okresie wiosennym i jesienno-zimowym.

Identyfikacja i charakterystyka ras *Plasmodiophora brassicae* w Polsce

W wielu rejonach Polski prowadzono monitoring związany z analizą zagrożenia przez *Plasmodiophora brassicae*. Głównie dotyczył on obszarów związanych z intensywną uprawą rzepaku, w tym wybranych części województwa pomorskiego, zachodniopomorskiego, dolnośląskiego, śląskiego, opolskiego, kujawsko-pomorskiego a także lubuskiego. Jak ustalono w poprzednich latach, województwa te należą do obszarów silnie zagrożonych wystąpieniem kiły kapusty. Identyfikacja patotypów dotyczyła izolatów *P. brassicae* zebranych na terenie Polski w ramach ekspedycji na tereny zgłaszane przez rolników uprawiających rzepak. Wyrośla suszono w temperaturze pokojowej i/lub mrożono. Oznaczenie ras wykonano na standardowym zestawie testowym wg. Somé i in. (1996). Ocenę stopnia porażenia przeprowadzono za pomocą metody LAMP (Kaczmarek i in. 2014). Wykazano obecność pięciu patotypów, przy czym przeważały i występowały w podobnej proporcji patotypy P1B oraz P3B (po 27%). Patotypy występujące w kolejności to P3A (23%) i P1A (20%). Najrzadziej występował patotyp P2A (3%). Między patotypami nie stwierdzono polimorfizmu sekwencji w regionach rybosomalnych lecz stwierdzono polimorfizm sekwencji ITS1 i ITS2.

Analiza genetyczna (metagenomika mikroorganizmów metodą shotgun, NGS Illumina) mikrobiomu zawartego w próbkach gleby wykazała ich duże podobieństwo. Stwierdzono, że 97% z 10 milionów odczytów stanowiły bakterie. Najliczniejszą grupę stanowiły *Proteobacteria* (44%), z nich zaś 31% należało do klasy *Alphaproteobacteria*, do rzędu *Rhizobiales*. W obrębie gromady stwierdzono 257 identycznych jednostek taksonomicznych (OTU), w obrębie klasy 356, rzędu 1177, rodzaju 1260, natomiast identycznych gatunków było aż 3414. Wykazano, że w badanych glebach wykazano obecność sekwencji stwierdzonych uprzednio między innymi u rodzajów *Bacillus*, *Clostridium*, *Ruminococcus*, *Cellulomonas*, *Streptomyces*, oraz *Arthrobacter*.

Przeniesienie odporności na kiłę kapusty z odpornych form *Brassica* do rzepaku i charakterystyka jakości nasion wybranych form mieszańcowych

Celem tematu było otrzymanie potomstwa F_1 mieszańców międzygatunkowych z krzyżowań wybranych odmian rzepaku ozimego (*B. napus* L.) z genotypami o potencjalnej odporności na kiłę kapusty oraz wyprowadzenie potomstwa F_1BC_1 . Materiał roślinny stanowiły dwa wybrane genotypy z rodziny Brassicaceae, tj. *Raphanus sativus* oraz *B. rapa* o podwyższonej odporności na kiłę oraz cztery odmiany rzepaku ozimego tj. Graf F1, Arsenal, Jet Neuf oraz Californium. Wykonano 778 krzyżowań oddalonych w ośmiu kombinacjach i otrzymano 162 łuszczyzny (płodność 21,0%). Wśród badanych kombinacji krzyżowań najwyższą płodność odnotowano w przypadku form mieszańcowych *B. napus* Californium \times *B. rapa* (32,4%), a najniższą w kombinacji *B. napus* Arsenal \times *R. sativus* (12,8%), dla której otrzymano tylko 11 łuszczyzn. W kulturach *in vitro* izolowanych zarodków obserwowano stosunkowo wysoką efektywność, mierzoną liczbą zregenerowanych roślin (71), średnio 42,2% przy zakresie od 0,0% do 66,6%. Z każdej łuszczyzny średnio uzyskiwano tylko jeden zarodek. Efektywność przeprowadzonych krzyżowań wstecznych wyrażona płodnością w przypadku krzyżowanych genotypów była znacznie niższa niż efektywność krzyżowań międzygatunkowych (odpowiednio 10,7% i 21,0%). W tym przypadku na cztery przeprowadzone kombinacje

krzyżowania, zapylone zostały 272 kwiaty, z czego uzyskano 29 nasion. Oznaczono zawartość włókna, glukozyolanów, tłuszczu i białka w nasionach międzygatunkowych mieszańców pokolenia F_2 otrzymanych z wybranych kombinacji krzyżowań pomiędzy *B. napus* i *B. rapa* oraz *B. oleracea*.

Cytogenetyczna analiza mieszańców *Brassica* odpornych na kiłę kapusty (*P. brassicae*)

Celem badań prowadzonych w ramach tego tematu była identyfikacja chromosomów u gatunków i form mieszańcowych Brassicaceae, z wykorzystaniem techniki fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) z sekwencjami chromosomowo i genomowo specyficznymi. W analizach FISH, z wykorzystaniem sekwencji rDNA (5S i 35S rDNA) jako sondy, materiał roślinny stanowiły gatunki: *B. oleracea*, *B. rapa*, *R. sativus* oraz *B. napus*. Wśród analizowanych roślin zidentyfikowano odpowiednio 18, 20, 18 i 38 chromosomów. Zastosowane sondy rDNA pozwoliły na identyfikację wybranych par chromosomów w kariotypie – A1, A10, A3, A5/A6/A9 (pochodzące z genomu *B. rapa*) oraz C4, C7 i C8 (pochodzące z genomu *B. oleracea*). Mapowanie fizyczne sekwencji rDNA wykazało zmienność w liczbie loci sekwencji 5S i 35S rDNA. W obrębie linii *B. napus* obserwowano od 8 do 14 loci 5S rDNA oraz od 9 do 15 loci 35S rDNA. Wśród analizowanych genotypów najczęstszym wzorem był układ 10 loci 5S i 12 loci 35S rDNA. Zmiany w liczbie genów kodujących rybosomalny RNA wynikają najprawdopodobniej z delecji i/lub amplifikacji sekwencji i przeniesienia jej do chromosomów, które nie nosiły wcześniej sekwencji rDNA (większa liczba loci niż spodziewana) lub też powstały na skutek delecji locus rDNA w obrębie chromosomu (mniejsza liczba loci niż spodziewana).

Literatura


- Kaczmarek, J., Irzykowski, W., Burzyński, A., Jędryczka, M. (2014). The detection of *Plasmodiophora brassicae* using Loop-mediated isothermal DNA amplification. *Acta Agrobot.* 67 (4): 59–66.
- Somé, A., Manzanares, M. J., Laurens, F., Baron, F., Thomas, G., Rouxel, F. (1996). Variation for virulence on *Brassica napus* L. amongst *Plasmodiophora brassicae* collections from France and derived single-spore isolates. *Plant Pathol.* 45: 432–439.

Poszukiwanie form kukurydzy o wysokiej odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi powodowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.

Identification of new sources of resistance for ear rot and stalk rot diseases caused by *Fusarium* spp.

Elżbieta Czembor , Seweryn Frasiński

Afiliacja Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,

 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 decyzji HOR.hn.802.3.2019 Zadanie nr 33.

Słowa kluczowe: *Fusarium graminearum*, fuzarioza kolb, kukurydza, deoksyniwalenol, zgorzel podstawy łodygi, źródła odporności

Zadanie dotyczy dwóch najważniejszych pod względem gospodarczym chorób kukurydzy powodowanych przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp. jakimi są zgorzel podstawy łodygi oraz fuzarioza kolb. Choroby te mają wpływ nie tylko na plon uzyskiwanego ziarna lub zielonej masy, lecz w sposób istotny warunkują jego jakość. Sprawcami są metabolity wtórne grzybów z rodzaju *Fusarium* spp., które są wysoce szkodliwe dla ludzi i zwierząt. Hodowla i wykorzystanie w uprawie odmian odpornych są powszechnie uznane za najbardziej opłacalną i przyjazną środowisku metodę ochrony roślin (Czembor, Frasiński, 2018; Czembor i in., 2018, Vasileaidis i in., 2011, Zijlstra i in., 2011)

Celem zadania jest identyfikacja cech fenotypowych kukurydzy warunkujących jej odporność na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi oraz określenie efektywności tych cech w programach poszukiwania źródeł odporności. W 2019 roku prowadzono wielo cechową charakterystykę pokoleń F_1 i ich form rodzicielskich wraz z określeniem efektu heterozji i współczynnika odziedziczalności dla stopnia odporności na fuzariozę kolb. Efektywność poszukiwania źródeł odporności metodą rodowodową w oparciu o oceny cech fenotypowe i oceny porażenia fuzariozą kolb i zgorzeli podstawy łodygi po zakażeniach sztucznych określono na podstawie wyników uzyskanych dla pokolenia S_3 oraz wielośrodowiskowej

oceny pokolenia S_4 .

Do badań włączono 40 mieszańców F_1 oraz ich form rodzicielskich, - należały do pul genowych KOB i SH (16 KOB i 24 SH, w trzech powtórzeniach, niezależnie dla fuzariozy kolb i zgorzeli podstawy łodygi). Były to formy o typie ziarna szklistym i zębokształtnym oraz różniące się pod względem wczesności, morfologii kolby i cech fenotypowych (wysokości, typu wiechy, zawartości antocyjanu w wybranych częściach rośliny). Ocenę odporności na fuzariozę kolb prowadzono w skali 1-7 a zgorzeli podstawy łodygi w skali 1-9 (1=brak objawów choroby). Przebieg warunków atmosferycznych w sposób istotny wpłynął na uzyskane wyniki. W końcowej fazie wegetacji opady były ciągłe, sprzyjając rozwojowi grzyba. Formy zębokształtne, których ziarniaki są bardziej podatne na porastanie grzybnią (okrywa owocowo-nasienna w górnej części jest bardziej cieka niż u form szklistych) zostały ocenione jako podatne lub bardzo podatne. Dlatego nie zostały uwzględnione w końcowych analizach, a doświadczenia dla tych form zostaną powtórzone. Mieszańce puli genowej KOB średnio wykazały się większą podatnością na fuzariozę kolb ocenianą po zakażeniach sztucznych (średnia dla ocena 4,4, zakres 2,6-6,2) w stosunku do mieszańców puli genowej SH (średnia dla ocen 4,1, zakres 3,5–5,4). Natomiast mieszańce puli genowej SH były

bardziej podatne na zgorzel podstawy łodygi (średnia dla ocen 3,9; zakres 2,7-5,5). Stopień odporności na zgorzel podstawy łodygi F_1 KOB oceniono średnio na 3,4 zakres 2,9 – 4,3).

Zawartość antocyjanu i morfologia kolby wpływała na rozwój choroby. Oceny porażenia po zakażeniach sztucznych korespondowały dodatkowo do zawartości DON oznaczonej w próbach mąki uzyskanych po zmieleniu kolb, jednak współzależności te nie były tak istotne jak w innych latach, gdy rozkład opadów jest równomierny na przestrzeni całego okresu wegetacyjnego.

Wykazano, że na wielkość współczynnika odziedziczalności również wpływała w sposób istotny pula genowa i typ ziarna: h^2_{ns} dla fuzariozy kolb była w zakresie 54% - 93%. Dla DON w grupie KOB zębokształtnych była wysoka, natomiast dla szklitych znacznie niższa. Dla cech, które mogą być potencjalnymi markerami odporności na fuzariozę kolb takich jak zawartość antocyjanu w pylniku – w grupie KOB wartość h^2_n była wysoka – 80,5% (szkliste) i 91,3% (zębokształtne); w grupie SH – wartość niska (poniżej 50,0%). Wyższy współczynnik odziedziczalności stwierdzono dla antocyjanu w łodydze (oprócz form szklitych w puli genowej SH). Wysoki współczynnik odziedziczalności wykazano również dla długości kanału kolby (od rdzenia do końca liści okrywowych w okresie kwitnienia kwiatostanów żeńskich) dla puli genowej SH i KOB o typie ziarna zębokształtnym oraz długości osadki kolby po zbiorze.

Badając efektywność poszukiwania źródeł odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi metodą rodowodową po zakażeniach sztucznych *F. graminearum* w oparciu o oceny porażenia i potencjalnie fenotypowe cechy markerowe do badań włączono materiały po 3 cyklach selekcji (S_3). Materiały puli genowej KOB po zapyleniu wsobnym zostały ocenione jako bardziej podatne, ale potwierdzeniem tego będą analizy DON dla pokolenia S_4 w kolejnym roku badań. Na podstawie wielocechowej charakterystyki pokolenia S_3 wykazano, że zawartość antocyjanu i długość kanały kolby może być potencjalnym markerem odporności na fuzariozę kolby.

Przeprowadzono również wielośrodowiskową ocenę linii pokoleń S_4 wyselekcjonowanych w cyklu badań prowadzonych w latach 2015-2018 (150 linii). Materiały scharakteryzowano z uwzględnieniem

odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi po zakażeniach sztucznych (w 1 środowisku) i przy infekcji naturalnej (w 2 środowiskach) oraz cech fenotypowych. Stwierdzono, że pula genowa SH wykazała się wysoką podatnością na zgorzel podstawy łodygi, natomiast pula KOB była bardziej podatna na fuzariozę kolb, co może być związane z różnicą we wczesności (współzależności dodatnie), potwierdzając wyniki uzyskane dla mieszańców F_1 . Aby potwierdzić stopień podatności materiałów na fuzariozę kolb, dla wybranych linii oznaczono zawartość DON w osadkach roślin, których kolby były zakażone sztucznie. Średnio, zawartość DON dla pokolenia S_4 była znacznie wyższa niż dla mieszańców F_1 . Uzasadnieniem tego może być fakt, że uwsobnienie materiału spowodowało obniżenie odporności na grzyba *F. graminearum*, którego metabolitami wtórnymi są toksyny (DON) oraz że analizy zostały wykonane dla prób mąki z osadek (wcześniejsze badania wykazały, że akumulacja tej toksyny jest wyższa w tej części kolby niż w ziarnie).

Literatura:

- Czembor, E., Waśkiewicz, A., Piechota, U., Puchta, M., Czembor, J. H., Stępień, Ł. (2019). Genetic diversity of current and historical maize inbred lines for ear rot resistance and fumonisin contamination caused by *Fusarium verticillioides*. *Frontiers in Microbiology*. doi.org/10.3389/fmicb.2019.00449
- Czembor, E., Frasiński, S. (2018). Polskie elitarne linie wsobne kukurydzy źródłem odporności na fuzariozę kolb (*Fusarium* spp.) i główńię guzowatą (*Ustilago maydis*). *Prog Plant Prot*; 58: 22–27
- Czembor, E., Frasiński, S., Stępień, Ł. (2018). Reakcja genotypów kukurydzy na infekcję wybranymi izolatami grzybów z rodzaju *Fusarium* sekcji *Liseola*. Response of maize genotypes to the infection by selected *Fusarium* isolates from *Liseola* section. *Prog Plant Prot*; 58: 81–86.
- Czembor, E., Stępień, Ł., Waśkiewicz, A. (2015). Effect of environmental factors on *Fusarium* species and associated mycotoxins in maize grain grown in Poland. *PLOS ONE* <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0133644>
- Czembor, E., Matusiak, M., Warzecha, R. (2013). Poszukiwanie źródeł odporności kukurydzy na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodyg metodą rodowodową. *Biuletyn IHAR*, 269, 131–139.

Tabela 1

Współczynniki odziedziczalności dla stopnia odporności na fuzariozę kolb, zgorzeli podstawy łodygi i innych cech morfologicznych i fizjologicznych, które potencjalnie mogą być ich markerami.

pula genowa	typ ziarna	współczynnik odziedziczalności	fuzarioza kolb (1 - 7)		DON (ppb)	wysokość średnia	wczesność		antocyjan				
			zakażane 2019	naturalna 2019			dni do pylenia	dni do wysunięcia słupków	wiecha	pylnik	słupki	łodyga	rdzeń kolby
SH	flint	szerokim zakresie			99,0%	97,7%	98,0%	95,5%	99,4%	99,9%	100,0%	100,0%	100,0%
		wąskim zakresie			99,0%	79,6%	93,2%	19,5%	74,5%	28,7%	58,4%	17,4%	100,0%
	dent	szerokim zakresie	97,8%	96,1%	98,9%	97,5%	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%	97,3%	100,0%	100,0%
		wąskim zakresie	93,3%	65,8%	82,7%	58,4%	49,7%	65,1%	72,6%	32,4%	59,5%	60,3%	100,0%
KOB	flint	szerokim zakresie	98,4%	89,6%	98,9%	95,6%	93,7%	96,5%	97,2%	99,8%	97,3%	99,4%	96,5%
		wąskim zakresie	58,3%	87,4%	36,1%	66,9%	44,3%	54,8%	50,3%	96,2%	80,5%	90,3%	45,3%
	dent	szerokim zakresie	98,5%	97,3%	99,4%	94,3%	97,3%	99,2%	98,6%	96,6%	99,0%	97,0%	98,5%
		wąskim zakresie	54,4%	66,0%	99,4%	58,3%	66,0%	25,3%	84,5%	95,5%	91,3%	51,2%	98,5%

Tabela 1 cd.

pula genowa	typ ziarna	współczynnik odziedziczalności	morfologia kolby					MTZ średnia	waga ziaren/kolbę (g)	liczba ziaren/kolbie
			długość rdzenia (mm)	długość kanału (mm)	długość słupków (mm)	zbitość liści okrywowych	długość osadki po zbiorze			
SH	flint	szerokim zakresie	97,8%	99,6%	98,7%	100,0%	97,8%	99,6%	97,0%	98,2%
		wąskim zakresie	12,0%	88,2%	17,9%	35,8%	97,8%	99,6%	97,0%	98,2%
	dent	szerokim zakresie	99,5%	99,2%	99,3%	100,0%	97,6%	98,1%	98,8%	99,1%
		wąskim zakresie	91,4%	69,4%	28,1%	41,9%	76,9%	96,0%	44,9%	50,5%
KOB	flint	szerokim zakresie	97,5%	98,5%	99,1%	100,0%	97,6%	98,2%	98,8%	94,5%
		wąskim zakresie	3,5%	31,8%	21,9%	19,2%	43,2%	56,7%	92,7%	60,0%
	dent	szerokim zakresie	99,8%	99,7%	99,2%	100,0%	95,3%	94,1%	98,7%	98,8%
		wąskim zakresie	93,7%	98,8%	68,1%	36,0%	95,3%	94,1%	98,7%	98,8%

Fusarium temperatum - znaczenie i szkodliwość w uprawie kukurydzy, poszukiwanie i charakterystyka źródeł odporności

Fusarium temperatum – importance and harmfulness in maize crops, search and characterization of resistance sources

Marcin Wit ¹✉, Piotr Ochodzki ², Roman Warzecha ², Monika Żurek ², Ewa Mirzwa-Mróż ¹, Emilia Jabłońska ¹, Józef Adamczyk ³, Anna Rogacka ³, Janusz Rogacki ³, Krzysztof Wójcik ⁴, Wojciech Wakuliński ¹

¹ Instytut Nauk Ogrodniczych, Katedra Ochrony Roślin, Zakład Fitopatologii, 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,

✉ e-mail: marcin_wit@sggw.pl, tel. 22 5932034

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, dofinansowane na podstawie § 9 ust. 1 pkt 1 oraz zadania nr 92 w załączniku nr 8, do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170, z późn. zm.). Zadanie nr 92.

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

Fuzarioza kolb kukurydzy (FKK) jest uważana za jeden z najważniejszych problemów w uprawie tej rośliny. Szkodliwość choroby polega na znaczącym spadku plonu, uzyskiwaniu ziarna gorszej jakości oraz jego zanieczyszczeniu 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, Stępień i in. 2018).

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 podjętych w 2019r. 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.

Ocenę patogeniczności przeprowadzono dla 50. 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-450, PFt-449, PFt-437, PFt-416 i PFt-444. Stanowiły one podstawę do badań podatności genotypów kukurydzy przez *F. temperatum*. W badanej populacji 50. izolatów *F. temperatum*

frekwencja występowania dopełniających typów kojarzeniowych *MATI-1* i *MATI-2* wyniosła odpowiednio 26 do 24.

W 2019 roku stopień porażenia kolb badanych 120 genotypów kukurydzy oceniane w dwóch lokalizacjach (Hodowla Roślin Smolice i IHAR-PIB Radzików oraz Małopolska Hodowla Roślin, Stacja Hodowli Roślin Kobierzycy i IHAR-PIB Radzików) był na poziomie średnim. Zakres zmienności analizowanej cechy, w oparciu o 6. stopniową skalę wahał się od 0,74 do 2,95. Średni stopień porażenia materiałów pochodzących z hodowli MHR Kobierzycy (1,42) i HRS Smolice (1,33) różnił się znacznie i różnica ta przy $\alpha=0,05$ była statystycznie istotna.

Na podkreślenie zasługuje stwierdzenie większej podatności na porażenie form dent niż flint, a stopień ich porażenia wynosił odpowiednio 1,43 i 1,32. Zależność taką obserwowano w przypadku trzech lokalizacji doświadczenia tj. Smolice, Kobierzycy i Radzików. Porażenie form dent i flint wynosiło odpowiednio: 1,56 i 1,29 (w Smolicach), 1,25 i 1,16 (w Radzikowie) oraz 1,64 i 1,63 (w Kobierzycach). Różnice w dwóch lokalizacjach doświadczenia (Smolice i Radzików) były istotne statystycznie. Stwierdzono istotny wpływ środowiska na stopień porażenia kolb kukurydzy przez *F.temperatum*. Istotnie silniej kolby były porażane w Kobierzycach (1,64) i Smolicach (1,43), niż w Radzikowie (1,21). Uzyskane wyniki wskazują na zróżnicowaną podatność materiałów hodowlanych na porażenie a zmienność porażenia miała charakter ciągły. Taki rozkład cechy jest typowy dla interakcji gospodarz patogen o charakterze rasowo niepecyficznym, a zatem dość typowym przy ocenie porażenia roślin przez *Fusarium spp*.

Określenie procentowego udziału amylozy w ogólnej zawartości skrobi przeprowadzono dla wybranych 160 prób ziarniaków kukurydzy, pochodzących z doświadczeń założonych na terenie pól doświadczalnych HR Smolice (40 prób), MHR Kobierzycy (40 prób) oraz IHAR-PIB w Radzikowie (80 prób). Zakres zmienności tej cechy wahał się od 21,52% do 38,06% i od 20,67% do 36,65%, odpowiednio dla form typu flint i dent.

Zarówno w porażonych ziarniakach pochodzących z doświadczeń inokulacyjnych, jak również w warunkach *in-vitro* (na ziarniakach ryżu) wykazano, że dominującą grupą mykotoksyn biosyntetyzowanych przez izolaty *F. temperatum* są związki heksadepsyptydowe tj. bowerycyna (BEA) i eniatyny (ENN).

Łącznie analizami objęto wybranych 160 prób ziarniaków pochodzących z doświadczeń polowych

prowadzonych na terenie wyżej wymienionych lokalizacji. W materiałach hodowli Kobierzycy średnia zawartość BEA w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 3,81 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 1,49 ppm (doświadczenie w Radzikowie). W próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość bowerycyny wynosiła 7,56 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 2,16 ppm (doświadczenie w Radzikowie). W materiałach hodowli Smolice średnia zawartość BEA w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 5,56 ppm (doświadczenie w Smolicach) i 0,94 ppm (doświadczenie w Radzikowie), zaś w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 9,17 ppm i 2,26 ppm, odpowiednio dla dwóch wyżej wymienionych lokalizacji.

W materiałach hodowli Kobierzycy w próbach ziarniaków kukurydzy typu dent średnia zawartość ergosterolu (ERG) wynosiła 24,51 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 11,16 ppm (doświadczenie w Radzikowie), zaś w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego związku wynosiła 31,02 ppm (doświadczenie w Kobierzycach) i 13,57 ppm (doświadczenie w Radzikowie). W materiałach hodowli Smolice średnia zawartość ERG w próbach kukurydzy typu dent wynosiła 20,15 ppm (doświadczenie w Smolicach) i 8,26 ppm (doświadczenie w Radzikowie), natomiast w próbach kukurydzy typu flint średnia zawartość tego metabolitu wynosiła 24,15 ppm i 12,18 ppm, odpowiednio dla doświadczeń zlokalizowanych w Smolicach i Radzikowie.

Profil mikotoksyn produkowanych przez *F.temperatum* zbadano dla 50. izolatów. Na ziarniakach ryżu wszystkie izolaty syntetyzowały bowerycynę (BEA). Średni poziom tego metabolitu wynosił 1056,1 ppm. W obrębie analizowanej populacji grzyba 49. izolatów produkowało eniatynę A1. Średni poziom tego metabolitu wynosił 33,5 ppm. Eniatyny B i B1 syntetyzowało odpowiednio 19. i 23. izolaty *F.temperatum*. Średni poziom ENN B dla populacji przebadanych izolatów wynosił 12,7 ppm, zaś ENN B1 -21,6 ppm. Żaden z przebadanych 50. izolatów patogena nie wytwarzał eniatyny A oraz fumonizyn. Średni poziom ergosterolu dla populacji przebadanych izolatów wynosił 580,2 ppm.

Wnioski:

- Badane materiały hodowlane różnią się podatnością na porażenie przez *Fusarium temperatum*.
- Formy dent są bardziej podatne na porażenie przez *Fusarium temperatum*, niż flint wśród badanych materiałów hodowlanych kukurydzy.

- Formy flint i dent różnią się pod względem udziału amylozy w strukturze skrobi.
- Istotny wpływ na zawartość amylozy w skrobi mają warunki środowiska.
- Sekwencje *EF-1a* oraz *β-tubulina* umożliwiają jednoznaczną diagnostykę *Fusarium temperatum*.
- Struktura endospermu ma istotny wpływ na porażenie ziarniaków przez *F. temperatum* oraz zawartość bowerycyny.
- 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. *Cer. 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.
- Stępień, Ł., Gromadzka, K., Chełkowski, J., Basińska-Barczak, A., Lalak-Kańczugowska, J. (2018). Diversity and mycotoxin production by *Fusarium temperatum* and *Fusarium subglutinans* as causal agents of pre-harvest *Fusarium* maize ear rot in Poland. *J. Appl. Genet.*: 1–9 pp.

Badania tolerancji odmian ziemniaka na stresy abiotyczne w świetle postępujących zmian klimatycznych

Drought tolerance of potato cultivars to abiotic stress in relation to climate change

Dominika Boguszewska-Mankowska ¹✉, Krystyna Zarzyńska ¹,
Krzysztof Treder ², Mateusz Mielczarek ², Anna Pawłowska ², Bogumiła
Zacharzewska ²

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB,

¹Zakład Agronomii Ziemniaka w Jadwisinie,

²Zakład Nasiennictwa i Ochrony Ziemniaka w Boninie,

✉ e-mail: d.boguszewska-mankowska@ihar.edu.pl, tel. 22 7826620 w.108

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 59.

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

Stres abiotyczny jest jednym z głównych ograniczeń produkcji roślinnej i bezpieczeństwa żywnościowego na całym świecie. Sytuacja pogorsza się z powodu drastycznych i szybkich zmian klimatu. Upał i susza są niewątpliwie dwoma najważniejszymi stresami mającymi ogromny wpływ na wzrost i wydajność roślin. Bardzo ważne jest zrozumienie zależności fizjologicznych, biochemicznych i ekologicznych związanych z tymi stresami w celu wykorzystania ich w hodowli nowych odmian. Wpływ stresów abiotycznych na produkcję ziemniaków wzrosnie w ciągu następnego dziesięciolecia ze względu na zmiany klimatu i rozszerzenie uprawy tej rośliny w warunkach suszy/upałów (Hijmanns 2003). Ziemniak jest podatny na suszę (Monneveux i in. 2013) z powodu płytkiego systemu korzeniowego i niskiej zdolności do regeneracji (Iwama i Yamaguchi 2006). Susza zmniejsza wzrost roślin (Deblonde i in. 2001) oraz liczbę i wielkość bulw (Schafleitner i in. 2007). Wielkość skutków suszy zależy od czasu jej trwania i stopnia nasilenia (Schafleitner 2009). Hodowla ziemniaków odpornych na wysoką temperaturę i suszę jest jednym z najbardziej wykonalnych i praktycznych sposobów radzenia sobie z globalnym ociepleniem. Dobrą wskazówką dla hodowców mogą stanowić informacje o wielkości systemu korzeniowego.

Celem podjętych badań było wytypowanie odmian o różnej wrażliwości na suszę glebową,

wysoką temperaturę, poznanie zależności 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. Najmniejszą powierzchnią asymilacyjną w warunkach suszy glebowej charakteryzowała się odmiana Aldona, najwyższą Otolia. Najmniejszą powierzchnią asymilacyjną w warunkach suszy glebowej i stresu wysokiej temperatury charakteryzowała się odmiana Aldona, najwyższą Otolia i Mieszko. W warunkach suszy obserwowano zmniejszenie zawartości chlorofilu (SPAD). Obserwowano również różnice odmianowe. Największy spadek tego wskaźnika obserwowano u odmiany Irmina. Oceniając rośliny wg skali wędnięcia, w warunkach suszy glebowej oraz przy występowaniu dwóch stresów jednocześnie najbardziej wędła odmiana Mieszko najmniej odmiana Otolia. Najmniejszym spadkiem plonu w warunkach suszy glebowej charakteryzowały

się odmiana Bojar. Najmniejszym spadkiem plonu w warunkach suszy glebowej i wysokiej temperatury występujących równocześnie charakteryzowała się odmiana Szyper największym Otolia. W warunkach kontroli najwyżej plonowały odmiany Bojar, Irmina i Otolia.

Badania systemu korzeniowego w warunkach stresów abiotycznych wykazały, że średnio dla odmian największą świeżą i suchą masę korzeni oraz największy udział korzeni w całej biomacie rośliny odnotowano w kombinacji z wysoką temperaturą a następnie w kombinacji kontrolnej. Pod wpływem stresu suszy nastąpił spadek wszystkich badanych parametrów. Największy spadek wartości badanych parametrów miał miejsce w kombinacji gdzie zastosowano oba stesy tj suszę i wysoką temperaturę. Spadek suchej masy korzeni pod wpływem tylko stresu suszy wynosił średnio dla odmian 26% zaś pod wpływem obu stresów zastosowanych jednocześnie 44%. Udział korzeni w biomacie rośliny zmniejszył się odpowiednio o 27 i 46%. Uzyskane wyniki potwierdzają zależności opisywane w literaturze. Wiadomym jest, że pod wpływem stresu suszy następuje zmniejszenie zarówno masy nadziemnej, jak i podziemnej roślin ziemniaka. Z danych literaturowych wiadomo też, że pod wpływem stresu wysokiej temperatury zwiększa się masa nadziemna. Z naszych badań wynika, że zwiększa się też masa korzeniowego i udział korzeni w biomacie rośliny. Wynika to stąd, że ziemniak jest rośliną klimatu umiarkowanego i optymalna do tworzenia bulw temperatura wynosi ok. 20°C. Zbyt wysoka temperatura powoduje nadmierny rozwój zarówno części nadziemnej, jak i podziemnej rośliny.

Badania biochemiczne sześciu odmian ziemniaka o różnej tolerancyjności na suszę wykazały, że największe zmiany zawartości L-proliny obserwowano po 9 dniach występowania stresów suszy i wysokiej temperatury. Największy wzrost L-proliny odnotowano pod wpływem suszy w warunkach wysokiej temperatury (38°C) u odmian Gwiazda, Tajfun, Laskara. U odmiany Cekin zaobserwowano spadek zawartości L-proliny w tych warunkach. W warunkach suszy glebowej przy optymalnej temperaturze (21°C) obserwowano wzrost zawartości L-proliny u wszystkich badanych odmian.

Literatura:

- Deblonde, P. M. K., Ledent, J. F. (2001). Effects of moderate drought drought conditions on green leaf number, stem height, leaf length and tuber yield of potato cultivars. *Eur. J. Agron.* 14: 1–41.
- Hijmans, R. J. (2003). The effect of climate change on global potato production. *American Journal of Potato Research*, 80: 271–280.
- Iwama, K, Yamaguchi, J. (2006). Abiotic stresses. In: Gopal J, Khurana SM, editors. *Handbook of potato production, improvement and postharvest management*. New York: Food Product Press. pp. 231–278
- Monneveux, P., Ramirez, D. A., Pino, M. T. (2013). Drought tolerance in potato (*S. tuberosum* L.) Can we learn from drought tolerance research in cereals? *Plant Science*, 205–206, 76–86.
- Schafleitner, R., Rosales, R. O. G., Gaudin, A., Aliaga, C. A. A., Martinez, G. N., Marca, L. R. T., Bolivar, L. A., Delgado, F. M., Simon, R., Bonierbale, M. (2007). Capturing candidate drought tolerance traits in two native Andean potato clones by transcription profiling of field grown plants under water stress. *Plant Physiol. Biochem.*; 45: 673–690.

Analiza interakcji genotypowo-środowiskowej w odniesieniu do wybranych cech użytkowych ziemniaka jadalnego w różnych systemach uprawy

Analysis of genotype by environment interaction for selected traits of table potato in various cultivation systems

Bogdan Flis ✉, Beata Tatrowska

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
Oddział Młochów, ul. Platanowa 19, Młochów 05-831,
✉ e-mail: b.flis@ihar.edu.pl, tel. 22 729 92 48 w. 216

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 62.

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 2019 roku cele prac były następujące (1) przeprowadzenie doświadczeń polowych w 3 lokalizacjach z wybranymi rodami i odmianami ziemniaka (drugi element 3-letniego cyklu), (2) rozmnażanie badanych rodów i odmian oraz (3) selekcjonowanie klonów tetraploidalnych wyróżniających się poziomem cech użytkowych i wybranych cech odpornościowych.

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 dwóch 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 Tukey'a lub test Kruskala-Wallisa. Analizę stabilności przeprowadzono wykorzystując współczynnik regresji (Eberhart i Russel, 1966), wariancję stabilności Shukli (Shukla, 1972) i współczynnik stabilności AMMI – ASV (ammi stability value) (Gauch, 2006, Purchase i in., 2000). 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 stabilności 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 2019 r. prowadzono także selekcję wśród 40 tetraploidalnych rodów ziemniaka pochodzących od form własnych i odmian, będących donorami odporności na zarazę ziemniaka krzyżowanych z donorami cech jakości, którymi były rody diploidalne. Rody te utrzymywano na poletkach 15 krzawkowych.

Wyniki przeprowadzonych w 2019 r. doświadczeń wskazują na istotny wpływ genotypu (tj. badanych rodów i odmian) oraz miejscowości na badane cechy. Najwyższy plon bulw i najniższą zawartość skrobi stwierdzono w Boguchwale (2,2 kg/krzak), niższe w Młochowie (1,3 kg/krzak), a najniższe w Grabowie z uprawą ekologiczną (0,6 kg/krzak). Zawartość skrobi była najwyższa w uprawie ekologicznej w Grabowie (14,0%), a najniższa w Boguchwale (12,3%). W przypadku plonu i zawartości skrobi stwierdzono wysoce istotną statystycznie interakcję rodów/odmian z miejscowościami.

Najmniejsze nasilenie wad stwierdzono w bulwach pochodzących z uprawy w Młochowie i Grabowie (odpowiednio średnie wartości 2,9 i 3,0), a najwyższe w Boguchwale (średnia ocena 2,5). Najlepszy smak miały bulwy pochodzące z uprawy ekologicznej (średnia 6,6), a w pozostałych lokalizacjach był istotnie słabszy (6,5 w Młochowie i 6,0 w Boguchwale). W 2019 r. nie stwierdzono różnic pomiędzy średnimi ocenami ciemnienia bulw pomiędzy poszczególnymi miejscowościami (średnie oceny od 7,1 do 7,2). Na otrzymane wyniki ponownie duży wpływ miał przebieg pogody (długotrwała susza w centralnej Polsce).

W celu oceny stabilności plonu zastosowano kilka parametrów wariację stabilności. Współczynniki regresji Eberharta i Russela (1966) dla większości badanych rodów i odmian (wyjątkiem była bardzo wczesna odmiana Bellarosa) był zbliżony do 1, co wskazuje na dynamiczny typ stabilności, czyli wyższe plony w lepszych środowiskach. Tylko w przypadku dwóch rodów nie stwierdzono istotności współczynnika regresji, co wskazuje na biologiczny typ stabilności dla tych rodów.

Dwa pozostałe parametry stabilności, tj. wariacja stabilności i ASV były bardzo wysoko skorelowane ($r=0,92$) i wskazują na dużą liczbę rodów/

odmian o stabilnym plonie (35 rodów/odmian stabilnych wg wariacji stabilności i 26 wg ASV). Liczba rodów/odmian stabilnych na podstawie dwuletnich badań (nieprezentowanych w tym komunikacie) znacznie maleje (24 genotypy stabilne wg wariacji stabilności). W przypadku parametru ASV choć liczba form stabilnych jest podobna, ale przeważnie ocena jednoroczna i dwuletnia wskazuje na różne genotypy stabilne.

Dodatkowo, zmodyfikowano wyjściowy ranking badanych genotypów wg rosnącego średniego plonu, uwzględniając statystyczną istotność różnic pomiędzy badanymi genotypami oraz istotność wariacji stabilności wg Shukli (1972). Odpowiednio zwiększając (dla genotypów plenniejszych i/lub stabilnych) lub zmniejszając (dla genotypów mniej plennych i/lub niestabilnych) wyjściową rangę każdego rodu lub odmiany otrzymano, nowy ranking i wyróżniono najlepsze genotypy łączące zdolność do plonowania ze stabilnością (Mendiburu, 2015). W takim uproszczonym schemacie selekcji, wybór najlepszych rodów zależy od wysokości średniego plonu, a stabilność (określona za pomocą wariacji stabilności) ma równorzędne lub mniejsze znaczenie. Podobna procedura zmiany rankingu badanych rodów/odmian przeprowadzona dla średniej wartości plonu i parametru ASV, pozwala wyciągnąć podobny wniosek, jak w przypadku wariacji stabilności.

W przypadku zawartości skrobi oceniono stabilność za pomocą wariacji stabilności Shukli, która pozwoliła 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 wskazujące na duży udział rodów/odmian niestabilnych pod względem zawartości skrobi otrzymywano także w poprzednich latach.

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 prowadzonych w trzech miejscowościach z uprawą tradycyjną lub ekologiczną, stwierdzono:

- a. istotny wpływ genotypu (rodu lub odmiany) i miejscowości na poziom wszystkich ocenianych cech oraz wpływ ich interakcji na poziom plonu i zawartości skrobi.
 - b. stabilny poziom plonu dla większości badanych rodów i odmian. Z kolei stabilność zawartości skrobi była znacznie rzadziej obserwowana.
 - c. stosunkowo rzadkie występowanie stabilnie małego nasilenia wad bulw.
2. Charakteryzowano 40 rodów pod względem cech użytkowych i odporności na zarazę ziemniaka oraz wirus Y ziemniaka. Zidentyfikowano grupę rodów o dobrym plonie, odpornych na zarazę ziemniaka lub wirusa Y ziemniaka charakteryzujących się morfologią oraz smakiem bulw na poziomie odmian wzorcowych Oberon, Satina i Tajfun.

Literatura

- Eberhart, S.A., Russel, W.A. (1966). Stability parameters for comparing varieties. *Crop Science* 6: 36–40.
- Gauch, H.G. (2006). Statistical analysis of yield trials by AMMI and GGE. *Crop Science* 46 (4): 1488–1500.
- Mendiburu, F. (2015). agricolae: Statistical Procedures for Agricultural Research. R package version 1.2-3. <http://CRAN.R-project.org/package=Agricole>
- Purchase, J.L., Hatting, H., Van Deventer, C.S. (2000). Genotype \times environment interaction of winter wheat (*Triticum aestivum* L.) in South Africa: II. Stability analysis of yield performance. *South African Journal of Plant and Soil* 17 (3): 101–107.
- 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.

Badania ekspresji i genetyczna charakterystyka odporności na bakterie *Dickeya solani* w wyróżnionych źródłach odporności w ziemniaku na poziomie diploidalnym

Research on the expression and genetic characterization of the resistance to bacteria *Dickeya solani* in selected for resistance diploid potato

Renata Lebecka✉, Jadwiga Śliwka, Anna Grupa-Urbańska, Waldemar Marczewski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
✉ e-mail: r.lebecka@ihar.edu.pl, tel. 22 7299248 w. 207

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.802.19.2018 Zadanie nr 56.

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

Celem zadania było zmapowanie loci ilościowych odporności bulw ziemniaka na bakterie *D. solani* na podstawie wyników trzyletniej oceny laboratoryjnej porażenia bulw potomstwa populacji mapującej, pochodzącej po skrzyżowaniu formy wysokoodpornej na *D. solani* (DG 00–270) z formą podatną (DG 08–305) i zbadanie związku odporności bulw na *D. solani* z zawartością skrobi w bulwach,

Zlokalizowanie na mapie genetycznej ziemniaka genów kodujących białka wyróżnione w rodzicach populacji mapującej we wczesnej fazie objawowej infekcji po inokulacji bakteriami *Dickeya solani* i zbadanie ich związku z odpornością bulw ziemniaka na bakterie *D. solani* w populacji mapującej.

Opis wyników

Loci cech ilościowych (QTL) odporności na bakterie *P. atrosepticum* zostały zmapowane (Zimnoch-Guzowska i in., 2000), przy użyciu 496 markerów RLFP i ALFP. W bieżącym projekcie uzyskano mapę genetyczną populacji DS-13, która liczy 2259 markerów i posiada łączną długość 1160,7 cM. Jest to druga mapa genetyczna odporności na bakterie powodujące mokrą zgniliznę bulw ziemniaka, ale pierwsza – odporności bulw na bakterię *D. solani*. Obie mapy genetyczne różnią się pod względem wykrytych QTL związanych z cechą odporności bulw na zakażenie

bakteriami. W naszych badaniach wykryto dwa QTL: jeden o dużym wpływie na dwa parametry porażenia mokrą zgnilizną bulw, we wszystkich trzech latach badań oraz dla średnich trzyletnich, na chromosomie IV (22,4% (średnie RT), oraz 22,9% (średnie DI) wyjaśnianej wariancji, drugi, o słabszym efekcie na RT 16,5% wyjaśnianej wariancji, na chromosomie II. QTL dla RT na chromosomie II był istotny w dwóch latach badań, natomiast nie wykazywał związku z DI. W niektórych zestawach danych wykryto także słaby QTL na chromosomie V wpływający na odporność na *D. solani*. W przypadku średniej RT wierzchołek najistotniejszego QTL na chromosomie IV był położony na 40,5 cM a dla średniej DI – na 47,1 cM. W badaniach Zimnoch-Guzowskiej i in. (2000) wykryto 12 QTLs na dziesięciu chromosomach ziemniaka, z tym, że trzy najsilniej związane z cechą były umieszczone na chromosomach III, VI i XII i wyjaśniały 6,6%, 5,3% oraz 6,3% wariancji, a pozostałych 9 (I, II, IV-2, V-2, IX, X, XI) łącznie wyjaśniało 37,5% zmienności. W przypadku populacji DS-13 dwa QTLs łącznie wyjaśniają 38,9% (RT).

W badaniach Lebecka et al. (2019) wykryto białka różnicowe w bulwach form rodzicielskich populacji DS-13, 8 h po inokulacji bakteriami *D. solani*. Zmapowano trzy geny kandydujące, kodujące białka różnicowe wykryte we wczesnej fazie infekcji w formach rodzicielskich populacji

mapującej na chromosomach: VII – M1D4V9 – inhibitor metalokarboksydazy, II – B3F8F4 – gluta-redoksyna, III – P01080 – inhibitor proteiny typu 2 CM7 K, VIII – M1BMR6 oksydaza katecholu. Żaden z markerów nie został zlokalizowany w obszarze QTL odporności bulw na bakterie.

Doniesienia w literaturze na temat związku zawartości skrobi w bulwach i odpornością na bakterie powodujące mokrą zgniliznę bulw nie są jednoznaczne. W naszych badaniach zmapowano QTL zawartości skrobi w bulwach na chromosomach III, V, VI, VII, VIII, IX, XI i XII. Żaden z nich nie został zlokalizowany na chromosomie II czy IV. Nie ma podstaw do odrzucenia hipotezy o braku związku pomiędzy zawartością skrobi w bulwach a ich odpornością na bakterie powodujące gnicie bulw.

Wnioski

W prezentowanej pracy po raz pierwszy zlokalizowano QTL o dużym wpływie na wszystkie trzy badane parametry (RT, SR i DI) opisujące odporność bulw ziemniaka na bakterie *D. solani*, oraz o słabszym efekcie na dwa parametry badane (RT i SR). Otrzymane wyniki dają możliwość dalszego

poszukiwania w zidentyfikowanych regionach QTL genów kandydujących odporności bulw na bakterie.

Zmapowane geny kandydujące, kodujące białka różnicowe wykryte we wczesnej fazie infekcji w formach rodzicielskich populacji DS-13 nie znajdują się w zidentyfikowanych obszarach QTL odporności bulw. Wyjaśnienie roli tych białek wymaga dalszych badań.

Nie potwierdzono związku zawartości skrobi z cechą badaną, co pozwala na wyselekcjonowanie genotypów ziemniaka łączących wysoki poziom odporności z wysoką zawartością skrobi.


Literatura

- Lebecka, R., Kistowski, M., Dębski, J., Szajko, K., Murawska, Z., Marczewski, W. (2019). Quantitative proteomic analysis of differentially expressed proteins in tubers of potato plants differing in resistance to *Dickeya solani*. *Plant and Soil*, 441: 317–329
- 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

Wyróżnianie form ziemniaka o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak przy wykorzystaniu metod konwencjonalnych i molekularnych. Charakterystyka nowego źródła odporności na *Globodera pallida* znalezionej w *Solanum gourlayi*

Selection of potato forms with accumulated resistances to nematodes attacking the potato by using conventional and molecular methods. Characterization of a new source of resistance to *Globodera pallida* found in *Solanum gourlayi*

Dorota Milczarek , Bogdan Flis, Anna Podlewska-Przetakiewicz

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
 e-mail: d.milczarek@ihar.edu.pl, tel. 22 7299248 w. 222

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 60.

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

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 ramach zadania w 2019 roku było: a) Przeprowadzenie oceny odporności wybranych klonów tetraploidalnych na patotypy *G. rostochiensis*; b) Przeprowadzenie doświadczenia polowego z udziałem wybranych klonów tetraploidalnych: ocena plonu bulw, ich morfologii oraz zawartości skrobi. Selekcja form o złożonej odporności na mątwiki będzie częściowo prowadzona z wykorzystaniem diagnostycznych markerów molekularnych. Przeprowadzenie krzyżowań interploidalnych mających na celu wprowadzenie odporności ze źródła *Solanum gourlayi* na poziom tetraploidalny; c) stworzenie mapy genetycznej i przeprowadzenie analizy QTL, co pozwoli na poznanie genetycznych uwarunkowań odporności na mątwiki zaobserwowanej w gatunku *S. gourlayi* oraz namnożenie materiału bulwowego wybranej populacji mapującej.

Materiał badawczy obejmował: (a) klony

z diploidalnej populacji mapującej DW 94-4235 × Sg 2/7 oraz (b) 50 klonów tetraploidalnych o złożonej odporności na patotypy *Globodera* spp. pochodzących z 3 kombinacji krzyżówkowych. Dla klonów tetraploidalnych przeprowadzono ocenę odporności na patotypy Ro1, 2, 3, 4 i 5 *G. rostochiensis*. 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). Dla klonów tych wykonano również analizę molekularną obecności fragmentów diagnostycznych markera GP122 genu *Ry-f_{sto}*, warunkującego odporność na wirus Y ziemniaka oraz markera NI25 genu *Sen1*, warunkującego odporność na raka ziemniaka. Ponadto wybrane wyróżniające się klony oceniono pod kątem cech kulinarnych. Wykonano także program krzyżowań interploidalnych mający na celu wprowadzenie odporności z *Solanum gourlayi* na poziom tetraploidalny.

Stworzono mapę genetyczną oraz przeprowadzono analizy QTL. Analizy QTL przeprowadzono stosując mapowanie interwałowe. QTL wykrywano przyjmując wartość LOD = 3, za krytyczną. Wykorzystano programy: Van Oojien JW

(2006) JoinMap®4 oraz Van Ooijen JW (2009) MapQTL®6.

W praktyce hodowlanej korzystne jest łączenie genów odporności. Kumulacja genów odporności (łączenie genów nadających odporność na różne patogeny) zapewnia odporność na szerokie spektrum szkodników. Natomiast piramidyzacja genów odporności (łączenie genów nadających odporność na ten sam patotyp) utrudnia powstawanie wirulentnych ras patogenów (Kim i in., 2012). Wybrane na podstawie amplifikacji markerów genów *H1*, *Gro1-4* i *GpaV_{vrm}* klonów tetraploidalnych, charakteryzujące się odpornością na patotypy Pa2,3 *G. pallida*, przetestowano pod kątem odporności na wszystkie patotypy *G. rostochiensis*. Spośród 50 klonów tetraploidalnych, przetestowanych pod kątem odporności na patotypy *G. rostochiensis* 48 było odpornych na patotyp Ro1, 36 klonów było odpornych na patotyp Ro2, 48 było odpornych na patotyp Ro3, 46 klonów było odpornych na patotyp Ro4 a 32 klonów wykazały się odpornością na patotyp Ro5. 31 spośród badanych klonów charakteryzowało się odpornością na wszystkie patotypy *G. rostochiensis*.

Ocena plonowania klonów tetraploidalnych, uzyskanych w wyniku krzyżowań form o złożonej odporności na *Globodera* spp., wskazuje na porównywalny poziom ich plonu bulw i plonu skrobi w porównaniu do wykorzystanych w doświadczeniu odmian wzorcowych. Również cechy morfologii bulw badanych klonów były na poziomie porównywalnym do wartości uzyskanych dla odmian wzorcowych.

Przeprowadzono porównanie średnich wartości cech pomiędzy grupą klonów charakteryzujących się amplifikacją markerów genów *H1*, *Gro1-4* i *GpaV_{vrm}*. Klonów posiadające wszystkie markery charakteryzowały się najwyższym plonem bulw. Badane klonów nie wykazywały zróżnicowania w ramach pozostałych badanych cech. Klonów posiadające markery HC, *Gro1-4* i 57R charakteryzowały się dobrym poziomem cech agronomicznych, co wskazuje na możliwość wytypowania spośród populacji tetraploidalnych klonów o dobrym poziomie badanych cech połączonych z odpornością na patotypy Ro1, Ro4 i Ro5 *G. rostochiensis* oraz Pa2/3 *G. pallida*.

Prezentowana praca wskazuje na możliwość kreowania materiałów hodowlanych o złożonych opornościach oraz materiałów, które wnoszą odporność na szkodniki od niedawna szerzące się w Europie, jak *G. pallida* (Przetakiewicz i in. 2017). Ponadto wyselekcjonowano 6 klonów łączących

odporność na patotypy mątwika ziemniaczanego i agresywnego z odpornością na wirus Y ziemniaka i na raka ziemniaka (potwierdzone amplifikacją markerów genów odporności: *H1*, *Gro1-4*, *GpaV_{vrm}*, *sen1* i *Ry-f_{sto}*).

W wyniku przeprowadzenia programu krzyżowań interploidalnych uzyskano 55 jagód, a z nasion uzyskanych z krzyżowań interploidalnych 2018 zebrano 8 klonów, które wytworzyły bulwy. Wskazuje to na możliwość wprowadzenia odporności z *Solanum gourlayi* na poziom tetraploidalny.

W ramach tematu przeprowadzono krzyżowania diploidalnej formy *S. gourlayi* (formy Sg) odpornej na patotypy Pa2 i Pa3 *G. pallida* z diploidalną formą podatną DW 94-4235 uzyskując populację, która posłużyła do stworzenia mapy genetycznej z wykorzystaniem markerów DArTseq. Uzyskana mapa genetyczna liczy 1316 loci i mierzy łącznie 1021 cM. Na podstawie utworzonej mapy przeprowadzono analizę QTL dla odporności na patotypy Pa2 i Pa3 mątwika agresywnego (*G. pallida*). Analiza została przeprowadzona osobno dla każdego zbioru danych (liczba cyst i ocena odporności w latach) oraz na wartościach średnich a następnie porównano uzyskane wyniki. Dla danych dotyczących odporności na mątwika agresywnego patotyp Pa2 wyznaczono 69 pozycji o LOD > 3, na chromosomach II, V, VIII, IX, X, XI i XII. Żadna z tych lokalizacji nie była jednak powtarzalna w latach. Dla danych dotyczących odporności na mątwika agresywnego patotyp Pa3 wyznaczono 212 pozycji o LOD > 3, na chromosomach IV, V, VI, VII, X, XI i XII. Powtarzalne w latach, ocenie vs liczbie cyst, było 5 lokalizacji uzyskanych dla chromosomu XI. Uzyskane wyniki wskazują, że badana cecha (odporność na *G. pallida*) jest warunkowana wieloma genami o sumujących się efektach. Różne wyniki uzyskane w latach sugerują natomiast modyfikujący wpływ środowiska na tą cechę.

Ocena odporności wybranych klonów tetraploidalnych potwierdza wysoką złożoną odporność klonów pochodzących z krzyżowań łączących odporność na *G. rostochiensis* z odpornością na *G. pallida*. Grupa wybranych klonów może więc posłużyć do zbadania zależności pomiędzy odpornością na mątwika a jakością bulw ziemniaka.

Wyniki doświadczenia polowego wskazują, że klonów łączące odporności na różne patotypy mątwika ziemniaczanego i agresywnego nie odbiegają do odmian wzorcowych pod względem badanych cech agronomicznych (plon, skrobia, morfologia bulw). Nagromadzenie odporności na mątwika nie ma więc negatywnego wpływu

na te cechy.

Wyselekcjonowano 6 klonów charakteryzujących się amplifikacją markerów 5 genów odporności: *H1*, *Gro1-4*, *GpaV_{vrm}*, *sen1* i *Ry-f_{sto}*.

Uzyskano łącznie 24 jagody z krzyżowania form Sg z klonem 11-VIII-86 oraz 30 jagód z krzyżowania z udziałem klonu PW363, a z nasion uzyskanych z krzyżowań interploidanych 2018 zebrano 8 klonów, które wytworzyły bulwy co wskazuje na możliwość wprowadzenia odporności z *S. gourlayi* na poziom tetraploidalny.

Bazując na danych uzyskanych z analizy DArTseq dla populacji mapującej stworzono mapę genetyczną *Solanum gourlayi*. Uzyskana mapa genetyczna liczy 1316 loci i mierzyła łącznie 1021 cM. Na jej podstawie przeprowadzono analizę QTL.

Analizę QTL przeprowadzono wyznaczając loci na chromosomie XI tłumaczące średnio od 12,9 do 14,8% zmienności w przypadku oceny odporności na patotyp Pa3 *G. pallida*.

Literatura

- Kim, H. J., Lee, H. R., Jo, K. R., Mahdi, Mortazavian, S. M., Huigen, D. J., Evenhius, B., Kessel, G., Visser, R. G. F., Jacobsen, E., Vossen, J. H. (2012). Broad spectrum late blight resistance in potato differential set plants *MaR8* and *MaR9* is conferred by multiple stacked *R* genes. *Theoretical and Applied Genetics* 124: 923–935.
- Przetakiewicz, A., Milczarek, D., Zimnoch-Guzowska, E., & Flis, B. (2017). Improvement level of nematode resistance in potato facing changes in population of *Globodera* spp. *JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences*, 27(6).

Eliminacja patogenów niekwwarantannowych (bakterie endogenne i wirusy) oraz kontrola zdrowotności roślin ziemniaka w banku *in vitro*

Elimination of non-quarantine pathogens (viruses and endophytic bacteria) and control of Potato plantlets healthiness in the *in vitro* bank

Dorota Michałowska ✉, Agnieszka Przewodowska, Włodzimierz Przewodowski, Joanna Piskorz, Oksana Olejnik

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - PIB, Oddział w Boninie,
✉ e-mail: michalowska@ziemniak-bonin.pl, tel. 94 3423031 wew. 213

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.802.19.2018 Zadanie nr 63.

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

Zgromadzone w Banku Genów *in vitro* zasoby genowe ziemniaka powinny być wolne od patogenów dlatego głównym celem zadania nr 63 jest doskonalenie metod eliminowania wirusów roślinnych i innych zakażeń bakteryjnych w kulturach *in vitro* przy zachowaniu szczególnej ostrożności.

Choroby wirusowe stanowią główną przyczynę złej jakości sadzeniaków, prowadzą do degeneracji plantacji nasiennych i wpływają na znaczne straty plonu. Największe zagrożenie stanowi wirus Y ziemniaka, który może spowodować spadek plonu bulw nawet o 50% (Chrzanowska 2000). Z kolei wirusy S i M ziemniaka, które łatwo rozprzestrzeniają się, 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 szczególnie ważne jest utrzymanie zdrowych, wolnych od wirusów materiałów wyjściowych ziemniaka w kulturach *in vitro* oraz opracowanie skutecznej metody eliminacji PVS, PVM i PVY z porażonego materiału wprowadzanego do Banku Genów.

W ramach tematu badawczego wykonano badania nad uwalnianiem roślin od wirusów PVS, PVM i PVY przy zastosowaniu dwóch metod: termoterapii połączonej z izolacją merystemów i chemioterapii jednowęzłowych fragmentów

roślin *in vitro* porażonych wirusami.

Zjawisko eliminacji wirusów w całych roślinach pod wpływem wysokiej temperatury po raz pierwszy zostało opisane przez amerykańskiego badacza L. O. Kunkela (1936). 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 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 79% (wykonawca 1) do 45,5% (wykonawca 2) roślin *in vitro*, w tym wolnych od wirusa 93% (wykonawca 1) do 16,6% (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 eliminuje PVS i 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 zarówno rybawiryna, jak i tiouracyl dodane do podłoża nieznacznie obniżają poziom ekstynkcji wirusa PVS i PVY, natomiast nie mają wpływu na zmniejszenie koncentracji wirusa M ziemniaka. Wraz ze wzrostem stężenia RBV w pożywce wprost proporcjonalnie wzrasta jego fitotoksyczne działanie na rośliny *in vitro*. Dodany do podłoża tiouracyl nie ma negatywnego wpływu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*.

Bakterie endogenne są problemem, który pojawia się systematycznie w kulturach *in vitro*, niezależnie od gatunku roślin. Nawet największa staranność w procesie mikrorozmnażania nie daje stuprocentowej pewności otrzymania i rozmnażania kultur bez zanieczyszczeń. Prawidłowo przeprowadzona dezynfekcja eksplantatów w początkowej fazie nie wykazuje zanieczyszczeń bakteryjnych i mogą one nie być zauważone (Orlikowska i in. 2012). 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 2019 roku było badanie trzech dostępnych na rynku preparatów bakteriobójczych: PPMTM, ProClin 300® i NaClO, pod kątem skuteczności zwalczania zanieczyszczeń bakteryjnych (bakterie endogenne) w kulturach *in vitro* ziemniaka i ocena ich fitotoksyczności. Preparaty te są stosowane z powodzeniem w kulturach *in vitro* innych gatunków roślin, brakuje jednak informacji na temat stosowania ich w kulturach *in vitro* ziemniaka. Dane literaturowe wykazują pozytywny wpływ preparatów w ograniczeniu zanieczyszczeń bakteryjnych, jednak muszą być one stosowane w odpowiedniej koncentracji w zależności od gatunku rośliny, 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 PPMTM, podobnie jak w latach poprzednich nie wykazywał fitotoksycznego wpływu na eksplantaty, rośliny rozwijały się prawidłowo i dobrze się korzeniły. Osiągnęły wysokość ok. 8-10 cm, a współczynnik rozmnożenia, w zależności od genotypu, wynosił od 5 do 9. Najniższa dawka 0,3% w dużym stopniu eliminowała bakterie endogenne – 88,9% czystych kultur. Wyższe dawki 0,4 i 0,5% to 100% kultur wolnych od zanieczyszczeń bakteryjnych. Dodatek do pożywki ProClin300® przy dawkach 0,02 i 0,03% eliminował bakterie endogenne w 74,5-93%, jednocześnie nie zaobserwowano fitotoksycznego działania preparatu na wzrost i rozwój roślin *in vitro*. Natomiast najwyższa dawka 0,04% wyeliminowała całkowicie zanieczyszczenia bakteryjne. Jednak przy wyższej dawce rośliny słabiej korzeniły się i rosły niższe w stosunku do kontroli. Podchloryn sodu (NaClO) dodany do pożywki przy niższych dawkach 0,0002-0,0003% eliminował bakterie endogenne u ok. 50% roślin, natomiast najwyższa dawka 0,001% całkowicie wyeliminowała endofity. Jednocześnie nie zaobserwowano szkodliwego działania na wzrost i rozwój roślin *in vitro*.

Sprawdzając trwałość efektu zastosowanych we wcześniejszych latach biocydów: PPMTM i ProClin 300® na dalszych etapach mikrorozmnażania zaobserwowano, że tylko fragmenty szczytowe były wizualnie czyste, tzn. nie zaobserwowano zmętnienia podłoża. Pozostałe fragmenty były zanieczyszczone bakteriami endogennymi.

Literatura

- Ali, M. A., Nasiruddin, K. M., Haque, M. S., Faisal, S. M. (2013). Virus elimination in potato through meristem culture followed by thermotherapy. SAARA J. Agri 11(1): 71–80;
- Biniyam, T., Tedesse, M. (2008). A survey of Vidal sttus on potatoes grown in Eritrea and in vitro elimination of local variety Tsaeda embaba. Afr. J. Biotech. 7(4): 397–403;
- Chrzanowska, M. (2000). Choroby ziemniaka wywołane przez wirusy. Wieś Jutra 3(20): 27–29;
- Kostiw, M. (2013). Przyrodnicze i pozaprzyrodnicze czynniki oraz ich wpływ na produkcję nasiennej ziemniaka. Wieś Jutra 1(174): 28–29;
- Kunkel, L. O. (1936). Heat treatments for the cure of yellows and other virus diseases of Peach. – Phytopathology 26: 809–830.

- Mahmound, S. Y. M., Hosseney, M. H., Abdel-Ghaffar, M. H. (2009). Evaluation of some therapies to eliminate potato Y potyvirus from potato plants. *Int. J. Virol.* 5(2): 64-76;
- Malepszy, S. (2001). *Biotechnologia roślin*. PWN. Warszawa. 36.
- Morel, G., Martin, C. (1952). Cure of dahlias attacked by a virus disease. *C. R. Hebd Seances Acad.Sci.* 235 (21): 1324–5.
- Nasir, I. A. Tabassum, B., Latif, Z., Javed, M. A., Haider, M. S., Husnain, T. (2010). Strategies to control potato virus Y under in vitro conditions. *Pak. J. Phytopathol.* 22b (1): 63–70.
- Orlikowska, T., Zawadzka, M., Zenkteler, E., Sobiczewski, P. (2012). Influence of the biocides PPM and Vitrofuraf on bacteria isolated from contaminated plant tissue cultures and on plant microshoots grown on various media. *J. Hortic. Sci Biotech.* 87,3:223 — 230.
- Zaklukiewicz, K. (1982). Uwalnianie roślin ziemniaka od wirusów S i M. *Ziemniak* 1981/82: 137 — 160.

Wyróżnianie i charakterystyka tetraploidalnych form ziemniaka odpornych na wirusy M i S ziemniaka z wykorzystaniem selekcji metodami konwencjonalnymi i markerami molekularnymi

Distinguished and characterization of tetraploid forms of potato resistant on PVM and PVS viruses by using conventional methods and marker assisted selection.

Beata Tatarowska ✉, Bogdan Flis, Katarzyna Szajko

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
✉ 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 decyzji HOR.hn.802.19.2018 Zadanie nr 61.

Słowa kluczowe: odporność, PVM, PVS, *Solanum tuberosum*, real – time PCR

Celem projektu było 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* celem było określenie zależności między odpornością, a występowaniem reakcji nekrotycznej. W przypadku wirusa S ziemniaka celem projektu była 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 2019 w ramach zadania 61 realizowano trzy tematy badawcze.

Ocena fenotypowa na wirus S ziemniaka rodów pochodzących z populacji 4x (*Ns*) – ocena porażenia wtórnego.

1. Ocena odporności na PVS wytypowanych rodów 4x ziemniaka prowadzona w dwóch temperaturach 20°C i 28°C, z wykorzystaniem dwóch izolatów PVS.
2. Ocena siły ekspresji reakcji nadwrażliwości (HR) w zależności od dawki genu *Ns*.

Celem tematu 1 było wyróżnienie rodów 4x wysoko odpornych na wirus S ziemniaka. W ramach tematu w porażeniu wtórnym oceniono 154 rody

ziemniaka. Z roślin badanych rodów, które w 2018 roku po zakażeniach mechanicznych wirusem S ziemniaka wykazały średnie wartości absorbancji A_{405} na poziomie lub poniżej wartości granicznej zostały zebrane bulwy. W 2019 roku bulwy z porażenia pierwotnego po okresie spoczynku i podkiełkowaniu wysadzono w szklarni. Po 6 tygodniach przeprowadzono testy ELISA, w celu identyfikacji obecności wirusa S ziemniaka.

Celem tematu 2 było określenie reakcji odpornościowej rodów z genem *Ns* przy zastosowaniu dwóch izolatów wirusa S ziemniaka oraz dwóch temperatur inkubacji. W ramach tematu do oceny odporności na PVS wybranych rodów 4x zastosowano metodę inokulacji mechanicznej roślin i przez szczepienie. Rośliny badanych rodów wysadzono w szklarni (po 6 roślin z każdego genotypu w dwóch powtórzeniach). Zakażenia mechaniczne przeprowadzono dwukrotnie w odstępach 2 dniowych. Źródło wirusa S ziemniaka stanowiły rośliny pomidora porażone szczepami PVS pochodzącymi z kolekcji IHAR-PIB w Młochowie (PVS-966 i PVS-Leon). Po zakażeniu/szczepieniu rośliny przewożono do kamer fitotronowych z kontrolowaną temperaturą 20°C i 28°C. Zawartość PVS w próbce soku określano za pomocą wartości absorbancji A_{405} w teście ELISA.

Celem tematu 3 była ocena wpływu dawki

genu *Ns* na poziom odporności i uzyskanie odpowiedzi na pytanie, czy uzasadnione jest tworzenie form typu multipleks pod względem genu *Ns*. W ramach tematu ocenie poddano rody pochodzące z tetraploidalnej populacji *Ns* – II. Wzorcem formy duplex genu *Ns*, była diploidalna forma genotypu DW 83 – 3121, która w poprzednich latach została poddana kolchicynowaniu w celu podwojenia liczby chromosomów. Ustalania dawki genu *Ns* na poziomie DNA przeprowadzano w oparciu o genomową sekwencję markera genu *Ns* o nr akcesyjnym w bazie GeneBank DQ415915.1 w reakcji real – time PCR. Dla badanego markera DNA allela dominującego genu *Ns* zastosowano startery o sekwencjach: F (5'– 3'): GCAATACATGTATTCTTACTCGG i R (5'– 3'): GACCTATATCAGTCCCTTCTAATCCACTAT. Amplifikują one produkt o długości 489 pz (par zasad). Dla określenia ilości produktu badanego markera wykorzystano gotowe zestawy mieszaniny do real – time Hot Start PCR z EvaGreen®. Reakcje przeprowadzono w mieszaninie reakcyjnej o objętości 10 µl, z dodatkiem 100 ng matrycowego DNA oraz 5 µM każdego ze starterów. Amplifikację markera przeprowadzono w następujących warunkach temperaturowych: 95°C (3 min.), 40x ((95°C (20 sek.), 60°C (20 sek.), 72°C (30 sek.)), krzywa potnienia, 40°C.

Wyniki

W ramach tematu 1 w polu prowadzono kolekcję 268 rodów wysoko odpornych na wirus M ziemniaka, pochodzących z sześciu populacji tetraploidalnych z segregującym genem *Rm* i *Gm*. Ocena tych rodów obejmowała ocenę porażenia pierwotnego i wtórnego. Dodatkowo rody te zostały scharakteryzowane pod kątem cech morfologicznych i wad zewnętrznych bulw. Dla potwierdzenia obecności genu *Rm* w rodach odpornych wykorzystano markery selekcyjne *GP* – 250 i *GP* – 283. Rody znajdujące się w kolekcji posiadają jeden lub oba markery. Kolekcja rodów odpornych na wirus M ziemniaka stanowi doskonały zestaw genotypów, który może zostać wykorzystany w kolejnych latach przez hodowców w ich programach hodowlanych. W ramach tematu rozmnażano również w polu dwie populacje z segregującym genem *Ns* odporności na wirus S ziemniaka, pochodzącym z uprawnego gatunku *S. tuberosum subsp. andigena*. Po ocenie porażenia pierwotnego w grupie rodów, które nie uległy porażeniu wirusem S ziemniaka znalazły się 154 genotypy. Po przeprowadzeniu w warunkach szklarniowych oceny porażenia wtórnego, do grupy odmian odpornych wytypowano 125 rodów ziemniaka.

W ramach tematu 2 oceniano w doświadczeniu szklarniowym odporność na wirus S ziemniaka 8 rodów z populacji *Ns*-II, dwa wzorce i formy rodzicielskie. Porównywano wpływ genotypu, szczepu wirusa i temperatury na poziom porażenia wirusem roślin po zakażeniu mechanicznym i po szczepieniu. Stosując zakażenia mechaniczne dla dwóch rodów (*Ns*-II-10 i *Ns*-II-40), odmian wzorcowych i form rodzicielskich nie stwierdzono istotnego wpływu temperatury inkubacji na poziom odporności i uzyskane wartości absorbancji A_{405} w teście ELISA. Dla pozostałych sześciu rodów rodzaj zastosowanej temperatury istotnie wpływał na namnażanie się wirusa w komórkach roślinnych. W wyższej temperaturze odnotowywano znacznie wyższy poziom wirusa S ziemniaka u wszystkich sześciu rodów.

Dla tych samych rodów (*Ns*-II-10 i *Ns*-II-40), odpornej odmiany Sonda i form rodzicielskich rodzaj zastosowanego szczepu do zakażeń mechanicznych, również nie miał wpływu na poziom porażenia PVS. Dla pozostałych sześciu rodów i podatnej odmiany Etola odnotowano istotny wpływ szczepu. Przy zastosowaniu szczepu 966 wysokie wartości absorbancji A_{405} odnotowano dla czterech rodów oraz podatnej odmiany Etola. Przy zastosowaniu szczepu Leon wysokie wartości absorbancji A_{405} odnotowano dla trzech rodów. Stosując inokulację przez szczepienie dla dwóch rodów *Ns*-II-10 i *Ns*-II-40, odpornej odmiany Sonda i form rodzicielskich, temperatura inkubacji nie miała wpływu na poziom porażenia PVS. Dla rodów i odmiany inkubowanych w obu temperaturach uzyskano bardzo niskie wartości absorbancji A_{405} w teście ELISA. Istotny wpływ temperatury inkubacji na uzyskane wartości absorbancji A_{405} odnotowano dla pięciu rodów oraz podatnej odmiany Etola. Rośliny inkubowane po szczepieniu w temperaturze 28°C uległy silniejszemu porażeniu wirusem S ziemniaka w porównaniu do temperatury 20°C. Przy temperaturze 28°C dla tych rodów uzyskano znacznie wyższe wartości absorbancji A_{405} . Dla jednego rodu przy zastosowaniu obu temperatur odnotowano porażenie PVS na tym samym poziomie. Dla tych samych rodów *Ns*-II-10 i *Ns*-II-40, odpornej odmiany Sonda i form rodzicielskich rodzaj zastosowanego szczepu nie miała wpływu na poziom porażenia PVS. Istotny wpływ szczepu na uzyskane wartości absorbancji A_{405} odnotowano dla sześciu rodów oraz podatnej odmiany Etola.

W ramach tematu 3 oceniono pod kątem odporności na wirus PVS rody z nieselekcjonowanej populacji *Ns* -II, pochodzące z krzyżowań mających na celu uzyskanie w potomstwach form

o zwiększonej dawce genu *Ns*. Obserwowana w populacji *Ns* – II segregacja odporności rodów (3: 1) wskazuje na posiadanie przez ich formy rodzicielskie genu *Ns* w formie simpleks. Uzyskane w ocenie fenotypowej wyniki odporności pozwoliły stwierdzić że wśród wyselekcjonowanych rodów odpornych na PVS można oczekiwać zarówno form typu simpleks jak i dupleks pod względem genu *Ns*. W badaniach wykorzystano czuły barwnik EvaGreen® do oszacowania amplifikacji markera genu *Ns* (o zmodyfikowanych na potrzeby reakcji qPCR sekwencjach starterów) (rys.1). Przeprowadzone analizy pozwoliły wśród ocenianych odpornych rodów na PVS wyróżnić 42 formy typu dupleks i 8 form typu simpleks. Po przeanalizowaniu wyników odpornościowych z testów fenotypowych dla rodów z obu grup stwierdzono, że w przypadku odporności na wirus S ziemniaka nie jest uzasadnione tworzenie form typu multipleks pod względem genu *Ns*. Gen *Ns* w rodach odpornych w formie simpleks daje już pełną odporność na tego wirusa.

Wnioski

W ramach tematu 1

1. Nowe rody odporne na wirus M ziemniaka znajdujące się w kolekcji mogą stanowić doskonały materiał dla hodowli jako przyszłe formy rodzicielskie w programach krzyżówkowych ukierunkowanych na wprowadzenie odporności na PVM do puli ziemniaka.
2. Nowe rody posiadają geny odporności na wirus M ziemniaka z dwóch dzikich gatunków: *S. megistacrolobum* (*Rm*) lub *S. gourlayi* (*Gm*).
3. Wszystkie rody znajdujące się w kolekcji

zostały ocenione pod kątem odporności na PVM w testach laboratoryjnych, w porażeniu pierwotnym i wtórnym oraz uzyskały pełną charakterystykę cech morfologicznych.

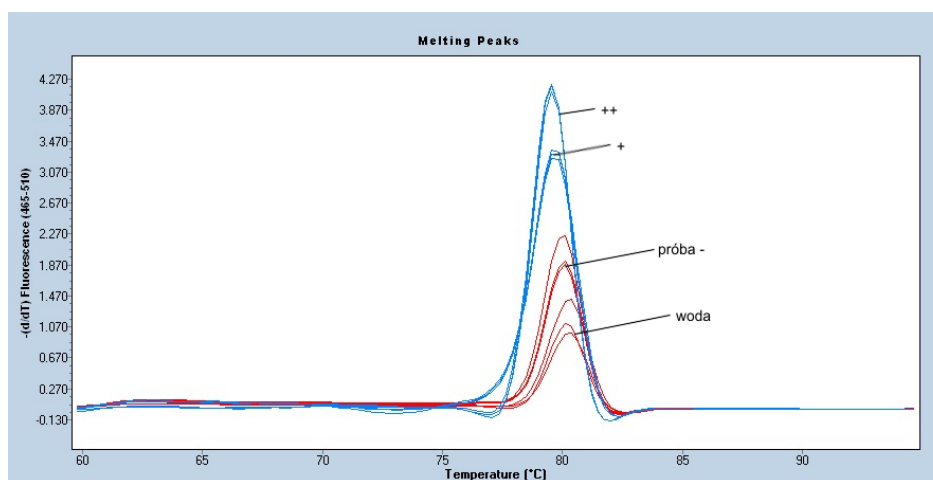
4. Wyróżniono grupę 125 nowych rodów ziemniaka wysoko odpornych na PVS z genem *Ns* pochodzącym z *S. tuberosum subsp. andigena*.

W ramach tematu 2

1. Wyselekcjonowane rody wysoko odporne na wirus S ziemniaka, stabilnie zachowujące się w różnych temperaturach i przy zastosowaniu różnych szczepów PVS, mogą stanowić cenny materiał do dalszych prac hodowlanych.
2. Wysoka temperatura (28°C) inkubacji przełamuje odporność rodów tetraploidalnych na wirus S ziemniaka warunkowaną genem *Ns*.
3. Rodzaj zastosowanego szczepu PVS do zakażeń jest ważnym elementem przy selekcji materiałów hodowlanych odpornych na PVS.
4. Uzyskane wyniki podkreślają ważną rolę profilu odporności odmian w wyjaśnianiu równowagi pomiędzy szczepami wirusów w uprawach ziemniaka.

W ramach tematu 3

1. W grupie ocenianych rodów odpornych na wirus S ziemniaka wyróżniono 42 formy typu dupleks i 8 form typu simpleks.
2. Uzyskane wyniki wskazują, że nie jest uzasadnione tworzenie form typu multipleks pod względem genu *Ns*.
3. Gen *Ns* w rodach odpornych w formie simpleks zapewnia już pełną odporność na wirusa S ziemniaka.



Rys. 1. Krzywa topnienia produktów reakcji real-time PCR, z wykorzystaniem barwnika EvaGreen®: - niebieskie linie odpowiadają temperaturze topnienia badanego produktu PCR w próbie, - czerwone linie obrazują krzywą topnienia produktu niespecyficznego dla rodu podatnego (próba -) i wody.

Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka

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

Anna Pawłowska, Mateusz Mielczarek, Agata Kaczmarek, Maria Fedczak, Krzysztof Treder ✉

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin - Państwowy Instytut Badawczy, Oddział w Boninie,
Pracownia Diagnostyki Molekularnej i Biochemii,
✉ e-mail: k.treder@ihar.edu.pl, 94 3423031 w. 207

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.802.3.2019, Zadanie nr 58.

Słowa kluczowe: test ELISA, RT-PCR, RT-LAMP, wirusy ziemniaka, wykrywanie, ziemniak

Projekt „Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych” jest zadaniem badawczym realizowanym w latach 2014-2020 i finansowanym przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w ramach programu Postęp Biologiczny w Produkcji Roślinnej. Głównym celem projektu jest opracowanie czułych i niekosztownych metod wykrywania najważniejszych wirusów infekujących rośliny ziemniaka. Założenia zadania i jego podstawy literaturowe omówiono wraz z wynikami uzyskanymi w 2018 roku w ubiegłorocznym komunikacie (Treder i in. 2019).

Celem projektu w 2019 r. było: (I) zoptymalizowanie 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 starterów na PVM kompatybilnych z multipleksowym RT-PCR w czasie rzeczywistym do wykrywania wirusów Y, M i L, (V) sprawdzenie, czy ekstrakcja chloroformem umożliwia wykrywanie wirusów M i L bezpośrednio w soku z liści za pomocą kolorymetrycznego RT-LAMP.

W roku 2019 kontynuowano prace nad zagęszczaniem wirusów na membranie Q. Optymalne wiązanie wirusów PVY, PLRV i PVM do membrany Q zachodziło w pH 5,5. Zagęszczanie badanych wirusów na membranie Q zwiększało dwukrotnie czułość ich wykrywania

za pomocą testu ELISA w porównaniu do prób niezagęszczanych. Niewielki wzrost czułości testu po zagęszczaniu mógł wynikać z tego, że pH optymalne dla wiązania wirusów do membrany Q nie pokrywało się z pH optymalnym dla stabilności cząstek wirusów. W 2019 roku w doświadczeniu polowym w Boninie potwierdzono negatywny wpływ poziomu odporności na wykrywalność PVY w bulwach. Badając wykrywalność wirusów w bulwach i kielkach ziemniaka za pomocą koktajl i DAS ELISA potwierdzono zgodność wykrywania w kielkach z próbą oczkową. W badaniu kielków wykazano, że test koktajl ELISA był bardziej skuteczny niż DAS-ELISA. Za pomocą obu wariantów testu ELISA wykryto więcej PVM bezpośrednio w bulwach niż w próbie oczkowej. Stosując PVY oraz trzy odmiany ziemniaka o umiarkowanie zróżnicowanej odporności badano skuteczność metod molekularnych (RT-qPCR i RT-LAMP) w wykrywaniu wirusa w bulwach, kielkach i w liściach potomnych roślin. W badaniach stosowano procedurę izolacji RNA zoptymalizowaną dla bulw ziemniaka. Test RT-qPCR był bardziej skuteczny w ocenie porażenia liści, kielków i bulw niż RT-LAMP i DAS-ELISA. Najwyższą skuteczność wykazał dla bulw. Dowodzi to, że jakość izolowanego RNA była główną przyczyną opisywanej w literaturze i obserwowanej w latach ubiegłych w ramach niniejszego projektu niskiej skuteczności RT-qPCR w wykrywaniu PVY w bulwach. W ramach prac nad adaptacją metod molekularnych

do wykrywania PVY, PVM i PLRV w roślinach in vitro opracowano test triplex RT-qPCR wykrywający jednocześnie badane wirusy w jednej próbce. Układ oparty w całości o startery własne (tripleks z sondami i starterami Y4, M10 i L8) nie amplifikował wydajnie PVY. Udało się jednak opracować skuteczny test triplex RT-qPCR stosując kombinację sondy i starterów wg Singh i in (2013) z sondami starterami własnymi opracowanymi dla PVM (zestaw M10) i PLRV (zestaw L8). W ramach prac nad szybkim testem polowym optymalizowano wizualny test RT-LAMP wykrywający wirusy bezpośrednio w soku. Potwierdzono, że wirus PVY można wykryć wizualnie bezpośrednio w soku za pomocą barwnika HNB po uprzedniej ekstrakcji soku odczynnikiem organicznym. Takie traktowanie nie usuwa czynników niespecyficznym zmieniających kolor reakcji w trakcie wykrywania PLRV i PVM. Ponieważ procedura testu powinna być identyczna dla wszystkich trzech wirusów, podjęto próbę adaptacji do ich wykrywania komercyjnego zestawu do kolorymetrycznego testu LAMP

(WarmStart® Colorimetric LAMP, NEB). Zestaw ten umożliwił wizualną detekcję PVM i PLRV, jednak jedynie w soku rozcieńczonym dwudziestokrotnie. Wariant fluorescencyjny opracowany w ubiegłych latach pozwalał na wykrycie wirusów w soku rozcieńczonym do 10 000 razy lub bardziej, zależnie od wyjściowej koncentracji wirusa w soku. Dlatego komercyjny test kolorymetryczny wymaga optymalizacji w celu zwiększenia czułości wykrywania badanych wirusów.

Literatura:

- Singh, M., Singh, R. P., Fageria, M. S., Nie, X., Coffin, R., Hawkins, G. (2013). Optimization of a real-time RT PCR assay and its comparison with ELISA, conventional RT-PCR and the grow-out test for large scale diagnosis of potato virus Y in dormant potato tubers. *Am. J. Potato Res.*, 90: 43 — 50.
- Treder, K., Mielczarek, M., Pawłowska, A., Zacharzewska, B., Fedczak, M. (2019). Opracowanie czułych metod wykrywania najważniejszych wirusów ziemniaka. *Biuletyn IHAR-PIB*, 286: 261 — 264.

Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czułej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych

Research and development of selective isolation and sensitive identification methods of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria in difficult diagnostic environmental samples

Włodzimierz Przewodowski ✉, Katarzyna Salamońska, Dorota Szarek, Dorota Michałowska, Wioleta Stochła, Agnieszka Przewodowska, Grzegorz Gryń, Agata Trocka, Katarzyna Franke, Mateusz Nowakowski

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
✉ e-mail: w.przewodowski@ihar.edu.pl, tel. 94 3423031 w. 211

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.802.3.2019, Zadanie nr 57.

Słowa kluczowe: bakterioza pierścieniowa ziemniaka, *Clavibacter sepedonicus*, diagnostyka, nowoczesne metody, próby środowiskowe, ziemniak

Celem realizowanego projektu było opracowanie materiałów i procedur do selektywnej izolacji kwarantannowej bakterii *Clavibacter sepedonicus* comb. nov. (Cs) (Poprzednia nazwa *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.

W ramach tematu I realizowano badania związane z konstrukcją materiałów służących do opracowania immunopodłoża do specyficznej izolacji komórek bakterii *Clavibacter sepedonicus* (Cs) z prób środowiskowych. W tym celu opracowano podłoże polimerowe, które po aktywacji chemicznej poddano bioaktywacji. Dzięki wprowadzonym modyfikacjom, uzyskano efektywnie działające podłoże, które posłużyło do selektywnego wyłapywania komórek Cs z badanych prób. Elementem biologicznie aktywnym były przeciwciała anty-Cs uzyskane na drodze selekcji przeciwciał opracowanych w ramach tematu na bazie trzech zawiesin bakterii Cs. Do opracowania immunopodłoża użyto przeciwciał dających najlepszy stosunek miana do specyficzności. Na podstawie

oceny czułości izolacji badanych bakterii Cs w obecności komponentów soku 9-ciu różnych odmian ziemniaka w laboratoriach zewnętrznych potwierdzono skuteczność działania immunopodłoża oraz opracowanej metodyki. Z kolei identyfikacja badanych preparatów zalecanym przez EPPO, klasycznym testem IFAS była kłopotliwa z powodu obecności skrobi i komponentów soku utrudniających identyfikację bakterii Cs.

Wyniki badań uzyskane w ramach kolejnego zadania pozwoliły na ocenę efektywności izolacji DNA zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cs. Stosując opracowane w poprzednim roku warunki izolacji DNA, oceniono wpływ obecności śluzów bakteryjnych badanych szczepów Cs na czułość dwóch testów molekularnych. Czułość stosowanych testów, klasycznego testu PCR oraz testu Real-Time PCR oceniano na podstawie odpowiednio pomiaru spektrofotometrycznego oraz analizy elektroforegramów zawierających produkty amplifikacji DNA po przeprowadzeniu testu PCR oraz analiz krzywych amplifikacji i krzywych topnienia. Badania wykonywane w obecności komponentów z soku ziemniaka przy zastosowaniu dla każdego z badanych szczepów serii 10-krotnych rozcieńczeń, potwierdziły skuteczność opracowanej metody zarówno w obecności wody, jak

i komponentów soku ziemniaka. Mimo, iż w obu testach zaobserwowano znaczny wpływ komponentów soku ziemniaka, wprowadzenie modyfikacji w opracowanej metodyce izolacji DNA z ekstraktów roślinnych pozwoliło na eliminację reakcji fałszywie negatywnych. Występujący w tym przypadku brak detekcji wynikał prawdopodobnie z obecności inhibitorów reakcji PCR obecnych w badanym soku roślinnym.

Badania realizowane w temacie 3 związane były z porównaniem stopnia porażenia badanych odmian ziemniaka na sztuczną inokulację dwoma zróżnicowanymi mukoidalnie szczepami bakterii Cs. Uzyskane wyniki potwierdziły przydatność opracowanej metody molekularnej w identyfikacji sprawcy bakteriozy w badanych próbach z roślin i bulw ziemniaka. Podobnie jak poprzednio, tegoroczne wyniki wskazały na zróżnicowaną reakcję badanych odmian na inokulację badanymi bakteriami Cs. Wykazano duże zróżnicowane porażenie przez Cs roślin badanych odmian. Najwyższy indeks porażenia bulw potomnych odnotowano u odmian Gwiazda, Jurek i Sagitta, natomiast odmianami najmniej podatnymi na porażenie przez oba szczepy Cs okazały się Courage i Ikar. Brak lub niskie porażenie pędów nie przekładało się na niewielką liczbę komórek w plonie bulw. Z kolei porażeniu latentnemu łodyg sprzyjały warunki glebowe występujące na glebie lżejszej charakteryzującej się niższą wilgotnością, natomiast porażenie latentne bulw notowano częściej w warunkach gleby ciężkiej, wilgotnej.

Wyniki badań uzyskane w ramach tematu 4, pozwoliły ocenić wpływ obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cs na poziom ekspresji objawów chorobowych oraz czułość testu molekularnego w badanych tkankach roślin in vitro.

Podobnie jak w roku poprzednim, oceniane odmiany wykazały zróżnicowaną wrażliwość na obecność badanych szczepów bakterii Cs. Bardziej wrażliwą odmianą na porażenie bakteriami Cs była odmiana Sagitta, u której obserwowano silniejsze działanie patogeniczne badanych szczepów w stosunku do mniej wrażliwej odmiany Courage. Jednocześnie nie odnotowano istotnej różnicy statystycznej w oddziaływaniu poszczególnych szczepów Cs. W przypadku odmiany tolerancyjnej oddziaływanie fitotoksyczne Cs było znacznie słabsze. Pomimo jednak braku widocznych objawów makroskopowych na roślinach wskazujących na porażenie bakteriami, praktycznie w większości badanych prób pozytywnych opracowanym testem PCR potwierdzono obecność bakterii Cs.

Badania dotyczące zapobiegania

kontaminacjom bakteriami Cs podłoży stosowanych do hodowli roślin in vitro ziemniaka, pozwoliły na ocenę wpływu obecności koloidu platyny na działanie mieszaniny dwóch innych koloidów o działaniu antymikrobiologicznym. Zaobserwowano, iż obecność koloidu platyny polepszyła działanie hamujące wzrost badanych bakterii, jak również zróżnicowaną wrażliwość badanych odmian ziemniaka na mieszaninę koloidów, która w głównej mierze zależała 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 Cs.

Wnioski z prowadzonych badań:

- Uzyskane przeciwciała skierowane na komórki bakterii Cs w porównaniu do przeciwciał komercyjnych z Loewe charakteryzowały się wyższą specyficnością wobec badanych szczepów Cs oraz relatywnie niższym oddziaływaniem niespecyficznym w stosunku do szczepów innych badanych bakterii. Użycie przeciwciał oraz odpowiedni sposób aktywacji matrycy pozwoliły na opracowanie immunopodłoża do specyficznej izolacji komórek bakterii *Clavibacter sepedonicus* (Cs) z prób środowiskowych. Dzięki wprowadzonym modyfikacjom, uzyskano efektywnie działające podłoże, które posłużyło do selektywnego wylapywania komórek Cs z badanych prób środowiskowych. Z kolei identyfikacja badanych preparatów zalecanym przez EPPO, klasycznym testem IFAS okazała się kłopotliwa z powodu obecności skrobi i komponentów soku utrudniających identyfikację bakterii Cs.
- Badania molekularne związane z weryfikacją metody izolacji DNA z zawiesin Cs o różnej zawartości śluzów bakteryjnych, potwierdziły skuteczność opracowanej metody zarówno w obecności wody, jak i komponentów soku ziemniaka. W porównaniu do zalecanej przez EPPO 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. Nie

zaobserwowano istotnej, relatywnej różnicy w czułości obu stosowanych testów molekularnych.

- Wyniki badań związane z porównaniem stopnia porażenia badanych roślin oraz bulw potomnych potwierdziły funkcjonalność opracowanych materiałów oraz metodyki izolacji DNA. Pomimo odmiennych do poprzednich lat warunków pogodowych, wykazano zróżnicowaną podatność badanych odmian na sztuczną inokulację badanymi szczepami Cs. Wykazano stosunkowo duże zróżnicowanie porażenia przez Cs roślin badanych odmian. Brak lub niskie porażenie pędów nie przekładało się na niewielką liczbę komórek w plonie bulw. Najwyższy indeks porażenia bulw potomnych odnotowano u odmian Gwiazda, Jurek i Sagitta, natomiast odmianami najmniej podatnymi na porażenie przez oba szczepy Cs okazały się Courage i Ikar. Z kolei porażeniu latentnemu łodyg sprzyjały warunki glebowe występujące na glebie lżejszej charakteryzującej się niższą wilgotnością, natomiast porażenie latentne bulw notowano częściej w warunkach gleby ciężkiej, wilgotnej.
- Wyniki badań uzyskane w ramach tematu 4, pozwoliły ocenić wpływ obecności zróżnicowanych mukoidalnie szczepów bakterii Cs 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 Cs. W porównaniu do wcześniejszych badań z użyciem mieszaniny 3 szczepów Cs, przy zastosowaniu pojedynczych szczepów i analogicznych koncentracji komórek bakterii w mieszaninie inokulacyjnej, oddziaływanie fitotoksyczne było znacznie słabsze. Obecność bakterii Cs 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 Cs.
- Badania dotyczące zapobiegania kontaminacjom bakteriami Cs podłoży stosowanych do hodowli roślin *in vitro* ziemniaka, pozwoliły na ocenę wpływu obecności koloidu platyny na działanie mieszaniny dwóch innych koloidów o działaniu antymikrobiologicznym. W zależności od stosowanej koncentracji obserwowano zróżnicowaną wrażliwość kultur *in vitro* badanych odmian ziemniaka na obecność mieszaniny koloidów.

Niższe stężenia badanych koloidów powodowały lepszy wzrost i namnażanie się badanych roślin w porównaniu z roślinami kontrolnymi, wyższe hamowanie wzrostu i współczynnika namnażania. Aby ustalić optymalne warunki należy prowadzić dalsze badania w kierunku optymalizacji działania opracowanej mieszaniny.

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. *Progress in Plant Protection / Postępy w Ochronie Roślin* 56 (1): 73–78. DOI: 10.14199/ppp-2016-013.
- Nowacki, W. (2009). Problemy profilaktyki i zwalczania bakteriozy pierścieniowej ziemniaka wywoływanej przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *PPP/Postępy w Ochronie Roślin* nr 49(2): 678–685.
- Pastuszewska, T., Gryń, G., Franke, K. (2010). Podatność odmian ziemniaka na porażenie przez *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus*. *Prog. Plant Protection/ Post. Ochr. Roślin* 50: 244–248.
- Pastuszewska, T., Gryń, G. (2012). Przeżycie *Clavibacter michiganensis* subsp. *sepedonicus* na powierzchniach wybranych materiałów w warunkach różnych temperatur. *PPP* 52 (2): 443–446.
- 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.* 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*. *PloSONE*12(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. Progress in Plant Protection / Postępy w OchronieRoślin 55: 352–357. DOI: 10.14199/ppp-2015-060.

Waleron, M., Waleron, K., Kamasa, J., Przewodowski, W., Lojkowska, E. (2011). Polymorphism analysis of housekeeping genes for identification and differentiation of *Clavibacter michiganensis* subspecies. Europ. J. Plant Pathol. 131: 341–354.

Opracowanie metod globalnej analizy polimorfizmów w genomie buraka cukrowego

Development of methods for global analysis of polymorphisms in the genome of sugar beet

Gabriela Machaj, Wojciech Wesołowski, Alicja Macko-Podgórn, Rafał Barański, Marek Szklarczyk, Dariusz Grzebelus ✉

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,
✉ email: d.grzebelus@urk.edu.pl, tel. 12 6625399

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-801–10/14, HOR/hn-801-PB-11/15, HOR/hn-801-PB-5/16, HOR.hn.802.24.2017, HOR.hn.802.8.2018 oraz HOR.hn.802.11.2019, Zadanie nr 45.

Słowa kluczowe: BNYVV, cytoplazmatyczna męska sterylność, ekspresja genów, genotypowanie, markery molekularne, rizomania

Temat badawczy 1: Przygotowanie i fenotypowanie segregujących populacji buraka cukrowego

Cele tematu: Uzyskanie kwitnących roślin BC1 i BC2 z krzyżowań typu obiekt męskosterylny (MS) x kandydat na linię dopełniającą (linię O), ocena fenotypu płodności kwitnących roślin BC1 i BC2 oraz uzyskanie siewek ustalonych linii męskosterylnych.

Opis wyników: Analizie poddano osiem populacji BC, każda z nich liczyła 70 roślin. Populacje 2S 14 122, 2S 15 751, 2S 15 753 oraz 3S 15 158 cechowały się wyraźną dominacją roślin częściowo-męskopłodnych (31 – 50%) nad męskopłodnymi (1 – 13%). Z kolei w populacjach MsCr 138/17/8 oraz MsCr 138/17/62 było odwrotnie – wyraźnie więcej było roślin męskopłodnych (46%) niż częściowo-męskopłodnych (3 i 14%). W pozostałych dwóch populacjach – MsCr 138/17/54 oraz MsCr 138/17/66 – liczebności tych klas fenotypowych były zbliżone (26 – 37%). Dla wszystkich badanych populacji, z wyjątkiem MsCr 138/17/54, obserwowane rozszczepienie na rośliny męskosterylne i męskopłodne wynosiło 1:1. Z tego względu dla populacji MsCr 138/17/54 wyniki fenotypowania w polu poddano weryfikacji poprzez mikroskopową ocenę żywotności pyłku, która wykazała znacznie większy udział roślin męskosterylnych (54%) niż ocena polowa (34%), zatem segregacja 1:1 w populacji MsCr 138/17/54 została również potwierdzona.

Wnioski:

- Wszystkie testowane populacje cechowała spodziewana segregacja na rośliny męskosterylne i męskopłodne w stosunku 1:1.
- Segregacja 1:1 wskazuje na monogeniczne dziedziczenie przywracania płodności w badanych populacjach oraz na heterozygotyczność locus restorerowego u odpowiednich roślin ojcowskich.

Temat badawczy 4: Opracowanie platformy genotypowania buraka cukrowego dla selekcji wspomagananej markerami

Cele tematu: Opracowanie markerów tetra-primer ARMS-PCR na bazie różnic pomiędzy sekwencjami z locus X/x (Rf1/rf1) kodującymi białko Oma, opracowanie markerów dla genu Z/Rf2 na bazie sekwencji genu 104890821 z chromosomu IV, ocena nierównowagi sprzężeń pomiędzy allelami loci Rf/rf i allelami wybranych loci markerowych, identyfikacja restorera dla nowej puli segregujących populacji, opracowanie markerów molekularnych identyfikujących polimorfizmy w rejonach kodujących geny potencjalnie związane z warunkowaniem odporności na rizomanie.

Opis wyników: Zweryfikowano użyteczność opracowanych markerów molekularnych sprzężonych z loci restorerowymi dla identyfikacji roślin kandydujących na linię dopełniającą (linię O). Strukturę molekularną loci restorerowych scharakteryzowano przy użyciu

czterech markerów molekularnych opracowanych w latach ubiegłych. Charakteryzowały się one wysokim stopniem kosegregacji z allelami restorerowymi. Markery te wykorzystano do genotypowania dziesięciu losowo wybranych roślin spośród czterech męskosterylnych linii buraka cukrowego. Badania molekularne wykazały niewielkie różnicowanie w strukturze locus restorerowego u badanych linii męskosterylnych. W wyniku genotypowania wybranymi markerami dla loci restorerowych, u większości linii stwierdzono obecność monomorficznych profili prążkowych. Wynik ten wskazuje na zgodny z oczekiwaniami homozygotyczny charakter locus restorera w badanych materiale roślinnym.

Genotypowanie populacji segregujących zostało przeprowadzone przy użyciu dwóch markerów dla genu X oraz dwóch markerów dla genu Z. Analizy wykazały, iż w trzech spośród czterech badanych populacji za niwelację sterylizującego wpływu cytoplazmy S odpowiada gen X. Obydwa markery dla genu X – Rf1-Mors oraz Rf1-se3/Apo1 – wykazywały niemal 100% kosegregację z fenotypem męskopłodnym/męskosterylnym w tych populacjach. Wyjątkiem była jedna populacja, dla której dla pojedynczej rośliny stwierdzono obecność w obydwu markerach profilu prążkowego charakterystycznego dla roślin męskosterylnych. Otrzymane wyniki wskazują na użyteczność testowanych markerów dla genu X jako narzędzia do identyfikacji obecności allelu restorerowego. Brak kosegregacji testowanych markerów u badanych roślin populacji 3S15158 wskazuje prawdopodobnie na udział innego genu restorerowego w przywracaniu płodności – prawdopodobnie genu Z.

Wśród sklonowanych fragmentów genu LOC104890821 poszukiwano takich, które miały polimorfizmy charakterystyczne dla rośliny męskopłodnej. Jeden klon z licznymi polimorfizmami tego typu udało się zidentyfikować. Dla rośliny męskopłodnej uzyskano także klony o cechach sekwencji zbliżonych do klonów z rośliny męskosterylnej. Jest to zrozumiałe, gdyż

rośliny męskopłodne były heterozygotami w locus restorera.

Genotypowano 250 roślin należących do 53 populacji buraka cukrowego o różnym pochodzeniu i reakcji na wirusa BNYVV przy użyciu dwóch markerów molekularnych opracowanych w roku 2016. Uzyskane wyniki stanowią kolejne potwierdzenie skuteczności markerów sprzężonych z rejonem genomu buraka cukrowego warunkującym odporność typu Holly (Rz1) na rizomanię. Wyniki uzyskane dla obu markerów były zgodne. Odniesiono je do wyników testu odpornościowego, co pozwoliło na bezpośrednie wnioskowanie na temat faktycznej reakcji roślin na infekcję wirusem BNYVV. Stwierdzono wysoki, ale nie całkowity, poziom zgodności wyników genotypowania i wyników testu odpornościowego; 68,8% roślin zostało przypisane do tego samego genotypu Rz1 w oparciu o oba rodzaje testów.


Wnioski:

- Genotypowanie linii męskosterylnych wykazało u większości roślin obecność profili charakterystycznych dla fenotypu męskosterylnego, bądź profili do tej pory nieobserwowanych.
- Genotypowanie populacji segregujących wykazało, iż za przywracanie płodności w populacjach 138/17/66, MsCr138/17/54 oraz MsCr138/17/62 odpowiada gen X (Rf1). Ze względu na brak polimorfizmu wykorzystanych markerów DNA nie udało się zidentyfikować restorera z populacji 3S15158.
- Określono fragment sekwencji genu 104890821, który był charakterystyczny dla rośliny z przywróconą płodnością – może on odpowiadać allelowi restorerowemu Z (Rf2) lub wykazywać z nim bliskie sprzężenie.
- Markery Rz1.9.1 i Rz1.9.2 skutecznie identyfikują rośliny o odporności na rizomanię warunkowanej genem Rz1.
- Stwierdzono przewagę roślin określonych jako odporne w teście odpornościowym, w stosunku do wyników genotypowania wskazujących na wrażliwość tych samych roślin.

Badania nad mechanizmami warunkującymi proces embriogenezy gametycznej u buraka cukrowego

The research on the mechanisms responsible for gametic embryogenesis in sugar beet

Sandra Cichorz , Małgorzata Malicka, Maria Goška

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy, Oddział Bydgoszcz,
 e-mail: s.cichorz@ihar.bydgoszcz.pl, tel. 52 5816918

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.802.3.2019, Zadanie nr 46.

Słowa kluczowe: burak cukrowy, embriogeneza gametyczna, kultury *in vitro*, podwojone haploidy

Proces tworzenia nowych odmian buraka cukrowego opiera się w głównej mierze na hodowli heterozygnej, w której istotną rolę odgrywają linie wysoce homozygotyczne. Jednakże uzyskanie ich metodą konwencjonalną, czyli poprzez chów wsobny, bazujący na wymuszonym samozapyleniu rośliny, będącej z natury obcopylną jest długotrwałą i kosztowną. Dodatkowo powyższemu procesowi towarzyszy silna depresja wsobna pod względem ważnych cech użytkowych. Z powyższych względów obecnie nieodzownym elementem strategii tworzenia i doskonalenia materiałów wyjściowych dla hodowli buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) jest wykorzystanie kultur *in vitro*, a w szczególności pozyskanie linii haploidalnych (H) oraz podwojonych haploidów (DH) na drodze embriogenezy gametycznej (Germanà 2011).

Do najczęściej stosowanych technik otrzymywania haploidów w warunkach *in vitro* należą kultury pylników oraz izolowanych mikrospor, które w przypadku: żyta (Guo i Pulli 2000), pszenicy (Chu i in. 1973), jęczmienia (Kasha i Kao 1970) i rzepaku (Cegielska-Taras 2002) są wykorzystywane na szeroką skalę w programach hodowlanych. Powyższa metoda, stosowana wśród wymienionych gatunków, jak i wielu innych daje satysfakcjonujące efekty (Germanà 2011). Jednakże w przypadku buraka cukrowego jest jak dotąd nieskuteczna. Pozyskanie haploidów *Beta vulgaris* na drodze indukowanej androgenezy nie powiodło się, mimo licznych prób wykonanych na wielu genotypach oraz pożywkach o różnorodnym składzie (Rogozińska i Goška 1976,

Rogozińska i in. 1977, Hermann i Lux 1988). Otrzymanie linii haploidalnych buraka stało się możliwe dopiero w latach 80-tych z wykorzystaniem kultur *in vitro* niezapłodnionych załączków i załączni (Van Geyt i in. 1987, Doctrinal i in. 1989, Goška 1997), podczas których dochodzi do regeneracji haploidalnych pędów z komórek jajowych woreczka załączkowego. Rośliny haploidalne są nieplodne, z tego względu niezbędna jest ich diploidyżacja dla uzyskania stabilnych genetycznie i cytologicznie linii podwojonych haploidów.

Zastosowanie procesu gynogenezy pozwala na trzy- lub czterokrotne skrócenie czasu otrzymania linii homozygotycznych. Należy podkreślić, iż podwojenie liczby chromosomów roślin haploidalnych zapewnia uzyskanie całkowitej homozygotyczności linii DH pod względem wszystkich *loci*, zaledwie w ciągu jednego pokolenia. Ma to szczególne znaczenie, gdy materiałem wyjściowym są osobniki wysoce heterozygotyczne. Co więcej, haploidyżacja roślin buraka cukrowego umożliwia otrzymanie układu alleli, który w naturalnych warunkach nie byłby możliwy do uzyskania. Przy czym, nie dochodzi do tworzenia nowej zmienności, lecz jedynie ujawnienia istniejącej. W związku z tym pozyskanie na dużą skalę haploidów oraz podwojonych haploidów daje możliwość prowadzenia selekcji wartościowych genotypów, a co za tym idzie przyspiesza efekty hodowli. Jednak wykorzystanie podwojonych haploidów w hodowli roślin w znacznym stopniu uwarunkowane jest efektywną metodą ich wypróbowania z różnych genotypów. Jest to istotne

do osiągnięcia maksymalnego efektu heterozji, gdyż komponenty używane do krzyżowań powinny zdecydowanie różnić się pod względem genetycznym. Ułatwia to stworzenie grup heterotycznych i prognozowanie formuły mieszańców, a w konsekwencji zwiększa wydajność selekcji przy jednoczesnym obniżeniu poniesionych kosztów. Co więcej, linie DH powinny wykazywać genetyczną i cytologiczną stabilność.

Efektywność procesu gynogenezy zależy od wielu czynników m. in. takich jak: warunki wzrostu i kondycja rośliny donorowej, stadium rozwojowego woreczka zalążkowego, skład pożywki, obecność regulatorów wzrostu. Dotychczasowe wyniki badań prowadzonych w bydgoskim oddziale IHAR-PIB poświęcone gynogenezie linii hodowlanych buraka cukrowego wskazały na silną zależność zdolności regeneracyjnych od genotypu rośliny matecznej (Gośka 1997). O ile wcześniej wymienione czynniki można optymalizować, o tyle bariera genotypowa może stanowić problem. Z tego względu wpływ genotypu uważany jest za najważniejszy czynnik warunkujący efektywność prawie wszystkich rodzajów kultur tkankowych, a w szczególności gynogenezy. Fakt ten, po pierwsze limituje postęp dalszych prac hodowlanych, a po drugie, jest zjawiskiem ciekawym z punktu widzenia badań podstawowych. Interesująca wydaje się być odpowiedź na pytanie skąd wynika odmienny potencjał embriogenetyczny roślin należących do tego samego gatunku lecz o odmiennych genotypach?

Pomimo znacznego postępu w zakresie pozyskania podwojonych haploidów, obecnie niewiele wiadomo na temat mechanizmów molekularnych związanych z indukcją gynogenezy. Zgodnie z danymi literaturowymi, obecność poszczególnych komponentów ściany komórkowej, 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 różnicowanej 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

sygnalnych (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 zalążkach (Acosta-Garcia i Vielle-Calzada 2004; Qin i Zhao 2006).

Wyniki przytoczonych prac eksperymentalnych jak również badań prowadzonych w IHAR-PIB potwierdzają istotną rolę proteoglikanów AGP w procesach morfogenezy roślin. W toku prowadzonych prac wykazano, że egzogenne AGP dodawane do pożywek w początkowym okresie kultury protoplastów szparkowych buraka cukrowego mają istotny wpływ na efektywność organogenezy kalusa w kolejnych etapach rozwoju. Wydajność organogenezy istotnie wzrosła z 6,82% (kontrola) do 47,22%. (dodatek AGP) (Wiśniewska i Majewska-Sawka 2007, 2008).

Dlatego też uznano za celowe porównanie struktury ścian komórkowych syntetyzowanych przez trudno i łatwo regenerujące na drodze gynogenezy genotypy buraka cukrowego, ze szczególnym uwzględnieniem lokalizacji i rearanżacji proteoglikanów. Ponadto, podjęto próbę znalezienia różnic molekularnych na poszczególnych etapach rozwoju niezapłodnionych zalążków buraka cukrowego w obrębie danego genotypu oraz pomiędzy genotypami o odmiennym potencjale embriogenetycznym. W tym celu wykorzystano metodę różnicowego profilowania ekspresji genów (ang. *differential display*) bazującej na analizach PCR (Liang i Pardee 1992). Powyższa technika w porównaniu m.in. z hybrydyzacją różnicową umożliwia identyfikację nawet rzadkich transkryptów. Wykorzystywana jest w przypadku identyfikacji genów uczestniczących w odpowiedzi na suszę u bawełny (Selvam i in. 2009) czy analiz zmian ekspresji genów u osobników pochodzących z indukowanej mutagenyzy (Phanchaisri i in. 2012).

Z powyższych względów celem niniejszego projektu było poszerzenie wiedzy na temat przebiegu embriogenezy gametycznej na poziomie cytologicznym i molekularnym między wyselekcjonowanymi genotypami o wysokim i niskim potencjale gynogenetycznym. Badania prowadzone z wykorzystaniem metod biochemicznych, immunocytochemicznych i molekularnych były poświęcone lokalizacji oraz biologicznej roli endogennych proteoglikanów AGP oraz różnicowemu

profilowaniu ekspresji genów podczas rozwoju niezapłodnionych załączków buraka cukrowego.

Literatura

- Acosta-García, G., Vielle-Calzada, J. P. (2004). A classical arabinogalactan protein is essential for the initiation of female gametogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 16: 2614–2628.
- 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 Tissue Organ Cult* 106: 169–177.
- Cegielska-Taras, T. (2002). Kultura *in vitro* mikrospor w genetycznym ulepszaniu rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.). Monografie i rozprawy naukowe IHAR 18: 1–107.
- Chu, Z. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Chien, N. F., Yin, K. C., Hsü, C. (1973). Investigations on the Induction and Morphogenesis of Wheat (*Triticum vulgare*) Pollen Plants. *Acta Bot Sin* 15: 1–11.
- 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.
- Germanà, M. A. (2011). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Rep* 30: 839–857.
- Goška, M. (1997). Haploidy i podwojone haploidy buraka cukrowego (*Beta vulgaris* L.) oraz możliwości ich wykorzystania w hodowli. Monografie i rozprawy naukowe IHAR 2: 1–81.
- Guo, Y. D., Pulli, S. (2000). Isolated microspore culture and plant regeneration in rye (*Secale cereale* L.). *Plant Cell Rep* 19: 875–880.
- Herrmann, L., Lux, H. (1988). Antherenkultur bei Zuckerrüben, *Beta vulgaris* var. *altissima* Döll. *Züchtungsforsch* 18: 375–383.
- Kasha, K. J., Kao, K. N. (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Nature* 225: 874–876.
- Liang, P., Pardee, A. B. (1992). Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science* 257: 967–971.
- Pavoković, D., Poljuha, D., Horvatić, A., Ljubešić, N., Hagege, D., Krsnik-Rasol, M. (2012). Morphological and proteomic analysis of sugar beet cultures and identifying putative markers for cell differentiation. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 108: 111–119.
- Phanchaisri, B., Samsang, N., Yu, L., Singkarat, S., Anuntalabhochai, S. (2012). Expression of OsSPY and 14-3-3 genes involved in plant height variations of ion-beam-induced KDML 105 rice mutants. *Mutat Res Fundam Mol Mech Mutagen* 734: 56–61.
- 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.
- Rogozińska, J., Goška, M. (1976). Growth and differentiation of sugar beet anthers and callus. *Bull Acad Pol Sci* 24: 57–60.
- Rogozińska, J., Goška, M., Kuźdowicz, A. (1977). Induction of plants from anthers of *Beta vulgaris* cultured *in vitro*. *Acta Soc Bot Pol* 46: 471–479.
- Selvam, J. N., Kumaravadivel, N., Gopikrishnan, A., Kumar, B. K., Ravikesavan, R., Boopathi, M. N. (2009). Identification of a novel drought tolerance gene in *Gossypium hirsutum* L. cv KC3. *Commun Biometry Crop Sci* 4: 9–13.
- 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 sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *Theor Appl Genet* 73: 920–925.
- Wiśniewska, E., Majewska-Sawka, A. (2007). Arabinogalactan-proteins stimulate the organogenesis of guard cell protoplasts-derived callus in sugar beet. *Plant Cell Rep* 26: 1457–1467.
- Wiśniewska, E., Majewska-Sawka, A. (2008). The differences in cell wall composition in leaves and regenerating protoplasts of *Beta vulgaris* and *Nicotiana tabacum*. *Biol Plant* 52: 634–641.

Doskonalenie ogórka (*Cucumis sativus* L.) pod względem odporności na kanciastą plamistość

Improvement of angular leaf spot resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Renata Słomnicka, Helena Olczak-Woltman, Aleksandra Korzeniewska, Karolina Kaźmińska, Katarzyna Niemirowicz-Szczytt, Grzegorz Bartoszewski ✉

Katedra Genetyki Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Biologii, Szkoła Główna Gospodarstwa Wiejskiego w Warszawie,
✉ e-mail: grzegorz_bartoszewski@sggw.pl, tel. 22 5932177, fax 22 5932152

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.803.2.2019, Zadanie nr 100.

Słowa kluczowe: *Cucumis sativus* L., kanciasta plamistość ogórka, markery molekularne, odporność, *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans*

Celem prac w 2019 roku było opracowanie i określenie przydatności markerów molekularnych sprzężonych z *loci* odporności na bakteryjną kanciastą plamistość ogórka na potrzeby hodowli twórczej. Zostało to osiągnięte poprzez testowanie i ocenę poziomu odporności wybranych linii hodowlanych ogórka na bakteryjną kanciastą plamistość w warunkach fitotronowych oraz genotypowanie tych linii za pomocą markerów molekularnych sprzężonych z *loci* odporności.

Do badań wytypowano zestaw 30 linii ogórka o zróżnicowanej odporności na bakteryjną kanciastą plamistość. Wykonano testy fitotronowe wykorzystując wcześniej opracowaną metodę i wirulentny szczep *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* 814/98 (Olczak-Woltman i in. 2007, Słomnicka i in. 2018a). Testy fitopatologiczne potwierdziły, że wśród badanych linii były zarówno linie bardziej odporne, jak i bardziej podatne w porównaniu ze stosowanymi standardami tj. linią odporną Gy14 i linią podatną B10. Najwyższy poziom odporności wykazała grupa czterech linii. Charakteryzowały się one brakiem chlorotycznych plam na liściach, a średnia ocen DSI (disease severity index) w skali od 1 do 9 (gdzie 9 oznacza pełną odporność) wynosiła 7,0. W wyniku inokulacji na liściach roślin tych linii obserwowano jedynie drobne nekrotyczne plamki. Wśród najbardziej odpornych linii była linia wywodząca się z *C. sativus* var. *hardwickii* Alef., co potwierdza, że cennym źródłem odporności

na kanciastą plamistość mogą być linie uzyskane w wyniku krzyżowania *C. sativus* var. *sativus* z jego dziką formą *C. sativus* var. *hardwickii*.

Opracowano zestaw markerów molekularnych, spośród których wytypowane te, które mogą być przydatne w selekcji materiałów hodowlanych odpornych na bakteryjną kanciastą plamistość. Najlepsze okazały się trzy markery oparte o PCR – dwa markery typu Indel-PCR i marker CAPS-PCR. Przy założeniu, że linie o wartości DSI > 5,5 są odporne, stwierdzono zgodność oceny fenotypowej z genotypem na poziomie 83-87% dla poszczególnych markerów. Wytypowane markery molekularne są zlokalizowane w obrębie *locus ps15.2*. Mniejszą zgodność fenotypu z genotypem uzyskano dla markerów znajdujących się w obrębie *locus ps15.1*, chociaż w populacji mapującej Gy14×B10 obserwowano większy efekt tego *locus* (Słomnicka i in., 2018b). Dwa spośród trzech opracowanych markerów miały charakter kodominujący (markery Indel-PCR) zaś trzeci marker nie miał takiego charakteru i pomimo różnych sposobów testowania nie udało się opracować warunków, w których marker ten różnicowałby homozygoty od heterozygot w materiałach podatnych na kanciastą plamistość.

Dla opracowanych trzech markerów molekularnych nie uzyskano pełnej zgodności fenotypu z genotypem. Brak tej zgodności może wynikać z doboru linii i sposobu testowania roślin, jak również obecności innych *loci* mających wpływ na poziom odporności.

Część linii charakteryzowała się spowolnionym tempem wzrostem i wobec tego testowanie wykonano na młodszych liściach, co mogło powodować zniżenie wartości wskaźnika DSI w testach fitopatologicznych i prowadzić do opisanego tych linii jako bardziej podatne niż są w rzeczywistości. Ponadto doniesienia literaturowe i nasze nieopublikowane wyniki wskazują na to, że u niektórych linii/odmian także na chromosomie 1 występują *loci* wpływające na poziom odporności roślin na kanciastą plamistość. To także może tłumaczyć, dlaczego nie odnotowaliśmy pełnej zgodności fenotypu z genotypem w przeprowadzonych analizach. Wydaje się, że opracowanie markerów dla genów odporności na chromosomie 1 i połączone testowanie z wykorzystaniem markerów dla *loci* na chromosomie 5 podwyższyłoby skuteczność selekcji materiałów odpornych.

Najważniejsze wnioski z prowadzonych badań

- Wytypowano zestaw linii, które różniły się podatnością na kanciastą plamistość, co umożliwiło dalsze testowanie markerów molekularnych z wykorzystaniem tych linii.
- Wśród linii o najwyższej odporności na kanciastą plamistość była linia ogórka pochodząca

z *C. sativus* var. *hardwickii*, co potwierdza, że *C. sativus* var. *hardwickii* może być dobrym źródłem odporności na tę chorobę.

- Opracowano zestaw markerów molekularnych sprzężonych z *loci* odporności na kanciastą plamistość zidentyfikowanymi na chromosomie 5, dla których po przetestowaniu w obrębie panelu 30 linii ogórka uzyskano zgodność fenotypowania z genotypowaniem na poziomie 83-87%.

Literatura

- Olczak-Woltman, H., Masny, A., Bartoszewski, G., Plucienniczak, A., Niemirowicz-Szczytt, K. (2007). Genetic diversity of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strains isolated from cucumber leaves collected in Poland. *Plant Pathology* 56: 373–382.
- Słomnicka, R., Olczak-Woltman, H., Oskiera, M., Schollenberger, M., Niemirowicz-Szczytt, K., Bartoszewski, G. (2018) a. Genome analysis of *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* strain 814/98 indicates diversity within the pathovar. *European Journal of Plant Pathology* 151:663–676.
- Słomnicka, R., Olczak-Woltman, H., Korzeniewska, A., Gozdowski, D., Niemirowicz-Szczytt, K., Bartoszewski, G. (2018)b. Genetic mapping of *psl* locus and quantitative trait loci for angular leaf spot resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.) *Molecular Breeding* 38:111.

Analiza wpływu hipoksji na zwiększenie tolerancji na stresy u pomidora (*Lycopersicon esculentum* L.) i ogórka (*Cucumis sativus* L.)

Analysis of the effects of exposure to hypoxia on increase stress tolerance at tomato (*Lycopersicon esculentum* L.) and cucumber (*Cucumis sativus* L.)

Małgorzata Czernicka ¹✉, Kinga Kęska ¹, Anna Kołton ², Małgorzata Kapusta ³, Iwona Kamińska ²

¹ Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii,

² Katedra Botaniki, Fizjologii i Ochrony Roślin, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków,

³ Katedra Cytologii i Embriologii Roślin, Wydział Biologii,

Uniwersytetu Gdańskiego, ul Wita Stwosza 59, 80-308 Gdańsk,

✉ e-meil: malgorzata.czernicka@urk.edu.pl, tel. 12 6625367

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 7.

Słowa kluczowe: hipoksja, ogórek, pomidor, stres, zalanie

Na uprawę pomidora i ogórka niekorzystny wpływ mają czynniki środowiskowe, które w znaczący sposób wpływają na spadek produktywności roślin. Jednym z priorytetowych problemów badawczych w hodowli pomidora i ogórka jest poznanie mechanizmów związanych z nabywaniem odporności na stresy abiotyczne. Krótkotrwały stres obniżonego stężenia tlenu w glebie może stanowić czynnik stymulujący odporność roślin na niekorzystne warunki stresowe (Ma i in 2016).

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 2019 roku celem podjętych badań była ocena wpływu hipoksji w obrębie systemu korzeniowego pomidora i ogórka na morfologię roślin, na aktywność wybranych związków o charakterze antyoksydacyjnym, ekspresję genów i wybranych białek. Ponadto cel badań stanowiło porównanie dynamiki wzrostu roślin oraz wielkości i jakości plonu owoców pomidora traktowanych i nietraktowanych stresem hipoksji w fazie rozsady.

Obiektami badań były 2 genotypy pomidora

oraz 2 linie DH ogórka. Rośliny po osiągnięciu stadium 2-4 liści właściwych podzielono na 3 grupy roślin tj. pierwsza grupa (kontrolna) uprawiana była bez zastosowania warunków stresowych, druga grupa (oznaczona jako 1xH) została potraktowana stresem obniżonej zawartości tlenu w obrębie systemu korzeniowego poprzez zalanie wielodoniczek wodą przez okres 7 dni, trzecia grupa (oznaczona jako 2xH) została potraktowana stresem hipoksji 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.

Temat badawczy 1.1: Analizy wpływu stresu obniżonego stężenia tlenu na morfologię roślin pomidora

Cel:

Ocena wpływu warunków hipoksji w obrębie systemu korzeniowego roślin w stadium 2-4 liści właściwych pomidora na wygląd morfologiczny roślin.

Wyniki:

Analiza wyników oceny morfologicznej wskazała na obecność zróżnicowania genotypowego

w odpowiedzi na stres hipoksji. U pomidora 7-dniowy stres poprzez zalanie systemu korzeniowego u obydwu genotypów pomidora spowodował spowolnienie wzrostu roślin, ale nie spowodował zmiany w liczbie i morfologii liści. Całkowita świeża masa roślin uległa zmianie po 7-dniowym stresie hipoksji jedynie u obiektu tolerancyjnego (POL 7/15), a ponowne zalanie roślin nie wpłynęło na zmianę świeżej masy roślin pomidora. Stwierdzono wpływ stresu hipoksji na obniżenie zawartości suchej masy w liściach badanych genotypów pomidora. Podobną tendencję zaobserwowano w odniesieniu do zawartości suchej masy w pędach roślin badanych genotypów pomidora. U obydwu genotypów pomidora zaobserwowano rozwój korzeni bocznych, jednak wcześniej ten proces zaobserwowano u obiektu wrażliwego (PZ 215). Masa wytworzonych korzeni różniła się między genotypami.

Wnioski:

Stres hipoksji wywołany zalaniem roślin w obrębie systemu korzeniowego wpływa na wybrane cechy morfologiczne roślin pomidora m.in. hamując ich wzrost oraz zmniejszając ich biomasa.

1. W warunkach ograniczonej dostępności tlenu rośliny obydwu obiektów pomidora wytworzyły korzenie boczne, przy czym u PZ 215 stwierdzono ich większą masę.

Temat badawczy 1.2: Ocena aktywności systemu antyoksydacyjnego pomidora i ogórka w warunkach stresu hipoksji

Cel:

Ocena wpływu stresu hipoksji w obrębie systemu korzeniowego pomidora i ogórka na zawartość wybranych antyoksydantów niskocząsteczkowych tj. kwasu askorbinowego i glutationu.

Wyniki

U badanych genotypów ogórka i pomidora największe zmiany w zawartości kwasu askorbinowego w liściach pod wpływem zastosowanego stresu zaobserwowano w 28 dniu trwania doświadczenia, przy czym zmiany te były zależne od gatunku i genotypu. W przypadku glutationu jego zawartość nie zmieniła się u roślin poddanych dwa razy stresowi w porównaniu do roślin kontrolnych (w 28 dniu doświadczenia) u genotypu tolerancyjnego POL 7/15, natomiast u genotypu PZ 215 wzrosła. Liście ogórków DH2, jak i DH4 poddanych jednokrotnemu stresowi (1xH) zawierały mniej glutationu w 21 dniu trwania doświadczenia niż w roślinach kontrolnych. Natomiast u genotypu DH4 zaobserwowano taką reakcję również po pierwszych 7 dniach trwania stresu. Wskazuje to na odmienne reakcje roślin

o wyższej i niższej wrażliwości na stres hipoksji.

Wnioski:

1. Zastosowane warunki hipoksji wpływają na zmiany w układzie antyoksydacyjnym roślin pomidora i ogórka.
2. Zaobserwowane różnice w badanych parametrach wskazują na różną wrażliwość badanych genotypów pomidora czy ogórka na stres hipoksji.

Temat badawczy 1.3: Immunodetekcja wybranych białek u pomidora pod wpływem stresu hipoksji

Cel:

Analiza akumulacji wybranego białka (ADH) w korzeniach dwóch genotypów pomidora w warunkach hipoksji.

Wyniki

Immunohistochemiczna detekcja dehydrogenazy alkoholowej (ADH, ang. *alcohol dehydrogenase*) uwidoczniała obecność sygnału fluorescencyjnego wyłącznie w korzeniach roślin traktowanych stresem hipoksji. Nie zaobserwowano sygnału fluorescencji na preparatach liściowych. Po 7 dniach stresu u pomidora PZ 215 na preparatach korzeni bocznych zaobserwowano słabszy sygnał fluorescencyjny niż u pomidora POL 7/15, co przekłada się na mniejszą akumulację ADH u obiektu wrażliwego (PZ 215). Ponadto, po jednokrotnym zalaniu roślin (1xH) zaobserwowano większą akumulację białka ADH w korzeniach bocznych niż w korzeniu głównym. W korzeniu głównym u obydwu obiektów pomidora stwierdzono akumulację białka ADH w komórkach tkanki miękkiej i w drewnie, przy czym sygnał fluorescencyjny był wyraźnie silniejszy u PZ 215 w porównaniu do obiektu tolerancyjnego (POL 7/15).

Wnioski:

1. Immunohistochemiczna analiza potwierdziła akumulację białka dehydrogenazy alkoholowej (ADH) pod wpływem stresu hipoksji, co potwierdziło udział ADH w odpowiedzi na w/w stres.
2. Obecnie niewiele jest wiadomo o dystrybucji białka ADH u roślin i z tego powodu wyniki są bardzo wartościowym uzupełnieniem dotychczas uzyskanych danych charakteryzujących aktywność genu i białka dehydrogenazy alkoholowej w warunkach stresu hipoksji.

Temat badawczy 1.4: Analiza porównawcza transkryptomów dwóch obiektów ogórka o skrajnej reakcji na hipoksję

Cel:

Zsekwencjonowanie transkryptomów związanych z regulacją ekspresji genów (miRNA) aktywowanych pod wpływem hipoksji u dwóch obiektów ogórka, określonych w pierwszym etapie badań jako obiekty skrajnie reagujące na badany stres.

Wyniki

W niniejszych badaniach dokonano identyfikacji genów miRNA ekspresjonowanych w korzeniach ogórka na skutek stresu hipoksji, w wyniku czego udało się zidentyfikować 19 nowych cząsteczek miRNA, które uległy różnicowej ekspresji w odpowiedzi na w/w stres. Kompleksowa analiza bioinformatyczna pozwoliła wskazać potencjalne geny podlegające regulacji dla nowo zidentyfikowanych cząsteczek miRNA, wśród których najliczniejszą grupę stanowiły czynniki transkrypcyjne mi.in. czynnik transkrypcyjny związany z odpowiedzią na auksyny (ARFs).

Wnioski:

1. Zidentyfikowane geny miRNA stanowią bazę do dalszych badań związanych z poznaniem funkcji, jaką pełnią one w odpowiedzi na stres hipoksji u ogórka.
2. Szczegółowa analiza poziomów ekspresji miRNA pozwoliła wskazać cząsteczki miRNA specyficzne dla dwóch badanych linii ogórka, z których jedna wykazuje się tolerancją na hipoksję (DH4), a druga wrażliwością na badany stres (DH2).
3. W kolejnym etapie niezbędna jest walidacja laboratoryjna wyselekcjonowanych cząsteczek miRNA u ogórka, w celu potwierdzenia wyników uzyskanych *in silico* oraz walidacja w początkowej fazie trwania stresu hipoksji, w celu wytypowania cząsteczek zaangażowanych we wczesną odpowiedź na stres ograniczonego dostępu tlenu.

Temat badawczy 1.5: Walidacja poziomu ekspresji genów regulatorowych u pomidora pod wpływem stresu hipoksji

Cel:

Optymalizacja metody walidacji i analizy poziomu ekspresji miRNA zidentyfikowanych *in silico* oraz transkryptu docelowego (potencjalnie przez nią regulowanego) u dwóch genotypów pomidora w warunkach hipoksji.

Wyniki

Sly-miR156b,c,a należy do konserwatywnych krótkich niekodujących cząsteczek RNA i jest zaangażowana między innymi w procesy adaptacyjne do różnych warunków stresowych (Khraiwesh i in. 2012). W niniejszych badaniach zaobserwowano wzrost ekspresji cząsteczki miRNA156b,c,a pod

wpływem stresu zalania systemu korzeniowego roślin dwóch badanych obiektów pomidora. Analizy bioinformatyczne pozwoliły wskazać gen docelowy *SPL* (*Squamosa promoter binding-like protein*) należący do grupy czynników transkrypcyjnych, który może być potencjalnie regulowany przez sly-miR156b,c,a. Zarówno u roślin PZ 215, jak i POL 7/15 zaobserwowano, że wraz ze wzrostem względnego poziomu ekspresji cząsteczki sly-miR156b,c,a maleje poziom ekspresji genu *SPL*, co wskazuje na wyciszającą rolę cząsteczki miRNA156b,c,a w regulacji ekspresji genu *SPL*.

Realizacja niniejszego zadania umożliwiła opracowanie protokołu służącego do walidacji miRNA zidentyfikowanych *in silico*, jak również do walidacji genu, który potencjalnie może być przez nie regulowany.

Wnioski:

1. Wzrost ekspresji cząsteczki miRNA156b,c,a koreluje ze względnym poziomem ekspresji genu potencjalnie regulowaną przez nią, tj. wzrost względnego poziomu ekspresji sly-miR156b,c,a powoduje zmniejszenie poziomu ekspresji genu *SPL*.
2. Zaobserwowany zróżnicowany profil ekspresji sly-miR156b,c,a pomiędzy roślinami kontrolnymi a stresowanymi hipoksją może świadczyć o tym, że ta cząsteczka miRNA zaangażowana jest w odpowiedź na w/w badany stres w trakcie jego trwania.
3. Opracowany protokół może być wykorzystany do walidacji kolejnych miRNA zidentyfikowanych u dwóch badanych genotypów pomidora: PZ 215 i POL 7/15.

Temat badawczy 2: Prowadzenie uprawy wazonowej w warunkach szklarniowych, analizy porównawcze dynamiki wzrostu roślin oraz wielkości i jakości plonu pomidora

Cel:

Porównanie dynamiki wzrostu roślin oraz wielkości i jakości plonu owoców pomidora traktowanych i nietraktowanych stresem hipoksji w stadium rozsady.

Wyniki

U pomidora POL 7/15, który określony został jako tolerancyjny na badany stres, jak również u PZ 215, charakteryzującego się wrażliwością na stres hipoksji, zaobserwowano wolniejsze tempo wzrostu roślin, które potraktowano dwukrotnie stresem hipoksji (2xH) w stadium rozsady. U pomidora wrażliwego na stres hipoksji uzyskano większy plon ogólny z roślin kontrolnych i roślin potraktowanych podwójnie stresem hipoksji (2xH),

co może potwierdzać hipotezę, że potraktowanie roślin pomidora w stadium rozsady krótkotrwałym stresem wpływa na nabywanie zwiększonej tolerancji na kolejne aplikacje stresu u roślin pomidora wykazujących się generalną wrażliwością na ograniczony dostęp tlenu. Spośród dwóch badanych pomidorów jedynie owoce pomidora PZ 215 traktowanego w stadium rozsady stresem hipoksji wykazywały istotnie wyższy procent suchej masy w porównaniu z owocami roślin kontrolnych. Jednokrotne potraktowanie roślin stresem hipoksji w fazie rozsady nie wpłynęło w istotny sposób na zawartość cukrów w żadnym z analizowanych obiektów pomidora, natomiast dwukrotna aplikacja stresu spowodowała większe gromadzenie cukrów tj. o ok. 17% w owocach PZ 215 i 31% w owocach POL 7/15. Zaobserwowano brak wpływu zalania roślin pomidora w stadium juvenilnym i owocowania na zawartość kwasu askorbinowego i likopenu.

Wnioski:

1. Dwukrotne potraktowanie roślin stresem hipoksji wpływa negatywnie na tempo wzrostu roślin pomidora tolerancyjnego i wrażliwego na w/w badany stres.
2. Zaobserwowano zróżnicowanie międzygenotypowe w odpowiedzi na stres hipoksji u roślin pomidora genotypu PZ 215 i POL 7/15 w fazie owocowania.

Literatura

- Khraiwesh, B., Zhu, J.K., Zhu, J. (2012). Role of miRNAs and siRNAs in biotic and abiotic stress responses of plants. *BBA Gene Regulatory Mechanisms* 1819(2), 137–148.
- Ma, Y, Zhu, M, Shabala, L, Zhou, M, Shabala, S. (2016). Conditioning of roots with hypoxia increases aluminum and acid stress tolerance by mitigating activation of K⁺ efflux channels by ROS in barley: Insights into cross-tolerance mechanisms. *Plant and Cell Physiology* 57(1), 160 — 173.

Analiza genetycznych i biochemicznych podstaw tolerancji cebuli (*Allium cepa* L.) na stres niedoboru wody

Analysis of genetic and biochemical basis of onion (*Allium cepa* L.) tolerance to water deficit stress

Urszula Kłosińska ✉, Marzena Nowakowska, Wojciech Szczechura, Katarzyna Nowak

Instytut Ogrodnictwa, ul Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice, Polska,
✉ e-mail: urszula.klosinska@inhort.pl, tel. 46 8346654

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.802.4.2019, Zadanie nr 104.

Słowa kluczowe: cebula, DArTseq, susza, tolerancja

Celem zadania prowadzonego w roku 2019 była charakterystyka kolejnych 150 linii/odmian cebuli pod względem reakcji na stres suszy w fazie kiełkowania nasion, wzrostu siewek i wiązania cebul oraz ocena polimorfizmu genomowego metodą DArTseq u wybranych 94 populacji cebuli o zróżnicowanej odpowiedzi na stres deficytu wody. Materiał do badań pochodził z polskich i zagranicznych firm hodowlano-nasiennych oraz z Banku Genów Instytutu Ogrodnictwa w Skierniewicach.

Stwierdzono bardzo duże zróżnicowanie ocenianych obiektów cebuli pod względem tolerancji na stres suszy, który wywoływany był zastosowaniem poliglikolu etylenowego (PEG) w stężeniu 18% dla fazy kiełkowania nasion oraz 10% dla fazy siewek. Spośród 150 testowanych linii/odmian cebuli, u 12 nie obserwowano istotnych różnic między zdolnością kiełkowania w warunkach kontrolnych i stresowych, o czym świadczyły kiełkowane nasion w suszy względem kontroli, który wynosi od 95 do 105%. Najbardziej wrażliwe na stres suszy fizjologicznej w fazie kiełkowania okazały się dwie linie, u których zdolność kiełkowania nasion została zredukowana o ponad 90% względem kontroli. Podobnie jak w fazie kiełkowania, również w fazie siewek zaobserwowano zróżnicowaną reakcję badanych obiektów cebuli na niedobór wody. Na podstawie średnich wartości ze wszystkich linii/odmian stwierdzono, że spośród

trzech ocenianych parametrów wzrostu siewek, stres niedoboru wody najmniej redukowało długość korzeni (36%); natomiast świeża masa i długość liścieni były zahamowane w ponad 50%. U 21 genotypów cebuli zanotowano dłuższy korzeń w warunkach stresu suszy niż w kontroli. Najbardziej wrażliwych na deficyt wody okazało się 8 obiektów z redukcją długości korzeni o ponad 80% w stosunku do kontroli. Zastosowanie 10% stężenia PEG u wszystkich linii zmniejszyło długość liścieni i świeżą masę siewek.

W doświadczeniu prowadzonym w fazie wiązania cebul w tradycyjnej suszy glebowej (50% pojemnikowej pojemności wodnej) również zaobserwowano duże zróżnicowanie pomiędzy liniami pod względem średniej masy cebul. Największe straty masy cebul (50 – 55%) zanotowano dla czterech obiektów, które stanowiły 2,5% badanej populacji. U 16 linii nie stwierdzono znacznych różnic między masą cebul w warunkach kontrolowanych i stresowych, o czym świadczyły masy cebul w suszy względem kontroli, który wynosi od 91 do 108%. Natomiast istotny wzrost masy cebul od 15 do 21% w warunkach deficytu wody w stosunku do kontroli zanotowano u czterech obiektów.

Na podstawie wyników uzyskanych dla fazy kiełkowania, siewek i wiązania cebul, spośród 150 obiektów wybrano 94 o zróżnicowanej reakcji na stres niedoboru wody. Ich genotypowanie

jest prowadzone w oparciu o technologię DArTseq przez Diversity Arrays Technology (DArT) Pty Ltd. Wyniki profilowania DNA 188 obiektów (94 z 2018r. i 94 z 2019 r.) będą analizowane bioinformatycznie celem wygenerowania jak największej liczby markerów, które zostaną wykorzystane do konstrukcji silnie zagęszczonej mapy genetycznej niezbędnej do identyfikacji regionów genomu odpowiedzialnych za tolerancję cebuli na deficyt wody.

Wnioski

1. 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.

2. Zwiększenie długości korzenia pod wpływem stresu suszy może być wskaźnikiem tolerancji cebuli na deficyt wody.
3. Przeprowadzona oddzielnie dla każdej linii/ odmiany analiza wpływu niedoboru wody na wielkość badanych cech względem kontroli pozwoliła na wybranie linii charakteryzujących się skrajną reakcją na suszę, które posłużą do badań fizjologiczno-biochemicznych oraz wygenerowania populacji mieszańcowych niezbędnych do określenia czynników genetycznych warunkujących tolerancję cebuli na deficyt wody.

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

Dariusz Grzebelus ✉, Alicja Macko-Podgórn, Katarzyna Stelmach, Kornelia Kwolek, Rafał Barański

Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,
✉ email: d.grzebelus@urk.edu.pl, tel. 12 6625191

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.802.11.2019, Zadanie nr 69.

Słowa kluczowe: genotypowanie, korzeń spichrzowy, mapowanie asocjacyjne, marchew, transpozony DNA, struktura zmienności genetycznej

Temat badawczy 1: Fenotypowanie roślin

Cel tematu:

Wyprowadzenie i ocena populacji marchwi o różnych parametrach korzenia spichrzowego w doświadczeniu polowym.

Opis wyników:

W doświadczeniu polowym wysiano ogółem dziewięć populacji, w tym siedem populacji WI-OSC oraz dwie populacje pochodzące z samozapylenia roślin z kolekcji RS. Ogółem oceniono 50 korzeni z pięciu pozostałych populacji WI-OSC, a także 160 korzeni z dwóch populacji RS. Badane populacje różniły się pod względem ocenianych cech morfologicznych, tj. długości korzenia, szerokości głowy, szerokości ramion, szerokości nasady korzenia oraz koloru korzenia oraz współczynników kształtu (K), zbieżystości (Z) i przyrostu na grubość (G).

Wnioski:

Populacje oceniane w doświadczeniu polowym wyraźnie różniły się morfologią korzeni spichrzowych, w tym kolorem oraz parametrami opisującymi kształt korzenia.

Temat badawczy 2: Wysokowydajne genotypowanie

Cel tematu:

Opracowanie dodatkowego panelu polimorfizmów insercji transpozonów *DcSto* w oparciu

i insercje nieobecne w genomie referencyjnym.

Opis wyników:

W wyniku przeprowadzonej analizy zidentyfikowano łącznie 18 518 miejsc insercji elementów *DcSto* należących do 14 rodzin. Spośród 167 zaprojektowanych par starterów, 124 charakteryzowały się amplifikacją produktów o oczekiwanej długości, pozostałe 43 charakteryzowały się obecnością produktów o długości innej niż oczekiwana lub brakiem wydajnej amplifikacji. Nowy panel markerów DcS-ILP posłużył do genotypowania 42 roślin z badanej kolekcji marchwi uprawnej typu wschodniego i zachodniego. 84 markery identyfikowały polimorfizm insercji elementów *DcSto*. Dodatkowe warianty alleliczne charakteryzowały się niską częstością występowania. Frekwencja dodatkowego allelu była zauważalnie wyższa w grupie marchwi typu zachodniego. W porównaniu do wcześniej opracowanych markerów DcS-ILP dla puli zachodniej, markery opracowane dla marchwi typu wschodniego wskazywały na nieco słabszą, choć nadal wyraźną, odrębność obu pul genowych marchwi uprawnej (rys. 1). Większość insercji pochodzących z puli wschodniej była mniej rozpowszechniona niż insercje z puli zachodniej (rys. 1).

Wnioski:

— Marchew typu wschodniego charakteryzuje się wysokim poziomem polimorfizmu insercji elementów *DcSto*.

- Markery DcS-ILP różnicują marchew uprawną na dwie pule genowe; marchwi typu wschodniego i zachodniego.
- Loci zawierające insercje elementów *DcSto* u roślin reprezentujących populacje marchwi typu wschodniego zwykle występują z niższą częstotliwością niż loci zawierające takie insercje, zidentyfikowane w oparciu o genom referencyjny. Może to świadczyć o selekcyjnym wąskim gardle na etapie wyodrębnienia puli zachodniej marchwi uprawnej.

Temat badawczy 3: Analiza bioinformatyczna i identyfikacja polimorfizmów diagnostycznych

Cele tematu

Mapowanie asocjacyjne w oparciu o wyniki fenotypowania i genotypowania GBS; identyfikacja i charakterystyka genów kandydujących warunkujących morfologię korzenia.

Opis wyników

Analizę GWAS przeprowadzono dla 300 roślin. Pierwsze trzy główne składowe wyjaśniały łącznie 20,67% całkowitej zmienności. Porównanie zmienności wewnątrz- i międzypopulacyjnej roślin wykorzystanych do GWAS wykazało, że ponad 64% wariacji molekularnej można było przypisać wariacji w obrębie populacji. Taki wynik wskazuje, że w przeciwieństwie do gatunków samopłodnych, w przypadku marchwi uzasadnione jest traktowanie każdej rośliny jako pojedynczego osobnika do analizy asocjacji, nawet jeśli reprezentują one samą odmianę. Analiza GWAS pozwoliła na identyfikację jednego rejonu genomowego o długości 180 473 pz, zlokalizowanego na pierwszym chromosomie, zawierającego polimorfizmy SNP istotnie związane z szerokością ramienia korzeni marchwi. Spośród 75 525 badanych SNP sześć było istotnie związanych z szerokością korzenia marchwi, przy czym każdy z nich wyjaśniał mniej niż 10% zmienności fenotypowej dla tej cechy. Wyniki analizy asocjacji wskazują, że kształt korzenia jest kontrolowany przez wiele miejsc w genomie o małym wpływie na badaną cechę. Ostatecznie, rejon użyty do identyfikacji genów kandydujących został zlokalizowany na pierwszym chromosomie i obejmował 24 geny oraz 97 polimorfizmów SNP (rys. 2). W celu zidentyfikowania genu kandydującego przeanalizowano ekspresję tych genów podczas rozwoju korzeni marchwi uprawnej i dzikiej (dane z analiz transkryptomów za Machaj i in. 2018). Spośród 24 genów 11 wykazało różnicową ekspresję między jedną lub większą liczbą faz rozwojowych lub marchwią dziką i uprawną. Dane literaturowe

sugerują, że spośród tych genów, tylko gen kodujący białko DCAF1 (DDB1-CUL4 Associated Factor 1) prawdopodobnie bierze udział w procesach rozwojowych korzeni. To skłoniło nas do wybrania tego genu do dalszej walidacji.

Wnioski

- Zidentyfikowano gen kandydujący, związany z determinacją szerokości ramion korzeni marchwi.
- Kształt korzenia marchwi jest determinowany wieloma miejscami w genomie, charakteryzującymi się małym efektem.

Temat badawczy 4: Konwersja wybranych polimorfizmów do markerów specyficznych

Cel tematu

Walidacja polimorfizmu GBS-SNP zasocjowanego z kształtem korzenia.

Opis wyników

Marker SNP chr1_26632616 segregował w pięciu z siedmiu genotypowanych populacji. Zaobserwowano związek z cechą średnicy ramion oraz średnicy głowy, a także z obliczonym na podstawie tych dwóch pomiarów współczynnikiem grubienia (G). Pozostałe cechy mierzalne i współczynniki nie korelowały z wynikami genotypowania. Szczegółowym analizom poddano wyniki uzyskane dla populacji RS79/1 liczącej 120 roślin. W populacji tej korzenie o najszerszych ramionach obserwowano dla heterozygot, podczas gdy homozygoty cechowały się podobnymi średnimi wartościami tej cechy. Ogólnie, frekwencja w klasach wielkości korzenia jedynie w niewielkim stopniu zależała od genotypu w analizowanym locus, wykazując jednak oczekiwaną relację, tzn. nieco wyższe średnice w ramionach korzeni roślin homozygotycznych G/G i heterozygot T/G. Uzyskane wyniki sugerują, że heterozygoty w locus chr1_26632616 mogą wykształcać nieco szersze korzenie, co tłumaczyłoby powszechne występowanie polimorfizmu SNP chr1_26632616 w puli genowej marchwi uprawnej typu zachodniego.

Wnioski

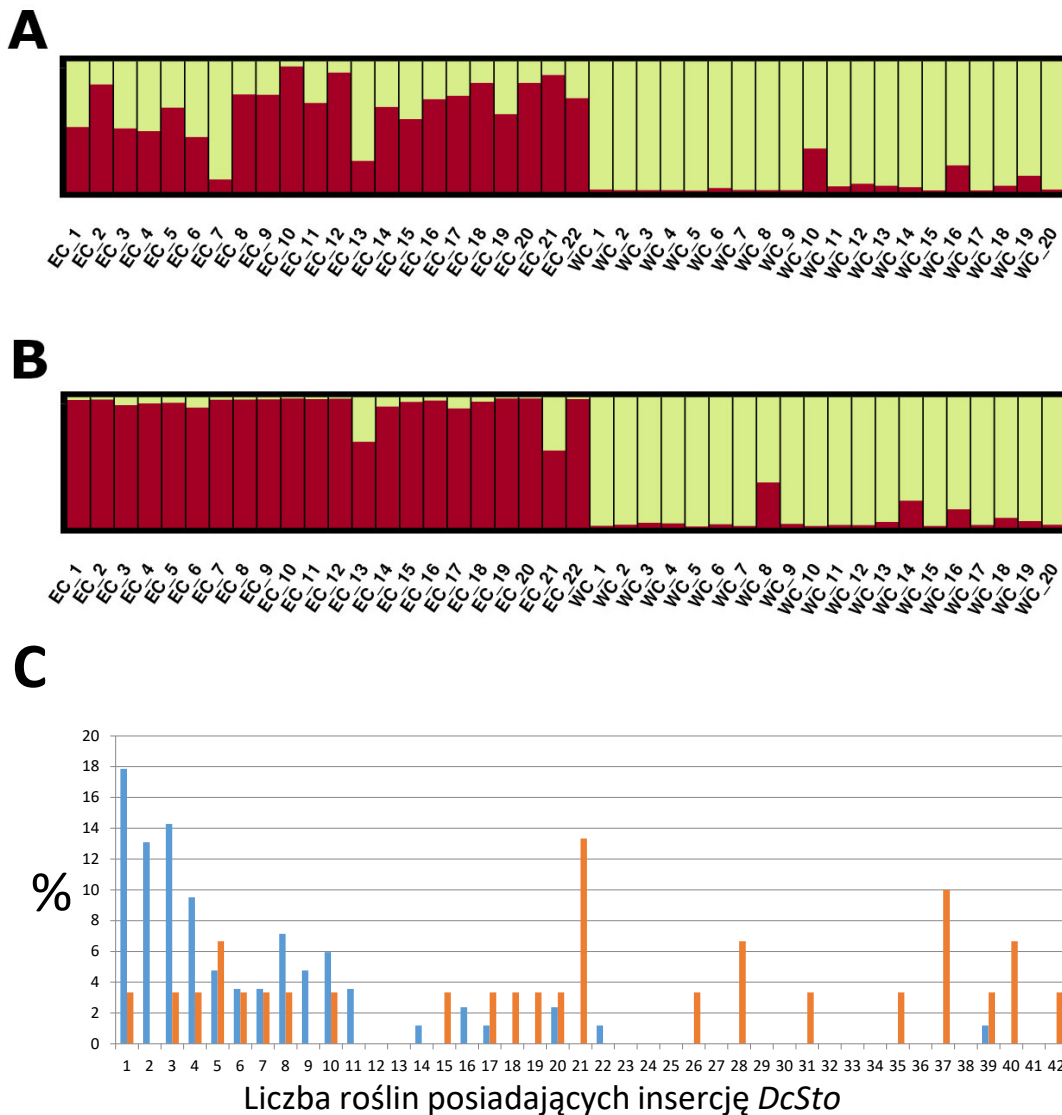
- Genotypowanie markerem SNP chr1_26632616 pozwoliło na uzyskanie jednoznacznych odczytów i przyporządkowanie każdej genotypowanej rośliny do jednej z trzech klas: homozygot G/G, homozygot T/T lub heterozygot T/G.
- Pięć z siedmiu ocenianych populacji cechowała heterozygotyczność w obrębie locus chr1_26632616.

- Wariant genetyczny w tym locus prawdopodobnie w niewielkim stopniu wpływa na różnice morfologiczne w odniesieniu do szerokości ramion korzeni spichrzowych.
- Wyniki uzyskane dla populacji RS79/1 wskazują na silniejszy przyrost korzeni na grubość u roślin będących heterozygotami pod względem locus chr1_26632616. Może tłumaczyć powszechne

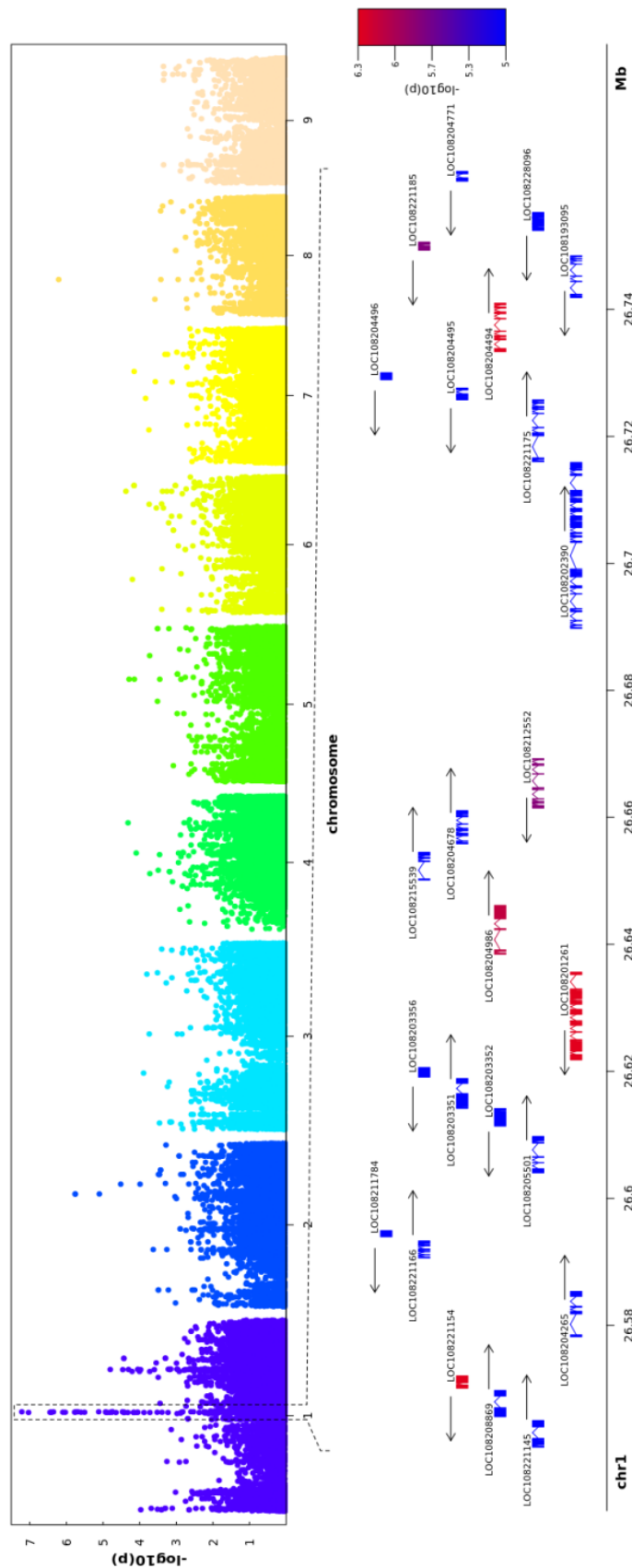
występowanie tego polimorfizmu w puli genowej marchwi uprawnej typu zachodniego.

Literatura

Machaj, G., Bostan, H., Macko-Podgórn, A., Iorizzo, M., Grzebelus, D. (2018). Comparative transcriptomics of root development in wild and cultivated carrots. *Genes*, 9(9): 431.



Rysunek 1. Struktura zmienności genetycznej marchwi uprawnej określona przy wykorzystaniu markerów uzyskanych dla typu wschodniego i zachodniego marchwi uprawnej (odpowiednio A i B) oraz częstość występowania wariantów z insercją *DcSto* dla tych dwóch grup markerów DcS-ILP.



Rysunek 2. Wykres typu Manhattan przedstawiający wartości $-\log_{10} p$ mówiące o asocjacji polimorfizmu z szerokością korzenia oraz adnotację genów znajdujących się w zidentyfikowanym rejonie. Kolor genów przypisany został w oparciu o wartość $-\log_{10} p$ polimorfizmu SNP znajdującego się w obrębie jego sekwencji.

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

Wojciech Wesołowski, Beata Domnicz, Anna Burda, Stefan Stojałowski, Marek Szklarczyk ✉

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ✉ e-mail: marek.szklarczyk@urk.edu.pl, tel. 12 6625331

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.802.11.2019, Zadanie nr 97.

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

Cel 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:

Przeprowadzono fenotypowanie czterech populacji typu BC – dwóch marchwi oraz dwóch cebuli. U wszystkich badanych populacji oczekiwane rozszczepienie na rośliny męskosterylne i męskopłodne wynosiło 1 : 1. Występowanie takich rozszczepień potwierdzono testem chi-kwadrat. W toku prac nad kapustą poddano jarowizacji 13 linii F3 oraz 40 linii BC1S1 otrzymanych z populacji segregujących pod względem samozgodności/samoniezgodności. Nieliczne kwitnące rośliny poddawano samozapyleniu w pąku i w otwartym kwiecie. Linie F3 bardzo słabo wiązały nasiona po obydwu typach samozapylenia. Z kolei kwitnące rośliny BC1S1 wiązały nasiona wydajnie (każda powyżej 200 nasion).

Wnioski:

- Testowane populacje marchwi i cebuli cechowała spodziewana segregacja na rośliny męskosterylne i męskopłodne – 1 : 1. Ze względu na prawidłową segregację populacje te nadają się do mapowania genetycznego loci restorerowych.

- Odnotowano problemy z produkcją nasion pokoleń F4 oraz BC1S2, co prawdopodobnie jest konsekwencją depresji wsobnej utrudniającej przejście roślin do fazy generatywnej oraz – w przypadku linii F3 – utrudniającej wiązanie nasion.

Temat badawczy 2: Sekwencjonowanie transkryptomów (RNA-seq) – próba bezpośredniej identyfikacji loci restorerowych

Cel tematu: uzyskanie sekwencji transkryptomu dla roślin męskosterylnych i roślin z przywróconą płodnością u cebuli.

Opis wyników:

W celu poznania różnic transkrypcyjnych wynikających z aktywności genu restorerowego, cztery rośliny męskosterylne (cytoplasma S, allel dopełniający w układzie homozygotycznym) i cztery rośliny męskopłodne (cytoplasma S, allel restorerowy w układzie heterozygotycznym) poddano analizom RNA-Seq. W wyniku sekwencjonowania dla pojedynczej próbki otrzymano średnio 55,2 mln par odczytów. Analiza przeprowadzona programem FASTQC potwierdziła wysoką jakość uzyskanych odczytów sekwencyjnych. Średnia wartość wskaźnika jakości Phred dla poszczególnych nukleotydów tworzących odczyty wynosiła 36. W uzyskanych sekwencjach zawartość G+C wynosiła średnio 43%. Dodatkową filtrację jakościową przeprowadzoną programem Trimmomatic przeszło około 93,1% odczytów. W tej puli frakcja sekwencji rRNA

wahała się w granicach od 0,31 do 0,65%.

Wnioski:

- Dla wszystkich roślin z badanej populacji cebuli uzyskano porównywalną ilość danych sekwencyjnych.
- Wysokie wartości wskaźnika jakości *Phred* gwarantują przydatność uzyskanych danych sekwencyjnych do różnicowej analizy ekspresji genów.

Temat badawczy 3: Analizy bioinformatyczne – ocena różnic w poziomie akumulacji transkryptów

Cel tematu: określenie poziomu ekspresji genów jądrowych (na poziomie RNA) u roślin męskosterylnych i roślin z przywróconą płodnością u cebuli.

Opis wyników:

Otrzymane w wyniku sekwencjonowania i filtracji jakościowej odczyty sekwencyjne poddano mapowaniu do transkryptomu cebuli. Procent zmapowanych par odczytów wynosił 100%. Analiza poziomu ekspresji umożliwiła identyfikację łącznie 1096 genów, których poziom ekspresji różnicował rośliny męskosterylne i męskopłodne. Spośród tych genów, 804 miało wyższą ekspresję u roślin męskopłodnych (MP), z czego dla 436 genów ekspresję stwierdzono wyłącznie u roślin MP. Analiza ontologii wykazała, iż białkowe produkty ekspresji niemal połowy (48%) genów różnicujących o transkryptach występujących wyłącznie u roślin męskosterylnych oraz charakteryzujących się zróżnicowanym poziomem u roślin męskopłodnych i męskosterylnych, są komponentami błon. Taką samą lokalizacją komórkową charakteryzowało się 39% białkowych produktów genów o transkryptach specyficznych dla roślin męskopłodnych. Jedną z najliczniej reprezentowanych kategorii genów ulegających wyższej ekspresji u roślin męskopłodnych były geny kodujące białka związane z metabolizmem ATP: kinazy (42 geny) oraz ATP-azy (6 genów). Innymi licznymi kategoriami genów ulegających podwyższonej ekspresji u roślin męskopłodnych były geny, których białka wchodzi w interakcję z kwasami nukleinowymi (19 genów) oraz jonami metali (31 genów).

Wnioski:

- Różnicowa analiza ekspresji umożliwiła identyfikację 1096 genów, dla których różnica wartości FPKM pomiędzy roślinami męskosterylnymi i męskopłodnymi była większa lub równa 15×.
- W tej puli genów 804 miało wyższą ekspresję u roślin męskopłodnych, z czego dla 436 genów ekspresję stwierdzono wyłącznie u roślin MP.
- Analiza ontologii genów wykazała, iż

większość genów ulegających podwyższonej ekspresji u roślin męskopłodnych koduje białka związane z procesami oksydoredukcyjnymi, interakcjami z kwasami nukleinowymi oraz aktywnością kinazową.

- Trzy geny różnicujące spełniały najważniejsze kryteria, jakimi powinny charakteryzować się restorery: ulegały ekspresji wyłącznie u roślin męskopłodnych, ich produkty białkowe są kierowane do mitochondriów i zawierają motywy pentatrikopeptydowe umożliwiające interakcje z transkryptami.

Temat badawczy 4: Genotypowanie markerami mikrosatelitarnymi (cebula)

Cel tematu: zmapowanie chromosomowo-specyficznych markerów mikrosatelitarnych w obrębie grup sprzężeń utworzonych z markerów GBS.

Opis wyników

Analizowano po pięć roślin męskosterylnych i męskopłodnych z trzech populacji AI/10, 10 i 601. Do genotypowania wykorzystano cztery markery mikrosatelitarne – ACM045, ACM046, ACM099 i ACM229. Markery te pochodziły z chromosomów odpowiednio VI, VII, V oraz VIII. Informatywne produkty wszystkich testowanych markerów mikrosatelitarnych miały charakter monomorficzny w obrębie badanych populacji. Niekiedy odnotowywano polimorfizm produktów większych niż informatywne – nie brano ich jednak pod uwagę, gdyż nie ma pewności, iż odpowiadają one deklarowanej lokalizacji chromosomowej zastosowanych markerów.

Wnioski:

- Brak polimorfizmu w testowanych segregujących populacjach uniemożliwił wykorzystanie markerów ACM045, ACM046, ACM099 i ACM229 do mapowania genetycznego.

Temat badawczy 5: Konwersja sprzężonych z docelowymi genami polimorfizmów DNA w markery sekwencyjnie specyficzne – CAPS, tetra-primer ARMS-PCR oraz TaqMan

Cel tematu: opracowanie markerów PCR do wnioskowania o obecności alleli restorerowych i alleli (allelu) samozgodności.

Opis wyników:

Zmapowano marker *pe106/TaqI* kosegregujący z przywracaniem płodności w populacji 170 marchwi. Marker ten wraz z genem restorerowym zmapował się wśród markerów GBS z chromosomu 9. Zmapowano także marker 100 kosegregujący z przywracaniem płodności w populacji AI/10

cebuli. Marker ten wraz z genem restorerowym zmapował się wśród markerów GBS z grupy sprzężeń nr 2. Mapowaniu poddano także polimorficzny marker PK1-PK4 z populacji 651 kapusty. Marker ten wykazywał sprzężenie z QTL samozgodności z chromosomu 6. Zaobserwowano też, iż rośliny będące heterozygotami w locus tego markera miały współczynnik samoniezgodności kilkukrotnie wyższy od roślin homozygotycznych. Prze-testowano także nową pulę markerów pod kątem ich potencjalnej kosegregacji z cechami przywracania płodności (marchew, cebula) i samozgodności (kapusta). Ogółem wyselekcjonowano cztery markery tego typu.

Wnioski:

- Marker *pe106/TaqI* marchwi oraz marker 100 cebuli wykazują sprzężenie z genami restorerowymi analizowanych populacji.
- Marker PK1-PK4 wykazuje sprzężenie z QTL samozgodności wykrytym w populacji 651 kapusty. Segregacja tego markera w populacjach 651 i C1 oraz zakotwiczenie w genie *SRK* sugerują, iż cecha samozgodności może być konsekwencją mutacji obrębie *S*-locus.
- Zidentyfikowano dwa markery kosegregujące z przywracaniem płodności u marchwi, jeden tego typu marker u cebuli oraz jeden marker kosegregujący z samozgodnością u kapusty.

Transfer cytoplazmatycznej męskiej sterility poprzez somatyczną hybrydyzację u marchwi

Transfer of cytoplasmic male sterility through somatic hybridization in carrot

Ewa Grzebelus ✉, Marek Szklarczyk, Rafał Barański, Aneta Malec, Dariusz Kadłuczka

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie,
✉ e-mail: e.grzebelus@urk.edu.pl, tel. 12 6625190

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.802.11.2019, Zadanie nr 101.

Słowa kluczowe: białka fluorescencyjne, elektrofuzja protoplastów, inaktywatory genomów organelowych i jądrowego, wczesna selekcja cybryd, utrwalenie wariantów allelicznych

Temat badawczy 1: Opracowanie markerów DNA przydatnych do identyfikacji form cybrydowych oraz stabilizacja genetyczna i selekcja form donorowych

Cel tematu

(1) ustalenie genotypów markerowych w partiach nasion donora i akceptorów CMS oraz (2) weryfikacja typu cytoplazmy u donora i akceptorów CMS.

Opis wyników

Analizami objęto siedem partii nasion (sublinii) oznaczonych numerami: 213, 253, 256, 257, 258, 259 i 262. Do genotypowania wykorzystano cztery markery jądrowe, jeden marker mitochondrialny (*atp9*) oraz jeden marker plastydowy (*psaA-trnS/AluI*). W zestawie analizowanych obiektów dla pojedynczego markera jądrowego odnotowano od dwóch do czterech profili prążkowych. Występowanie tych profili można wyjaśnić obecnością dwóch lub trzech alleli danego markera. W przypadku markera mitochondrialnego analizowane próby generowały produkt charakterystyczny dla cytoplazmy normalnej N (0,36 kb) lub produkt charakterystyczny dla cytoplazmy sterylizującej Sp (0,32 kb). Obecność markera dla cytoplazmy N obserwowano u sześciu badanych obiektów, tylko u jednego obiektu uzyskano marker cytoplazmy Sp. W profilach prążkowych markera plastydowego poszukiwano produktu diagnostycznego o wielkości 0,2 kb, który wskazywał na obecność cytoplazmy N. Produkt ten wystąpił u prób, w których obserwowano mitochondrialny marker

cytoplazmy N.

W bieżącym roku podjęto produkcję nasion czterech sublinii męskopłodnych (188/5, 188/20, 189/3, 189/5). Kwitnące rośliny z danej sublinii izolowano wspólnie w celu przepyleń siostrzanego. Przeprowadzono także produkcję nasion męskosterylnej linii 2163A. W tym celu wysadzono trzy sublinie 2163 – 8587, 8588 i 8594 – każda z nich była reprezentowana przez trzy pary złożone z rośliny męskosterylnej oraz dopełniającej. Pary umieszczano pod wspólnym izolatorem – nasiona zbierano oddzielnie z każdej rośliny męskosterylnej.

Wnioski

- W wyniku testowania markerami jądrowymi utrwalone warianty alleliczne wykryto w pięciu partiach nasion (subliniach). Materiały te będzie można wykorzystać do fuzji protoplastów pod warunkiem dobrania komponentów partnerskich o przeciwstawnych wariantach allelicznych.
- Zarówno zastosowany marker mitochondrialny jak i marker plastydowy zgodnie wskazują, iż sześć partii nasion posiada cytoplazmę normalną N a jedna cytoplazmę Sp.
- W wyniku kolejnej rundy reprodukcji komponentów rodzicielskich uzyskano nasiona do następnych eksperymentów fuzji. Plony nasion wahały się od kilku sztuk do 150 g.

Temat badawczy 2: Elektrofuzja protoplastów marchwi z wykorzystaniem różnych

inaktywatorów genomów organellowych

Cel tematu

Wybór inaktywatora genomu organellowego.

Opis wyników

W doświadczeniu wykorzystano jedną linię męskosterylną 2163A oraz trzy sublinie męskopłodne linii B1 i B14. Genom organellowy inaktywowano poprzez traktowanie protoplastów akceptora CMS 0,3 mM kwasem jodooctowym (IOA) lub 1,0 mM amidem kwasu jodooctowego (IOAA). Doświadczenie przeprowadzono w ten sposób, by sprawdzić reakcję protoplastów konkretnych sublinii męskopłodnych na dwa inaktywatory genomu organellowego. Ogólny stan protoplastów po traktowaniu inaktywatorami był dobry, zarówno w przypadku protoplastów donora, jak i akceptora CMS. Nie obserwowano różnic w jakości protoplastów pomiędzy komórkami traktowanymi poszczególnymi inaktywatorami chemicznymi (IOA i IOAA). Różnic nie było także w liczbie cybryd otrzymywanych w wyniku elektrofuzji. Obserwowano jednak niekorzystny wpływ czasu na wynik fuzji protoplastów – im więcej czasu upływało od momentu wyizolowania protoplastów, tym elektrofuzja była mniej wydajna i tym samym obserwowano mniejszą liczbę komórek cybrydowych.

Wnioski

- Zastosowanie łagodniejszych warunków inaktywacji genomów organellowych i jądrowych skutkowało lepszą jakością protoplastów, które były użyte do fuzji.
- Zastosowanie IOAA daje szansę na regenerację większej liczby komórek cybrydowych.

Temat badawczy 3: Selekcja, regeneracja i wzrost roślin cybrydowych

Cel tematu

(1) otrzymanie komórek mieszańcowych, (2) weryfikacja podziałów mitotycznych oraz (3) określenie warunków otrzymania tkanki kalusowej/masy proembriogennej i regeneracji roślin cybrydowych.

Opis wyników

Podczas obserwacji w 10 dniu stwierdzono obecność pierwszych podziałów. We wszystkich założonych doświadczeniach obserwowano niewielką liczbę komórek, które ulegały podziałom. U komórek niedzielących się obserwowano symptomy plazmolizy i zamieranie, a w przypadku niektórych agregatów – brak dalszego rozwoju i zamieranie. W przypadku agregatów, u których obserwowano rozwój, podjęto próbę ich uwolnienia z minibłonek po ok. 2,5 miesiąca

od założenia kultury. Uwolnione agregaty zostały przniesione na pożywkę indukującą wzrost tkanki kalusowej/masy proembriogennej wzbogaconą w fitosulfokinę. W wyniku zastosowania powyższej procedury otrzymano rośliny, które poddano ocenie molekularnej (temat badawczy 4).

Wnioski

- Zastosowane w doświadczeniu warunki oraz zwiększenie liczby wyselekcjonowanych komórek nie pozwoliły uzyskać zadowalającej liczby dzielących się komórek cybrydowych.
- W przyszłych eksperymentach należałoby zmodyfikować stężenie fitosulfokiny lub zastosować inny regulator wzrostu, w celu poprawy aktywności podziałowej wyselekcjonowanych cybryd i ich regeneracji w rośliny.

Temat badawczy 4: Ocena molekularna i fenotypowa roślin cybrydowych

Cel tematu

Genotypowanie genomu jądrowego i cytoplazmatycznego regeneratów.

Opis wyników

Analizom poddano dwie pule zregenerowanych roślin. Pierwsza była rezultatem fuzji 4503/4x4501/5 + 174/9 (11 roślin o numerach 9 – 19), drugą otrzymano po fuzji 4505/4x4501/2 + 188/7 (9 roślin o numerach 55 – 63).

Regeneranty o numerach od 9 do 19 zostały poddane genotypowaniu markerem jądrowym chr1-DcS15. U roślin 9, 10, 11, 13, 14, 17 i 18 został wygenerowany wyłącznie produkt PCR o wielkości 650 bp. Profil taki obserwowano także u obiektu rodzicielskiego 174/9. U roślin 12, 15, 16 oraz 19 wystąpiły dwa produkty amplifikacji – miały one wielkość 650 i 880 bp. U rodzica 4503/4x4501/5 był obserwowany wyłącznie fragment DNA o długości 880 bp.

Regeneranty o numerach od 55 do 63 poddano genotypowaniu markerem jądrowym chr2-DcS31. U roślin 55, 56, 57, 58, 60, 61 oraz u rodzica 188/7 obserwowano pojedynczy produkt amplifikacji o wielkości 850 bp. U roślin 62 i 63 oraz u rodzica 4505/4x4501/2 uzyskano pojedynczy produkt o wielkości 570 bp. Amplifikację obydwu tych produktów odnotowano u regeneranta nr 59.

Markery organellowe zgodnie wskazują, iż regeneranty nr 62 i 63 mają cytoplazmę Sp. Przy użyciu markera mitochondrialnego takie samo wskazanie uzyskano dla rośliny nr 59. Z kolei marker plastydowy wskazuje na jej heteroplazmię z przewagą komponentu N nad Sp. U pozostałych regenerantów markery organellowe zgodnie wskazywały na obecność cytoplazmy normalnej.

Wnioski

- Genotypowanie markerami jądrowymi wskazuje, iż regeneranty oznaczone numerami 12, 15, 16, 19 i 59 mają charakter mieszańcowy – są rezultatem fuzji somatycznej komórek z linii CMS i męskopłodnej.
- Genotypowanie obydwoma markerami organelowymi wskazuje, iż mieszańcowe regeneranty o numerach 12, 15, 16 i 19 mają cytoplazmą normalną N. W przypadku regeneranta nr 59 marker mitochondrialny wskazuje na obecność cytoplazmy Sp a marker plastydowy na heteroplazmię N/Sp.
- Pozostałe zregenerowane rośliny najprawdopodobniej powstały bez udziału fuzji heterologicznej, czyli z komórek tylko jednej linii – w przypadku roślin 62 i 63 była to linia męskosterylna (4505/4x4501/2), natomiast dla reszty niemieszańcowych regenerantów była to linia męskopłodna (174/9 lub 188/7).

Wykorzystanie metod biotechnologicznych do poszerzenia zmienności genetycznej warzyw kapustnych

Biotechnological methods for broadening of the genetic diversity in brassica vegetables

Agnieszka Kiełkowska ✉, Adela Adamus, Marek Szklarczyk

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Uniwersytet Rolniczy im. H. Kołłątaja w Krakowie, Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków,
✉ e-mail: a.kielkowska@urk.edu.pl, tel. 12 6625190

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.802.11.2019, Zadanie nr 64.

Słowa kluczowe: elektrofuzja, inaktywacja genomu, markery molekularne, protoplasty

Zad.1. Opracowanie metody otrzymania mieszańców somatycznych kapusty głowiastej (*Brassica oleracea* var. *capitata*) z nowymi, wartościowymi cechami

Celem badań w 2019 roku było zbadanie wpływu stresu inaktywacji genomu cytoplazmatycznego oraz elektrofuzji na jakość protoplastów oraz charakterystyka kultur po fuzji asymetrycznej.

Przeprowadzono badania nad optymalizacją metodyki fuzji asymetrycznej. Otrzymane wyniki wskazują, że skrócenie czasu traktowania protoplastów IOA w połączeniu z obniżeniem temperatury podczas manipulacji poprzedzających elektrofuzję były niezwykle ważne dla przeciwdziałania ich degradacji. W związku z tym, w badaniach nad otrzymaniem hybryd u kapusty głowiastej genom cytoplazmatyczny należy inaktywować za pomocą 1 mM IOA działającego przez 15 minut z zachowaniem obniżonej temperatury na wszystkich etapach poprzedzających elektrofuzję, a inaktywację jądra komórkowego wykonać za pomocą promieniowania UV w cross linkerze wg protokołu opracowanego w latach 2016-2017. Frekwencja heterokarionów po fuzji asymetrycznej (ok. 6%), była zadawalająca i zgodna z danymi literaturowymi (Pelletier 1993, Navrátilová i in. 2006). Żywotność protoplastów i aktywność mitotyczna komórek otrzymanych z protoplastów poddanych fuzji asymetrycznej była niższa w porównaniu z innymi badanymi kombinacjami. W roku bieżącym, w wyniku fuzji asymetrycznej, po raz pierwszy,

uzyskano mikrokalus, który poddano regeneracji. Na dzień sporządzenia sprawozdania otrzymano z tej kombinacji około 70 pędów. Wstępna ocena cytometryczna tych regenerantów wykazała obecność diploidów oraz tetraploidów. Powyższe wyniki wskazują na potrzebę analizy markerowej uzyskanych regenerantów w celu weryfikacji ich statusu genetycznego. Korzystnym byłoby również walidacja zoptymalizowanej metodyki fuzji asymetrycznej na innym układzie obiektów, niż opisane w bieżącym sprawozdaniu.

Zad.2. Opracowanie markerów molekularnych do oceny statusu mieszańcowości regenerantów otrzymanych w wyniku eksperymentów fuzji

Celem tego zadania w 2019 roku była analiza markerowa regenerantów otrzymanych w wyniku fuzji symetrycznej oraz fenotypowanie potomstw F3 pod względem odporności na kiłę – test na polu kiłowym.

Przeprowadzono analizę molekularną (markerami do identyfikacji plazmotypu oraz markerami DNA jądrowego) 20 regenerantów otrzymanych w wyniku fuzji symetrycznej w roku 2018. Wśród testowanych regenerantów dominowały rośliny (15 szt.), których charakteru mieszańcowego nie stwierdzono, ale obserwowano również 5 roślin (4 z kombinacji diploid + diploid i 1 z kombinacji haploid + haploid) u których, wykryto mieszańcowy charakter.

W 2019 roku, w ramach prac nad populacją z segregacją odporności na kiłę kapusty

wykonano fenotypowanie 80 potomstw pokolenia F3 na polu śmierci porażonym przez *Plasmodiophora brassicae*. Badane potomstwa pochodziły z 3 krzyżówek roślin odpornych i wrażliwych, które następnie zostały poddane samozapyleniu, aby wyprowadzić pokolenie F3. Rośliny te poddano ocenie wrażliwości na porażenie kiłą. Na podstawie przeprowadzonej oceny dla każdego badanego potomstwa obliczano indeks wrażliwości. Fenotypowanie roślin pokolenia F3, przy zastosowaniu 4-stopniowej skali porażenia kiłą kapusty, wykazało rozszczepienie cechy odporności w badanych populacjach. Odnotowano ogółem 3% roślin z korzeniami bez objawów porażenia przez kiłę, 46% roślin o średnim porażeniu korzeni oraz a 51% roślin silnie porażonych. Rośliny bez objawów chorobowych na korzeniach odnotowano u 18 potomstw F3 z częstotliwością 2-20%. Wzorce wrażliwości zachowały się zgodnie z przewidywaniami i były porażone w wysokim stopniu, wzorce odporności wykazywały zróżnicowaną reakcję, od odpornych do średnio wrażliwych.

Dane z fenotypowania posłużą do przypisania wartości cechy odporności roślinom z pokolenia F2,

których próby zabezpieczono wcześniej. Rośliny pokolenia F2 należałoby poddać wysokoprzepustowemu genotypowaniu na skalę genomową. Zestaw tych danych tj. wartość fenotypowa danego genotypu określona w bieżącym roku, oraz genotypowanie na skalę genomową stanowić będzie bazę do mapowania loci cech ilościowych (QTL) (Wu i in. 2008) i tym samym pozwoli uzyskać informację o lokalizacji genetycznych determinant odporności na kiłę kapusty.

Literatura

- Navrátilová, B., Greplová, M., Vyvadilová, M., Klíma, M., Gajdová, J., Skálová, D. (2006). Electrofusion of protoplasts in selected vegetables of *Brassica*, *Cucumis*, and *Solanum* genera. *Acta Horticult* 725: 801–805
- Pelletier, G. (1993). Somatic hybridization. In: Hayward MD, Bosemark NO, Romagosa I (eds), *Plant Breeding*, Chapmanand Hall, London, pp. 93–106
- Wu, Y., Bhat, P. R., Close, T. J., Lonardi, S. (2008). Efficient and accurate construction of genetic linkage maps from the minimum spanning tree of a graph. *PLoS Genet.* 4: e1000212

Otrzymanie nowej zmienności genetycznej warzyw kapustowatych przy wykorzystaniu krzyżowań oddalonych w rodzaju *Brassica*

Development of the new genetic diversity of vegetable brassicas by the use of distant hybridization

Piotr Kamiński ¹✉, Małgorzata Podwyszyńska ¹, Agnieszka Marasek-Ciołakowska ¹, Michał Starzycki ², Elżbieta Starzycka-Korbas ²

¹ Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,

² Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin PIB, Strzeszyńska 36, 60–479 Poznań,

✉ 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.

Słowa kluczowe: *Brassica* sp., krzyżowania oddalone, embryo-rescue, FCM, FISH, cechy morfologiczne

Celem badań prowadzonych w roku 2019 było wytworzenie nowych form mieszańcowych pokolenia BC₁ oraz BC₂ pomiędzy uprawnymi gatunkami oraz genotypami oddalonymi i dzikimi z rodzaju *Brassica oleracea* i *Brassica napus* w wyniku zastosowania techniki hodowli *in vitro* izolowanych zarodków oraz krzyżowań klasycznych, ocena nowo wytworzonych mieszańców pod względem cech anatomicznych, morfologicznych, cytogenetycznych oraz pod względem zdolności do rozmnażania generatywnego, a także ocena przydatności nowych form użytkowych jako źródła cennych gospodarczo cech jakościowych oraz odporności.

W wyniku zastosowania techniki hodowli *in vitro* izolowanych zarodków oraz technik hodowli tradycyjnej wytworzono nowe formy mieszańcowe pokolenia BC₁ oraz BC₂ pomiędzy genotypami oddalonymi i dzikimi oraz uprawnymi *Brassica oleracea*, *Brassica napus* i *Brassica rapa*. W roku 2019 dla trzynastu pokoleń wstecznych oraz wsobnych mieszańców międzygatunkowych *B. oleracea* x *B. napus* wykonano 25 krzyżowań wstecznych na około 600 kwiatach i pąkach kwiatowych następnie dokonano izolacji 17 prawidłowo wykształconych zarodków mieszańcowych oraz przeprowadzono klonowanie *in vitro* oraz *in vivo* (w kulturach hydroponicznych) roślin pokolenia BC₂ oraz BC₁ x F₁ mieszańców międzygatunkowych otrzymując 40 roślin.

Przeprowadzenie adaptacji w kulturach

hydroponicznych pozwoliło na regenerację roślin mieszańców międzygatunkowych i przygotowanie ich do jarowizacji w warunkach szklarniowych. W wyniku swobodnego zapylenia oraz zapyleń wsobnych otrzymano prawidłowo wykształcone nasiona mieszańców międzygatunkowych pokolenia F₁ x BC₁, BC₁ x F₁ x F₂ *B. napus* x *B. oleracea*. Krzyżowania mieszańców międzygatunkowych z liniami wsobnymi kapusty głowiastej metodą hodowli konwencjonalnej w celu uzyskania pokolenia BC₂ było całkowicie nieefektywne.

Mieszańce międzygatunkowe *B. oleracea* x *B. napus* pokolenia BC₁ x F_{1/2} i BC₂ i F₁ x F₂ wykazywały duże zróżnicowanie pod względem wielkości genomu jądrowego. Mieszańce międzygatunkowe *B. napus* x *B. oleracea* pokolenia BC₁ x F_{1/2} i BC₂ i F₁ x F₂ charakteryzowały się wyraźnym zróżnicowaniem cech anatomiczno-morfologicznych zarówno w fazie wegetatywnej jak i generatywnej. Obserwowano zróżnicowaną liczbę chromosomów od 34 do 59 w pokoleniu BC₁ x F_{1/2} i od 28 do 66 w pokoleniu BC₂. Zastosowanie sekwencji rDNA pozwoliło zaobserwować zmienność w liczbie i dystrybucji loci 5S i 35S rDNA oraz identyfikację chromosomów markerowych dla genomu C i A.

Ocena cech anatomiczno-morfologicznych w warunkach polowych wykazała, że genotypy uzyskane w wyniku krzyżowań oddalonych charakteryzowały się szeregiem cech nietypowych dla form uprawnych co mogło być

spowodowane występowaniem cech gatunków dzikich. Zastosowanie w praktyce nowo otrzymanej zmienności genetycznej zależy będzie również mechanizmów dziedziczenia ważnych gospodarczo cech w tym odporności na kiłę kapusty, czerń krzyżowych, choroby bakteryjne i fizjologiczne (Cartea et al. 2011, Dickson 2006, Kaneko et al. 2009). Mieszańce z gatunkami dzikimi oraz pomiędzy bardzo oddalonymi formami charakteryzowały się

dużą liczbą cech typowych dla form dzikich. Nowo otrzymane formy mieszańcowe będą mogły zostać wykorzystane do dalszych krzyżowań wypierających po przeprowadzeniu selekcji i dokładnej oceny ich przydatności.

Oceniane genotypy stanowiły bogaty i zróżnicowany morfologicznie materiał badawczy odzwierciedlający potencjał i możliwości otrzymania nowej zmienności genetycznej roślin kapustowatych.

Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stropy abiotyczne

Identification of regions in the pea genome, responsible for selected parameters of physiological efficiency, as an important element of resistance to abiotic stresses

Wojciech Święcicki ✉, Magdalena Gawłowska, Andrzej Górny, Katarzyna Beczek, Alicja Niewiadomska, Lech Boros

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu,
✉ e-mail: wswi@igr.poznan.pl, tel. 61 6550263, 61 6550255

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.802.2.2019, Zadanie nr 40.

Słowa kluczowe: efektywność wykorzystania azotu 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 stropy abiotyczne i biotyczne. Dlatego szczególnie 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 ładu grochu, ilościowe i jakościowe ulepszenie plonu, zwiększenie efektywności procesu wykorzystania azotu oraz odporność na stropy biotyczne i abiotyczne należą do kluczowych kierunków badań z zakresu postępu biologicznego.

W 2019 doświadczenie szklarniowe i polowe dotyczyło wybranych linii grochu, przebadanych wcześniej pod kątem fluorescencji chlorofilu – 14

linii oraz linie rodzicielskie populacji mapujących: 1. Wt10269 (trad), 2. Astronaute (*afila*), 3. Wt2033 (trad), 4. Starski (*afila*), 5. Wt3805 (trad), 6. Wt11145 (trad), 7. Wt9013 (trad), 8. Wt404 (trad), 9. Wt10270 (*afila*), 10. Wt2815 (trad), 11. Wt12368 (trad), 12. Wt15237 (trad), 13. Tarchalska (*afila*), 14. Mecenias (*afila*), 15. Carneval (*afila*), 16. MP1401 (*afila*), 17. Batuta (*afila*), 18. Hubal (trad) [w warunkach polowych zamiast linii Batuta i Hubal były linie Wt10245 (trad.) i Wt11238 (*accacia*)]. W warunkach obniżonego nawożenia azotowego w szklarni notowano: (a) zbliżony poziom plonowania, efektywności wykorzystania azotu (NER_{g,v}), koncentracji azotu w tkankach roślinnych oraz (b) zwiększoną aktywność nitrogenazy i wzrost ilości związanego N₂. % wiązania azotu i aktywność nitrogenazy były wyższe w warunkach stresowych niż w warunkach kontrolnych.

Średnio, najniższy plon/roślinę zaobserwowano w Przebędowie (ok 1.6 g s.m./rośl.), a najwyższy w Wiatrowie stresowym (ok 2.5 g). Spośród obserwowanych linii wyróżniała się odmiana Tarchalska (ok. 4.0 g) i ród Wt9013 (ok. 3.3g/rośl.). Prawie 3-krotnie niższe (najniższe) plony wykazały: Astronaute i linie Wt404, Wt15237 i Wt2815 (0.9-1.5 g/rośl.; były to rody zwykle o niskich wartościach HI i NHI, a więc ‘z trudem’ transportujące suchą masę i N do nasion).

Stwierdzono istotne korelacje pomiędzy

plonem, a parametrami gospodarki azotowej w warunkach optymalnych w szklarnii, z wyjątkiem efektywności wykorzystania azotu w formowaniu masy vegetatywnej NER_{veg} . Pojawiły się wysokie korelacje pomiędzy ilością pobranego azotu, a efektywnością wykorzystania azotu w formowaniu nasion NER_g ($r=0,71$), plonem, a % związanego azotu ($r=0,90$), aktywnością nitrogenazy, a azotowym indeksem plonu ($r=-0,43$) i z efektywnością wykorzystania azotu w formowaniu masy vegetatywnej NER_{veg} ($r=0,41$). W warunkach niedoboru azotu stwierdzone korelacje były znacznie niższe, z wyjątkiem korelacji plon~NAC ($r=0,94$).

Stwierdzono istotne korelacje ($p<0.01$) pomiędzy plonem z rośliny, a efektywnością wykorzystania azotu w kształtowaniu nasion (NER_{gen}) (Wiatrowo optymalne 0.69, Wiatrowo niskie 0.78, Przebędowo stresowe 0.71). Istotna była również negatywna korelacja pomiędzy plonem z rośliny, a efektywnością wykorzystania azotu w formowaniu masy vegetatywnej (NER_{veg}) (Wiatrowo optymalne -0.42, Wiatrowo niskie -0.76, Przebędowo stresowe -0.61). Zaobserwowano istotne korelacje pomiędzy aktywnością nitrogenazy, a parametrami gospodarki azotowej w warunkach optymalnych (najwyższa korelacja plon i NA 0.54). W warunkach stresowych najwyższa korelacja dotyczyła ilości pobranego azotu i NA -0.29). Zaobserwowano spadek lub wzrost wartości korelacji w zależności od stresogenności środowiska.

Średnie współczynniki tolerancji na stres wybranych linii grochu dla lokalizacji polowych w Wiatrowie i Przebędowie były zbliżone (1.2 Wiatrowo; 1.6 Przebędowo) i wyższe niż średnia współczynniki tolerancji na stres, wyznaczonych w doświadczeniu szklarniowym (1.0). W doświadczeniach polowych w Przebędowie i Wiatrowie linia rodzicielska MP1401 była linią o niższym współczynniku tolerancji w środowisku stresowym (nadmiar Fe, niedobór cynku), natomiast w doświadczeniu szklarniowym wykazywała zbliżony współczynnik tolerancji na stres w porównaniu z linią Carneval. Linia Wt404 (*P. syriacum*) miała wysokie współczynniki tolerancji w warunkach polowych. Podobnie odmiana Astronaute, linia Wt2815 (var. *cimitari*), Wt15237, Wt10269. W warunkach szklarniowych najwyższy współczynnik tolerancji miała odmiana MP1401.

Doświadczenie szklarniowe pozwoliło na wyznaczenie współczynnika tolerancji na niedobór azotu (warunki kontrolowane). Natomiast współczynniki wyznaczone z doświadczeń polowych wskazywały na tolerancję na nadmiar Fe i niedobór cynku. Przebędowo uznano za lokalizację stresową

ze względu na duży nadmiar wapnia i niedobór manganu.

Korelacje dla parametrów fotosyntetycznych w warunkach optymalnych były silniejsze niż w warunkach niedoboru azotu. Pozytywną korelację pomiędzy parametrami fotosyntetycznymi i aktywnością nitrogenazy stwierdzono dla koniczyny (0,8-0,9) i dla lucerny (0,6-0,8) (Niewiadomska 2013). Autorzy uważają, że ATP pochodzące z procesu fotosyntezy w roślinie stanowi źródło energii dla mikrosymbiontów, niezbędnej do wiązania azotu. W badaniach własnych stwierdziliśmy negatywną korelację pomiędzy parametrami intensywności fotosyntezy, a aktywnością nitrogenazy w warunkach kontrolowanych. Najsilniejsze korelacje pomiędzy efektywnością wykorzystania wody na poziomie liści i parametrami fotosyntezy dotyczyły P_n/Tr i C_i – międzykomórkowego (sub-stomatal) stężenia CO_2 (-0.83) oraz zawartości chlorofilu (0.51) w warunkach optymalnych. W warunkach stresowych korelacje zwiększały się.

Dla badanej grupy 15 linii grochu wykonano ocenę zawartości lignin w łodygach roślin pobranych w fazie dojrzałości technologicznej. Średnia zawartość lignin w łodygach roślin badanych linii grochu wynosiła 18,53%. Ocena wylegania I,II, III terminu w wybranym zestawie linii była dodatnio skorelowana z zawartością lignin w łodygach (odpowiednio $r=0,44$, $r=0,50$ i $r=0,60$) co oznacza, że formy o wyższej odporności na wyleganie /wg skali 9-1 COBORU/ charakteryzowały się wyższą zawartością lignin.

Przeanalizowano 6 cech związanych z gospodarką azotową (%Nzia, %Nveg, NAC ilość pobranego azotu/ wazon lub roślinę, NHI azotowy indeks plonu, NER_g efektywność wykorzystania azotu w formowaniu masy nasion, NER_v efektywność wykorzystania azotu w formowaniu masy vegetatywnej). Dane pochodziły z doświadczenia z 2018 roku ze stresowych warunków polowych (większa liczba obiektów), w populacji mapującej [Wt10245×Wt11238]. Zidentyfikowano 21 loci. Do analizy w liniach grochu wybrano markery bliskosprężone, zdefiniowane sekwencyjnie, lub SSR, wyznaczone we wszystkich poprzednich analizach. Były to markery powtarzalne i stosunkowo łatwe w analizie. Wybrano 9 markerów: AA473 (II), P628 (IV), mt_Est_3378 (VB), PisCam394 (VB), AD21 (IIIC), PsGAPA, dCAPS PisGen57 (IIIB), MTIC451 (I), Mtic16 (IIIB). Przeanalizowano zgodność układu alleli oraz wartości cech, związanych z gospodarką azotową, z warunków polowych i szklarniowych oraz warunków optymalnych i stresowych. Największą zgodność

zaobserwowano dla układu: szklarnia, warunki niedoboru azotu, aktywność nitrogenazy, marker dCAPSis Gen57 oraz warunki polowe, optymalne, zawartość azotu w nasionach, marker AD21.

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


Niewiadomska, A. (2013). Ocena wpływu nawozu PRP SOL i koinokulacji bakteriami na proces diazotrofii, aktywność biologiczną i właściwości fizykochemiczne gleby oraz kondycję i plon koniczyny i lucerny. Poznań. Wydawnictwo Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu: 106.

Gaj, R. (red.) (2013). Efektywne wykorzystanie składników mineralnych z nawozów we współczesnym rolnictwie. Centrum Doradztwa Rolniczego w Brwinowie, Oddział w Poznaniu.

Analiza bioróżnorodności zasobów genowych soi przydatnej do hodowli w warunkach klimatycznych Polski i opracowanie metodyki krzyżowania międzygatunkowego *Glycine max* x *Glycine soja*

Analysis of biodiversity of soybean gene resources useful for breeding in climatic conditions of Poland and development of interspecific *Glycine max* x *Glycine soja* crossing methodology

Jerzy Nawracała , Danuta Kurasiak-Popowska, Agnieszka Katańska-Kaczmarek

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań,
 e-mail: jerzy.nawracała@up.poznan.pl, tel. 61 8487720

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.802.9.2019. Zadanie nr 43.

Słowa kluczowe: banki genów, *Glycine max*, *Glycine soja*, kolekcje, krzyżowanie międzygatunkowe, materiały wyjściowe

W ramach projektu były realizowane 2 tematy badawcze z następującymi celami:

1. Celem 1 tematu badawczego 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 latach 2015 - 2017.
2. Celem 2 tematu badawczego było przeprowadzenie obserwacji kwitnienia wybranych genotypów *G. soja* w warunkach polowych oraz ocena zmienności roślin pokolenia F₄ otrzymanych z roślin pokolenia F₃ mieszańców międzygatunkowych *G. max* x *G. soja*.

Materiałem do badań było w 2019 r. łącznie 280 genotypów soi zgromadzonych w KG i HR w latach 2015 – 2018 otrzymanych głównie z banków genów i kolekcji z USA, Kanady, Japonii, Rosji oraz z zasobów różnych państw europejskich.

Rok 2019 charakteryzował się nietypowym przebiegiem warunków pogodowych. Suchy kwiecień, chłodny maj i ekstremalne upały w czerwcu (średnia temperatura o 6,9°C wyższa niż z wielolecia, opady 6,2 mm). W doświadczeniach przeprowadzonych w RGD Dłoń i w Szelejewie obserwowano olbrzymie zróżnicowanie

długości okresu wegetacji od 111 do 188 dni (koniec października). Pomimo wysokich w temperatur jednak niektóre genotypy, szczególnie te pochodzące z Japonii i Chin wydłużyły długość okresu wegetacji z powodu ich reakcji fotoperiodycznej. Obserwowano również olbrzymie zróżnicowanie pod względem cech morfologicznych i cech komponentów plonu. Wśród zgromadzonych materiałów kolecyjnych zidentyfikowano genotypy mające korzystne, z punktu widzenia hodowli w Polsce, cechy jak wysoko osadzony I strąk, dużą liczbę pędów bocznych, dużą liczbę zawiązanych strąków i nasion, dużą MTN.

Ocena potencjału plonowania genotypów najlepszych w poprzednich latach przeprowadzono w doświadczeniach na poletkach o powierzchni 9 m², w 3 powtórzeniach. W doświadczeniu czwartym pięć genotypów plonowało wyżej od odmian kontrolnych (16,1 dt/ha) W doświadczeniu piątym najwyższe plony wynoszące 15 dt/ha zebrano z 2 genotypów i odmiany kontrolnej Aligator. Niskie plony były spowodowane drastycznym niedoborem opadów i wysokimi temperaturami.

W ramach drugiego tematu badawczego siew genotypów *G. soja* przeprowadzono w warunkach polowych 18.04, 14.05 i 10.06. W porównaniu do 2018 r. wszystkie genotypy skróciły długość okresu kwitnienia. Rośliny genotypów *G. soja*, których koniec kwitnienia jest trudno

ustalić z powodu ich niezdeterminowanego typu wzrostu, kwitły niezależnie od terminu siewu od 18 do 20 dni. Wysokie temperatury spowodowały również skrócenie okresu wegetacji. Niestety z powodu wystąpienia bardzo niekorzystnych warunków pogodowych (wysokie temperatury i susza) również w tym roku próby przekrzyżowania gatunków *G. max* i *G. soja* zakończyły się niepowodzeniem.

Wysiane w 2019 r. potomstwa roślin pokolenia F_4 oceniane w doświadczeniu pochodziły z dwóch kombinacji krzyżowania międzygatunkowego *G. max* x *G. soja*. W RGD Dłóż wysiano 200 potomstw. Wschody roślin były zróżnicowane w wyniku suchego kwietnia i niskich temperatur w maju. Obserwacje wykazały, że zdecydowana większość roślin charakteryzowała się pokrojem dzikiego gatunku *G. soja*. W obydwu kombinacjach krzyżowania Annushka x PI507825 i Mavka x PI507825 obserwowano w dalszym ciągu w obrębie potomstw silną segregację pod względem wszystkich obserwowanych cech. Łącznie wybrano 390 roślin: 50 z pierwszej i 340 z drugiej kombinacji. Najwcześniej zbierano rośliny z kombinacji Mavka x PI507825 – od 20 sierpnia do końca października. Mieszance z kombinacji Annushka x PI507825 charakteryzowały się dłuższym okresem wegetacji – pierwsze rośliny dojrzewały 17 września. Z punktu widzenia przydatności roślin do hodowli korzystniejsze były rośliny wybrane z kombinacji Mavka x PI507825, ponieważ w tej kombinacji krzyżowania było więcej roślin o morfotypie *G. max*, charakteryzujących się dużą liczbą strąków i nasion (średnio 252,2 strąka i 404,4 nasion). Wyselekcjonowano również 24 rośliny, których nasiona miały MTN powyżej 200 g.

Wnioski

- W trzech doświadczeniach oceniono 280 genotypów charakteryzujących się zróżnicowanym pochodzeniem i stwierdzono, że różniły się one znacznie pod względem przebiegu kwitnienia, długości okresu wegetacji oraz analizowanych cech komponentów plonu. Charakterystyka cech morfologicznych i komponentów plonu wykazała, że można wyselekcjonować genotypy o korzystnych cechach pod względem


wysokości roślin, wysokości osadzenia pierwszego strąka, liczby pędów bocznych, liczby nasion w strąku i MTN.

- Duża liczba genotypów otrzymanych z zagranicznych banków genów i kolekcji charakteryzowała się pomimo wysokich temperatur długim okresem wegetacji. Wydłużenie wegetacji było wynikiem reakcji fotoperiodycznej na warunki długiego dnia.
- Plony wybranych genotypów w doświadczeniu 4 i 5 były w 2019 r. bardzo niskie z powodu drastycznego niedoboru opadów oraz wysokich w temperatur w czerwcu. W doświadczeniu 4 pięć genotypów miało plony wyższe (20,0 dt/ha) od odmian wzorcowych (16,1 dt/ha). W doświadczeniu 5 plony były niższe i tylko 2 genotypy miały taka sama wysokość plonu (15,0 dt/ha) jak odmiana Aligator.
- Powtarzające się w ostatnich latach wysokie temperatury powietrza oraz susza może umożliwić wyselekcjonowanie genotypów w większym stopniu tolerancyjnych na suszę.
- Przyjęte 3 terminu siewu *G. soja*: kwiecień, maj i czerwiec nie zapewniły podaży kwiatów do krzyżowania. Spowodowane to było głównie wysokimi temperaturami w głównym okresie kwitnienia soi (czerwiec).
- W potomstwach roślin mieszańcowych pokolenia F_4 otrzymanych w wyniku krzyżowania *G. max* x *G. soja* obserwowano silną segregację pod względem wszystkich obserwowanych cech. Wśród roślin z obydwu kombinacji krzyżowania wybrano 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 x PI507825, może stanowić cenny materiał wyjściowy do dalszej hodowli.
- Bardzo dużą liczbę strąków i nasion zebranych z roślin pokolenia F_4 może świadczyć o przeniesieniu z dzikiego rodzica cech lepszej odporności na niekorzystne warunki środowiskowe charakterystycznej dla gatunku *G. soja*.

Identyfikacja układów allelicznych genów fotoneutralności i wczesności oraz opracowanie metodyki otrzymywania roślin homozygotycznych u soi

Identification of alleles arrangement of photoneutrality and earliness genes and developing method of obtaining soybean homozygous plants

Jerzy Nawracała , Danuta Kurasiak-Popowska, Janetta Niemann, Agnieszka Tomkowiak, Dorota Weigt, Bogdan Wolko, Michał Książkiewicz, Sandra Rychel, Agnieszka Katańska-Kaczmarek

Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, Katedra Genetyki i Hodowli Roślin,
ul. Dojazd 11, 60-632 Poznań,
 e-mail: jerzy.nawracała@up.poznan.pl, tel. 61 8487720

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.802.9.2019. Zadanie nr 105.

Słowa kluczowe: geny wczesności, markery molekularne, soja, SSD

W ramach projektu były realizowane 3 tematy badawcze z następującymi celami:

- Celem 1 tematu było określenie składu allelicznego materiałów kolekcyjnych soi w obrębie dwóch genów zdeterminowania wzrostu oraz siedmiu genów wczesności kwitnienia.
- Celem tematu 2 było przeprowadzenie obserwacji fenotypowych (terminu kwitnienia i dojrzewania) 150 genotypów kolekcyjnych i referencyjnych soi w warunkach polowych.
- Celem doświadczenia szklarniowego było otrzymanie 2 pokoleń soi w jednym roku.

Materiałem do badań było 150 genotypów wybranych z kolekcji Katedry Genetyki i Hodowli Roślin w tym genotypy referencyjne. Analizy molekularne były przeprowadzane w dwóch laboratoriach – w IGR i w KG i HR. Na podstawie danych literaturowych wybrano startery do reakcji PCR amplifikujące markery na znane geny wczesności kwitnienia (*E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7*, *E9*, *E10*) i zdeterminowania wzrostu (*Dt1* i *Dt2*). Analizę zakończono dla 26 markerów (23 markerów z zestawu podstawowego i 3 markerów dodatkowych). Zastosowane markery pozwoliły na ocenę składu allelicznego dla wszystkich badanych genów. W puli badanych

150 genotypów stwierdzono występowanie allela dominującego *E1* (26-29 linii) oraz następujących alleli recesywnych: *e1-nl* (55-56 linii), *e1-as* (59-61 linii), *e1-fs* (2-3 linie) oraz kombinacji *e1-as/e1-nl* (4-5 linii). Przeprowadzone badania upoważniają do stwierdzenia, że w puli badanych genotypów występuje duże zróżnicowanie kombinacji allelicznych genów wczesności (*E1*, *E2*, *E3*, *E4* i przypuszczalnie *E7*) oraz genów zdeterminowania wzrostu *Dt1*

W doświadczeniu polowym obserwowano wszystkie 150 genotypów, które były analizowane molekularnie. Doświadczenie zostało założone 24.04.2019 r. na polu doświadczalnym KG i HR w Rolniczym Gospodarstwie Doświadczalnym Dłóż. Rozstaw rzędów 50 cm, wielkość poletka 2 m². W 2019 r. temperatury, za wyjątkiem miesiąca maja, były o kilka stopni wyższe w porównaniu z temperaturą z wielolecia. Opady w miesiącach kwiecień oraz czerwiec-sierpień były znacznie niższe od średniej z wielolecia z drastycznym brakiem opadów w czerwcu (6, 2 mm). Najwcześniejsze genotypy zakwitły na początku czerwca po 50 dniach, a najpóźniejsze po 109 dnia od siewu. Najszybciej, zgodnie z oczekiwaniami, dojrzewały te genotypy referencyjne, które miały układ 4 alleli recesywnych (Fiskeby V, Bravalla, Nawiko.). Do końca sierpnia dojrzały 23 genotypy, które z nielicznymi wyjątkami

miały również allele recesywne 4 głównych genów wczesności *e1-e4* oraz allel recesywny genu *e7*. Najpóźniej z odmian referencyjnych dojrzewały odmiany Corsoy i Harosoy należące do II grupy dojrzałości (MG), które w układzie alleli 4 głównych genów wczesności (*E1 – E4*) miały allele dominujące *E2* i *E4*, a odmiana Corsoy dodatkowo allel dominujący *E7*. W całym doświadczeniu najpóźniej dojrzały genotypy L64-4584, Williams82, Hakka Zashi i Imnertinskaja, które zbierane były 30 października po 188 dniach od siewu. Tylko ostatnia odmiana miała 4 allele dominujące *E1 – E4*, a genotyp L64-4584 3 allele *E2 – E4*. Podobnie długi okres wegetacji – 180 dni miała odmiana Athow, u której również zidentyfikowano układ alleli dominujących *E2 – E4*. W doświadczeniu było ocenianych 150 genotypów wybranych pod kątem zróżnicowania w terminie dojrzewania i z punktu widzenia dalszych analiz molekularnych genów wczesności i determinacji wzrostu pędu, dlatego też obserwowano olbrzymie zróżnicowanie pod względem wszystkich cech morfologicznych i cech komponentów plonu

W doświadczeniu z metodą SSD w 2019 r. materiałem do doświadczenia były 2 pokolenia mieszańcowe soi (F_5 i F_6): 2 kombinacje krzyżowania międzyodmianowego soi otrzymane w Danko Hodowla Roślin Sp. z o. o. i 2 kombinacje krzyżowania międzygatunkowego *G. max* x *G. soja* otrzymane w KG i HR. Założono łącznie 4 doświadczenia. W doświadczeniach badano wpływ 3 obsad roślin na 1 m² na zawiązanie strąków i nasion: 156 roślin/m², 363 roślin/m² i 630 roślin/m². Podobnie jak w 2018 r. obserwowano wyraźną tendencję do zmniejszania się liczby strąków i nasion z rośliny jak również średniej liczby nasion w strąku wraz ze zwiększaniem się obsady roślin. Różnica w liczbie średniej liczby nasion z rośliny była bardzo duża: np. w Szelejewie w obsadzie 156 roślin/m² rośliny zawiązały w zależności od kombinacji krzyżowania 17,3 i 19,8 nasion, a w obsadzie 630 roślin/ m² tylko 3,6 i 5,1 nasion. Jest to wystarczająca liczba nasion do prowadzenia hodowli metodą SSD.

Wnioski

1. W puli badanych linii soi (150 genotypów) istnieje znaczne zróżnicowanie składu allelicznego genów *E1*, *E2*, *E3*, *E4*, *E7* i *Dt1*, które umożliwia prowadzenie prac w kierunku rozpoznania optymalnych kompozycji allelicznych warunkujących adaptację soi do występujących w Polsce warunków klimatycznych.
2. 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 ocenianych genotypów była zróżnicowana (124 – 188 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.
3. 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 kilku nasion, co jest wystarczającą liczbą nasion dla metody pojedynczych nasion. Odnotowanie jednak w przypadku największej obsady roślin, które nie zawiązały strąków wskazuje, że jest to największa możliwa odsada roślin w tych warunkach.
4. W warunkach szklarniowych zarówno w KG i HR jak i w Szelejewie można otrzymać dwa pokolenia soi w jednym roku i w rezultacie skrócić o dwa lata czas otrzymywania linii homozygotycznych soi.
5. Zastosowanie metody SSD do przyspieszenia otrzymania pokoleń soi w przypadku kombinacji krzyżowania międzygatunkowego *G. max* x *G. soja* może być utrudnione z powodu bardzo dużego zróżnicowania roślin pod względem wysokości roślin, typu wzrostu (niezdeternowany) i długości okresu wegetacji.

Badania nad gametyczną embriogenezą u *Lupinus angustifolius* L. - indukcja haploidów i analiza genetycznego podłoża tego procesu

Research on gametic embryogenesis in *Lupinus angustifolius* L. - haploid induction and analysis of the genetic basis of this process

Renata Galek ¹✉, Bartosz Kozak ¹, Dariusz Zalewski ¹, Ewa Sawicka-Sienkiewicz ¹, Adela Adamus ², Agnieszka Kiełkowska ²

¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa,

²Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa,

✉ e-mail: renata.galek@upwr.edu.pl, tel. 713201815 lub 713201826

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.802.10.2019, Zadanie nr 108.

Słowa kluczowe: androgeneza, gynogeneza, haploidy, identyfikacja haploidów, krzyżowanie oddalone, łubin wąskolistny

Cel badań

Realizacja projektu w drugim roku badań - 2019 została podzielona na dwie części, których celami zasadniczymi były:

I część

- analiza wpływu pyłku obcego gatunku na rozwój woreczka zalążkowego w układzie krzyżowania *L. angustifolius* x *L. mutabilis*
- optymalizacja pożywek dla wybranych dwóch genotypów *L. angustifolius* – krzyżowanie oddalone, gynogeneza

II część

- charakterystyka kultur mikrospor po zastosowaniu enzymatycznego traktowania mikrospor oraz stresu chłodu
- ocena histologiczna kalusa otrzymanego z kultur mikrospor
- analiza genów ulegających ekspresji w tkance kalusa z kultur mikrospor

Opis wyników

I część

W pierwszej kolejności przeanalizowano stan rozwojowy zalążków dla dwóch genotypów łubinu wąskolistnego stanowiących kontrolę, gdzie punktem odniesienia była wielkość pylników w stosunku do słupka wraz ze znamieniem: pylniki osiągające 1/2 i 3/4 długości słupka oraz pylniki

rozwinęte powyżej znamienia słupka. Stwierdzono, że zalążki pobrane w pierwszym z wymienionych terminów nie miały zróżnicowanych komórek macierzystych makrospory, aczkolwiek obserwowano już zarys woreczka zalążkowego. Przy pobraniu zalążków przy 3/4 długości pylników w stosunku do słupka obserwowano od jedno do kilkukomórkowego woreczka zalążkowego. W pełni kwitnienia po przerośnięciu przez pylniki znamion obserwowano wykształcony aparat jajowy, także proces kariogamii i powstanie zygoty. Dodatkowo przeanalizowano preparaty z zalążków pobranych po 4-7 dniach od samozapylania oraz 21. Obserwowano rozwój kilkukomórkowych prozarodków, a po dwóch tygodniach zarodki osiągnęły stadium kuliste z widocznym suspensorem. W przypadku analizowanych preparatów wykonanych z zalążków po przepaleniu *L. angustifolius* (Karo i Grań) x *L. mutabilis* LM. 13 po nie stwierdzono na żadnym z analizowanych preparatów dla dwóch genotypów łubinu wąskolistnego procesu kariogamii, tylko obecność pojedynczych komórek po 48 h od przepylania pyłkiem *L. mutabilis*. Po 96 h można było zaobserwować kilkukomórkowe struktury o dużych jadrach komórkowych czy po 168 h kilkunastokomórkowe nie przypominające zarodków zygotycznych. Ich położenie może wskazywać, że mamy do czynienia z partenogenezą. Po tym czasie widoczne też były degenerujące woreczki zalążkowe w zalążku.

Zarówno materiał biologiczny w postaci kalusa wyprowadzony na drodze krzyżowania oddalonego jak i gynogenezy wymaga szeregu pasażu, niewykluczone że bardzo częstych. W obu technikach podjęcie rozwoju tkanki kalusowej miało miejsce do dwóch tygodni, w kolejnych obserwacjach prowadzonych co tydzień kolejnych załączków ze zmianami nie przybywało. Procent indukcji zmian dla trzech genotypów nie przekroczył 35% po zastosowaniu pożywki B5 z różnymi kombinacjami regulatorów wzrostu (2,4 D i lub kinetyna, B5 kontrola – łącznie 5 podłoży). Generalnie pożywka bez regulatorów wzrostu w początkowych etapach – do dwóch tygodni dała najlepsze rezultaty w przypadku krzyżowania oddalonego. W dwóch technikach indukcji haploidów generalnie odmiany Emir, Graf i Karo okazały się podatne na warunki kultury a LAE nie. Dobór regulatorów wzrostu w pożywce B5 jest kluczowy, a także kolejnych podtrzymujących rozwój eksplantatów. Bardzo ważną rolę w opracowaniu dalszych etapów regeneracji będzie uchwycenie czasu pasażu. Biorąc pod uwagę otrzymane wyniki konieczne jest prowadzenie materiału pulsacyjnie, tzn. nie tylko zmieniając stężenia i rodzaje regulatorów wzrostu, ale też zastosowanie pożywki bez regulatorów. Zmiany częste podłoży są konieczne, ponieważ zaobserwowano szybkie przechodzenie komórek na szlak apoptozy i nie zawsze daje się ten proces zahamować czy całkowicie odwrócić. W bieżącym roku udało się ustabilizować tkanki kalusowe dla odmiany Emir. Uzyskano też znaczny postęp dla kultur załączków (gynogeneza) w stosunku do ubiegłego roku. W przypadku krzyżowania oddalonego otrzymano w tym roku dwa typy kalusa – obydwie wyraźnie wydostające się ze środka załączka.

II część

Dane literaturowe dotyczące prób uzyskania haploidów u łubinu wskazywały, że jedną z przyczyn trudności w indukcji androgenyzy może być bardzo gruba egzyna, uniemożliwiająca dalszy rozwój mikrospory. W bieżącym roku przeprowadzono wstępne badanie dotyczące osłabienia egzyny mikrospor poprzez trawienie enzymatyczne. Wyniki wskazały, że zastosowane mieszaniny enzymatyczne w znacznym stopniu wpłynęły na zwiększenie liczby komórek splazmolizowanych (ok. 50%), w porównaniu z kontrolą (30%). W tym doświadczeniu odnotowano nieliczne podziały komórkowe głównie w kontroli, ale także oraz po zastosowaniu mieszaniny ESPP4 o bogatszym składzie enzymatycznym. Odnotowano bardzo niski odsetek żywotnych mikrospor (poniżej 10%) nie

tylko po zastosowaniu badanych mieszanin enzymatycznych, ale również i w kontroli. W dalszej części badania były skoncentrowane na analizie wpływu składu pożywki oraz temperatury na indukcję androgenyzy u 2 odmian łubinu. Zastosowano długotrwały szok termiczny (4°C/14 dni). Kontrolą była kultura prowadzona cały czas w stałej temperaturze 26°C. Obserwacje kultury wskazały, że większość mikrospor, niezależnie od zastosowanego szoku termicznego oraz pożywki nie wykazywała zmian morfologicznych nawet do 28 dnia kultury. Literatura z zakresu haploidyacji roślin jasno wskazuje, że w prawidłowej kulturze, w tym czasie obserwuje się już występowanie wielokomórkowych agregatów, czego w niniejszym doświadczeniu praktycznie nie obserwowano. Odnotowano pojedyncze podziały komórkowe, jednak były one w większości zatrzymane na pierwszej lub drugiej mitozie i nie postępowały dalej. W tym doświadczeniu testowano również wpływ zróżnicowanych pożywek na rozwój mikrospor. W niniejszych badaniach zastosowanie 0,1 μM trichostatyny nie przyniosło pożądanego efektu. Podziały odnotowano najliczniej (0,9%) na pożywce 190/2 w kulturze mikrospor prowadzonej w stałej temperaturze 26°C. Pożywka ta zawierała kinetynę i 2,4-D. Tylko w jednym przypadku, u odmiany Karo prowadzonej na pożywce 190/2 w 26°C, podziały komórkowe były niezahamowane i obserwowano wytworzenie agregatu komórkowego. Analiza żywotności mikrospor potwierdziła obserwacje z pierwszego doświadczenia, i wykazała bardzo niską żywotność mikrospor w kulturze nieprzekraczającą 14% w pierwszej dobie kultury, a wynoszącą poniżej 7% w siódmej dobie kultury.

Powyższe wyniki wskazują na potrzebę optymalizacji składu mieszaniny pod kątem osmotikum roztworu tak, aby zminimalizować plazmolizę mikrospor oraz zbadanie przyczyny tak niskiej żywotności mikrospor. Potencjalną przyczyną niskiej żywotności może być stres związany z odkażaniem materiału oraz samym procesem izolacji komórek lub specyficzne wymagania co do pożywki, która ma indukować androgenezę w mikrosporach gatunków z rodzaju *Lupinus*. Traktowanie mikrospor niską temperaturą najprawdopodobniej nie wpływa negatywnie na żywotność, gdyż jak pokazały nasze wyniki, spadek ten obserwowano również w nietraktowanej szokiem termicznym kontroli.

W bieżącym roku przeprowadzono również analizę histologiczną tkanki kalusowej uzyskanej z doświadczenia w roku 2018. Wyniki ujawniły różnice na poziomie morfologii komórek oraz

elementów wiązek przewodzących między kalusem żywym i zamierającym.

Otrzymane wyniki potwierdzają doniesienia literaturowe, że indukcja androgenezy u łubinu wąskolistnego w kulturach mikrospor jest niezwykle trudna. Problem ten nie dotyczy jednak tylko tego gatunku, ale całej rodziny. Pomimo licznych prób, wyniki wskazują na otrzymanie pojedynczych agregatów lub prozarodków u gatunków z rodziny *Fabaceae*.

Uzyskane RNA z kalusa otrzymanego z mikrospor oraz roślin 'Graf' prowadzonych *in vitro* posłużyło do utworzenia bibliotek, które zostały zsekwencjonowane. Dla każdej biblioteki uzyskano 34 - 35 mln odczytów i 5,2 - 5,3 Gbp odczytanych zasad. Wykonana analiza porównawcza ekspresji pozwoliła na wskazanie 407 genów z istotną statystycznie ($FDR < 0,01$) zmianą ekspresji (2x lub więcej up i down) w tkance kalusa z indukowanych mikrospor oraz w tkance kalusa uzyskanej metodami klasycznymi. W badanym materiale stwierdzono różnicę w ekspresji między badanymi próbkami dla ortologu genu LEC1. Dla kilku kluczowych genów (BBM, LEC2, FUSCA3, ABI3, AS1)

z szlaku morfo i embriogenezy nie stwierdzono ekspresji w badanym materiale. Profil ekspresji genów w kalusie z mikrospor i kalusie kontrolnym oceniony na podstawie współczynników korelacji Pearsona był bardzo podobny (wartości powyżej 0.97).

Uzyskane wyniki wskazują, iż konieczne jest dokładniejsze zbadanie w kilku punktach czasowych kalusa uzyskanego z mikrospor jak również kalusa pochodzącego z krzyżowania oddalonego. We wczesnym etapie kalus ten nie wykazuje istotnych różnic w stosunku do kalusa kontrolnego. Możemy zaobserwować w nim ekspresję genów inicjujących organogenezę np. genów STM, ANT, AS1, KAN2 na poziomie zbliżonym do kalusa kontrolnego. W następnym etapie powinna zostać także zbadana dynamika zmian ekspresji genów związanych z embriogenezą takich genów jak LEC1, BBM, AS1, KAN2 w czasie proliferacji kalusa z mikrospor oraz kalusa powstałego w wyniku krzyżowania oddalonego. Analizy takie powinny pomóc we wskazaniu punktu czasowego, w którym ekspresja zaczyna spadać i mechanizmy komórkowe uruchamiają procesy związane z śmiercią komórkową.

Cecha wczesności kwitnienia u łąbinu białego i łąbinu żółtego – podstawy genetyczne i molekularne

Early flowering traits of white lupin and yellow lupin – genetic and molecular backgrounds

Michał Książkiewicz ✉, Piotr Plewiński, Sandra Rychel-Bielska, Magdalena Tomaszewska, Wojciech Bielski, Bogdan Wolko

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu,
✉ e-mail: mksi@igr.poznan.pl, tel. 61 6550268

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministerstwa Rolnictwa i Rozwoju Wsi, nr HOR/hn-801–8/14, Zadanie nr 39.

Słowa kluczowe: fenotypowanie, mapowanie genetyczne, sekwencjonowanie DNA, sekwencjonowanie RNA, termin kwitnienia, wernalizacja

Realizację zadania podzielono na cztery tematy badawcze.

Cel tematu badawczego 1

Otrzymanie linii pokolenia F_5 z krzyżówek łąbinu żółtego ♀PRH444/14 × ♂Parys i ♀Parys × ♂PRH444/14 oraz poznanie wymagań wernalizacyjnych wybranych linii z kolekcji łąbinu żółtego.

W stacji Hodowli Roślin Smolice, Oddział w Przebędowie, wysiano nasiona z pokolenia F_4 obu wariantów populacji mapującej łąbinu żółtego. Uzyskano plon z 200 linii z każdej kombinacji krzyżówkowej. Po ręcznej obróbce strąków uzyskano nasiona w liczbie wystarczającej (z rezerwą dodatkowych 200 linii na ewentualne powtórzenia) do kontynuacji prac w następnych latach.

Doświadczenie ukierunkowane na ocenę terminu kwitnienia zostało założone w warunkach szklarniowych (z wernalizacją i bez wernalizacji). Badano 108 linii łąbinu żółtego otrzymanych ze światowej kolekcji oraz linii rodzicielskich dwóch populacji mapujących łąbinu żółtego: polskich (PRH444/14 i Parys) i australijskich (Wodjil i P28213). W wariancie bez wernalizacji 112 linii osiągnęło fazę wiązania pąków oraz początek kwitnienia, 106 linii koniec kwitnienia, a 97 linii fazę dojrzałości (zbioru nasion). W wariancie z wernalizacją 111 linii osiągnęło fazę wiązania pąków oraz początek kwitnienia, zaś 110 linii koniec kwitnienia i fazę dojrzałości (zbioru nasion). Innymi słowy, bez wernalizacji 87% badanych linii wydało plon nasion, zaś

z wernalizacją – 98%. Przy braku wernalizacji rośliny potrzebowały średnio ~63 dni do zawiązania pąków (min. ~42/max. ~83), ~70 dni do początku kwitnienia (min. ~50/max. ~91), ~82 dni do zakończenia kwitnienia (min. ~64/max. ~98) i ~119 dni do dojrzałości strąków (min. ~105/max. ~121). Przy zastosowaniu wernalizacji terminy te były krótsze o 2–24 dni (Rys. 1). Zaobserwowano, że linie wczesne cechowały się relatywnie niewielką odpowiedzią na wernalizację w postaci przyspieszenia kwitnienia o maksymalnie 10 dni (Rys. 2).

Wnioski z realizacji tematu badawczego 1

- Cecha wczesności kwitnienia łąbinu żółtego jest cechą ilościową, warunkowaną przez kilka niesprzężonych ze sobą genów.
- Linie rodzicielskie populacji mapujących łąbinu żółtego istotnie różnią się terminem kwitnienia i wymaganiami wernalizacyjnymi, co umożliwi mapowanie cech ilościowych.

Cel tematu badawczego 2

Uzyskanie zestawu markerów polimorficznych różnicujących linie rodzicielskie dwóch populacji mapujących w obrębie sekwencji homologów genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia oraz poznanie segregacji tych markerów w liniach wsobnych populacji mapującej Wodjil × P28213.

Prace prowadzone w ramach zadania

w latach 2017–2018 doprowadziły do opracowania 10 markerów dla populacji PRH444/14×Parys oraz 23 markerów dla populacji Wodjil×P28213. W 2019 roku generowano markery m.in. dla genów *SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1 (SOC1)* i *FLOWERING LOCUS D (FLD)*, wykazujących zróżnicowany profil ekspresji i cechujących się silną odpowiedzią na wernalizację. Zaprojektowano 78 par starterów na geny z grupy *FLOWERING LOCUS T (FT)* i 19 par na geny *FLD* i *SOC1*. Izolację DNA wykonano przy użyciu zestawu DNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). Amplifikację PCR prowadzono przy użyciu polimerazy GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase (Promega). Specyficzne produkty PCR uzyskano dla 77 par, a sekwencjonowanie wykonano dla 40. Zidentyfikowano loci polimorficzne pomiędzy liniami rodzicielskimi obu populacji mapujących dla genów *FT* oraz *SOC1*, a także loci polimorficzne pomiędzy liniami Parys i PRH444/14 dla genu *FLD*. Pomiedzy linią dziką P28213, a udomowioną Wodjil 33% produktów było polimorficznych. Polimorfizm między PRH444/14 a Parysem był niższy (25%). Segregację w populacji mapującej odczytano dla 12 markerów. Dla 8 markerów segregacja była zgodna z oczekiwaną (test Chi², p-value 1E-05) (Rys. 3). Odchylenie segregacji wystąpiło dla 4 markerów i wynikało z heterozygotyczności dzięki linii rodzicielskiej (Rys. 4). Wszystkie markery rozlokowano w grupach sprzężeń, przy czym wartości LOD dla markerów z segregacją prawidłową wyniosły 16.9–28.3, zaś dla markerów z segregacją odchylną: 4.0–6.6. Dwa markery zmapowano w dwóch głównych loci warunkujących wczesność kwitnienia.

Wnioski z realizacji tematu badawczego 2

- Obserwowany poziom polimorfizmu między liniami wczesnymi a późnymi łubinu żółtego jest zbliżony do tego, który występuje u łubinu wąskolistnego i białego.
- Cecha wczesności kwitnienia łubinu żółtego jest warunkowana przez co najmniej dwa geny zlokalizowane w dwóch głównych loci QTL.
- Uzyskanie dalszego postępu w badaniach genetycznych podstaw wczesności kwitnienia łubinu żółtego będzie możliwe przy wykorzystaniu populacji mapującej PRH444/14 × Parys, ponieważ linia PRH444/14 jest

najwcześniejszą aktualnie znaną linią łubinu żółtego, wykazującą stabilny fenotyp w zakresie trzech lat doświadczeń.

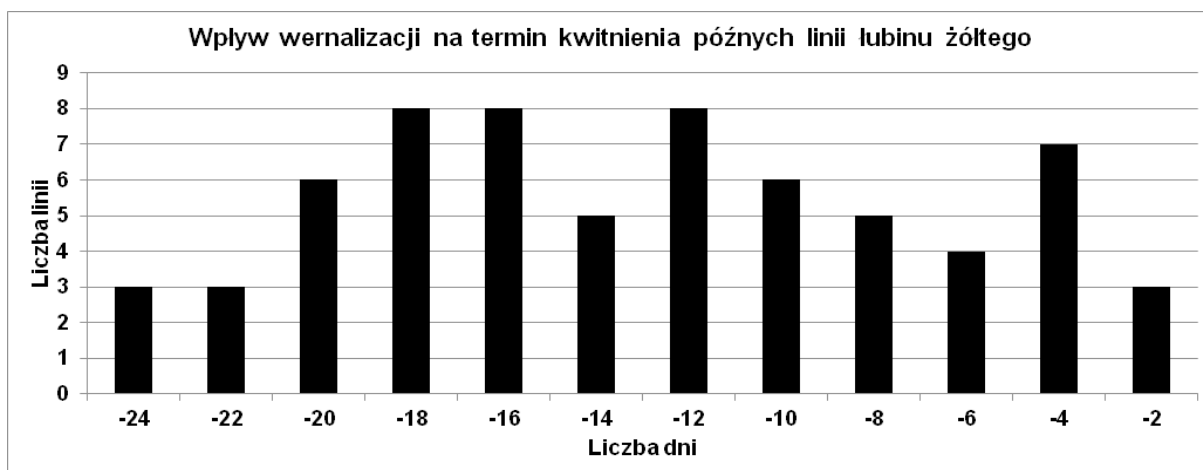
Cel tematu badawczego 3

Poznanie profilu ekspresji genów uczestniczących w procesie indukcji kwitnienia w liniach rodzicielskich dwóch populacji mapujących w odpowiedzi na wernalizację.

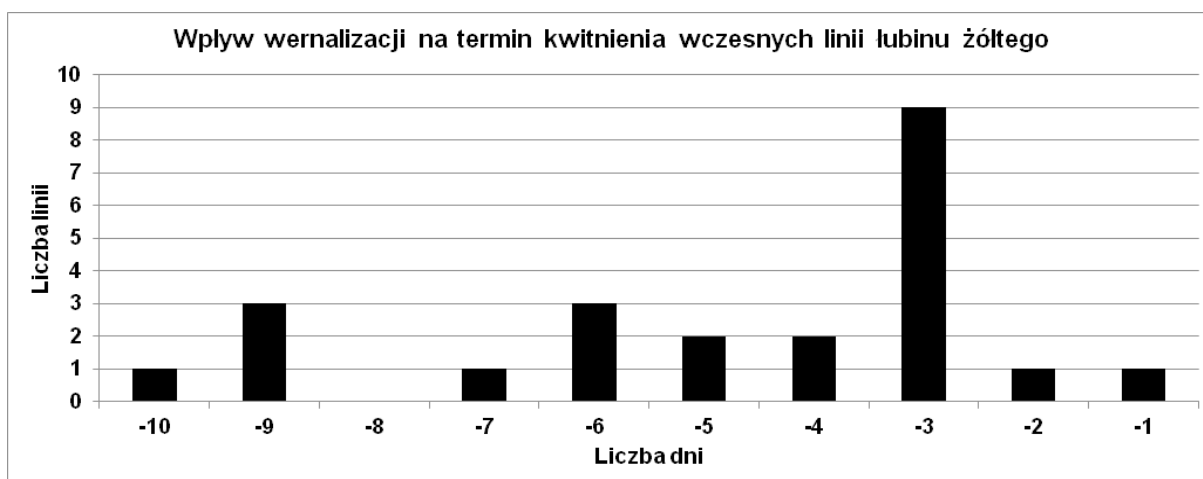
Doświadczenie zostało założone w warunkach kontrolowanych w Centrum Uprawy Roślin IGR (z wernalizacją i bez wernalizacji). Nasiona roślin niewernalizowanych były wysiane 4 dni wcześniej, aby zapewnić podobną liczbę stopni. Materiał roślinny zebrany był co tydzień. Badano ekspresję czterech genów *FT* i genu referencyjnego (*DRH1*) wybranego na podstawie analizy wyników sekwencjonowania transkryptomu metodą RNA-seq z roku 2018. Do izolacji RNA i przepisania RNA na cDNA oraz do ilościowego PCR używano komercyjnych zestawów (SV Total RNA Isolation System, Promega; iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad; iTaq Universal SYBR Green Supermix; Bio-Rad). Były zastosowane po 3 powtórzenia biologiczne dla każdej z linii.

Wnioski z realizacji tematu badawczego 3

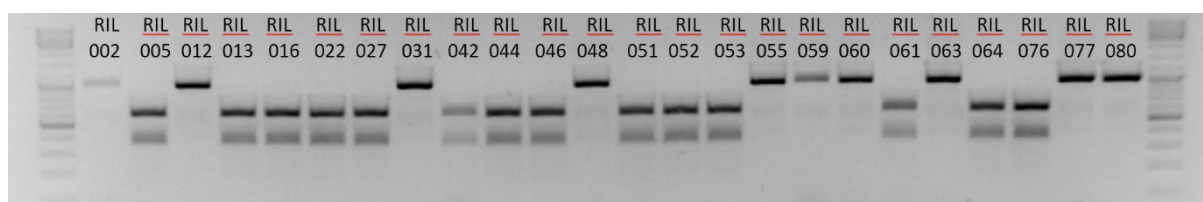
- Wyniki analizy ekspresji genów ujawniły potencjalną funkcję regulatorową trzech genów *FT* w procesie indukcji kwitnienia łubinu żółtego i uzasadniają badanie polimorfizmu sekwencji tych genów w liniach kolekcyjnych.
- Wyniki uzyskane dla łubinu żółtego potwierdziły wysoki stopień zachowawczości regulacji procesu indukcji kwitnienia w obrębie roślin strączkowych. Z badań prowadzonych w poprzednich latach realizacji zadania w ramach Postępu Biologicznego wynika, że u łubinu wąskolistnego głównym genem wczesności kwitnienia jest homolog z kładu *FTc1*, a u łubinu białego m. in. gen *FTa1*. Z danych literaturowych wynika, że u *Medicago truncatula* za wymagania wernalizacyjne odpowiada jeden z homologów *FTa1*, zaś za reakcję na fotoperiod – gen z kładu *FTb*. U soi odpowiedź fotoperiodyczną warunkują geny z kładów *FTa* i *FTc*, zaś u grochu gen *FTa1* (locus *GIGAS*).



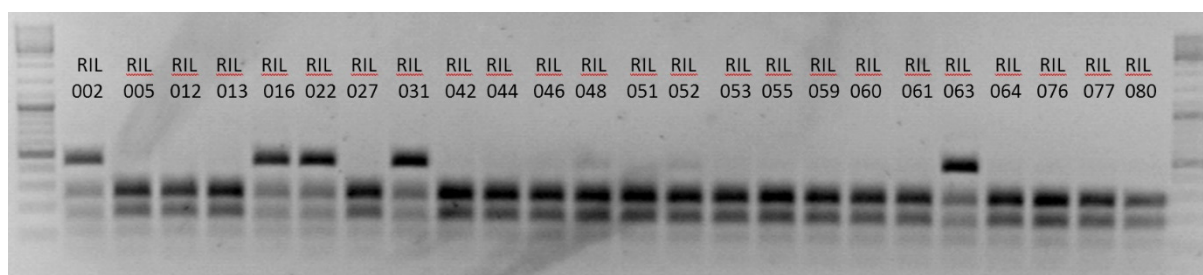
Rys. 1. Wpływ wernalizacji na termin od wysiania nasion do rozpoczęcia kwitnienia łubinu żółtego. Podana jest liczba roślin w poszczególnych przedziałach czasowych dla 66 linii późnych. Wartości ujemne na osi x wskazują na przyspieszenie terminu kwitnienia roślin poddanych wernalizacji (w porównaniu do roślin niewernalizowanych).



Rys. 2. Wpływ wernalizacji na termin od wysiania nasion do rozpoczęcia kwitnienia łubinu żółtego. Podana jest liczba roślin w poszczególnych przedziałach czasowych dla 23 linii wczesnych. Wartości ujemne na osi x wskazują na przyspieszenie terminu kwitnienia roślin poddanych wernalizacji (w porównaniu do roślin niewernalizowanych).



Rys. 3. Elektroforegram markera UNI_F2c_R2 (górny produkt – allel P28213, dolne produkty – allel Wodjil). Marker typu CAPS, trawiony enzymem *Hph*I. Wartość P testu Chi-2: 1,75E-04.



Rys. 4. Elektroforegram markera CDF3_F1_R1 (górny produkt – allel P28213, dolny produkt – allel Wodjil). Marker typu CAPS, trawiony enzymem *Mnl*I. Wartość P testu Chi-2: 5.67E-06.

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 Rybiński ¹✉, Wojciech Świącicki¹, Paweł Barzyk ²

¹Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu,

²Poznańska Hodowla Roślin, Oddział w Wiatrowie,

✉ e-mail: wryb@igr.poznan.pl, tel. 61 6550252

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.802.2.2019, zadanie nr 42.

Słowa kluczowe: alkaloidy, antraknoza, łubin biały, krzyżowania zbliżające, mutageneza, tłuszcz, wczesność

Cel podjętego tematu i prowadzonych 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 poznanym 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. 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.

Opis wyników

W ramach zdania 42 w roku 2019 badania realizowano w jednym szerokim temacie badawczym:

Temat badawczy 1: Krzyżowania zbliżające

Uzyskiwanie segregujących populacji w kolejnych pokoleniach pod względem pary cech (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). Na podstawie uzyskanych wyników z wspomnianych krzyżowań zbliżających kontynuowano prace nad łączną inkorporacją cechy wczesności i wysokiej zawartości tłuszczu do jednego genotypu na drodze krzyżowania zbliżającego, a w odniesieniu do drugiej pary cech (zawartość alkaloidów i odporność na antraknozę) w bieżącym roku rozpoczęto krzyżowania zbliżające wybranych mieszańców o najniższej zawartości alkaloidów z wyselekcjonowanymi mieszańcami o największej tolerancji na porażenie antraknozą.

W ramach kontynuacji badań w odniesieniu do pierwszej pary cech (forma o zwiększonej tolerancji na antraknozę x odmiana i formy niskoalkaloidowe x odmiana) w roku bieżącym analizowano kolejne pokolenie mieszańców.

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. Mieszańce te stanowiły materiał wyjściowy do uzyskania roślin kolejnego pokolenia. Podobnie jak w ubiegłorocznym pokoleniu F_4 , największą liczbę form niskoalkaloidowych (przy zakresie zmienności tej cechy od 0,0073 do 0,00060) zidentyfikowano w kombinacji krzyżówkowej B17: Amiga x Pikador, przy średniej zawartości alkaloidów na poziomie 0,0242 % w nasionach wzorca, odmiany Butan. Potwierdzają się więc wcześniejsze wyniki wskazujące na szczególną wartość tej kombinacji w pozyskiwaniu najliczniejszej grupy mieszańców łubinu białego o najniższej zawartości alkaloidów. Nieco wyższe średnie wartości uzyskano dla mieszańców pochodzących z pozostałych dwu kombinacji, przy czym średnia zawartość alkaloidów była niższa w kombinacji B 16 (Amiga x Boros) niż w nasionach mieszańców z segregującej populacji w kombinacji B15 (Lotos x Butan). Obydwie kombinacje charakteryzuje szeroki zakres zmienności ogólnej zawartości alkaloidów, od 0,0014 % do 0,053 % w nasionach roślin z kombinacji B15 i od 0,0024 % do 0,0081% w kombinacji B16. W odniesieniu do analiz z lat poprzednich, także w roku bieżącym, wynikiem segregacji jest ujawnianie się mieszańców o bardzo niskiej, wręcz śladowej zawartości alkaloidów w każdej kombinacji, poniżej wartości tej cechy dla nasion odmiany – wzorca Butan. Systematyczny spadek zawartości alkaloidów w nasionach jest niewątpliwie wynikiem prowadzonej od kilku lat selekcji, wybierając do dalszych badań w kolejnych pokoleniach najbardziej niskoalkaloidowe genotypy mieszańcowe. Podobnie jak w poprzednich pokoleniach, oprócz zmienności zawartości alkaloidów w nasionach segregującej populacji mieszańców, szczególnie interesująco przedstawia się struktura zawartości poszczególnych alkaloidów w ich łącznej zawartości. Generalnie analizy obejmowały 20 różnych alkaloidów, przy czym obecność niektórych z nich jak przykładowo sparteina, nie ujawniała się w żadnej z analiz. Niezależnie od kombinacji, w nasionach każdego mieszańca obecna jest lupanina i jest to kluczowy alkaloid w łubinie białym. Jego średnia zawartość różni się między kombinacjami i tak w dwu pierwszych (B15 i B16) nasiona zawierają średnio 41,7% i 39,0% lupaniny, ale już genotypy z najbardziej odmiennej kombinacji (B17) tylko 23,9 %, a dominuje tu 13-hydroksymultifloryna (24,3%) obecna

w nasionach w kombinacji B15 i B16 w niewielkich ilościach, odpowiednio: 4,8 i 4,7 %. Drugim w kolejności wiodącym alkaloidem jest 13-hydroksylupanina z wartościami: 16,6; 17,4 i 13,9% w nasionach kombinacji B15, B16 i B 17. Pośród ocenianych mieszańców po infekcji roślin w szklarni przez grzyb *Colletotrichum lupini*, podobnie jak w pokoleniu F_4 nie zidentyfikowano w F_5 form o pełnej odporności na antraknozę. Stwierdzono natomiast szeroki zakres reakcji roślin na infekcję wyrażony zróżnicowanym stopniem porażenia w odniesieniu do poszczególnych mieszańców. Formy o najmniejszym stopniu podatności (zwiększonej tolerancji) na antraknozę w zakresie 3-4 w 9-cio stopniowej skali (9 – całkowite porażenie) mogą zostać wykorzystane na dalszych etapach prac zadania badawczego, zwłaszcza w kontekście znacznej wrażliwości roślin wzorcowej odmiany Butan na poziomie 8 w wyżej wspomnianej skali.

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 F_5 o poszerzonym zakresie zmienności ocenianych cech w stosunku do ich form rodzicielskich, a wybrane, najbardziej wartościowe mieszańce (przy ograniczeniu się z pięciu do trzech najlepszych kombinacji) stanowiły materiał wyjściowy do uzyskania segregującego pokolenia F_6 . Pod względem efektywności uzyskiwania najwcześniejszych mieszańców, podobnie jak w roku ubiegłym (pokolenie F_5), najlepszą okazała się kombinacja B1 (Damascus x Boros), z której wyselekcjonowano mieszańce F_6 o najwcześniejszym dojrzewaniu w porównaniu z mieszańcami z pozostałych dwóch kombinacji i formami rodzicielskimi. Nie mniej wartościowymi okazały się także dwie dalsze kombinacje: B2 (Damascus x Pikador) i B6 (MJS208-1 x 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. Identyfikacja plennych mieszańców z towarzyszącą im wczesnością dojrzewania, przy znacznej tolerancji na antraknozę, jest istotnym elementem wzrostu atrakcyjności udziału łubinu białego w krajowym rolnictwie. Na podstawie tegorocznych wyników zidentyfikowano mieszańce o najwcześniejszym dojrzewaniu w powiązaniu z ich terminem kwitnienia i potencjałem plonowania. Na szczególną uwagę zasługują mieszańce wczesne z kombinacji

B1 (Damascus x Boros), a zwłaszcza mieszańców 155/6.

Na podstawie wcześniej wykonanych analiz chemicznych, potwierdzono trafność wyboru do badań w roku 2017 (F_4) kombinacji krzyżówkowej AL. 22 x 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. Wysoką wartość kombinacyjną tej krzyżówki potwierdzono w pokoleniu F_5 i tegorocznym F_6 . W pokoleniu F_6 przy zbliżonych wartościach dla form rodzicielskich na poziomie ponad 12 %, odnotowano istotny postęp wyrażony wyraźnie wyższym poziomem zakresu zmienności dla ocenianych mieszańców (od 11,9 do 17 %), co znalazło odzwierciedlenie w wyższej wartości średniej przekraczającej 14 % (14,05 %), przy czym liczba mieszańców o bardzo wysokiej zawartości tłuszczu (powyżej 15 %) była wyższa niż w pokoleniu F_5 i wynosiła 11 obiektów z rekordową zawartością 17% u jednego z mieszańców. Ten korzystny wynik, wyrażony utrzymywaniem się wysokich zawartości tłuszczu w kolejnych pokoleniach, wskazuje jak bardzo o efekcie finalnym decyduje wartość kombinacyjna odpowiednio dobranych do krzyżowań form rodzicielskich. W odniesieniu do danych literaturowych, nasiona łubinu białego

wyraźnie 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 ten stosunek obydwu nienasyconych kwasów (obserwowany także w F_6) uważany jest za prawie idealny w diecie ludzi jak żywieniu zwierząt. Dla łącznej inkorporacji cechy wczesności i wysokiej zawartości tłuszczu w jeden genotyp (w aspekcie piramidyzacji genów) wykonano krzyżowania obejmujące najwartościowsze mieszańce pod względem obydwu cech. W roku bieżącym uzyskano rośliny pokolenia F_3 .

Podsumowanie

Zastosowane krzyżowania zbliżające w zróżnicowanych układach kombinacyjnych (wraz z zawężaniem liczby kombinacji do najwartościowszych w kolejnych pokoleniach) umożliwiły uzyskanie widocznego postępu w stosunku do lat ubiegłych, wyrażającego się uzyskaniem mieszańców F_5 o niższej zawartości alkaloidów i większej tolerancji na antraknozę niż odmiana Butan, mieszańców pokolenia F_6 wcześniejszych niż ich formy rodzicielskie oraz o wyższej zawartości tłuszczu (do 17 %) i zbalansowanym profilu kwasów tłuszczowych (stosunek kwasu omega 3 do omega 6).

Identyfikacja i sposób dziedziczenia genów warunkujących odporność na choroby grzybowe i niską zawartość alkaloidów w doskonaleniu wartości użytkowej łubinów, ze szczególnym uwzględnieniem łubinu żółtego

Identification and mode of inheritance of genes underlying fungal disease resistance and low alkaloid content in lupins improvement, with particular attention to yellow lupin

Wojciech Święcicki ¹✉, Magdalena Kroc ¹, Paweł Barzyk ², Katarzyna Czepiel ¹, Paulina Wilczura / Patrycja Bielecka¹

¹ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk,

² Poznańska Hodowla Roślin Tulce,

✉ e-mail: wswi@igr.poznan.pl, tel. 61 6550291

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.802.2.2019, Zadanie nr 41.

Słowa kluczowe: łubin, alkaloidy, *Fusarium*, antraknoza

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 ramach tegorocznych badań na podstawie analizy ekspresji różnicowej, adnotacji funkcjonalnej genów oraz dostępnej literatury wybrano 6 genów kandydackich, których ekspresję analizowano z zastosowaniem metody qPCR. Wybrano geny związane z metabolizmem ściany komórkowej, a także geny uczestniczące w syntezie i akumulacji alkaloidów. Ściana komórkowa zapewnia fizyczną barierę zabezpieczającą przed infekcją patogenów, ale także uczestniczy w rozpoznaniu patogenów prowadzącym do aktywacji procesów odpornościowych. Alkaloidy łubino- we pełnią natomiast funkcję ochrony chemicznej przeciw patogenom (wirusowym, bakteryjnym i grzybowym) i szkodnikom. W przypadku genów związanych z metabolizmem ściany komórkowej

wykazano, że po porażeniu fuzariozą następuje znaczny spadek ekspresji u linii podatnych, natomiast u linii odpornych ekspresja zmienia się nieznacznie (niewielki wzrost ekspresji). Analiza ekspresji wybranych genów szlaku syntezy alkaloidów w badanym materiale łubinu żółtego wykazała, że u linii podatnych obserwowany jest znaczny spadek ekspresji, natomiast u linii odpornych ekspresja ulega zmianie w bardzo niewielkim stopniu (niewielki spadek ekspresji). Porównując natomiast poziom ekspresji u linii odpornych (względem linii podatnych) obserwowany w warunkach kontrolnych oraz po porażeniu, w przypadku wszystkich genów badanych zaobserwowano znacznie wyższą ekspresję po porażeniu. Uzyskane wyniki wskazują, że wybrane geny kandydackie mogą przyczyniać się do zwiększonej przeżywalności roślin w czasie porażenia *Fusarium* spp. Prezentowane wyniki mogą stanowić punkt wyjściowy do dalszego zrozumienia interakcji patogen grzybowy - ściana komórkowa rośliny, a także korzystnej roli alkaloidów w czasie procesu infekcji *Fusarium* spp.

Ad 2.

— Uzyskano 9 nowych kombinacji mieszańcowych łubinu wąskolistnego i żółtego, łączących genotypy odmian uprawnych

- ze źródłami odporności przeciwko wędnięciu fuzaryjnemu i antraknozie: W-658 (W-350 × Samba), W-660 (W-411 × Samba), W-662 (W-411 × Wars), W-705 (W-417 × Rumba), Z-811 (Z-563 × Perkoz), Z-812 (Z-563 × Bursztyn), Z-824 (Z-687 × Bursztyn), Z-825 (Z-687 × Perkoz), Z-753 (Z-525 × Baryt).
- Przetestowano 20 obiektów łubinu wąskolistnego (tab. 1) oraz 40 obiektów łubinu żółtego (tab. 1) pod względem odporności na *Fusarium sp.*. Presja selekcyjna była bardzo silna i mimo tego najlepsze obiekty w obu gatunkach były porażone słabiej od wzorców odporności. Oznacza to, że są cennym materiałem i mogą być źródłem genetycznej odporności dla form uprawnych. Są to W-470, Z-626, Z-666, Z-622, Z-654, Z-625 (tab. 1).
 - Przetestowano 40 obiektów łubinu żółtego pod względem odporności na antraknozę w warunkach polowych. Porażenie rozwinęło się w typowym terminie – w stadium kwitnienia – i było skupione na łodygach bocznych i strąkach, i miało ogólnie średni poziom. Duża część roślin została wyeliminowana przez wędnięcie fuzaryjne. Stan obiektów wzorcowych potwierdził prawidłowy przebiegu testu. Wyniki obserwacji umożliwiły wykonanie selekcji i wskazanie obiektów mogących posiadać odporność genetyczną: Z-773, Z-760, Z-746 (tab. 2). Ze względu na dość wczesne pokolenie (F3) przetestowanych kombinacji mieszańcowych, wskazane jest potwierdzenie wyników w dodatkowych testach.
 - Przetestowano 40 obiektów łubinu żółtego pod względem odporności na antraknozę w warunkach szklarniowych. Ocena porażenia ujawniła szeroki zakres zmienność poziomu odporności od 3,79 do 8,71 stopnia, w skali 0-9 (tab. 2). Porównanie z wynikami testu polowego uwidacznia, że presja selekcyjna w warunkach polowych była słabsza i niektóre obiekty stosunkowo słabo porażone w polu w warunkach kontrolowanych ulegają wyraźnie silniejszemu porażeniu (szczególnie Z-760). Wysoka pozycja wzorca odporności potwierdza prawidłowy przebieg testu, a obecność grupy obiektów lepszych od niego dowodzi skuteczności procedury badawczej. Pięć badanych obiektów (Z-731, Z-723, Z-686E, Z-736, Z-744) wykazało się średnim porażeniem, statystycznie istotnym, słabszym od wzorca Mister. Obiekty te są potencjalnym źródłem odporności dla hodowli odpornościowej (tab. 2).
- Wnioski z prowadzonych badań
- Zaobserwowany poziom ekspresji genów badanych może przemawiać za ich zaangażowaniem w odpowiedź rośliny na porażenie *Fusarium spp.*, poprzez wpływ na zdolność linii do ograniczenia wzrostu i rozwoju patogena. Zaangażowanie genów uczestniczących w różnych mechanizmach odpornościowych może wskazywać, że odporność na wędnięcie fuzaryjne u łubinu żółtego warunkowana jest wielogenowo
 - Genotypy o bardzo wysokiej odporności na wędnięcie fuzaryjne są nieliczne w łubinie wąskolistnym, jednak test na polu fuzarialnym pozwala na ich wyodrębnienie spośród badanych materiałów. W roku 2019 znaleziono 8 genotypów o wysokim poziomie odporności, w tym jeden o szczególnie wysokim, wzorcowym poziomie odporności – z pewnością mogący być źródłem tej odporności.
 - W łubinie żółtym przeciętny poziom odporności przeciwko wędnięciu fuzaryjnemu jest dość wysoki, w porównaniu z łubinem wąskolistnym. Liczba obiektów posiadających geny odporności jest również większa, co utrudnia wyodrębnienie najlepszych genotypów, jednak nadal jest możliwe ulepszanie tej odporności. W sezonie wegetacyjnym 2019 udało się znaleźć 5 obiektów przewyższających wzorzec odporności, które mogą być źródłem genetycznej odporności na najwyższym poziomie.
 - Znalezienie genetycznej odporności na antraknozę jest trudne i wymaga zbadania materiałów w różnych warunkach i stadiach wegetacji. Kompleksowa ocena za pomocą testów polowych i szklarniowych pozwoliła w roku 2019 wskazać przynajmniej 5 obiektów o wysokiej odporności. Jeden z tych obiektów można uznać za potencjalne źródło genetycznej odporności przeciwko antraknozie ze względu na bardzo dobry wynik w obu typach przeprowadzanych doświadczeń.
 - Uzyskanie stabilnych genotypów, łączących odporność na *Fusarium sp.*, *Colletotrichum lupini* i niską zawartość alkaloidów, wymaga dalszych testów i selekcji potomstwa wybranych kombinacji mieszańcowych.

Tabela 1

Przeżycie roślin lębina wąskolistnego i żółtego na polu fuzarialnym (2019)

Gatunek	Nazwa obiektu	Średnio przeżycie w stadium dojrzwania [%]	Gatunek	Nazwa obiektu	Średnio przeżycie w stadium dojrzwania [%]
<i>L. angustifolius</i>	W-470	98,9	<i>L. luteus</i>	Z-620	85,71
<i>L. angustifolius</i>	*Kalif	96,8	<i>L. luteus</i>	Z-660	83,33
<i>L. angustifolius</i>	W-476	95,4	<i>L. luteus</i>	Z-637E	83,33
<i>L. angustifolius</i>	W-494	94,9	<i>L. luteus</i>	Z-652	82,86
<i>L. angustifolius</i>	W-459	93,7	<i>L. luteus</i>	Z-653	82,64
<i>L. angustifolius</i>	W-472	93,1	<i>L. luteus</i>	Z-662	81,94
<i>L. angustifolius</i>	W-474	92,3	<i>L. luteus</i>	Z-643	81,25
<i>L. angustifolius</i>	W-493	90,4	<i>L. luteus</i>	Z-634	80,36
<i>L. angustifolius</i>	W-483	88,9	<i>L. luteus</i>	Z-650	79,44
<i>L. angustifolius</i>	W-475	78,4	<i>L. luteus</i>	Z-641	78,57
<i>L. angustifolius</i>	W-491	74,5	<i>L. luteus</i>	Z-648	77,78
<i>L. angustifolius</i>	W-484	74,1	<i>L. luteus</i>	Z-658	73,89
<i>L. angustifolius</i>	W-478	68,1	<i>L. luteus</i>	Z-631	73,75
<i>L. angustifolius</i>	W-479	65,1	<i>L. luteus</i>	*Parys	72,22
<i>L. angustifolius</i>	W-477	59,1	<i>L. luteus</i>	Z-633	72,22
<i>L. angustifolius</i>	W-480	45,5	<i>L. luteus</i>	Z-635	70,83
<i>L. angustifolius</i>	W-489	42,1	<i>L. luteus</i>	Z-657	70,14
<i>L. angustifolius</i>	W-473	38,5	<i>L. luteus</i>	Z-651	66,67
<i>L. angustifolius</i>	W-490	34,2	<i>L. luteus</i>	Z-646	64,58
<i>L. angustifolius</i>	W-487	33,0	<i>L. luteus</i>	Z-642	63,49
<i>L. angustifolius</i>	W-488	22,0	<i>L. luteus</i>	Z-661	62,22
<i>L. angustifolius</i>	*Sonet	0,0	<i>L. luteus</i>	Z-628	60,71
<i>L. luteus</i>	Z-626	100,00	<i>L. luteus</i>	Z-655	60,32
<i>L. luteus</i>	Z-666	95,00	<i>L. luteus</i>	Z-627	57,14
<i>L. luteus</i>	Z-622	93,75	<i>L. luteus</i>	Z-644	55,56
<i>L. luteus</i>	Z-654	92,86	<i>L. luteus</i>	Z-649E	54,46
<i>L. luteus</i>	Z-625	92,86	<i>L. luteus</i>	Z-640	52,78
<i>L. luteus</i>	*Lord	92,86	<i>L. luteus</i>	Z-623	52,08
<i>L. luteus</i>	Z-665	88,89	<i>L. luteus</i>	Z-636	45,83
<i>L. luteus</i>	Z-659	88,19	<i>L. luteus</i>	Z-664	45,14
<i>L. luteus</i>	Z-645	87,50	<i>L. luteus</i>	Z-647	30,56
<i>L. luteus</i>	Z-629	85,71	<i>L. luteus</i>	Z-638	30,56

Tabela 2

Porażenie antrakozą siewek łubinu żółtego w doświadczeniu szklarniowym (2019) i zestawienie z rankingiem połowym

Lp.	obiekt	średnie porażenie	Grupy jednorodne statystycznie	ranking połowy
1	Z-731	3,793	T	31
2	Z-723	4,433	S	12
3	Z-686E	4,969	R S	21
4	Teo	5,115	R	42, 43
5	Z-736	5,767	Q	40
6	Z-744	6,194	P Q	25
7	Z-725	6,433	O P	20
8	Z-738	6,433	O P	32
9	Z-724	6,536	N O P	16
10	Z-729	6,786	M N O	44
11	Mister	6,849	M N O	6, 17
12	Z-721	6,893	L M N O	23
13	Z-773	6,964	L M N O	1
14	Z-771	7,033	K L M N	19
15	Z-711	7,069	K L M N	29
16	Z-750	7,103	K L M N	36
17	Z-753	7,138	J K L M	7
18	Z-732	7,393	I J K L	41
19	Z-715	7,412	I J K L	4
20	Z-728	7,571	H I J K	34
21	Z-772	7,690	G H I J	15
22	Z-727	7,714	F G H I	35
23	Z-746	7,867	E F G H I	3
24	Z-743	7,903	E F G H I	30
25	Z-722	7,964	D E F G H I	27
26	Z-717	7,966	D E F G H	9
27	Z-767	7,967	D E F G H	26
28	Z-768	8,033	C D E F G H	18
29	Z-730	8,036	B C D E F G H	28
30	Z-713	8,148	A B C D E F G H	5
31	Z-754	8,200	A B C D E F G	8
32	Z-741	8,259	A B C D E F G	39
33	Z-747	8,267	A B C D E F	38
34	Z-764	8,276	A B C D E F	11
35	Z-760	8,300	A B C D E	2
36	Z-766	8,345	A B C D E	37
37	Z-761	8,467	A B C D	14
38	Z-737	8,483	A B C D	24
39	Z-755	8,533	A B C	22
40	Z-758	8,600	A B	33
41	Z-748	8,690	A	13
42	Z-749	8,714	A	10

Występowanie dotychczas niemonitorowanych wirusów (HpLV, ArMV) i wiroidów (HpSVd, AFCVd, CBCVd) na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce

The occurrence of previously unmonitored viruses (HpLV, ArMV) and viroids (HpSVd, AFCVd, CBCVd) in hop gardens in Poland

Marcin Przybyś , Urszula Skomra, Grażyna Korbecka-Glinka

Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy, ul. Czartoryskich 8, 24-100 Puławy,

 e-mail: mprzybys@iung.pulawy.pl, tel. 81 4786934

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.802.5.2019, Zadanie nr 107.

Słowa kluczowe: AFCVd, ArMV, CBCVd, chmiel, HpLV, HpSVd, wirusy

W roku 2019 podjęto badania dotyczące występowania wirusów i wiroidów na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce. Celem badań było opracowanie narzędzi diagnostycznych pozwalających na jednoczesne wykrywanie trzech wiroidów: wiroida karłowatości chmielu (HSVd), wiroida wyboistości jabłek (Apple fruit crinkle viroid, AFCVd), wiroida pęknięcia kory cytrusowych (Citrus bark cracking viroid, CBCVd), narzędzi do jednoczesnego wykrywania dwóch wirusów chmielu: wirusa utajonego chmielu (HpLV), wirusa mozaiki gęsiówki (Arabis mosaic virus, ArMV), ocena występowania na plantacjach produkcyjnych chmielu w Polsce tych patogenów oraz uzyskanie bibliotek do sekwencjonowania NGS, w celu określenia wiromu chmielu. W wyniku prowadzonych badań opracowano i zoptymalizowano warunki reakcji multiplex PCR dla jednoczesnego wykrywania wiroidów (HSVd, CBCVd, AFCVd) z kontrolą wewnętrzną RNA roślinnego oraz jednoczesnego wykrywania wirusów (HpLV, ArMV) z kontrolą wewnętrzną. Do detekcji wszystkich wiroidów: HSVd, CBCVd, AFCVd wykorzystano startery, które amplifikowały pełne genomy patogenów (Sano i in., 2001, Bernad i Duran-Vila, 2006, Sano i in., 2008). W efekcie uzyskano amplikony o długościach odpowiednio: 303 pz, 284 pz i 382 pz. Do detekcji HpLV wykorzystano startery, które amplifikowały 5'-koniec genomu

tego wirusa (1116 pz) (Ziegler i in. 2014), zaś do wykrywania ArMV amplifikowano wysoce konserwatywny region kodujący białko płaszczka (CP) przy użyciu starterów ArMV-F i ArMV-R (Komínek et al. 2003). W efekcie uzyskiwano amplikony o długości 213 pz. Kolejnym etapem badań było gromadzenie próbek chmielu z plantacji produkcyjnych zlokalizowanych we wszystkich rejonach uprawy chmielu w Polsce: lubelskim, wielkopolskim, dolnośląskim. Próbki pobierano zarówno z odmian typu goryczkowego jak i aromatycznego. Dodatkowo gromadzono próbki z kolekcji odmian chmielu utrzymywanej w IUNG-PIB w Puławach. Próbki gromadzono 3-krotnie w trakcie sezonu wegetacyjnego, co wynikało z faktu, iż niektóre patogeny są możliwe do wykrycia tylko w określonych stadiach rozwojowych rośliny (Tsai i in., 2012; Wetzel i in., 2002; Ziegler i in., 2014). Pierwszy termin obejmował okres naprowadzania roślin chmielu na przewodniki, kolejny obejmował fazę kwitnienia, a ostatni fazę dojrzałości. Ogółem w roku 2019 zgromadzono 904 próbki chmielu. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono występowanie na terenie Polski przypadków porażenia roślin chmielu wyłącznie przez utajony wirus chmielu (Hop latent virus, HpLV). Występowanie wirusa HpLV stwierdzono w lubelskim i dolnośląskim rejonie uprawy chmielu w Polsce. HpLV wykryto w próbkach

gromadzonych w drugim i trzecim terminie. *Hop latent virus* (HpLV) należy do rodzaju *Carlavirus*. Jego występowanie stwierdzono wcześniej 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). HpLV nie ma innych poza chmielem naturalnych gospodarzy. W roku 2019 r. w żadnej z badanych próbek nie stwierdzono obecności wirusa mozaiki gęsiówki (Arabis mosaic virus, ArMV), wiroida karłowatości chmielu (Hop stunt viroid, HSVd), wiroida wyboistości jabłek (Apple fruit crinkle viroid, AFCVd) oraz wiroida pęknięcia kory cytrusowych (Citrus bark cracking viroid, CBCVd). Należy podkreślić, że uzyskane w 2019 r. wyniki wskazują, że największym zagrożeniem upraw chmielu w Polsce jest HpLV. Pomimo niestwierdzenia obecności HSVd, 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 genetyczne źródła odporności na HpLV nie są znane, dlatego ważne jest utrzymywanie wysokiej zdrowotności plantacji poprzez stosowanie wysokiej jakości materiału sadzonek i przestrzeganie zaleceń fitosanitarnych, co będzie zabezpieczało plantacje przed zakażeniem. W celu badania wirusa chmielu w 2019 r. przygotowano 5 bibliotek do sekwencjonowania NGS. Metody sekwencjonowania następnej generacji (NGS) oparte na masowym, równoległym sekwencjonowaniu cząsteczek RNA/DNA otwierają nowe możliwości wykrywania patogenów roślinnych. Największą zaletą tych metod jest brak konieczności zakładania *a priori* jaki wirus będzie wykrywany w czasie analiz. Sekwencjonowanie całkowitego RNA z rośliny zakażonej pozwala na identyfikację RNA wszystkich patogenów w toku analizy bioinformatycznej.

Wnioski

- opracowane protokoły wykrywania poszczególnych wirusów i wiroidów umożliwiając jednoczesną detekcję wszystkich badanych wiroidów lub wirusów z jednoczesną kontrolą przebiegu procesu odwrotnej transkrypcji i multiplex PCR
- na plantacjach chmielu w Polsce w roku 2018 nie stwierdzono występowania ArMV, HSVd,

AFCVd i CBCVd

- występowanie HpLV na plantacjach produkcyjnych stwierdzono w lubelskim i dolnośląskim rejonie uprawy chmielu w Polsce

Literatura

- Bernad, L., Duran-Vila, N. (2006). A novel RT-PCR approach for detection and characterization of citrus viroids. *Molecular Cellular Probes*, 20(2):105–113
- 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.
- Komínek, P., Svoboda, P., Abou Ghanem-Sabanadzovic, N. (2003). Improved detection of Arabis mosaic virus in grapevine and hop plants. *Acta Virologica*, 47:199–200.
- Matoušek, J., Orctová, L., Patzak, J., Svoboda, P., Ludvíková, I. (2003). Molecular sampling of hop stunt viroid (HSVd) from grapevines in hop production areas in the Czech Republic and hop protection. *Plant Soil Environmental* 49:168–75.
- 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 Disease*, 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, *Disease Notes*, 96(4):592.
- Sano, T., Isono, S., Matsuki, K., Kawaguchi-Ito, Y., Tanaka, K., Kondo, K.-i., i in., 2008. Vegetative propagation and its possible role as a genetic bottleneck in the shaping of the apple fruit crinkle viroid populations in apple and hop plants. *Virus Genes*, 37: 298–303
- Sano, T., Mimura, R., Ohshima, K. (2001) Phylogenetic analysis of hop and grapevine isolates of hop stunt viroid supports a grapevine origin for hop stunt disease. *Virus Genes*. 22(1):53–59.
- 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 Pathology* 61:977–985.
- Von Weschmar, W. B., Brits, G., Cole-man T. (1989). Viruses in hops and aspects of virus epidemiology and hop production in South Africa at 34° southern latitude.

- Strony: 33–42 w: Proc. Int. Workshop Hop Virus Dis. Giessen.
- Wetzel, T., Jardak, R., Meuniera, L., Ghorbel, A., Reustle, G.M., Krczal, G. (2002). Simultaneous RT/PCR detection and differentiation of arabis mosaic and grapevine fanleaf nepoviruses in grapevines with a single pair of primers. *Journal of Virological Methods*, 101(1-2):63–69.
- 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., Kastir, U., Matoušek, J., Schubert, J. (2014). Detection and molecular analysis of Hop latent virus and Hop latent viroid in hop samples from Poland, *Journal für Kulturpflanzen*, 66 (7). S. 248–254.

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

Elżbieta Czembor ✉, Włodzimierz Majtkowski, Jan Schmidt, Seweryn Frasiński

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy,
✉ 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 decyzji HOR.hn.802.3.2019, Zadanie nr 36.

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 wsp. (2001 a, b, 2002 a, b), Czembor (2003, 2004).

Celem prac realizowanych w roku 2019 była charakterystyka ekotypów należących do 7 gatunków traw wieloletnich w użytkowaniu kośnym i nasiennym. Był to pierwszy roku pełnego użytkowania w siewie gęstym – poletkowym i rzędownym. Łącznie badano 36 ekotypów należących do gatunków: śmiałek darniowy (*Deschampsia cespitosa*), kostrzewa trzciniowa (*Festuca arundinacea*), kostrzewa łąkowa (*Festuca pratensis*), kostrzewa czerwona (*Festuca rubra*), życica trwała (*Lolium perenne*), tymotka łąkowa (*Phleum pratense*), wiechlina łąkowa (*Poa pratensis*). Zostały one wytypowane z kolekcji I i II (ponad 250 obiektów) na podstawie wyników doświadczeń prowadzonych w warunkach polowych na przestrzeni trzech lat (Kolekcja I 2014 – 2012016 i Kolekcja II 2015 - 2017) oraz doświadczeń

prowadzonych w warunkach szklarniowych. Wyniki doświadczeń wykazały, że są to formy charakteryzujące się podwyższoną odpornością na stropy biotyczne i abiotyczne oraz innymi korzystnymi cechami świadczącymi o ich wysokiej wartości użytkowej. Charakterystyka w użytkowaniu kośnym prowadzona była w Radzikowie, natomiast w użytkowaniu nasiennym w Bydgoszczy i dodatkowej, drugiej lokalizacji (Polanowice, Nieznanice, Szelejewo). W waloryzacji uwzględniono odporność na stropy biotyczne i abiotyczne, ważne gospodarczo cechy morfologiczne i fenologiczne (składowe plonu) oraz potencjał plonowania (zielonej i suchej masy lub nasion, w zależności od typu użytkowania).

Stopień odporności roślin na stropy biotyczne i abiotyczne (takie jak oceny przetrwania, wigoru wiosną i jesienią i stopień odporności na choroby) istotnie różnicowały badany materiał w obu typach użytkowania. Odporność na stropy oceniano w skali 1–9, w której 1 oznacza, że roślina jest martwa.

W użytkowaniu kośnym stan roślin po zimie i stan roślin w okresie wiosennym życicy trwałej i tymotki łąkowej został oceniony najwyżej natomiast kostrzewy czerwonej i wiechlina łąkowej najniżej (rys. 1). Gatunkiem najbardziej podatnym na rdze były wiechlina łąkowa. Zakres zmienności w okresie letnim i jesiennym w obrębie tego gatunku był duży i pozwalał wyodrębnić genotypy średnio odporne (latem średnie porażenie

4,7, zakres 3,0-7,0; jesienią średnie porażenie 4,2 zakres 2,7-5,3). Gatunkiem najbardziej odpornym na rdzę była kostrzewa czerwona, latem oceniona średnio na 7,9 (zakres 7,3-8,3). Stopień odporności na rdze (powodowane przez grzyby z rodzaju *Puccinia* spp.) w okresie letnim korespondował oceny stanu roślin przed zimą. Objawy choroby plamistości liści stwierdzono latem na gatunkach kostrzewy łąkowej (średnio, stopień odporności oceniono na 5,3) i tymotki łąkowej (średnio, stopień odporności oceniono na 5,0), przy małym zróżnicowaniu wewnątrz tych gatunków. Zakres zmienności dla potencjału plonowania w użytkowaniu kośnym był wysoki. Wiosną, największy plon zielonej masy uzyskano dla życicy trwałej (średnio 11,10 kg/m², zakres 4,60-21,50 kg/m²), tymotki łąkowej (średnio 11,50 kg/m², zakres 10,00-13,10 kg/m²) i kostrzewy łąkowej (średnio 11,4 kg/m², zakres 8,80-13,80 kg/m²). Udział suchej masy w zielonej masie był najwyższy dla wiechliny łąkowej, średnio 25,6% (23,5-28,2%).

W użytkowaniu nasiennym, w Bydgoszczy ogólne porażenie grzybami z rodzaju *Puccinia* spp. (sprawca rdzy) było niskie i nie różnicowało obiektów. W okresie jesiennym na wszystkich gatunkach obserwowano objawy plamistości liści, a badane materiały różniły się pod względem odporności na tą chorobę. Najbardziej podatna była wiechlina łąkowa jesienią (w okresie letnim stopień odporności gatunku było ocenione na poziomie 5,4, przy dużym zakresie zmienności od 4,3 do 7,7; natomiast w okresie jesiennym średnia ocen stopnia odporności 3,4 przy zakresie zmienności 2,3-6,0). Porażenie innych gatunków było niskie (średnio powyżej 7,7).

W pozostałych lokalizacjach, w których prowadzono doświadczenia w użytkowaniu nasiennym, podatność na rdze wykazały życica trwała (Radzików: latem stopień odporności oceniono średnio na 6,1 natomiast jesienią średnio na 6,0), śmiełek darniowy (Radzików: latem stopień odporności oceniono średnio na 5,3 natomiast jesienią średnio na 3,0), wiechlina łąkowa (Polanowice latem stopień odporności oceniono średnio na 6,3 a jesienią na 6,6) i tymotka łąkowa (Szelejowo - wiosną stopień odporności oceniono średnio na 5,5 a jesienią na 7,2). Gatunkami o wysokiej odporności na rdzę okazały się kostrzewa trzcinowa i kostrzewa łąkowa. Na kostrzewie łąkowej obserwowano średnie i niskie nasilenie plamistości liści - w Polanowicach latem została oceniona średnio na 7,3 (zakres ocen 6,7-8,3), jesienią średnio na 6,9 (zakres ocen 6,3-7,3). Na pozostałych gatunkach użytkowania

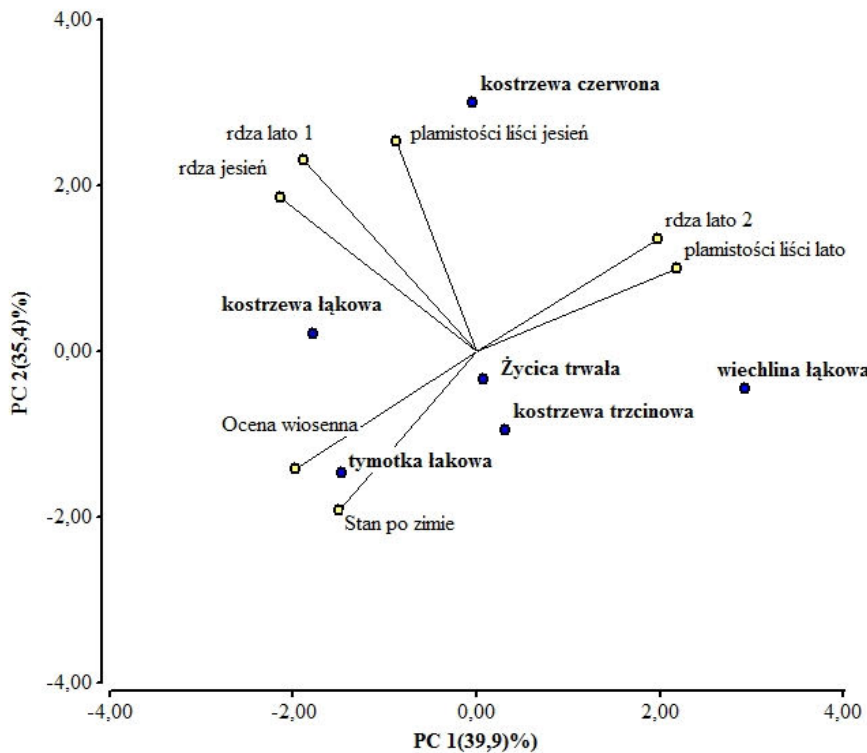
nasiennego w II lokalizacji nasilenie choroby plamistości liści było niskie lub go nie stwierdzono. Ocena stopnia odporności na rdze korespondowała do stanu roślin przed zimą.

Stwierdzono duże różnice (pomiędzy gatunkami i w obrębie gatunków) dla składowych plonu w użytkowaniu nasiennym (rys. 2). Najwięcej nasion uzyskano dla tymotki łąkowej (średnio 817,1 szt., przy zakresie 434-1282 szt.). Masa tysiąca ziaren była najwyższa dla kostrzewy trzcinowej (średnio 2,94 g) a najniższa – wiechliny łąkowej (średnio 0,31kg). W obrębie wszystkich gatunków duże różnice stwierdzono również dla długości kwiatostanu (kostrzewa trzcinowa: 9,7-19,7 cm; życica trwała: 18,3-27,4 cm.

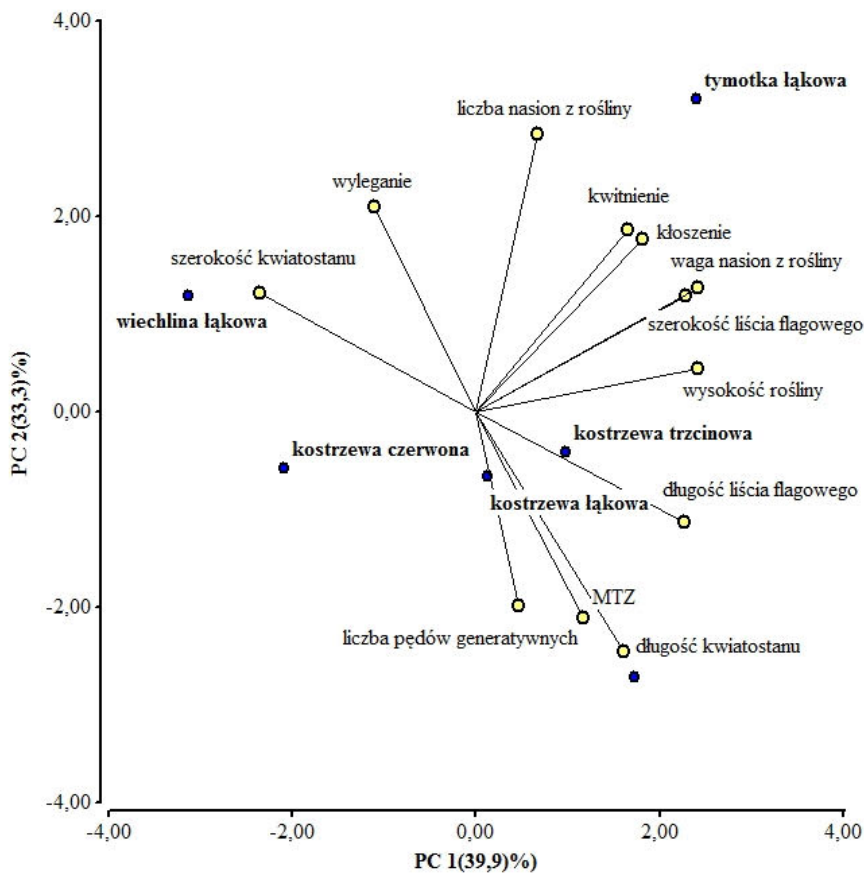
W użytkowaniu nasiennym współzależności pomiędzy wczesnością a wysokością roślin, szerokością liścia flagowego, liczbą nasion z rośliny i ich wagą były dodatnie i statystycznie istotne. Rośliny wysokie, o długim i wąskim kwiatostanie charakteryzowały się wyższą MTZ. Wczesność i szerokość liścia flagowego dodatnio korespondowała do liczby i wagi nasion pozyskanych z rośliny, natomiast współzależność pomiędzy liczbą nasion a długością kwiatostanu była ujemna.

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.



Rys. 1. Odporność na stresse biotyczne i abiotyczne kostrzewy czerwonej, łąkowej i trzcinowej, wiechlina łąkowej, tymotki łąkowej i życicy trwałej w użytkowaniu kośnym (pierwszy rok pełnego użytkowania) w układzie dwóch pierwszych składowych głównych.



Rys. 2. Zróżnicowanie kostrzewy czerwonej, łąkowej i trzcinowej, wiechlina łąkowej, tymotki łąkowej i życicy trwałej dla cech morfologicznych, fizjologicznych i składowych plonu w użytkowaniu nasiennym kośnym (pierwszy rok pełnego użytkowania) w układzie dwóch pierwszych składowych głównych.

Identyfikacja genów związanych z ekspresją zimotrwałości i tolerancji suszy u form introgresywnych *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea*

Identification of genes associated with winter-hardiness and drought tolerance in the introgression forms of *Lolium multiflorum*/*Festuca arundinacea*

Arkadiusz Kosmala ¹✉, Adam Augustyniak ¹, Dawid Perlikowski ¹,
Włodzimierz Zwierzykowski ¹, Eugeniusz Paszkowski ²

¹ Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk,

² DANKO Hodowla Roślin,

✉ e-mail: akos@igr.poznan.pl, tel. 61 6550285

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji HOR.hn.802.2.2019, Zadanie nr 35.

Słowa kluczowe: fizjologiczne i molekularne markery odporności na stresy środowiskowe, mrozoodporność, odporność na choroby, odporność na suszę, trawy, zimotrwałość

W ramach zadania badawczego prowadzone są prace zmierzające do: (i) selekcji form introgresywnych *Lolium multiflorum* (życica wielokwiatowa)/*Festuca arundinacea* (kostrzewa trzcinowa), które wykazują stosunkowo wysoki poziom tolerancji sekwencji stresów środowiskowych, w układzie susza/zima oraz (ii) wyznaczenia fizjologicznych i molekularnych wskaźników tolerancji analizowanych stresów abiotycznych. Podstawowe cele badań w roku 2019 obejmowały:

- ocenę stopnia przezimowania form introgresywnych BC₆ *L. multiflorum*/*F. arundinacea* (przeprowadzenie testu na zimotrwałość),
- analizę fizjologicznych parametrów związanych z tolerancją suszy (relatywna zawartość wody, zawartość wody, wyciek elektrolitów, fluorescencja chlorofilu) u wyselekcjonowanych form introgresywnych BC₆ w symulowanych warunkach szklarniowych,
- analizę fizjologicznych parametrów związanych z tolerancją niskiej temperatury, w tym mrozu (wyciek elektrolitów) u wyselekcjonowanych form introgresywnych BC₆ w symulowanych warunkach fitotronowych (pomieszczenie do hartowania roślin),
- przygotowanie do analizy ekspresji genów *Wcor80* i *cor14b* w warunkach hartowania na mróz (izolacja RNA i odwrotna transkrypcja) u wyselekcjonowanych form

introgresywnych BC₆.

Testy zimotrwałości prowadzono w 1 lokalizacji – w Szelejewie (DANKO Hodowla Roślin) dla 792 obiektów roślinnych z następujących populacji BC₆: 185/4, 185/6, 185/10 i 185/12 oraz dla populacji *L. multiflorum* odm. Atos. W pracach fizjologiczno-molekularnych wykorzystano dwie formy introgresywne z populacji BC₆-185/4: 185/4/28 – o stosunkowo najwyższym poziomie tolerancji stresów środowiskowych (w układzie susza/zima) oraz 185/4/49 – o stosunkowo najniższym poziomie tolerancji stresów środowiskowych.

Oceny zimotrwałości dokonano na podstawie: (i) oszacowania suchej i mokrej masy roślin, które przezimowały oraz (ii) potencjału odrostu roślin, które przezimowały. Analiza fizjologicznych markerów tolerancji suszy prowadzona była w symulowanych warunkach laboratoryjnych. Rośliny poddano działaniu krótkotrwałej suszy (11 dni) w doniczkach w warunkach szklarniowych. W trakcie prowadzenia eksperymentu wykonano następujące pomiary fizjologiczne: zawartość wody (WC), relatywna zawartość wody (RWC), wyciek elektrolitów (EL) oraz fluorescencja chlorofilu, bazując na materiale roślinnym w postaci liści. Parametry fizjologiczne analizowano w warunkach kontrolnych i 11 dniu suszy oraz w 10 dni po rozpoczęciu nawadniania (Kosmala i in. 2012). Analiza fizjologicznych markerów

tolerancji mrozu prowadzona była w symulowanych warunkach fitotronowych. Każdą formę introgressywną poddano pre-hartowaniu (7 dni), a następnie hartowaniu (21 dni). Badanie uszkodzeń błon komórkowych u dwóch wyselekcjonowanych form polegało na konduktometrycznym pomiarze wycieku elektrolitów z uszkodzonych tkanek liści po mrożeniu, po różnym czasie hartowania roślin w niskiej temperaturze. Wyznaczono wartość T_{EL50} (temperatura powodująca 50% wyciek elektrolitów) dla każdego badanego momentu hartowania (Kosmala i in. 2006, 2007 i 2009; Augustyniak i in. 2018). Izolację RNA i odwrotną transkrypcję prowadzono przy wykorzystaniu komercyjnych zestawów odczytników (Pawłowicz i in. 2017).

Opis wyników

Zaobserwowano duże różnice w potencjale plonowania po zimie dla poszczególnych populacji form introgressywnych. Średnie populacyjne dla wybranych parametrów plonowania w przypadku trzech populacji (185/4, 185/6 i 185/10) były wyższe, a w przypadku jednej populacji (185/12) niższe w odniesieniu do średnich populacyjnych dla form kontrolnych *L. multiflorum*. Wyselekcjonowane do prac fizjologiczno-molekularnych dwie formy introgressywne, cechowały się zróżnicowanym stopniem odporności na sekwencję stresów środowiskowych – forma 185/4/28 miała wysoki stopień zimotrwałości i odporności na suszę, natomiast forma 185/4/49 – niski stopień zimotrwałości i odporności na suszę.

U obu wyselekcjonowanych form introgressywnych zaobserwowano istotny spadek uwodnienia tkanek liścia w warunkach suszy, na podstawie oznaczonych parametrów zawartości wody w komórkach. Forma introgressywna 185/4/49 wykazała niższe wartości WC i RWC w 11 dniu suszy, w porównaniu do formy 185/4/28. Po powtórnym nawodnieniu, obie formy nie wykazywały różnic w analizowanych parametrach, natomiast zaobserwowano u nich istotny wzrost wartości WC i RWC, w odniesieniu do wartości w 11 dniu suszy. Badane formy introgressywne różniły się również większością parametrów fluorescencji chlorofilu w warunkach suszy, obrazujących poziom aktywności fotosystemu II. Parametry te osiągały niższe wartości u formy introgressywnej 185/4/49.

Wyselekcjonowane formy introgressywne charakteryzowały się stosunkowo niskim poziomem mrozoodporności, ale forma 185/4/28 była bardziej mrozoodporna. Efektywność hartowania na mróz była niewielka w przypadku obu form introgressywnych.

Zebrano 90 próbek tkanki roślinnej (liście) w warunkach hartowania na mróz dla każdej wyselekcjonowanej formy introgressywnej. W dalszej kolejności z każdej z próbek wyizolowano RNA. Wszystkie próbki mRNA poddano odwrotnej transkrypcji. Uzyskane pule cDNA zostaną wykorzystane w reakcji RT-PCR w czasie rzeczywistym, celem określenia ekspresji genów *Cor14b* i *Wcor80* w warunkach niskiej temperatury na poziomie transkryptu, w kolejnym roku trwania projektu.

Wnioski z prowadzonych badań

mrozoodporność nie była głównym czynnikiem warunkującym zimotrwałość wyselekcjonowanych form introgressywnych,

poziom wyciek elektrolitów jest dobrym markerem fizjologicznym poziomu mrozoodporności badanych form introgressywnych traw,

wartości fizjologicznych wskaźników odporności na suszę (WC, RWC, EL i większość parametrów fluorescencji chlorofilu) odzwierciedlały poziom tolerancji stresów środowiskowych badanych form introgressywnych.

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.
- Pawłowicz, I., Rapacz, M., Perlikowski, D., Gondek, K., Kosmala, A. (2017). Abiotic stresses influence the transcript abundance of PIP and TIP aquaporins in *Festuca* species. *J. Appl. Genet.* 58: 421–435.

Badanie cech warunkujących zawiązywanie nasion, ich jakość oraz plon w wybranych gatunkach traw wieloletnich

The examination of traits affecting seed formation as well as seed quality and yield in selected perennial grass species

Grzegorz Żurek ¹✉, Danuta Martyniak ¹, Kamil Prokopiuk ¹, Agnieszka Rachwalska ², Eugenisz Paszkowski ³, Maciej Jurkowski ⁴

¹ Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Państwowy Instytut Badawczy, 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.,

✉ e-mail: g.zurek@ihar.edu.pl, tel. 22 7334571

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.802.19.2018, Zadanie nr 38.

Słowa kluczowe: *Lolium perenne*, *Poa pratensis*, produktywność generatywna, wiechlina łąkowa, zmienność, życica trwała

Badania, realizowane od roku 2015 mają na celu określenie zróżnicowania wewnątrz- i międzyobiekowego badanych form traw wieloletnich (kostrzewy czerwonej, kostrzewy trzcinowej, kostrzewy łąkowej, życicy trwałej oraz wiechliny łąkowej) w obrębie zestawu cech związanych z plonowaniem generatywnym, jak również wybranych cech fizjologicznych mierzonych w różnych fazach dojrzałości jak np. zawartość azotu w liściach, określana pośrednio za pomocą pomiaru zawartości chlorofilu. W badaniach przyjęto hipotezę że istnieje korelacja pomiędzy tą cechą a cechami składowymi plonu nasion, ich jakością oraz samym plonem. Korelacja ta może być ograniczona do konkretnych genotypów bądź dotyczyć całych gatunków. Badania podzielono na 2 etapy, gdzie w pierwszym (2014 – 2017) badano kostrzewy a od roku 2018 badane są wiechlina łąkowa i życica trwała. Celem prac realizowanych w roku 2019 było określenie zróżnicowania badanych obiektów pod względem cech fenologicznych, morfologicznych, chemicznych (np. termin kłoszenia i kwitnienia, wysokość roślin, zawartość chlorofilu, azotu itp.) oraz warunkujących plonowanie nasienne w drugim, pełnym roku wegetacji roślin wiechliny łąkowej (*Poa pratensis* L.) i życicy trwałej (*Lolium perenne* L.).

Materiały i Metody

Badano 14 obiektów w wymienionych powyżej gatunkach: odmiany Alicja, Balin, Bila, Compact, Limagie i rody: NI-400, NI-401 we wiechlinie oraz Amarant 4n, Bajka 2n, Brawa 4n, Nira 2n i rody: DS-117, NI-402, NI-403 w życicy, w układzie doświadczenia ścisłego, wielopowtórzeniowego w 4 lokalizacjach w kraju (Radzików, Szelejewo, Nieznanice i Grodkowice). Rośliny oceniano pod względem 18 cech: przezimowania, pokroju, początku kłoszenia i kwitnienia, szacunkowego plonu zielonej masy w pełni kłoszenia, wysokości roślin w pełni kwitnienia, długości i szerokości liścia podflagowego, względnej zawartości chlorofilu, zawartości azotu w roślinach, liczby pędów generatywnych na roślinie, plonu nasion z kwiatostanu, z rośliny oraz z poletka, długości kwiatostanu, osypywania nasion, ciężaru 1000 nasion oraz zdolności kiełkowania.

Wyniki

Wiechlina łąkowa

W roku 2019 nie stwierdzono istotnego wpływu warunków lokalizacji doświadczenia na początek fazy kwitnienia oraz na zawartość azotu ogólnego w roślinach. Nie stwierdzono

negatywnego wpływu zimy 2018/2019 na ekspresję badanych cech u większość roślin. Kłoszenie zaczęło się najwcześniej w Radzikowie (3 maja) a najpóźniej – w Szelejewie (13 maja). Z badanych obiektów najwcześniejsza była odmiana Balin (początek kłoszenia – 3 maja) a najpóźniejsza, podobnie jak w roku 2018 – odmiana Alicja (początek kłoszenia – 13 maja).

Cechy morfologiczne oraz chemiczne (zawartość chlorofilu oraz azotu) były silnie zdeterminowane warunkami, w jakich prowadzono badania, aczkolwiek wysokość roślin oraz względna zawartość chlorofilu były silniej związane ze specyfiką badanych genotypów. Najwyższe rośliny stwierdzono dla odmiany Compact (średnio 66,9 cm), a najniższe dla odmiany Alicja (średnio 48,9 cm). Podobnie zdeterminowana była względna zawartość chlorofilu, która była relatywnie najwyższa dla odmiany trawnikowej Compact (średnio 1,75), a najniższa dla odmiany pastewnej Balin (1,54).

Względna zawartość chlorofilu (CCI) była związana z zawartością azotu (N-og.) w roślinach zależnością liniową o następującym przebiegu:

$$N\text{-og.} = 1,1064 \cdot CCI - 0,0054 \quad (R^2=0,4975).$$

Interakcja pomiędzy specyfiką genotypową oraz lokalnymi warunkami realizacji doświadczeń decydowała o stwierdzonej w roku 2019 zmienności badanych populacji. Potwierdzono również dominujący wpływ genotypu jako nośnika genetycznych cech plonowania nasiennego wiechliny łąkowej oraz istotność zależności plonu nasion od interakcji genotypowo-środowiskowej (Żyłka i Prończuk, 1998; Godshalk i wsp., 1998). W niniejszych badaniach stwierdzono istnienie takiej interakcji dla takich cech jak: długość kwiatostanu, liczba pędów generatywnych oraz plon nasion z rośliny. Obiektem o najwyższych plonach nasion, z równocześnie znaczną liczbą pędów generatywnych była, podobnie jak w roku 2018, odmiana Compact (średnio 16,42 grama nasion z rośliny oraz 235 pędów generatywnych). Nieco mniej zanotowano dla odmiany Balin (10,4 g i 135 pędów). Średnie wartości plonu nasion z rośliny pozostałych badanych form były niższe o ok. 10 g.

Porównanie zmienności międzyobiektywnej i wewnątrzobiektywnej wskazuje na mniejsze zróżnicowanie w obrębie badanych form niż pomiędzy nimi co znajduje potwierdzenie w literaturze (np. Huff, 2010). W przypadku cech warunkujących plonowanie nasienne, ocenianych w roku 2019 było to szczególnie wyraźne dla następujących obiektów i cech: Balin (liczba pędów generatywnych oraz plon nasion z poletka), Bila (liczba pędów generatywnych oraz plon nasion z rośliny) oraz

Ni-400 (liczba pędów generatywnych, plon nasion z poletka oraz masa tysiąca ziarniaków). Stwierdzono również istnienie zależności odwrotnych, gdzie np. w wypadku rodu Ni-401 zmienność liczby pędów generatywnych oraz plonu nasion z poletka przewyższała zmienność międzyobiektywą.

Życica trwała:

Czynnikiem najsilniej modyfikującym badane cechy u obiektów życicy trwałej, podobnie jak w przypadku wiechliny łąkowej, były warunki lokalizacji doświadczeń. Nie dotyczyło to jedynie liczby dni do kłoszenia oraz zawartości chlorofilu i azotu. Zróżnicowanie wczesności życicy trwałej jest istotne dla zabezpieczenia podaży zielonki o odpowiedniej jakości w miarę długo w sezonie wegetacyjnym. Odstęp pomiędzy najwcześniej i najpóźniej kłoszącymi się odmianami w tym roku wynosił 16 dni (w roku 2018 – 29 dni). Na fakt ten składało się kłoszenie rodu DS.-117 w Radzikowie (22 maja) oraz Ni-402 w Szelejewie (7 czerwca).

W kształtowaniu zmienności cech biometrycznych oraz chemicznych istotną rolę odgrywała specyfika genetyczna badanych obiektów, z kolei warunki środowiskowe realizacji doświadczenia (lokalizacje) nie miały wpływu na zróżnicowanie zawartości chlorofilu i azotu. Zależności te były konsekwencją zastosowania obiektów o zróżnicowanej ploidalności. Odmiany diploidalne życicy trwałej (Bajka i Nira) charakteryzowały się niższymi od odmian tetraploidalnych (Amarant i Brawa) wartościami parametrów biometrycznych jak: wymiary liścia podflagowego czy względna zawartość chlorofilu. Odmiany tetraploidalne w stosunku do diploidalnych miały liście średnio o 24% dłuższe oraz 25% szersze oraz względną zawartość chlorofilu większą o 37%, co było efektem większej o 22% zawartości azotu. Podobnie jak w roku ubiegłym najbardziej zielone liście (o największej zawartości chlorofilu) miały rośliny rodu DS.-117 (średnio 4,95), z kolei najniższą wartość tej cechy zanotowano dla rodu Ni-403 (średnio 1,993) oraz odmiany Bajka (1,98).

Zawartość chlorofilu (CCI) była wypadkową zawartości azotu ogólnego w roślinie (N-og.):

$$N\text{-og.} = 0,4401 \cdot CCI + 0,8614 \quad (R^2=0,5302).$$

Zmienność cech związanych z reprodukcją generatywną była również zdeterminowana specyfiką lokalizacji, w których realizowano doświadczenie oraz genetycznych predyspozycji badanych obiektów. Odmiany tetraploidalne miały wyższe plony nasion średnio o 35% w stosunku do diploidalnych, co wiązało się m.in. z wykształcaniem większych nasion (średnio o 89%) w stosunku

do form diploidalnych. Formy diploidalne miały jednocześnie średnio o ok. 40 sztuk więcej pędów generatywnych od form tetraploidalnych. Najlepsze warunki do wykształcania nasion wystąpiły w Szelejewie (średni plon z rośliny – 13,3 g) oraz Radzikowie (średnio 10,3 g). Najniższe plony nasion stwierdzono w Nieznanicach (9,6 g na roślinę).

Wnioski

W drugim roku realizacji doświadczenia potwierdzono istotny wpływ specyfiki lokalnych warunków klimatycznych w lokalizacjach doświadczenia na zmienność większości badanych cech. Czynnikiem klimatycznym, istotnie modyfikującym ekspresję większości badanych cech były opady atmosferyczne.

Potwierdzono większą stabilność tj. mniejszą podatność na modyfikacje przez warunki lokalizacji doświadczenia, obiektów życicy trwałej w stosunku do wiechliny łąkowej.

Zmienność w obrębie badanych w 2019 roku, obiektów wiechliny łąkowej, podobnie jak w roku ubiegłym, była we większości przypadków większa od zmienności pomiędzy badanymi obiektami (międzyobiektovej). Z kolei w wypadku życicy trwałej zmienność wewnątrzobiektovej większości cech była porównywalna do zmienności międzyobiektovej.

Literatura

- Huff, D.R. (2010). Bluegrasses. W: Boller B. (wyd.) 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 x environment interaction effects on orchardgrass seed and forage production. *Agronomy Abstracts*, ASA, Madison, p. 67.
- Żyłka, D., Prończuk, S. (1997). Zmienność cech morfologicznych i biologicznych ekotypów wiechliny łąkowej wybranych z Zasobów Genowych na użytkowanie trawnikowe. *Zeszyty Probl. PNR PAN*, z. 463: 499–507.

Badania nad saturacją mapy genetycznej ‘Elsanta’ x ‘Senga Sengana’ pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria x ananassa*).

Research on saturation of the genetic map of ‘Elsanta Senga’ x ‘Sengana’ for locating genes linked to important traits of strawberry (*Fragaria x ananassa*)

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz ✉, Agnieszka Masny, Bogusława Idczak, Krystyna Strączyńska

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach,
ul Pomologiczna 18, 96–100 Skierniewice,
✉ e-mail: sylwia.keller@inhort.pl, tel. 46 8345254

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.802.4.2019, Zadanie nr 74.

Słowa kluczowe: jakość owoców, korelacja fenotypowo-genotypowa, mapa genetyczna, *Phytophthora cactorum*, QTL, truskawka

Celem badań było pozyskanie subpopulacji segregującej ‘Elsanta’ x ‘Senga Sengana’ (oznaczonej jako subpopulacja H) i ocena fenotypowa roślin mieszańcowych należących do tej populacji pod kątem odporności na grzyba *P. cactorum*, sprawcę zgnilizny korony korzeni truskawki, a także ocena wybranych parametrów jakości owoców pojedynków należących do przygotowanej do tego celu subpopulacji A, utrzymywanej w kwaterze polowej. Pojedynki z subpopulacji H 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 H (132 genot.) poddano analizie fenotypowej pod kątem parametrów jakości owoców (subpop. A) oraz podatności na grzyba *Phytophthora cactorum* (subpop. H). 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 w roku bieżącym wytypowano 100 starterów mikrosatelitarnych (Sargent D.J. 2006, 2007, 2008, 2009,

2012.; Zorrilla-Fontanesi Y. 2011). Na podstawie przeprowadzonych testów PCR-SSR, dotychczas zidentyfikowano 763 allele polimorficzne, segregujące w genomach roślin mieszańcowych (Van Ooijen. 2001). Dla 736 z nich zidentyfikowano loci na mapie genetycznej genomów odmian ‘Elsanta’ oraz ‘Senga Sengana’ (Rys. 1). Utworzona mapa genetyczna odmiany ‘Elsanta’ zawiera 478 alleli markerów SSR sprzężonych łącznie w 46 grupach LG, natomiast mapa genetyczna genomu odmiany ‘Senga Sengana’ zawiera 514 alleli rozlokowanych w 45 grupach sprzężeń. Grupy te stanowią fragmenty siedmiu chromosomów genomu gatunku *Fragaria*. Wielkości sporządzonych map genetycznych wyniosły odpowiednio: 950 cM dla genomu odmiany ‘Elsanta’ i 853 cM dla genomu odmiany ‘Senga Sengana’.

Ocenę korelacji fenotypowo-genotypowych w subpopulacjach badanych w latach 2014 – 2019 (A i H), przeprowadzono po potwierdzeniu statusu mieszańców (analiza polimorfizmu DNA po amplifikacji z 5 oligonuleotydami mikrosatelitarnymi). W wyniku przeprowadzonych testów, w badanej puli roślin mieszańcowych subpopulacji H nie odnotowano genotypów pochodzących z niekontrolowanego zapylenia.

Analiza zależności pomiędzy loci alleli markerów oraz wartościami ocenianych parametrów

fenotypowych w roślinach miszańcowych wykazała istotny stopień korelacji między badanymi cechami jakości owoców, a markerami SSR zlokalizowanymi w grupie sprzężeń LG 2 genomów obu odmian ($K^* \geq 10,5$). Ponadto wysoki poziom wpływu odnotowano pomiędzy markerami zlokalizowanymi w grupie sprzężeń LG 6 i 7 genomu odmiany ‘Senga Sengana’ ($K^* > 7$), a odpornością na porażenie grzybem *P. cactorum*. W przypadku odmiany ‘Elsanta’ niewielki stopień korelacji ($K^* < 5$) pomiędzy loci markerów a badaną cechą odporności zidentyfikowano w LG 3, 4, 5 genomu tej formy rodzicielskiej. Istotną zależność pomiędzy jędrnością owoców, zawartością ekstraktu oraz witaminy C, a markerami zlokalizowanymi odpowiednio w grupach LG 4 (Vit. C i jędrność) i 5 (Bix i Vit. C) zidentyfikowano również w genomach obu badanych form rodzicielskich. (Sujeet V. 2017, Nellist

C.F. 2019) (Tab.1).

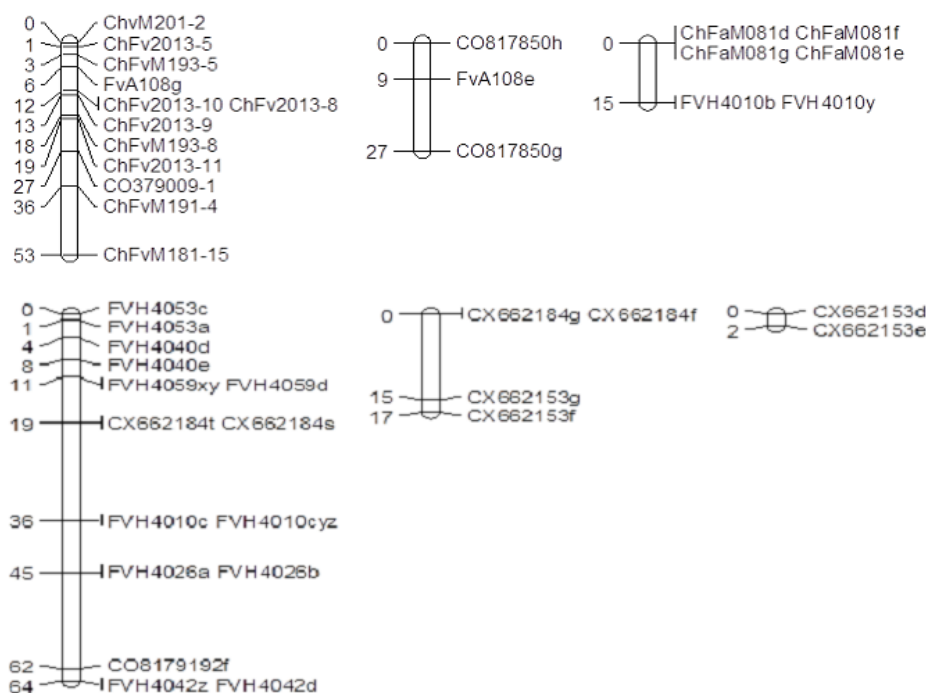
Na tym etapie badań wytypowano markery (ChFaM092, FVH4040, FVH4059, CX662153, FVH4010, CHF182, CX661428) regulujące parametry warunkujące jakość owoców (dane z sezonów 2016–2019), dla których odnotowano sezonowo – stabilną wartość współczynnika korelacji. Markery, te mogą stanowić bazę dla selekcji genotypów produkujących wysokiej jakości owoce truskawki, uzyskanych w programach hodowlanych.

Dodatkowo, na podstawie analiz segregacji 85 alleli różnicujących obie formy rodzicielskie przeprowadzono analizę terminalną wybranych regionów QTL. Loci segregujących alleli polimorficznych zidentyfikowano w obrębie czternastu (344 cM), w przypadku odmiany ‘Elsanta’ oraz jedenastu (288 cM) w przypadku odmiany ‘Senga Sengana’, zmapowanych fragmentów pochodzących

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
LG 5, 6	$K^* 4$	$K^* 6$	Zgnilizna korony korzeni
LG 3, 4, 5	$K^* 5$	$K^* 8$	Jędrność
LG 6, 7	$K^* 10$	$K^* 10,8$	Zaw. ekstraktu, wit.C



Rys. 1. Fragment mapy genetycznej genomu gatunku *Fragaria* (analiza populacji ‘Elsanta’ x ‘Senga Sengana’).

z chromosomów *Fragaria*. Uzyskany region genomu odmiany 'Elsanta' – zawiera 50 alleli, a genomu odmiany 'Senga Sengana' – zawiera 36 alleli markerów SSR.

Wnioski

Rozkład cechy odporności na porażenie grzybem *P. cactorum* 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.

Zagęszczona mapa genetyczna 'Elsanta' x 'Senga Sengana' stanowi bazę loci genów przydatną do dalszej identyfikacji regionów QTL sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki.

Rozkład alleli pochodzących z form rodzicielskich wskazuje, że genotypy wykorzystane dla celów zagęszczania mapy genomów truskawki mają status mieszańców z planowanego zapylenia.


Wstępna analiza regionów QTL w grupach sprzężeń LG 2, 6 i 7 genomów badanych odmian truskawki wskazuje na korelacje markerów z badanymi cechami użytkowymi tego gatunku.


Literatura

- Nellist, C.F., Vickerstaff, R.J., Sobczyk, M.L., Mariana-Montes, C., Wilson, F.M., Simpson, D.W., Whitehouse, A.B., Harrison, R.J. (2019). Quantitative trait loci controlling *Phytophthora cactorum* resistance in the cultivated octoploid strawberry (*Fragaria xananassa*). *Horticulture Research* 6/60.
- 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., Batten, 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 x 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 x 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, Jason D Zurn, Natalia Salinas, Megan M Mathey, Beatrice Denoyes, James F Hancock, Chad E Finn, Nahla V Bassil, Vance M Whitaker, 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.

Badania nad możliwością zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w owocach truskawki na drodze hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*

Studies on possibilities of increasing of bioactive compounds in strawberry fruits through intra- and interspecific hybridization within *Fragaria* genus

Agnieszka Masny , Monika Mieszczakowska-Frać, Anita Kuras, Edward Żurawicz

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,
 e-mail: agnieszka.masny@inhort.pl, tel. 46 8345273; 501622880

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.802.4.2019, Zadanie nr 76.

Słowa kluczowe: antocyjany, jakość owoców, kwas L-askorbinowy, polifenole, truskawka

Prace badawcze nad poszerzaniem zmienności genetycznej u truskawki prowadzone obecnie w Instytucie Ogrodnictwa ukierunkowane są głównie na poprawę zewnętrznej i wewnętrznej jakości owoców. Celem badań 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 z wykorzystaniem hybrydyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*.

Materiały i Metody

Dla uzyskania celu badań zrealizowano trzy tematy szczegółowe: Temat 1 – oceniono plonowanie, wielkość, atrakcyjność, kształt, barwę, połysk i jędrność owoców oraz podatność roślin na choroby liści 180 mieszańców pokolenia F₁, otrzymanych ze skrzyżowania w obrębie rodzaju *Fragaria*, a także skład chemiczny owoców 90 wybranych klonów; Temat 2 – dla 60 genotypów o najwyższej zawartości w owocach polifenoli i antocyjanów ogółem, metodą HPLC wykonano szczegółową analizę związków z grupy polifenoli, procyanidyn, antocyjanów i kwasu elagowego; Temat 3 – metodą SSR potwierdzono status mieszańca dla 20 genotypów z rodzaju *Fragaria*, wyselekcjonowanych w latach 2017–2019,

odznaczających się dużą zawartością związków polifenolowych i antocyjanów w owocach.

Wyniki i Dyskusja

Najlepszą jakością zewnętrzną owoców wyróżniały się genotypy: T-201407–02 i T-201407–03 ('Camarosa' × 'Pink Rosa'), T-201426–03 ('Konfitura' × 'Grandarosa'), T-201436–04 i T-201436–05 ('Onda' × 'Grandarosa'), T-201437–02 ('Onda' × 'Pink Rosa'), T-201444–01 ('Roxana' × 'Pink Rosa'), T-201453–02 ('Sugar Lia' × 'Grandarosa'), T-201457–10, T-201457–16 i T-201457–17 ('Grandarosa' × 'Elsanta'), T-201487–05 ('Polka' × 'Matis'), T-201488–06 ('Vibrant' × 'Matis'), T-201501–03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201511–01 ('Asia' × 'Panvik'), T-201512–05 i T-201512–06 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201514–04 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201526–06 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201536–01, T-201536–02, T-201536–05, T-201536–06, T-201536–07 i T-201536–09 ('Clery' × 'Grandarosa') oraz T-201560–07 ('Onda' × 'Panvik'). Najwyższym poziomem kwasu askorbinowego w owocach (powyżej 90 mg/100 g) odznaczały się klony: T-201501–03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201526–02 i T-201526–05 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201536–08 i T-201536–15 ('Clery' × 'Grandarosa'), T-201537–02 ('Clery' × 'Matis'), T-201539–01 ('Darselect' × 'Grandarosa'), T-201555–02, T-201555–08 i T-201555–09 ('Marmolada' × 'Grandarosa') oraz T-201567–01

i T-201567–03 ('Patty' × 'Panvik'). Najwięcej związków fenolowych (powyżej 430 mg/100 g) zawierały owoce genotypów: T-201501–02 i T-201501–03 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201512–04 i T-201512–05 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201567–01, T-201567–02 i T-201567–04 ('Patty' × 'Panvik') oraz T-201585–01 (*Fragaria chiloensis* Yaquina A × 'Matis'). Bardzo wysoką zawartość antocyjanów, przekraczającą 50 mg/100 g owoców, stwierdzono w owocach klonów T-201508–01 ('Alice' × 'Matis'), T-201512–03 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201514–02 i T-201514–08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201517–05 ('Chandler' × 'Matis'), T-201567–04 ('Patty' × 'Panvik') oraz T-201580–01 (*Fragaria chiloensis* Del Norte × 'Elsanta'). Zawarte w truskawkach składniki bioaktywne pełnią istotną rolę w diecie człowieka dzięki właściwościom antyoksydacyjnym i antykancerogennym (Battino i in., 2017; Zasowska i in., 2016).

Wykazano, że badane klony różniły się profilem antocyjanów, jednak zawsze dominującym związkiem był glukozyd pelargonidyny, którego udział procentowy mieścił się w przedziale 45,0% do 91,1%, a następnie malonyloglikozyd pelargonidyny (0,7% – 34,1%). Pozostałe antocyjany: glukozyd cyjanidyny, rutozyd pelargonidyny i malonyloglikozyd cyjanidyny stanowiły maksymalnie 16,9; 10,2 i 10,8% wszystkich antocyjanów. Najwyższy procentowy udział w grupie monomerycznych związków fenolowych miała katechina, której zawartość w owocach mieściła się w zakresie od 3,3 do 39,3 mg/100 g. Najwyższą zawartością tego związku charakteryzowały się owoce genotypów: T-201458–01 ('Pink Rosa' × 'Elsanta' – 39,3 mg/100 g) i T-201457–03 ('Grandarosa' × 'Elsanta' – 25,7 mg/100 g). Oprócz katechiny, w owocach odnotowano również śladowe ilości innych monomerów flawanoli takich jak: epikatechina, afzelechina i epiafzelechina. Zawartość procyanidyn w owocach badanych klonów wahała się od 96,9 do 721,3 mg/100 g. Najwięcej oligomerów procyanidyn (powyżej 400 mg/100 g) zawierały owoce następujących genotypów: T-201458–01 i T-201458–09 ('Pink Rosa' × 'Elsanta') oraz T-201457–03 i T-201457–16 ('Grandarosa' × 'Elsanta'). Zawartość kwasu elagowego w owocach większości badanych klonów truskawki wynosiła od 20 do 45 mg/100 g świeżej masy owoców. Najwyższą zawartość tego składnika (powyżej 45 mg/100 g) stwierdzono w owocach klonów: T-201501–02 ('Alba' × 'Grandarosa'), T-201560–08 ('Onda' × 'Panvik') i T-201457–03 ('Grandarosa' × 'Elsanta').

W wyniku przeprowadzonych 2160

reakcji amplifikacji z testowanymi parami starterów uzyskano 544 amplikony o długości od 170 do 520 pz, z których 84% było polimorficznych. Analizowane genotypy scharakteryzowano na podstawie 8–15 polimorficznych fragmentów DNA. Status mieszańca potwierdzono dla wszystkich testowanych genotypów. Określono procentowy udział amplikonów pochodzących od formy matecznej, który wynosił od 73% do 33%. Najwyższy udział fragmentów DNA charakterystycznych dla formy matecznej obserwowano na matrycy DNA wydzielonych z genotypów nr: 1 ('Chandler' × 'Grandarosa'), 13 ('Vibrant' × 'Matis'), 19 ('Candiss' × 'Matis') oraz 6 ('Onda' × 'Pink Rosa'), 7 ('Patty' × 'Elsanta'), 11 (*F. chil.* Del. Norte × 'Grandarosa') i 14, 15 ('Alba' × 'Grandarosa'), najniższy zaś dla siewek nr 8 ('Sophie' × 'Grandarosa') i 12 ('Polka' × 'Matis'). Użycie markerów mikrosatelitarnych pozwala na jednoznaczny identyfikację genotypów (Govan i in. 2008).

Wnioski

- Klony T-201437–02 ('Onda' × 'Pink Rosa'), T-201453–02 ('Sugar Lia' × 'Grandarosa'), T-201511–01 ('Asia' × 'Panvik'), T-201512–05 i T-201512–06 ('Camarosa' × 'Panvik'), T-201514–08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201536–02, T-201536–06, T-201536–07, T-201536–09 i T-201536–15 ('Clery' × 'Grandarosa') oraz T-201560–07 ('Onda' × 'Panvik'), ze względu na wysoką zewnętrzną jakość owoców i odporność lub małą podatność na choroby liści, są genotypami perspektywicznymi do uprawy towarowej.
- Owoce klonów T-201510–02 (rodowód 'Asia' × 'Matis'), T-201514–02 i T-201514–08 ('Candiss' × 'Panvik'), T-201517–05 ('Chandler' × 'Matis'), T-201526–01 i T-201526–04 ('Cigaline' × 'Grandarosa'), T-201567–03 i T-201567–04 ('Patty' × 'Panvik') oraz T-201571–02 ('Sophie' × 'Pink Rosa'), ze względu na wysoką zawartość związków polifenolowych, antocyjanów, a także kwasu askorbinowego, są bardzo cenne dla zdrowia człowieka.
- Owoce klonów: T-201457–03 ('Grandarosa' × 'Elsanta'), T-201458–01 ('Pink Rosa' × 'Elsanta') oraz T-201560–08 ('Onda' × 'Panvik'), ze względu na wysoką zawartość monomerów antocyjanów, kwasu elagowego, katechiny i procyanidyn, są bardzo wartościowe dla prawidłowego odżywiania się.
- Istnieje możliwość kontrolowanego zapylania genotypów w obrębie rodzaju *Fragaria*

(mieszance o potwierdzonym statusie metodą SSR stanowią 100% testowanych genotypów z rodzaju *Fragaria*).

Literatura

- Battino, M., Forbez-Hernandez, T. Y., Gasparrini, M., Afrin, S., Mezzetti, B., Giampieri, F. (2017). The effects of strawberry bioactive compounds on human health. *Acta Hort. (ISHS)* 1156: 355–362. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2017.1156.54>
- Govan, C.L., Simpson, D.W., Johnson, A.W., Tobutt, K.R., Sargent, D.J. (2008). A reliable multiplexed microsatellite set for genotyping *Fragaria* and its use in a survey of 60 *F. × ananassa* cultivars. *Molecular Breeding*, 22: 649–661.
- Zasowska-Nowak, A., Nowak, P.J., Bialasiewicz, P., Prymont-Przyminska, A., Zwolinska, A., Sarniak, A., Włodarczyk, A., Markowski, J., Rutkowski, K.P., Nowak, D. (2016). Strawberries added to the usual diet suppress fasting plasma paraoxonase activity and have a weak transient decreasing effect on cholesterol levels in healthy nonobese subjects. *Journal of the American College of Nutrition*, 35 (5): 422–35.

Ocena potencjału genetycznego wybranych genotypów borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) w oparciu o czynnikowy układ krzyżowań

Evaluation of the genetic potential of selected genotypes of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) based on a factorial crossing design

Stanisław Pluta ✉, Bogusława Badek, Łukasz Seliga

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,
✉ e-mail: stanislaw.pluta@inhort.pl, tel. 46 8345315

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji nr HOR.hn.802.4.2019, Zadanie nr 72.

Słowa kluczowe: cechy użytkowe, formy rodzicielskie, GCA, ocena fenotypowa, SCA

Celem podjętych w 2019 roku badań było określenie zdolności kombinacyjnej 12 genotypów rodzicielskich borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) na podstawie oceny ich efektów ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej (GCA i SCA) dla wybranych cech użytkowych, potwierdzenie statusu mieszańca dla 10 najcenniejszych genotypów, ocena fenotypowa 20 wyselekcjonowanych pojedynków i 2 odmian standardowych pod kątem wybranych cech morfologicznych roślin oraz ocena sensoryczna i instrumentalna jakości owoców wartościowych pojedynków i odmian rodzicielskich.

Materiał badawczy stanowiła populacja 2100 siewek pokolenia F_1 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 na poletku.

W roku 2019 realizowano 4 tematy badawcze. W pierwszym temacie wykonano ocenę fenotypową wszystkich siewek borówki wysokiej pod względem wybranych cech użytkowych (siła wzrostu i pokrój roślin, intensywność kwitnienia, plonowanie roślin i masa owoców).

Borówka amerykańska (wysoka, północnego typu) ma specyficzne wymagania w uprawie tego gatunku krzewów owocowych. Prawidłowy wzrost i rozwój, kwitnienie oraz plonowanie roślin i wielkość (masa) owoców uzależnione są od czynników genetycznych (genotypu) i warunków środowiska oraz ich współdziałania (interakcji). Współdziałanie genotypu i środowiska (GxE) jest zjawiskiem biologicznym, określanym jako niejednakowa reakcja genotypów na warunki środowiskowe (Mądry i in. 2006). Do drugiej grupy czynników należy zaliczyć: wybór odpowiedniego stanowiska, kwaśna gleba (pH 4,5–5,5) i jej przygotowanie (wzbogacenie w substancję organiczną) oraz wszystkie zabiegi pielęgnacyjne i agrotechniczne, w tym niezbędne nawadnianie kropłowe (Smolarz 2003; Smolarz i Pluta 2014). W naszych badaniach wykazano, że młode siewki borówki wysokiej należące do 35 rodzin mieszańcowych różniły się siłą wzrostu. Większość ocenianych młodych siewek borówki miała średnio-rozłożysty lub średnio-wzniesiony pokrój krzewu. Oceniane siewki różniły się także w intensywności kwitnienia, większość z nich kwitła słabo lub średnio. Intensywność kwitnienia siewek miała bezpośredni wpływ na zawiązanie owoców i plonowanie roślin, które było także zróżnicowane. Średnia masa (wielkość) owoców ocenianych siewek była również zróżnicowana i uzależniona od genotypu i jego rodowodu, czyli od krzyżowanych form rodzicielskich.

Na podstawie wyników oceny fenotypowej

populacji siewek oszacowano zdolność kombinacyjną (GCA i SCA) 12 odmian rodzicielskich borówki wysokiej dla w/w cech użytkowych. Ogólna zdolność kombinacyjna (GCA) pod względem rozpatrywanej cechy jest przeciętnym poziomem tej cechy w potomstwie rozpatrywanej formy rodzicielskiej. Jest ona miarą addytywnego działania genów na tą cechę (Griffing, 1956 a, b) i określa ogólną przydatność form rodzicielskich do tworzenia nowych odmian roślin uprawnych. Specyficzna zdolność kombinacyjna (SCA) dla rozpatrywanej cechy odnosi się do pary form rodzicielskich i jest interakcją (współdziałaniem) obu form rodzicielskich, ujawnianą w postaci zachowania tej cechy w ich potomstwie. Jest wynikiem nieaddytywnego działania genów – dominacji i epistazy (Ubysz-Borucka i in. 1985). Istotnie pozytywne lub negatywne efekty SCA oszacowane są tylko w niektórych kombinacjach krzyżowań i wskazują na poprawę (dodatnie) lub pogorszenie (ujemne) wartości cech u potomstwa. Wysokie i istotne wartości efektów SCA, stwierdzone w poszczególnych populacjach mieszańcowych dotyczą najczęściej pojedynczych cech użytkowych roślin (Spangelo i in. 1971).

Spośród 12 genotypów rodzicielskich istotne (na plus lub minus) wartości efektów GCA miały następujące odmiany: ‘Bluecrop’ (+) – wysokość i szerokość roślin, plon owoców i masa owoców; ‘Brigitta Blue’ (-) – wysokość i szerokość roślin, plon owoców; ‘Chandler’ (-) – szerokość roślin, masa owoców; ‘Draper’ (-) – masa owoców; ‘Duke’ (+) – wysokość i szerokość roślin, intensywność kwitnienia, plon owoców; ‘KazPliszka’ (-) – wysokość i szerokość roślin, intensywność kwitnienia, plon owoców i masa owoców; ‘Polaris’ (+) – intensywność kwitnienia, plon owoców i masa owoców; ‘Toro’ (+) – plon owoców; ‘Weymouth’ (+) – intensywność kwitnienia (tab. 1). Odmiany rodzicielskie posiadające dodatnie efekty GCA, są donorami genów warunkujących poprawę w/w cech, podczas gdy genotypy rodzicielskie wykazujące ujemne efekty GCA mają wpływ na pogorszenie cech u potomstwa ocenianych siewek.

Oszacowane efekty SCA dla 35 rodzin mieszańców przyjmowały także istotne dodatnie i ujemne wartości dla ocenianych cech użytkowych borówki wysokiej. Istotne i dodatnie wartości efektów SCA dla wysokości roślin stwierdzono dla 2 rodzin, a istotne ujemne dla innych 4 rodzin; odpowiednio dla szerokości roślin – 4 rodziny (+) i 3 rodziny (-); intensywności kwitnienia – 4 rodziny (+) i 6 rodzin (-); plonu owoców – 5 rodzin (+) i 7 rodzin (-); masy owoców – 2 rodziny (+) i 4 rodziny mieszańcowe (-). Oznacza to, że genetyczne

współdziałanie obu odmian rodzicielskich borówki wysokiej w ramach tych rodzin mieszańcowych warunkuje z dużym prawdopodobieństwem poprawę lub pogorszenie wartości ocenianych cech użytkowych u potomstwa.

W drugim temacie wykonano analizy molekularne w celu weryfikacji statusu mieszańca dla wybranych 10 pojedynczków otrzymanych z programu krzyżowania w/w form rodzicielskich borówki wysokiej. Badania molekularne, identyfikujące odmianę na podstawie polimorfizmu DNA (genetyczny odcisk palca, *DNA fingerprinting*), okazały się niezależne od czynników środowiskowych i są możliwe do przeprowadzenia nawet z niewielkiego fragmentu rośliny, a także krótki czas potrzebny dla uzyskania stosunkowo wiarygodnego wyniku (Janick i in. 1996). Tradycyjna hodowla twórcza roślin wykorzystuje markery molekularne, które umożliwiają odróżnianie roślin na podstawie polimorfizmu ich materiału genetycznego (Nybom 1994). Markery takie przede wszystkim ułatwiają dobór form (odmian) rodzicielskich i wczesną identyfikację mieszańców w programach krzyżowań.

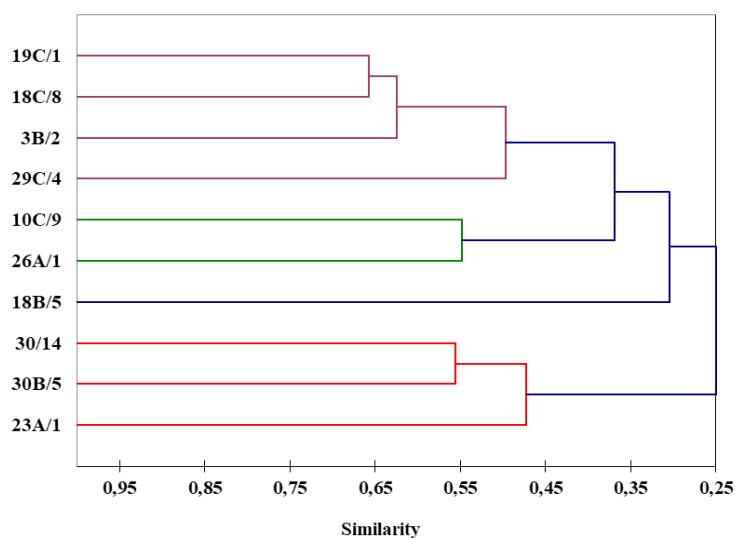
Dla analizowanych genotypów potwierdzono status genetyczny mieszańca, porównując ich wzory prążkowe (uzyskane w reakcji PCR z 10 wytypowanymi starterami SSR), z wzorami form rodzicielskich. Zgromadzona baza produktów amplifikacji posłużyła również do określenia pokrewieństwa genetycznego analizowanych pojedynczków. Pokrewieństwo genetyczne analizowanych pojedynczków borówki wysokiej, określone w oparciu o dane uzyskane w wyniku przeprowadzonych testów SSR, kształtowało się na poziomie 28–67% (rys. 1). Dla 10 wytypowanych do badań pojedynczków opracowano zestawy starterów SSR stanowiące tzw. metki identyfikacyjne, charakterystyczne dla profilu genetycznego każdej z analizowanych roślin. Uzyskane wyniki są zbieżne z danymi literaturowymi, dotyczącymi rodowodów badanych odmian rodzicielskich (Boches i in. 2006; Levi i Rowland 1997; Quililongo i in. 2013).

W trzecim temacie badawczym wykonano wstępną ocenę siły wzrostu roślin 20 wyselekcjonowanych pojedynczków i 2 odmian standardowych (‘Duke’ i ‘Bluecrop’) borówki wysokiej rozmnożonych 2 metodami (*in vitro* i *ex vitro* – sadzonki zielne). Odmiany borówki wysokiej uprawiane w Polsce oraz w innych krajach świata rozmnażane są wegetatywnie przy użyciu powszechnych metod: kultur *in vitro* oraz *ex vitro* (sadzonyki zielne, półzdrewniałe i zdrewniałe). O rozmnażaniu *in vitro* borówki wysokiej donosili w świecie (Zimmerman i Broome 1980; Debnath 2007; Rużić i in. 2012)

Tabela 1.

Wartości efektów GCA 12 odmian rodzicielskich borówki wysokiej dla wybranych cech użytkowych, Skierniewice, 2019; (program statystyczny SERGEN).

Nr matki lub ojca	Formy rodzicielskie	Wysokość roślin (cm)	Szerokość roślin (cm)	Intensywność kwitnienia (skala bon. 1-9)	Plon owoców (kg/poletko)	Masa owoców (g)
Analiza względem form matecznych (♀)						
1	Aurora	-3,338	-3,015	-0,034	-0,015	0,188
2	Bluecrop	12,307**	9,795**	0,036	0,068*	0,273*
3	Brigitta Blue	-9,218**	-7,105**	-0,339	-0,080**	0,143
4	Chandler	-5,368	-6,25**	-0,099	-0,024	0,258*
5	Draper	1,087	1,10	-0,339	-0,036	-0,357**
6	Duke	6,077*	5,135*	0,581**	0,088**	-0,102
7	Northland	-1,548	0,34	0,191	0,068	0,188
<i>Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie</i>		2,76	2,76	0,10	0,10	0,10
		3,93	0,05	0,05	0,05	0,05
		6,89	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie</i>		6,21	6,21	0,10	0,10	0,10
		7,54	0,05	0,05	0,05	0,05
		10,75	0,01	0,01	0,01	0,01
Analiza względem form ojcowskich (♂)						
8	Earliblue	-1,436	-0,526	-0,232	-0,021	0,180
9	KazPliszka	-4,911*	-4,008*	-0,768**	-0,118**	-0,571**
10	Polaris	2,896	2,003	0,443**	0,064**	0,198*
11	Toro	2,818	2,471	0,168	0,060*	0,170
12	Weymouth	0,632	0,06	0,389**	0,015	0,023
<i>Wartości krytyczne dla testowania indywidualnego na poziomie</i>		2,76	2,76	0,10	0,10	0,10
		3,93	0,05	0,05	0,05	0,05
		6,89	0,01	0,01	0,01	0,01
<i>Wartości krytyczne dla testowania jednoczesnego na poziomie</i>		5,59	5,59	0,10	0,10	0,10
		6,89	0,05	0,05	0,05	0,05
		10,06	0,01	0,01	0,01	0,01

Objaśnienie: * - wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha=0,05$ **- wartości istotnie różne od średniej ogólnej przy poziomie $\alpha=0,01$ 

Rys. 1. Dendrogram obrazujący pokrewieństwo 10 wytypowanych do badań pojedynków borówki wysokiej, opracowany zgodnie z metodą Jaccard-Dice/UPGMA w oparciu o dane uzyskane w reakcjach SSR-PCR.

oraz w Polsce (Orlikowska 1986).

Doświadczenie odmianowo-porównawcze założono na polu w Sadzie Pomologicznym w Skierniewicach, jesienią 2018 roku. Wstępne wyniki siły wzrostu młodych roślin borówki wysokiej wskazują na małe zróżnicowanie testowanych genotypów rosnących w nowo założonym doświadczeniu, średnio nieco silniej rosły rośliny rozmnażane *in vitro*. Wyniki badań prowadzone przez Krzewińską i współautorów (2006) potwierdziły tezę, że rośliny borówki wysokiej (3 odmian) rozmnożone metodą *in vitro* rosły silniej niż rośliny rozmnożone z sadzonek.

W czwartym temacie wykonano ocenę sensoryczną i instrumentalną owoców 20 wyselekcjonowanych pojedynków borówki wysokiej na podstawie oceny sensorycznej i instrumentalnej dla uzyskania informacji, czy w oparciu o użyte formy rodzicielskie możliwe jest uzyskanie nowych genotypów o ulepszonych cechach jakościowych owoców. Owoce borówki wysokiej należą do wybitnie deserywowych, chętnie są spożywane w stanie świeżym, a także przetworzonym. Są to bardzo wartościowe owoce, o wysokich właściwościach prozdrowotnych, zawierają one witaminy: A, B₁, B₂, B₃, fosfor, potas, wapń, sód, kwas foliowy i fitoestrogeny (Kalt i in. 1999; Ścibisz i in. 2004). Wysokie właściwości prozdrowotne tych owoców wynikają z wysokiej zawartości w/w związków, polifenoli (w tym antocyjanów), a także witaminy C. Było to potwierdzone badaniami w Polsce (Mitek in. 2001; Ścibisz i in. 2004; Skupień K. 2006) oraz za granicą (Kalt i in. 1999; Ehlenfeldt i Prior 2000; Zeng i Wang 2003). Związki te mają korzystny wpływ na trawienie, ochronę oczu czy profilaktykę i leczenie chorób nowotworowych.

Materiał badawczy stanowiły próbki owoców o masie ok. 0,5 kg. Ocena sensoryczna (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. Kilka wybranych pojedynków pochodzących od takich odmian rodzicielskich, jak: ‘KazPliszka’, ‘Brigitta Blue’, ‘Bluecrop’ i ‘Draper’ wytwarzało atrakcyjne i smaczne owoce oraz miały także wysoką zawartość ekstraktu i wit. C. Należy podkreślić, że w naszych badaniach niektóre wyselekcjonowane pojedynki dorównywały lub trochę przewyższały odmiany rodzicielskie

pod względem jakości owoców w ocenie sensorycznej i instrumentalnej.

Wnioski z prowadzonych badań

- Ocena fenotypowa siewek borówki wysokiej rosnących w doświadczeniu polowym wskazuje na duże ich zróżnicowanie pod względem ocenianych cech użytkowych (siła wzrostu, pokrój roślin, intensywność kwitnienia, plonowanie i masa owoców).
- Badane odmiany rodzicielskie borówki wysokiej różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) dla w/w cech użytkowych.
- Oszacowane wartości efektów GCA dla 12 wybranych odmian rodzicielskich borówki wysokiej oraz efektów SCA dla 35 rodzin mieszańcowych przyjmują wartości dodatnie i ujemne. Zatem odmiany te, użyte w programach krzyżowań, mogą przyczynić się do poprawy lub pogorszenia wartości analizowanych cech u potomstwa.
- Zastosowanie techniki molekularnej SSR-PCR umożliwia uzyskanie bogatej biblioteki fragmentów polimorficznych, które są użyteczne w dalszych pracach nad zróżnicowaniem i oceną pokrewieństwa odmian (genotypów) borówki wysokiej.
- Otrzymany dendrogram rodowodowy stanowi cenne wskazówki przy doborze komponentów (form) rodzicielskich do tworzenia nowych odmian tego gatunku.
- Opracowane „metki identyfikacyjne” mogą być wykorzystane do potwierdzenia statusu mieszańców uzyskanych w wyniku krzyżowania wybranych form rodzicielskich.
- Wybrane genotypy borówki wysokiej mogą być z powodzeniem wegetatywnie rozmnażane w kulturach *in vitro* oraz *ex vitro* (sadzonki zielne).
- Jednoroczne rośliny testowanych genotypów borówki wysokiej rozmnażane *in vitro* rosną trochę silniej niż uzyskane *ex vitro* z sadzonek zielnych.
- Owoce badanych pojedynków i odmian rodzicielskich borówki wysokiej różnią się w ocenie sensorycznej (atrakcyjność i smak) oraz instrumentalnej (zawartość ekstraktu i witaminy C).

Literatura

- Boches, P., Bassil, N. V., Rowland, L. (2006). Genetic diversity in the highbush blueberry evaluated with microsatellite markers. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 131(5): 674–686.
- Debnath, S.C. (2007) Propagation of *Vaccinium in vitro*:

- A review—International journal of fruit science, Taylor & Francis, 47–71.
- Ehlenfeldt, M., Prior, L. (2000). Oxygen radical absorbance capacity (ORAC), phenolic, and anthocyanin concentration in fruit and leaf tissue of highbush blueberry. (abstract) Hort Science 35: 487.
- Griffing, B., (1956a). A generalised treatments of diallel crosses in quantitative inheritance. Heredity 10: 31–50.
- Griffing, B., (1956b). Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing systems. Austr. J. Biol. Sci. 9: 463–493.
- Janick, J., Cummins, J.N., Brown, S.K., Hemmat, M. (1996). Apples. In: Janick, J., Moore, J.N., eds, Fruit Breeding, Vol I: Tree and Tropical Fruits. John Wiley and Sons, New York 1–77.
- Kalt, W., Forney, C. F., Martin, A., Prior, R. L. (1999). Antioxidant capacity, vitamin C, phenolics, and anthocyanins after fresh storage of small fruits. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47 (11): 4638–4644.
- Krzewińska, D., Smolarz, K., Czynczyk, A., Chlebowska, D. (2006). Porównanie siły wzrostu i owocowania roślin borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) rozmnożonych metodą tradycyjną i *in vitro*. Zeszyty Naukowe ISK, 14: 61–69.
- Levi, A., Rowland, L. J. (1997). Identifying blueberry cultivars and evaluating their genetic relationships using randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) and simple sequence repeat- (SSR-) anchored primers. Journal of the American Society for Horticultural Science, 122 (1), 74–78.
- Mitek, M., Ścibisz, I., Niewczas, J. (2001). Właściwości przeciwutleniające owoców borówki wysokiej. In: XXXII Sesja Nauk. PAN, H. Porzucek and T. Haber (eds), SGGW Warszawa: (CD) 1–6.
- Nybom, H. (1994). DNA fingerprinting—a useful tool in fruit breeding. Euphytica, 77: 59–64.
- Orlikowska, T. (1986). Micropropagation of highbush blueberry. Fruit Sci. Rep. 13: 105–115.
- Ružić, D., Vujović, T., Libiakova, G. (2012). Micropropagation *in vitro* of highbush blueberry (*Vaccinium corymbosum* L.) Journal of Berry Research 2: 97–103.
- Smolarz K. 2003. Wybór i przygotowanie pola pod plantację borówki. Hasło Ogrodnicze 10: 61 – 62.
- Smolarz, K., Pluta, S. (2014). Cultivation of the High-Bush Blueberry in Poland. Acta Hort. 1017: 199 – 204
- Skupień, K. (2006). Chemical composition of selected cultivars of highbush blueberry fruit (*Vaccinium corymbosum* L.). Folia Hort. 18/2: 47 – 56.
- Spangelo, L.P., Watkins, R., Hsu, C.S., Fejer, S.O., (1971). Combining ability analysis in the cultivated strawberry. Can. J. Plant Sci., 51: 377–383.
- Ścibisz, I., Mitek, M., Serwinowska, K. (2004). Aktywność przeciwutleniająca soków i półkoncentratów otrzymanych z owoców borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.). Żywność. Nauka. Technologia. Jakość, 2004, 3 (40) Supl., 196–203.
- Quililongo, C. M., Wheeler, P. V., Cumplido, L. V., Ramírez, M. R., & Fica, J. E. (2013). Efficiency of RAPD in assessing genetic variation in commercially viable local varieties of blueberry (*Vaccinium*). Agricultural Sciences, 4: 238.
- Ubysz-Borucka, L., Mądry, W., Muszyński, S. (1985). Podstawy statystyczne genetyki cech ilościowych w hodowli roślin. Wydawnictwo SGGW-AR, Warszawa: 220 ss.
- Zeng, W., Wang, S.H., 2003. Oxygen radical absorbing capacity of phenolics in blueberries, cranberries, chokeberries and lingonberries. J. Agric. Food Chem. 51: 502–509.
- Zimmerman, R.H. and O.C. Broome. (1980). Blueberry micropropagation, pp. 44–47. In: Proc. Conf. on Nursery Prod. of Fruit Plants Through Tiss. Cult. – Applications and Feasibility. USDA-SEA, Agr. Res. Results ARR-NE-11.

Badania nad możliwością poszerzenia zmienności genetycznej maliny właściwej (*Rubus idaeus*) pod względem pory dojrzewania i jakości owoców

The research on the possibility of extending the genetic variability of red raspberry (*Rubus idaeus*) in terms of different ripening time and fruit quality

Agnieszka Masny ✉, Danuta Kucharska, Monika Mieszczakowska-Frać, Anita Kuras, Edward Żurawicz

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,
✉ e-mail: agnieszka.masny@inhort.pl, tel. 46 8345273; 501622880

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.802.4.2019, Zadanie nr 75.

Słowa kluczowe: hodowla maliny, odmiany maliny, siewki maliny

W zasobach genetycznych Instytutu Ogrodnictwa znajduje się wiele genotypów maliny właściwej (*Rubus idaeus*), różniących się wieloma cechami biologicznymi, ważnymi z użytkowego punktu widzenia. Celem prowadzonych badań jest weryfikacja hipotezy zakładającej, że metodą hodowli konwencjonalnej możliwe jest poszerzenie istniejącej zmienności genetycznej w obrębie tego gatunku, poprzez wykorzystanie potencjału genetycznego wybranych odmian maliny właściwej, pochodzących z różnych regionów geograficznych świata.

Materiały i Metody

Dla uzyskania celu badań wykonano cztery szczegółowe tematy badawcze, w ramach których oceniono populację siewek należących do 55 rodzin mieszańców. Otrzymanych ze skrzyżowania w roku 2014 w układzie diallelicznym (II metoda Griffinga), oraz ich 10 form rodzicielskich ('Canby', 'Glen Ample', 'Laszka', 'Polana', 'Polka', 'Radziejowa', 'Schönemann', 'Sokolica', 'Veten', 'Willamette'). Oceniano następujące cechy roślin: plon, atrakcyjność, wielkość i barwa owoców, koleczastość pędów oraz wysokość i pokrój krzewów (Temat 1). W kulturach *in vitro* oceniono możliwość rozmnożenia 10 pojedynków maliny właściwej, wyselekcjonowanych w latach 2016–2018 (Temat 2). Z wykorzystaniem metod spektrofotometrycznych i chromatograficznych wykonano analizy chemiczne owoców 40

najcenniejszych klonów i ich form rodzicielskich (Temat 3). Metodą SSR przeprowadzono analizy molekularne wybranych 10 klonów maliny właściwej (dla potwierdzenia ich mieszańcowego statusu) i opracowano ich profile genetyczne „DNA-fingerprinting” (Temat 4).

Wyniki i Dyskusja

Stwierdzono, że badane populacje roślin maliny właściwej – siewki oraz ich formy rodzicielskie, bardzo różnią się pod względem ocenianych cech fenotypowych oraz że siewki badanej populacji mieszańców w różnym stopniu łączą cechy fenotypowe form rodzicielskich, tworząc genotypy o innowacyjnych cechach. Uzyskane wyniki wskazują, że możliwe jest połączenie w jednym genotypie zdolności do wytwarzania wysokiej jakości owoców, zdolności do letnio-jesiennego owocowania, bezkolcowości pędów, małej podatności na choroby i szkodniki oraz wysokiego stopnia samopłodności (Żurawicz, 2016; Żurawicz i in., 2018). Najwartościowsze pojedynki (o innowacyjnych cechach w stosunku do użytych form rodzicielskich) zostały rozmnożone (rozklonowane) i posadzone w kolekcji klonów. Klony te owocowały w roku 2019, co umożliwiło dokonanie ich oceny fenotypowej i zebranie reprezentatywnych prób owoców dla wykonania oceny ich jakości wewnętrznej (analiz chemicznych).

Badano możliwość szybkiego rozmnożenia

in vitro 10 pojedynków malin, wyselekcjonowanych w 2017 roku. Stwierdzono, że liczba wypadów pąków inicjalnych wahała się od 16,7 do 77,2 procent. Odsetek pąków inicjalnych, który pozostał w kulturach *in vitro* do dalszego namnażania, zależał przede wszystkim od genotypu, a także od pory pobierania pąków. Najslabiej przebiegała izolacja w miesiącach styczeń-marzec z pąków zimowych. Wiele z nich miało zawiązki kwiatostanów i te pąki zamierały po przeniesieniu do warunków *in vitro*. Ponadto, wiele z nich miało objawy szklistości. Bardziej efektywne były izolacje w miesiącach maj-czerwiec, kiedy pąki wierzchołkowe są dobrze wykształcone. Wpływ genotypu zaznaczał się silnie również na etapie namnażania kultur oraz ukorzenia. Widoczne były bardzo duże różnice w potencjale rozmnożeniowym genotypów tzw. 'łatwych', z których uzyskanie pędów z przeznaczeniem do ukorzenia nie sprawiało większych trudności, takich jak pojedynki 297, 325, 395 oraz genotypów 'opornych', takich jak 381, 388, 400 czy 403. Jednak dla większości genotypów uzyskanie dostatecznej liczebności pędów, przydatnych do ukorzenia wymagało 2–3 pasaży na pożywcę do namnażania pędów. Współczynnik namnażania wahał się od 0,8 do 3,9 pędów z jednego eksplantatu. Efektywność ukorzenia *in vitro* i aklimatyzacji była zależna od genotypu i wahała się od 63,5% do 91,2%, ale wykazano, że badane genotypy można dość łatwo rozmnożyć i włączyć do dalszych badań.

Analizy chemiczne owoców 40 klonów maliny właściwej, otrzymanych z rozmnożenia najlepszych pojedynków, wyselekcjonowanych wcześniej z populacji siewek i ich form rodzicielskich wykazały, że badane genotypy były zróżnicowane pod względem zawartości badanych związków chemicznych w owocach. Zawartość ekstraktu badanych owoców maliny mieściła się w przedziale 9 – 15 °Bx, przy czym większość genotypów posiadała ekstrakt w zakresie 10–11 °Bx (31 próbek). Najwięcej ekstraktu stwierdzono w owocach klonów 403 i 271 oraz odmiany 'Willamette'. Zawartość polifenoli ogółem mieściła się w przedziale 298 – 543 mg/100 g, przy czym najwyższą zawartość polifenoli stwierdzono w owocach klonu nr 207, a następnie nr 341. Średnia zawartość polifenoli ogółem w owocach badanych czterdziestu genotypów wynosiła 388 mg/100 g, przy czym zawartość związków fenolowych w owocach 20 genotypów była wyższa od tej wartości średniej. Zawartość antocyjanów w badanych owocach mieściła się w zakresie 2–93 mg/100 g. Średnia wartość antocyjanów w owocach badanych genotypów wynosiła 41 mg/100 g; w owocach 22 badanych klonów

wykazano zawartość antocyjanów powyżej wartości średniej. Najwyższą zawartością antocyjanów odznaczały się owoce klonu nr 341. Kwas cytrynowy był dominującym kwasem organicznym w owocach badanych klonów maliny, jego zawartość kształtowała się na poziomie 1065 – 2509 mg/100 g. Najwięcej kwasu cytrynowego zawierały owoce klonów nr 317 i nr 336 oraz odmian 'Polana' i 'Polka'. Zawartość kwasu jabłkowego w malinach mieściła się w przedziale 34 – 99 mg/100 g, największą jego zawartością odznaczały się owoce klonów nr 336, 400, 42 i 412 oraz odmian 'Willamette' i 'Poemat'. Zawartość kwasu askorbinowego w owocach badanych genotypów była na poziomie 12–46 mg/100 g. Spośród badanych genotypów, w owocach 14 klonów stwierdzono wyższą zawartość kwasu askorbinowego, w porównaniu do wartości średniej, która wynosiła 21 mg/100 g. Najwięcej kwasu askorbinowego zawierały owoce klonu nr 95. W owocach odmiany 'Radziejowa' oraz genotypów o nr 341, 387 i 400 stwierdzono wyższą zawartość polifenoli ogółem, antocyjanów, jak i kwasu L-askorbinowego w porównaniu do wartości średnich tych związków, uzyskanych dla wszystkich badanych prób. Wykonując krzyżowanie istniejących odmian maliny można więc uzyskać nowe genotypy, które pod względem zawartości składników bioaktywnych będą przewyższać odmiany rodzicielskie.

Przeprowadzono 1.562 reakcje amplifikacji, w których wygenerowano 174 amplikony, w tym 170 polimorficznych. Wykazano, że długość uzyskanych amplikonów wahała się od 110 do 520 pz. Każdy z testowanych genotypów został oceniony na podstawie 7–10 charakteryzujących go fragmentów DNA. Status mieszańca z planowanego zapylenia potwierdzono dla wszystkich testowanych genotypów. Określono również procentowy udział amplikonów pochodzących od formy matecznej, który wynosił od 100 do 27%. Ponadto oszacowano procentowy udział alleli pochodzących od formy ojcowskiej, wynosił on od 73 do 25%. Najwyższy udział fragmentów DNA charakterystycznych dla formy matecznej obserwowano na matrycy DNA wydzielonych z genotypu nr 6 ('Polana' x 'Schönemann'), najniższy zaś dla genotypu nr 279 ('Radziejowa' x 'Schönemann'). Dla wszystkich testowanych genotypów opracowano ich profil genetyczny „DNA-fingerprinting” metodą SSR z wytypowanymi 5 parami oligonukleotydów.

Wniosek

U gatunku *Rubus idaeus* (malina właściwa) istnieje możliwość poszerzenia istniejącej zmienności genetycznej pod względem wielu cech

fenotypowych i jakości owoców, przy wykorzystaniu odmian pochodzących z różnych regionów geograficznych świata (zróżnicowanych genetycznie).

Literatura

Żurawicz, E. (2016). Cross-pollination increases the number

of drupelets in the fruits of red raspberry (*Rubus idaeus* L.). Acta Hortic. 1133: 145-151; DOI 10.17660/Acta Hortic. 2016.1133.22.

Żurawicz, E., Studnicki, M., Kubik, J., Pruski, K. (2018). A careful choice of compatible pollinizers significantly improves the size of fruits in red raspberry (*Rubus idaeus* L.). Sci. Hortic. 235: 253 — 257.

Analiza czynników warunkujących organogenezę agrestu (*Ribes grossularia* L.) w kulturach *in vitro* i *in vivo* oraz ocena genetyczna i fenotypowa otrzymanego materiału

The analysis of factors determining *in vitro* and *in vivo* organogenesis of gooseberry (*Ribes grossularia* L.), genetic and phenotypic assessment of obtained material

Danuta Kucharska ✉, Danuta Wójcik, Aleksandra Trzewik, Teresa Orlikowska, Angelika Niewiadomska-Wnuk

Instytut Ogrodnictwa Skierniewice,

✉ e-mail: danuta.kucharska@inhort.pl, tel. 46 8345506

Badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. (Dz. U. poz. 1170, z późn. zm.). Zadanie nr 79.

Słowa kluczowe: agrest, DNA, kultury *in vitro*, organogeneza, polimorfizm,

Temat 1.

Obserwacja roślin w doświadczeniu odmianowo-porównawczym i wykonanie oceny fenotypowej w warunkach *in vivo*.

Cel

Obserwacje i ocena fenotypowa roślin rozmnożonych w kulturach *in vitro* i tradycyjnie, rosnących w doświadczeniu odmianowo – porównawczym, w warunkach polowych.

Opis wyników

Materiał do badań stanowiły młode rośliny 15 genotypów agrestu, rozmnożone w kulturach *in vitro* oraz tradycyjnie, rosnące w doświadczeniu odmianowo-porównawczym. Większość roślin była w dobrej kondycji po zimie. Parametry wzrostu wskazują, że silniej rosły krzewy rozmnożone *in vitro*. Przyrost wysokości i szerokości krzewów z *in vitro* był od 2,5 do 3 razy większy w porównaniu do rozmnażanych przez sadzonki zielne. Liczba pędów w roślinach z *in vitro* była dwukrotnie większa w porównaniu do rozmnożonych tradycyjnie. Procent krzewów z owocami był znacznie wyższy u roślin mnożonych tradycyjnie.

Wnioski

- Przyrost wysokości i szerokości oraz liczba pędów agrestu *in vitro* były od 2 do 3 razy większe w porównaniu do rozmnażanych przez sadzonki zielne.
- Niezależnie od metody rozmnażania największe porażenie przez amerykańskiego

mączniaka agrestu stwierdzono u odmiany ‘Biały Triumf’, a przez antraknozę liści na genotypach: ‘Biały Triumf’, ‘Hinnonmaki Rot’, 86 oraz 117.

Temat 2.

Określenie wpływu mikrorozmnażania agrestu na zachowanie jednorodności genetycznej i powstawanie zmienności somaklonalnej w obrębie gatunku.

Cel

Analiza zmienności somaklonalnej 5 genotypów agrestu przy użyciu techniki AFLP i przygotowanie preparatów DNA do analizy zmienności somaklonalnej kolejnych 5 genotypów.

Opis wyników

Przeprowadzono analizę zmienności genetycznej 13–15 roślin *in vitro* oraz rośliny mateczne pięciu odmian agrestu. Liczba produktów generowanych przez pary starterów AFLP wahała się od 33 do 108, średnio wynosiła 52,2. Najwyższą z DNA roślin ‘Hinnonmaki Rot’ (300), a najmniejszą z odmian ‘Hinsel’ i ‘Resika’ (262). Zmienność genetyczna analizowana metodą AFLP w roślinach z *in vitro* różniła się dla poszczególnych odmian i wahała się od 1,03% dla odmiany ‘Captivator’ do 10,3% w przypadku odmiany ‘Hinsel’, w przypadku tej odmiany reakcje AFLP-PCR ze wszystkimi parami starterów generowały produkty polimorficzne. Dla pozostałych odmian produkty polimorficzne uzyskano w reakcji z 2–3

parami starterów.

Wnioski

- Potwierdzono skuteczność techniki AFLP w detekcji stopnia zmienności somaklonalnej u agrestu generowanej przez kultury *in vitro*, który różnił się w zależności od odmiany.
- Odmiany ‘Captivator’, ‘Invicta’, ‘Hinnonmaki Rot’ i ‘Resika’ wykazują stabilność genetyczną w kulturach *in vitro*. Zastosowanie opracowanej metody rozmnażania *in vitro* agrestu pozwala uzyskać rośliny jednorodnie genetycznie.
- Odmiana ‘Hinsel’ charakteryzuje się wyższym stopniem zmienności w kulturach *in vitro*.
- Zastosowanie komercyjnych zestawów do izolacji genomowego DNA pozwala na uzyskanie preparatów DNA przydatnych do dalszej analizy AFLP.
- Wydajność izolacji genomowego DNA oraz czystość preparatów jest uzależniona od odmiany.

Temat 3

Analiza polimorfizmu DNA genotypów agrestu przy użyciu techniki RAPD i ISSR.

Cel

Analiza jednorodności genetycznej sadzonek *in vitro* i wegetatywnych 5 genotypów agrestu z zastosowaniem markerów ISSR.

Opis wyników

Izolacja genomowego DNA z liści 5 genotypów agrestu (sadzonyki *in vitro* i wegetatywne, rośliny mateczne) przy użyciu trzech zestawów komercyjnych DNeasy® Plant Mini Kit, NucleoSpin® 96 Plant kit i DNA Plant/Fungi DNA Isolation Kit pozwoliła na uzyskanie DNA o stężeniu od 7,8 do 55,1 ng/μl i wartości współczynnika 260/280 nm od 1,61 do 2,00. W wyniku analizy ISSR-PCR z pięcioma starterami dla 5 badanych genotypów uzyskano łącznie 2294 produktów amplifikacji, z czego 64 (2,8%) produktów było polimorficznych. Wielkości otrzymanych produktów amplifikacji wahały się w granicach 250 – 2900 pz, w zależności od startera i odmiany. Zastosowane startery różniły się w ilości generowanych produktów PCR, ich liczba w odmianie ‘Invicta’ wahała się od 42 dla startera 834 do 168 dla startera 849. Analiza ISSR-PCR wskazała na różny stopień polimorfizmu wśród badanych genotypów, od jego braku, w przypadku odmian ‘Hinnonmaki Rot’ i ‘Resika’, do 11,6% dla odmiany ‘Hinsel’.

Wnioski

- Zastosowane komercyjne zestawy do izolacji genomowego DNA są efektywne w uzyskiwaniu

preparatów DNA z liści agrestu o stężeniu i jakości odpowiedniej do analizy techniką ISSR.

- Potwierdzono skuteczność techniki ISSR w uzyskaniu markerów pozwalających na identyfikację pięciu genotypów oraz w detekcji polimorfizmu DNA dla trzech odmian.

Temat 4

Wpływ zastosowanych warunków kultury na wydajność procesu fotosyntezy u mikrosadzonek agrestu w kulturach *in vitro* oraz warunkach szklarniowych.

Cel

Ocena parametrów fizjologicznych oraz aktywności fotosyntetycznej pędów *in vitro* oraz *ex vitro* po zastosowaniu różnych cytokinin.

Opis wyników

Materiałem badawczym były ukorzone mikrosadzonyki odmian agrestu ‘Invicta’ i ‘Pax’, oraz klonów hodowlanych 2/33 i 102, po zastosowaniu pożywek do namnażania, z dodatkiem cytokininy BAP lub *meta*-Topoliny. Wzrost pędów *in vitro* na pożywce z BAP był mniej intensywny dla wszystkich badanych genotypów agrestu. Widoczne było żółknięcie liści i nekrozy pędów. W pędach mnożonych na pożywce z BAP poziom etylenu był wyższy dla wszystkich genotypów w porównaniu do *meta*-Topoliny. Zaznaczył się wpływ rodzaju cytokininy na zawartość cukrów rozpuszczalnych, których poziom był wyższy w pędach mnożonych na pożywce z *meta*-Topoliną dla wszystkich badanych genotypów agrestu. Również w warunkach *ex vitro* zaznaczył się następczy wpływ rodzaju cytokininy na zawartość chlorofilu, który był wyższy u wszystkich genotypów po pożywce z *meta*-Topoliną. Uzyskane w badaniach wartości parametrów Fv/Fm na poziomie 0,82 dla klonu 102 i 0,81 dla odmiany ‘Pax’ niezależnie od rodzaju pożywki wskazują na dość wysoki potencjał fotosyntetyczny mikrosadzonek agrestu. Jedynie w odmianie ‘Invicta’ parametr ten wykazywał wartości niższe. Zaznaczyła się tendencja korzystnego wpływu *meta*-Topoliny na ten wybrany parametr u wszystkich genotypów.

Wnioski

- Rodzaj użytej cytokininy ma wpływ na wybrane parametry fizjologiczne mikrosadzonek agrestu, zarówno w kulturach *in vitro* jak i warunkach *ex vitro*.
- Pędy *in vitro* mnożone na pożywce z *meta*-Topoliną wydzielaly mniej etylenu, miały większą zawartość cukrów rozpuszczalnych i chlorofilu oraz wykazywały większą aktywność aparatu fotosyntetycznego.

Charakterystyka markerów molekularnych, sprzężonych z odpornością na wielkopąkowca porzeczkowego (*Cecidophyopsis ribis*)

Characteristics of molecular markers linked with the resistance to gall mite (*Cecidophyopsis ribis*)

Anita Kuras ✉, Bogumiła Badek, Stanisław Pluta, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Bogusława Idczak, Renata Góralska, Krystyna Strączyńska

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach, 96–100 Skierniewice, ul. Pomologiczna 18,
✉ e-mail: anita.kuras@inhort.pl, tel 46 8345460

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.802.4.2019, Zadanie nr 78.

Słowa kluczowe: mapa genetyczna, marker, porzeczkowa czarna, wielkopąkowiec porzeczkowy

Wielkopąkowiec porzeczkowy (*Cecidophyopsis ribis*), najgroźniejszy szkodnik w uprawie czarnej porzeczki, jest wektorem rewersji porzeczki czarnej (*BRV* – Black Currant Reversion Virus), 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 szpecieła 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 w/w badaniach jest agrest (*R. grossularia*), a typu P – *R. nigrum* ssp. *Sibiricum* (Brennan i in. 2008; Mazeikiene i in. 2012). 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.

Cel badań prowadzonych w 2019 roku:

- ocena polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony związane z cechą odporności porzeczki na *C. ribis*, oparta na metodzie sekwencjonowania
- zagęszczanie kolejnych grup sprzężeń mapy genetycznej odmian ‘Ceres’ i ‘Bona’

— określenie korelacji genotypowo-fenotypowych w celu identyfikacji fragmentów DNA regulujących cechę odporności na *C. ribis* oraz weryfikacja wytypowanych sekwencji markerowych pod kątem ich przydatności do selekcji genotypów odpornych i podatnych na wielkopąkowca porzeczkowego.

Materiał i Metody

Materiał badawczy do analiz molekularnych stanowiły rośliny pochodzące z kolekcji IO (100 roślin) i rodziny mieszańców ‘Ceres’ x ‘Bona’, poddane corocznej ocenie fenotypowej pod względem stopnia zasiedlenia przez wielkopąkowca.

Wyniki

Do monitorowania regionów genomu porzeczki czarnej użyto markerów mikrosatelitarnych 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. Ocenę polimorfizmu w grupach sprzężeń obejmujących regiony Ce i P dwunastu genotypów *Ribes* (kolekcja IO), zróżnicowanych pod względem odporności na *C. ribis*, oparto na sekwencjonowaniu matryc DNA. Analizę sekwencji przeprowadzono przy użyciu programu komputerowego CEQ 8000 software v.9.0.

Analiza porównawcza wykazała zróżnicowanie układu sekwencji amplikonów genotypów odpornych i wrażliwych. Do uzyskanych sekwencji zaprojektowano specyficzne oligonukleotydy.

W następnym etapie badań skupiono się na zagęszczaniu mapy genetycznej porzeczek czarnej odmian ‘Ceres’ i ‘Bona’ uzyskanej w latach 2017–2018. Konstrukcję mapy oparto łącznie na 30 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’ x ‘Bona’, zidentyfikowano 229 alleli polimorficznych, segregujących dla genotypów mieszańcowych. W 2019 roku mapa genomu porzeczek wzbogacona została o 52 allele. Mapa genetyczna genomu odmiany ‘Ceres’ zawierała 76 loci rozlokowanych w obrębie 15 grup sprzężeń, homologicznych do chromosomów I, II, III, IV, V, VI i VII genomu porzeczek czarnej, o łącznej długości 476 cM. Natomiast na sporządzonej mapie genomu odmiany ‘Bona’ zlokalizowano 69 alleli markerów SSR sprzężonych w 16 grupach wykazujących homologię z opublikowanymi dotychczas mapami referencyjnymi porzeczek czarnej (*Ribes nigrum*) w obrębie LG1, LG2, LG3, LG4, LG5, LG6 i LG7, o łącznej długości 527cM. 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.

Ocenę stopnia korelacji genotypowo-fenotypowych (analiza QTL) pomiędzy cechą odporności na wielkopąkowca porzeczkowego, a położeniem markerów SSR na sporządzonej w latach 2017–2019 mapie genetycznej populacji ‘Ceres’ x ‘Bona’ przeprowadzono przy użyciu programu MapQTL 6.0. Najsilniejszą współzależność pomiędzy cechą odporności na wielkopąkowca a analizowanymi markerami genomu odmiany ‘Bona’ odnotowano w regionie LG4, natomiast w przypadku odmiany ‘Ceres’ w regionie LG1.

Ostatni etap badań prowadzonych w 2019 roku dotyczył poszukiwania markerów sprzężonych z genami *Ce* i *P*, które umożliwiłyby charakterystykę genotypów rodzaju *Ribes*, zróżnicowanych pod względem odporności na wielkopąkowca porzeczkowego. Na 100 wytypowanych do badań genotypach przeprowadzono weryfikację 10 markerów SCAR pod kątem ich przydatności do selekcji

genotypów odpornych i podatnych 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

- 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*.
- 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.
- Analiza regionów QTL badanych genomów porzeczek czarnej wskazuje na istotne korelacje zlokalizowanych na mapie markerów SSR z genami warunkującymi odporność na wielkopąkowca porzeczkowego.
- Na podstawie uzyskanych wyników nie stwierdzono korelacji między testowanymi markerami a cechą odporności na wielkopąkowca porzeczkowego.

Literatura

- 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.
- 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.

Poszukiwanie regionów DNA sprzężonych z tolerancją wegetatywnych podkładek jabłoni na niskie temperatury poprzez analizę transkryptomu i ocenę stopnia polimorfizmu genów kandydujących

Identification of the genome regions correlated with cold hardiness of apple rootstocks by transcriptomic analysis of differentially expressed candidate genes

Sylwia Keller-Przybyłkiewicz ✉, Mariusz Lewandowski

Instytut Ogrodnictwa w Skierniewicach,
✉ e-mail: sylwia.keller@inhort.pl, tel. 46 8345254

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.802.4.2019, Zadanie nr 73.

Słowa kluczowe: adnotacja, EST, jabłoń, NGS, qPCR, RNAseq, sekwencjonowanie transkryptom

Celem tematu była analiza fenotypowa 17 podkładek jabłoni z kolekcji IO w oparciu o ocenę nasilenia reakcji obronnej badanych roślin po przemrożeniu oraz ocena zmian ekspresji genów kandydujących (CG) (qPCR), wytypowanych na podstawie sekwencjonowania transkryptomu dwóch podkładek wzorcowych i zweryfikowanych dla 15 innych z kolekcji Instytutu 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 zastosowanych ujemnych temperatur nie spowodowała śmierci całej puli podkładek reprezentujących wszystkie badane genotypy, niemniej kondycja roślin traktowanych była słabsza niż roślin kontrolnych.

Podkładki P 66, P 67 i P 68 wykazywały słabszą reakcję na przemrażanie niż standardowe M.9 i M.26. Dla tych podkładek odnotowano większy przyrost i średnicę pędu przewodnikowego, większą długość pędów bocznych, a także większą świeżą masę korzeni niż dla podkładek M.9 i M.26.

Bazując na wartościach średnich badanych parametrów dla trzech temperatur w obrębie ocenianych podkładek można wyróżnić dwie grupy – mniej i bardziej wrażliwe na przemarzanie. Do pierwszej grupy zakwalifikowano 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 P 2, P 14, P 16, P 22, CG 11, CG 16, M.9 i M.26.

Odczyty sekwencji transkryptomów genów o zróżnicowanej ekspresji oraz różnym typie regulacji (*up/down regulation*), uzyskanych z eksperymentów RNAseq (2015 – 2018) poddano weryfikacji metodą qPCR. W tym celu, z tej samej puli 17 podkładek, do 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 (1µg) poddano transkrypcji do stabilnego cDNA (AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit, Agilent). Do amplifikacji fragmentów dsDNA użyto par oligonukleotydów zaprojektowanych dla 30 adnotowanych genów (EST, analiza transkryptomu NGS 2017 i 2018) o różnicowanej ekspresji w genomach wzorcowych podkładek jabłoni traktowanych niskimi temperaturami.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono ocenę zmian profilu 15 fragmentów EST (RNAseq 2017) w genomach 17 podkładek jabłoni. Wytypowane sekwencje genów kodują: białko z rodziny auksyn odpowiedzialnych za regulację procesów roślinnych w okresie ich spoczynku (*dormancy*), (Md285927, Md32326), komponenty błon komórkowych oraz białka uczestniczące w transporcie między- i wewnątrzkomórkowym makrocząsteczek i jonów (Md432351, Md818613, Md240736, Md139165, Md165140, Md247173, Md843015, Md312901), białka z grupy hydrolaz o funkcji wiązania kationów – uczestniczące w metabolizmie wody (Md222724, Md425030), białko uczestniczące w odpowiedzi komórek na czynniki stresu (Md835497), białko uczestniczące w produkcji i przemianie farnesanu (Md668869), który bierze udział w utrzymaniu osmozy komórkowej.

Na podstawie przeprowadzonej oceny zmian profili ekspresji badanych EST zaobserwowano: wzrost ilości transkryptu genów o adnotacji Md285927 oraz Md312901 w podkładkach wrażliwych (M.9, MM106, CG11, PB4) po zastosowaniu odpowiednio temp. przemrażania -14 i -12°C. Ponadto spadek aktywności transkryptów w podkładkach tolerancyjnych P 66, P 60, P 2, CG16 odnotowano dla genów o adnotacjach Md8343015, Md247173, Md385927, Md139165 i Md668869 po zastosowaniu temp. -10 i -14°C, natomiast wzrost ekspresji badanych genów w tej samej puli przemrażanych podkładek zaobserwowano w przypadku genów Md425030, Md222724, Md32326, Md163192. W wyniku analizy przeprowadzonej dla genu o adnotacji Md165140 odnotowano spadek ilości transkryptu u podkładek wrażliwych MM106, Antonówka, M.9 potraktowanych temp. -10°C, natomiast silny wzrost poziomu transkryptów genów Md318613 oraz Md240736 oszacowano dla puli wszystkich badanych podkładek traktowanych temp. -14°C.

W drugim etapie badań przeprowadzono ocenę zmian w profilu ekspresji kolejnych 30 EST (RNAseq 2018). Ocenę tą przeprowadzono dla podkładek wzorcowych: wrażliwej M.9

i tolerancyjnej P 60.

Wytypowane do badań geny: biorą udział w wiązaniu kationów regulujących reakcje chemiczne (Md280910 i Md154241); kodują białka błon komórkowych oraz białka transportowe (Md258197, Md141228, Md135041, Md241358, Md893990, Md786461, Md496872, Md228548, Md198091, Md255592, Md137638); kodują białka z grupy hydrolaz, zawartych również chloroplastach, (Md280910, Md154241, Md352930) jak również białka receptorowe błony komórkowej (Md773609) oraz białka aktywowane podczas czynników abiotycznych i uczestniczące w regulacji komórkowych systemów naprawczych (Velasco i in. 2010, Bai i in. 2014)

Analiza sekwencji deEST wytypowanych z eksperymentu RNA-seq (sezon IV), przeprowadzona dla podkładek wzorcowych M.9 (W) oraz P 60 (T) pozwoliła na zidentyfikowanie grupy genów podlegających inhibicji (Md141228, Md496812) oraz silnej aktywacji (Md467354, Md515106, Md629440, Md836749, Md920349) u obu przemrażanych podkładek.

Dla podkładki wrażliwej M.9 traktowanej temperaturą -10°C zaobserwowano aktywację genów o adnotacjach Md134238, Md198091, Md241358, Md255592, Md258197, Md352930 Md187047, Md230387, Md827881 oraz spadek aktywności genu Md893990. Natomiast w przypadku podkładki tolerancyjnej P 60 ekspresja wytypowanych genów była zależna od zastosowanej temperatury przemrażania. Dla genów o adnotacji Md141221, Md496812 oraz Md235041 odnotowano spadek ilości transkryptu po zastosowaniu temperatury -10°C, natomiast obniżenie temperatury do -14°C powodowało wzrost aktywności ww. genów oraz dodatkowo genów o adnotacjach Md187047 oraz Md230387. Wzrost ekspresji genów, zależny od zastosowanej temperatury, odnotowano także dla genów Md134238, Md198091, Md255592, Md893990 (-12°C), Md241358 (-10°C) oraz Md258197, Md289101, Md352930 (-14°C).

Na podstawie analiz przeprowadzonych w oparciu o pomiary ekspresji wytypowanych sekwencji EST (2018), celem weryfikacji uzyskanych profili ekspresji wytypowanych dotychczas genów, przeprowadzono analizę porównawczą typu regulacji poziomu ich transkryptów (*up/down regulation*) w eksperymencie RNAseq oraz teście qPCR. Dla pięciu genów, spośród wytypowanych w roku bieżącym, odnotowano ten sam rodzaj regulacji w testach qPCR, jak i w eksperymentach RNAseq. Do grupy tej należą geny o adnotacjach: Md258197, Md141228 (M.9, -10°C/down),

Md496812 (M.9, -12°C/down), Md893990 (P 60, -12°C/up) i Md198091 (P 60, -10°C/down)

W ramach realizowanego zadania w wyniku przeprowadzonych testów walidacyjnych (RNAseq vs. qPCR) (Imelfort i Edwards 2009) dotychczas wytypowano 18 fragmentów EST, dla których odnotowano zróżnicowaną regulację w układzie genotyp/gen/temperatura przemrażania.

Sekwencje EST o potwierdzonym typie regulacji ekspresji, stanowiąc będą potencjalne markery funkcjonalne do monitorowania poziomu tolerancji podkładek jabłoni na stres niskich temperatur.

Wnioski

1. Podkłádki P 66, P 67 i P 68 lepiej znoszą przemrozenie niż podkłádki M.9 i M.26, można je więc uznać za tolerancyjne na stres niskich temperatur.
2. Poziom ekspresji badanych genów zależy od genotypu podkłádki, badanej tkanki roślinnej (ksylem/korzeń) i stosowanej temperatury przemrażania.

3. Wytypowane i adnotowane sekwencje transkryptomu jabłoni poszerzają bazę danych, z której wstępnie wyłoniono 18 przypuszczalnych markerów funkcjonalnych 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., et al. (2010). The genome of the domesticated apple (*Malus x domestica* Borkh.). *Nature Genetics* 42(10): 833–841.
- 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.

Analiza genetyczna i molekularna wybranych genotypów jabłoni (*Malus domestica*) dla skrócenia okresu juvenilnego i poprawy jakości owoców

Genetic and molecular analysis of selected apple genotypes (*Malus domestica*) for shortening of the juvenile period and quality improvement of the fruits

Mariusz Lewandowski ✉, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Edward Żurawicz

Instytut Ogrodnictwa, ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,
✉ e-mail: mariusz.lewandowski@inhort.pl, tel. 46 8345410

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.802.4.2019, Zadanie nr 71.

Słowa kluczowe: faza juvenilna, jabłoni, jakość owoców, markery molekularne

W ramach zadania 71 w roku 2019 realizowano 4 tematy badawcze.

- 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, wysoka jakość owoców, odporność roślin na choroby) w oparciu o ocenę potomstwa 28 rodzin mieszańców.
- Zagęszczenie kolejnych grup sprzężeń mapy genetycznej odmian ‘Free Redstar’ i ‘Oliwka Żółta’ (uzyskana w latach 2015–2019) poprzedzone analizą segregacji alleli markerów SSR w populacji.
- Analiza korelacji cech fenotypowych oraz markerów zlokalizowanych na mapie genomów odmian ‘Free Redstar’ i ‘Oliwka Żółta’.
- Weryfikacja wyselekcjonowanych siewek, przy użyciu markerów SSR o wysokim stopniu korelacji z badanymi cechami fenotypowymi.

Obliczenia 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, 7 odmian: ‘Free Redstar’, ‘Gold Milenium’, ‘Alwa’, ‘Golden Delicious’, ‘Kosztela’, ‘Oliwka Żółta’ i ‘Koksa Pomarańczowa’ miało istotne dodatnie lub ujemne wartości efektów GCA dla siły wzrostu siewek (tab. 1). Odmiany: ‘Free

Redstar’, ‘Gold Milenium’ (dla średnicy pędu przewodnikowego), ‘Alwa’ i ‘Koksa Pomarańczowa’ wykazują istotnie dodatnie wartości efektów GCA dla tej cechy, są więc donorami silnego wzrostu u potomstwa siewek tego gatunku. Natomiast odmiany ‘Gold Milenium’ (dla wysokości pędu przewodnikowego), ‘Golden Delicious’, ‘Kosztela’ i ‘Oliwka Żółta’ miały istotnie negatywne efekty GCA dla tej cechy, są więc donorami genów warunkujących słaby wzrost u potomstwa siewek jabłoni. 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 i mączniaka jabłoni odmiany ‘Free Redstar’ wskazały na istotnie ujemny efekt GCA (tab. 2). Genotyp ten jest potencjalnym donorem genów warunkujących odporność/małą podatność na parcha i mączniaka jabłoni u potomstwa. Odmiany ‘Alwa’ i ‘Oliwka Żółta’ reprezentowały natomiast istotnie dodatnie efekty GCA dla stopnia porażenia roślin przez parcha i mączniaka jabłoni, są więc donorem genów warunkujących podatność na parcha i mączniaka jabłoni u potomstwa siewek jabłoni. Nasze wyniki mają potwierdzenie w literaturze, która wskazuje, że genotyp ‘Free Redstar’ jest odmianą odporną na parcha jabłoni (V_p), zaś genotypy ‘Alwa’ i ‘Oliwka Żółta’ są odmianami średnio podatnymi na tego patogena (Rejman

1994; Żurawicz 2003, Lewandowski i Żurawicz 2007, Żurawicz i in. 2013).

Podczas sporządzania map genetycznych jabłoni odmian 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta', prowadzonych w niniejszych badaniach wykorzystano zjawisko konserwatywności (kolinearności) markerów molekularnych (Velasco i in. 2010). W wyniku reakcji amplifikacji DNA z 50 markerami SSR zidentyfikowano 184 polimorficzne allele, segregujące w populacji mapującej, dla których określono loci w genomach obu badanych form rodzicielskich. Analiza typu segregacji oraz frekwencji rekombinacji pomiędzy allelami, pozwoliła na sporządzenie 'szkieletu' grup sprzężeń – homologów chrom. I, VI, XII, XIV, XVII genomu jabłoni, dotychczas niezmapowanych odmian tego gatunku. Uzyskany w roku 2019 szkielet mapy zawiera łącznie loci 46 markerów SSR pokrywających 452 cM fragmentu genomu jabłoni. Natomiast na podstawie analizy 247 zidentyfikowanych (2015–2019) heterozygotycznych alleli, różnicujących genomy odmian 'Free Redstar' oraz 'Oliwka Żółta', określono typ segregacji oraz ich rozkład w populacji mapującej (test X^2). Po określeniu typu segregacji oszacowano, że 102 wprowadzonych na mapę alleli markerów pochodziło z genomu odmiany 'Free Redstar', natomiast 104 z genomu odmiany 'Oliwka Żółta'. W przypadku 80 markerów zidentyfikowano allele, które pochodziły z genomów obu form rodzicielskich. Na tym etapie badań sporządzono odrębne mapy genetyczne genomów 'Free Redstar' i 'Oliwka Żółta'. Mapa genomu odmiany 'Free Redstar' zawiera 41 grup sprzężeń wysyconych loci 215 alleli markerów SSR (wielkość zmapowanego genomu 2 520 cM), natomiast na mapie genomu odmiany 'Oliwka Żółta' zlokalizowano 231 alleli markerów sprzężonych w 51 grupach LG (2 166 cM). Stopień kolinearności zmapowanych fragmentów genomów obu odmian jabłoni z odczytami referencyjnej mapy rodzaju *Malus* oszacowano na 43% (analiza porównawcza dla mapy zintegrowanej 'Free Redstar' x 'Oliwka Żółta') (Liebhard i in. 2002, 2003).

W wyniku analizy korelacji genotypowo-fenotypowych dla odmiany 'Free Redstar' zaobserwowano wysoki stopień zależności pomiędzy terminem kwitnienia, średnicą, wysokością pędu, a markerami zlokalizowanymi w grupach sprzężeń LG1, 2, 3, 8, 10, 11, 16 ($K^* 4 - 7$) jej genomu. Natomiast w przypadku cechy odporności na parcha i mączniaka, w jej genomie zidentyfikowano markery odpowiednio w grupach sprzężeń LG1, 2, 10 i LG2, 8, 17, dla których odnotowano istotną wartość współczynnika korelacji pomiędzy loci a wartością badanej cechy ($K^*5 - 4$). W genomie

odmiany 'Oliwka Żółta' oszacowano wysoki stopień korelacji dla cech związanych z rozwojem pędów (termin kwitnienia, wysokość i średnica) i markerami zlokalizowanymi w grupach LG2, 3, 4, 6, 7, 8, 10. Jednocześnie markery z grup LG1 i 2 wykazały wysoki stopień sprzężenia z cechą odporności na parcha, natomiast nie odnotowano istotnych korelacji pomiędzy lokalizacją markerów SSR, a odpornością na mączniaka.

Ponadto dla 30 genotypów wyselekcjonowanych pod kątem krótkiego okresu juvenilnego i dobrej jakości zewnętrznej i wewnętrznej owoców potwierdzono status mieszańca i zróżnicowania genetycznego. Zgodnie z przeprowadzoną analizą wybrane rośliny zgrupowano w trzech klastrach. W pierwszym klastrze (I) znalazły się genotypy potomne o numerach 24/1 (1R), 01/3 (5R), 01/5 (8R) oraz krzyżowana odmiana 'Glogierówka' (33R) reprezentujące poziom podobieństwa między 79–81%, drugą grupę (II) utworzyły rośliny oznaczone 04/1 (18R), 28/1 (26R) i odmiana 'Gold Milenium' (36R), dla których poziom podobieństwa wynosił 80–85%. Pozostałe rośliny reprezentujące podobieństwo genetyczne na poziomie 70–92% zgrupowano w trzecim klastrze (III). Ponadto rośliny: 01/7 (10R) i 'Kronselka' (38R) zostały pogrupowane osobno, a poziom podobieństwa ich genomów oszacowano na poziomie 79%. Najbardziej genetycznie oddalone, niepowiązane z żadną z prezentowanych grup, były genotypy o numerach 24/1 (1R) i 22/1 (7R) pochodzące odpowiednio ze skrzyżowania odmian: 'Golden Delicious' x 'Malinowa Oberlandzka' i 'Golden Delicious' x 'Glogierówka'.

Wnioski z prowadzonych badań

- Wstępne wyniki badań pokazują, że badane genotypy rodzicielskie jabłoni różnią się zdolnością kombinacyjną (efekty GCA i SCA) pod względem badanych cech.
- Wstępne wyniki badań pokazują, że wśród 30 wyselekcjonowanych genotypów jabłoni znajdują się zarówno genotypy z wysoką i niską jędrnością owoców oraz genotypy z wysoką i niską zawartością ekstraktu, kwasowości i kwasu L-askorbinowego w owocach.
- Utworzone mapy genetyczne stanowią bazę do dalszych badań genomów nowych odmian jabłoni, a także do oszacowania korelacji pomiędzy zlokalizowanymi markerami a cechami fenotypowymi (MAS: Marker Assisted Selection).
- Wstępnie wytypowane markery o znanych loci stanowią bazę do wczesnej selekcji siewek pod

kątem cech warunkujących długość fazy juwenilnej jabłoni.

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. ss 77.
- 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.
- Liebhart, 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 x domestica* Borkh.). Mol. Breed. 10: 217–241.
- Liebhart, R., Koller, B., Gianfranceschi, L., Gessler, C. (2003). Creating a saturated reference map for the apple (*Malus x domestica* Borkh.) genome. Theoretical and Applied Genetics 106: 1497–1508.
- Rejman, A. (1994). Jabłonie, p. 19–130. In: Rejman, A. (ed.). Pomologia – Odmianoznawstwo Roślin Sadowniczych. PWRiL, Warszawa.
- 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., 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., Vecchiatti, 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 x 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.

Tabela 1

Ocena efektów GCA dla siły wzrostu siewek 11 odmian jabłoni krzyżowanych w układzie czynnikowym (♀4 x ♂7), Dąbrowice, 2019; 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	0,110	0,35	0,204**	91,08
2	Gold Milenium	0,481*	6,72	-0,094**	19,46
3	Alwa	0,123	0,44	0,112**	27,60
4	Golden Delicious	-0,714**	14,79	-0,222**	107,88
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	0,329	0,56	0,136	2,40
2	Kosztela	-1,334*	9,26	0,007	0,01
3	Malinowa Oberlandzka	0,832	3,60	-0,194	4,87
4	Kronselska	-0,084	0,04	0,201	5,19
5	Oliwka Żółta	-1,555**	12,57	-0,349**	15,73
6	Koksa Pomarańczowa	2,111**	23,17	-0,006	0,00
7	McIntosh	-0,299	0,46	0,206	5,46
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 $\alpha=0,01$

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, 2019; 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	-0,131**	17,14	-0,064**	12,96
2	Gold Milenium	0,004	0,02	-0,039	4,84
3	Alwa	0,140**	19,55	0,082**	21,16
4	Golden Delicious	-0,013	0,18	0,021	1,44
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	-0,182	6,78	-0,064	1,52
2	Kosztela	0,099	2,01	-0,046	0,76
3	Malinowa Oberlandzka	-0,038	0,30	0,079	2,33
4	Kronselska	-0,157	5,05	-0,064	1,52
5	Oliwka Żółta	0,287**	16,79	0,048	0,86
6	Koksa Pomarańczowa	-0,063	0,82	-0,033	0,40
7	McIntosh	0,055	0,63	0,079	2,33
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 $\alpha=0,01$

Indukowanie zmienności genetycznej jabłoni na drodze poliploidyzacji *in vitro* oraz ocena fenotypowa i genetyczna uzyskanych poliploidów w odniesieniu do diploidalnych form wyjściowych

Induction of genetic variability of apple via polyploidization *in vitro* and phenotypic and genetic assessment of polyploids obtained in relation to their diploid counterparts

Małgorzata Podwyszyńska ✉, Monika Markiewicz, Agnieszka Marasek-Ciołakowska, Agnieszka Wojtania, Bożena Matysiak, Agata Broniarek-Niemiec, Dorota Kruczyńska, Joanna Puławska

Instytut Ogrodnictwa, Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,
✉ e-mail: Malgorzata.Podwyszynska@inhort.pl, tel. 46 8345353

Praca została wykonana w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr decyzji HOR.hn.802.4.2019, Zadanie nr 70.

Słowa kluczowe: AFLP, *Erwinia amylovora*, *in vitro*, *Malus × domestica*, odporność, tetraploidy, *Venturia inaequalis*

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 poprzednich latach badań, dzięki opracowanej efektywnej metodzie poliploidyzacji *in vitro*, uzyskano liczne tetraploidy sześciu odmian jabłoni ‘Free Redstar’, ‘Gala Must’, ‘Pinova’, Co-op 32, ‘Redchief’ i ‘Sander’. W roku 2019 celem badań była ocena uzyskanych autotetraploidów po względem cech morfologicznych, parametrów fizjologicznych oraz podatności na ww. patogeny, a także zmian genetycznych.

Opis wyników

Prace prowadzono w ramach 5 tematów badawczych.

Temat badawczy 1.

Ocena *in vitro* podatności na porażenie przez *Erwinia amylovora* uzyskanych tetraploidów wytypowanym testem w odniesieniu do ich diploidalnych genotypów wyjściowych. Ocenie poddano 31 kolejnych genotypów tetraploidalnych 6 odmian i odmiany referencyjnej ‘Lobo’ o wysokim stopniu

podatności na patogen. U czterech odmian ‘Free Redstar’, ‘Gala Must’, ‘Pinova’ i ‘Redchief’ wykryto w sumie 10 klonów tetraploidalnych charakteryzujących się istotnie niższym stopniem porażenia bakteriozą w porównaniu do odmiany macierzystej i referencyjnej.

Temat badawczy 2.

Ocena efektywności ukorzeniania i aklimatyzacji w warunkach *ex vitro* klonów tetraploidalnych. Mikrosadzonki tetraploidów charakteryzowały się słabszymi zdolnościami do ryzogenezy w porównaniu do diploidów. Aktywnie rosnące tetraploidy w liczbie umożliwiającej przeprowadzenie badań nad oceną fenotypową uzyskano dla 11 spośród 18 badanych klonów tetraploidalnych.

Temat badawczy 3.

Ocena zmian genetycznych/epigenetycznych neotetraploidów. W badaniach wykorzystano trzy neotetraploidy jabłoni ‘Free Redstar’ wykazujące wysoki stopień odporności na parcha jabłoni (*V. inaequalis*) oraz ich diploidalny genotyp wyjściowy – odmianę względnie odporną na tę chorobę.

Analizę transkryptomów przeprowadzono metodą cDNA-AFLP. Wykonano również sekwencjonowanie fragmentów AFLP ulegających zróżnicowanej ekspresji u tetraploidów i diploida pod wpływem infekcji. Transkrypty genów, których ekspresja była zróżnicowana po inokulacji roślin *V. inaequalis* u genotypów tetraploidalnych i diploida zostały wytypowane do reamplifikacji i sekwencjonowania (zsekwencjonowano 30 fragmentów takich genów). Przy pomocy oprogramowania BLAST analizowano stopień podobieństwa reamplifikowanych produktów AFLP do sekwencji genów zebranych w bazie danych NCBI. Wykazano, że spośród genów ulegających nadekspresji u tetraploidalnych roślin infekowanych *V. inaequalis*, trzy z nich wykazywały podobieństwo do genów kodujących białka zaangażowane w reakcje odpornościowe roślin: czynnik transkrypcyjny RAP2, białko EFR3 oraz hydrolazę ABH. Pozostałe fragmenty cDNA-AFLP wykazywały podobieństwo do genów kodujących białka, które mogą być pośrednio związane z reakcją roślin na porażenie patogenem; białka regulujące ekspresję genów, białka transportowe oraz białka transdukcji sygnału. Wykonano również analizę obecności czterech genów odporności na parcha *Rvi5*, *Rvi6*, *Rvi11* oraz *Rvi15*. Wyniki badań potwierdziły obecność ww. genów odporności na tę chorobę, zarówno u diploida, jak i u wszystkich tetraploidów. Ponadto analiza ekspresji genów odporności *PR2* oraz *Rvi6* podczas infekcji *V. inaequalis* przeprowadzona u jednego genotypu tetraploidalnego 'Free Redstar' metodą real-time PCR wykazała znaczne zwiększenie poziomu ekspresji tych genów.

Temat badawczy 4.

Ocena morfologiczna oraz parametrów fizjologicznych wytypowanych tetraploidów w odniesieniu do genotypów wyjściowych. Ocenie poddano rosące w sadzie 1–2-letnie drzewka (własnokorzeniowe oraz zaszczone na podkładce M 9) 28 tetraploidalnych klonów 5 odmian ('Free Redstar', 'Gala Must', 'Redchief', 'Pinova' i 'Sander') oraz ich diploidalnych odmian wyjściowych. Zmiany fenotypu były szczególnie widoczne u roślin własnokorzeniowych: tetraploidy były znacznie niższe, miały mniejsze liście i w kilku przypadkach niższą aktywność fotosyntetyczną niż diploidy. Tetraploidy jabłoni szczepione na podkładce M9 charakteryzowały się większym wigorem niż własnokorzeniowe – wskazywały na to wyraźnie mniejsze różnice lub brak różnic pomiędzy tetraploidami i diploidami w wysokości pędów, wielkości liści i aktywności fotosyntetycznej.

Temat badawczy 5.

Ocena podatności uzyskanych poliploidów na porażenie przez *Venturia inaequalis* w warunkach szklarniowych. Ocenę porażenia liści tetraploidów w odniesieniu do diploidalnych odmian wyjściowych oraz wrażliwej odmiany referencyjnej 'Lobo' przeprowadzona po 4 tyg. od inokulacji zawiesiną zarodników *V. inaequalis* przy użyciu 5-stopniowej skali. Wykazano, że tetraploidy odmian o dużej i średniej podatności na parcha ('Redchief' i 'Gala Must'), charakteryzują się z reguły podobną podatnością na patogen, jak odmiany macierzyste. Natomiast u odmian o małej podatności, tetraploidy nie są w ogóle porażone, jak u 'Free Redstar' i 'Co-op 32'.

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*

Marek Szymajda , Anita Kuras, Edward Żurawicz, Bogusława Idczak

Instytut Ogrodnictwa, Zakład Hodowli Roślin Ogrodniczych ul. Konstytucji 3 Maja 1/3, 96–100 Skierniewice,
 e-mail: marek.szymajda@inhort.pl, tel. 46 8345406

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.802.4.2019, Zadanie nr 77.

Słowa kluczowe: *embryo rescue*, krzyżowanie międzygatunkowe, mieszańce międzygatunkowe, *Prunus*

Hybrydyzacja oddalona gatunków drzew owocowych z rodzaju *Prunus* jest dość trudna, a jeśli już zachodzi, to charakteryzuje się niską efektywnością (Yoshida i in., 1975; Jun i Chung, 2007). Technika ta znajduje zastosowanie zwłaszcza wówczas, gdy w obrębie określonego gatunku roślin brak jest źródeł genów, warunkujących pożądaną cechę lub ekspresja tych genów jest niewystarczająca (Layne i Sherman, 1986). Dlatego w Instytucie Ogrodnictwa prowadzone są badania nad możliwością zwiększenia bioróżnorodności genetycznej w obrębie rodzaju *Prunus* poprzez zastosowanie hybrydyzacji oddalonej gatunków *Prunus cerasifera* (ałyca), *Prunus salicina* (śliwa japońska) oraz *Prunus armeniaca* (morela) metodą hodowli klasycznej przy wykorzystaniu techniki *embryo-rescue*. Przyjęta hipoteza badawcza zakłada, że przy pomocy konwencjonalnych metod hodowli (krzyżowanie tradycyjne i selekcja) możliwy jest transfer genów warunkujących cenne cechy biologiczne między wymienionymi gatunkami i uzyskanie nowych, nie występujących w naturze genotypów, łączących pożądaną cechę, występującą w obrębie różnych gatunków z rodzaju *Prunus*. Genotypy te pozwolą poszerzyć istniejącą bioróżnorodność w obrębie tego rodzaju, a w przyszłości mogą być wykorzystane także

w hodowli ukierunkowanej na uzyskanie nowych odmian moreli, śliwy japońskiej i śliwy domowej lub podkładek dla tych gatunków.

Materiały i Metody

Dla uzyskania założonego celu badawczego realizowano 6 tematów szczegółowych: *temat 1* – analiza żywotności pyłku form ojcowskich moreli, śliwy japońskiej i ałycy. Żywotność pyłku badano poprzez: wybarwienie cytoplazmy oraz ocenę zdolności kiełkowania; *temat 2* – ocena możliwości krzyżowania różnych genotypów z rodzaju *Prunus* (śliwa japońska, morela, ałyca) w oparciu o wykonanie 20 kombinacji zapyleń oddalonych, wykonanych w wysokim tunelu foliowym; *temat 3* – ocena zdolności kiełkowania nasion uzyskanych w wyniku hybrydyzacji oddalonej różnych genotypów ałycy, moreli, śliwy japońskiej lub ich mieszańców; *temat 4* – optymalizacja i prowadzenie hodowli zarodków *in vitro*. Zarodki mieszańcowe wykładano na trzy pożywki: MS (Murashige i Skoog, 1962), WPM (Lloyd i McCown, 1981) i C2d (Chee i Pool, 1987); *temat 5* – analizy molekularne 40 siewek mieszańcowych oraz ich form rodzicielskich. Do analiz zastosowano technikę SSR (Simple Sequence Repeat); *temat 6* – ocena wybranych

cech biologicznych 180 siewek mieszańcowych (kwitnienie i owocowanie) uzyskanych w poprzednich latach badań.

Wyniki i Dyskusja

Barwienie acetoorceiną wykazało, że żywotność pyłku form ojcowskich wykorzystanych do krzyżowań w 2019 r., wynosiła od 49% 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 również ziarna pyłku nieaktywne fizjologicznie. Niezależnie od zastosowanej pożywki najniższą zdolność kiełkowania miał pyłek śliwy japońskiej (21–33% kiełkujących ziaren), a najwyższą moreli (48–75%). Obserwacje wzrostu łagiewek pyłkowych przez tkankę transmisyjną szyjki słupka (*in vivo*) wykazały, że po zapyleniu międzygatunkowym dorastają one do poziomu załączka po upływie 72 godzin od naniesienia pyłku na znamię słupka.

W wykonanych krzyżowaniach duża liczba powstających zawiązków opadła w ciągu kilku tygodni po wykonaniu zapylenia, co prawdopodobnie spowodowane było wystąpieniem postzygotycznych barier krzyżowalności. Ostatecznie z wykonanych krzyżowań uzyskano 1077 owoców/zawiązków owoców, co stanowi tylko 13,3% zapylnych kwiatów. Najlepsze zawiązywanie owoców w stosunku do liczby zapylnych kwiatów uzyskano w krzyżowaniach śliwa japońska × morela (15,6%) oraz śliwa japońska × ałycza (12,1%). Te kombinacje krzyżowań dają więc największe szanse na uzyskanie siewek mieszańcowych.

Z krzyżowania różnych genotypów śliwy japońskiej, moreli i ałyczy uzyskano 337 nasion dobrze wykształconych (78,0%), czyli żywotnych. Pozostałe 95 nasion (22,0%) miało 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 skiełkowały 323 nasiona (95,8% skiełkowanych nasion). Najlepiej kiełkowały nasiona śliwy japońskiej D 17–73 i ‘Czarnuszka’ (97,6% i 97,1%), natomiast najslabiej nasiona mieszańca śliwy japońskiej i ałyczy ‘Najdiena’ (70,0%). Oznacza to, że genotypy te są dobrymi formami matecznymi do krzyżowań oddalonych śliwy japońskiej, moreli i ałyczy.

Na pożywki *in vitro* wyłożono 92 zarodki,

uzyskane z krzyżowania międzygatunkowego śliwy japońskiej, ałyczy i moreli oraz 180 zarodków (kontrola) uzyskanych w wyniku wolnego zapylenia kwiatów (zarodki wewnątrzgatunkowe). Po 10 tygodniach stratyfikacji pozostało 70 żywotnych zarodków z krzyżowań międzygatunkowych i 146 z wolnego zapylenia. Z zarodków tych w fitotronie uzyskano odpowiednio 28 i 104 rośliny. Z zarodków wyłożonych na pożywkę MS uzyskano więcej roślin niż z zarodków wyłożonych na pożywki WPM i C2d. Najwięcej zregenerowanych roślin uzyskano z zarodków śliwy japońskiej D 17–73.

W badaniach profilu genetycznego klonu nr MMG K4 13 2013 77/13 oraz identyfikacji mieszańców przeprowadzono 1928 reakcji amplifikacji, w których wygenerowano 133 amplikony (w tym 18 monomorficznych), o długości od 90 do 230 pz. Do opracowania profilu genetycznego zastosowano zestaw 20 par starterów, w reakcji z którymi uzyskano 37 amplikonów. Status mieszańca z wykonanego krzyżowania potwierdzono dla wszystkich testowanych siewek mieszańcowych.

Z ocenianych 180 siewek mieszańcowych śliwy japońskiej, ałyczy i moreli zaowocowały 42 genotypy, czyli tylko 23,3% 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 uzyskane ze skrzyżowania mieszańca międzygatunkowego ‘Najdiena’ (śliwa japońska × ałycza) ze śliwą japońską ‘Blue Gigant’. Siewki te kwitły intensywnie oraz, pomimo przymrozków wiosennych, na ogół odznaczały się średnim lub intensywnym owocowaniem i wytwarzały atrakcyjne owoce. Owoce wytwarzane przez niektóre z tych siewek odznaczały się dobrym odchodzeniem miąższu od pestki, co w przypadku owoców śliwy japońskiej jest rzadką, ale porządną cechą.

Wnioski

- Okres 72 godzin po zapyleniu jest wystarczający dla dotarcia łagiewki pyłkowej do załączni słupka w krzyżowaniach oddalonych śliwy japońskiej i moreli.
- Tradycyjna hybrydyzacja oddalona gatunków morela, śliwa japońska i ałycza jest mało efektywna. Uzyskuje się małą liczbę owoców

i nasion w stosunku do zapylonych kwiatów.

- Duża część nasion uzyskanych w krzyżowaniach oddalonych gatunków śliwa japońska × morela to nasiona nieprawidłowo wykształcone i stąd nieżywotne.
- Efektywność hodowli zarodków mieszańcowych śliwy japońskiej, moreli i ałyczy w warunkach *in vitro* zależy od genotypu zarodków i rodzaju zastosowanej pożywki.
- Spośród ocenianych rodzin mieszańców najlepszymi cechami fenotypowymi odznaczają się siewki uzyskane ze skrzyżowania genotypów ‘Najdiena’ i ‘Blue Gigant’ [(śliwa japońska × ałycza) × śliwa japońska].

Literatura

Chee, R., Pool, R. M. (1987). Improved inorganic media

constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae* 32: 85–95.

Jun, J. H., Chung, K. H. (2007). Interspecific cross compatibility among plum, apricot and plumcot. *Kor. J. Hort. Sci. Technol.* 25 (3): 217–222.

Layne, R. E., Sherman, C. W. B. (1986): Interspecific hybridization of *Prunus*. *HortScience* 21 (1): 48–51.

Lloyd, G., McCown, B. (1981). Commercially-feasible micropropagation of Mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot tip culture. *Int. Plant Prop. Soc. Proc.* 30: 421–427.

Murashige, T., Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497.

Yoshida, M., Kyotani, H., Yasuno, M. (1975). Studies on interspecific crossing in *Prunus* spp. I. Cross compatibility. *Jpn. J. Breeding.* 25 (1): 17–23.

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, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogrodowicz, Renata Trzeciak, Alina Anioła, Renata HOLEWIŃSKA 5
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 Radecka-Janusik, Maciej Majka, Jarosław Przetakiewicz 7
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 Szala 11
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 13
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, Tadeusz Drzazga, Paweł Krajewski, Przemysław Matysik, Róża Mazur, Teresa Sikora, Edward Witkowski, Grzegorz Fic, Magdalena Szeliga, Marcin Jaromin, Justyna Buczkowicz, Dorota Tyrka 17
Selekcja genomowa pszenicy ozimej
Genomic selection of winter wheat
- Aleksandra Pietrusińska 21
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, Adriana Twardawska, Jolanta Belter	25
<p>Wykorzystanie markerów molekularnych i fenotypowych do identyfikacji genów odporności pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez <i>Oculimacula yallundae</i> i <i>Oculimacula acuformis</i> The use of molecular and phenotypic markers to identify genes of wheat resistance to eyespot caused by <i>Oculimacula yallundae</i> and <i>Oculimacula acuformis</i></p>	
Yuliya Kloc, Marta Dmochowska-Boguta, Waclaw Orczyk	29
<p>Tolerancja na stresy abiotyczne - genotypowanie pszenicy w oparciu o strategię genów kandydujących Tolerance for abiotic stresses – genotyping of wheat based on candidate gene strategy</p>	
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	31
<p>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</p>	
Magdalena Szechyńska-Hebda, Natalia Hordyńska, Maria Wędzony, Dyda Mateusz, Joanna Troczyńska	35
<p>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</p>	
PSZENŻYTO	
Piotr Tomasz Bednarek, Marzena Wasiak, Agnieszka Niedziela, Sławomir Bany, Mirosław Pojmaj	37
<p>Poszukiwanie markerów molekularnych genów utrzymania sterylności pyłku u pszenżyta z CMS Tt Identification of molecular markers associated with maintenance of pollen sterility genes in triticale with CMS Tt</p>	
Edward Arseniuk, Lidia Kowalska	39
<p>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.)]</p>	
Jakub Walczewski, Edward Arseniuk	41
<p>Toksyny białkowe <i>Parastagonospora nodorum</i> i ich związek z patogenicznością oraz odpornością pszenżyta i pszenicy na septoriozę liści i plew (SNB) <i>Parastagonospora nodorum</i> proteinaceous toxins and their relationship with wheat and triticale susceptibility and resistance to stagonospora nodorum blotch (SNB)</p>	

Halina Wiśniewska, Adriana Twardawska, Tomasz Góral, Piotr Ochodzki, Maciej Majka, Dorota Walentyn-Góral, Jolanta Belter	45
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, Sławomir Sowa	49
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	51
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, Magdalena Kawęcka, Karolina Różaniecka	55
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	

JĘCZMIEN

Jerzy H. Czembor	57
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	
Renata Orłowska, Piotr Tomasz Bednarek, Sławomir Bany	59
Molekularna charakterystyka wpływu elementów mobilnych na zmienność genetyczną w zbożowych kulturach <i>in vitro</i>	
Molecular characterization of the impact of transposable elements on genetic variation in cereals tissue cultures	
Anetta Kuczyńska, Tadeusz Adamski, Maria Surma, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Ogrodowicz, Michał Kempa, Monika Mokrzycka, Renata Trezciak, Renata Holewińska, Alina Anioła	63
Wpływ stresu niedoboru wody na rozwój i architekturę systemu korzeniowego u jęczmienia (<i>Hordeum vulgare</i> L.)	
Effects of drought on the development and architecture of barley root system	

ŻYTO

Sylvia Mikołajczyk, Agnieszka Tomkowiak, Dorota Weigt, Jan Bocianowski, Zbigniew Broda 67

Haploidyżacja żyta – diagnostyka molekularna oraz wpływ nanomolekuł na wspomaganie indukcji 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

Piotr Tomasz Bednarek, Agnieszka Niedziela, Zbigniew Rybka, Waldemar Brukwiński, Barbara Kozber 71

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

Stefan Stojalowski, Martyna Sobczyk, Anna Bienias, Marta Orłowska, Sylwia Czarnecka, Marek Zając, Katarzyna Andrzejewska, Dorota Jasińska, Róża Martofel, Marek Szklarczyk 73

Badania wewnętrznej struktury genetycznej odmian żyta oraz dziedzicznego podłoża efektu heterozji w roku 2019

Study on internal genetic structure of rye cultivars and genetic background of heterosis in 2019

Janusz Zimny, Andrzej Czaplicki, Aleksandra Zimny, Sylwia Oleszczuk 75

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

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

OWIES

Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa, Joanna Toporowska, Ewelina Marek, Aneta Koroluk, Piotr Bednarek 79

Mapowanie sprzężeniowe i asocjacyjne owsa zwyczajnego

Linkage and association mapping of oat

Edyta Paczos-Grzęda, Sylwia Sowa, Joanna Toporowska, Ewelina Marek, Aneta Koroluk 81

Piramidyżacja 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

RZEPAK

Iwona Bartkowiak-Broda, Katarzyna Mikołajczyk, Alina Liersch, Marcin Matuszczak, Joanna Wolko, Joanna Nowakowska 83

Badanie genomu rzepaku ozimego przy wykorzystaniu markerów molekularnych

The investigation of winter rapeseed genome with the use of molecular markers

Teresa Cegielska-Taras, Laurencja Szała, Katarzyna Sosnowska	85
Wprowadzanie nowych alleli z pul genowych różnych gatunków z rodzaju <i>Brassica</i> do bazy genowej rzepaku ozimego	
Introduction of new alleles from the gene pools of various <i>Brassica</i> species in winter oilseed rape genome	
Krzysztof Michalski, Renata Daleka, Mariola Ebertowska, Czesława Fink, Justyna Karauda	89
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, Dorota Weigt, Justyna Szwarz, Jan Bocianowski, Małgorzata Jędryczka, Joanna Kaczmarek, Witold Irzykowski, Joanna Majka, Marek Mrówczyński	91
Introdukcja genów odporności na choroby i owady oraz męskiej sterylności 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 Spasibonek, Katarzyna Mikołajczyk, Marcin Matuszczak, Magdalena Walkowiak, Joanna Nowakowska	93
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, Elżbieta Starzycka-Korbas	97
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, Agnieszka Czajka, Beata Kowalska	99
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>Brassicaceae</i> plants	
Małgorzata Jędryczka, Witold Irzykowski, Joanna Majka, Janetta Niemann, Marek Korbas, Ewa Jajor	101
Zastosowanie konwencjonalnych i molekularnych narzędzi fitopatologicznych w poszukiwaniu źródeł odporności na kiłę kapusty oraz charakterystyka aktualnej populacji patogenu w Polsce	
The use of conventional and molecular phytopathological tools in searching for sources of resistance to clubroot and characterisation of the current pathogen population in Poland	

KUKURYDZA

- Elżbieta Czembor, Seweryn Frasiński 103
 Poszukiwanie form kukurydzy o wysokiej odporności na fuzariozę kolb i zgorzel podstawy łodygi powodowane przez grzyby z rodzaju *Fusarium* spp.
 Identification of new sources of resistance for ear rot and stalk rot diseases caused by *Fusarium* spp.
- Marcin Wit, Piotr Ochodzki, Roman Warzecha, Monika Żurek, Ewa Mirzwa-Mróż, Emilia Jabłońska, Józef Adamczyk, Anna Rogacka, Janusz Rogacki, Krzysztof Wójcik, Wojciech Wakuliński 107
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

ZIEMNIAK

- Dominika Boguszewska-Mankowska, Krystyna Zarzyńska, Krzysztof Treder, Mateusz Mielczarek, Anna Pawłowska, Bogumiła Zacharzewska 111
 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 113
 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, Jadwiga Śliwka, Anna Grupa-Urbańska, Waldemar Marczewski 117
 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
- Dorota Milczarek, Bogdan Flis, Anna Podlewska-Przetakiewicz 119
 Wyróżnianie form ziemniaka o złożonej odporności na mątwiki atakujące ziemniak przy wykorzystaniu metod konwencjonalnych i molekularnych. Charakterystyka nowego źródła odporności na *Globodera pallida* znalezionej w *Solanum gourlayi*
 Selection of potato forms with accumulated resistances to nematodes attacking the potato by using conventional and molecular methods. Characterization of a new source of resistance to *Globodera pallida* found in *Solanum gourlayi*
- Dorota Michałowska, Agnieszka Przewodowska, Włodzimierz Przewodowski, Joanna Piskorz, Oksana Olejnik 123
 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

Beata Tatarowska, Bogdan Flis, Katarzyna Szajko 127

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.

Anna Pawłowska, Mateusz Mielczarek, Agata Kaczmarek, Maria Fedczak, Krzysztof Treder 131

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, Agata Trocka, Katarzyna Franke, Mateusz Nowakowski 133

Badania nad opracowaniem metod selektywnej izolacji oraz czulej identyfikacji bakterii *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* w trudnych diagnostycznie próbach środowiskowych
Research and development of selective isolation and sensitive identification methods of *Clavibacter michiganensis* ssp. *sepedonicus* bacteria in difficult diagnostic environmental samples

BURAK CUKROWY

Gabriela Machaj, Wojciech Wesołowski, Alicja Macko-Podgórn, Rafał Barański, Marek Szklarczyk, Dariusz Grzebelus 137

Opracowanie metod globalnej analizy polimorfizmów w genomie buraka cukrowego
Development of methods for global analysis of polymorphisms in the genome of sugar beet

Sandra Cichorz, Małgorzata Malicka, Maria Gośka 139

Badania nad mechanizmami warunkującymi proces embriogenezy gametycznej u buraka cukrowego
The research on the mechanisms responsible for gametic embryogenesis in sugar beet

OGÓREK

Renata Słomnicka, Helena Olczak-Woltman, Aleksandra Korzeniewska, Karolina Kaźmińska, Katarzyna Niemirowicz-Szczytt, Grzegorz Bartoszewski 143

Doskonalenie ogórka (*Cucumis sativus* L.) pod względem odporności na kanciastą plamistość
Improvement of angular leaf spot resistance in cucumber (*Cucumis sativus* L.)

POMIDOR

Małgorzata Czernicka, Kinga Kęska, Anna Kołton, Małgorzata Kapusta, Iwona Kamińska 145

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.)

CEBULA

- Urszula Kłosińska, Marzena Nowakowska, Wojciech Szczechura, Katarzyna Nowak 149
 Analiza genetycznych i biochemicznych podstaw tolerancji cebuli (*Allium cepa* L.) na stres niedoboru wody
 Analysis of genetic and biochemical basis of onion (*Allium cepa* L.) tolerance to water deficit stress

MARCHEW

- Dariusz Grzebelus, Alicja Macko-Podgórn, Katarzyna Stelmach, Kornelia Kwolek, Rafał Barański 151
 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
- Wojciech Wesołowski, Beata Domnicz, Anna Burda, Stefan Stojalowski, Marek Szklarczyk 155
 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, Dariusz Kadłuczka 159
 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

- Agnieszka Kielkowska, Adela Adamus, Marek Szklarczyk 163
 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 165
 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

GROCH

- Wojciech Świącicki, Magdalena Gawłowska, Andrzej Górny, Katarzyna Beczek, Alicja Niewiadomska, Lech Boros 167
 Identyfikacja rejonów w genomie grochu, warunkujących wybrane parametry sprawności fizjologicznej, jako istotnego elementu odporności na stresy abiotyczne
 Identification of regions in the pea genome, responsible for selected parameters of physiological efficiency, as an important element of resistance to abiotic stresses

SOJA

- Jerzy Nawracała, Danuta Kurasiak-Popowska, Agnieszka Katańska-Kaczmarek 171
 Analiza bioróżnorodności zasobów genowych soi przydatnej do hodowli w warunkach klimatycznych Polski i opracowanie metodyki krzyżowania międzygatunkowego *Glycine max* x *Glycine soja*
 Analysis of biodiversity of soybean gene resources useful for breeding in climatic conditions of Poland and development of interspecific *Glycine max* x *Glycine soja* crossing methodology
- Jerzy Nawracała, Danuta Kurasiak-Popowska, Janetta Niemann, Agnieszka Tomkowiak, Dorota Weigt, Bogdan Wolko, Michał Książkiewicz, Sandra Rychel, Agnieszka Katańska-Kaczmarek 173
 Identyfikacja układów allelicznych genów fotoneutralności i wczesności oraz opracowanie metodyki otrzymywania roślin homozygotycznych u soi
 Identification of alleles arrangement of photoneutrality and earliness genes and developing method of obtaining soybean homozygous plants

ŁUBIN

- Renata Galek, Bartosz Kozak, Dariusz Zalewski, Ewa Sawicka-Sienkiewicz, Adela Adamus, Agnieszka Kielkowska 175
 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
- Michał Książkiewicz, Piotr Plewiński, Sandra Rychel-Bielska, Magdalena Tomaszewska, Wojciech Bielski, Bogdan Wolko 179
 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 Święcicki, Paweł Barzyk 183
 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 Święcicki, Magdalena Kroc, Paweł Barzyk, Katarzyna Czepiel, Paulina Wilczura / Patrycja Bielecka 187
 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 191
 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 195
 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, Włodzimierz Zwierzykowski, Eugeniusz Paszkowski 199
 Identyfikacja genów związanych z ekspresją zimotrwałości i tolerancji suszy u form introgressywnych *Lolium multiflorum/Festuca arundinacea*
 Identification of genes associated with winter-hardiness and drought tolerance in the introgression forms of *Lolium multiflorum/Festuca arundinacea*
- Grzegorz Żurek, Danuta Martyniak, Kamil Prokopiuk, Agnieszka Rachwalska, Eugeniusz Paszkowski, Maciej Jurkowski 201
 Badanie cech warunkujących zawiązywanie nasion, ich jakość oraz plon w wybranych gatunkach traw wieloletnich
 The examination of traits affecting seed formation as well as seed quality and yield in selected perennial grass species

TRUSKAWKA

- Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Agnieszka Masny, Bogusława Idczak
 Badania nad saturacją mapy genetycznej ‘Elsanta’ x ‘Senga Sengana’ pod kątem lokalizacji genów sprzężonych z ważnymi cechami użytkowymi truskawki (*Fragaria x ananassa*).
 Research on saturation of the genetic map of ‘Elsanta Senga’ x ‘Sengana’ for locating genes linked to important traits of strawberry (*Fragaria x ananassa*)
- Agnieszka Masny, Monika Mieszczakowska-Frać, Anita Kuras, Edward Żurawicz 209
 Badania nad możliwością zwiększenia zawartości składników bioaktywnych w owocach truskawki na drodze hybridyzacji wewnątrz- i międzygatunkowej w obrębie rodzaju *Fragaria*
 Studies on possibilities of increasing of bioactive compounds in strawberry fruits through intra- and interspecific hybridization within *Fragaria* genus

BORÓWKA

Stanisław Pluta, Bogusława Badek, Łukasz Seliga 213

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

MALINA

Agnieszka Masny, Danuta Kucharska, Monika Mieszczakowska-Frać, Anita Kuras, Edward Żurawicz 219

Badania nad możliwością poszerzenia zmienności genetycznej maliny właściwej (*Rubus idaeus*) pod względem pory dojrzewania i jakości owoców

The research on the possibility of extending the genetic variability of red raspberry (*Rubus idaeus*) in terms of different ripening time and fruit quality

AGREST

Danuta Kucharska, Danuta Wójcik, Aleksandra Trzewik, Teresa Orlikowska, Angelika Niewiadomska-Wnuk 223

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

Anita Kuras, Bogumiła Badek, Stanisław Pluta, Sylwia Keller-Przybyłkiewicz, Bogusława Idczak, Renata Góralska, Krystyna Strączyńska 225

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 227

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, Edward Żurawicz 231

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, Agnieszka Marasek-Ciołakowska, Agnieszka Wojtania, Bożena Matysiak, Agata Broniarek-Niemiec, Dorota Kruczyńska, Joanna Puławska 235

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, Anita Kuras, Edward Żurawicz, Bogusława Idczak 237

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*