

## SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2019 roku

### INFORMACJE OGÓLNE

|   |
|---|
| Tytuł zadania - <b>Identyfikacja regionów genomu oraz markerów DNA związanych z heterozją w heksaploidalnym pszenżycie ozimym</b>   |
| Numer zadania (w załączniku nr 8 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. poz. 1170 z późn. zm.)) - <b>82</b> |
| Planowany okres realizacji zadania: <b>2019</b>   |
| Planowane nakłady w zł: <b>97 083</b>   |

### INFORMACJA O WYKONAWCACH

#### 1. Zespół badawczy

| <b>Kierownik zadania</b>      |                         |   |
|-------------------------------|-------------------------|---|
| imię i nazwisko               | stopień i tytuł naukowy | miejsce zatrudnienia  |
| Michał Nowak                  | dr inż.                 | Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie                                   |
| <b>Wykonawcy zadania</b>      |                         |   |
| imię i nazwisko               | stopień i tytuł naukowy | miejsce zatrudnienia  |
| Piotr Tomasz Bednarek         | prof. dr hab.           | Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – Państwowy Instytut Badawczy |
| Justyna Leśniowska-Nowak      | dr inż.                 | Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie                                   |
| Magdalena Sozoniuk (Zapalska) | dr inż.                 | Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie                                   |
| Adam Kuzdrałiński             | dr hab. inż.            | Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie                                   |
| Karolina Dudziak              | dr inż.                 | Uniwersytet Medyczny w Lublinie                                       |
| Magdalena Kawęcka             | mgr inż.                | Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie                                   |
| Karolina Różaniecka           | inż.                    | Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie                                   |

## OPIS ZADANIA

### 1. Cele zadania

| Lp. | Cel (zgodnie ze szczegółowym opisem na dany rok)  | Czy cel został zrealizowany (tak/nie <sup>1</sup> /częściowo <sup>1</sup> ) |
|-----|---|---|
| 1   | Uzyskanie markerów sekwencyjnie specyficznych przydatnych w procesie wyboru genotypów rodzicielskich do krzyżowań w celu zwiększenia prawdopodobieństwa wystąpienia zjawiska heterozji. | TAK   |
| 2   | Krzyżowanie zróżnicowanych genetycznie form pszenżyta wybranych w zad. 6, uzyskanie ziarniaków mieszańcowych F <sub>1</sub> i ich wysiew w warunkach doświadczenia polowego.            | TAK   |

### 2. Opis tematów badawczych *(należy sporządzić opis dla tematów badawczych wymienionych w tabeli powyżej; kolejność zgodnie z tabelą powyżej)*

#### 2.1. Temat badawczy 1: Konwersja wybranych markerów DArTseq na markery sekwencyjnie specyficzne.

##### Cel tematu badawczego 1

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.

##### Materiały i metody

W pierwszym etapie prac na podstawie wyników projektu uzyskanych w poprzednich latach wybrane zostały 2 chromosomy w przypadku których osiągnięto najwyższą wartość współczynników MPH i BPH. W kolejnym etapie wyselekcjonowano po 10 markerów DArTseq równomiernie rozłożonych na wybranych uprzednio chromosomach z przeznaczeniem do ich konwersji w markery specyficzne. Procedura konwersji obejmowała izolację DNA z genotypów w których wybrany marker był obecny, a następnie zaprojektowanie oligonukleotydów sekwencyjnie specyficznych do sekwencji markerowych. Do projektowania oligonukleotydów wykorzystane zostały ogólnodostępne narzędzia (np. Primer3Plus, Oligo Perfect).

Ziarniaki analizowanych genotypów wyłożono na wilgotną bibułę na szalkach Petriego, skąd po 7 dniach pobrane zostały świeże liście. Do izolacji DNA wykorzystano komercyjny zestaw odczynników oparty na oczyszczaniu kwasu nukleinowego na złożu w kolumnkach. Wyizolowane preparaty DNA poddane zostały ocenie jakościowej i ilościowej za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000, jak również analizie integralności przy użyciu elektroforezy w 1,5% żelu agarozowym.

W kolejnym etapie wykonano sekwencjonowanie uzyskanych fragmentów pozwalające na wydłużenie sekwencji markerowej w obu kierunkach. Na bazie uzyskanej sekwencji zaprojektowane zostały pary specyficznych oligonukleotydów pozwalające na amplifikację sekwencji markerowej. W ostatnim etapie dokonano walidacji poprawności sekwencji ampliconów uzyskiwanych za pomocą zaprojektowanych markerów.

##### Wyniki

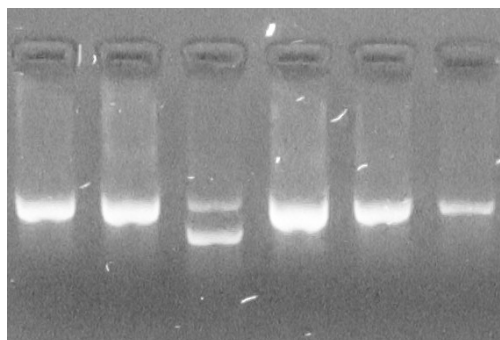
Na podstawie dotychczas uzyskanych wyników analizy markerowej do dalszych prac wytypowano chromosomy 5A i 2B dla których w roku 2018 uzyskano najwyższe wartości współczynników MPH i BPH – odpowiednio 129% i 111% dla chromosomu 5A oraz 105% i 75% dla chromosomu 2B. W kolejnym etapie spośród markerów DArTseq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

<sup>1</sup> Jeśli dotyczy – proszę opisać pod tabelą, w jakim stopniu cel został osiągnięty i podać przyczyny

**Tabela 1.** Markery DArTseq zlokalizowane na chromosomach 5A oraz 2B wyselekcjonowane do dalszych projektowania markerów sekwencyjnie specyficznych.

| L.p. | Chromosom | Marker DArTseq | Sekwencja  |
|------|-----------|----------------|--|
| 1    | 5A        | 8515582        | TGCAGCAGCGACAGCCGCGGGAGCCCG                        |
| 2    |           | 4218038        | TGCAGATGGGTGGTGGGGAGTAGCGGTTGCGGTATCCG             |
| 3    |           | 4560236        | TGCAGCTTCTCCGTGTTGGGCGCTTCTCGTCTTCGCCGCCG          |
| 4    |           | 8523773        | TGCAGGAAGCGGAGCTGGTGGGCGGCAGCCG                    |
| 5    |           | 10497547       | TGCAGCAGCCGACCACGGCCATGCTCGAGAAGCTCGTCTCCG         |
| 6    |           | 4205409        | TGCAGCGTGCACCGCTGTTGGCAGTCACCATCTGTGATCTGGAGAGCCG  |
| 7    |           | 4342189        | TGCAGTCTCACCTTGCCGCCTGTGAACCGCCCCG                 |
| 8    |           | 8539016        | TGCAGATCGTTCCCTCAGCGTCGCAGCCACCAGCGACGCCCCG        |
| 9    |           | 10501598       | TGCAGGTGGGAGGCGCAATGGGAGGCCGACACGCGCCCCCTCACCCCCG  |
| 10   |           | 14476136       | TGCAGGCTGGATACATGCATGTGGACACAGCCACGCCCACAGCTCCCCG  |
| 11   | 2B        | 8517354        | TGCAGGGCACGGTGCGGCAGGTCCCCG                        |
| 12   |           | 16357840       | TGCAGCTGAGCTCGGTCATGCCG                            |
| 13   |           | 3616542        | TGCAGACCTGGGGTGAGGAACTGCCAGACGATGTAATTATCCG        |
| 14   |           | 4346951        | TGCAGCAGGACGTTGTGGCTACGGATGTAAGCCCCG               |
| 15   |           | 4572122        | TGCAGAGAGAGGAACAAGGCCCGCGGAGGAGGGGGCTTCAGTCTCCG    |
| 16   |           | 4341697        | TGCAGCAGGCAGCCGCGGGAGGCCGAGGCCG                    |
| 17   |           | 8518632        | TGCAGAAAATAGCATACGCGCGCCACCATGGCTACCAGGGCGATGCACCG |
| 18   |           | 4360372        | TGCAGAATCGCCAGATTGGAGCCCCG                         |
| 19   |           | 4557699        | TGCAGCCATGGCAAAGTAAGGTGACTGCTGCTGCCCG              |
| 20   |           | 4354962        | TGCAGCTCCCATCGCCGACGACCG                           |

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, dokonywano ponownego projektowania primerów i ponownej walidacji ich specyficzności (Fot. 1).



**Fot. 1.** Przykład niespecyficznej amplifikacji uzyskanej z wykorzystaniem jednej z par oligonukleotydów zaprojektowanych w zadaniu 1.

W ten sposób opracowano dla każdego z wyselekcjonowanych chromosomów po 5 par oligonukleotydów pozwalających na specyficzną amplifikację wybranych sekwencji markerowych. Sekwencje zaprojektowanych oligonukleotydów podano w tabeli 2.

**Tabela 2.** Sekwencje specyficznych par oligonukleotydów zaprojektowanych dla wybranych sekwencji markerowych.

| Chromosom | Wyjściowy marker DArT seq | Primer F [5' – 3']    | Primer R [5' – 3']    | Długość amplikonu [bp] |
|-----------|---------------------------|-----------------------|-----------------------|------------------------|
| 5A        | 4218038                   | GATGCAGCGTCTACTCCTCC  | GGGAACTCCAGAAGGCAGAC  | 92                     |
|           | 10497547                  | CGGGAGCTTGCTTCGAATTG  | TGTATGTCCTTTGCGGCCTT  | 222                    |
|           | 4205409                   | CAACGAACGTTTGGGCAACT  | TTGCGTACTGAGCTGCATGA  | 181                    |
|           | 8539016                   | GGTGGCCGCCTAATCATAACA | AGCAGGCCGAAAAGAGATAGC | 318                    |
|           | 14476136                  | TGTTTCGGACCTCTTGCTTC  | CTGGGGGAGGATGGTATGGA  | 164                    |
| 2B        | 8517354                   | ATTGGAATGGGGAAGGGCAG  | TGCCATTGGGACATCCAGAC  | 139                    |
|           | 4572122                   | CAAGGAGGAGCTTCACAGCA  | TCACTTGGGATTGTGGGAGC  | 72                     |
|           | 4341697                   | TGGAGGGTTTGCTTGCATCT  | AGACCTGCTGAACGGCATA   | 108                    |
|           | 8518632                   | ACGATAGTCGACACCAAGGC  | CAGACCTGCTGAACGGCATA  | 143                    |
|           | 4557699                   | ACAAGGAGGGGCATGTGATG  | GTGTAGGTGAGCCGTGTGAA  | 139                    |

## Dyskusja

Wykorzystanie efektu heterozji traktowane jest jako jedno z największych osiągnięć hodowli roślin na przestrzeni dziejów. Efekt heterozji dotyczyć może wielu cech wpływających na plon i jego jakość (Yildirim i in. 2014). W przypadku pszenżyta ocenia się, że wzrost plonowania możliwy do uzyskania dzięki heterozji kształtuje się na poziomie 2-10% (Longin i in. 2012). Głównym problemem w hodowli heterozyjnej pozostaje fakt, że pomimo wielu badań molekularne mechanizmy leżące u podstaw tego zjawiska nie zostały dotychczas w pełni zidentyfikowane i opisane (Kaeppler 2012). Zazwyczaj u podstaw wykorzystania efektu heterozji leży ewaluacja setek kombinacji krzyżówkowych w warunkach polowych (Rajendrakumar 2015). Z tego względu od wielu lat podejmowane są próby uzyskania markerów molekularnych, które pozwalałyby na predykcję wystąpienia efektu heterozji w oparciu o analizę materiału genetycznego form rodzicielskich. Dotychczasowe badania wykazały przydatność wysokoprzepustowych analiz molekularnych do identyfikacji markerów asocjowanych z cechami plonotwórczymi do predykcji wystąpienia heterozji m.in. u kukurydzy (Riedelsheimer i in. 2012, Tomkowiak i in. 2019). Podjęte zostały również próby identyfikacji kluczowych QTL odpowiedzialnych za wystąpienie tego efektu (Yi i in. 2019). W dostępnej literaturze brak jest jednak informacji o próbie opracowania markerów sekwencyjnie specyficznych i próby ich aplikacji do selekcji materiałów hodowlanych. Z tego względu w projekcie zidentyfikowano markery SNP, które w na podstawie dotychczasowych wyników mogą być użyteczne w predykcji wystąpienia heterozji u pszenżyta i zaprojektowano specyficzne dla nich systemy detekcji bazujące na PCR. Po walidacji na szerokiej puli materiałów markery te mogą okazać się przydatnym narzędziem pozwalającym na wsparcie procesu selekcji genotypów pszenżyta w hodowli mieszańcowej.

## 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 stanowiąc mogą wartościowe narzędzie w selekcji materiałów hodowlanych pszenżyta w kierunku zwiększenia prawdopodobieństwa wystąpienia efektu heterozji w pokoleniu F<sub>1</sub>.

### Mierniki dla tematu badawczego 1 (podać w tabeli)

| Lp. | Miernik <sup>2</sup>   | Wartość miernika podana w opisie zadania | Wartość miernika zrealizowana |
|-----|--|--|-------------------------------|
| 1   | Liczba markerów DArTseq skonwertowanych na markery specyficzne | 10                                       | 10                            |

<sup>2</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

## 2.2. Temat badawczy 2: Krzyżowanie wybranych w zad. 6 genotypów, ocena mieszańców F<sub>1</sub> i oszacowanie efektu heterozji.

### Cel tematu badawczego 2

Celem tematu badawczego w roku 2019 było uzyskanie drugiej serii mieszańców F<sub>1</sub> 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.

### Materiały i metody

Krzyżowanie wykonano w warunkach doświadczenia polowego na drodze ręcznego kastrowania i zapylania kwiatów. Doświadczenie założone zostało w roku 2018 w Gospodarstwie Doświadczalnym Felin należącym do Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie. Wszystkie obiekty wysiano na poletka o równej powierzchni, wynoszącej 2 m<sup>2</sup>, a rośliny sukcesywnie poddawano zabiegom stosowanym typowo w doświadczeniach polowych.

Tuż przed kwitnieniem kwiaty w kłosach roślin przeznaczonych na formy mateczne kastrowano metodą manualną z użyciem pincety. Z każdego kłoska usunięte zostały środkowe kwiaty, a z pozostałych, bocznych kwiatów usuwano niedojrzałe pylniki. Na każdy wykastrowany kłos założony został izolator z folii paroprzepuszczalnej. Po osiągnięciu dojrzałości przez znamię słupka, наносzony był na nie pyłek z roślin przeznaczonych na formę ojcowską. Zapylony kłos został ponownie zaizolowany. Po osiągnięciu dojrzałości pełnej, kłosy zostały zebrane ręcznie, a następnie wymłócone w celu uzyskania ziarniaków F<sub>1</sub>. Formy mieszańcowe wysiano we wrześniu 2019 roku na poletka doświadczalne, równolegle wysiano również formy rodzicielskie dla każdej z kombinacji, celem oceny efektu heterozji w roku 2020.

### Wyniki

W wyniku realizacji zadania uzyskano ziarniaki mieszańcowe F<sub>1</sub> dla 21 kombinacji krzyżówkowych wykonanych według uprzednio opracowanego schematu. Listę uzyskanych kombinacji przedstawiono w tabeli 3. Po osiągnięciu dojrzałości pełnej zebrano ziarniaki mieszańcowe z przeznaczeniem do wysiewu na sezon wegetacyjny 2019/2020.

**Tabela 3.** 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     |

## Dyskusja i 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<sub>1</sub>. Podjęte prace umożliwiły uzyskanie kombinacji krzyżówkowych zgodnie z założeniami przyjętymi w projekcie. Dyskusja uzyskanych wyników zadania i wnioskowanie na ich podstawie możliwe będzie po uzyskaniu w roku 2020 końcowych rezultatów oceny plonowania form rodzicielskich i mieszańcowych.

### Mierniki dla tematu badawczego 2 (podać w tabeli)

| Lp. | Miernik <sup>3</sup>                       | Wartość miernika podana w opisie zadania | Wartość miernika zrealizowana |
|-----|--|--|-------------------------------|
| 1   | Liczba wykonanych kombinacji krzyżówkowych | 21                                       | 21                            |

**3. Planowana prezentacja wyników badań** (podać w tabeli - należy wymienić konferencje, na których zaprezentowano wyniki i/lub wymienić publikacje, przygotowane i przyjęte do druku w trakcie realizacji zadania w danym roku).

| Prezentacja wyników na konferencjach                 |   |                          |  |                                 |
|--|---|--------------------------|--|---------------------------------|
| Lp.  | Konferencja   | Prezentacja <sup>4</sup> | Liczba prezentacji podana w opisie zadania | Liczba prezentacji zrealizowana |
| 1  | 5th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding Budapeszt (Węgry) | poster                   | 2  | 2                               |
| Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych |   |                          |  |                                 |
| Lp.  | Monografia/Czasopismo   | Publikacja <sup>5</sup>  | Liczba publikacji podana w opisie zadania  | Liczba publikacji zrealizowana  |
| 1  | -   | -                        | 0  | 0                               |

Jeśli któryś z mierników nie został zrealizowany należy podać przyczyny.

## 4. Adres, pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy:

<https://www.up.lublin.pl/badania-gen/>

## 5. Miernik zadania – stopień realizacji

| Lp.              | Miernik  | Wartość miernika podana w opisie zadania | Wartość miernika zrealizowana | Stopień realizacji zadania |
|------------------|--|--|-------------------------------|----------------------------|
| 1                | 2  | 3  | 4                             | 5                          |
| Temat badawczy 1 |  |  |                               |                            |
| 1.1              | Liczba markerów DArTseq skonwertowanych na markery specyficzne | 10                                       | 10                            | 1,00                       |
| Temat badawczy 2 |  |  |                               |                            |
| 2.1              | Liczba wykonanych kombinacji krzyżówkowych                     | 21                                       | 21                            | 1,00                       |
|                  |  |  | <b>ŚREDNIA</b>                | 1,00                       |
|                  |  |  | <b>% REALIZACJI ZADANIA</b>   | <b>100,0%</b>              |

Sporządzono:

Lublin, 14.01.2020 r.

<sup>3</sup> Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

<sup>4</sup> Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

<sup>5</sup> Podać, czy chodzi o publikację oryginalną, czy np. polemika, list do edytora, rozdział w monografii etc.