

Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone

Okres realizacji **2014-2020**

(rok 2016 był rokiem przerwy)

Kierownik – Justyna Leśniowska-Nowak
(justyna.lesniowska@up.lublin.pl)

Zespół realizujący projekt w latach 2014-2020

- Daniela Gruszecka
- Michał Nowak
- Aleksandra Wieremczuk
- Aleksandra Nucia
- Aneta Koroluk
- Sylwia Róg
- Sylwia Okoń
- Magdalena Sozoniuk
- Agnieszka Surmacz-Magdziak
- Dorota Kosińska
- Karolina Dudziak
- Magdalena Kawęcka
- Karolina Różaniecka
- Wojciech Marecki



Cele projektu

- ▶ Otrzymywanie pierwotnych form pszenżyta w wyniku krzyżowania pszenicy zwyczajnej i żyta uprawnego w celu wstępnej analizy zmian zachodzących w strukturze genomów wchodzących w skład mieszańca - **OSIĄGNIĘTY**
- ▶ Identyfikacja nowych źródeł odporności na czynniki biotyczne i abiotyczne w dzikich gatunkach roślin i ich introdukcja do pszenżyta - **OSIĄGNIĘTY**
- ▶ Monitorowanie obecności nowych genów w kolejnych pokoleniach mieszańców na podstawie testów żywiciel-patogen, analiz molekularnych oraz charakterystyki fenotypowej w warunkach doświadczeń polowych - **OSIĄGNIĘTY**
- ▶ Opracowanie techniki krzyżowania pszenżyta z mrozoodpornymi genotypami z rodzaju *Leymus* – **OSIĄGNIĘTY CZĘŚCIOWO (wniosek - rośliny nie rosły w warunkach polowych, konieczne wsparcie warunkami fitotronu)**
- ▶ Zwiększenie wydajności uzyskiwania mieszańców oddalonych pszenżyta poprzez zastosowanie techniki ratowania zarodków w kulturach *in vitro* - **OSIĄGNIĘTY**
- ▶ Analiza stabilności genomu mieszańców uzyskiwanych w wyniku krzyżowań oddalonych z wykorzystaniem metod molekularnych - **OSIĄGNIĘTY**

Materiał i metody

Materiał

Materiał do badań stanowiły rośliny należące do rodzajów: *Triticum*, *Triticale*, *Secale*, *Aegilops*, *Agropyron*, *Agrotriticum*, *Leymus* oraz rośliny mieszańcowe pochodzące z krzyżowań tych gatunków

Metody

- ▶ Analizy statystyczne komponentów plonu mieszańców i roślin rodzicielskich – Statistica
- ▶ Embryo rescue – *in vitro*
- ▶ Analiza stresów abiotycznych – *in vitro*
- ▶ Analiza stresów biotycznych – testy żywiciel-patogen
- ▶ Analizy molekularne – PCR, qPCR
- ▶ Genotypowanie - DArT technology

Wyniki – zadanie 1

Fenotypowanie dzikich genotypów z rodzaju *Aegilops* pod kątem odporności na rdzę brunatną pszenżyta

- ▶ Zidentyfikowane potencjalne źródła odporności na rdzę brunatną głównie wśród form diploidalnych i tetraploidalnych. Łącznie zidentyfikowano 42 genotypy odporne.
- ▶ Rozszerzenie testów pozwoliło na identyfikację większej liczby genotypów heksaploidalnych, które są cenniejszym źródłem genów odporności dla gatunków uprawnych – zidentyfikowano 29 genotypów spośród 100 analizowanych
- ▶ Zidentyfikowano 7 odmian pszenicy odpornych na rdzę brunatną – źródło odporności dla pszenżyta

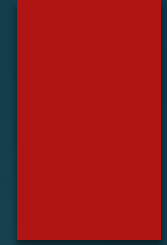
Wyniki – zadanie 2

Uzyskiwanie mieszańców poprzez krzyżowanie (kastrowanie i zapylanie) roślin

- ▶ Wykazano, że odmiany i linie hodowlane pszenicy i pszenżyta krzyżują się w różnym stopniu (zależnym od genotypu) z formami dzikimi z rodzaju *Aegilops*. Efektywność była wyższa dla krzyżowań z pszenicą.
- ▶ Zidentyfikowano odmiany pszenicy charakteryzujące się zmienną zdolnością kombinacyjną w zależności od kierunku krzyżowania przy uzyskiwaniu pszenżyta pierwotnego.
- ▶ Zdolność kombinacyjna dla krzyżowań pszenica x żyto wahała się od 0 do 37,5 % i była zmienna w zależności od roku badań i genotypu.
- ▶ Zdolność kombinacyjna kozieńców w krzyżowaniach z pszenicą zawierała się w przedziale od 0% do 62,5%. Średnio wynosiła ona 21%. W przypadku krzyżowania z pszenżytem zawierała się w przedziale od 0% do 75% w zależności od formy. Średnio było to 31,13%. Zdolność kombinacyjna pszenicy wynosiła maksymalnie 50% a pszenżyta maksymalnie 70% . Średnia zdolność kombinacyjna dla tych gatunków wynosiła odpowiednio 28,02% (pszenica) i 29,44% (pszenżyto).
- ▶ Gatunki z rodzaju *Aegilops*, ze względu na możliwość krzyżowania zarówno z pszenicą, jak i z pszenżytem, stanowią cenne źródło genetyczne kartowatości. Zdolność kombinacyjna w tych krzyżowaniach wahała się dla pszenżyta od 0% do 21,6%, natomiast dla kozieńców od 0% do 37,5%.
- ▶ Zdolność kombinacyjna w krzyżowaniach wstecznych mieszańców oddalonych z pszenżytem wahała się od 0% do 20% dla mieszańców oddalonych. Zdolność kombinacyjna natomiast przy uzyskiwaniu pokolenia BC2 wahała się od 0% do 64%.
- ▶ Stwierdzono, że płodność kłosów mieszańców wstecznych przy samozapyleniu jest różna i zależy od kombinacji krzyżówkowej.

Wyniki – zadanie 3

Ocena zmienności cech w mieszańcach



- ▶ Zmiana genetycznego podłoża reakcji na fotoperiod nie wpływała niekorzystnie na elementy plonowania roślin mieszańcowych.
- ▶ Wprowadzenie do badanych mieszańcowych form pszenżyta nowego genu karłowatości zidentyfikowanego w genomie rodu CZR 876/01 skutkuje skróceniem pędu głównego o ok. 16%, wynikającym głównie z redukcji długości I oraz III międzywęźla.
- ▶ Krzyżowanie roślin pszenżyta z pszenicą powoduje obniżenie wysokości roślin mieszańcowych oraz obniżenie MTZ w roślinach pokolenia F_2 jak i BC_1 .
- ▶ Krzyżowanie wsteczne mieszańców oddalonych [(*Ae. column.* x Poshuk) x Top] z odmianą Tomko spowodowało zwiększenie wysokości oraz MTZ roślin mieszańcowych pokoleń BC_1 jak i BC_2 w stosunku do roślin F_1 .
- ▶ Formy mieszańcowe żyta o kombinacji krzyżówkowej 541x84A/1 wykazywały istotnie wyższą masę ziarniaków z kłosa w porównaniu do form rodzicielskich.
- ▶ Formy mieszańcowe pokoleń F_1 , BC_1 , BC_2 uzyskane z krzyżowania Ae.87 z odmianą Sekret wykazywały istotnie wyższą masę ziarniaków z kłosa w porównaniu do form rodzicielskich. Krzyżowanie nie powodowało redukcji ani wzrostu MTZ w pokoleniu F_2 . Mieszańce charakteryzowały się natomiast istotnie wyższą liczbą ziarników z kłosa głównego.

Wyniki – zadanie 4

Izolacja uzyskanych zarodków i prowadzenie kultur *in vitro*

- ▶ Optymalnym terminem pobierania zarodków pszenżyta przeznaczonych do procedury embryo rescue jest czas pomiędzy 18 a 21 dniem po zapyleniu, natomiast w przypadku niedojrzałych ziarniaków jest to 21 dni po zapyleniu.
- ▶ Sterylizacja zarodków z wykorzystaniem NaClO skutkuje obniżeniem ilości otrzymanych regenerantów w porównaniu do sterylizacji z wykorzystaniem etanolu, co wynika prawdopodobnie z uszkodzenia zarodka przez czynnik sterylizujący.
- ▶ Najskuteczniejszym sposobem uniknięcia zakażeń w przypadku wykładania na pożywkę niedojrzałych ziarniaków jest ich sterylizacja powierzchniowa za pomocą mieszaniny etanolu z podchlorynem sodu lub chlorkiem rtęci.
- ▶ Zastosowanie opracowanej metodyki pozwoliło na uzyskanie wydajności na poziomie 40% w przypadku krzyżowań z pszenicą i 30% w przypadku krzyżowań z pszenżytem.

Wyniki – zadanie 5

Analizy molekularne uzyskanych mieszańców

- ▶ Analiza genów wrażliwości na fotoperiod w mieszańcach oddalonych pszenżyta wykazała obecność nowego allelu *Ppd-B1*.
- ▶ Wykazano, że jednym z czynników warunkujących karłowaty fenotyp roślin pszenżyta [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* zawierających nowy gen karłowatości jest osłabienie ekspresji genów *GA20ox* oraz *GA3ox* na poziomie transkrypcji.
- ▶ W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano 11 043 markery SilicoDArT specyficzne dla roślin wysokich, niskich oraz średnich. W obrębie tych markerów zidentyfikowano 4 624 markery SNP. Spośród tych markerów jedynie 5 były to markery specyficzne dla roślin niskich i zanikające wraz ze wzrostem długości pędu. Analiza bioinformatyczna mieszańców pochodzących z w/w kombinacji za pomocą platformy Phytozome 12 wykazała, że wszystkie te markery silicoDArT są specyficzne dla telomerów krótkich ramion dwóch chromosomów pszenicy 6A i 1B.
- ▶ Markery pogrupowano w dwa regiony chromosomalne przypisane do chromosomu 5R. Pierwsza z nich zawierała się w przedziale od 38,45 cM do 24,62 cM, pokrywając 14,29 cM z najbardziej związanym znacznikiem przy 32,811 cM. Druga grupa składała się z mniej powiązanych markerów w zakresie od 56,984 do 59,501 cM. Pierwsza grupa składała się z 31 asocjowanych markerów i 70 markerów będących markerami redundantnymi na podstawie opublikowanych materiałów uzupełniających (Tyrka i wsp. 2015). Podobnie, zidentyfikowano 8 asocjowanych i 24 redundantne dla drugiego regionu. Markery pogrupowano w dwa obszary chromosomalne położone w odległości około 11 cM. Zidentyfikowany region najprawdopodobniej zlokalizowany jest na krótkim ramieniu chromosomu 5R.
- ▶ Analiza populacji 541×84A/2 z wykorzystaniem technologii DArT pozwoliła na uzyskanie 37 963 markerów SilicoDArT specyficznych dla roślin wczesnych, późnych oraz o pośredniej wczesności. W obrębie tych markerów zidentyfikowano 25 269 markery SNP.
- ▶ W ciągu całego okresu badań potwierdzano charakter mieszańcowy uzyskiwanych mieszańców m.in. z wykorzystaniem markerów SRAP i ISSR.
- ▶ Uzyskane markery DArT sprzężone z cechą znajdują się w obrębie sekwencji oznaczonej *Aegilops tauschii* subsp. *tauschii* receptor-like protein 12 (LOC109767969), transcript variant X2.
- ▶ Amplifikacja PCR z wykorzystaniem staretrów specyficznych dla sekwencji markerów sprzężonych z cechą karłowatości nie wykazała różnic w długości produktów.
- ▶ Analizy molekularne otrzymanych mieszańców wykazały, iż wystąpienie stresu oksydacyjnego prowadziło do obniżenia ekspresji genów kodujących enzymy antyoksydacyjne (*CAT*, *APX*) u badanych form.

Osiągnięte cele i wdrożenia

- ▶ Uzyskane kombinacje krzyżówkowe zawierające w swoim składzie chromatynę pochodzącą z dzikich gatunków kozińców zostały przekazane do spółek hodowlanych i włączone w programy hodowlane
- ▶ Zlokalizowano nowy gen karłowatości o potencjalnej przydatności w hodowli pszenżyta na chromosomie 5R
- ▶ Zidentyfikowano potencjalne źródła karłowatości dla pszenżyta w życie oraz kozińcach
- ▶ Zidentyfikowano potencjalne źródła odporności na rdzę brunatną wśród kozińców i wprowadzono je do pszenżyta

Publikacje i doniesienia

Konferencje Naukowe

- ▶ Identyfikacja nowych źródeł odporności na rdzę brunatną pszenżyta w obrębie rodzaju *Aegilops*.
- ▶ Ocena krzyżowalności w obrębie jarych heksaploidalnych form pszenżyta i pszenicy.
- ▶ Analysis of *Ppd* alleles structure in triticale hybrid plants with different flowering time.
- ▶ Characterisation of the level of crossability during wide crosses within *Triticeae*.
- ▶ DArTseq analysis of F2 population obtained from crossing between dwarf and high triticale plants derived from [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* cross combination.
- ▶ Expression analysis of gibberellin biosynthesis pathway genes in triticale forms with *Dw1* gene and dwarf and high triticale plants derived from [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* cross combination.
- ▶ Identification of markers associated with dwarfism in the CZR876/01 × CZR891/01.
- ▶ Expression analysis of gibberellin biosynthesis pathway genes in triticale forms with *Dw1* gene and dwarf and high triticale plants derived from [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* cross combination.
- ▶ Development of DArT-based PCR markers for marker assisted selection of new dwarfing gene in triticale (x *Triticosecale* Wittmack).
- ▶ Plant height and yield components in backcross interspecific hybrids derivatives from *Aegilops columnaris* x *Triticum aestivum* combination.

Publikacja w przygotowaniu

- ▶ Putative reference genes expression stability determination in Triticale hybrids