

# SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2015 roku

## INFORMACJE OGÓLNE

Tytuł zadania - <b>Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone</b>
Numer zadania (w załączniku nr 9 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 18 maja 2010 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. Nr 91, poz. 595, z późn. zm.)) - 17
Planowany okres realizacji zadania: 2015
Planowane nakłady w zł: 80 000

## INFORMACJA O WYKONAWCACH

Kierownik zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Justyna Leśniowska-Nowak	dr	UP w Lublinie
Wykonawcy zadania		
imię i nazwisko	stopień i tytuł naukowy	miejsce zatrudnienia
Daniela Gruszecka	prof. dr hab.	UP w Lublinie
Michał Nowak	dr	UP w Lublinie
Sylwia Okoń	dr	UP w Lublinie
Agnieszka Surmacz-Magdziak	dr	UP w Lublinie
Aneta Koroluk	mgr inż.	UP w Lublinie
Sylwia Sowa (Róg)	mgr inż.	UP w Lublinie
Aleksandra Gogół	mgr inż.	UP 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	Identyfikacja nowych źródeł odporności na rdzę brunatną w dzikich heksaploidalnych gatunkach roślin z rodzaju <i>Aegilops</i> .	TAK
2	Uzyskanie mieszańców F <sub>1</sub> potencjalnie odpornych na rdzę brunatną uzyskaną w wyniku krzyżowania pszenżyta oraz pszenicy z wyselekcjonowanymi w roku 2014 formami <i>Aegilops</i> oraz poszerzenie zmienności polskiej puli genetycznej pszenżyta poprzez krzyżowanie oddalone z rodzajami <i>Triticum</i> i <i>Secale</i> .	TAK
3	Analiza długości międzywęźli roślin pochodzących z kombinacji krzyżówkowej [(Jana×Tempo)×Jana]× <i>Aegilops juvenalis</i> oraz określenie wpływu obecności nowego genu karłowatości na długość pędu głównego oraz długość i średnicę poszczególnych międzywęźli.	TAK
4	Podjęcie próby ograniczenia zakażeń grzybowych w kulturach <i>in vitro</i> w celu zwiększenia wydajności techniki ratowania zarodków.	TAK
5	Potwierdzenie charakteru mieszańcowego genotypów otrzymanych w roku ubiegłym oraz analiza ekspresji genów ze szlaku biosyntezy giberelin z wykorzystaniem sond molekularnych.	TAK

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

## 2. Opis tematów badawczych

**Temat badawczy 1: Fenotypowanie dzikich genotypów z rodzaju *Aegilops* pod kątem odporności na choroby grzybowe pszenżyta.**

### Cel tematu badawczego 1

Celem zadania 1 była identyfikacja nowych źródeł odporności na rdzę brunatną w dzikich heksaploidalnych gatunkach roślin z rodzaju *Aegilops*.

### Materiały i metody

W ramach zadania kolekcja analizowanych form z rodzaju *Aegilops* wzbogacona została o 100 genotypów należących do heksaploidalnych gatunków *Ae. crassa*, *Ae. neglecta* oraz *Ae. juvenalis*. Genotypy te pozyskano z bazy The Germplasm Resources Information Network (GRIN) prowadzonej przez U.S. Department of Agriculture's Agricultural Research Service oraz z banku genów prowadzonego przez IPK Gatersleben (Niemcy). Ponadto, tymi samymi izolatami rdzy brunatnej przetestowano 15 odmian pszenicy zwyczajnej, cechujących się wysoką plennością, które wykorzystywane będą do krzyżowań. W ramach zadania wykorzystano izolaty rdzy brunatnej zebrane z liści roślin pszenżyta rosnących w warunkach polowych w 3 oddalonych od siebie lokalizacjach w sezonie wegetacyjnym 2014/2015.

Identyfikację roślin odpornych na choroby grzybowe przeprowadzono za pomocą testów żywicieli-patogen na etapie siewki. Na fragmenty liści 10-dniowych siewek wyłożone na pożywkę agarową rozpylano zarodniki *Puccinia triticina* – grzyba powodującego rdzę brunatną. Szalki umieszczono w klimatyzowanym pomieszczeniu w temperaturze 18°C, wilgotności wynoszącej 80% i fotoperiodzie 16/8 h (dzień/noc). Po 10 dniach od rozpylenia porażenie zostało ocenione w skali 5-stopniowej. Interpretując wyniki oceny porażenia, za odporne (O) uznano formy ocenione w skali na 0 lub 1, natomiast za wrażliwe (W) formy ocenione na 3 i 4. Formy ocenione na 2 opisano jako pośrednie (P).

### Wyniki

W obrębie 100 analizowanych heksaploidalnych genotypów z rodzaju *Aegilops* zidentyfikowano 28 form odpornych na rdzę brunatną (tab. 1). Wyselekcjonowane genotypy mogą zostać wykorzystane do krzyżowań oddalonych z roślinami pszenżyta lub pszenicy w celu introdukcji genów odporności na *Puccinia triticina* do roślin zbożowych.

Analiza porażenia 15 badanych odmian pszenicy na rdzę brunatną wykazała, iż 7 z nich charakteryzowało się odpornością na tego patogena (tab. 2).

**Tabela 1.** Wyniki oceny porażenia analizowanych genotypów z rodzaju *Aegilops*.

Lp	#	Gatunek	Genotyp	Reakcja na porażenie przez <i>Puccinia triticina</i>
1	<i>Ae.</i> 1	<i>Aegilops neglecta</i> Req. ex Bertol. subsp. <i>recta</i> (Zhuk.) K. Hammer	UUMMNN	P
2	<i>Ae.</i> 2			O
3	<i>Ae.</i> 4			O
4	<i>Ae.</i> 5			P
5	<i>Ae.</i> 6			P
6	<i>Ae.</i> 7			O
7	<i>Ae.</i> 8			P
8	<i>Ae.</i> 10			P
9	<i>Ae.</i> 12			P
10	<i>Ae.</i> 13			O
11	<i>Ae.</i> 14			P
12	<i>Ae.</i> 15			W
13	<i>Ae.</i> 16			W
14	<i>Ae.</i> 17			O
15	<i>Ae.</i> 18			P
16	<i>Ae.</i> 20			W
17	<i>Ae.</i> 21			W
18	<i>Ae.</i> 22			W
19	<i>Ae.</i> 23			P
20	<i>Ae.</i> 24			W

Lp	#	Gatunek	Genotyp	Reakcja na porażenie przez <i>Puccinia triticinia</i>
21	<i>Ae.</i> 25			P
22	<i>Ae.</i> 26			P
23	<i>Ae.</i> 27			P
24	<i>Ae.</i> 28			W
25	<i>Ae.</i> 29			W
26	<i>Ae.</i> 30			P
27	<i>Ae.</i> 31			P
28	<i>Ae.</i> 32			W
29	<i>Ae.</i> 33			W
30	<i>Ae.</i> 34			P
31	<i>Ae.</i> 35			W
32	<i>Ae.</i> 36			P
33	<i>Ae.</i> 37			O
34	<i>Ae.</i> 38			P
35	<i>Ae.</i> 39			P
36	<i>Ae.</i> 40			W
37	<i>Ae.</i> 41			W
38	<i>Ae.</i> 42			O
39	<i>Ae.</i> 43			O
40	<i>Ae.</i> 44			O
41	<i>Ae.</i> 45			O
42	<i>Ae.</i> 46			O
43	<i>Ae.</i> 47			O
44	<i>Ae.</i> 48			P
45	<i>Ae.</i> 49			P
46	<i>Ae.</i> 50			O
47	<i>Ae.</i> 51			P
48	<i>Ae.</i> 52			W
49	<i>Ae.</i> 53			W
50	<i>Ae.</i> 54			P
51	<i>Ae.</i> 55			O
52	<i>Ae.</i> 56			P
53	<i>Ae.</i> 57			O
54	<i>Ae.</i> 58			P
55	<i>Ae.</i> 59			P
56	<i>Ae.</i> 61	<i>Aegilops neglecta</i>	UUMMNN	O
57	<i>Ae.</i> 62			P
58	<i>Ae.</i> 63			P
59	<i>Ae.</i> 65			P
60	<i>Ae.</i> 66			P
61	<i>Ae.</i> 67			W
62	<i>Ae.</i> 68			O
63	<i>Ae.</i> 69			P
64	<i>Ae.</i> 70			P
65	<i>Ae.</i> 71			O
66	<i>Ae.</i> 72			W
67	<i>Ae.</i> 115	<i>Aegilops crassa</i> ssp. <i>crassa</i>	DDMMSS	O
68	<i>Ae.</i> 116			O
69	<i>Ae.</i> 119			P
70	<i>Ae.</i> 120			O
71	<i>Ae.</i> 122			P
72	<i>Ae.</i> 123			O
73	<i>Ae.</i> 125			P
74	<i>Ae.</i> 128	<i>Aegilops crassa</i> ssp. <i>vavilowii</i>	DDMMSS	O
75	<i>Ae.</i> 131			P
76	<i>Ae.</i> 132			W
77	<i>Ae.</i> 133			P
78	<i>Ae.</i> 134			W
79	<i>Ae.</i> 135			O

Lp	#	Gatunek	Genotyp	Reakcja na porażenie przez <i>Puccinia triticinia</i>
80	<i>Ae.</i> 136			P
81	<i>Ae.</i> 137			P
82	<i>Ae.</i> 138			P
83	<i>Ae.</i> 139			P
84	<i>Ae.</i> 140			O
85	<i>Ae.</i> 141	<i>Aegilops crassa</i>	DDMMSS	P
86	<i>Ae.</i> 143			O
87	<i>Ae.</i> 144			W
88	<i>Ae.</i> 145			W
89	<i>Ae.</i> 146			O
90	<i>Ae.</i> 147			W
91	<i>Ae.</i> 148			W
92	<i>Ae.</i> 150	<i>Aegilops juvenalis</i>	DDMMUU	P
93	<i>Ae.</i> 151			P
94	<i>Ae.</i> 152			P
95	<i>Ae.</i> 153			W
96	<i>Ae.</i> 155			W
97	<i>Ae.</i> 156			W
98	<i>Ae.</i> 157			P
99	<i>Ae.</i> 159			O
100	<i>Ae.</i> 163			W

**Tabela 2.** Wyniki oceny porażenia analizowanych odmian pszenicy.

Lp	Odmiana	Reakcja na porażenie przez <i>Puccinia triticinia</i>
1	Naridana	P
2	Figura	P
3	Ostroga	O
4	Askalon	O
5	Bamberka	W
6	Natula	O
7	Bockris	W
8	Astoria	P
9	Estivus	W
10	Praktik	O
11	Muszelka	W
12	Fidelius	O
13	Jantarka	P
14	Ozon	O
15	Forum	O

### Wnioski

1. Wybrane heksaploidalne gatunki z rodzaju *Aegilops* stanowić mogą nowe, cenne źródła zmienności w hodowli odpornościowej pszenżyta i pszenicy.
2. Zidentyfikowane odporne na rdzę brunatną odmiany pszenicy mogą stanowić źródło genów odporności dla nowych genotypów pszenżyta.
3. Ze względu na zmienność patogena wskazana jest weryfikacja odporności wybranych genotypów w przyszłych sezonach wegetacyjnych, w oparciu o izolaty zebrane z terenu całego kraju.

## Temat badawczy 2: Uzyskiwanie mieszańców poprzez krzyżowanie (kastrowanie i zapylanie) roślin.

### Cel tematu badawczego 2

Celem zadania 2 jest wprowadzenie odporności na rdzę brunatną pszenżyta poprzez krzyżowanie z dzikimi gatunkami z rodzaju *Aegilops* oraz poszerzenie zmienności polskiej puli genetycznej pszenżyta poprzez krzyżowanie oddalone z rodzajami *Triticum* i *Secale*.

### Materiały i metody

W roku 2015 wysiano w sumie 123 genotypy pszenżyta, żyta uprawnego oraz pszenicy zwyczajnej (odpowiednio: 40, 19 i 64) z przeznaczeniem na formy rodzicielskie do krzyżowań. W ramach zadania wysiano również rośliny wybranych gatunków z rodzaju *Aegilops* (łącznie 162 genotypy) (tab. 3).

Ziarniaki wysiano na poletkach 2-rzędowych, w siewie gęstym, rzutowym. Gęstość zasiewu wynosiła 300-350 ziarniaków na m<sup>2</sup>, długość rzędu 1 m, a rozstawa rzędów 20 cm. W celu zróżnicowania czasu kwitnienia i wydłużenia okresu w którym możliwe będzie krzyżowanie roślin wysiewu dokonano w dwóch terminach. Interwał pomiędzy I i II terminem wysiewu wynosił około 30 dni. W siewie punktowym wysiano rośliny mieszańcowe wczesnych pokoleń przeznaczone do krzyżowań wstecznych (pierwotne pszenżyto uzyskane w poprzednim sezonie). Doświadczenia polowe założono w gospodarstwach doświadczalnych Uniwersytetu Przyrodniczego w Lublinie w dwóch lokalizacjach: GD Czesławice k. Nałęczowa oraz GD Felin w Lublinie. Materiały do krzyżowań wyselekcjonowane zostały na podstawie obserwacji terminów kłoszenia w latach wcześniejszych. Dzikie genotypy z rodzaju *Aegilops* wyselekcjonowane zostały na podstawie wyników testów żywicielpatogen.

Tuż przed kwitnieniem kwiaty w kłosach roślin przeznaczonych na formy mateczne były kastrowane. Kastrację wykonano metodą manualną z użyciem pincety. Z każdego kłoska usuwano środkowe kwiaty, a z pozostałych, bocznych kwiatów usuwano po trzy niedojrzałe pylniki. Na każdy wykastrowany kłos założono izolator z folii paroprzepuszczalnej. Po osiągnięciu dojrzałości przez znamię słupka, nanoszono na nie pyłek z roślin przeznaczonych na formę ojcowską. Zapylony kłos ponownie izolowano.

W przypadku roślin pszenżyta pierwotnego przeprowadzono procedurę kolchicynowania w celu podwojenia liczby chromosomów. Rośliny przeniesiono z warunków polowych do doniczek wypełnionych podłożem, następnie część pędów przycięto na wysokość 6-8 cm. Na tak przygotowane pędy nałożono na 48 godzin tampony z waty nasączonej 0,4% wodnym roztworem kolchicyny. Po zakończonej procedurze kolchicynowania rośliny przeniesiono ponownie na poletka.

Po zebraniu w fazie dojrzałości pełnej, wszystkie krzyżowane kłosy poddano ocenie pod kątem liczby wykastrowanych kwiatów oraz zawiązanych ziarniaków. Na podstawie tych danych obliczono zdolność kombinacyjną poszczególnych form, którą wyrażono w formie procentowej. W przypadku krzyżowań z dzikimi gatunkami z rodzaju *Aegilops*, ze względu na rozbieżność w ilości kombinacji dla poszczególnych genotypów wynikającej ze znacznych różnic w czasie kwitnienia, wyniki podano w formie liczby uzyskanych ziarniaków F<sub>1</sub>.

**Tabela 3.** Materiały wysiane w doświadczeniu polowym z przeznaczeniem do krzyżowań.

Lp.	Pszennica	Pszennyto	Żyto	<i>Aegilops</i>
1	170	Algozo	980	<i>Ae. crassa</i> [9 genotypów]
2	Alcazar	Alzo	981	<i>Ae. crassa</i> ssp. <i>vavilovii</i> [26 genotypów]
3	Alfold	Baltiko	982	<i>Ae. juvenalis</i> [14 genotypów]
4	Aristide	BOH 1512	998	<i>Ae. neglecta</i> [66 genotypów]
5	Arkadia	BOH 1813	Amilo	<i>Ae. neglecta</i> ssp. <i>recta</i> [47 genotypów]
6	Artist	Borowik	Arant	
7	Askalon	DC 1	Bojko	
8	Astoria	DC 2	Dańkowskie Agat	
9	Baletka	LAD 1	Dańkowskie Amber	

Lp.	Pszenica	Pszenżyto	Żyto	<i>Aegilops</i>
10	Bamberka	LAD 2	Dańkowskie Diament	
11	Belissa	LAD 3	Dańkowskie Rubin	
12	Bockris	LAD 4	DC 45	
13	Brilliant	Magnat	DC 88	
14	Carodejka	MAH 1	DC 89	
15	Fidelius	MAH 10	DC 92	
16	Figura	MAH 11	Motto	
17	Forkida	MAH 12	Rostockie	
18	Forum	MAH 13	Warko	
19	Franz	MAH 14	Włodko	
20	Herman	MAH 15		
21	Improved Triumph	MAH 16		
22	Jantarka	MAH 2		
23	Japhet	MAH 3		
24	Julius	MAH 4		
25	Kampana	MAH 5		
26	Kaskada	MAH 6		
27	Kilimanjaro	MAH 7		
28	Knox	MAH 8		
29	Kohelia	MAH 9		
30	KWS Magic	Meloman		
31	Lavantus	Pawo		
32	Livius	Sekundo		
33	Loft	Sorento		
34	Longbow	Tomko		
35	Madison	Trismart		
36	Markiza	TRKW 53		
37	Mauri	TRKW 54		
38	Muszelka	TRKW 55		
39	Nadobna	TRKW 56		
40	Naridana	Zorro		
41	Natula			
42	Ohio			
43	Platin			
44	Poshuk			
45	Rusalka			
46	Safidak			
47	Sailor			
48	Spartakus			
49	Speedway			
50	Super Triumph			
51	TAM 105			
52	Tommi			
53	Top			
54	TRKW 39			
55	TRKW 41			
56	TRKW 44			
57	TRKW 48			
58	TRKW 49			
59	TRKW 50			
60	TRKW 52			
61	Tulecka			
62	Vratza			
63	Warrior			
64	Zenit			

## Wyniki

W ramach realizacji zadania wykonanych zostało 107 kombinacji krzyżówkowych heksaploidalnego pszenżyta ozimego z haksaploidalną pszenicą ozimą. Ziarniaki mieszańcowe

uzyskano dla 93 z nich. Procent zawiązanych ziarniaków wahał się od 0 do 38,89 (tab. 4). Najwyższą zdolność kombinacyjną zanotowano dla pszenicy TRKW 41 (33,33%), a najniższą dla odmian pszenicy Carodejka, Tulecka i rodu TRKW 44, dla których nie uzyskano żadnego ziarniaka mieszańcowego. Najwyższą zdolność kombinacyjną w obrębie *Triticale* wykazywał ród hodowlany BOH 1813 (31,03%), a najniższą genotypy MAH 5, MAH 8 i MAH 17 w przypadku których nie zawiązały się ziarniaki mieszańcowe (tab. 4).

**Tabela 4.** Kombinacje krzyżówkowe pszenżyta 6x z pszenicą 6x.

Lp.	Kombinacja	% zawiązanych ziarniaków
1	DC 2 × Ohio	38,89
2	Pizarro × Herman	37,50
3	BOH 1512 × TRKW 48	34,38
4	BOH 1813 × TRKW 41	33,33
5	BOH 1813 × TRKW 52	28,57
6	DC 2 × Alcazar	28,57
7	MAH 10 × Improved Triumph	26,32
8	Borowik × Belissa	25,00
9	TRKW 54 × TRKW 39	25,00
10	TRKW 54 × TRKW 52	23,68
11	BOH 1512 × TRKW 49	23,53
12	TRKW 53 × TRKW 39	23,53
13	MAH 16 × Artist	21,88
14	MAH 11 × Improved Triumph	21,05
15	MAH 11 × Super Triumph	19,35
16	TRKW 53 × TRKW 52	18,42
17	DC 1 × Kilimanjaro	18,18
18	DC 1 × Franz	17,86
19	Tomko × Forkida	17,50
20	Borowik × Herman	16,67
21	MAH 15 × Baletka	16,67
22	Pizarro × Kampana	16,67
23	TRKW 53 × TRKW 48	16,67
24	TRKW 55 × TRKW 48	16,67
25	Meloman × Aristide	16,13
26	Pizarro × Loft	15,38
27	MAH 16 × Lavantus	15,00
28	MAH 6 × Baletka	15,00
29	DC 1 × Livius	14,71
30	TRKW 53 × TRKW 49	14,71
31	DC 1 × Ohio	13,89
32	MAH 6 × Aristide	13,89
33	Pizarro × Tommi	13,89
34	MAH 3 × Julius	13,64
35	TRKW 56 × TRKW 49	13,16
36	TRKW 54 × TRKW 50	12,50
37	MAH 9 × Arkadia	12,00
38	MAH 1 × Julius	11,90

<b>Lp.</b>	<b>Kombinacja</b>	<b>% zawiązanych ziarniaków</b>
39	Borowik × Alcazar	11,76
40	MAH 7 × Improved Triumph	11,76
41	Pizarro × Alcazar	11,76
42	DC 1 × Alcazar	11,11
43	MAH 12 × Improved Triumph	11,11
44	Tomko × Lavantus	11,11
45	Tomko × Markiza	11,11
46	MAH 16 × Baletka	10,53
47	MAH 13 × Aristide	10,42
48	DC 2 × Kampana	10,00
49	TRKW 56 × TRKW 52	10,00
50	MAH 15 × Arkadia	9,52
51	MAH 3 × Bockris	9,52
52	DC 1 × Kampana	9,38
53	TRKW 55 × TRKW 50	9,38
54	MAH 1 × Alfold	9,30
55	BOH 1512 × TRKW 50	8,82
56	MAH 13 × Alfold	8,70
57	MAH 7 × Rusalka	7,69
58	DC 1 × Muszelka	7,50
59	MAH 1 × Forum	7,50
60	MAH 4 × Top	7,50
61	MAH 14 × Lavantus	7,14
62	Borowik × TRKW 48	6,90
63	MAH 6 × Alfold	6,52
64	MAH 9 × Artist	6,52
65	MAH 10 × Baletka	6,38
66	MAH 14 × Baletka	6,25
67	MAH 3 × Fidelius	5,88
68	Borowik × Tommi	5,26
69	Tomko × Baletka	5,26
70	Meloman × Alfold	5,13
71	DC 2 × Muszelka	5,00
72	Meloman × Top	5,00
73	MAH 14 × Sailor	4,76
74	MAH 2 × Baletka	4,76
75	Meloman × Baletka	4,76
76	MAH 1 × Baletka	3,85
77	Borowik × TRKW 49	3,57
78	Pizarro × Muszelka	3,57
79	MAH 4 × Forum	3,13
80	DC 2 × Tommi	2,94
81	MAH 11 × 170	2,94
82	MAH 2 × Forum	2,94
83	DC 1 × Herman	2,78



Lp.	Kombinacja	% związanych ziarniaków
84	TRKW 53 × TRKW 50	2,78
85	Borowik × Muszelka	2,63
86	MAH 16 × Sailor	2,63
87	MAH 4 × Natula	2,63
88	MAH 14 × Artist	2,50
89	Meloman × Poshuk	2,50
90	MAH 13 × Top	2,38
91	Tomko × Astoria	2,38
92	MAH 2 × Bockris	2,27
93	MAH 4 × Bockris	1,96
94	Borowik × Franz	0,00
95	Borowik × TRKW 44	0,00
96	DC 1 × Tommi	0,00
97	MAH 13 × Tulecka	0,00
98	MAH 17 × Super Triumph	0,00
99	MAH 2 × Fidelius	0,00
100	MAH 3 × Forum	0,00
101	MAH 5 × Rusalka	0,00
102	MAH 5 × Super Triumph	0,00
103	MAH 8 × Rusalka	0,00
104	MAH 8 × Super Triumph	0,00
105	TRKW 55 × TRKW 44	0,00
106	TRKW 55 × TRKW 52	0,00
107	MAH 7 × Carodejka	0,00

W sezonie wegetacyjnym 2014/2015 przeprowadzono również krzyżowania wsteczne pszenżyta oktoploidalnego z heksaploidalnymi genotypami tego zboża. W grupie tej wykonano 8 kombinacji krzyżówkowych. Formę mateczną stanowiły mieszańce oddalone pszenżyta uzyskane w ramach realizacji projektu w roku ubiegłym, zaś formami ojcowskimi były 4 rody pszenżyta ozimego. Procent związanych ziarniaków wahał się od 0 do 18,75 (tab. 5).

**Tabela 5.** Kombinacje krzyżowań wstecznych pszeżyta pierwotnego.

Lp.	Kombinacja	% związanych ziarniaków
1	[Vetta × Warko × Sorento] × LAD 3	18,75
2	[Zenit × 998] × LAD 3	7,14
3	[Alfold × 982] × LAD 3	5,17
4	[Alfold × 982] × LAD 1	5,00
5	[Alfold × 982] × LAD 2	0,00
6	[Alfold × 982] × LAD 4	0,00
7	[Demetra × Arant] × LAD 3	0,00
8	[Rusalka × Arant] × LAD 3	0,00

W bieżącym roku wykonano również krzyżowania mające na celu uzyskanie mieszańców oddalonych pomiędzy heksaploidalną pszenicą zwyczajną, a żytem uprawnym. Wykonano 42 kombinacje krzyżówkowe z których uzyskano 13 kombinacji pszenżyta pierwotnego. Procent związanych ziarniaków wahał się od 0 do 37,5 (tab. 6). Najwyższą zdolność kombinacyjną zanotowano

w przypadku genotypów matecznych dla pszenicy odmiany Figura (37,5%), natomiast wśród genotypów ojcowskich dla żyta odmiany Warko (23,75%).

**Tabela 6.** Kombinacje krzyżówkowe pszenżyta pierwotnego uzyskane w wyniku krzyżowania pszenicy zwyczajnej i żyta uprawnego.

<b>Lp.</b>	<b>Kombinacja</b>	<b>% związanych ziarniaków</b>
1	Figura × Warko	37,50
2	Bamberka × Amilo	30,00
3	Naridana × Warko	19,23
4	Forkida × Arant	19,05
5	Baletka × Warko	16,67
6	Jantarka × Amilo	14,29
7	Spartakus × Arant	12,50
8	Bockris × Amilo	10,00
9	Lavantus × Dańkowskie Amber	8,33
10	KWS Magic × DC 89	5,56
11	Vratza × Motto	5,56
12	Platin × Amilo	4,35
13	Nadobna × Bojko	4,17
14	Arkadia × Arant	0,00
15	Arkadia × Rostockie	0,00
16	Artist × Arant	0,00
17	Artist × DC 92	0,00
18	Askalon × Dańkowskie Agat	0,00
19	Astoria × Amilo	0,00
20	Astoria × DC89	0,00
21	Brilliant × Amilo	0,00
22	Brilliant × Dańkowskie Rubin	0,00
23	Fidelius × DC 89	0,00
24	Forkida × DC 92	0,00
25	Forum × DC 89	0,00
26	Forum × Rostockie	0,00
27	Jantarka × Dańkowskie Rubin	0,00
28	Jantarka × Rostockie	0,00
29	Kohelia × DC 95	0,00
30	KWS Magic × Dańkowskie Rubin	0,00
31	KWS Magic × Rostockie	0,00
32	Lavantus × Arant	0,00
33	Lavantus × DC 92	0,00
34	Markiza × Arant	0,00
35	Markiza × DC 92	0,00
36	Muszelka × Bojko	0,00
37	Naridana × Motto	0,00
38	Naridana × Rostockie	0,00
39	Sailor × DC 92	0,00
40	Spartakus × Motto	0,00
41	Tulecka × Arant	0,00

Lp.	Kombinacja	% związanych ziarniaków
42	Tulecka × DC 92	0,00

W ramach zadania badawczego wykonano również krzyżowania oddalone heksaploidalnych form pszenicy oraz pszenżyta z dzikimi gatunkami z rodzaju *Aegilops*, charakteryzującymi się odpornością na rdzę brunatną. Wykonano po 25 kombinacji krzyżówkowych dla każdego ze zbóż. Liczba uzyskanych kombinacji wyniosła 17 dla krzyżowań *Aegilops* z pszenicą i 13 w przypadku krzyżowań z pszenżytem (tab. 7, 8). Łączna liczba uzyskanych ziarniaków mieszańcowych wyniosła 66.

**Tabela 7.** Kombinacje krzyżówkowe dzikich form z rodzaju *Aegilops* z pszenicą.

Lp.	Kombinacja	Liczba związanych ziarniaków
<i>Aegilops neglecta</i> ssp. <i>recta</i>		
1	<i>Ae.</i> 42 × Alfold	1
2	<i>Ae.</i> 42 × Carodejka	1
3	<i>Ae.</i> 42 × Rusalka	0
4	<i>Ae.</i> 42 × Weipro	0
5	<i>Ae.</i> 42 × Zenit	0
6	<i>Ae.</i> 46 × Forkida	1
7	<i>Ae.</i> 46 × Lavantus	2
<i>Aegilops neglecta</i>		
8	<i>Ae.</i> 61 × Belissa	0
9	<i>Ae.</i> 93 × Belissa	1
10	<i>Ae.</i> 93 × Tobak	3
11	<i>Ae.</i> 96 × Lavantus	0
12	<i>Ae.</i> 96 × Sailor	1
13	<i>Ae.</i> 100 × Belissa	1
14	<i>Ae.</i> 100 × Forum	1
15	<i>Ae.</i> 100 × Sailor	0
16	<i>Ae.</i> 104 × Belissa	1
17	<i>Ae.</i> 104 × Forkida	2
18	<i>Ae.</i> 104 × Forum	1
19	<i>Ae.</i> 104 × Ohio	3
20	<i>Ae.</i> 104 × Sailor	0
21	<i>Ae.</i> 104 × Tobak	1
<i>Aegilops crassa</i> ssp. <i>vavilovii</i>		
22	<i>Ae.</i> 135 × Alfold	5
23	<i>Ae.</i> 135 × Carodejka	1
<i>Aegilops juvenalis</i>		
24	<i>Ae.</i> 159 × Mambo	0
25	<i>Ae.</i> 159 × Sailor	1

**Tabela 8.** Kombinacje krzyżówkowe dzikich form z rodzaju *Aegilops* z pszenżytem.

Lp.	Kombinacja	Liczba zawiązanych ziarniaków
<i>Aegilops neglecta</i> ssp. <i>recta</i>		
1	<i>Ae.</i> 42 × MAH 5	0
2	<i>Ae.</i> 42 × MAH 7	0
3	<i>Ae.</i> 43 × MAH 11	0
4	<i>Ae.</i> 43 × MAH 7	0
5	<i>Ae.</i> 44 × MAH 7	1
6	<i>Ae.</i> 45 × MAH 10	0
7	<i>Ae.</i> 45 × MAH 11	0
8	<i>Ae.</i> 46 × Borowik	1
9	<i>Ae.</i> 46 × MAH 15	1
<i>Aegilops neglecta</i>		
10	<i>Ae.</i> 55 × MAH 11	0
11	<i>Ae.</i> 61 × DC 1	0
12	<i>Ae.</i> 61 × DC 2	0
13	<i>Ae.</i> 90 × Alekto	4
14	<i>Ae.</i> 90 × Borowik	1
15	<i>Ae.</i> 93 × Pizarro	0
16	<i>Ae.</i> 97 × Alekto	2
17	<i>Ae.</i> 97 × Borowik	3
18	<i>Ae.</i> 100 × DC 1	3
19	<i>Ae.</i> 100 × Pizarro	3
20	<i>Ae.</i> 100 × TRKW 54	10
21	<i>Ae.</i> 104 × DC 2	3
22	<i>Ae.</i> 104 × Pizarro	3
<i>Aegilops crassa</i> ssp. <i>vavilovii</i>		
23	<i>Ae.</i> 135 × TRKW 56	4
<i>Aegilops juvenalis</i>		
24	<i>Ae.</i> 159 × BOH 1813	0
25	<i>Ae.</i> 159 × TRKW 54	0

### Wnioski

1. 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.
2. Zdolność kombinacyjną badanych genotypów pszenicy, żyta i pszenżyta wykorzystanych w krzyżowaniach oddalonych cechuje duże zróżnicowanie i zależność od zastosowanej formuły krzyżowania.

### Temat badawczy 3: Ocena zmienności cech w mieszańcach

#### Cel tematu badawczego 3

Analiza długości oraz średnicy międzywęzła roślin pochodzących z kombinacji krzyżówkowej [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* oraz określenie wpływu obecności nowego genu karłowatości na badane cechy.

## Materiały i metody

Przedmiot badań stanowiły pojedyncze rośliny pszenżyta pochodzące z populacji F<sub>2</sub> otrzymanej na drodze krzyżowania form niskich oraz wysokich wywodzących się z kombinacji krzyżówkowej [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis*. Rośliny F<sub>2</sub> pochodziły z pojedynczej rośliny F<sub>1</sub>. W ramach zadania ocenie poddano 180 roślin z populacji segregującej oraz rośliny form rodzicielskich (20 matecznych i 20 ojcowskich). Forma niska (mateczna) została wyselekcjonowana spośród wysokich roślin należących do w/w kombinacji krzyżówkowej. Forma wysoka opisana była jako ród CZR 891/01, natomiast forma niska jako ród CZR 876/01. Obniżenie wysokości powodowane było spontaniczną mutacją, co zostało potwierdzone we wcześniejszych badaniach. Ocenie fenotypowej poddane zostały pędy główne wszystkich roślin w fazie dojrzałości pełnej.

W ocenie fenotypowej uwzględniono następujące cechy:

- długość pędu głównego [cm],
- długość międzywęźli [cm],
- średnica międzywęźli [mm],

Analizy statystyczne wykonano z wykorzystaniem pakietu SAS w wersji 9.2. Do określenia istotności różnic pomiędzy średnimi grupowymi w układzie analizy wariancji zastosowano test post-hoc HSD Tukey'a przy poziomie istotności  $\alpha = 0,05$ .

## Wyniki

Analiza długości pędu głównego roślin mieszańcowych uzyskanych w wyniku krzyżowania pomiędzy formą wysoką, a niską zawierającą nowy gen karłowatości wykazała, że długość pędu głównego w mieszańcach uległa skróceniu średnio o 16,8 cm w porównaniu z formą wysoką. Analiza długości poszczególnych międzywęźli wykazała iż w mieszańcach istotnemu skróceniu w porównaniu z wysoką formą rodzicielską ulega I międzywęźle (dokłosie) oraz III międzywęźle (tab. 9).

Analiza średnicy poszczególnych międzywęźli wykazała, że dla mieszańców była ona zazwyczaj wyższa niż dla rodzicielskiej formy wysokiej, co sugerować może poprawę stabilności rośliny, niemniej jednak różnica ta nie była istotna statystycznie (tab. 9). W przypadku niskiego genotypu rodzicielskiego (ród CZR 876/01) obserwowano ponadto redukcję liczby międzywęźli do 4 (brak najniższego międzywęźla).

**Tabela 9.** Analiza długości pędu głównego oraz długości i średnicy poszczególnych międzywęźli dla analizowanych genotypów pszenżyta.

Genotyp	Długość pędu głównego [cm]	Nr międzywęźla [od kłosa]	Długość [cm]	Średnica [mm]
CZR 876/01 (forma niska)	71,8 <sup>a</sup>	I	32,2 <sup>b</sup>	3,45 <sup>a</sup>
		II	15,2 <sup>b</sup>	5,10 <sup>a</sup>
		III	7,4 <sup>c</sup>	5,13 <sup>a</sup>
		IV	4,5 <sup>b</sup>	4,51 <sup>a</sup>
		V	n/a	n/a
CZR 876/01 × CZR 891/01	87,7 <sup>b</sup>	I	35,5 <sup>b</sup>	3,37 <sup>a</sup>
		II	18,3 <sup>a</sup>	4,94 <sup>a</sup>
		III	11,2 <sup>b</sup>	5,75 <sup>a</sup>
		IV	7,4 <sup>a</sup>	5,34 <sup>a</sup>
		V	4 <sup>a</sup>	4,47 <sup>a</sup>
CZR 891/01 (forma wysoka)	104,5 <sup>c</sup>	I	46,6 <sup>a</sup>	3,45 <sup>a</sup>
		II	19,0 <sup>a</sup>	4,72 <sup>a</sup>
		III	14,0 <sup>a</sup>	5,37 <sup>a</sup>
		IV	8,9 <sup>a</sup>	4,88 <sup>a</sup>
		V	5,0 <sup>a</sup>	4,34 <sup>a</sup>

Średnie z tą samą literą nie różnią się istotnie.

## Wnioski

1. 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.

2. Introdukcja genu karłowatości na drodze krzyżowania z rodem CZR 876/01 nie wpływa istotnie na zmianę średnicy międzywęźli pędu głównego rośliny.

#### **Temat badawczy 4: Izolacja uzyskanych zarodków i prowadzenie kultur *in vitro*.**

##### **Cel tematu badawczego**

Celem zadania 4 jest podjęcie próby ograniczenia zakażeń grzybowych w kulturach *in vitro* w celu zwiększenia wydajności techniki ratowania zarodków.

##### **Materiały i metody**

Materiałem badań było w sumie 55 zarodków oraz 73 niedojrzałe ziarniki mieszańcowe uzyskane w wyniku krzyżowania między sobą 8 genotypów pszenżyta (Algozo, Alzo, Baltiko, Magnat, Pawo, Trismart, Sekundo i Sorento). Wiosną wybrane odmiany wykastrowano, a następnie zapylnono w warunkach doświadczenia polowego. Następnie z rozwijających się ziarników mieszańcowych pobierano zarodki, celem przeniesienia do warunków kultury *in vitro*. Zarodki pobierano w trzech punktach czasowych: 14, 18 oraz 21 dni po zapyleniu. Do badań wykorzystano także młode ziarniki mieszańcowe w całości (bez izolacji zarodka). Każdą próbę stanowiło 4 zarodki lub ziarniki. Pobrane zarodki oraz ziarniki poddano sterylizacji wg różnych protokołów (tab. 10). Po sterylizacji zarodki oraz ziarniki płukano trzykrotnie w wodzie dejonizowanej.

**Tabela 10.** Czynniki wykorzystane w procedurze sterylizacji zarodków i niedojrzałych ziarników przeznaczonych do kultur *in vitro*.

<b>Czynnik sterylizujący</b>	<b>Czas traktowania</b>	<b>Liczba obiektów</b>
<i>Zarodki</i>		
70% etanol	2 min.	12
	4 min.	12
2% NaClO	2 min.	12
	4 min.	12
<i>Ziarniki</i>		
75% etanol	4 min.	12
	6 min.	12
2% NaClO	2 min.	12
	5 min.	12
70% etanol + 5% NaClO	1 min. + 2 min.	12
70% etanol + 0,01% HgCl <sub>2</sub>	30 s. + 3 min.	12

Tak przygotowane zarodki mieszańcowe wykorzystano w procedurze ratowania zarodków (*embryo rescue*) w warunkach kultury *in vitro*. W tym celu sterylne zarodki umieszczano na pożywce MS z dodatkiem hydrolizatu kazeiny i umieszczano w fitotronie. W pierwszym etapie (5 dni) przetrzymywane były one w ciemności w temperaturze 25°C. Po tym czasie skiełkowane zarodki przeniesiono do fotoperiodu 16/8. Analogicznie postępowano w przypadku ziarników. Uzyskane rośliny przeniesiono następnie do doniczek w celu ich adaptacji do środowiska, a następnie do warunków polowych.

##### **Wyniki**

W ramach przeprowadzonego doświadczenia procedurę *embryo rescue* w warunkach kultury *in vitro* wykonano w sumie dla 55 zarodków, z których z sukcesem zregenerowano 27 roślin (49%).

Badania wykazały, że prawie wszystkie zastosowane protokoły sterylizacji pozwoliły na całkowite wyeliminowanie zakażeń grzybowych, jednakże zastosowanie NaClO skutkowało zazwyczaj redukcją ilości uzyskanych roślin w porównaniu do obiektów traktowanych etanolem (tab. 11). W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, że efektywność regeneracji dla zarodków pobranych 14 dni po zapyleniu (średnia 35%) była niższa niż w przypadku zarodków pobranych 18 i 21 dni po zapyleniu (średnia odpowiednio 59% i 50%).

**Tabela 11.** Wyniki procedury sterylizacji zarodków mieszańcowych przeznaczonych do kultur *in vitro*.

Kombinacja krzyżówkowa	Czas pobierania [dni po zapyleniu]	Metoda sterylizacji	Zakażenie	Liczba zarodków	Liczba roślin	Efektywność [%]
Algoso × Alzo	14	70% EtOH 2 min	-	5	2	40
Algoso × Alzo		70% EtOH 4 min	-	4	2	50
Algoso × Alzo		2% NaClO 2 min	-	4	1	25
Algoso × Alzo		2% NaClO 4 min	+	4	1	25
Pawo × Algoso	18	70% EtOH 2 min	-	5	4	80
Algoso × Alzo		70% EtOH 4 min	-	5	2	40
Pawo × Trismart		2% NaClO 2 min	-	6	4	67
Pawo × Magnat		2% NaClO 4 min	-	6	3	50
Sorento × Pawo	21	70% EtOH 2 min	+	4	3	75
Sorento × Pawo		70% EtOH 4 min	-	4	2	50
Sorento × Pawo		2% NaClO 2 min	-	4	2	50
Sorento × Pawo		2% NaClO 4 min	-	4	1	25
<b>SUMA</b>				<b>55</b>	<b>27</b>	<b>49</b>

W ramach prowadzonych badań oceniono również wpływ czasu pobierania oraz zastosowanej metody sterylizacji na regenerację młodych roślin z niedojrzałych ziarniaków roślin mieszańcowych, przeniesionych na pożywkę MS bez izolacji zarodka. W sumie wyłożono 73 niedojrzałe ziarniaki z których zregenerowano 38 roślin (52%).

Badania wykazały, że sterylizacja powierzchniowa pobranych ziarniaków za pomocą etanolu nie pozwoliła najczęściej na uniknięcie zakażeń w kulturach *in vitro*. Zastosowanie mieszaniny dwóch czynników sterylizujących gwarantowało eliminację zakażeń (tab. 12). Średnia efektywność regeneracji roślin była najwyższa w przypadku ziarniaków pobieranych 21 dni po zapyleniu (58%).

**Tabela 12.** Wyniki procedury sterylizacji niedojrzałych ziarniaków mieszańcowych przeznaczonych do kultur *in vitro*.

Kombinacja krzyżówkowa	Czas pobierania [dni po zapyleniu]	Metoda sterylizacji	Zakażenie	Liczba ziarniaków	Liczba roślin	Efektywność [%]
Algoso x Alzo	14	75% EtOH 4 min	+	4	0	0
Algoso x Alzo		75% EtOH 6 min	+	4	0	0
Algoso x Alzo		2% NaClO 2 min	+	4	0	0
Algoso x Alzo		2% NaClO 5 min	-	4	4	100
Algoso x Alzo		70% EtOH 1 min + 5% NaClO 2 min	-	4	4	100
Algoso x Alzo		70% EtOH 30 s + 0,01 HgCl <sub>2</sub> 3 min	-	4	4	100
Sekundo x Trismart	18	75% EtOH 4 min	-	5	5	100
Pawo x Trismart		75% EtOH 6 min	+	4	0	0
Pawo x Algoso		2% NaClO 2 min	-	4	0	0
Pawo x Algoso		2% NaClO 5 min	+	4	0	0
Algoso x Magnat		70% EtOH 1 min + 5% NaClO 2 min	-	4	3	75
Algoso x Alzo		70% EtOH 30 s + 0,01 HgCl <sub>2</sub> 3 min	-	4	4	100

Kombinacja krzyżówkowa	Czas pobierania [dni po zapyleeniu]	Metoda sterylizacji	Zakażenie	Liczba ziarniaków	Liczba roślin	Efektywność [%]
Sorento x Pawo	21	75% EtOH 4 min	+	4	3	75
Sorento x Pawo		75% EtOH 6 min	+	4	0	0
Sorento x Pawo		2% NaClO 2 min	-	4	4	100
Sorento x Pawo		2% NaClO 5 min	-	4	4	100
Sorento x Baltiko		70% EtOH 1 min + 5% NaClO 2 min	-	4	3	75
Sorento x Baltiko		70% EtOH 30 s + 0,01 HgCl <sub>2</sub> 3 min	-	4	0	0
<b>SUMA</b>				<b>73</b>	<b>38</b>	<b>52</b>

### Wnioski

1. Optymalnym terminem pobierania zarodków pszenżyta przeznaczonych do procedury *embryo rescue* jest czas pomiędzy 18 a 21 dniem po zapyleeniu, natomiast w przypadku niedojrzałych ziarniaków jest to 21 dni po zapyleeniu.
2. 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.
3. Najskuteczniejszym sposobem uniknięcia zakażeń w przypadku wykładania na pożywkę niedojrzałych ziarniaków jest ich sterylizacja powierzchniowa za pomocą nieszaniny etanolu z podchlorynem sodu lub chlorkiem rtęci.

### Temat badawczy 5: Analizy molekularne uzyskanych mieszańców.

#### Cel tematu badawczego

Celem zadania 5 było powiędzenie charakteru mieszańcowego mieszańców uzyskanych w poprzednim sezonie wegetacyjnym oraz analiza ekspresji genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy giberelin w niskich oraz wysokich roślinach pochodzących z kombinacji krzyżówkowej [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis*.

#### Materiały i metody

##### 1. Potwierdzenie charakteru mieszańcowego wybranych form uzyskanych w poprzednim sezonie wegetacyjnym.

Materiał badań stanowiło 6 mieszańców oddalonych uzyskanych metodą krzyżowania pomiędzy 2 gatunkami z rodzaju *Aegilops* (*Aegilops columaris*, *Aegilops perigrina*) oraz 3 odmianami pszenicy zwyczajnej (Alfold, Demetra, Poshuk):

- *Aegilops columaris* × Demetra (2 mieszańce),
- *Aegilops columaris* × Poshuk (1 mieszańiec),
- *Aegilops perigrina* × Alfold (3 mieszańce).

Do badań włączono również wszystkie genotypy rodzicielskie.

Z poletek doświadczalnych pobrano młode, nieporażone liście badanych mieszańców oraz form rodzicielskich, a następnie przechowane do czasu analiz w temperaturze -80°C. Izolację DNA z materiału roślinnego przeprowadzono z wykorzystaniem komercyjnego zestawu kolumnkowego GeneMATRIX Plant & Fungi DNA Purification Kit (EURx). Po izolacji oceniono stężenie oraz czystość uzyskanych preparatów DNA za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) oraz wykonano niezbędne rozcieńczenia.



Uzyskane DNA wykorzystano jako matrycę do reakcji w systemie markerów SRAP według metody opracowanej przez Li i Quiros (2001). Celem prowadzonej analizy było potwierdzenie charakteru mieszańcowego analizowanych genotypów. W pierwszym etapie badań przetestowanych zostało 45 kombinacji starterów F i R (tab. 13). Na podstawie uzyskanych wyników wybrano 4 pary starterów, które charakteryzowały się najwyższą ilością amplifikowanych produktów, potwierdzających charakter mieszańcowy badanych genotypów.

Wykorzystana w PCR mieszanina reakcyjna o objętości 15 µl zawierała: 1 × bufor do PCR (10 mM Tris pH 8.8, 50 mM KCl, 0.08% Nonident P40) (Thermo Scientific), 60 ng genomowego DNA, 160 µM każdego dNTP, 5,3 pM każdego startera, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub> oraz 0,5 U *Taq* DNA Polymerase (Thermo Scientific). Reakcje przeprowadzone zostały na termocyklerze T1 Biometra przy zastosowaniu następującego profilu termicznego: wstępna denaturacja w temperaturze 94°C przez 5 minut, następnie 5 cykli: denaturacja 94°C – 1 min., przyłączanie starterów 37°C – 1 min., wydłużanie starterów 72°C – 1 min. Kolejne 35 cykli przeprowadzono zgodnie z profilem: denaturacja 94°C – 1 min., przyłączanie starterów 50°C – 1 min., wydłużanie starterów 72°C – 1 min oraz końcowa inkubacja w temperaturze 72°C przez 7 minut. Otrzymane produkty amplifikacji rozdzielono elektroforetycznie na 2% żelu agarozowym zawierającym 0,01% bromku etydyny w buforze 1×TBE (89 mM Tris-borate, 2.5 mM EDTA). Rozdział prowadzono przy napięciu 120 V przez 4 godziny.

**Tabela 13.** Sekwencje testowanych starterów SRAP.

Nazwa startera	Sekwencja 5' – 3'
<b>Startery F</b>	
me1	TGAGTCCAAACCGGATA
me3	TGAGTCCAAACCGGAAT
me4	TGAGTCCCAACCGGACC
me5	TGAGTCCAAACCGGAAG
me6_1	TGAGTCCAAACCGGACA
me7	TGAGTCCAAACCGGTTG
me8	TGAGTCCAAACCGGTGC
me10_2	TGAGTCCAAACCGGGAC
me11	TGAGTCCAAACCGGAAC
me13	TGAGTCCAAACCGGAAA
me22	TGAGTCCAAACCGGGCA
F14	TGAGTCCAAACCGGAAC
meDC1	TAAACAATGGTCACTCAAGG
meOD3	CCAAAACCTAAAACCAGGA
meSA4	TTCTTCTTCTGGACACAAA
<b>Startery R</b>	
em3	GACTGCGTACGAATTGAC
em4	GACTGCGTACGAATTTGA
em5_2	GACTGCGTACGAATTAAC
em6	GACTGCGTACGAATTGCA
em7	GACTGCGTACGAATTCAA
em8	GACTGCGTACGAATTCAC
em10_2	GACTGCGTACGAATTCAT
em11	GACTGCGTACGAATTTCTG
em13	GACTGCGTACGAATTGGT
em14_2	GACTGCGTACGAATTCTT
em15	GACTGCGTACGAATTCTG
em16	GACTGCGTACGAATTCGG
em17	GACTGCGTACGAATTCCA
SRAP R	TGAGTCCAAACCGGATA

## 2. Analiza ekspresji genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy giberelin w niskich oraz wysokich roślinach pszenżyta.

W ramach zadania przeprowadzono również analizę ekspresji genów szlaku biosyntezy giberelin *GA3ox* i *GA20ox* z wykorzystaniem sond molekularnych w reakcji qPCR. Materiał badań stanowiły rośliny wysokie oraz niskie pochodzące z kombinacji krzyżówkowej [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis*.

W pierwszym etapie wykonano izolację całkowitego RNA z badanego materiału roślinnego. W tym celu ziarniaki badanych form poddano sterylizacji powierzchniowej za pomocą gazowego chloru przez 5 godzin. Następnie sterylne powierzchniowo ziarniaki badanych form roślin niskich i wysokich wkładano na wilgotną bibułę na szalkach Petriego i umieszczano w kielkowniku w temperaturze 25°C, wilgotności 85% bez dostępu światła. Po trzech dniach siewki przeniesiono do kuwet wypełnionych perlitem i umieszczono w fitotronie w warunkach fotoperiodu 16 h dzień/8 h noc i temperaturze 24°C. Po siedmiu dniach siewki badanych form pobierano i natychmiast zamrażano w ciekłym azocie. Przed przystąpieniem do izolacji RNA sprzęt i materiały plastikowe wypłukano 0,1% roztworem DEPC i sterylizowano w autoklawie, natomiast powierzchnie robocze poddano dekontaminacji za pomocą RNaseZap (Ambion). Całkowity RNA wyizolowano przy zastosowaniu manualnej metody izolacji z wykorzystaniem odczynnika TRIzol (Ambion) wg. protokołu zalecanego przez producenta. Każdą próbę analizowano w dwóch powtórzeniach biologicznych. Uzyskane preparaty genomowego RNA poddano ocenie jakościowej i ilościowej za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000, ponadto ich integrację oceniono na 2% żelu agarozowym wybarwionym EtBr. Następnie dla każdej z form 1 µg wyizolowanego RNA wykorzystany został jako matryca do odwrotnej transkrypcji na cDNA, przy zastosowaniu komercyjnego zestawu odczynników SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Kit (Invitrogen) według instrukcji producenta zestawu. Uzyskany cDNA stanowił matrycę do ilościowej analizy transkryptów badanych genów techniką qPCR. Analizę ekspresji badanych genów przeprowadzono z wykorzystaniem sond typu TaqMan znakowanych FAM i BHQ1. Mieszanina reakcyjna o objętości końcowej równej 20 µl zawierała 1· TaqMan Gene Expression Master Mix (Applied Biosystems), po 400 nM każdego startera, 250 nM znakowanej sondy oraz 80 ng cDNA. Wszystkie analizy wykonane zostały w trzech powtórzeniach technicznych. Jako gen referencyjny wykorzystano zwalidowany uprzednio pod kątem stabilności ekspresji w warunkach eksperymentu gen kodujący ligazę ubikwityny E3 (Ta.35546).

W przypadku wszystkich analizowanych genów specyficzne sekwencyjnie startery oraz sondy do qPCR projektowano samodzielnie na bazie sekwencji kodujących badanych genów pozyskanych z baz danych TIGR Plant Transcript Assemblies oraz UniGene (NCBI), stosując oprogramowanie Primer3. Analizy qPCR wykonano przy zastosowaniu aparatu Mx3005P (Stratagene) wraz z dedykowanym oprogramowaniem MxPro. Zmiany ekspresji badanych genów w genotypie niskim w porównaniu z formą wysoką opisano stosując algorytm  $2^{-ddCt}$  (Livak i Schmittgen 2001).

### Wyniki

#### 1. Potwierdzenie charakteru mieszańcowego wybranych form uzyskanych w poprzednim sezonie wegetacyjnym.

W wyniku przeprowadzonych analiz z wykorzystaniem markerów w systemie SRAP potwierdzono charakter mieszańcowy 6 genotypów pochodzących z krzyżowania odmian pszenicy zwyczajnej z dzikimi gatunkami z rodzaju *Aegilops* wg. kombinacji: *Aegilops columaris* × Demetra (I1, I2), *Aegilops columaris* × Poshuk (K1), *Aegilops peregrina* × Alfold (P1, P2, P3).

Wśród wszystkich badanych par starterów najefektywniejszą okazała się być para F14+em7, za pomocą której uzyskano 16 fragmentów potwierdzających mieszańcowy charakter uzyskanych form. Pary starterów me22+em14\_2 oraz meSA4+em16 amplifikowały po 12 fragmentów potwierdzających mieszańcowy charakter, zaś 11 takich fragmentów zostało uzyskanych przy pomocy pary starterów me22+em15 (tab. 14, fot. 1).

Z wykorzystaniem pary F14+em7 uzyskano 7 amplikonów o długości: 320 bp, 400 bp, 510 bp, 550 bp, 740 bp, 790 bp, 900 bp potwierdzających obecność materiału genetycznego odmiany Demetra, oraz 2 amplikony (445 bp, 450 bp) potwierdzające obecność materiału genetycznego z *Aegilops columaris* w mieszańcach I1 oraz I2. W przypadku mieszańca K1 7 amplikonów (320 bp, 400 bp, 510 bp, 550 bp, 740 bp, 790 bp, 900 bp) wykazało analogię z odmianą Poshuk, natomiast 2 amplikony (445 bp, 450 bp) analogię z *Ae. columaris*. Dla mieszańców P1, P2 oraz P3 zidentyfikowano 8 amplikonów (120 bp, 250 bp, 490 bp, 550 bp, 610 bp, 750 bp, 790 bp, 800 bp) potwierdzających obecność sekwencji

pochodzących z pszenicy odmiany Alfold oraz 2 produkty (150 bp, 410 bp) dla sekwencji pochodzących z *Ae. peregrina*.

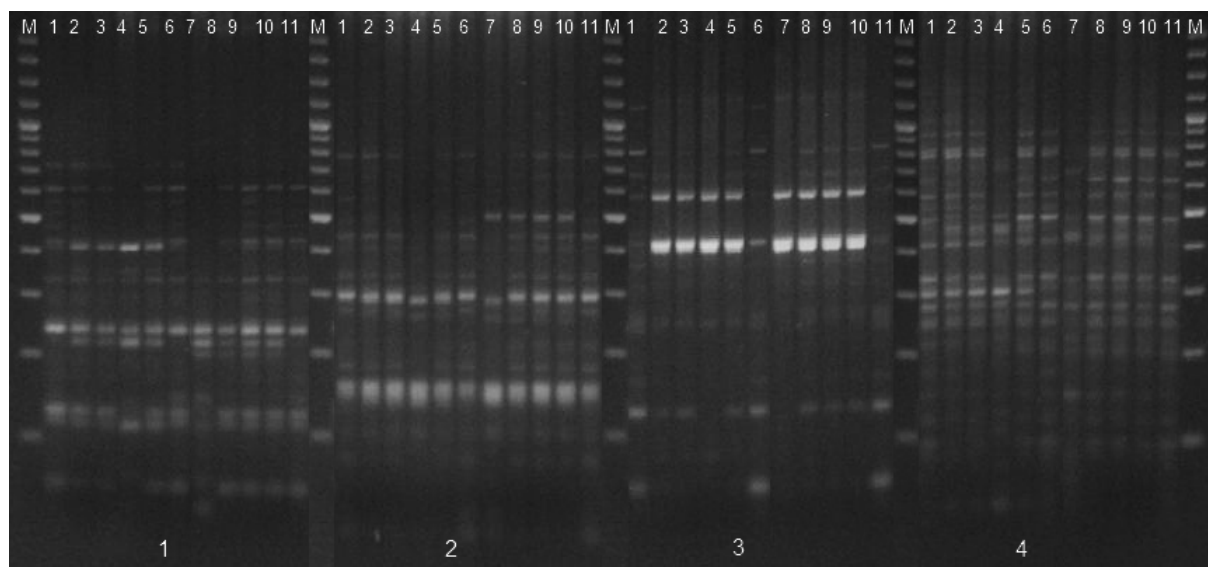
Z wykorzystaniem pary me22+em14\_2 uzyskano 3 amplikony (130 bp, 605 bp, 710 bp) potwierdzające obecność genów pochodzących z odmiany Demetra oraz 3 (210 bp, 350 bp, 410 bp) potwierdzające pokrewieństwo z *Aegilops columnaris* w mieszańcach I1 oraz I2. 3 amplikony (50 bp, 605 bp, 710 bp) wykazało analogię z odmianą Poshuk, oraz 3 (210 bp, 350 bp, 410 bp) podobieństwo z *Ae. columaris* w mieszańcu K1. Natomiast 6 amplikonów (50 bp, 130 bp, 420 bp, 490 bp, 550 bp, 600 bp) potwierdziło obecność genów pochodzących z odmiany pszenicy Alfold oraz 2 produktów (200 bp, 215 bp) dla sekwencji pochodzących z *Ae. peregrina* w mieszańcach P1, P2 oraz P3.

Z wykorzystaniem pary meSA4+em16 uzyskano 3 amplikony (wielkość produktów: 140 bp, 650 bp, 780 bp) potwierdzające obecność materiału genetycznego pochodzącego z odmiany Demetra, oraz 2 amplikony (400 bp, 560 bp) potwierdzających pokrewieństwo z *Aegilops columnaris* w mieszańcach I1 oraz I2. Dla mieszańca K1 3 amplikony (wielkość produktów: 140 bp, 650 bp, 780 bp) wykazały podobieństwo z odmianą Poshuk, oraz 2 amplikony (400 bp, 560 bp) podobieństwo z *Ae. columaris*, natomiast 6 amplikonów (140 bp, 280 bp, 310 bp, 380 bp, 690 bp, 800 bp) potwierdziło obecność genów pochodzących z pszenicy odmiany Alfold oraz 3 produkty (420 bp, 590 bp, 1100 bp) pochodzących z *Ae. peregrina* w mieszańcach P1, P2 oraz P3.

**Tabela 14.** Wyniki analiz w celu potwierdzenia charakteru mieszańcowego z zastosowaniem markerów SRAP.

Startery	Wielkość fragmentu [bp]	Demetra	I1	I2	<i>Aegilops columnaris</i>	K1	Poshuk	<i>Aegilops peregrina</i>	P1	P2	P3	Alfold
me22+em14_2	50					+	+		+	+	+	+
	130	+	+	+								+
	200											
	210				+	+		+	+	+		
	215							+	+	+	+	
	350				+	+						
	410				+	+						
	420								+	+	+	+
	490								+	+	+	+
	550								+	+	+	+
	600	+	+	+		+	+		+	+	+	+
710	+	+	+		+	+						
me22+em15	80								+	+	+	+
	190	+	+	+		+	+		+	+	+	+
	210								+	+	+	+
	280								+	+	+	+
	320	+	+	+					+	+	+	+
	350					+	+					
	355							+	+	+	+	
	430	+	+	+					+	+	+	+
	510					+	+	+	+	+	+	
	680		+	+	+		+					
800	+	+	+					+	+	+	+	
meSA4+em16	140	+	+	+		+	+		+	+	+	+
	280								+	+	+	+
	310								+	+	+	+
	380								+	+	+	+
	400		+	+	+	+						
	420							+	+	+	+	
	560		+	+	+	+						
	590							+	+	+	+	
	650	+	+	+		+	+					
	690								+	+	+	+
	780	+	+	+		+	+		+	+	+	+
1100							+	+	+	+		
F14+em17	120								+	+	+	+
	150							+	+	+	+	
	250								+	+	+	+
	320	+	+	+		+	+					
	400	+	+	+		+	+					
	410							+	+	+	+	
	445		+	+	+	+						
	450		+	+	+	+						
	490								+	+	+	+
510	+	+	+		+	+						
550	+	+	+		+	+		+	+	+	+	

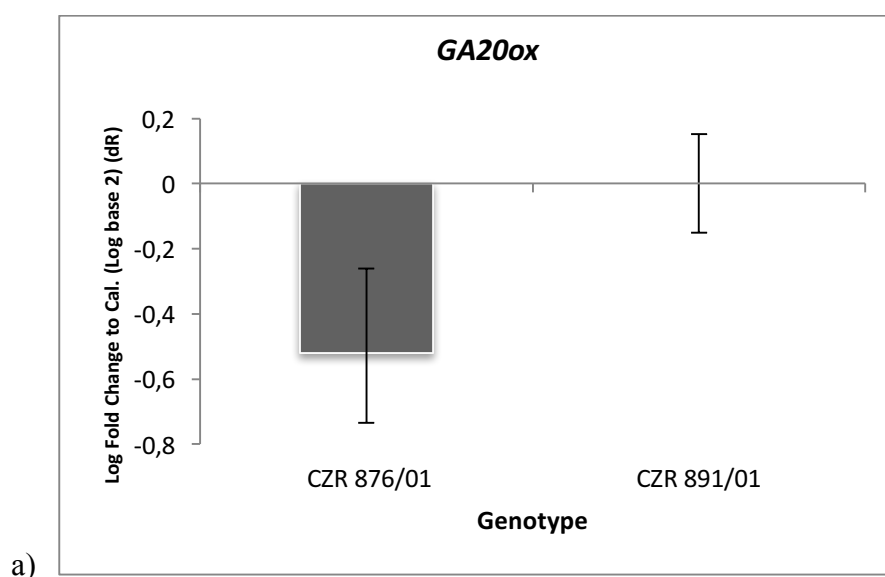
610																		+	+	+	+	
740	+	+	+																+	+	+	+
790	+	+	+																+	+	+	+
800																			+	+	+	+
900	+	+	+																+	+	+	+

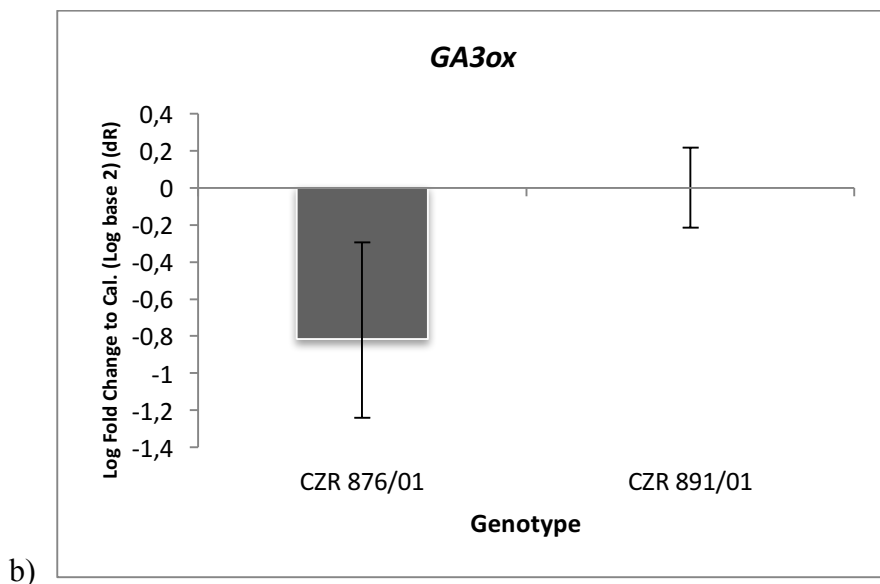


**Fot. 1.** Elektroforegram produktów reakcji amplifikacji w systemie SRAP z zastosowaniem par starterów me22+em14\_2 (1); me22+em15 (2); meSA4+em16 (3); F14+em17 (4). M- marker wielkości GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, 1. Demetra, 2. I1, 3. I2, 4. *Aegilops columnaris*, 5. K1, 6. Poshuk, 7. *Aegilops peregrina*, 8. P1, 9. P2, 10. P3, 11. Alfold.

## 2. Analiza ekspresji genów kodujących enzymy szlaku biosyntezy giberelin w niskich oraz wysokich roślinach pszenżyta.

W wyniku przeprowadzonych badań stwierdzono, iż poziom ekspresji wszystkich badanych genów różnił się w analizowanych genotypach. W przypadku genów *GA20ox* oraz *GA3ox*, kodujących enzymy odpowiedzialne za przekształcenie nieaktywnych prekursorów do form giberelin wykazujących aktywność biologiczną obserwowano spadek ilości transkryptów w formie niskiej w porównaniu do formy wysokiej, odpowiednio 0,52· oraz 0,82· (Rys. 1a, 1b).





**Rys. 1.** Względna zmiana ekspresji analizowanych genów w krótkosłomym genotypie pszenżyta CZR 876/01 w porównaniu z genotypem wysokim CZR 891/01.

Uzyskane wyniki wskazują, że jednym z czynników decydujących o karłowym fenotypie roślin pszenżyta pochodzących z rodu CZR 876/01 jest niedobór bioaktywnych form giberelin, spowodowany zahamowaniem ich biosyntezy w wyniku osłabienia ekspresji genów *GA20ox* oraz *GA3ox*.

### Wnioski

1. Przeprowadzone analizy oparte o markery SRAP potwierdziły mieszańcowy charakter genotypów uzyskanych w wyniku krzyżowań: *Aegilops columaris* × Demetra, *Aegilops columaris* × Poshuk oraz *Aegilops peregrina* × Alfold.
2. 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.

Prezentacja wyników na konferencjach				
Lp.	Konferencja	Miernik <sup>2</sup>	Wartość miernika podana w opisie zadania	Wartość miernika zrealizowana
1	XII Ogólnopolska Konferencja Naukowa "Nauka dla hodowli i nasiennictwa roślin uprawnych" Zakopane, 02-06.02.2015 r.	Poster (zał. 1 i 2)	2	2

### Załączniki:

1. Poster: „Analiza wpływu nowego genu karłowatości na długość i średnicę międzywęźli roślin pszenżyta” – Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Gruszecka D., Gogół A., Róg S., Kowalczyk K.
2. Poster: „Molekularna identyfikacja mieszańców oddalonych zbóż” - Gogół A., Leśniowska-Nowak J., Nowak M., Gruszecka D.

<sup>2</sup> Podać, czy chodzi o wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

## Analiza wpływu nowego genu karłowatości na długość i średnicę międzywęźli roślin pszenżyta

Justyna Leśniowska-Nowak, Michał Nowak, Daniela Gruszecka, Aleksandra Gogół,  
Sylwia Róg, Krzysztof Kowalczyk

Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie  
justyna.lesniowska@up.lublin.pl

### WSTĘP

Karłowatość oraz geny obniżające wysokość roślin były szeroko wykorzystywane w międzynarodowych programach hodowli roślin uprawnych od czasu tzw. „zielonej rewolucji”. W hodowli pszenżyta redukcja długości źdźbła może mieć korzystny wpływ na wzrost plonu ziarna poprzez lepsze rozprowadzanie asymilatów, co skutkuje lepszym rozwojem kłosa oraz ograniczonym wyleganiem. W przypadku pszenżyta dotychczas w praktycznej hodowli wykorzystuje się jedynie pochodzący z żyta gen karłowatości Dw1 zlokalizowany na chromosomie 5R.

### CEL PRACY

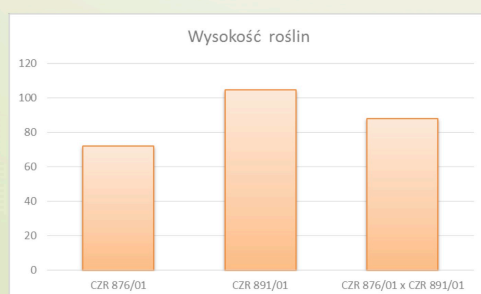
Celem pracy była ocena wpływu nowego genu karłowatości na wysokość roślin pszenżyta. Materiał badań stanowiły rośliny pokolenia F<sub>2</sub> pochodzące z kombinacji krzyżówkowej [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis*.

### MATERIAŁ I METODY

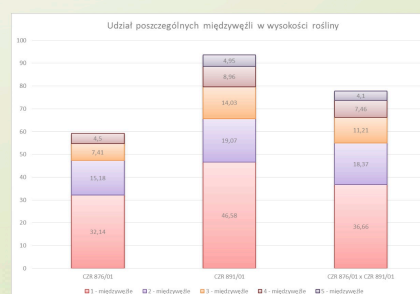
W pierwszym etapie prac przeprowadzono krzyżowanie pojedynczej rośliny krótkostomiej i wysokiej. W wyniku tego krzyżowania uzyskano dwie rośliny F<sub>1</sub>, z których wyprowadzono dwie segregujące populacje F<sub>2</sub>. Pojedynki oceniane były pod kątem wysokości rośliny, a także długości oraz średnicy każdego z międzywęźli. Analizy statystyczne badanych cech na poziomie istotności równym 0,05 zostały przeprowadzone z wykorzystaniem programu SAS v.9.2.

### WYNIKI

W wyniku przeprowadzonych analiz nie stwierdzono różnic istotnych statystycznie pod względem średnicy poszczególnych międzywęźli. Pod względem wysokości rośliny mieszańcowe były istotnie niższe niż forma wysoka oraz istotnie wyższe niż forma krótkostoma (Rys. 1). Analiza długości międzywęźli w formach mieszańcowych wykazała, że istotnemu skróceniu, do poziomu, jaki występował w roślinach karłowatych uległo pierwsze z nich, czyli dokłosie oraz międzywęźle trzecie, którego długość była pośrednia pomiędzy obiema formami rodzicielskimi. Międzywęźla drugie, czwarte oraz piąte nie różniły się istotnie od formy długostomiej (Rys 2.). Analogiczne wyniki uzyskano dla obu analizowanych populacji segregujących. Uzyskany wynik wskazuje, iż badany gen karłowatości wpływa istotnie na redukcję długości dwóch międzywęźli: pierwszego oraz trzeciego w roślinach mieszańcowych.



Rys. 1. Rozkład wysokości roślin



Rys. 2. Rozkład długości międzywęźli

