

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE**z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2017 roku****A. INFORMACJE OGÓLNE**

Tytuł zadania - Wytwarzanie nowych źródeł genetycznych pszenżyta w oparciu o krzyżowanie oddalone
Numer zadania (w załączniku nr 9 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 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: 2017
Planowane nakłady w zł: 80 000

B. DANE WNIOSKODAWCY

Imię i nazwisko osoby reprezentującej jednostkę badawczą, tytuł lub stopień naukowy, stanowisko, nazwa i adres jednostki badawczej, telefon, fax) Prorektor ds. Nauki, Wdrożeń i Współpracy Międzynarodowej prof. dr hab. Zbigniew Grądzki Uniwersytet Przyrodniczy w Lublinie ul. Akademicka 13 20-950 Lublin tel. (+ 81) 445-68-68
--

C. INFORMACJA O WYKONAWCACH

1. Zespół badawczy

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
Michał Nowak	dr	UP w Lublinie
Sylwia Okoń	dr	UP w Lublinie
Magdalena Zapalska	dr	UP w Lublinie
Karolina Dudziak	mgr inż.	UP w Lublinie
Aneta Koroluk	mgr inż.	UP w Lublinie
Aleksandra Nucia	mgr inż.	UP w Lublinie
Aleksandra Wieremczuk	mgr inż.	UP w Lublinie

2. Kierownik zadania (imię, nazwisko, tytuł lub stopień naukowy, adres do korespondencji, telefon bezpośredni i do sekretariatu jednostki organizacyjnej zatrudniającej kierownika zadania, e-mail kierownika; telefon do oraz dane osoby, z którą można się kontaktować w razie nieobecności kierownika zadania)

dr Justyna Leśniowska-Nowak
ul. Akademicka 15
20-950 Lublin
tel. 81 445 66 25, 602 621 709
Sekretariat Uczelni – tel. 81 445 66 22
e-mail: justyna.lesniowska@up.lublin.pl
dr Michał Nowak – tel. 81 445 69 01, 784 099 589

D. OPIS ZADANIA

1. Cele zadania

Lp.	Cel (zgodnie ze szczegółowym opisem na dany rok)	Czy cel został zrealizowany (tak/nie ¹ /częściowo ¹)
1	Uzyskanie mieszańców oddalonych pszenżyta oraz pszenicy z niskimi oraz odpornymi na rdzę brunatną genotypami z rodzaju <i>Aegilops</i> .	TAK
2	Analiza wysokości oraz podstawowych komponentów plonu mieszańców F ₂ oraz BC ₁ pochodzących z krzyżowań pszenżyta i pszenicy.	TAK
3	Zwiększenie wydajności uzyskiwania mieszańców oddalonych poprzez zastosowanie opracowanej w roku 2015 metodyki embryo rescue	TAK
4	Analiza porównawcza ekspresji podstawowych genów ze szlaku biosyntezy giberelin form zawierających w genomie <i>Dw1</i> oraz form CZR876/01 i 891/01	TAK
5	Analiza populacji F ₂ pochodzącej z krzyżowania CZR876/01 × CZR891/01 przy wykorzystaniu technologii DArT.	TAK

2. Harmonogram realizacji zadania

Harmonogram realizacji zadania należy sporządzić w tabeli, dla każdego z planowanych tematów badawczych z uwzględnieniem ilości planowanych testów/prób/linii na których prowadzone będą badania. Proszę podać koszty realizacji poszczególnych tematów badawczych.

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

Proszę wyróżnić etapy (tematy badawcze), określić czas ich trwania w miesiącach od rozpoczęcia projektu i przewidywane koszty. Terminy realizacji tematów badawczych mogą się zająć. Suma kosztów tematów badawczych musi być równa całkowitemu kosztowi zadania.

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Uzyskiwanie mieszańców poprzez krzyżowanie (kastrowanie i zapylenie) roślin	5-12	37 000
2	Ocena zmienności cech w mieszańcach	1-12	20 000
3	Izolacja uzyskanych zarodków i prowadzenie kultur <i>in vitro</i>	6-12	6 000
4	Analizy molekularne uzyskanych mieszańców	1-12	17 000
Razem			80 000

UWAGA: Nie są tematami badawczymi czynności techniczne służące wykonaniu zadania np. zakup materiałów, utrzymanie roślin w szklarni, opracowanie statystyczne wyników, opracowanie raportów i sprawozdań.

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

3.1 Temat badawczy 1: Uzyskiwanie mieszańców poprzez krzyżowanie (kastrowanie i zapylenie) roślin.

Cel tematu badawczego 1

Celem zadania 1 jest wprowadzenie odporności na rdzę brunatną pszenżyta oraz obniżenie wysokości roślin poprzez krzyżowanie z dzikimi gatunkami z rodzaju *Aegilops*.

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

W roku bieżącym do wykonania potencjalnych krzyżowań wysianych zostało około 39 odmian i linii pszenżyta, obejmujących formy mające największe znaczenie i charakteryzujące się największą plennością. Ponadto wysiane zostały linie i odmiany pszenicy w liczbie 48. Wybrane formy wysiewane były na poletkach 2-rzędowych, w siewie gęstym, rzutowym (około 300 ziarniaków na m²). Rozstawa rzędów wynosiła 20 cm. W ramach zadania wysiane zostały również różne formy z rodzaju *Aegilops* w liczbie 139, które wcześniej ocenione były pod kątem odporności na rdzę brunatną oraz wysokości. W siewie punktowym wysiane były rośliny mieszańcowe wczesnych pokoleń przeznaczone do krzyżowań wstecznych (pierwotne pszenżyto, mieszańce z kozieńcami oraz inne mieszańce uzyskane w sezonie 2014/2015).

Tuż przed kwitnieniem na poletkach doświadczalnych kastrowane były kwiaty w kłosach roślin przeznaczonych na formy mateczne. Kastracja wykonywana jest metodą manualną. Z każdego kłoska usuwane są środkowe kwiaty, a z pozostałych, bocznych kwiatów usuwa się po trzy niedojrzałe pylniki. Na wykastrowany kłos nakłada się izolator. Następnie na dojrzałe znamię słupka nanoszony jest pyłek z roślin przeznaczonych na formę ojcowską.

Schemat krzyżowań planowanych na rok 2017	Liczba kombinacji
<i>Aegilops</i> × pszenica heksaploidalna	50
<i>Aegilops</i> × pszenżyto heksaploidalne	50

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

Wyniki

W ramach projektu w roku 2017 wykonano 100 kombinacji krzyżówkowych pomiędzy kocięciami oraz pszenicą i pszenżytem. We wszystkich wykonanych kombinacjach kocieniec był formą mateczną a zboże formą ojcowską (Tab. 1).

Lp.	<i>Aegilops</i> x Pszenica	L. wykastr. kw.	<i>Aegilops</i> x Pszenżyto	L. wykastr. kw.
1	Ae 108 x Kohelia	4	Ae 131 x B134	6
2	Ae 111 x Sekundo	4	Ae 54 x L166	4
3	Ae 120 x Top	8	Ae 152 x B150	10
4	Ae 131 x Naridana	4	Ae 152 x B124	10
5	Ae 131 x Forkida	6	Ae 54 x B 124	4
6	Ae 131 x Poshuk	4	Ae 128 x B 124	4
7	Ae 135 x Forkida	8	Ae 152 x L 166	10
8	Ae 135 x Naridana	4	Ae 135 x L 113	4
9	Ae 135 x Top	6	Ae 128 x Lombardo	6
10	Ae 138 x Forkida	4	Ae 131 x B 134	6
11	Ae 138 x Sailor	4	Ae 80 x Lombardo	4
12	Ae 151 x Forkida	10	Ae 120 x L 113	4
13	Ae 151 x Top	8	Ae 80 x Baltiko	4
14	Ae 152 x Top	10	Ae 39 x L 113	4
15	Ae 156 x Astoria	10	Ae 63 x L 113	4
16	Ae 156 x Naridana	8	Ae 77 x L159	4
17	Ae 156 x Sailor	8	Ae 77 x Lombardo	4
18	Ae 156 x Top	4	Ae 152 x L166	10
19	Ae 157 x Naridana	10	Ae 152 x Lombardo	10
20	Ae 157 x Sailor	8	Ae 80 x L166	4
21	Ae 157 x Top	10	Ae 80 x B78	4
22	Ae 39 x Kohelia	6	Ae 80 x BOH16x03	4
23	Ae 54 x Naridana	4	Ae 54 x L 159	4
24	Ae 63 x Astoria	4	Ae 54 x Baltiko	4
25	Ae 63 x Fidelius	4	Ae 75 x L 166	4
26	Ae 63 x Figura	4	Ae 75 x Baltiko	4
27	Ae 63 x Kohelia	4	Ae 75 x L 159	4
28	Ae 72 x Forkida	4	Ae 74 x Baltiko	4
29	Ae 72 x Top	4	Ae 151 x L 113	8
30	Ae 74 x Astoria	4	Ae 75 x Moreno	4
31	Ae 74 x Fidelius	4	Ae 75 x Sekundo	4
32	Ae 74 x Figura	4	Ae 157 x Lombardo	10
33	Ae 74 x Forkida	6	Ae 138 x L 159	6
34	Ae 74 x Kohelia	4	Ae 63 x Janko	4
35	Ae 74 x Naridana	4	Ae 63 x Leontino	4
36	Ae 74 x Top	4	Ae 39 x Baltiko	4
37	Ae 75 x Astoria	4	Ae 75 x L163	4
38	Ae 75 x Forkida	4	Ae 74 x Moreno	4
39	Ae 75 x Naridana	4	Ae 74 x Torino	4
40	Ae 75 x Sailor	4	Ae 63 x Torino	4
41	Ae 75 x Top	4	Ae 63 x Moreno	4

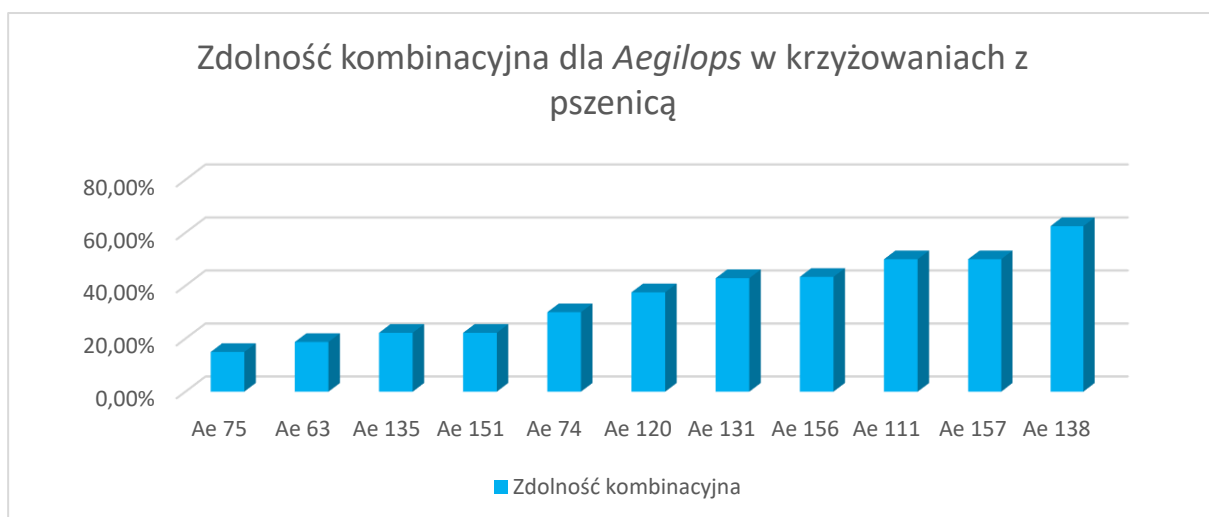
42	Ae 77 x Astoria	4	Ae 63 x Trismart	4
43	Ae 77 x Figura	4	Ae 156 x Torino	4
44	Ae 77 x Forkida	4	Ae 72 x Torino	4
45	Ae 77 x Naridana	4	Ae 72 x Baltiko	4
46	Ae 77 x Sailor	4	Ae 54 x Moreno	4
47	Ae 77 x Top	4	Ae 54 x Torino	4
48	Ae 80 x Forkida	6	Ae 77 x Torino	4
49	Ae 80 x Naridana	4	Ae 74 x Janko	4
50	Ae 84 x Kohelia	4	Ae 74 x Trismart	4
SUMA		264	SUMA	248

Tab. 1. Kombinacje krzyżówkowe wykonane w ramach projektu w roku 2017.

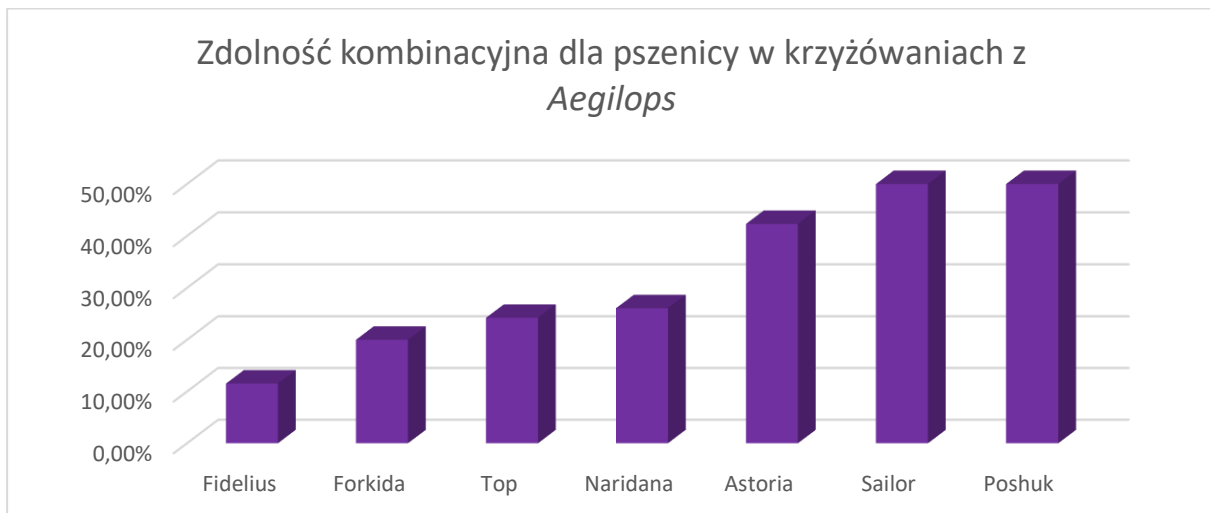
Na podstawie liczby wykastrowanych kwiatów oraz liczby uzyskanych ziarniaków obliczono zdolność kombinacyjną poszczególnych genotypów wg. wzoru:

$$\frac{\text{Liczba uzyskanych ziarniaków}}{\text{Liczba wykastrowanych kwiatów}} * 100\%$$

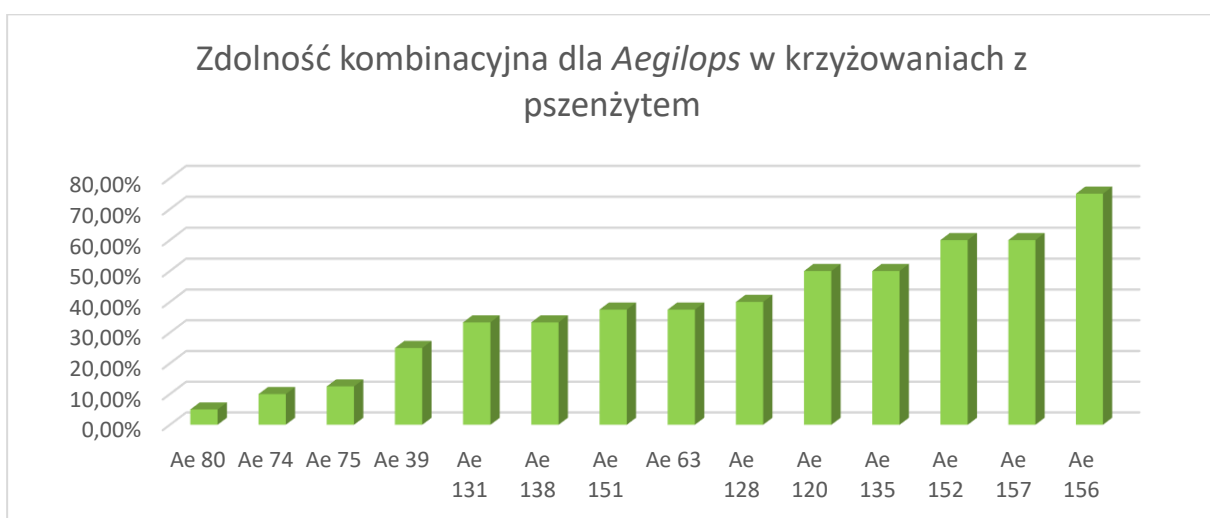
Zdolność kombinacyjna kozienców w krzyżowaniach z pszenicą zawierała się w przedziale od 0% do 62,5%. Średnio wynosiła ona 21% (Rys.1). W przypadku krzyżowania z pszenżytem zawierała się w przedziale od 0% do 75% w zależności od formy. Średnio było to 31,13% (Rys. 3). Zdolność kombinacyjna pszenicy wynosiła maksymalnie 50% (Rys 2.) a pszenżyta maksymalnie 70% (Rys 4.). Średnia zdolność kombinacyjna dla tych gatunków wynosiła odpowiednio 28,02% (pszenica) i 29,44% (pszenżyto).



Rys. 1.



Rys. 2



Rys.3.



Rys 4.

Mierniki dla tematu badawczego 1 (podać w tabeli)

Lp.	miernik ²	Wartość miernika podana w opisie	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba wykonanych kombinacji krzyżówkowych.	100	100

3.2 Temat badawczy 2: Ocena zmienności cech w mieszańcach

Cel tematu badawczego 2

Celem zadania 2 jest analiza wysokości oraz podstawowych elementów plonu mieszańców F₂ oraz BC₁ pszenżyta z pszenicą

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

Przedmiot badań stanowią będą pojedyncze rośliny mieszańcowe pszenżyta pokolenia F₂ i BC₁ otrzymane w wyniku krzyżowania z pszenicą a następnie samozapylenia oraz krzyżowania wstecznego (wypierającego) wraz z ich formami rodzicielskimi (Tab. 2).

Kombinacja krzyżówkowa	Liczba analizowanych roślin mieszańcowych	Formy rodzicielskie	Liczba analizowanych roślin rodzicielskich	Pokolenie	Łączna liczba analizowanych roślin
BOH1512 x Zunda	10	BOH 1512 Zunda	2x10	F ₂	40
[BOH1512 x Zunda] x BOH1512	10			BC ₁	
BOH1813 x Artist	10	BOH1813 Artist	2x10	F ₂	40
[BOH1813 x Artist] x BOH1813	10			BC ₁	

Ocenię fenotypowej poddane zostaną pędy główne wszystkich roślin w fazie dojrzałości pełnej.

Ocenię laboratoryjnej poddane będą następujące elementy:

- długość pędu głównego [cm],
- długość osadki kłosowej [cm],
- liczba kłosek w kłosie głównym,
- zbitość kłosa głównego,
- liczba ziarniaków w kłosie głównym,
- masa ziarniaków z kłosa głównego [g],
- płodność kłoska (liczba ziarniaków przypadających na kłosek kłosa głównego),
- masa 1000 ziarniaków [g].

Zbitość kłosa głównego, płodność kłoska oraz masę 1000 ziarniaków obliczona będzie za pomocą wzorów:

² Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

$$\text{Zbitość kłosa głównego} = \frac{\text{liczba kłosek w kłosie głównym} - 1}{\text{długość osadki kłosowej kłosa głównego [dm]}}$$

$$\text{Płodność kłoska} = \frac{\text{liczba ziarniaków w kłosie głównym}}{\text{liczba kłosek w kłosie głównym}}$$

$$\text{Masa 1000 ziarniaków} = \frac{\text{masa ziarniaków z kłosa głównego} \times 1000}{\text{liczba ziarniaków w kłosie głównym}}$$

Analizy statystyczne wykonane będą z wykorzystaniem programu Statistica 13.1. Do określenia istotności różnic pomiędzy średnimi grupowymi w układzie analizy wariancji zastosowany będzie test post-hoc HSD Tukey'a przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Wyniki

Analizie poddano po 10 roślin pokolenia F_1 , BC_1 , oraz po 10 roślin matecznych i ojcowskich. Analiza statystyczna wykazała, że mieszańce uzyskane z krzyżowania pszenżyta BOH1512 i pszenicy 'Zunda' są istotnie niższe od pszenżytniej formy rodzicielskiej, a nie różnią się od formy matecznej. Wykazano również, że długość kłosa jest istotnie mniejsza tylko dla odmiany Zunda. Mieszańce oraz ród BOH1512 mają kłosa o długości nieróżniącej istotnie. W przypadku masy ziarniaków z kłosa stwierdzono brak istotnych różnic między mieszańcami. Masa ta była jednak istotnie niższa w porównaniu do obu form rodzicielskich. Analogiczne wyniki otrzymano dla Masy Tysiąca Ziarniaków (Tab. 3)

W przypadku drugiej kombinacji krzyżówkowej analizowano również po 10 roślin pokolenia F_1 , BC_1 , oraz po 10 roślin matecznych (BOH1813) i ojcowskich (Artist). Uzyskane wyniki wskazują na obniżenie wysokości mieszańców w stosunku do pszenżytniej formy matecznej. Długość pędu głównego nie była natomiast istotna statystycznie w porównaniu z pszenicą odmiany Artist. Stwierdzono również obniżenie długości kłosa mieszańców w porównaniu z pszenżystem, co niekoniecznie przełożyło się na liczbę kłosek występujących na osadce kłosowej, co miało również przełożenie na zbitość kłosa. Obserwowano również u mieszańców pokolenia F_1 oraz BC_1 istotne obniżenie liczby ziarniaków w stosunku do pszenżytniego komponentu rodzicielskiego. Tendencja ta obserwowana była również dla MTZ, gdzie obserwowano istotne obniżenie tego parametru w porównaniu z obiema formami rodzieskimi. Istotnie zmniejszyła się również płodność kłoska mieszańców w stosunku do komponentu matecznego (Tab. 4).

Kombinacja krzyżówkowa	Dł. pędu głównego [cm]	Dł. Kłosa [cm]	L. kłosków w kłosie	L. ziarniaków w kłosie	Masa ziarniaków w kłosie [g]	Zbitość kłosa	Płodność kłoska	MTZ
BOH1512×Zunda	67,17 ^a	7,58 ^{ab}	30,0 ^a	31,0 ^a	1,53 ^{acd}	3,78 ^a	1,25 ^a	40,08 ^a
[BOH1512×Zunda]×BOH1512	73,50 ^{ab}	6,75 ^a	26,2 ^a	26,2 ^{ac}	0,80 ^{ac}	4,00 ^a	0,09 ^a	33,06 ^a
Zunda	69,33 ^{ab}	9,33 ^b	38,3 ^a	38,3 ^{abc}	2,08 ^{bd}	3,99 ^a	1,40 ^a	51,07 ^b
BOH1512	80,60 ^b	8,60 ^{ab}	39,8 ^a	39,8 ^b	3,80 ^b	4,50 ^a	1,94 ^a	59,96 ^c

Tab. 3. Istotność różnic dla podstawowych komponentów plonu uzyskanych dla mieszańców pochodzących z kombinacji krzyżówkowych pomiędzy pszenżytem BOH1512 a pszenicą Zunda.

Kombinacja krzyżówkowa	Dł. pędu głównego [cm]	Dł. Kłosa [cm]	L. kłosków w kłosie	L. ziarniaków w kłosie	Masa ziarniaków w kłosie [g]	Zbitość kłosa	Płodność kłoska	MTZ
BOH1813×Artist	65,00 ^a	8,00 ^a	26,00 ^a	27,36 ^a	1,12 ^a	3,19 ^{ab}	1,21 ^a	36,63 ^a
[BOH1813×Artist]×BOH1813	74,43 ^{ab}	7,14 ^a	33,00 ^a	44,29 ^{ab}	1,76 ^{ab}	4,45 ^a	1,56 ^{ab}	39,17 ^a
Artist	86,67 ^b	10,83 ^b	36,33 ^b	63,00 ^b	4,09 ^c	3,33 ^{ab}	1,96 ^{ab}	64,83 ^b
BOH1813	69,29 ^{ab}	8,57 ^{ab}	17,85 ^{ab}	46,29 ^{ab}	2,59 ^{bc}	1,97 ^b	2,56 ^b	56,16 ^b

Tab. 4. Istotność różnic dla podstawowych komponentów plonu uzyskanych dla mieszańców pochodzących z kombinacji krzyżówkowych pomiędzy pszenżytem BOH1813 a pszenicą Artist.

Mierniki dla tematu badawczego 2 (podać w tabeli)

Lp.	miernik ³	Wartość miernika podana w opisie	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba fenotypowanych roślin	80	80

3.3 Temat badawczy 3: Izolacja uzyskanych zarodków i prowadzenie kultur *in vitro*.

Cel tematu badawczego

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

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

Materiałem badań było 20 zarodków mieszańcowych uzyskanych w wyniku krzyżowania oddalonego pszenicy i pszenżyta z kozieńcami.

Wybrane formy z rodzaju *Aegilops* zostały wykastrowane, a następnie zapyłone pyłkiem pobranym z pszenicy oraz pszenżyta. Spośród 100 wykonanych kombinacji krzyżówkowych, z 20 pobrano zarodki i przekazano do kultur *in vitro*. Zarodki były pobierane w okresie pomiędzy 18 a 21 dniem po zapyleniu. Pobrane zarodki były sterylizowane przez 2 minuty za pomocą 70% etanolu.

W kolejnym kroku wszystkie ziarniaki zostały przepłukane trzykrotnie w wodzie destylowanej.

Tak przygotowane zarodki mieszańcowe poddano procedurze ratowania zarodków (embryo rescue) w warunkach kultury *in vitro*. W tym celu przenoszono je na pożywkę MS z dodatkiem hydrolizatu kazeiny. W pierwszym etapie (5 dni) przetrzymywano je w ciemności w temperaturze 25°C. Po tym czasie skiełkowane zarodki umieszczono w laboratorium kultur *in vitro* przy fotoperiodzie 16/8. Uzyskane roślinki przesadzone zostały do doniczek w celu ich adaptacji do środowiska, a następnie do warunków polowych.

Wyniki

Do rozwoju w kulturach *in vitro* przekazano 20 zarodków (Tab. 5). Pozostałe ziarniaki zostały wysiane bezpośrednio do ziemi. Spośród wyłożonych 20 zarodków uzyskano 4 rośliny pochodzące z kombinacji krzyżówkowej kozieniec x pszenica oraz 3 z kombinacji kozieniec x pszenżyto. Daje to wydajność na poziomie 40% w przypadku krzyżowań z pszenicą i 30% w przypadku krzyżowań z pszenżytem.

Lp.	Kombinacja z pszenicą	L. zarodków	L. roślin	Lp.	Kombinacja z pszenżytem	L. zarodków	L. roślin
1	Ae 120 x Top	1	1	1	Ae 131 x B134	1	0
2	Ae 131 x Naridana	1	0	2	Ae 152 x B150	1	0
3	Ae 131 x Forkida	1	1	3	Ae 152 x B124	1	1
4	Ae 131 x Poshuk	1	0	4	Ae 152 x L 166	1	0
5	Ae 135 x Forkida	1	1	5	Ae 135 x L 113	1	0
6	Ae 135 x Naridana	1	0	6	Ae 128 x Lombardo	1	1
7	Ae 138 x Forkida	1	0	7	Ae 80 x Lombardo	1	0
8	Ae 138 x Sailor	1	1	8	Ae 156 x Torino	1	1
9	Ae 151 x Top	1	0	9	Ae 39 x L 113	1	0
10	Ae 156 x Astoria	1	0	10	Ae 63 x L 113	1	0
	SUMA	10	4			10	3

Tab. 5. Kombinacje krzyżówkowe przekazane do Embryo Rescue.

³ Podać miernik – np. ilość testów, prób, badanych genotypów etc.

Mierniki dla tematu badawczego 3 (podać w tabeli)

Lp.	miernik ⁴	Wartość miernika podana w opisie	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba kombinacji krzyżówkowych z których zarodki będą przeznaczone do kultur <i>in vitro</i>	20	20

3.4 Temat badawczy 4: Analizy molekularne uzyskanych mieszańców.

Cel tematu badawczego

Celem zadania 4 jest identyfikacja markerów DNA sprzężonych z genem karłowatości rodu CZR876/01 techniką DArT oraz analiza porównawcza ekspresji genów ze szlaku biosyntezy giberelin pomiędzy formami zawierającymi gen *Dw1* i formami CZR876/01 oraz CZR891/01.

Materiały i metody (opisać jak w publikacji)

Materiał badań stanowiło 186 roślin pokolenia F₂ pochodzących z krzyżowania formy krótkosłowej CZR876/01 oraz wysokiej CZR891/01, wywodzących z kombinacji krzyżówkowej [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* oraz 2 formy rodzicielskie.

Z liści roślin pokolenia F₂ (CZR876/01 × CZR891/01) oraz form rodzicielskich pobranych z pola wyizolowano DNA za pomocą komercyjnego zestawu kolumnowego. Uzyskany DNA poddano ocenie jakościowej i ilościowej a następnie wyrównano stężenia. Tak przygotowane próby naniesiono na 96-dołowe płytki i przesłano do Diversity Array Technology, Canberra (Australia) celem wykonania genotypowania poprzez sekwencjonowanie.

W ramach zadania przeprowadzona była również analiza ekspresji genów szlaku biosyntezy giberelin, które związane są karłowatością i wzrostem wydłużeniowym roślin:

- | | | | |
|----|-----|----|--------|
| 1. | CPS | 4. | GA2ox, |
| 2. | KS | 5. | GA3ox |
| 3. | KO | 6. | GA20ox |

Analizy qPCR będą przeprowadzono z wykorzystaniem sond molekularnych oraz barwnika SYBR Green w reakcji qPCR.

Materiał badań stanowiły rośliny wysokie oraz niskie pochodzące z kombinacji [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* oraz formy zawierające gen *Dw1*.

W pierwszym etapie badań przeprowadzono 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 wykładano bę na wilgotną bibułę na szalkach Petriego i umieszczano w kielkowniku w temperaturze 25°C, wilgotności 85% i braku 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. Całkowity RNA izolowano przy zastosowaniu manualnej metody izolacji z wykorzystaniem Trizolu lub w razie potrzeby za pomocą komercyjnego zestawu opartego o minikolumny. Każda próba analizowana była w dwóch powtórzeniach biologicznych. Przed przystąpieniem do izolacji RNA sprzęt wykorzystywany w tej procedurze został wypłukany 0,1% roztworem DEPC i wysterylizowany, natomiast powierzchnie robocze poddano dekontaminacji za pomocą RNaseZap (Ambion). Uzyskane preparaty genomowego RNA poddano ocenie jakościowej i ilościowej za pomocą spektrofotometru NanoDrop 2000. W przypadku niesatysfakcjonujących parametrów preparatu RNA wykonano jego doczyszczanie lub ponownie przeprowadzono procedurę izolacji. Następnie dla każdej z form 1 µg

⁴ Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

wyzolowanego RNA poddany został odwrotnej transkrypcji na cDNA, przy zastosowaniu zestawu komercyjny wg procedury zalecanej przez producenta. Uzyskany cDNA stanowił matrycę do ilościowej analizy transkryptów badanych (CPS, KS, KO, GA2ox, GA3ox i GA20ox) genów techniką qPCR. Jako matrycę do reakcji stosowano 80 ng uzyskanego uprzednio cDNA. Wszystkie analizy wykonano w trzech powtórzeniach technicznych. Analizy ekspresji badanych genów przeprowadzono z wykorzystaniem sond molekularnych w systemie TaqMan oraz barwnika SYBR Green. W przypadku wszystkich analizowanych genów specyficzne sekwencyjnie startery oraz sondy do qPCR projektowano samodzielnie na bazie sekwencji kodujących badanych genów pozyskanych z bazy danych UniGene (NCBI), stosując oprogramowanie QuantPrime oraz Primer3. Analizy qPCR będą wykonane przy zastosowaniu aparatu Quanstudio 3 (Termofisher) wraz z dedykowanym oprogramowaniem.

Wyniki

W roku bieżącym analizie poddano populację segregującą po względem wysokości CZR876/01xCZR891/01 z wykorzystaniem techniki DArT (Tab. 6).

Genotyp	Wysokość [cm]	Genotyp	Wysokość [cm]	Genotyp	Wysokość [cm]	Genotyp	Wysokość [cm]
Triticale N	70	Triticale 23	104	Triticale 47	90,5	Triticale 71	109
Triticale W	104	Triticale 24	89	Triticale 48	81,5	Triticale 72	73
Triticale 1	115,5	Triticale 25	89	Triticale 49	95,5	Triticale 73	83,5
Triticale 2	87	Triticale 26	94	Triticale 50	107,5	Triticale 74	72
Triticale 3	88,5	Triticale 27	87,5	Triticale 51	105	Triticale 75	100
Triticale 4	96	Triticale 28	96	Triticale 52	98,5	Triticale 76	89
Triticale 5	90	Triticale 29	89	Triticale 53	125	Triticale 77	82
Triticale 6	82,4	Triticale 30	60	Triticale 54	112,5	Triticale 78	96
Triticale 7	98	Triticale 31	85	Triticale 55	87,5	Triticale 79	83
Triticale 8	86,5	Triticale 32	73	Triticale 56	86	Triticale 80	90
Triticale 9	79	Triticale 33	91,5	Triticale 57	88	Triticale 81	104
Triticale 10	95	Triticale 34	88,5	Triticale 58	75	Triticale 82	62,5
Triticale 11	111	Triticale 35	115	Triticale 59	107,5	Triticale 83	95
Triticale 12	84	Triticale 36	89	Triticale 60	78	Triticale 84	68
Triticale 13	92	Triticale 37	111	Triticale 61	65	Triticale 85	81,5
Triticale 14	92	Triticale 38	102	Triticale 62	97	Triticale 86	80
Triticale 15	77	Triticale 39	87,5	Triticale 63	86,5	Triticale 87	104,5
Triticale 16	66	Triticale 40	88	Triticale 64	104	Triticale 88	85
Triticale 17	91	Triticale 41	87	Triticale 65	88,5	Triticale 89	104
Triticale 18	84,5	Triticale 42	96	Triticale 66	112,5	Triticale 90	86
Triticale 19	86	Triticale 43	85	Triticale 67	87	Triticale 91	89
Triticale 20	104	Triticale 44	82	Triticale 68	92	Triticale 92	92
Triticale 21	106	Triticale 45	93	Triticale 69	77,5	Triticale 93	90
Triticale 22	91,5	Triticale 46	118	Triticale 70	86,5	Triticale 94	76,5
Triticale 95	81	Triticale 117	112	Triticale 139	80,5	Triticale 159	82
Triticale 96	116	Triticale 118	66	Triticale 140	84	Triticale 160	92,5
Triticale 97	82	Triticale 119	107	Triticale 141	76,5	Triticale 161	88,5
Triticale 98	72	Triticale 120	76,5	Triticale 142	108	Triticale 162	81,5
Triticale 99	99	Triticale 121	93	Triticale 143	100	Triticale 166	71,5
Triticale 100	98,5	Triticale 122	116	Triticale 144	104,5	Triticale 167	72
Triticale 101	111	Triticale 123	111	Triticale 145	66,5	Triticale 168	89
Triticale 102	80,5	Triticale 124	92	Triticale 146	58	Triticale 169	72,5

Genotyp	Wysokość [cm]	Genotyp	Wysokość [cm]	Genotyp	Wysokość [cm]	Genotyp	Wysokość [cm]
Triticale 103	73	Triticale 125	79,5	Triticale 147	87,5	Triticale 170	77,5
Triticale 104	88	Triticale 126	86	Triticale 148	75,5	Triticale 171	71,5
Triticale 105	88	Triticale 127	80	Triticale 149	73,5	Triticale 172	76
Triticale 106	77	Triticale 128	85	Triticale 151	84	Triticale 173	68,5
Triticale 107	84	Triticale 129	84	Triticale 152	91,5	Triticale 174	96,5
Triticale 108	89	Triticale 130	96,5	Triticale 153	72,5	Triticale 175	77,5
Triticale 109	82	Triticale 131	82,5	Triticale 154	83	Triticale 176	80
Triticale 110	89	Triticale 132	101,5	Triticale 155	90	Triticale 177	108,5
Triticale 111	101,5	Triticale 133	68,5	Triticale 163	114	Triticale 178	105
Triticale 112	82	Triticale 134	86,5	Triticale 164	71,5	Triticale 179	86,5
Triticale 113	105	Triticale 135	79,5	Triticale 165	82	Triticale 180	80
Triticale 114	110	Triticale 136	121	Triticale 156	93,5	Triticale 181	81
Triticale 115	106	Triticale 137	91,5	Triticale 157	110	Triticale 182	80,5
Triticale 116	76,5	Triticale 138	72,5	Triticale 158	85	Triticale 183	71
Genotyp	Wysokość [cm]						
Triticale 184	97						
Triticale 185	60						
Triticale 186	87						

Tab.6. Populacja segregująca wraz z formami rodzicielskimi – długość pędu

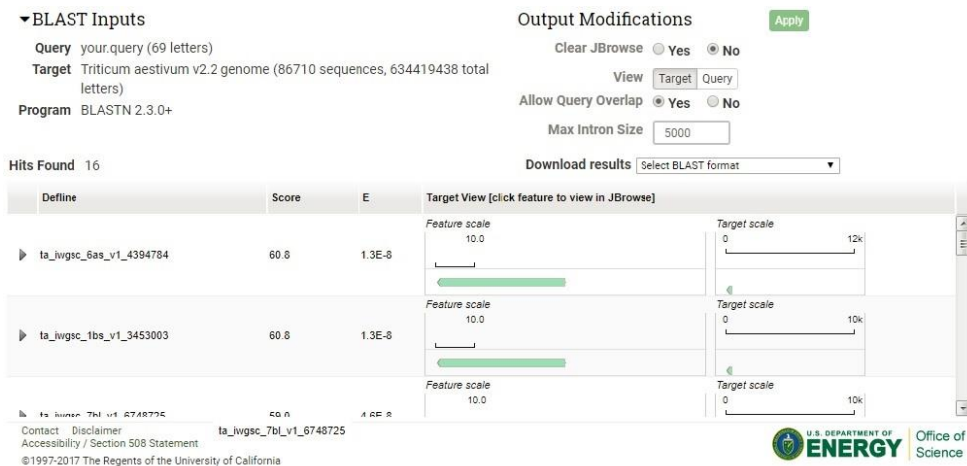
W wyniku przeprowadzonych analiz uzyskano 11 043 markery SilicoDArT specyficzne dla roślin wysokich, niskich oraz średnich. W obrębie tych markerów zidentyfikowano 4 624 markery SNP. Spośród tych markerów jedynie 5 były to markery specyficzne dla roślin niskich i zanikające wraz ze wzrostem długości pędu (Rys. 1).

Średnia wartość PIC dla wszystkich analizowanych prób wynosiła 0,268. W analizowanej populacji stwierdzono dość wysoki współczynnik heterozygotyczności, który wynosił 0,444. Związane jest z faktem iż analizowana populacja była populacją F₂, czyli na bardzo wczesnym poziomie zaawansowania hodowlanego.

16358601 F 0-5:A>G-5:A>G	TGCAGATTCGACCTCGACGGCGACGGCAAACCTCTCATTCGACGAGTCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCA	TGCAGATTCGACCTCGACGGCGACGGCAAACCTCTCATTCGACGAGTTC
4200836 F 0-11:T>C-11:T>C	TGCAGCGTTTCTAGGCAGCGCCATGGCGTCCGGCGGACCTGGTATGGAGATGGCCGAGATCGGAAGA	TGCAGCGTTTCTAGGCAGCGCCATGGCGTCCGGCGGACCTGGTAT
4219577 F 0-5:G>A-5:G>A	TGCAGGCCTACAGAGATTCACATATCGACACAAACAGGTAGGCATAGATCGATCGATCTGTCCAGGCAAC	TGCAGGCCTACAGAGATTCACATATCGACACAAACAGGTAGGCATAC
8531930 F 0-5:A>T-5:A>T	TGCAGACTGGTCCGCATGGCCGCGAGCCCGCAGTCAATGGCAAGCGAGATAGGCTAGTCCGGCCGAGA	TGCAGACTGGTCCGCATGGCCGCGAGCCCGCAGTCAATGGCAAG
3042861 F 0-63:G>T-63:G>T	TGCAGAAGAGCATCTCAACAGCAGTGGCTCCGACATCGTCCAGCTTAAACATGTCTCTCATGGCCATG	TGCAGAAGAGCATCTCAACAGCAGTGGCTCCGACATCGTCCAGCTT
4353187 F 0-5:G>C-5:G>C	TGCAGGGTGTGGTGTGATGAGATTTGCCACCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAGCAGGAATGCCGAGACC	TGCAGGGTGTGGTGTGATGAGATTTGCCACCCGAGATCGGAAGAG
16312343 F 0-25:A>C-25:A>C	TGCAGGAGAGGAGGCGCTCGTGAACCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAGCAGGAATGCCGAGACCGA	TGCAGGAGAGGAGGCGCTCGTGAACCCGAGATCGGAAGAGCGGTT
16312243 F 0-13:G>C-13:G>C	TGCAGATCTTGACGAACGGGAGGTACCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAGCAGGAATGCCGAGACCGATCT	TGCAGATCTTGACGAACGGGAGGTACCGAGATCGGAAGAGCGGTT
10511847 F 0-30:G>C-30:G>C	TGCAGCGGCGGACGCCGACCACTCCGCTGGAGCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAGCAGGAATGCCGGA	TGCAGCGGCGGACGCCGACCACTCCGCTGGAGCCGAGATCGGAAGAG
16312333 F 0-9:T>A-9:T>A	TGCAGCTTCTAGAAACGAACGTCGCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAGCAGGAATGCCGAGACCGATCTC	TGCAGCTTCTAGAAACGAACGTCGCCGAGATCGGAAGAGCGGTT
14479494 F 0-8:T>C-8:T>C	TGCAGCTTTGGGACGGAGCGCCGCTGGTAGCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAGCAGGAATGCCGAGAC	TGCAGCTTTGGGACGGAGCGCCGCTGGTAGCCGAGATCGGAAGAG
4564113 F 0-28:G>A-28:G>A	TGCAGCTTCGGCGTGCACGCGGCCGCGGGCACGGGCTCGCGCTTGGCGTGGTGGCCAGCAGCGGAGGCG	TGCAGCTTCGGCGTGCACGCGGCCGCGGGCACGGGCTCGCGCTTGG
8536791 F 0-9:T>G-9:T>G	TGCAGTTATTGCGCGCAGCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAGCAGGAATGCCGAGACCGATCTCGTATGC	TGCAGTTATTGCGCGCAGCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAGCAG
8539582 F 0-13:A>G-13:A>G	TGCAGTTCAGCAAACGGGGCTGCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAGCAGGAATGCCGAGACCGATCTCGT	TGCAGTTCAGCAAACGGGGCTGCCGAGATCGGAAGAGCGGTTCCAG

Rys. 1 Markery specyficzne dla roślin niskich populacji segregującej.

Analiza bioinformatyczna za pomocą platformy Phytozome 12 wykazała, że wszystkie te markery są specyficzne dla telomerów krótkich ramion dwóch chromosomów pszenicy 6A i 1B (Rys.2).



Rys.2 Wynik analizy BLAST na platformie Pchytosome 12

Analiza porównawcza ekspresji genów ze szlaku biosyntezy giberelin wykazała istnienie różnic w poziomie transkryptów tych genów u analizowanych form pszenżyta. Podwyższony poziom ekspresji obu genów zaangażowanych w pierwszy etap biosyntezy giberelin, czyli biosyntezę ent-kaurenu, obserwowano jedynie u odmiany Magnat. Odmiana ta charakteryzowała się najwyższym wśród badanych form poziomem transkryptów genów CPS (syntazy pirofosforanu kopalilu) oraz KS (syntazy ent-kaurenu). Obniżenie ekspresji obu genów zaangażowanych w początkowe etapy biosyntezy giberelin obserwowano u odmiany Fidelio. W porównaniu do formy wysokiej CZR 891/01, forma niska CZR 876/01 pochodząca z kombinacji krzyżówkowej [(Jana × Tempo) × Jana] × *Aegilops juvenalis* odznaczała się znacznym podwyższeniem poziomu transkryptów genu CPS oraz niewielkim obniżeniem poziomu transkryptów genu KS.

Kolejnym badanym genem był gen oksydazy ent-kaurenowej (KO) uczestniczący w dalszym przekształcaniu ent-kaurenu. Najwyższy poziom ekspresji tego genu obserwowano u odmiany Magnat. Wzrost poziomu transkryptu genu KO obserwowano także u analizowanej formy niskiej CZR876/01. U odmian Fidelio, Woltario i Zorro ekspresja genu KO była obniżona.

Analiza poziomu transkryptów wykazała różne wzory ekspresji genów kodujących oksydazy GA-20 i GA-3 w badanym materiale. Najniższe poziomy ilości transkryptu obu genów (GA-20ox i GA-3ox) zaobserwowano w formie wysokiej CZR 891/01, pochodzącej z analizowanej kombinacji krzyżówkowej. Najwyższy poziom transkryptu GA-20ox ujawnił się w przypadku karła CZR 876/01 pochodzącego z wyżej wymienionej kombinacji krzyżowej. Najwyższą natomiast ekspresję GA-3ox stwierdzono w odmianach Magnat i Woltario. Na uwagę zasługuje różnica w poziomach transkryptu GA-20ox między formami karłowymi i wysokimi uzyskanymi z badanej kombinacji krzyżowej. Jak wykazano w literaturze, zwiększona ekspresja GA-20ox nie zawsze jest powiązana z wysokim fenotypem, ponieważ na poziom bioaktywnych giberelin wpływ mają zarówno ich synteza i inaktywacja, jak i precyzyjna regulacja sprzężenia zwrotnego.

Ostatnim z badanych genów był gen GA2-ox kodujący GA 2-oksydazę, która uczestniczy w inaktywacji bioaktywnych giberelin poprzez ich 2 β -hydroksylację. Podobny profil ekspresji genu GA2ox uzyskano dla badanej formy niskiej CZR876/01 pochodzącej z kombinacji krzyżówkowej oraz dla odmian Fidelio i Woltario. Formy te charakteryzowały się spadkiem poziomu transkryptów genu GA2-ox, przy czym najniższy poziom ekspresji tego genu obserwowano u odmiany Woltario. W porównaniu do analizowanej formy wysokiej CZR 891/01 wyższy poziom ekspresji genu GA2ox odnotowano u odmian Magnat i Woltario.

Wyniki przeprowadzonych analiz uzyskane z wykorzystaniem sond molekularnych zostały potwierdzone w analizach opartych o wykorzystanie barwnika SYBR Green.

Mierniki dla tematu badawczego 4 (podać w tabeli)

Lp.	miernik ⁵	Wartość miernika podana w opisie	Wartość miernika zrealizowana
1	Liczba genotypowanych roślin (DArT)	188	188
2	Liczba przeanalizowanych genów (real-time PCR)	6	6

4. Informacja nt. prezentacji wyników badań (podać w tabeli - należy wymienić konferencje, na których planuje się zaprezentować wyniki i/lub wymienić publikacje, które zostaną przygotowane i przyjęte do druku w trakcie realizacji zadania w danym roku).

Prezentacja wyników na konferencjach			
lp.	konferencja	Rodzaj prezentacji ⁶	Liczba prezentacji
1	8th International Triticeae Symposium 2017, 12-16.06.2017	poster	2
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych			
lp.	monografia/czasopismo	Rodzaj publikacji ⁷	Liczba publikacji

6. 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 wykonanych kombinacji krzyżówkowych.	100	100	1,00
Temat badawczy 2				
2.1	Liczba fenotypowanych roślin	80	80	1,00
Temat badawczy 3				
3.1	Liczba kombinacji krzyżówkowych z których zarodki będą przeznaczone do kultur <i>in vitro</i>	20	20	1,00
Temat badawczy 3				
4.1	Liczba genotypowanych roślin (DArT)	188	188	1,00
	Liczba przeanalizowanych genów (real-time PCR)	6	6	1,00
			ŚREDNIA	1,00
			% REALIZACJI ZADANIA	100,0%

Sporządzono:

Lublin, 12.01.2018

⁵ Podać miernik – np. ilość planowanych testów, prób, badanych genotypów etc.

⁶ Podać, czy planowany jest wykład plenarny, doniesienie konferencyjne czy poster.

⁷ Podać, czy planowana jest publikacja oryginalna, czy np. polemika, list do edytora, rozdział w monografii etc.

Pieczęć jednostki

Osoba reprezentująca jednostkę

Kierownik zadania

data

podpis i pieczęć

podpis