

Sprawozdania z realizacji projektów w roku 2008

MR1 „Identyfikacja oraz wprowadzenie do genomu genów determinujących odporność pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez grzyb *Pseudocercospora herpotrichoides*”

Kierownik: doc. dr hab. Halina Wiśniewska, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Wykonawcy: doc. dr hab. S. Bartkowiak, doc. dr hab. M. Korbas, doc. dr hab. H. Wiśniewska, dr M. Majewska, dr T. Sodikiewicz, mgr D. Ratuszniak, J. Maszner, T. Szcześniak

Celem badań w ramach projektu była analiza elektroforetyczna izoenzymów endopeptydaz komórkowych pozwalających zidentyfikować genotypy posiadające introgressywny fragment chromosomu *Aegilops ventricosa* i obecny w nim gen *EPD1b* sprzężony z genem *Ph1* determinującym odporność pszenicy na łamliwość źdźbła powodowaną przez *Pseudocercospora herpotrichoides*. Badania obejmowały 140 genotypów pszenicy ozimej o zróżnicowanym podłożu genetycznym oraz odmianę Rendez-vous- jako wzorzec odporności na łamliwość źdźbła.

Zbadano próbki liści pobranych z poszczególnych genotypów. Większość analizowanego materiału (89 genotypów), to były heterozygoty typu Ep-D1a **Ep-D1b**. W 8 genotypach stwierdzono obecność na żelu izoenzymów **Ep-D1b EpD1b** podobnie jak u odmiany niemieckiej Rendez-vous charakteryzującej się wysoką odpornością na łamliwość źdźbła, u której we wcześniejszych badaniach potwierdzono występowanie genu *Ph1* sprzężonego z genem *Ep-D1b*. W 37 genotypach nie stwierdzono izoenzymu Ep-D1b, a wykazano tylko obecność izoenzymu Ep-D1a, który nie jest sprzężony z genem *Ph1*. Obecność **Ep-D1b** świadczy o obecności w badanym materiale genu odporności *Ph1* na infekcję grzybową powodowaną przez *Pseudocercospora herpotrichoides*. Ep-D1b jest kodominującym markerem obecności loci *Ph1*. Wykrycie jego obecności w tkankach pszenicy pozwala więc wysnuć wniosek że badany materiał posiada odporność na infekcję grzybową *Pseudocercospora herpotrichoides*.

Analizę ekspresji genu *Ph1* w warunkach polowych skontrolowano w teście inokulacyjnym. Najniższą ilość porażonych źdźbeł stwierdzono dla genotypu SZD 4631 i jest to zgodne z klasyfikacją na podstawie analizy izoenzymów endopeptydaz, podobnie jak u

odmiany Rendez-vous. Najwyższy procent porażonych źdźbeł wskazujący na podatność na *Pseudocercospora herpotrichoides* stwierdzono oceniając odmianę Smuga (50% porażonych źdźbeł), u której również nie wykazano obecności izoenzymu EPD1b.

MR 2 „, Poszukiwanie, tworzenie, ocena i gromadzenie źródeł odporności na fuzariozę kłosów u pszenicy”

Kierownik: doc. dr hab. Halina Wiśniewska, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Wykonawcy: doc. dr hab. H. Wiśniewska, dr Tomasz Góral, dr Piotr Ochodzki, dr A. Kaczmarek, mgr inż. J. Belter, J. Maszner, G. Cicha, T. Szcześniak

Celem realizowanego projektu było badanie odporności na fuzariozę kłosów 160 genotypów pszenicy ozimej. Do badań wybrano genotypy o zróżnicowanej morfologii kłosa, terminie kłoszenia i dojrzewania, pochodzących z różnych kombinacji krzyżowań odmian i linii o podwyższonej odporności na fuzariozę kłosa. Obiekty wysiane zostały na poletkach doświadczalnych Instytutu Genetyki Roślin PAN w Cerkwicy koło Poznania oraz w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie, co pozwoliło na większe zróżnicowanie warunków klimatycznych modyfikujących w dużym stopniu reakcję pszenicy na porażenie kłosa przez grzyby z rodzaju *Fusarium*. Materiałem infekcyjnym była mieszanina 3 izolatów *Fusarium culmorum*, wytwarzających deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV) oraz zearalenon. Kłosa inokulowane były w stadium kwitnienia przez oprysk zawiesiną zarodników z zastosowaniem mikrozaszrania po inokulacji. Nasilenie fuzariozy kłosów w Cerkwicy było niższe niż w Radzikowie, co związane było z wysoką temperaturą i brakiem opadów po kwitnieniu i kształtowało się w granicach od 2 do 27%. Procent ziarniaków z wyraźnymi objawami fuzariozy był niższy w Cerkwicy niż w Radzikowie i wynosił od 6,9 do 53%. Współczynnik korelacji wysokości roślin i nasilenia fuzariozy kłosów był istotny. Najwyższe porażenie kłosa stwierdzono u najniższego genotypu (72,3%). Genotypy wyższe były słabiej porażane przez *Fusarium* sp., na co wskazuje wysoki współczynnik determinacji. Stwierdzono istotną dodatnią zależność uszkodzenia ziarniaków od nasilenia fuzariozy kłosów. Nieliczne genotypy wykazywały niskie uszkodzenie ziarniaków mimo silnego porażenia. Ziarno z genotypów badanych w lokalizacji Poznań i Radzików charakteryzujących się niewielkim porażeniem kłosa, małą masą i liczbą

ziarniaków z objawami fuzariozy, oraz niewielką obniżką parametrów plonotwórczych, analizowano pod względem zawartości w ziarniakach szkodliwych toksyn: niwalenolu i deoksyniwalenolu, stosując technikę (HPLC). Zawartość DON w ziarnie była wysoka (0,10-11,43mg/kg) biorąc pod uwagę stopień uszkodzenia ziarniaków. Tylko 4 genotypy wykazywały niewielką dopuszczalną ilość toksyny DON, od 0,10 do 0,82 ppm. W badanych próbach stwierdzona znacznie mniejsze ilości niwalenolu od 0,09 do 3,32 ppm. Współczynniki korelacji nasilenia fuzariozy kłosów i uszkodzenia ziarniaków z zawartością DON i NIV były istotne statystycznie. Cztery genotypy kumulowały niewielką ilość tych 2 toksyn – poniżej 1,0 ppm. (a dwa z nich wykazywały również małe porażenie kłosa i porażenie ziarna). Wyselekcjonowane genotypy charakteryzujące się niską zawartością toksyn, małym porażeniem kłosa i ziarna mogą stanowić cenny materiał do badań genetycznych nad odpornością pszenicy na fuzariozę kłosów, jak również stanowić cenną pulę genetycznych źródeł odporności na fuzariozę kłosa.

MR 11 „Segregacja alleli Glu-1 w populacjach linii DH i SSD pszenicy”

Kierownik: prof. dr hab. Tadeusz Adamski, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Wykonawcy: prof. dr hab. Maria Surma, dr Aleksandra Ponitka, dr Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina, dr Karolina Krystkowiak, dr Anetta Kuczyńska, mgr Hanna Pudelska, mgr Renata Trzeciak, mgr Jolanta Woźna, Alina Anioła, Reneta Holewińska

Wartość wypiekowa mąki zależy od wielu czynników, z których do najważniejszych należy ilość i jakość białek zapasowych występujących w endospermie ziarniaków pszenicy. Spośród białek największy wpływ na wartość technologiczną mąki ma zawartość i jakość glutenu. Wysokocząsteczkowe (HMW) gluteniny stanowią ok. 10% białek zapasowych, które generują do 70% zmienności cech technologicznych. Celem badań jest stwierdzenie, czy uzyskiwanie linii homozygotycznych pszenicy różnymi metodami przyspieszającymi cykl hodowlany (technika pojedynczego ziarna, metoda kultur pylnikowych oraz metoda wykorzystująca zjawisko eliminacji chromosomów zachodzące w wyniku skrzyżowania pszenicy z kukurydzą) nie powoduje zaburzeń w segregacji loci Glu1 warunkujących wartość technologiczną ziarna.

Materiał do badań stanowiły mieszańce pokolenia F₁ (pojedyncze lub złożone) uzyskane z 36 kombinacji krzyżówkowych pszenicy ozimej. Na podstawie przeprowadzonej analizy produktów ekspresji alleli Glu-1, metodą elektroforezy białek gluteninowych na żelu poliakrylamidowym oraz metodami identyfikacji alleli w loci Glu-1, za pomocą markerów allelospecyficznych wykazano zróżnicowanie form rodzicielskich pod względem składu podjednostek gluteninowych. Porównano efektywność otrzymywania form haploidalnych pszenicy ozimej metodą krzyżowania z kukurydzą oraz metodą kultur pylnikowych. Dokonano podziału mieszańców na grupy o wysokiej, średniej i niskiej efektywności otrzymywania roślin w stosunku do wyłożonych pylników (androgeneza) lub zapylnych kwiatków (eliminacja chromosomów). Wskazano kombinacje krzyżówkowe szczególnie przydatne do badań nad genetycznym uwarunkowaniem wartości technologicznej mąki.

MR 12: „Ocena zmienności cech jakościowych pszenicy na podstawie analizy składu jakościowo-ilościowego wybranych klas białek oraz badań reologicznych”

Kierownik projektu: doc. dr hab. Bolesław Salmanowicz

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Wartość wypiekowa pszenicy zwyczajnej w znacznym stopniu determinowana jest składem jakościowo-ilościowym białek zapasowych ziarniaków. Opracowywane nowe metodyki badawcze umożliwiają typowanie linii/rodów o pożądanym własnościach użytkowych na wstępnych etapach selekcji hodowlanej na podstawie danych uzyskanych przy zastosowaniu trzech nowych testów reologicznych przeprowadzonych w mikroskali (do 10g) z zastosowaniem miksografu, farinografu oraz analizatora tekstury ziarna (pomiar metodą Kieffer'a). Uzyskane dane reologiczne analizowane są w powiązaniu ze zmiennością składu jakościowo-ilościowego wybranych klas białek zapasowych ziarniaków pszenicy wynikającą ze zróżnicowania genotypowego oraz wpływu środowiska (pomiarów techniką wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej, SDS-PAGE oraz wysokosprawnej chromatografii cieczowej z odwróconymi fazami). Przeprowadzono również identyfikację wybranych genów kodujących białka mające istotny wpływ na jakość technologiczną pszenicy (technika PCR z zastosowaniem allelospecyficznych markerów molekularnych).

Obiektem badań były 104 odmiany/rody pszenicy o znanej wartości wypiekowej oraz 216 nowych linii hodowlanych. Na wstępie określono korelacje między poszczególnymi parametrami reologicznymi zmierzonymi przy pomocy trzech nowych aparatów a podstawowymi własnościami technologicznymi wyznaczonymi wcześniej metodami klasycznymi dla 104 prób pszenicy. Dla szeregu parametrów miksograficznych, farinograficznych i relaksacyjno-wydłużeniowych (metoda Kieffera) uzyskano bardzo wysokie współczynniki korelacji (R w zakresie 0,62 - 0,96, $P < 0,05$) z danymi technologicznymi. Następnie dla 216 linii/rodów, na podstawie oznaczonych metodami reologicznymi wskaźników jakości, określono przewidywaną wartość technologiczną. Tylko u 4 z 216 analizowanych linii stwierdzono występowanie genu *Glu-B1-1b* charakteryzującego się podwyższoną ekspresją, lecz nie stwierdzono obecności genu *Glu-B1-2a*, co świadczy o braku pary HMW podjednostek gluteninowych Bx7^{OE} i By8*, które bardzo korzystnie wpływają na własności technologiczne pszenicy.

MR 15 „Modelowanie statystyczne i optymalizacja serii doświadczeń porównawczych z pszenicą”

Kierownik: prof. dr hab. Zygmunt Kaczmarek, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Wykonawcy: doc. dr hab. Paweł Krajewski, prof. dr hab. Wiesław Mądry, mgr Marcin Przystalski

Rozwiązywanie wielu zagadnień rolniczych odbywa się poprzez prowadzenie doświadczeń powtarzanych w różnych miejscowościach i w różnych sezonach wegetacyjnych. Metodyka umożliwiająca odpowiednią analizę tych doświadczeń noszących nazwę serii doświadczeń nie jest prosta i wymaga wprowadzenia właściwego i realnego, odpowiadającego rzeczywistości, modelu matematycznego.

W analizie statystycznej serii doświadczeń porównawczych z genotypami najbardziej interesującą, zwłaszcza z punktu widzenia oceny stabilności i zdolności adaptacyjnej genotypów (nowych kreacji), jest interakcja genotypowo-środowiskowa. Interakcja ta informuje o reakcji genotypów na warunki klimatyczno-glebowe miejsc (środowisk), w których to porównywanie jest przeprowadzane. Jest oczywiste, że ocena badanych genotypów jest pełniejsza i bardziej efektywna jeśli doświadczenia zakładane są w dużej liczbie lokalizacji o różnych warunkach przyrodniczych. Jednakże w praktyce zakładane serie obejmują zwykle kilka doświadczeń, na podstawie których chciałoby się uzyskać informacje

o wspomnianych genotypach zbliżone do informacji uzyskiwanych na podstawie doświadczeń prowadzonych w wielu środowiskach.

W obecnej pracy, zawierającej wyniki pierwszego etapu badań, przedstawiono model matematyczny obserwacji dla serii doświadczeń oraz zaproponowano metodę liniowej regresji wielokrotnej do wyboru środowisk reprezentatywnych dla danej serii doświadczeń. Mogą one stanowić serię referencyjną, pomocną w planowaniu (prognozowaniu) oceny potencjalnych genotypów (np. nowych odmian) na różnych etapach procesu selekcji. Ponieważ jednym z najważniejszych kryteriów oceny nowych kreacji są ich średnie oszacowane w seriach doświadczeń, opisana metoda zawiera odniesienie do takich średnich z równoczesnym uwzględnieniem wszechstronnej oceny interakcji genotypowo-środowiskowej. Wykonano także analizę statystyczną przykładowych danych pochodzących z serii doświadczeń prowadzonych w latach 2005-2007 w ramach systemu porejestrowego doświadczalnictwa odmianowego koordynowanego przez COBORU. Selekcja środowisk pozwoliła wyróżnić do dalszych badań 8 stacji doświadczalnych COBORU.

MR 28 „Badanie odporności genotypów pszenżyta na fuzariozę kłosów i akumulację mikotoksyn fuzaryjnych w ziarnie” (lokalizacja Poznań)

Kierownik: doc. dr hab. Halina Wiśniewska, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Wykonawcy: doc. dr hab. H. Wiśniewska, dr Tomasz Góral, dr Piotr Ochodzki, mgr inż. J. Belter, G. Cicha

Celem prac prowadzonych w ramach projektu było badanie odporności na fuzariozę kłosów 41 genotypów pszenżyta ozimego o zróżnicowanym podłożu genetycznym. Obiekty wysiane zostały na polstkach doświadczalnych Instytutu Genetyki Roślin PAN w Cerkwicy koło Poznania oraz oddzielny projekt dotyczący tego samego materiału realizowany był w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Radzikowie. Materiałem infekcyjnym w obu lokalizacjach była mieszanina 3 izolatów *Fusarium culmorum*, wytwarzających deoksyniwalenol (DON), niwalenol (NIV) oraz zearalenon. Kłosa inokulowane były w stadium kwitnienia przez oprysk zawiesiną zarodników z zastosowaniem mikrozaszrania po inokulacji.

Porażenie kłosa kształtowało się w granicach 2-27%. Niski indeks fuzariozy kłosów (od 2 do 3%) określono dla 8 genotypów. Procent ziarniaków z wyraźnymi objawami fuzariozy u badanych genotypów wynosił od 6,9 do 52,7%. Poniżej 10% ziarniaków z wyraźnymi objawami fuzariozy stwierdzono u 5 form. Nie stwierdzono korelacji fuzariozy kłosów z stopniem uszkodzenia ziarniaków.

Ziarno z badanych genotypów z lokalizacji Poznań i Radzików charakteryzujących się niewielkim porażeniem kłosa, małą masą i liczbą ziarniaków z objawami fuzariozy oraz niewielką obniżką parametrów plonotwórczych, analizowano pod względem zawartości szkodliwych dla człowieka i zwierząt kumulowanych w ziarniakach toksyn fuzaryjnych: niwalenolu i deoksyniwalenolu, stosując technikę (HPLC) z detekcją UV. Zawartość DON w ziarnie była wysoka (0,40-11,49mg/kg) biorąc pod uwagę stopień uszkodzenia ziarniaków. U 9 genotypów w Cerkwicy zawartość toksyny DON przewyższała dopuszczalny poziom (1,25 mg/kg) W badanych próbach przeciętnie występowało kilkakrotnie więcej DON niż NIV (0-0,56mg/kg). Współczynniki korelacji nasilenia fuzariozy kłosów z zawartością DON i NIV były nieistotne statystycznie. Istotne natomiast były współczynniki korelacji uszkodzenia ziarniaków z zawartością DON i NIV. Wyższy współczynnik odnotowano dla zawartości DON. Na podstawie przeprowadzonych w dwóch lokalizacjach badań pszenżyta wyselekcjonowano 8 genotypów pszenżyta ozimego o niewielkim porażeniu kłosa, i ziarna oraz kumulujących w ziarniakach niewielkie ilości szkodliwych toksyn trichotecenowych (DON i NIV).

MR 31 „Badanie efektywności spontanicznie otrzymywanych i indukowanych linii podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego w kulturach in vitro”

Kierownik: dr Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Wykonawcy: dr A. Ponitka, dr A. Ślusarkiewicz-Jarzina, mgr H. Pudelska, mgr J. Woźna

Badano efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur i zielonych roślin w kulturach pylnikowych zróżnicowanego genetycznie materiału pszenżyta ozimego i jarego. Oceniano stopień ploidalności roślin oraz podwajano liczbę chromosomów haploidów.

Pylniki w stadium jednojądrowych ziaren pyłku wykładano na zmodyfikowaną pożywkę C17 (Wang i Chen 1983) a następnie inkubowano w ciemności, w temp. 28°C. Po miesiącu androgeniczne struktury przenoszono na pożywkę regeneracyjną: 190-2 (Zhuang i Xu, 1983). Dalszą hodowlę prowadzono w temp. 22°C przy oświetleniu 12 godz./dobę. Określano poziom ploidalności androgenicznych zielonych roślin z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Rośliny pszenżyta ozimego jarowizowano przez 8 tygodni. Po aklimatyzacji haploidy traktowano roztworem kolchicyny celem podwojenia liczby chromosomów. Wyizolowano 79010 pylników z 32 form mieszańcowych pszenżyta ozimego,

z których uzyskano 65415 androgenicznych struktur w zależności od genotypu od 17,1 do 196,8/100 pylników (średnio 82,8). Na pożywce regeneracyjnej wyhodowano 4115 zielonych roślin (średnio 5,2/100 pylników). Rośliny otrzymano ze wszystkich 32 genotypów, przy czym efektywność wahała się od 0,2 do 26,6 /100 pylników. W ośmiu genotypach notowano wysoką częstotliwość (powyżej 7,5%) zielonych roślin w stosunku do wyłożonych pylników. Wśród regenerantów stwierdzono 51,6% spontanicznie podwojonych haploidów (od 32,1 do 85,7% w zależności od genotypu). Z dwunastu form mieszańcowych pszenżyta jarego wyizolowano 28934 pylników, z których otrzymano 10909 androgenicznych struktur, w zależności od genotypu od 4,0 do 194,5/100 pylników (średnio 37,7). Na pożywce regeneracyjnej wyhodowano 854 zielonych roślin (średnio 2,9/100 pylników). Rośliny zregenerowano z 11 genotypów, przy czym efektywność wahała się od 0,3 do 17,3/100 pylników. Efektywność uzyskiwania androgenicznych roślin pszenżyta jarego wynosiła średnio 2,9% i była niższa w porównaniu z efektywnością notowaną w pszenżycie ozimym (5,2% zielonych roślin). Po osiągnięciu dojrzałości roślin pszenżyta ozimego i jarego zostanie przeprowadzona ocena płodności oraz efektywności spontanicznie otrzymywanych i indukowanych linii podwojonych haploidów.

MR 36: „Ocena cech jakościowych pszenżyta na wczesnych etapach selekcji hodowlanej z przeznaczeniem ziarna do wypieku chleba oraz o polepszonej wartości paszowej”

Kierownik projektu: doc. dr hab. Bolesław Salmanowicz, Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Do oceny zmienności wybranych cech jakościowych pszenżyta zastosowano nowoczesne metody analityczne, reologiczne oraz markery molekularne. Dane uzyskane na podstawie znajomości składu jakościowo-ilościowego białek zapasowych ziarniaków oraz własności reologicznych wykorzystywane są do wstępnego typowania odmian/rodów//linii o korzystnych parametrach technologicznych. Przeprowadzone analizy umożliwiają również zidentyfikować odmiany/rody/linie hodowlane o polepszonej wartości paszowej tj. o zmniejszonym udziale sekalin w ogólnej ilości białka oraz zredukowanej ilości poszczególnych podklas sekalin. Dotychczas brak jest dokładnego rozpoznania składu jakościowo-ilościowego białek sekalinowych. Pomocne okazały się techniki wysokosprawnej elektroforezy kapilarnej (HPCE) i chromatografii cieczerwowej z odwróconymi fazami (RP-

HPLC), które obok pełnej identyfikacji jakościowej poszczególnych klas białek zapasowych, umożliwiają również oznaczenie ich składu ilościowego. Wykorzystywane w niniejszym projekcie metody reologiczne (testy wykonane na miksografie, farinografie oraz analizatorze tekstury - pomiary deformacyjno-relaksacyjne metodą Kieffer'a przeprowadzone w mikroskali (do 10g mąki) sprawdziły się w przypadku szacowania wartości wypiekowej rodów/linii pszenicy zwyczajnej.

Obiektem badań elektroforetycznych (SDS-PAGE i HPCE), chromatograficznych (RP-HPLC) oraz reologicznych było 51 krajowych odmian pszenżyta oraz 105 liniach hodowlanych pszenżyta. Stwierdzono obecność szeregu nowych HMW podjednostek gluteninowych (Bx7*, By8*, By18*, By20*) wcześniej nie identyfikowanych u pszenicy zwyczajnej. Przeprowadzone wstępne badania reologiczne wykazały, że opracowane dotychczas metodyki dla prób mąki pszenicznej nie w pełni potwierdzają się w przypadku mąki pszenżytniej. Dodatkowo przeważająca część analizowanych odmian/rodów/linii pszenżyta charakteryzowała się wysoką kleistością ciasta, co utrudnia przeprowadzanie pomiarów. Wymagać to będzie opracowania odrębnych procedur dostosowanych do badań reologicznych mąki pszenżytniej

MR 38 „Optymalizacja procesu homozygotyzacji mieszańców jęczmienia w aspekcie skracania cyklu hodowlanego”

Kierownik: prof. dr hab. Maria Surma, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

Wykonawcy: *Instytut Genetyki Roślin PAN*: prof. dr hab. T. Adamski, prof. dr hab. M. Surma, dr A. Kuczyńska, dr K. Krystkowiak, mgr R. Trzeciak, A. Anioła, R. Holewińska,
Uniwersytet Śląski w Katowicach: prof. dr hab. I. Szarejko, dr Danuta Nabiałkowska, Justyna Kościńska, Justyna Zbieszczyk, Marek Marzec

Celem badań prowadzonych w ramach projektu jest opracowanie podstaw metodycznych uzyskiwania z mieszańców wczesnych pokoleń jęczmienia ozimego linii podwojonych haploidów (DH) i linii wsobnych oraz ocena stopnia ich homozygotyczności za pomocą markerów molekularnych. Analizowane są dwa podejścia: haploidyzacja mieszańców F₁ drogą androgenezy oraz wyprowadzanie linii techniką pojedynczego ziarna (ang. single seed descent, SSD) w powiązaniu z kulturami *in vitro*. Harmonogram na 2008 r. obejmował:

wybór i wytworzenie do doświadczeń materiałów o różnym stopniu heterozygotyczności, prace metodyczne na zwiększeniu efektywności androgenezy oraz nad skróceniem cyklu uzyskiwania linii jęczmienia ozimego techniką SSD w połączeniu z kulturą *in vitro* niedojrzałych zarodków. Materiałem do badań były 2- i 6-rzędowe odmiany jęczmienia ozimego: Bombay, Nickela, Reni, Tiffany (2-rzędowe), Campanile, Franziska, Lomerit, Merlot, Mombasa, Naomie, Rosita (6-rzędowe) i oraz mieszańce F_1 kombinacji Tiffany x Bombay, Nickela x Reni, Lomerit x Merlot, Franziska x Merlot. Analizowano zróżnicowanie odmian jęczmienia ozimego z punktu widzenia długości okresu jarowizacji. Zastosowano 4 okresy jarowizacji: 4, 6, 8 i 10 tygodni. Czterotygodniowy okres jarowizacji okazał się wystarczający dla odmian Nickela, Merlot i Franziska. Dla większości odmian konieczny był się 6-tygodniowy okres jarowizacji. Odm. Campanile, Tiffany i Bombay wymagały 8-tygodniowej jarowizacji. Badania dotyczące warunków wyeliminowania spoczynku nasion poprzez zastosowanie kultury *in vitro* obejmowały określenie optymalnego stadium rozwoju ziarniaków i wielkości zarodków przeznaczonych do izolacji. Ustalono, że optymalnym stadium rozwoju ziarniaków, z których zarodki pobierane się do kultury *in vitro* jest końcowe stadium dojrzałości mlecznej. Rozwój zarodków z ziarniaków młodszych był znacznie wolniejszy, tak więc w efekcie wcześniejsze wykładanie zarodków nie skracało okresu czasu potrzebnego do uzyskania roślin.

W badaniach nad androgenezą wykorzystywano kłosa, w których mikrospory znajdowały się w stadium wczesno-średnim i średnim jednojądrowym. Kłosa poddano przedtraktowaniu w temperaturze 4°C przez 21 dni. Po tym okresie pobierano pylniki i wykładano je na pożywkę indukującą BAC3 (Szarejko i Kasha, 1991: Induction of anther culture derived doubled haploids in barley. *Cereal Res. Commun.* 19(1-2): 219-237). Po okresie 3-4 tygodni obserwowano pojawianie się kalusów bądź embrioidów. Embrioidy przekładano na pożywkę BAC3 regenerującą. W przypadku wszystkich kombinacji otrzymano bardzo dużą liczbę dobrze wykształconych struktur zarodkopodobnych, które zregenerowały w rośliny w liczbie od 70 do 170 w zależności od kombinacji. Wśród zregenerowanych roślin obserwowano obok roślin zielonych również rośliny albinotyczne. W przypadku wszystkich kombinacji rośliny pozbawione chlorofilu stanowiły większość w obrębie regeneratów. Najwięcej regeneratów uzyskano dla krzyżówki Franziska x Merlot (174 rośliny), jednakże tylko ok. 10% z nich stanowiły rośliny zielone. Natomiast najwyższą częstotliwość roślin zielonych (45%) uzyskano dla krzyżówki Tiffany x Bombay. Zastosowana metoda androgenezy,

wykorzystywana z powodzeniem do regeneracji jarych odmian jęczmienia, umożliwiła otrzymanie roślin zielonych ze wszystkich badanych mieszańców jęczmienia ozimego.

MR 64 „Metody analizy interakcji genotypowo-środowiskowej w badaniach stabilności i adaptacyjności genotypów rzepaku ozimego”

Kierownik: dr Elżbieta Adamska, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Wykonawcy: prof. dr hab. Tadeusz Caliński, doc. dr hab. Teresa Cegielska-Taras, dr Stanisław Czajka, prof. dr hab. Zygmunt Kaczmarek, mgr Laurencja Szała

Celem projektu było opracowanie metodyki analizy statystycznej doświadczenia jednopowtórzeniowego z wzorcem umożliwiającą ocenę badanych linii oraz ich klasyfikację i selekcję ze względu na cechy struktury plonu i zawartość tłuszczu oraz ważniejszych kwasów tłuszczowych w oleju nasion rzepaku ozimego.

Porównanie genotypów (rodów i linii) we wczesnych etapach hodowli rzepaku ozimego oparte jest przede wszystkim na wynikach analizy pojedynczych doświadczeń jednopowtórzeniowych z wzorcami. Analiza ta ma na celu ocenę niereplikowanych linii i rodów poprzez pośrednie porównanie ich z wzorcami w taki sposób, który umożliwiłby dokonanie rankingu tych genotypów i wybór najlepszych z nich do dalszych prac.

W tegorocznych badaniach przedstawiono propozycję metodyki analizowania zmienności fenotypowej i genetycznej cech struktury plonu i cech biochemicznych linii podwojonych haploidów rzepaku ozimego. Zastosowanie tej metodyki omówiono na przykładzie danych z doświadczenia jednopowtórzeniowego, w którym dwie formy wzorcowe, odmiana *Californium* i linia DH W-15, porównywano z 116 liniami DH uzyskanymi z mieszańców F1 *Californium* × DH W-15 oraz z 94 liniami DH otrzymanymi z mieszańców F1 DH W-15 × *Californium*. Linie podwojonych haploidów otrzymano w Pracowni Kultur Tkankowych Zakładu Roślin Oleistych IHAR w Poznaniu metodą izolowanych mikrospor (Cegielska i Szała, 1997). Linie DH oraz formy rodzicielskie *Californium* (CAL) i DH W-15 (W-15) badano w doświadczeniu jednopowtórzeniowym z wzorcami przeprowadzonym na polu doświadczalnym Instytutu Genetyki Roślin PAN w Cerekwicy k. Poznania. Dla cech struktury plonu i cech biochemicznych wyznaczono charakterystyki statystyczne populacji linii DH i populacji rodzicielskich, przeprowadzono ocenę i rankingi linii DH, znaleziono

oceny efektów transgresji linii oraz zweryfikowano istotność tych efektów a także wyznaczono oceny parametrów genetycznych.

MR 84 „Łubiny - poszukiwanie źródeł i zbadanie sposobu dziedziczenia odporności na choroby grzybowe (fuzarioza i antraknoza) oraz niskiej zawartości i składu jakościowego alkaloidów”

Kierownik projektu: prof. dr hab. W. Święcicki (Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu)

Wykonawca: mgr Paweł Barzyk

Badania zmierzały do wyselekcjonowania oraz wytworzenia poprzez krzyżowania łubinów o ulepszonym genotypie pod względem odporności na antraknozę, przy jednoczesnym uwzględnieniu zawartości związków antyżywniowych (alkaloidów). Materiał badawczy obejmował odmiany i linie kolekcyjne oraz rody wytworzone w trakcie badań.

1. Doświadczenia polowe ze sztuczną inokulacją i nawadnianiem.

Na 110 poletkach doświadczalnych przetestowano 46 genotypów pochodzących z 6 kombinacji mieszańcowych (Z-474, Z-489, Z-477, Z-473, Z-476, Z-468) i 2 odmiany wzorcowe wg opracowanej wcześniej metodyki. Obserwacje przeprowadzono w dwóch terminach – podczas pełni kwitnienia i dojrzewania strąków. Porażenie antraknozą wystąpiło dopiero po sztucznej inokulacji, głównie na strąkach, o średnim natężeniu. Zebrano nasiona 161 pojedynków, łącznie 7667 sztuk. Wyniki potwierdzają słuszność wyboru rodów pochodzących od Z-477 i Z-476, a także Z-489 który został wybrany do dalszych badań. Większość obiektów pochodzących od mieszańca Z-474 uzyskała istotnie słabsze wyniki.

2. Doświadczenia polowe podatności/odporności na wędnięcie fuzaryjne

Na stanowisku sztucznie zainfekowanym szczepami *Fusarium sp.* przetestowano 81 genotypów *L. angustifolius* (i 3 odmiany wzorcowe) pod kątem zdolności przeżycia. Eksperyment ujawnił szeroki zakres zmienności wyrażonej jako odsetek roślin, które potrafiły wykształcić zdrowe strąki.

Na innym polu, w warunkach porażenia przez *Fusarium sp.*, przetestowano 17 genotypów pod kątem zdolności do plonowania (plon nasion w dt/ha); eksperyment wykonano w 4 powtórzeniach, z 2 odmianami wzorcowymi, łącznie 76 poletek.

3. Testy szklarniowe podatności/odporności na porażenie antraknozą

Przebadano 125 genotypów łubinu żółtego, w tym 65 obiektów wyselekcjonowanych na podstawie wyników doświadczeń polowych w latach 2005-2008. Wegetacja przebiegała w kontrolowanych warunkach. Siewki łubinów w stadium 4 liści inokulowano zawiesiną zarodników konidialnych *Colletotrichum lupini*, uzyskanych z hodowli *in vitro*. Wyniki wyrażone w skali stopniowej 0-9 ujawniają istotne zróżnicowanie badanych genotypów pod względem podatności na antraknozę i wskazują jako najwartościowsze genotypy pochodzące od mieszańca Z-489 i kolejno Z-477, Z-473, Z-468, Z-476; wyniki weryfikują również wnioski z doświadczeń polowych – szczególnie na temat potomstwa mieszańca Z-474.

4. Krzyżowania wybranych rodów genotypów

W wyniku krzyżowań wybranych obiektów łubinu żółtego (z doświadczeń polowych) z odmianą Mister – forma ojcowska uzyskano nasiona z 13 kombinacji. Łącznie uzyskano 353 wykształcone nasiona o dwu typach zabarwienia: nakrapiane (*parvimaclatus*) i białe (*niveus*). Będą one materiałem wyjściowym do dalszych badań nad odpornością łubinów na antraknozę.

5. Krzyżowania wybranych linii o zróżnicowanej zawartości alkaloidów.

W wyniku krzyżowań form o zróżnicowanej zawartości alkaloidów uzyskano 122 nasiona mieszańcowe łubinu białego z 10 kombinacji oraz 108 nasion łubinu wąskolistnego z 11 kombinacji.

W wyniku rozmnożenia form skrzyżowanych w roku 2007 uzyskano nasiona pokolenia F1 z trzech kombinacji mieszańcowych (Mustal x Kalina, Boruta x Karo, Boruta x ST.239).

6. Analizy zawartości alkaloidów

Analizowano ogólną zawartość alkaloidów oraz skład jakościowy w materiałach kolekcyjnych i segregujących liniach mieszańcowych (zawartość alkaloidów oznaczono na chromatografie gazowym). Charakterystyka zmienności w materiałach kolekcyjnych umożliwia wybór form rodzicielskich i wykonanie krzyżowań do badań nad sposobem dziedziczenia zawartości ogólnej oraz składu jakościowego. W łubinie wąskolistnym stwierdzono dominujący udział lupaniny i 13-OH lupaniny, co pozwala na postawienie

hipotezy, że eliminacja angustifoliny może prowadzić do niższej, ogólnej zawartości. Na podobnej zasadzie można przypuszczać, że obniżenie zawartości sparteiny może spowodować niższą zawartość ogólną w łubinie żółtym. Nasiona łubinu żółtego zawierały mniej alkaloidów niż łubin wąskolistny; głównymi alkaloidami były typowe dla gatunku – lupinina i sparteina.

MR 85 „Podstawy genetyczne odporności na wyleganie i cech jakościowych nasion grochu”

Kierownik projektu: prof. dr hab. W. Święcicki (Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu)

Wykonawcy: dr M. Gawłowska, dr L. Boros, dr hab. J. Żebrowski

Celem projektu jest zbadanie możliwości ulepszenia najważniejszych cech użytkowych grochu – sztywności łodygi (odporności na wyleganie) oraz cech jakościowych nasion – zawartości oligosacharydów i białka.

Zbadano parametry fizyczne i mechaniczne łodyg w genotypach o zróżnicowanym poziomie wylegania oraz w populacji mapującej Carneval x MP1401. Elementem badań nad sposobem dziedziczenia sztywności łodygi jest identyfikacja rejonów genomu warunkujących tą cechę.

Zróżnicowanie średnicy i grubości ścian łodyg w poszczególnych odcinkach było małe. Z parametrów mechanicznych najniższe współczynniki zmienności genotypowej stwierdzono dla parametru sztywności standaryzowanej (EI) i maksymalnego momentu gnącego (MBM). W fazie dojrzałości korzystniejsze parametry stwierdzono u form wzorcowych Turkus i Ezop. Wytrzymałość mierzona jako maksymalny moment zginający okazała się być dobrym wskaźnikiem różnicującym linie, a sztywność łodygi była wysoce skorelowana z wytrzymałością. Wyniki dla dwu terminów pomiaru i trzech odcinków łodygi pozwoliły na wyodrębnienie genotypów o korzystnych parametrach (WTD 4293, WTD 4298, WTD 4304, WTD 4297 i odm. Ezop).

Zidentyfikowano w genomie grochu 14 rejonów warunkujących sztywność i wytrzymałość łodygi oraz 18 loci. Do dalszych testów wytypowano 6 sprzężonych markerów (6 izoenzymatycznych, 1 morfologiczny, 1 typu STS i 1 typu SSR).

Oligosacharydy rodziny rafinozy przyczyniają się do ograniczonego wykorzystania nasion grochu w żywieniu ponieważ podlegając fermentacji w jelicie grubym powodują wzdęcia i związany z tym dyskomfort. Stąd obniżenie zawartości może być jedną z dróg poprawy wartości konsumpcyjnej nasion.

W nasionach badanych genotypów cukrowce rozpuszczalne były reprezentowane przez sacharozę oraz cukry z rodziny rafinozy. Ich zawartość wahała się od kilku do kilkunastu % masy nasion. Rafinozy stanowiły średnio 70% cukrowców rozpuszczalnych. We frakcji RFO dominowała werbaskoza lub stachioza. Dominacja stachiozy upodabniała niektóre genotypy grochu do rodzaju *Phaseolus* i wiąże się ze wzrostem zawartości rafinozy w takich nasionach.

Zawartość białka analizowano metodą Dumas'a ($N \times 5,52$). Analizowano genotypy uprawiane w dwu lokalizacjach (Szelejewo i Wiatrowo) dla określenia interakcji genotypowo-środowiskowej i korelacji z plonem i innymi cechami użytkowymi, a także segregujące potomstwa nowych kombinacji krzyżówkowych. Ocena wyników potwierdza obserwowaną od kilku lat tendencję w kierunku obniżenia zawartości białka w nasionach wysokoplennych genotypów, a w konsekwencji zmniejszenie przydatności paszowej grochu w porównaniu do innych surowców wysokobiałkowych. Wcześniejsze wyniki badań nad korelacją białko – plon wskazują na możliwości zapobiegania tej tendencji.

MR 86: Markery molekularne sprzężone z cechami użytkowymi w charakterystyce genotypów łubinu wąskolistnego (*Lupinus angustifolius* L.)

Kierownik projektu: Prof. dr hab. Bogdan Wolko, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Wykonawcy: mgr inż. Łucja Przysiecka, mgr inż. Weronika Jankowska (od 1.10. 2008)

Konsultant: dr Zdzisław Paszkiewicz

Celem prac było opracowanie technologii opierającej się na monitorowaniu genotypów łubinu wąskolistnego za pomocą sekwencyjnie zdefiniowanych markerów molekularnych sprzężonych z czterema genami odpowiedzialnymi takie cechy jak: pęknięcie strąków (geny *lentus* i *tardus*), twardość okrywy nasiennej (gen *mollis*) i przyspieszenie kwitnienia poprzez obniżenie wymagań związanych z wernalizacją roślin (gen *Ku*). Wstępną informację o sekwencji markerów MFLP sprzężonych z wyżej wymienionymi cechami użytkowymi uzyskano w ramach formalnej współpracy IGR PAN z Department of Agriculture and Food Western Australia.

Materiał roślinny obejmował zestaw 33 linii łubinu wąskolistnego uzyskanych z kolekcji Banku Genów Stacji Hodowli w Wiatrowie. W ich skład wchodziło 8 populacji dzikich, 16 polskich odmian uprawnych, 9 australijskich odmian uprawnych i 2 linie rodzicielskie populacji mapującej. Przeprowadzono izolację DNA z tkanki liściowej po dwóch tygodniach wzrostu z 5 roślin reprezentujących każdą z badanych linii. Na podstawie dostarczonych informacji o sekwencji markerów MFLP zaprojektowano nowe startery do amplifikacji markerów STS. Po optymalizacji warunków PCR, otrzymane produkty amplifikacji rozdzielano techniką elektroforezy na żelu agarozowym, i uzyskano polimorficzne produkty amplifikacji w przypadku markerów dla genów *le* i *ta* odpowiedzialnych za redukcję pęknięcia strąków. Polimorfizm markera dla genu *lentus* (sprzężenie z cechą - 2,6 cM) charakteryzował się występowaniem dominującego prążka (126 pz) sprzężonego z allelem *le* i brakiem prążka w przypadku allela *Le*. W przypadku genu *tardus* (sprzężenie z cechą - 2,8 cM) wykryty marker ma charakter kodominacyjny. Allel *Ta* charakteryzuje się produktem krótszym (szybszy prążek), a *ta* prążek wolniejszy o długości 221 pz.

Dla markera sprzężonego z genem *mollis* (0,4 cM) odpowiedzialnego za grubość okrywy nasiennej uzyskano monomorficzny produkt w badanym zestawie linii. Jego sekwencjonowanie w wybranych liniach pozwoliło na identyfikację dwóch miejsc SNP różniących dwa allele genu. W wyniku zastosowania techniki SSCP uzyskano marker o charakterze kodominacyjnym. Allel dziki *Moll* różnił się od allela *moll* warunkującego cienką okrywę nasienną ruchliwością jednego prążka.

W przypadku markera sprzężonego z genem *Ku* (0,5 cM) warunkującym niezależność wczesności kwitnienia od procesu wernalizacji uzyskano jeden produkt amplifikacji dla wszystkich analizowanych linii. Trudny do zdefiniowania polimorfizm tego prążka związany jest z minimalnymi różnicami w długości produktu. Uzyskane wyniki wskazują, że niezbędna będzie analiza polimorfizmu tego markera na żelu poliakrylamidowym zapewniającym większy stopień rozdzielczości.

Z testowanych czterech markerów sprzężonych z cechami użytkowymi trzy wykazały łatwy do identyfikacji polimorfizm długości produktów lub obecności bądź braku produktu amplifikacji w badanym zestawie linii. Minimalne różnice w długości produktu generowanego w przypadku markera sprzężonego z genem *Ku*, uzyskane na drodze standardowego rozdziału elektroforetycznego na żelu agarozowym były powodem w trudności w jednoznacznej identyfikacji genotypów badanych linii.

Wstępnie wykonano również prace nad wykorzystaniem markerów blisko sprzężonych z genem odporności na brunatną plamistość łodyg. W pierwszym etapie badań wykorzystano jeden z sekwencyjnie zdefiniowanych markerów znany z literatury. Analiza zmienności produktów wykazała, że badane linie charakteryzują się trzema fenotypami elektroforetycznymi. Pierwszy z nich oznaczony jako A, posiada jeden wyraźny prążek najszybciej wędrujący (ok. 280 pz) oraz trzy lub cztery prążki o mniejszej intensywności i ruchliwości. Drugi fenotyp oznaczony jako B, zawiera jeden wyraźny

prążek o wielkości ok. 300 pz. Trzeci z wykrytych fenotypów – C, charakteryzuje się obecnością jednego najwolniej wędrującego prążka o wielkości ok. 360 pz. Dalsze badania w tym zakresie powinny zostać rozszerzone o testowanie odporności metodami klasycznej fitopatologii.

Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że tylko jeden marker genu *mollis* związany z cechą twardości okrywy nasiennej można wykorzystać do genotypowania materiałów hodowlanych i linii dzikich łubinów wąskolistnych. Markery genów *lentus* i *tardus* związanych z cechą pęknięcia strąków wykazały tylko częściową użyteczność. Część linii dzikich populacji określanych w kolekcyjnym opisie fenotypu jako linie o pękających strąkach wykazała genotyp (*lele* i *tata*) typowy dla genotypów o zredukowanej zdolności do pęknięcia strąków. Nie można wykluczyć, że zgodnie z doniesieniami literaturowymi cecha ta o charakterze poligenicznym zależna jest również od innego, dotychczas nie zidentyfikowanego genu mającego wpływ na ekspresję cechy w niektórych genotypach dzikich populacji łubinu wąskolistnego. A zatem, badane markery pozwalają na monitorowanie tylko części czynników genetycznych mających wpływ na ekspresję tej cechy pęknięcia strąków.