

Sprawozdanie z realizacji projektu badawczego pt.  
„Badania nad wpływem translokacji 1B/1R na efektywność uzyskiwania linii DH pszenicy  
oraz ich wartość technologiczną” w 2017 r.

Projekt finansowany przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi

Nr zadania 3 w załączniku nr 3

do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 27 lipca 2017 r. w sprawie  
dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa  
(Dz. U. poz. 1470)

Tadeusz Adamski, Maria Surma, Karolina Krystkowiak, Zygmunt Kaczmarek, Anetta  
Kuczyńska, Krzysztof Mikołajczak, Piotr Oгородowicz, Elżbieta Adamska, Renata Trzeciak,  
Alina Anioła, Renata Holewińska

Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Celem badań wieloletnich jest stwierdzenie, czy obecne w niektórych odmianach (rodach) pszenicy translokacje 1B/1R mają wpływ na efektywność uzyskiwania form haploidalnych i linii podwojonych haploidów (DH) na drodze krzyżowania pszenicy z kukurydzą oraz na prawidłowość zachodzenia segregacji w populacjach linii DH i SSD wyprowadzonych z mieszańców form translokowanych. Na podstawie dotychczas przeprowadzonych badań stwierdzono, że mieszańce zawierające translokacje odznaczały się w większości przypadków korzystnymi wartościami parametrów związanych z efektywnością uzyskiwania form haploidalnych. Wykazano także brak wpływu efektów matecznych na efektywność otrzymywania haploidów drogą krzyżowania pszenicy z kukurydzą.

W 2017 r. badania prowadzono w ramach 3 tematów: (1) Ocena wpływu kierunku krzyżowania w procesie otrzymywania mieszańców F<sub>1</sub> pszenicy z form translokowanych z nietranslokowanymi na częstość występowania alleli wybranych markerów molekularnych i białkowych w populacjach linii DH; (2) Porównanie segregacji wybranych markerów molekularnych i białkowych w populacjach linii DH i SSD w aspekcie występowania form translokowanych i nietranslokowanych; (3) Określenie związku między występowaniem translokacji 1B/1R a efektywnością otrzymywania form haploidalnych pszenicy ozimej.

Celem **Tematu 1** było określenie wpływu kierunku krzyżowania, a tym samym efektów matecznych, na segregację markerów związanych ze składem wysokocząsteczkowych białek gluteninowych oraz markerów mikrosatelitarnych identyfikujących gen półkarłowatości (*Rht8*) oraz identyfikujących translokacje 1B/1R w populacjach linii DH wyprowadzonych z mieszańców form translokowanych z nietranslokowanymi. Materiał do badań stanowiło 8 populacji linii DH pszenicy wyprowadzonych z mieszańców F<sub>1</sub>, z których jedna z form rodzicielskich zawierała translokacje pszenno-żytnie. Mieszańce F<sub>1</sub> pochodziły z krzyżowań wzajemno-przemiennych w układzie forma translokowana x nietranslokowana oraz nietranslokowana x translokowana. Formy haploidalne pszenicy otrzymano na drodze krzyżowania z kukurydzą. Podwajanie

liczby chromosomów wykonano z wykorzystaniem kolchicyny. Analizowano następujące populacje linii podwojonych haploidów: Palma\* × STH0007A, Brilliant\* × STH0007A, STH0007A × Palma\*, STH0007A × Brilliant\*, Palma\* × Fidelius, Brilliant\* × Fidelius, Fidelius × Palma\*, Fidelius × Brilliant\* (formy rodzicielskie zawierające translokacje zaznaczono gwiazdką).

Analizę linii DH przeprowadzono z wykorzystaniem markerów mikrosatelitarnych: *Xgwm261*, *Scm9* oraz zestawu markerów pozwalających na identyfikację alleli w locji *Glu-1*. W każdej z badanych populacji analizowano 40 roślin. DNA do analizy z użyciem markerów molekularnych izolowano za pomocą zestawu Wizard Genomic DNA Purification Kit firmy PROMEGA zgodnie z protokołem producenta. Stężenie DNA oznaczano spektrofotometrycznie względem buforów pochodzących z użytych podczas izolacji kitów. Pomiar stężenia próbek o objętości 1 µl prowadzono na spektrofotometrze NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Izolowane DNA traktowano jako roztwory wyjściowe, z których sporządzano rozcieńczenia używane w dalszych etapach pracy. Uzyskane po izolacji preparaty ekstraktu DNA rozcieńczano do finalnej koncentracji 50 ng/µl (wykorzystywane jako matryca w reakcji PCR).

Reakcje PCR przeprowadzono przy użyciu odczynników Qiagen w 5 µl objętości na płytkach PCR. Mieszanina reakcyjna zawierała 1x stężony Qiagen Multiplex PCR Master Mix, 2 µM każdego primera oraz matrycowe DNA. Elektroforezę kapilarną przeprowadzono za pomocą analizatora genetycznego DNA (Applied Biosystems) a analizę segregacji badanych markerów SSR przeprowadzono z wykorzystaniem programu GeneMapper.

Analizę segregacji alleli w loci *Glu-1* wykonano na populacjach linii DH otrzymanych w 2015 i 2016 r. - łącznie 360 linii DH i 50 linii SSD, natomiast dla pozostałych markerów dla linii otrzymanych w roku sprawozdawczym. Uzyskane wyniki weryfikowano poprzez analizę w liniach DH podjednostek białek HMW (produktów ekspresji genów w loci *Glu-1*) i obecności białek sekalinowych metodą SDS-PAGE. Prawidłowość segregacji alleli określono poprzez porównanie oczekiwanych i obserwowanych liczebności linii z poszczególnymi allelami z wykorzystaniem testu *chi*-kwadrat.

Na podstawie przeprowadzonych analiz molekularnych z zastosowaniem markera *Scm9* stwierdzono polimorfizm pod względem występowania translokacji żytnich we wszystkich badanych populacjach DH i SSD Polimorfizm wśród badanego materiału doświadczalnego dla markera związanego z wysokością roślin (*Xgwm261*) wystąpił w populacjach Palma × STH0007A, STH 0007A × Palma, Brilant × STH 0007A i STH × Brilant. Częstość alleli segregujących w loci *Glu-A1*, *Glu-B1* i *Glu-D1* odpowiadała we wszystkich populacjach oczekiwanemu stosunkowi 1:1, na co wskazują nieistotne wartości statystyki *chi*-kwadrat zastosowanej dla testowania różnic między oczekiwaną a obserwowaną liczbą linii zawierających odpowiedni allel. Interesujące wyniki uzyskano dla segregacji linii pod względem translokacji 1B/1R. Tylko w połowie badanych populacji linii DH stosunek liczby linii z translokacją do liczby linii bez translokacji był zgodny z oczekiwanym stosunkiem 1:1. Uwagę zwraca, że zaburzenia w segregacji allela wskazującego na obecność translokacji 1B/1R wystąpiły głównie w populacjach linii DH, w których tworzeniu formą ojcowską była odmiana translokowana.

Prowadzone w ramach **Tematu 2** badania dotyczyły poprawności zachodzenia segregacji alleli w populacjach linii DH i SSD uzyskanych z tej samej kombinacji krzyżówkowej, z uwzględnieniem podziału na formy translokowane i nietranslokowane.

W roku 2016 (Sprawozdanie z realizacji badań w 2016 r.) przeprowadzono analizę poprawności segregacji wybranych markerów molekularnych i białkowych w populacjach linii DH: SM/TB/2, KBP/TB/3, NK/TB/4. Materiał do prowadzonych w roku sprawozdawczym badań stanowiły uzyskane z tych samych kombinacji krzyżówkowych linie SSD oraz, dodatkowo, linie DH i SSD z mieszańców F1 (Karen). Łącznie analizowano 29 linii DH i 189 linii SSD. Analizę linii DH i SSD przeprowadzono z wykorzystaniem 2 markerów mikrosatelitarnych (*Xgwm261* i *Scm9*) oraz zestawu markerów pozwalających na określenie składu HMW oraz techniką SDS PAGE. Szczegóły przedstawiono w opisie Tematu badawczego nr 1. Prawidłowość segregacji alleli określono poprzez porównanie oczekiwanych i obserwowanych liczebności linii z poszczególnymi allelami z wykorzystaniem testu *chi*-kwadrat. Ponadto wybrane populacje linii DH i SSD wysiano w warunkach polowych w celu rozmnożenia materiału siewnego do założenia w 2018 serii doświadczeń polowych. Celem tych doświadczeń będzie określenie zależności między stabilnością linii DH i SSD a obecnością translokacji pszenno-żytnich.

Na podstawie przeprowadzonych analiz molekularnych z zastosowaniem markera *Scm9* stwierdzono polimorfizm pod względem translokacji żytnich w badanej populacji linii DH (Karen) oraz w 4 analizowanych populacjach linii SSD: SSD-TB2, SSD-TB3, SSD-TB4 i SSD-Karen. Częstość alleli segregujących w loci *Glu-A1*, *Glu-B1* i *Glu-D1* odpowiadała we wszystkich populacjach oczekiwanemu stosunkowi 1:1, na co wskazują nieistotne wartości statystyki *chi*-kwadrat zastosowanej dla testowania różnic między oczekiwaną a obserwowaną liczbą linii zawierających odpowiedni allel. Nieistotne wartości testu *chi*-kwadrat stwierdzono także w segregacji markera *Xgwm261* w liniach SSD-TB4.

Interesujące wyniki uzyskano dla segregacji linii pod względem translokacji 1B/1R. W badanych w 2016 roku liniach DH (SM/TB1, SM/TB/2, KBP/TB/3, NK/TB/4) stosunek liczby linii z translokacją do liczby linii bez translokacji był zgodny z oczekiwanym, to jest 1:1 (Sprawozdanie z realizacji badań w roku 2016), natomiast w populacji SM/TB1 liczba linii bez translokacji okazała się istotnie większa od linii z translokacją – wartość testu *chi*-kwadrat była wysoce istotna ( $P < 0,01$ ). Podobne wyniki uzyskano w badaniach prowadzonych w roku sprawozdawczym. W populacjach SSD wytworzonych poprzez samozapylenie z mieszańców heterozygotycznych pod względem translokacji, przeważały linie, w których nie zidentyfikowano obecności translokacji 1B/1R.

Celem realizowanych w ramach **Tematu 3** badań było określenie związku między występowaniem translokacji 1B/1R a efektywnością otrzymywania form haploidalnych pszenicy ozimej. Materiał do badań stanowiło 18 kombinacji krzyżówkowych pokolenia F1 uzyskanych ze skrzyżowania form zróżnicowanych pod względem obecności translokacji 1B/1R. Mieszańce F1 wytworzone zostały w wyspecjalizowanych firmach hodowlanych. Dla uzyskania informacji o wpływie translokacji 1B/1R na efektywność uzyskiwania form haploidalnych z wykorzystaniem zjawiska eliminacji chromosomów przeprowadzono krzyżowanie pszenicy z kukurydzą. Określono liczbę rozrośniętych załąźni/100 zapyłonych kwiatków, liczbę zarodków/100 rozrośniętych załąźni, liczbę zarodków/100 zapyłonych kwiatków oraz liczbę haploidów/100 zapyłonych kwiatków. Uzyskane wyniki opracowano

statystycznie. Przeprowadzono analizę wariancji. Dokonano także weryfikacji hipotez szczegółowych dotyczących kontrastów między wybranymi grupami form. Podobieństwo badanych mieszańców pod względem wszystkich cech łącznie przedstawiono graficznie w odpowiednich układach współrzędnych stosując analizę zmiennych kanonicznych. Na podstawie przeprowadzonej analizy wariancji (ANOVA) dla pojedynczych cech stwierdzono istotne zróżnicowanie badanych form pod względem wszystkich analizowanych parametrów. Liczba rozrośniętych zalążni/100 zapylnych kwiatków w zależności od badanych obiektów mieściła się w granicach od 18,2 do 69,6. Procent uzyskanych zarodków w stosunku do rozrośniętych zalążni wynosił od 5,3 do 25,4, natomiast do zapylnych kwiatków od 2,12 do 16,96. Liczba uzyskanych roślin haploidalnych/100 zapylnych kwiatków mieściła się w granicach 0,53-10,42. Dokonano podziału genotypów na grupy jednorodne pod względem cech determinujących efektywność uzyskiwania form haploidalnych metodą analizy skupień. Do grupy 1 zaliczone zostały mieszańce F1 o najwyższych wartościach badanych cech. Pod względem liczby rozrośniętych zalążni/100 zapylnych kwiatków, zarodków/100 zapylnych kwiatków i zarodków na 100/rozrośniętych zalążni w grupie 1 znalazły się mieszańce uzyskane ze skrzyżowania form translokowanych z nietranslokowanymi lub translokowane x translokowane.

Na podstawie uzyskanych wyników stwierdzono brak istotnych różnic między mieszańcami pochodzącymi ze skrzyżowania form translokowanych oraz translokowanych z formami bez translokacji pod względem wszystkich parametrów związanych z efektywnością otrzymywania form haploidalnych traktowanych łącznie. Procent haploidalnych zarodków w rozrośniętych zalążniach był istotnie wyższy w przypadku mieszańców, których jedna lub obie formy rodzicielskie posiadały translokację, niż przypadku mieszańców między formami bez translokacji.