

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Załącznik do zadania
nr 18 wg Rozporządzenia MRiRW z dnia 29.07.2015 r.
nr 4 wg Decyzji MRiRW nr HOR hn-801-PB-9/16

PODSUMOWANIE

wyników otrzymanych w projekcie realizowanym na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, finansowanym przez Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi w latach 2014 – 2016

„Badania nad zwiększeniem efektywności uzyskiwania haploidów w procesie androgenezy oraz optymalizacja parametrów otrzymywania podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego”

Kierownik tematu: dr Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina

Wykonawcy: dr Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina
mgr Hanna Pudelska
mgr Jolanta Woźna

Celem projektu była modyfikacja pożywek i warunków kultur *in vitro* dla opracowania efektywnego systemu uzyskiwania haploidów i spontanicznie podwojonych haploidów w procesie androgenезy oraz optymalizacja warunków podwajania liczby chromosomów haploidów pszenżyta ozimego i jarego.

Badano efektywność otrzymywania linii DH pszenżyta ozimego i jarego określając częstotliwość występowania podwojonych haploidów po zastosowaniu kolchicyny w pożywce C17 indukującej proces androgenезy oraz w pożywce regeneracyjnej 190-2, a także po podwojeniu liczby chromosomów haploidów w procesie kolchicynowania *in vivo*.

Material i metody

Rośliny mieszańcowe pszenżyta do doświadczeń w kulturach *in vitro* wyhodowano na potrzeby projektu w placówkach: DANKO Hodowla Roślin Sp. z o.o. Choryń oraz Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Oddział Małyszyn i Oddział Borowo. Do indukcji androgenезy pszenżyta ozimego i jarego stosowano pożywkę C₁₇ (Wang i Chen 1983), zawierającą 0,5 mg/l KIN + 2 mg/l 2,4-D + 90 g/l maltozy. Androgeniczne struktury hodowano na pożywce regeneracyjnej: 190-2 (Zhuang i Xu, 1983). Pożywki wybrano na podstawie wcześniejszych badań autorów projektu oraz wyników z doświadczeń przeprowadzonych w pierwszym roku realizacji projektu. Stosowano kolchicynę w stężeniu 1,0 mg/l zarówno w trakcie kultur pylnikowych w pożywce indukcyjnej, jak i w pożywce regeneracyjnej, a także w procesie podwojenia liczby chromosomów roślin haploidalnych w roztworze o stężeniu 1%. Oznaczano ploidalność androgenicznych roślin przy użyciu cytometru.

Wyniki

W ramach projektu, realizowanego w okresie 3 lat, wyłożono 83776 pylników z 40 form pszenżyta ozimego i otrzymano 69552 androgenicznych struktur (83,0/100 pylników) oraz 2762 zielonych roślin (3,3/100 pylników, 4,0/100 struktur). Wyłożono również 89941 pylników z 42 form pszenżyta jarego i otrzymano 77252 androgenicznych struktur (85,3/100 pylników) oraz 2646 zielonych roślin (2,9/100 pylników, 3,4/100 struktur). Na podstawie cytometrycznych analiz 2022 androgenicznych roślin pszenżyta ozimego (z 32 genotypów) stwierdzono 717 (35,5%) podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych, natomiast w pszenżycie jarym wśród 1283 analizowanych roślin (z 25 genotypów) roślin DH było 447 (34,8%). Zarówno w formach ozimych i jarych obserwowano około 4,5% roślin aneuploidalnych. Całkowitą efektywność uzyskiwania linii DH oceniono w 2016 roku dla form ozimych i jarych, które były w doświadczeniach w 2015 roku, sumując podwojone haploidy z kultur pylnikowych z kolchicyną (wyodrębnione na podstawie badań cytometrycznych) oraz podwojone haploidy uzyskane po kolchicynowaniu haploidów. Ogółem z 1793 analizowanych roślin otrzymano 798 (44,5%) linii DH.

W dwóch latach 2015 i 2016 wyhodowano łącznie 1026 linii podwojonych haploidów (445 ozimych i 581 jarych). W 2015 roku z 14 genotypów pszenżyta ozimego na 20 badanych otrzymano 182 (24,8) linie DH, oraz 46 (7,6%) linii z 7 genotypów pszenżyta jarego na 15 przebadanych. W 2016 roku linie DH uzyskano ze wszystkich badanych form 10 ozimych i 17 jarych, tj. 263 (40,9%) roślin DH ozimych i, 535 (46,5%) jarych. Obserwacje efektywności indukcji androgenicznych struktur i regeneracji roślin w doświadczeniach przeprowadzonych w 2016 roku, dotyczących zastosowania kolchicyny w kulturach pylnikowych i w podwajaniu liczby chromosomów roślin haploidalnych wskazują, że poziom uzyskania linii DH będzie zbliżony lub wyższy do wyników z roku 2015.

Z analizy pochodzenia mieszańców wynika że: dla pszenżyta ozimego korzystne jest użycie form oznaczonych symbolem MAH..., zarówno jako matki jak i ojca, oraz odmian TWINGO, TOMKO i KASYNO jako ojca, natomiast dla pszenżyta jarego korzystne jest użycie form oznaczonych symbolem MAH... i TJ..., jako matki, oraz odmian ANDRUS i MILKARO jako ojca.

Obserwacje efektywności indukcji androgenicznych struktur i regeneracji roślin w doświadczeniach przeprowadzonych w 2016 roku, dotyczących zastosowania kolchicyny w kulturach pylnikowych i w podwajaniu liczby chromosomów roślin haploidalnych wskazują, że

poziom uzyskania linii DH będzie zbliżony do wyników z roku 2015. Można więc, stwierdzić, że opracowana w trakcie realizacji projektu technika otrzymywania roślin DH pszenżyta, zarówno dla form ozimych jak i jarych, została zoptymalizowana i może być stosowana w programach hodowlanych.

Wnioski z realizacji projektu:

1. W kulturach pylnikowych form ozimych i jarych uzyskano podobną efektywność androgenicznych struktur (około 80%), zielonych roślin (około 3-4%) oraz linii DH (około 30-40%), co świadczy o zoptymalizowaniu metody dla pszenżyta.
2. Technika uzyskiwania haploidów i linii podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego może być z powodzeniem wdrażana w zainteresowanych spółkach hodowlanych.
3. Stwierdzono, że suma podwojonych haploidów, otrzymanych podczas stosowania kolchicyny na różnych etapach hodowli pylników oraz kolchicynowanie *in vivo* haploidalnych roślin pozwoli wytworzyć wystarczającą ilość linii DH dla wykorzystania w programach hodowlanych.
4. Analiza pochodzenia mieszańców wykazała, że ważny jest wybór komponentów do tworzenia mieszańców dających pozytywną odpowiedź w kulturach pylnikowych pszenżyta.

Wnioski ogólne dotyczące stosowania kolchicyny:

1. Bez kolchicynowania = najtaniej, ale mniej roślin DH.
2. Kolchicyna dodawana do pożywki indukującej androgenzę = taniej, bo zużywa się mniej kolchicyny, ale większy jest nakład pracy przy dwukrotnym przekładaniu pylników. Roślin DH więcej o 20%.
3. Kolchicyna dodawana do pożywki regeneracyjnej = wynik zbliżony do kontroli (bez kolchicyny w pożywkach).
4. Kolchicynowanie haploidów *in vivo* = najdrożej, bo należy włączyć badania cytometryczne, a kolchicynę używa się w większym stężeniu. Poza tym około 30% roślin po kolchicynie nie przeżywa, szczególnie u form jarych.
5. Jedynie suma podwojonych haploidów otrzymanych podczas stosowania kolchicyny w kulturach pylnikowych (tj. w pożywce indukującej proces androgenyzy) oraz kolchicynowanie *in vivo* haploidalnych roślin stwarza możliwość otrzymania takiej ilości linii DH, która może być wykorzystywana w programach hodowlanych = około 60-70% linii DH form ozimych i około 40-50% jarych.

Materiały opublikowane:

- Plakat: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Pudelska H., Woźna J. **2015**. Comparison of the effectiveness of haploid and doubled haploid induction in anther culture of winter and spring forms of triticale (\times *Triticosecale* Wittm.). Streszczenie plakatu: BioTechnologia 96(1): 94. (Prezentacja wyników z 2014 r. zawartych w sprawozdaniu merytorycznym na str. 5-7, 12-14)
- Publikacja: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. **2015**. Doubled haploid production of winter and spring triticale hybrids using colchicine in anther cultures. Biuletyn IHAR, 276: 57-67. (Publikacja wyników z 2014 r. zawartych w sprawozdaniu merytorycznym na str. 7-11)
- Publikacja: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Kaczmarek Z. **2014** (wydane w 2015). The efficiency of the production doubled haploid spring triticale through anther culture. Zeszyty Naukowe UP we Wrocławiu, Rolnictwo CIX, 605: 65-74. (Publikacja wyników z 2013 r.)
- Publikacja: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Pudelska H., Woźna J., Pniewski T. **2016** "Improved production of doubled haploids of winter and spring triticale hybrids via combination of colchicine treatments on anthers and regenerated plant". J. Appl. Genet., DOI: 10.1007/s13353-016-0387-9. (Publikacja wyników z doświadczeń 2015 r. zawartych w sprawozdaniu merytorycznym na str. 5-8 oraz 11-14)