

Program Wieloletni 2008 – 2013

Zadanie 2.1

Analiza i wykorzystanie bioróżnorodności gatunków rodziny *Poaceae* w ulepszaniu pszenicy *T. aestivum* L. metodami biologii molekularnej, taksonomii numerycznej oraz międzygatunkowej i międzyrodzajowej hybrydyzacji generatywnej

Celem zadania było:
**zidentyfikowanie mieszańców międzygatunkowych
i międzyrodzajowych pszenicy *T. aestivum* L. z
gatunkami obcymi rodziny *Poaceae* o zmienionych
cechach lepszych niż u odmian pszenicy.**

1. Wielokrotna ocena polowa i laboratoryjna zidentyfikowanych mieszańców oddalonych z wykorzystaniem metod taksonomii numerycznej i biologii molekularnej. Wyprowadzanie podwojonych haploidów (DH) z mieszańców – wyrównywanie linii
2. Wytypowanie mieszańców o ulepszonych cechach, ich ocena pod względem przydatności dla hodowli poprzez określenie zakresu ulepszonych cech i ich kombinacji.
3. Określenie stabilności wytypowanych linii pod względem uzyskanych ulepszeń. Końcowa charakterystyka polowa i laboratoryjna wybranych linii.
4. Opracowanie sugestii dla programów hodowlanych pszenicy i pszenżyta odnośnie możliwości wykorzystania wytworzonych materiałów.

Na bazie oddalonych krzyżowań pszenicy *T. aestivum* L z gatunkami spokrewnionymi w obrębie rodziny *Poaceae* zidentyfikowano 958 mieszańców jarych F_5 - F_{10} o lepszych cechach niż w odmianach *T. aestivum* L. Mieszańce te pochodziły z krzyżowań *T. aestivum* L. z następującymi gatunkami:

1. *T. timopheevii* Zhukov (174)
2. *T. durum* Desf. odm. Mirable, Fuensemiduro, Khapli, Vernal (131)
3. *T. monococcum* L. (111)
4. *S. montanum* Guss (110)
5. *S. vavilovii* Grossh. (1)
6. *H. vulgare* L. odm. Manker (35)
7. *L. perenne* L. (225)
8. *Ae. squarrosa* L. (50)
9. *Ae. triumvidis* L. (5)
10. *Ae. speltoides* Taush. (97)

W efekcie wytworzonego z krzyżowań międzygatunkowych i międzyrodzajowych materiału ozimego $F_4 - F_{10}$ zidentyfikowano 690 mieszańców ozimych o cechach lepszych niż w odmianach *T. aestivum* L.

Mieszańce te pochodziły z krzyżowań *T. aestivum* L. z następującymi gatunkami:

1. *T. timopheevii* Zhukov (2)
2. *T. durum* Desf. odm. Mirable, Fuensemiduro, Khapli, Vernal No.124, Mielijononous, DF624 (625)
3. *T. dicoccoides* L. (10)
4. *T. beoticum* Boiss. (5)
5. *Ae. speltoides* Taush (12)
6. *E. giganteus* L. (19)
7. *L. perenne* L. odm. Anna, No.9/1/1 (17)

Spośród wielu gatunków *Poaceae* jakie wykorzystano do wytworzenia mieszańców z *T. aestivum* L. tylko materiał genetyczny pochodzący z:

1. *T. timopheevii* Zhukov.
2. *T. durum* Desf.
3. *T. dicoccoides* L.
4. *T. monococcum* L.
5. *T. boeoticum* Boiss.
6. *S. montanum* Guss.
7. *S. vavilovii* Grossh.
8. *H. ulgare* L.
9. *Ae. squarrosa* L.
10. *Ae. triumvidis* L.
11. *Ae. speltoides* Taush.
12. *L. perenne* L.
13. *E. giganteus* L.

okazał się efektywny w uzyskaniu lepszych wartości cech od *T. aestivum* L.

Ogółem zidentyfikowano **1629** linii
ozimych i jarych, o zmienionych
cechach pochodzących z
krzyżowań międzygatunkowych i
międzyrodzajowych pszenicy
***T. aestivum* L.** z innymi gatunkami
z rodziny ***Poaceae*.**



Ch.S

(Ch.S. x F.semiduro) x M Marksman : F5

[(5B Jara x L.perenne L.) x T.ae. 107] x AND 166





[(5B Jara x L.perenne L.) x T.ae. 107] x AND 166

Kryteria ulepszeń cech kłosa (1-6) i wskaźników technologicznych ziarna (a-d) linii ozimych *T. aestivum* L.

Oznaczenie cech	Nazwa cechy	Wartość krytyczna
1	Długość kłosa (cm)	12,0
2	Liczba kłosków w kłosie	22,0
3	Liczba ziarn w kłosie	55,0
4	Masa ziarn z kłosa (g)	2,5
5	Masa 1000-ziarn (MTZ) (g)	45,0
6	Liczba ziarn w kłosku (średnia)	2,5
a	Zawartość białka ogółem (%)	kl. E, A
b	Wskaźnik sedymentacji - SDS (cm ³)	kl. E, A
c	Liczba opadania – LO (sek.)	kl. E
d	Ocena ogólna (grupa Q)	Gr. E, A

**Wyizolowano DNA z materiału tkankowego
wytypowanych do badań molekularnych 180 linii**

**Analizę DNA przeprowadzono metodą polegającą na
amplifikacji sekwencji satelitarnych specyficznych dla
roślin jednoliściennych, a w szczególności pszenicy**

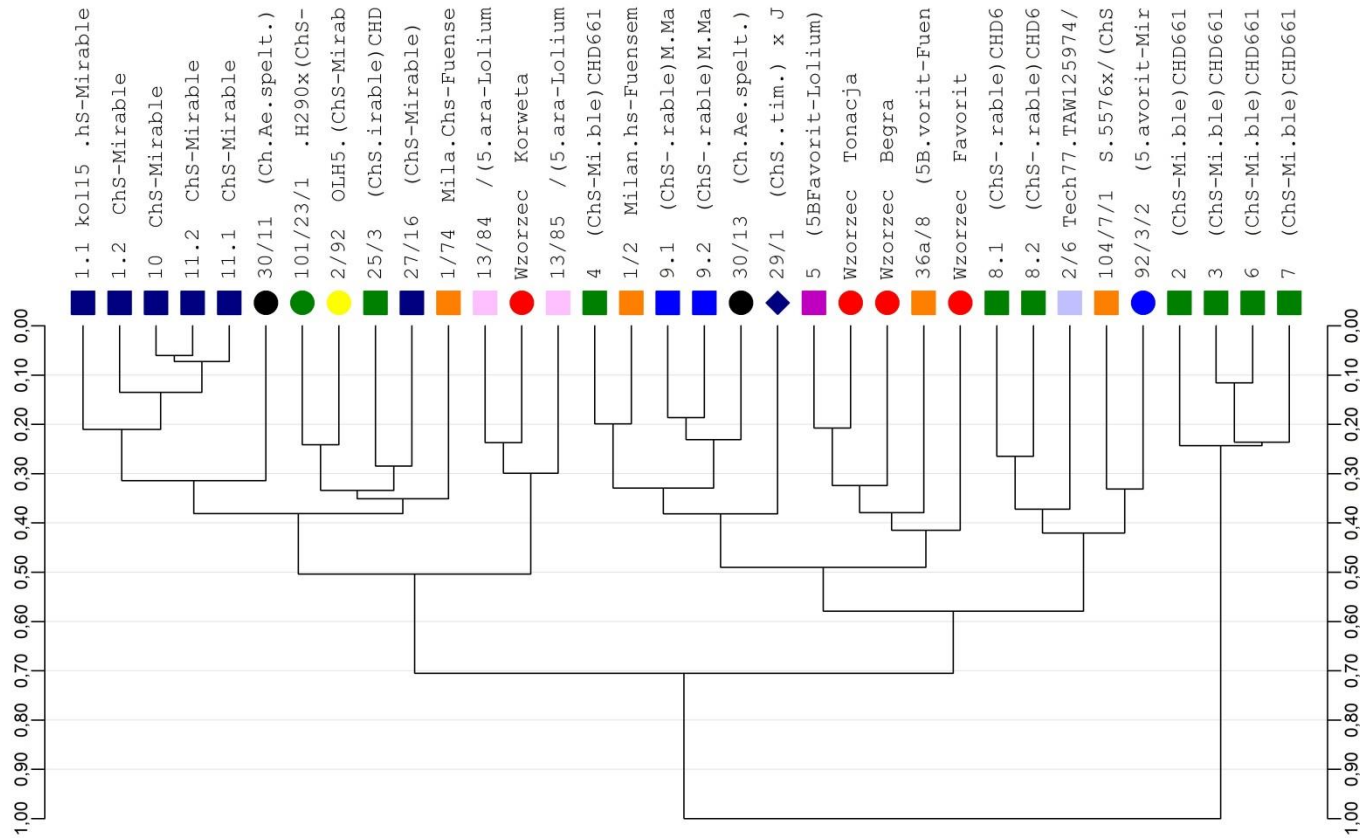
**Następnie próbki analizowano przez
wysokorozdzielczą elektroforezę kapilarną z
wykorzystaniem systemu
PA 800 plus - Beckman-Coulter**

**Do analizy skupień wykorzystano matrycę
danych skonstruowaną dla 105 obiektów i
sześciu cech morfologicznych kłosa
(w trzech powtórzeniach + średnia)**

**Metoda analizy skupień pogrupowała
mieszkańce pod względem ogólnego
wszechstronnego podobieństwa
względem badanych cech kłosa**

Dendrogram dla 30 odmian i 13 cech (morfologicznych i jakościowych)

WPGMA / Odległość miejska (Manhattan)



W dalszych badaniach analizowano

30 linii ozimych z 6 kombinacji

1. *T. aestivum* L. v.ChS x *T. durum* Desf. v. Mirable, Khapli, Fuensemiduro (15)
2. (*T. aestivum* L. v ChS- *T. durum* Desf. v. Mirable) x *T. aestivum* L v.CHD661 (7)
3. *T. aestivum* L. v. 5B Favorit x *L. perenne* L. v. Anna (3)
4. (*T. aestivum* L. v. ChS - *T. durum* Desf. v. Mirable) x *T. aestivum* L. v. M.Marks (2)
5. (*T. aestivum* L. v ChS- *T. timopheevii* Zhukov) x *T. aestivum* L. v. Jara (1)
6. (*T. aestivum* L. v ChS- *Ae. Sprltoides* Tausch.) x (*T. aestivum* L. v ChS- *T. durum* Desf. v. Mirable) (2)

Korzystając z analizy danych morfologicznych, molekularnych i grupując przy pomocy analizy skupień mieszańce pod względem ogólnego wszechstronnego podobieństwa w dalszych badaniach skupiono się na **30 mieszańcach** uzyskanych z krzyżówek z gatunkami

T. durum Desf.

T. timopheevii Zhukov.

L. perenne L.

Ae. speltoides Taush.

Kolekcja obejmowała następujące kombinacje krzyżowań z gatunkami obcymi **Poaceae**

T. aestivum L. v. ChS x *T. durum* Desf. v. Mirable, Khapli,
Fuensemiduro x *T. aestivum* L v. CHD661, M. Marks, 22 linie

T. aestivum L. v. 5B Favorit x *L. perenne* L. v. Anna, 1 linia

(*T. aestivum* L. v. 5B Jara x *L. perenne* L. v. 9.1.1.) *T. aestivum*
L. v. AND166, 2 linie

(*T. aestivum* L.v. ChS - *T. durum* Desf. v. Mirable) x *T. aestivum*
L. v. M. Marks, 2 linie

(*T. aestivum* L. v. ChS – *T. timopheevii* Zhukov.) x *T. aestivum*
L. v. Jara, 1 linia

(*T. aestivum* L. v. ChS – *Ae. speltoides* Taush.) x (*T. aestivum*
L. v. ChS x *T. durum* Desf. v. Mirable), 2 linie

**Opracowano końcową charakterystykę
wytypowanych **30 linii** na podstawie
cech polowych/laboratoryjnych z 3 lat
(**2011, 2012, 2013**) jako sugestie dla
programów hodowlanych pszenicy i
pszenżyta oraz dokonano oceny
wybranych linii z wykorzystaniem metod
biologii molekularnej.**

Zakres cech ulepszonych 30 linii w latach 2011-2013

Zakres cech ulepszonych 30 linii w latach 2011-2013								
Nr	Cecha	2011		2012		2013		Jednostka
		Zakres	Liczba	Zakres	Liczba	Zakres ulepszeń	Liczba	
1	Długość kłosa	12,2 - 17,8	30	12,0 - 19,2	29	12,0 - 16,2	30	cm
2	Liczba kłosek w kłosie	22,1 - 28,8	30	22,0 - 31,2	27	22,0 - 27,2	25	
3	liczba ziarn z kłosa	55,0 - 98,2	28	55,0 - 83,0	27	55,9 - 80,7	26	
4	Masa ziarna z kłosa	2,5 - 3,4	24	2,5 - 4,0	26	2,5 - 3,4	11	g
5	MTZ	45,2 - 53,4	13	45,1 - 57,1	19	45,0 - 57,1	5	g
6	Liczba ziarn w kłosku	2,5 - 3,6	19	2,5 - 3,8	24	2,5 - 3,1	24	
7	Zwartość kłosa	19,0 - 22,4	3	19,0 - 23,7	10	19,0 - 24,2	7	%
8	Kłoszenie	33 - 27	16	33 - 15	30	33 - 23	3	l. dni od 1. V.
9	Wysokość roślin	111,0 - 115	1	85 - 115	29	105 - 117	4	
10	Zawartość białka	kl. E : 13,6 >	29	kl. E : 14,2 - 18,4	30	kl. E : 14,2 - 18,4	30	%
		kl. A: 12,6-13,6	1	kl. A: 13,2-13,7	0	kl. A: 13,2-13,7	0	%
11	Wskaźnik sedymentacji	kl. E : 76,2 >	6	kl. E : 74,2 - 90	3	kl. E : 74,2 - 90	3	cm ³
		kl. A: 60,2-76,1	4	kl. A: 58,2-74,1	2	kl. A: 58,2-74,1	2	cm ³
12	Liczba opadania	kl. E : 280 >	24	kl. E : 280 - 483	24	kl. E : 280 - 483	24	sek
		kl. A: 240-279	3	kl. A: 240-279	2			
13	Porastanie	34,6 - 0	23	14,7 - 0	10	10,0 - 0	25	% porastania
14	Zawartość glutenu					29,9	30	%

Charakterystyka linii

Cechy	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Linie wartości od... do...	12,1	19,9	45,8	2,2	26,4	1,8	13,7	12,6	103,3	14,5	20,3	143,3	0,0	31,3
	20,3	30,6	80,6	3,6	53,8	3,5	23,4	37,7	137,6	18,1	88,3	497,7	64,4	42,0
Ulepszone Linie	30	25	26	11	5	24	7	3	4	30 E	3 E	24 E	25	30
										2 A				
Wzorzec Tonacja	10,6	20,1	49,1	2,2	44,9	2,4	19,0	30,0	98,3	13,5	78,6	322,6	19,7	29,9
Wzorzec Begra	10,3	22,5	60,4	2,7	46,2	2,6	21,9	29,0	100,3	13,3	86,0	383,0	19,8	31,8
Wzorzec Korweta	11,1	21,4	60,4	2,7	46,2	2,8	19,4	31,0	100,0	13,8	84,3	449,3	13,2	33,1

Linie z ulepszonymi cechami

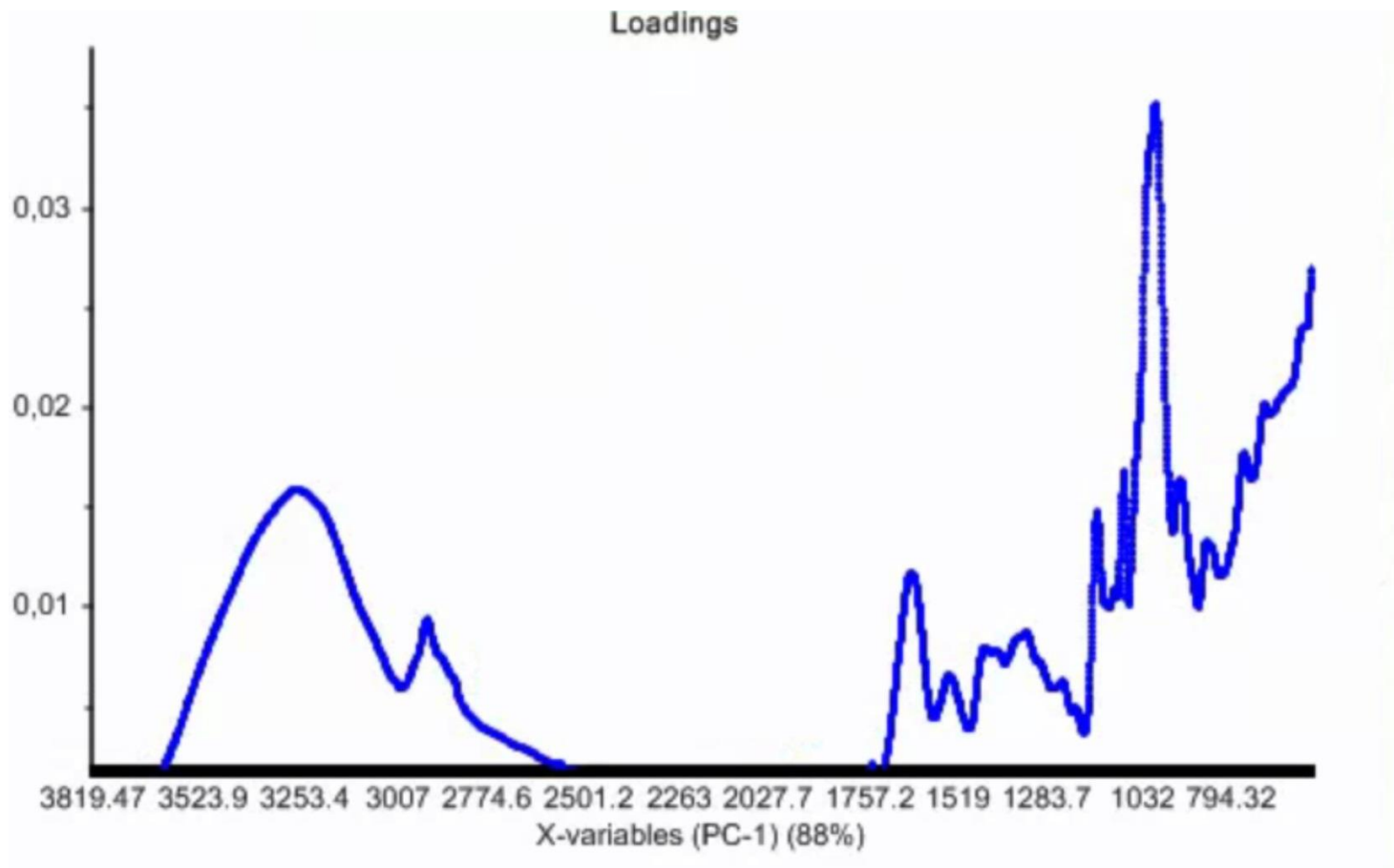
Połączenia cech	7	8	9	10	11
Liczba linii	1	6	10	11	2

Przeprowadzono analizę metabolomiczną ziarniaków za pomocą spektroskopii FTIR w zakresie środkowej podczerwieni z wykorzystaniem transformacji fourierowskiej

Metoda ta dostarcza informacje o obecności grup funkcyjnych w badanym materiale, na podstawie analizy spektralnej absorpcji/transmisji promieniowania elektromagnetycznego w zakresie liczb falowych 4000 - 400 [1/cm]

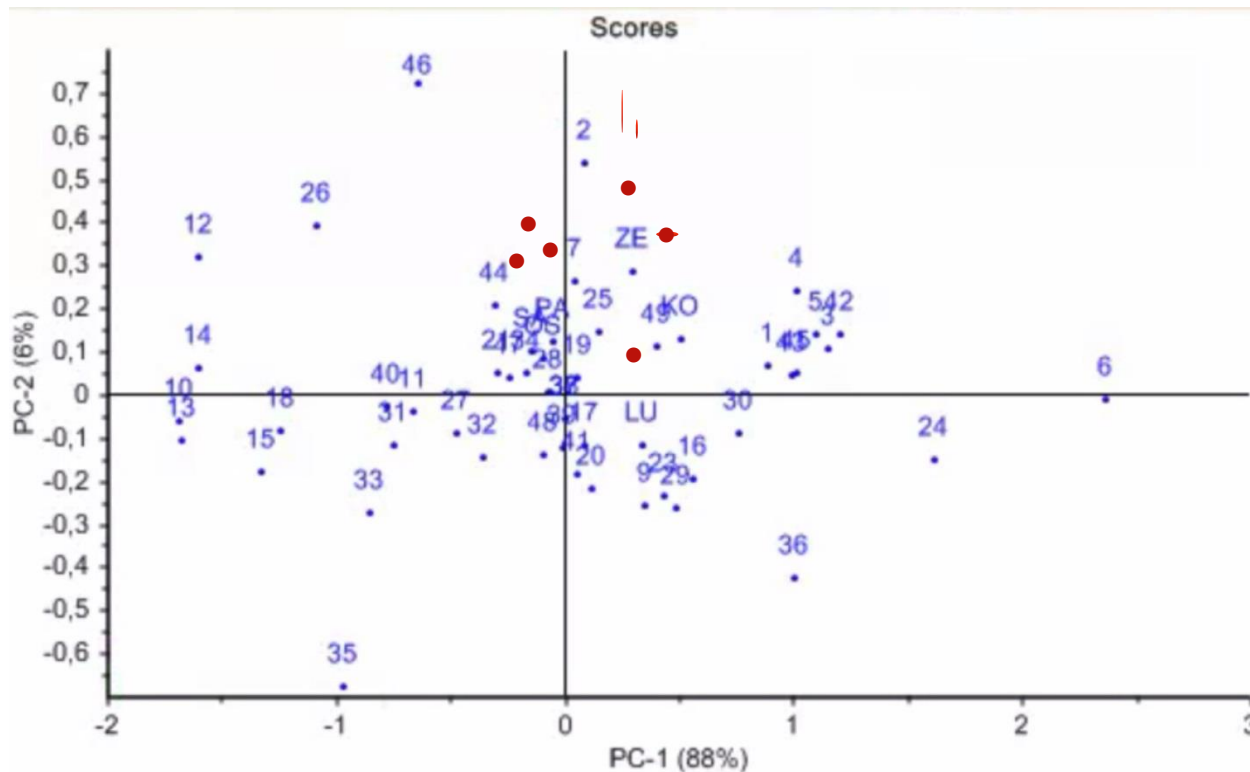
Pozwalała tym samym na określenie charakterystyki metabolomicznej testowanego materiału pod względem zawartości różnych grup związków chemicznych (m. in. polisacharydów, tłuszczów, białek a także na charakterystykę związków w obrębie węglowodanów, tłuszczów i białek)

Typowe spektrum **FTIR** w pełnym zakresie środkowej podczerwieni uzyskane dla ziarniaków badanych krzyżówek i odmian



Uzyskane pomiary spektroskopowe analizowano wykorzystując
Analizę Głównych Składowych (PCA) oraz analizę skupień

Ogólny zakres zmienności metabolomicznej ziarniaków uzyskany drogą krzyżówek międzygatunkowych znacznie przekraczał obserwowany u aktualnych odmian pszenicy (**czerwone punkty**).

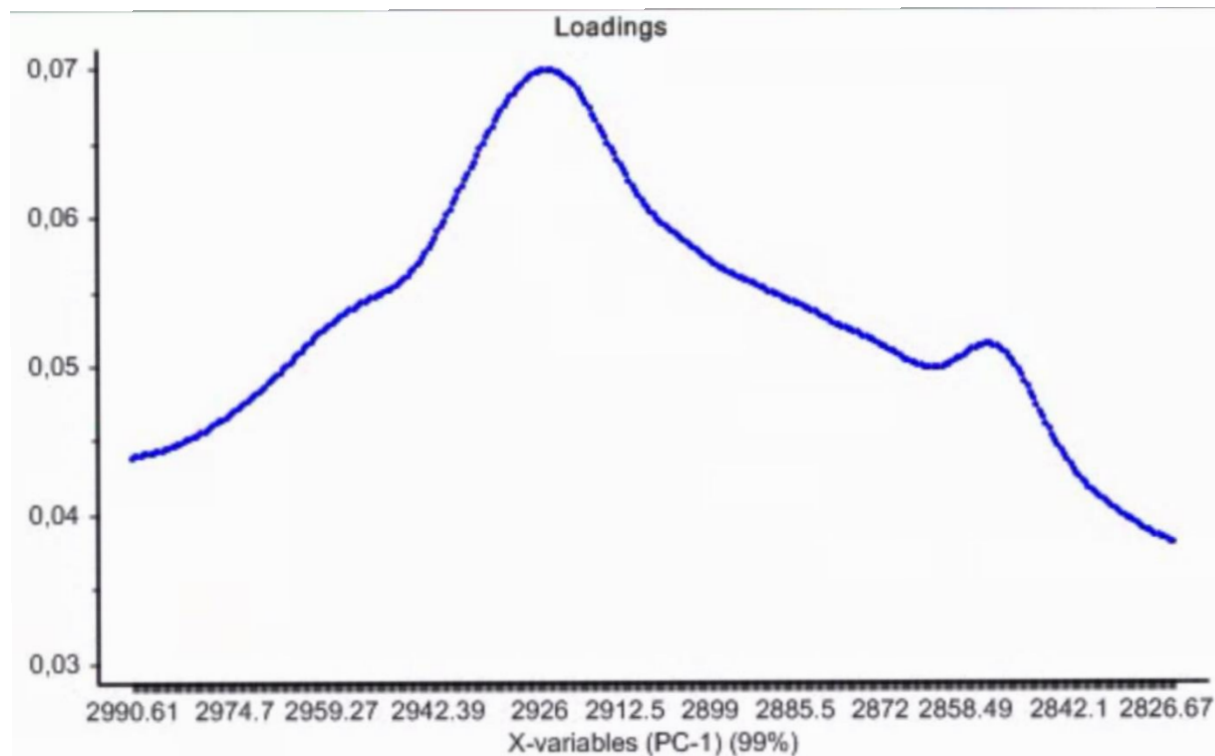


Źródłem stosunkowo największej zmienności metabolicznej ziarniaków były krzyżówki: 6, 10, 12, 13, 14, 14. 35, 46

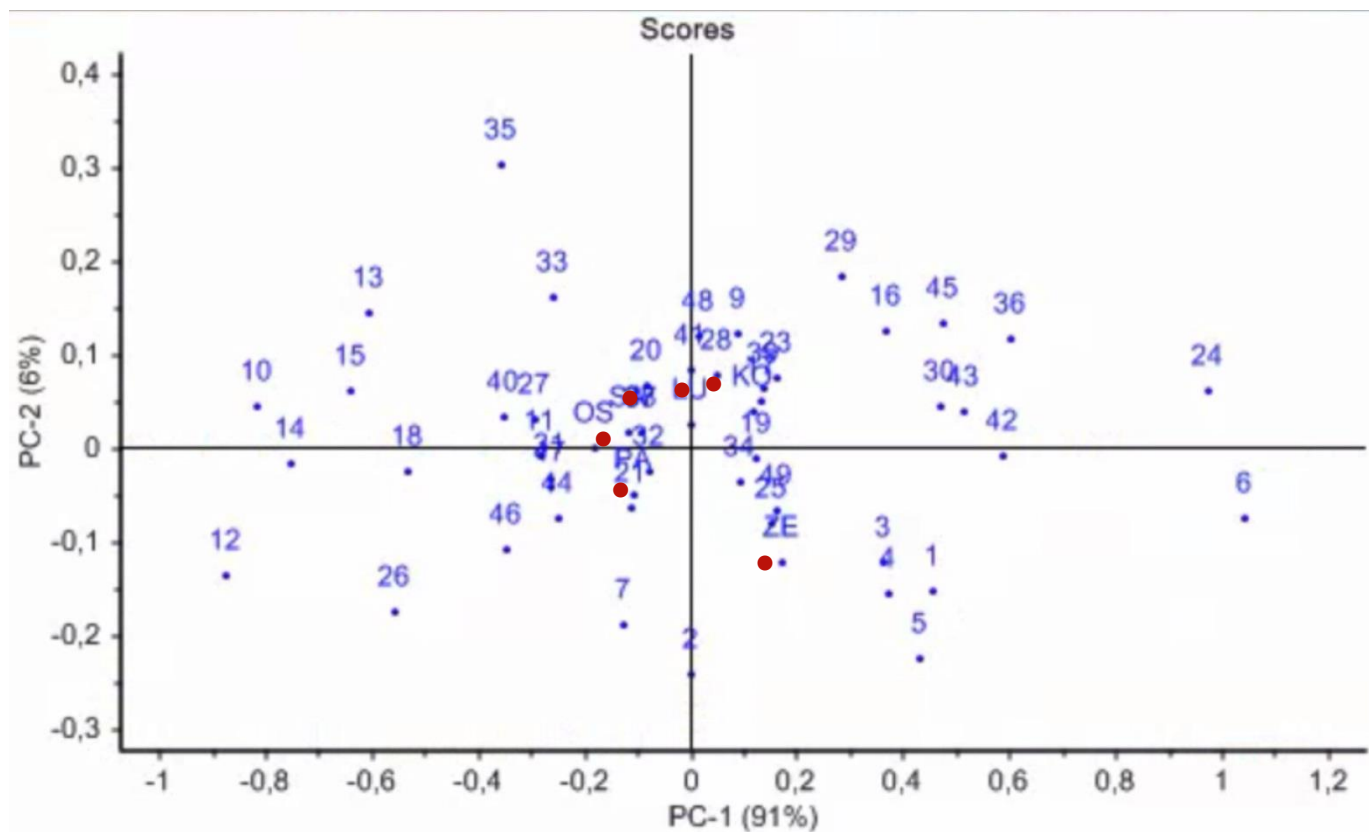
**Szczegółową analizę spektralną
przeprowadzono w zakresach
charakterystycznych dla**

- związków tłuszczowych**
- białek**
- węglowodanów**

Związki tłuszczowe

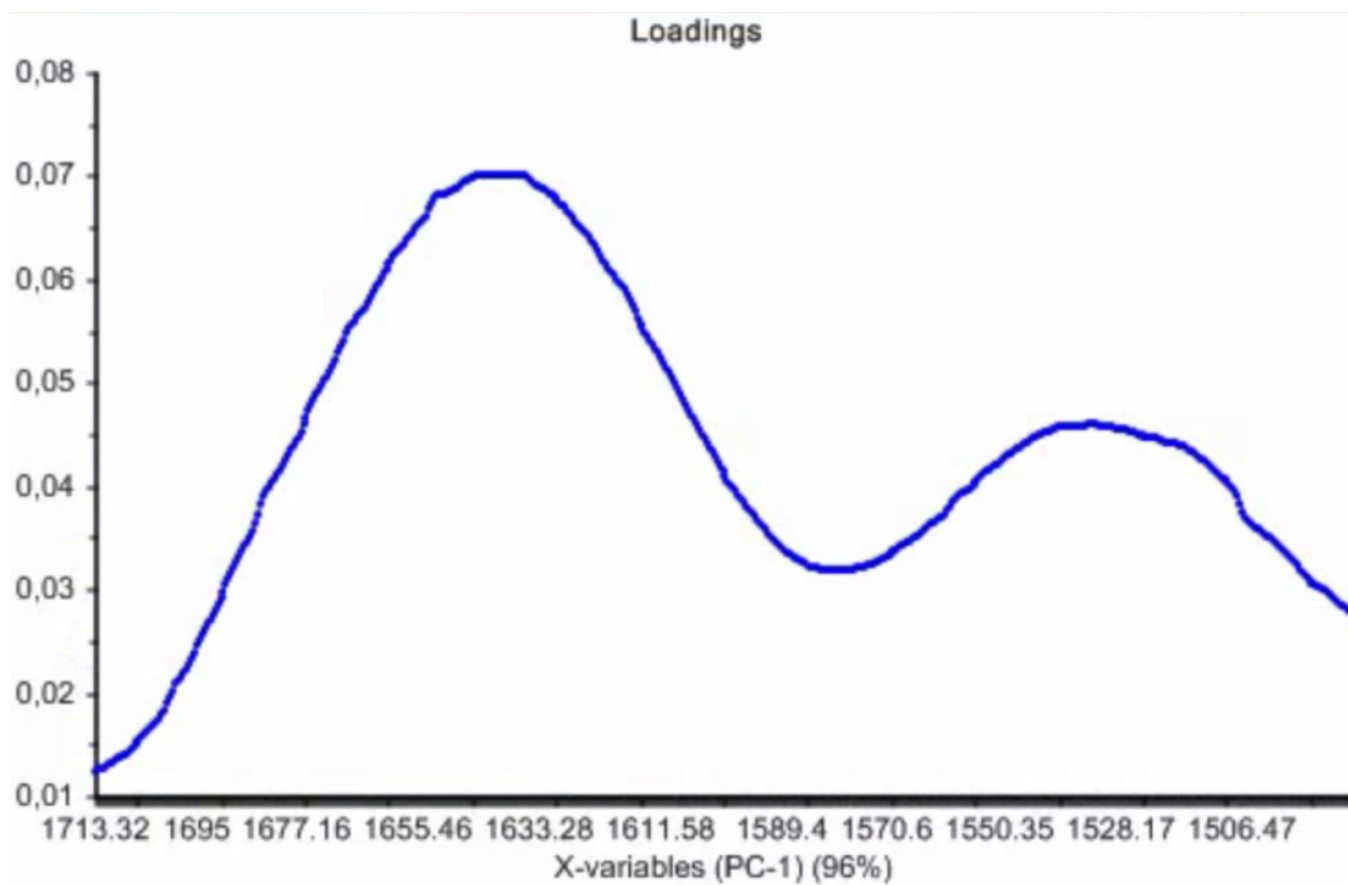


Ziarniaki z uzyskanych krzyżówek cechowała znacznie większa zmienność w zakresie jakości i względnej ilości związków tłuszczowych niż obserwowana u aktualnych odmian pszenicy (**czerwone punkty**).

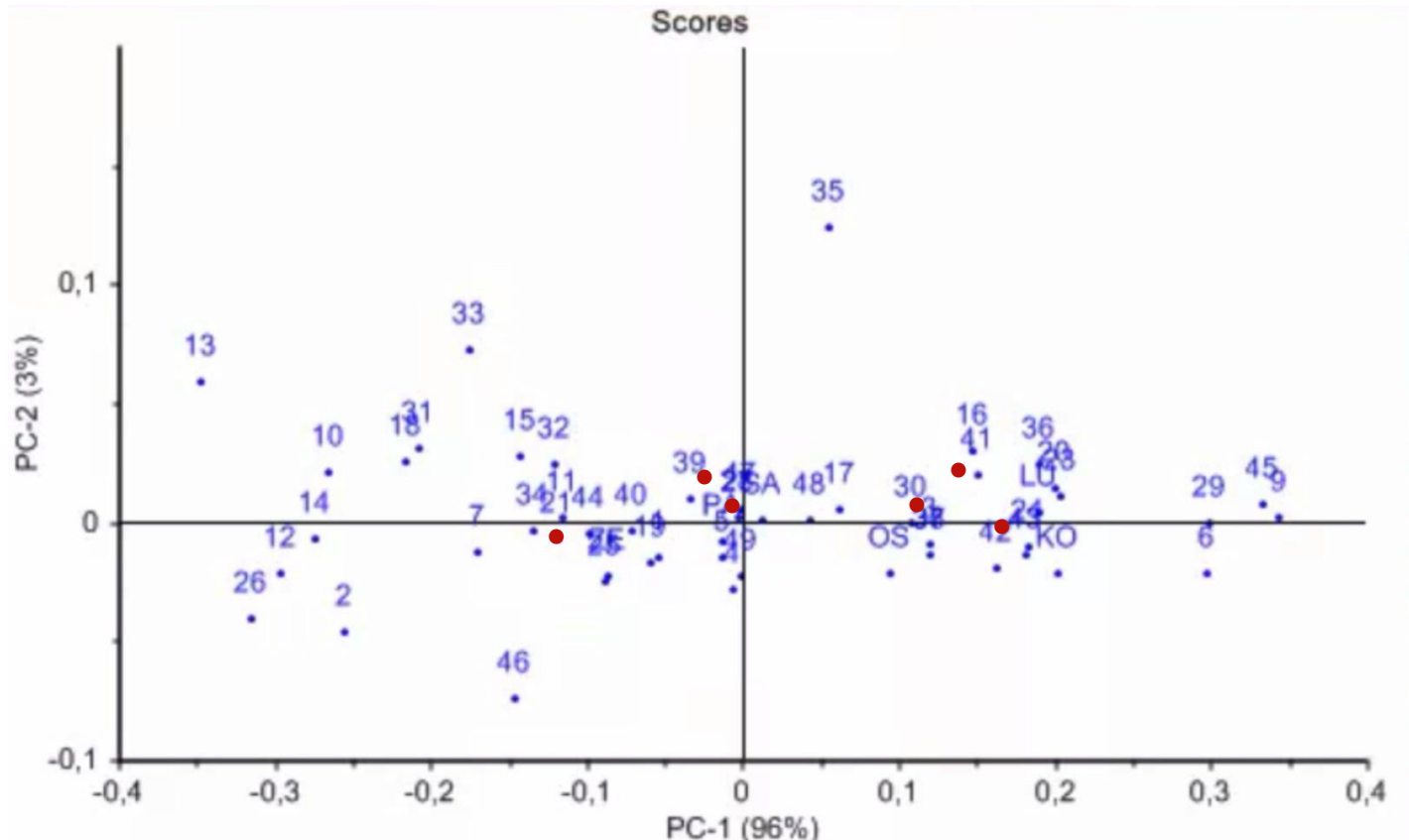


Źródłem stosunkowo największej zmienności metabolicznej (w zakresie jakości i względnej ilości związków tłuszczowych w ziarniakach) były krzyżówki: **6, 10, 12, 14, 24, 35**

Białka

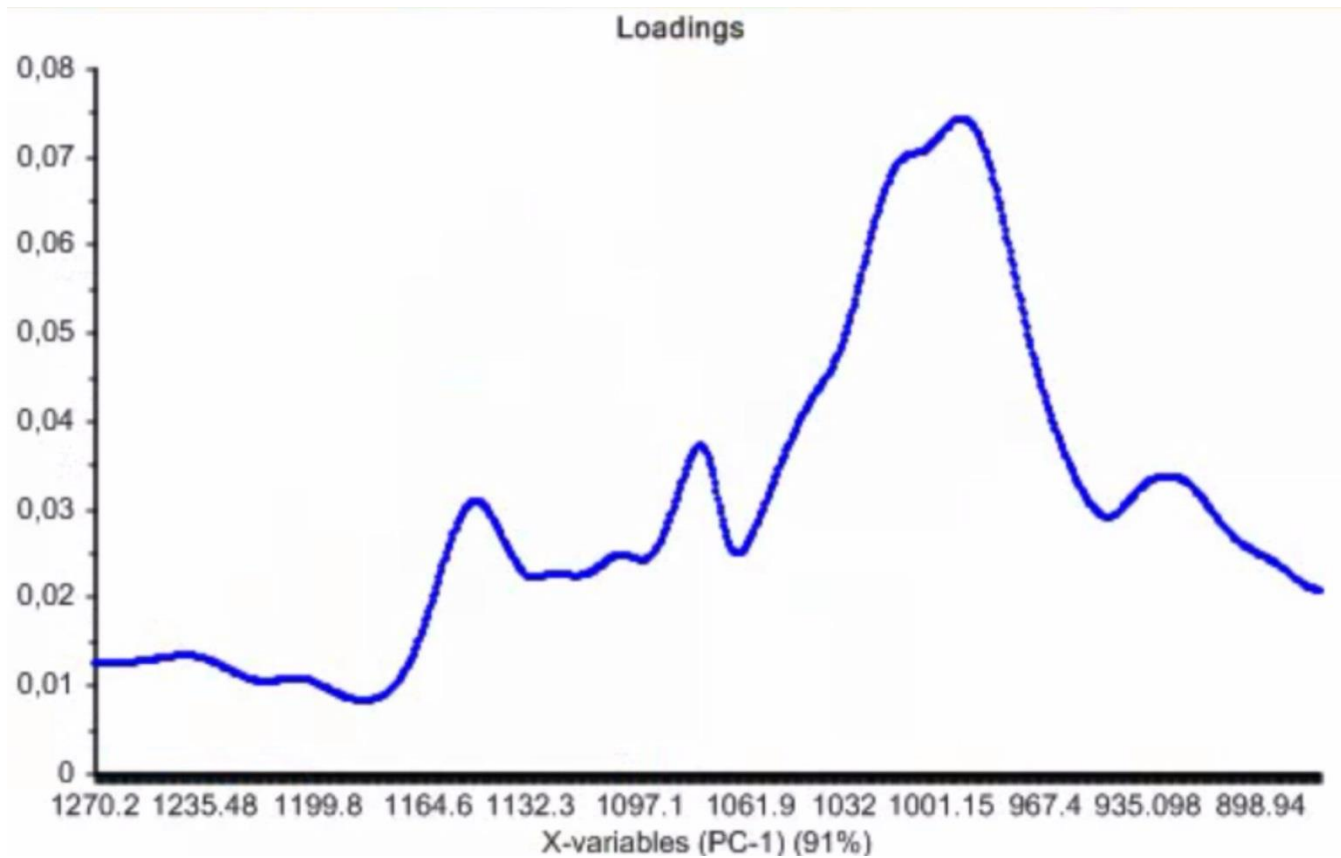


Ziarniaki z uzyskanych krzyżówek cechowała znacznie większa zmienność w zakresie jakości i względnej ilości związków białkowych niż obserwowana u aktualnych odmian (**czerwone punkty**).

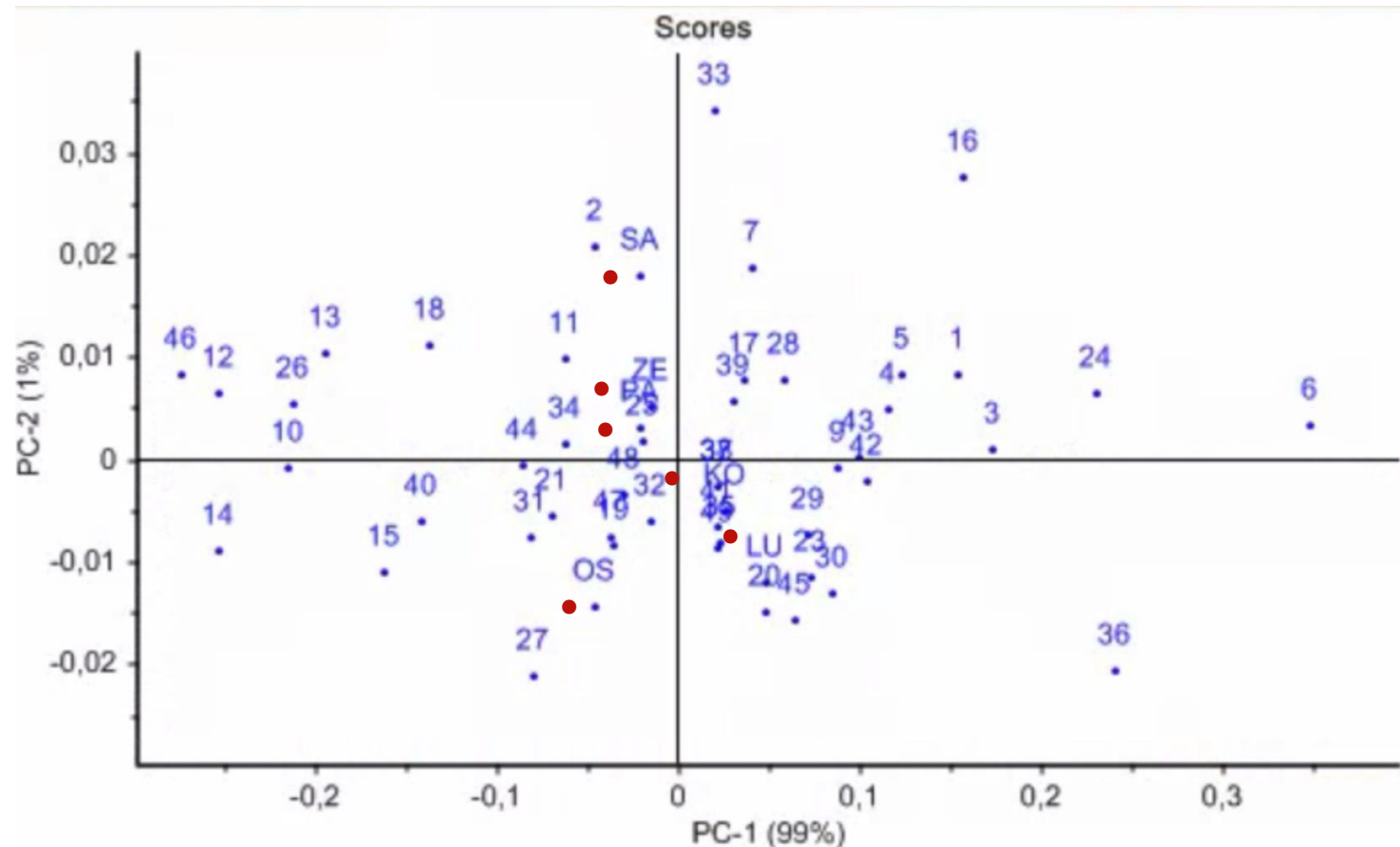


Źródłem stosunkowo największej zmienności metabolicznej ziarniaków były krzyżówki: **6, 12, 35, 46**

Węglowodany



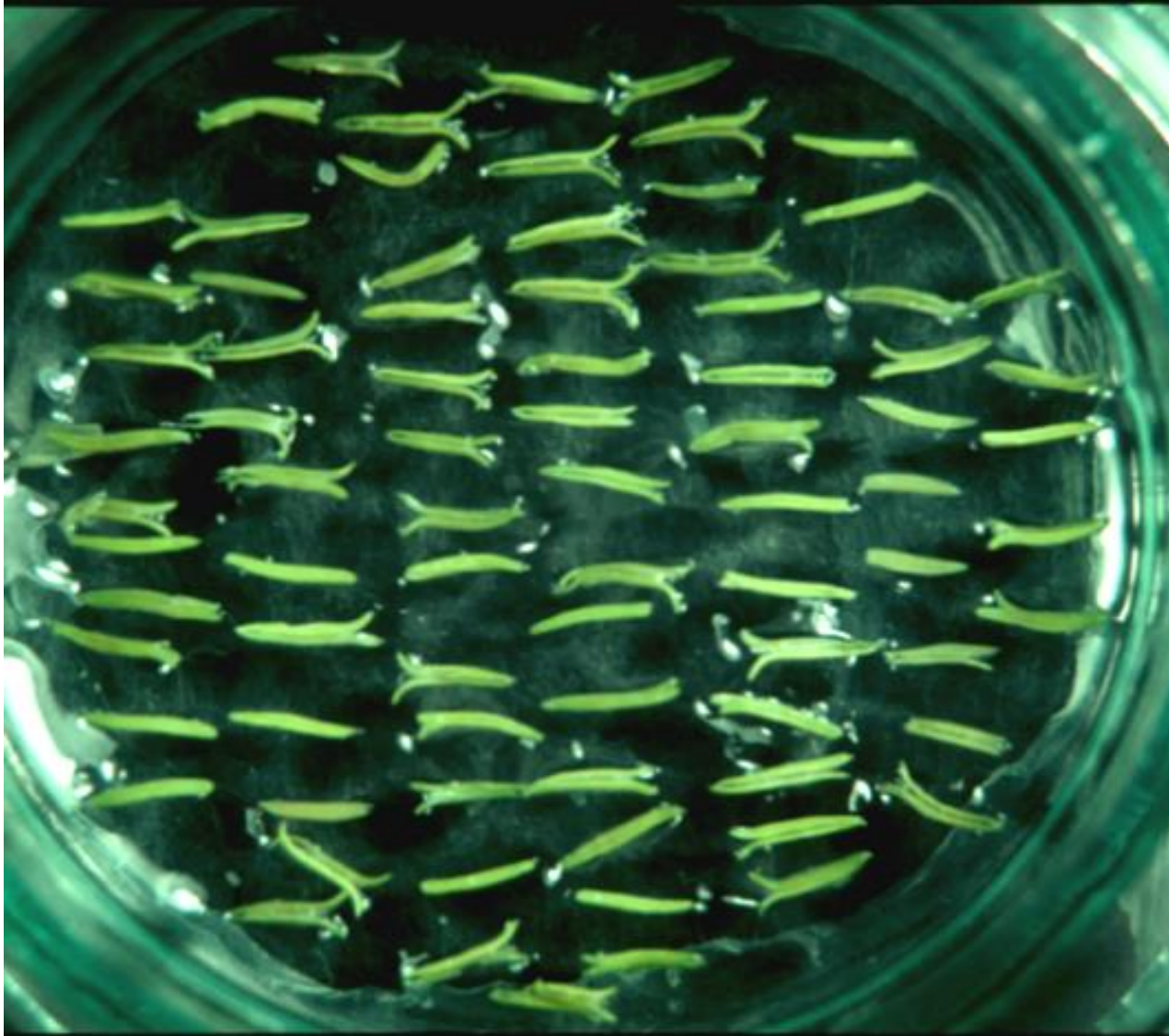
Ziarniaki z uzyskanych krzyżówek cechowała znacznie większa zmienność w zakresie jakości i względnej ilości węglowodanów niż obserwowana u aktualnych odmian (**czerwone punkty**).



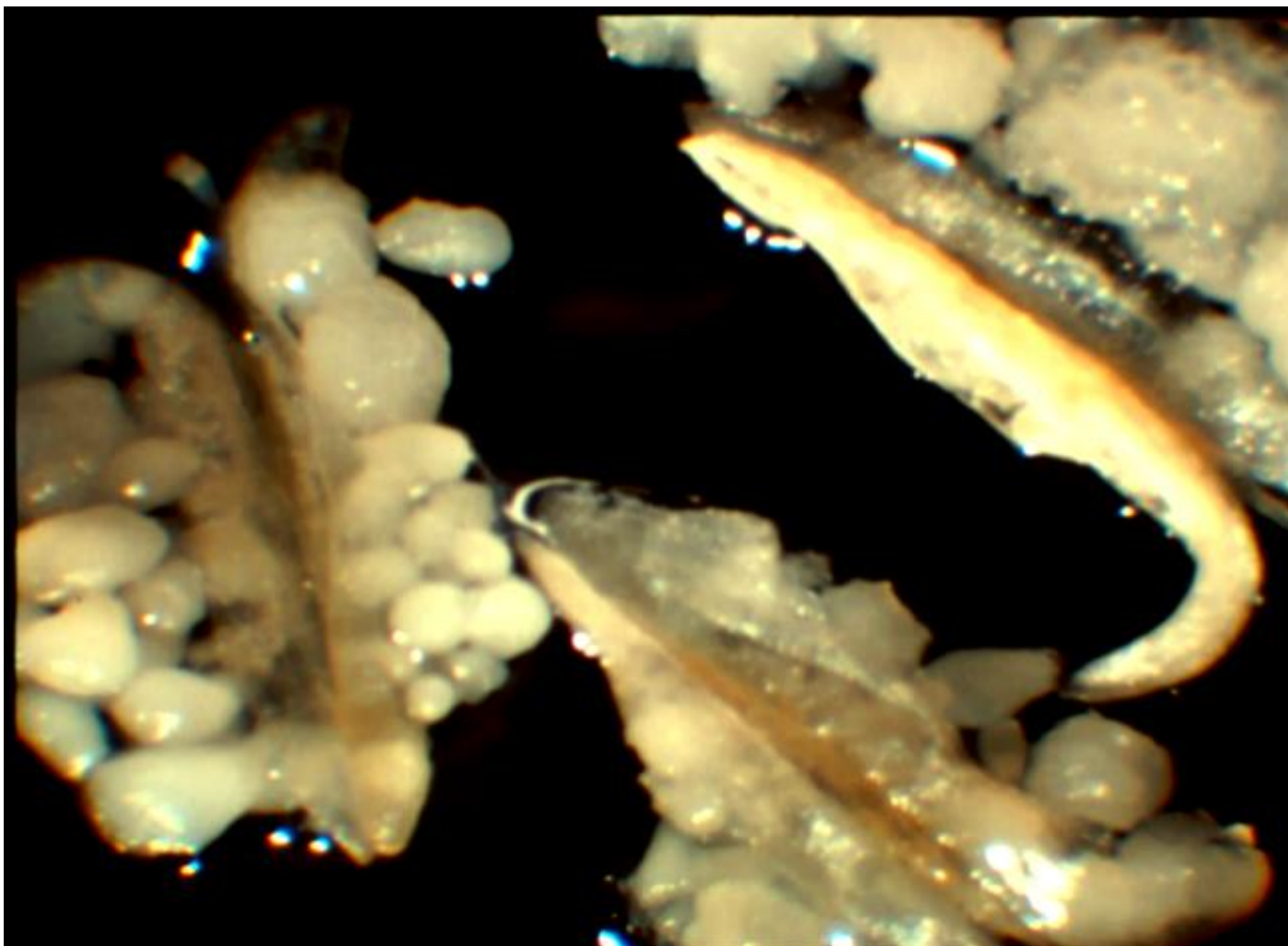
Źródłem stosunkowo największej zmienności metabolicznej ziarniaków były krzyżówki: **6, 12, 14, 24, 36, 46**

W trakcie każdego etapu typowano linie mieszańcowe do otrzymania linii **DH w celu wyrównania linii. Ogółem wyłożono **130 tysięcy pylników** i otrzymano **3982 kalusy**, z których zregenerowano **543 rośliny zielone****

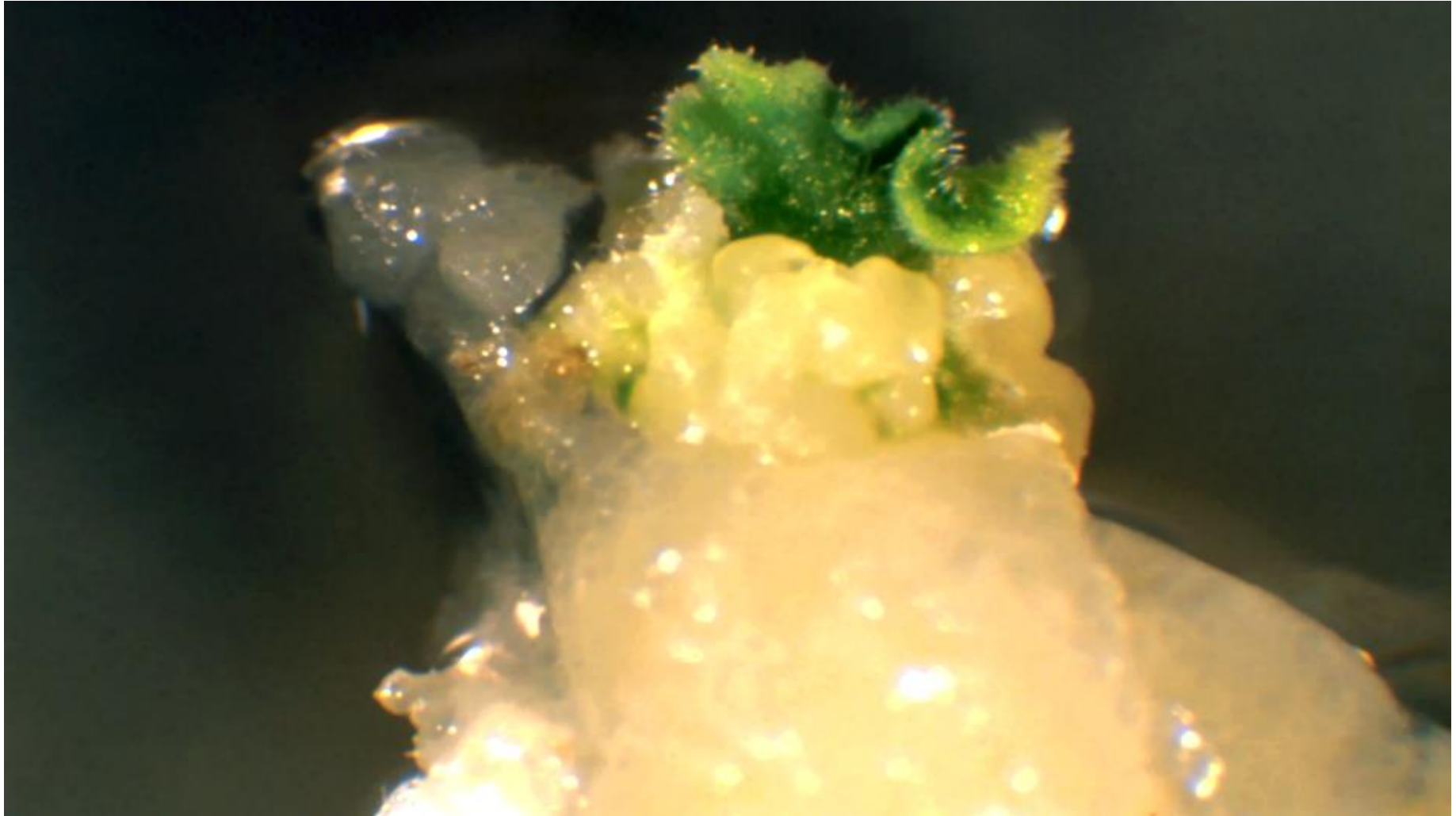
Pylniki na pożywce indukcyjnej C17



Kalusy na pożywce indukcyjnej po 6 tygodniach inkubacji



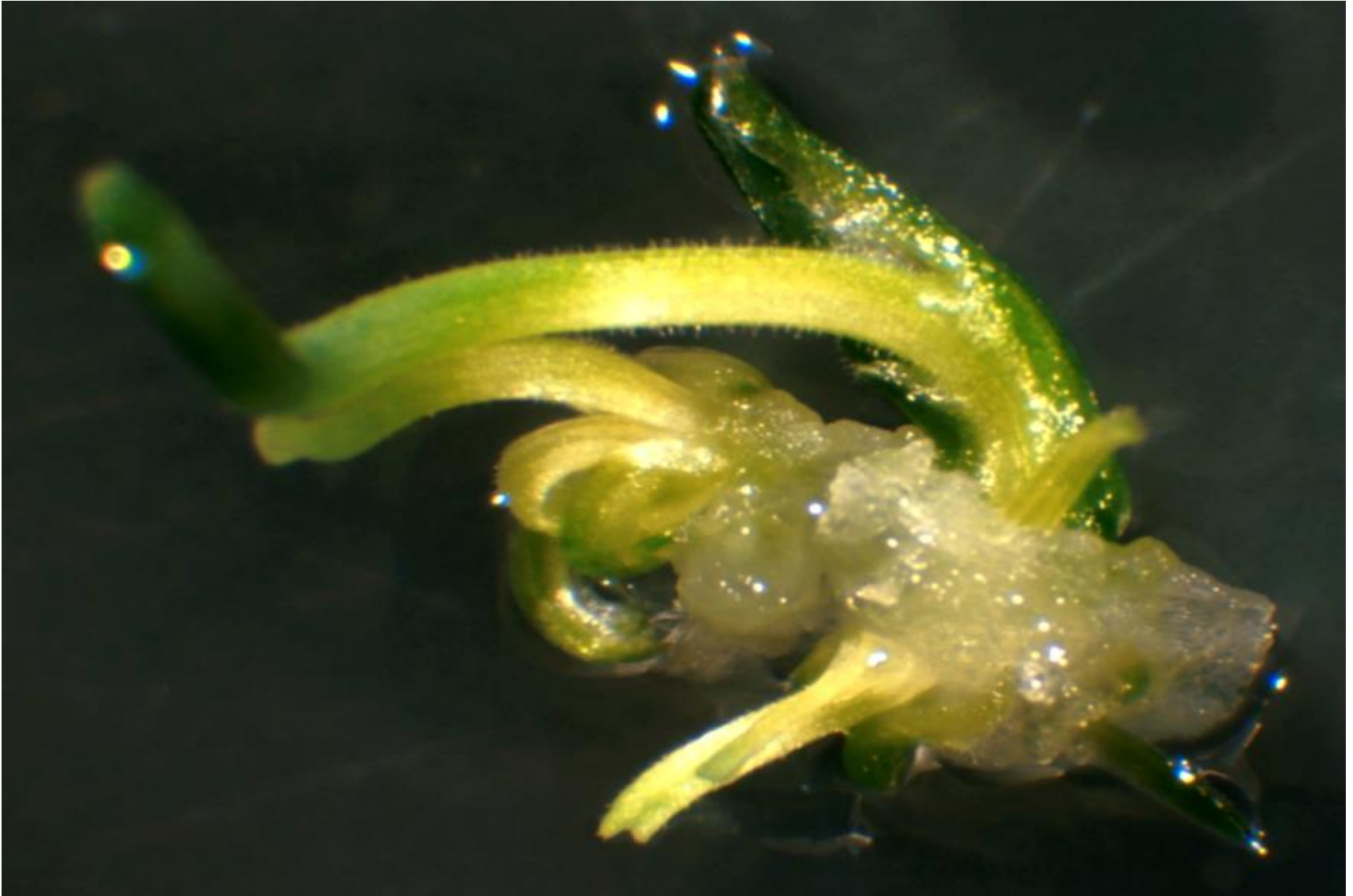
Struktury „lisciopodobne” na pożywce R1



Struktury „lisciopodobne” na pożywce R1



Młody regenerant na pożywce R4

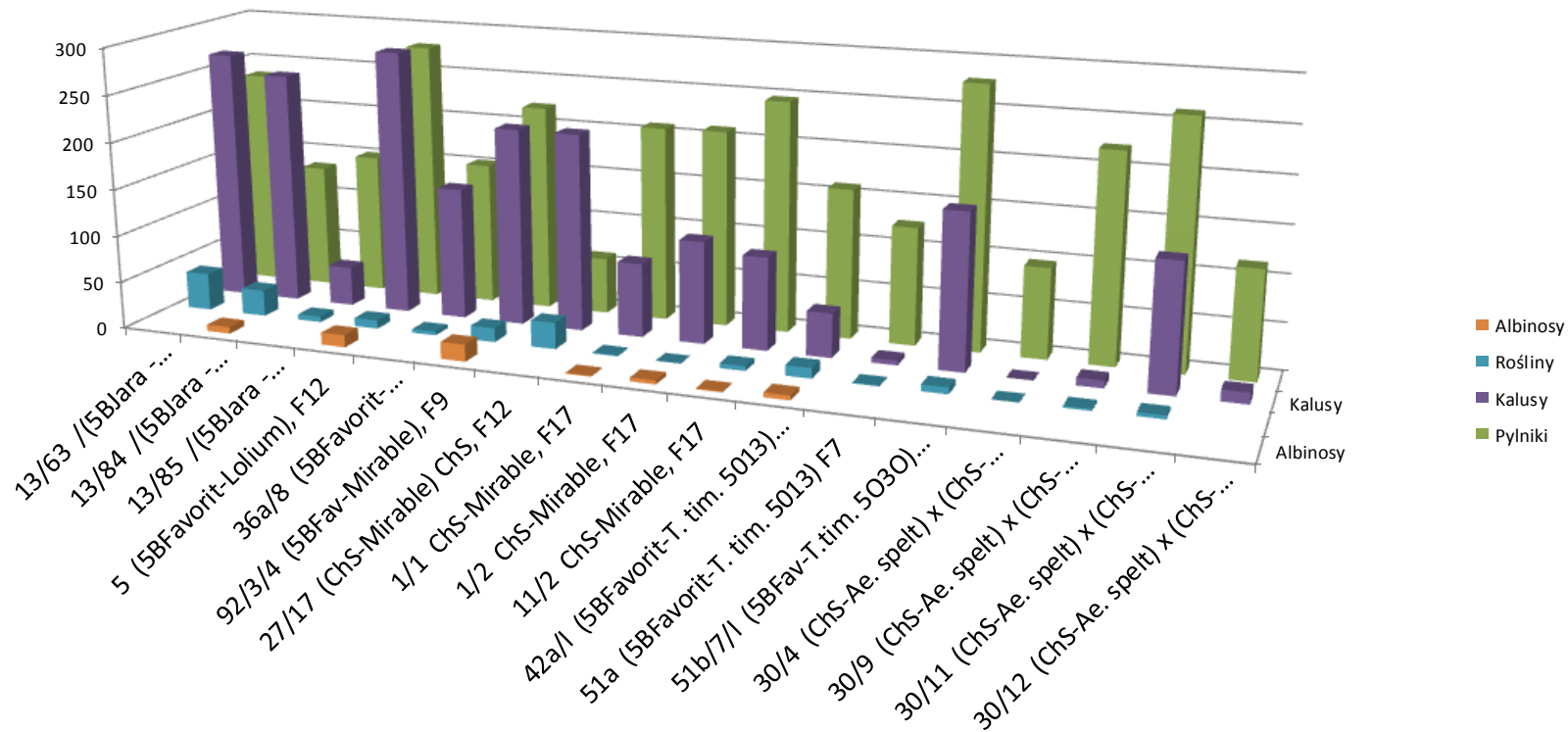


Młode rośliny na pożywce R4 i w ziemi

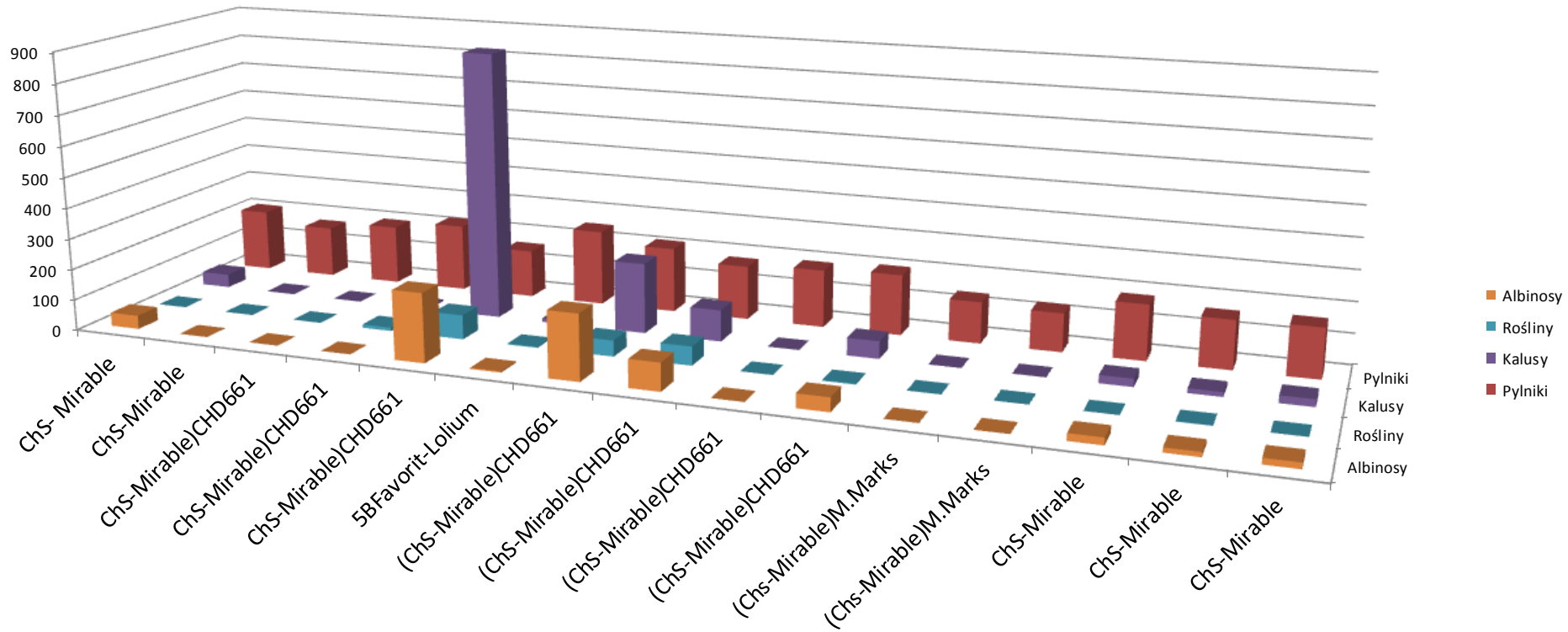


Androgeneza 2009 - 2012

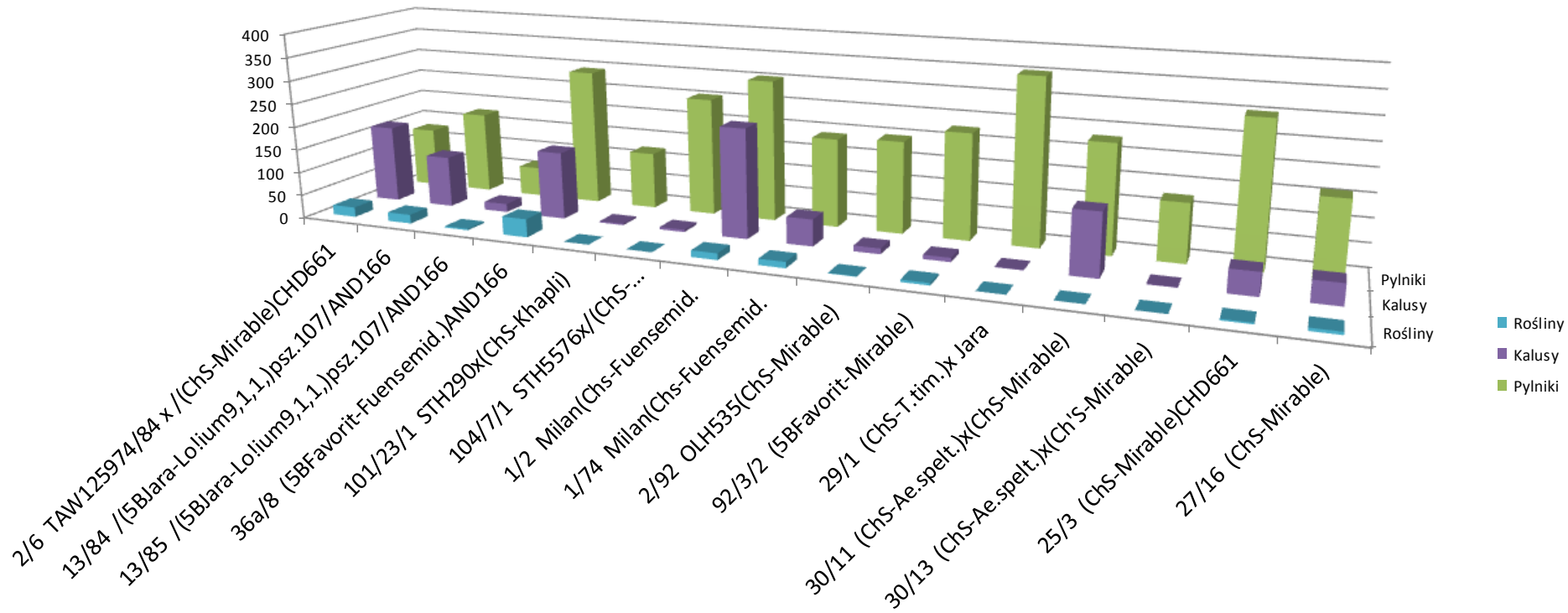
Androgeneza 2009



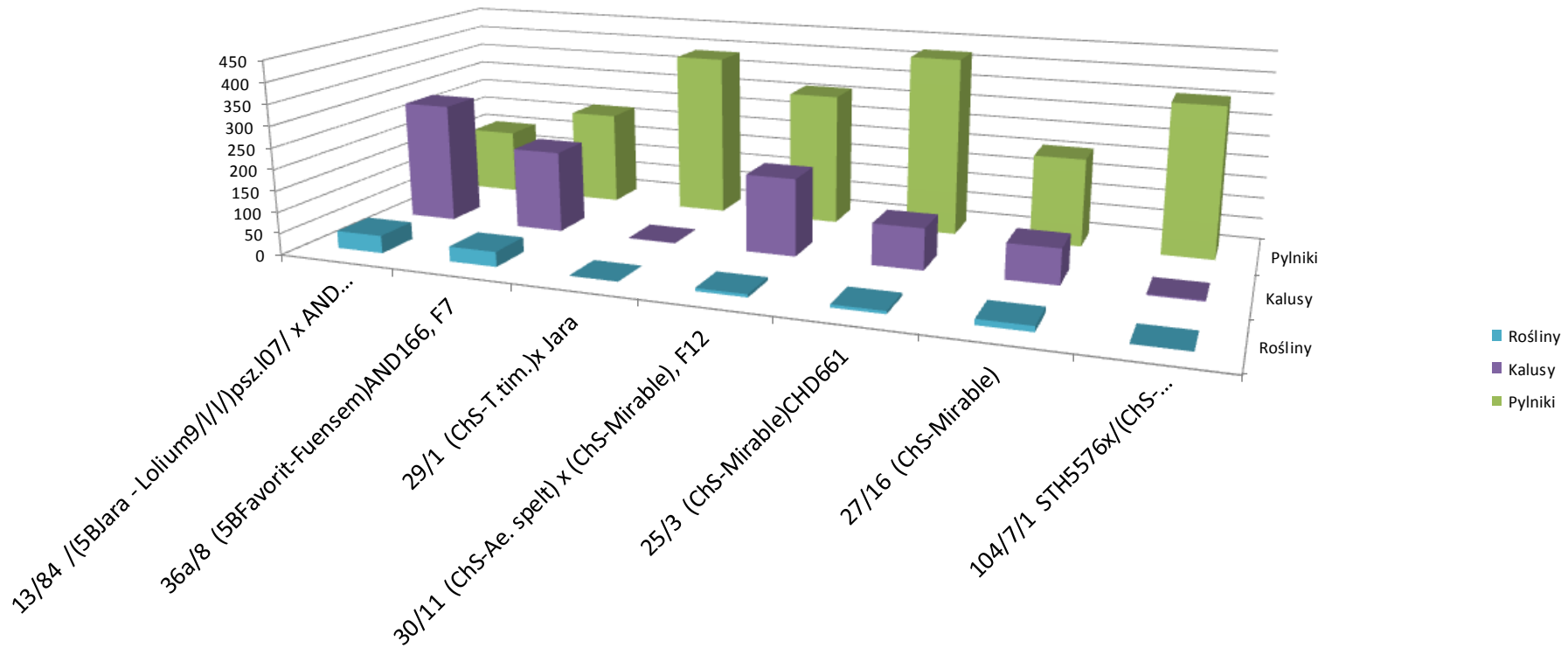
Androgeneza 2010



Androgeneza 2011



Androgeneza 2012



Międzygatunkowe i międzyrodzajowe
krzyżowania pszenicy *T. aestivum* L.
wykonane z ponad 20 gatunkami
spokrewnionymi taksonomicznie w
rodzinie *Poaceae* wykazały
przydatność materiału genetycznego
niektórych tylko gatunków do
uzyskania ulepszeń dla wybranych
cech u pszenicy

W końcowym etapie badań najbardziej efektywnymi okazały się tylko 4 gatunki:

T. durum Desf.

T. timopheevii Zhukov.

L. perenne L.

Ae. speltoides Taush.

Jak wynika z 3-letnich badań największą efektywność przedstawiała pszenica tetraploidalna twarda *T. durum* Desf.

Mniejszą rolę odegrały pozostałe gatunki.

Prace potwierdziły iż **krzyżowania**
generatywne z gatunkami
odległymi taksonomicznie w
obrębie rodziny *Poaceae*
prowadzą do wytworzenia linii
hodowlanych o ulepszonych
cechach

3-letnia (2011-2013) analiza cech **uzyskanych**
mieszkańców wykazała, iż wśród uzyskanych linii
wystąpiły takie, które mają wartości cech znacznie
przewyższające wzorce hodowlane.

Aktualnym wzorcem jakości w hodowli nowych odmian
jest odmiana **Tonacja** i na jej tle uwydatniają się uzyskane
ulepszenia:

poszczególnych cech,
połączeń cech kłosa ze wskaźnikami technologicznymi ziarna
w kombinacjach innych cech.

Na podstawie 3-letnich wyników
określono współzależności cech
współczynnikiem korelacji
Pearsona przy różnych poziomach
istotności w przedziale **0,00-0,05**.
W uzyskanych liniach wystąpiły
niektóre znane u pszenicy ozimej
T. aestivum L korelacje cech

Korelacje Pearsona dla badanych cech (na podstawie 3-letnich badań)

(- ujemna, + dodatnia, P = 0,00 - 0,05)

Cecha	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
1. długość kłosa (cm)		+	+	+	-		-	+	+		-	+	
2. liczba kłosków w kłosie	+		+		-	-	+	+	+		-	+	+
3. liczba ziarn z kłosa	+	+		+	-	+	-	+		-	-		
4. masa ziarna z kłosa (g)	+		+		+	+	-		+	-	-	-	
5. MTZ (g)	-	-	-	+		-		-	+	-	-	-	
6. liczba ziarn w kłosku		-	+	+	-		-						
7. zwartość kłosa	-	+	-	-		-		-	-	+			+
8. kłoszenie (liczba dni od 1.V.)	+	+	+		-		-		+	-	-	+	
9. wysokość roślin (cm)	+	+		+	+		-			-	-	+	
10. zawartość białka ogółem (%)			-	-	-		+	-	-		+	+	
11. wskaźnik sedymentacji (cm ³)	-	-	-	-	-			-	-	+		+	
12. liczba opadania (s)	+	+		-	-			+	+	+	+		-
13. porastanie (% porastania w kłosach)		+					+					-	

Wykazano, że niektóre korelacje są jednak inne, jak: **zawartość białka i wskaźnik sedymentacji, zwartość kłosa i zawartość białka w ziarnie.**

Najwięcej korelacji wystąpiło z liczbą **kłosków w kłosie** (10 korelacji) albowiem cecha ta decyduje o liczbie ziarn w kłosie i z cechą **MTZ** (10 korelacji), która związana jest z wielkością i wypełnieniem ziarna.

Wystąpiła wysoka dodatnia korelacja cechy przedźniwnego porostania kłosów z cechami morfologicznymi budowy anatomicznej (liczba kłosków w kłosie i zwartość kłosa).

Jest to ważna informacja dla atestacji materiałów pszenicy. Wskazuje to, iż w ocenie odmian winna być uwzględniona budowa anatomiczna kłosa czego nie wykonuje się w ocenie odporności odmian i materiałów hodowlanych.

Opracowano propozycje dla programów hodowlanych dotyczących pszenicy a także pszenżyta wynikające z 3-letniej charakterystyki uzyskanych 30 linii.

Uzyskano 30 linii wykazujących połączenia 7-11 ulepszonych cech w 15 różnych kombinacjach, co daje możliwość wyboru linii o zróżnicowanej kombinacji cech.

Uzyskano na bazie krzyżowań międzygatunkowych / międzyrodzajowych 30 linii, które utrzymują ulepszone wartości 13 cech w 3 latach (2011, 2012 i 2013), z których niektóre łączą cechy morfologiczne kłosa z cechami technologii ziarna.

Badania przeprowadzone metodami taksonomii numerycznej potwierdziły obserwacje fenotypowe. Wskazuje to na przydatność tych metod w selekcji materiałów dla hodowli roślin.

Przedstawione wyniki opublikowano w formie 17-tu referatów i publikacji

ważniejsze poniżej

- Czaplicki A. Z., Pilch J., Zimny J. 2012. Androgenesis of the introgressive-improved lines obtained after interspecific and intergeneric hybridization of wheat *Triticum aestivum* L. with the related species from *Poaceae* family. Book of Abstracts of International Conference - Biotechnology and Plant Breeding – Perspectives towards Food Security and Sustainability: 133-134. Radzików, Poland.
- Czaplicki A. Z., Pilch J., Żebrowski J., Zimny J. 2013. Metabolome grain analysis of wheat *Triticum aestivum* L. hybrid obtained by interspecific and intergeneric hybridization with *Poaceae* family species.” Konferencja „Plant Biotechnology: Green for Good II – Olomouc Biotech 2013”, Ołomuniec (Republika Czeska), 16-21 czerwca. Abstracts: 59 p.
- Oleszczuk S., Zimny J., Czaplicki A. Z., Makowska K., Godzina-Sawczuk M., Kozdój J., Sowa S. 2013. Androgenesis as a Tool for Cereal Crop Improvement. In: Biotechnology and Plant Breeding Perspectives. Eds: R. K. Behl and Edward Arseniuk, Agrobios (International) Publishers, Jodhpur, India, pp 221-237, ISBN No. 978-93-81191-01-9.
- Pilch J., 1996. Performance of interspecific and intergeneric hybrids of *Triticum aestivum* L. for wheat improvements. Part II. Breeding value of spring-type generations $F_6 - F_{10}$ of *T. aestivum* L. with *Triticum* (2x, 4x), *Aegilops* (2x, 4x), *Secale* (2x) and *Hordeum* (2x) species in respect of some characters of spike. Plant Breeding and Seed Science, Vol. 41, No.1: 3-15.
- Pilch J. 2005. Możliwości wykorzystania krzyżowania introgresywnego w hodowli pszenicy ozimej *Triticum aestivum* L. Część I. Zastosowanie systemów genetycznych pszenicy *T. aestivum* L. do otrzymania mieszańców pomostowych F_1 . Biul. IHAR, 235: 31-41.
- Pilch J. 2011a. Introgresje genów z gatunków spokrewnionych taksonomicznie w ulepszeniach pszenicy *Triticum aestivum* L. i innych roślin uprawnych. Biul. IHAR, 260/261: 21-42.
- Pilch J. 2011b. Wykorzystanie genów z gatunków diploidalnych, tetraploidalnych i heksaploidalnych pszenicy *Triticum* L. w odmianach pszenicy heksaploidalnej *Triticum aestivum* L. Biul. IHAR 262, 2: 3-24.