

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016. roku

1. Tytuł zadania: **Opracowanie i wykorzystanie metod biotechnologicznych skracających cykl hodowlany i zwiększających efektywność selekcji genotypów ozimej pszenicy i ozimego pszenżyta o podwyższonej odporności i tolerancji na septoriozę liści i plew [(czynniki sprawczy: *Parastagonospora nodorum* (Berk.) E. Castell. & Germano)]**.
2. Kierownik zadania: Prof. dr hab. Edward Arseniuk, Dyrektor IHAR-PIB
Zakład Fitopatologii, IHAR-PIB, Radzików, 05-870 Błonie;
e-mail: e.arseniuk@ihar.edu.pl
tel. (22) 725 45 36; Fax: (22) 733 45 05;
3. Cel zadania: Celem projektu jest porównanie efektywności i wykorzystanie biotechnologicznych technik somatycznej embriogenezy i androgenezy poszerzających zmienność genetyczną i skracających cykl hodowlany pszenicy i pszenżyta pod względem odporności i tolerancji zbóż na septoriozę liści i plew.

3.1 Temat badawczy 1

Wykonanie kombinacji krzyżówkowych między odmianami pszenicy i pszenżyta o zróżnicowanej odporności na septoriozę liści i plew celem uzyskania drugiej partii ziarniaków z mieszańców F1 do zapoczątkowania wyprowadzania linii somaklonów i dihaploidów. (Wysiew w polu i krzyżowanie wybranych ozimych rodzicielskich odmian pszenicy i pszenżyta w obie strony – pełny diallel).

Cel tematu badawczego:

Celem tematu badawczego 1 jest otrzymanie drugiej partii ziarniaków z mieszańców pokolenia F1 z kombinacji krzyżówkowych wykonywanych w obie strony (pełny diallel) ozimych odmian pszenicy i pszenżyta o zróżnicowanej odporności na *P. nodorum*. Następnie ziarniaki zostaną wykorzystane do uzyskania somaklonów i dihaploidów.

Materiały i metody:

Na podstawie wyników polowych testów odporności na *P. nodorum* do krzyżowania roślin wytypowano sześć odmian pszenicy ozimej (Arkadia, Astoria, Bamberka, Muza, Ostroga, Wydma) i pięć ozimych odmian pszenżyta (Algoso, Borowik, Borwo, Tomko, Cyrkon) o zróżnicowanej odporności na patogen. Wszystkie kombinacje krzyżówkowe roślin (n=30 dla pszenicy i n=20 dla pszenżyta) wykonano w spółkach: HR Smolice, HR Strzelce, HR Danko, Poznańska HR, HBP MHR Kraków.

Wyniki

Spółki HR wykonujące usługę krzyżowania wybranych do badań ozimych odmian pszenicy i pszenżyta, łącznie przekazały 7038 ziarniaków pokolenia F1. Najwięcej ziarniaków mieszańców F1 udało się uzyskać dla kombinacji krzyżówkowych: Muza/Astoria i Astoria/Muza natomiast wśród odmian pszenżyta dla kombinacji Borwo/Tomko.

Wnioski:

1. Duże doświadczenie i zaplecze hodowlane hodowców już na początku realizacji projektu zapewniło otrzymanie znacznej liczby ziarniaków pokolenia F1 z większości kombinacji krzyżówkowych niezbędnych do realizacji kolejnych etapów badań.
2. W celu uzyskania większej liczby ziarniaków F1 należy kontynuować w 2017 r. krzyżowania odmian zgodnie z zaplanowanymi schematami krzyżowań odmian pszenicy i pszenżyta.

3.2. Temat badawczy 2

Wysiew, pielęgnacja i prowadzenie roślin drugiej partii ziarniaków mieszańców pokolenia F1 z dialleli oraz rodzicielskich odmian pszenicy i pszenżyta celem uzyskania eksplantatów do somatycznej embriogenezy i androgenezy.

Cel tematu badawczego 2:

Celem tematu 2 jest wyprowadzenie w bieżącym roku roślin mieszańców pokolenia F1 z dialleli oraz rodzicielskich odmian pszenicy i pszenżyta do rozpoczęcia pobierania eksplantatów i produkcji somaklonów i dihaploidów.

Materiały i metody:

Eksplantaty do somatycznej embriogenezy zostaną pobrane z rosnących w polu roślin mieszańców pokolenia F1 z dialleli oraz roślin odmian rodzicielskich pszenicy i pszenżyta. W tym celu po 15 ziarniaków mieszańców pokolenia F1 z dialleli (n=30 kombinacji krzyżówkowych) odmian pszenicy ozimej oraz po 10 ziarniaków pokolenia F1 z dialleli (n=20 kombinacji krzyżówkowych) odmian pszenżyta ozimego wysiano na 1-2 rzędowych poletkach o długości 1m, rozstawie 15 cm. W uprawie roślin na poletkach prowadzone są standardowe zabiegi agrotechniczne.

W celu otrzymania dihaploidów, po 15 ziarniaków mieszańców pokolenia F1 (n=30) ozimych odmian pszenicy oraz po 10 ziarniaków mieszańców F1 (n=20) pszenżyta ozimego zostało wysianych do wazonów w komorach fitotronowych. Rośliny będą prowadzone do momentu uzyskania pylników wykorzystywanych do produkcji linii DH w procesie androgenezy.

Wyniki:

W celu otrzymania jak największej liczby eksplantatów niezbędnych w procesie somatycznej embriogenezy, nasiona wyprowadzonych z dialleli roślin mieszańców pokolenia F1 oraz nasiona odmian rodzicielskich pszenicy i pszenżyta wysiano na poletkach doświadczalnych, gdzie przedplonem był groch. Po zebraniu grochu zastosowano orkę oraz wysiano nawóz Polifoska® 6 w dawce 300 kg/ha w celu dobrego ukorzenienia roślin, zwiększenia ich mrozoodporności i odporności na suszę. Przed siewem ww. nasion zbóż poletka talerzowano oraz wykonano uprawę agregatem. Siew niezaprawianych nasion wykonano ręcznie po 15 ziarniaków mieszańców pokolenia F1 z dialleli oraz 6 rodzimych odmian pszenicy oraz po 10 ziarniaków pokolenia F1 z dialleli oraz 5 rodzicielskich odmian pszenżyta. We wczesnym etapie rozwojowym chwastów zastosowano herbicyd Maraton w zalecanej dawce 4l/ha.

Celem otrzymania eksplantatów do androgenezy wykorzystano wyprowadzone w wyniku kombinacji krzyżowań ozimych odmian pszenicy i pszenżyta ziarniki z mieszańców F1 oraz rodzime odmiany zbóż. Nasiona wyłożono na szalki z wodą. Po 24 godzinach nasiona wysiano w multiplatach po 15 ziarniaków mieszańców pokolenia F1 i rodzicielskich ozimych odmian pszenicy oraz po 10 ziarniaków mieszańców F1 i rodzicielskich odmian pszenżyta ozimego. Multiplaty umieszczono w fitotronie. Po tygodniu skrócono długość drugiego liścia

celem rozkrzewienia. Następnie rośliny poddano procesowi jarowizacji trwającemu 8 tygodni w 4°C. Po tym czasie rośliny zostały przesadzone do wiader z ziemią i umieszczone w warunkach kontrolowanego środowiska, gdzie długość dnia wyniesi 16 godz., temperatura w nocy 10°C a w dzień 12°C.

Wnioski:

Podjęto wszelkie próby otrzymania jak największej liczby roślin z ziarniaków mieszańców F1 z dialleli oraz rodzicielskich odmian pszenicy i pszenżyta. W tym roku otrzymaliśmy od spółek większą liczbę ziarniaków po krzyżowaniach, które następnie wysiano w polu i fitotronie. Założony cel badań w 2016 r. zrealizowano w całości.

3.3. Temat badawczy 3

Otrzymanie linii somaklonów i dihaploidów z roślin pierwszej partii mieszańców pokolenia F1 uzyskanych w 2015r. i rodzicielskich odmian pszenicy i pszenżyta.

Cel tematu badawczego 3:

Celem tematu 3 jest wyprowadzenie somaklonów z dojrzałych zarodków oraz otrzymanie dihaploidów z pylników kwitnących roślin. Eksplantaty zostaną pobrane z roślin pokolenia F1 powstałych w wyniku krzyżowania w 2015r. oraz z rodzicielskich odmian pszenicy i pszenżyta.

Materiały i metody:

Otrzymywanie somaklonów (SE)

Materiałem wykorzystanym w badaniu były dojrzałe zarodki wyizolowane z ziarniaków roślin otrzymanych w 2015r. w wyniku krzyżowania (n=18 dla pszenicy i n=22 dla pszenżyta) oraz sześciu ozimych odmian rodzicielskich pszenicy (Arkadia, Astoria, Bamberka, Muza, Ostroga, Wydma) i pięciu ozimych odmian pszenżyta (Algoś, Borowik, Borwo, Tomko, Cyrkon. Przed właściwą sterylizacją ziarniaki umieszczono w alkoholu etylowym przez 5 min., który następnie usunięto a ziarniaki zalewano roztworem środka „Domestos” i wody w stosunku 1:9 na 20 min. Kolejną czynnością było trzykrotnie płukanie ziarniaków wodą sterylną przez 30s, następnie przez 10 i 15 minut. Z wysterylizowanych ziarniaków wyizolowano dojrzałe zarodki przy użyciu igieł preparacyjnych w warunkach aseptycznych. Zarodki wyłożono po 15 sztuk na szalki Petriego o średnicy 60 mm z pożywką indukcyjną Murashige-Skoog'a (MS) i inkubowano w całkowitej ciemności w temperaturze 25°C. Na podstawie wcześniejszych doświadczeń, do badania użyto pożywki z kwasem 3,6-dichloro-2-metoksybenzo (Dicamba) i sacharozą. Pierwszy pasaż został wykonany po 4 tygodniach a kolejne co 2 tygodnie. Po rozrośnięciu się kalusa i wytworzeniu zarodków embriogenicznych, eksplantaty przełożono na pożywkę regeneracyjną nie zawierającą hormonu wzrostu (MSR) i inkubowano w temperaturze 25°C i przy 16/8-godzinnym cyklu światło/ciemność (fotoperiod). Zastosowane pożywki sterylizowane były przez autoklawowanie w temperaturze 121°C i nadciśnieniu 1 atmosfery przez 20 min, pH pożywek ustalone zostało przed sterylizacją na poziomie 5,6-5,7. Rośliny sukcesywnie zostały przeniesione są do kolb z pożywką ukorzeniającą. Siewki wytwarzające korzenie zostaną przesadzone do doniczek z ziemią. Celem pełnego ukorzenia się przez 2 tygodnie będą przetrzymywane w warunkach wysokiej wilgotności oraz temperaturze i długości dnia jak poprzednio przez 2 tygodnie. Następnie rośliny będą jarowizowane przez 6 tygodni w temperaturze 3°C. Zjarowizowane rośliny po przesadzeniu do szklarni będą tam prowadzone do momentu zbioru ziarna pokolenia R0.

Ocena fenotypowa reakcji w kulturze *in vitro* dojrzałych zarodków ozimych odmian pszenicy i pszenżyta zostanie wykonana na podstawie wartości 3 parametrów: udział

zarodków wytwarzających kalus nieembriogeniczny (ZNE), udział zarodków wytwarzających kalus embriogeniczny (ZE), udział zarodków wytwarzających rośliny (LR). Dla poszczególnych genotypów każdy z parametrów został obliczony w stosunku do wyjściowej liczby zarodków (WZ) oraz liczby zarodków reagujących w warunkach kultury *in vitro* (ZR).

Otrzymanie dihaploidów (DH)

Eksplantatem w androgenezie były pylniki z kłosów roślin pierwszej partii mieszańców pokolenia F₁, które otrzymano w roku ubiegłym oraz rodzicielskich odmian pszenicy (n=6) i pszenżyta (n=7). Ścinano pędy z kłosami zawierającymi pylniki z mikrosporamizacją w stadium jednojądrowym oraz przechowywane były przez 7 do 10 dni w chłodni. Przed sterylizacją właściwą, kłosa umieszczono w 70% alkoholu etylowym na 2 min. Następnie alkohol zlan i całość sterylizowano roztworem środka „Domestos” i wody w stosunku 1:9 przez 10 min. Po zlaniu roztworu kłosa płukano wodą sterylną 4 razy: przez 30s., a następnie kolejno przez 5, 10 i 15 min. Pylniki izolowano z kłosów w sterylnych warunkach i wyłożono na szalki Petriego o średnicy 60 mm z pożywką indukującą androgenizację (CLM dla pszenicy, A dla pszenżyta). Następnie szalki zostały wstawione do inkubatora do temp. 26°C i przechowywane w całkowitej ciemności. Po około 6 tygodniach sukcesywnie przekładano wytworzony na pylnikach kalus na pożywkę regeneracyjną 190-2 i inkubowano w temperaturze 25°C przy 16/8-godzinny cykl światło/ciemność. Pożywki były sterylizowane przez autoklawowanie w temperaturze 121°C i nadciśnieniu 1 atmosfery przez 20 min, pH pożywek zostało ustalone przed sterylizacją na poziomie 5,6-5,7. Po około 10 dniach wytworzone z kalusa rośliny zostały przełożone do kolb z pożywką ukorzeniającą a później poddane procesowi jarowizacji trwającemu 6 tygodni w temp. 4°C. Po zakończeniu jarowizacji rośliny będą wysadzone do pojemników z ziemią i ustawiane w komorze fitotronowej do czasu wytworzenia ziarniaków. Zjarowizowane rośliny po przesadzeniu do szklarni będą prowadzone do momentu zbioru ziarna.

Efektywność androgenezy została przedstawiona na podstawie 2 parametrów: udział kalusa embriogenicznego w stosunku do liczby wyłożonych pylników w przeliczeniu na 100 pylników oraz udział powstałych roślin w stosunku do liczby wyłożonych pylników i otrzymanego kalusa, w przeliczeniu na 100 pylników/kalusów.

Wyniki

W warunkach kultury *in vitro* dojrzałych zarodków dla wszystkich genotypów ozimych odmian pszenicy i pszenżyta zaobserwowano indukcję kalusa embriogenicznego i nieembriogenicznego. Najlepiej reagowały linie pszenicy SE104 oraz pszenżyta SE80. Dla linii pszenicy SE98 oraz pszenżyta SE 60 uzyskano najmniejszy odsetek ZE, dla których na pożywce najczęściej pojawiał się kalus nieembriogeniczny. W warunkach kultury *in vitro* dojrzałych zarodków uzyskano łącznie 117 roślin pszenicy ozimej i 455 roślin pszenżyta ozimego.

W warunkach kultury *in vitro* pylników również dla wszystkich linii zbóż zaobserwowano indukcję kalusa embriogenicznego. W czasie badań otrzymano łącznie 3050 kalusów dla wszystkich 53 genotypów pszenicy i pszenżyta. W przypadku pszenicy najwyższy udział kalusa embriogenicznego otrzymano dla DH 91 i DH98, natomiast najniższy dla DH104. Dla linii pszenżyta najwyższy udział PE zaobserwowano dla DH61 natomiast najmniej kalusa embriogenicznego otrzymano dla linii DH112. Podczas doświadczeń uzyskano 281 roślin. Wśród genotypów pszenicy najwyższą efektywność androgenezy otrzymano dla linii DH100, natomiast w przypadku pszenżyta najwyższy udział PR zaobserwowano dla DH61.

Wnioski:

1. Wszystkie badane linie zbóż charakteryzują się wysokim potencjałem embriogenicznym.
2. Wyższą efektywność androgenyzy i somatycznej embriogenezy otrzymano dla ozimych odmian pszenżyta i ich mieszańców pokolenia F1 otrzymanych w 2015r.
3. Ozime odmiany pszenicy i ich mieszańce pokolenia F1 charakteryzują się niższą zdolnością do regeneracji roślin w warunkach kultury *in vitro* pylników i dojrzałych zarodków.

3.4. Temat badawczy 4

Rozmnożenie somaklonów pszenicy i pszenżyta otrzymanych w 2015r. i analiza odporności na *P. nodorum* w warunkach fitotronowych.

Cel tematu badawczego 4:

W bieżącym roku zaplanowane jest dalsze namnożenie otrzymanych somaklonów z dojrzałych zarodków wytypowanych do doświadczeń ozimych odmian pszenicy i pszenżyta w celu uzyskania wystarczającej ilości do prowadzenia dalszych badań. W miarę możliwości zostaną wykonane w warunkach fitotronowych wstępne testy odporności na *P. nodorum*.

Materiały i metody:

Otrzymane w roku 2015r. somaklony zostały wysadzone i prowadzone w fitotronie i szklarni do momentu otrzymania nasion. W ramach projektu przetestowano 6 genotypów pszenicy ozimej i 5 genotypów pszenżyta ozimego. Materiałem do analizy odporności były dwutygodniowe siewki ozimych odmian pszenicy i pszenżyta do czasu pełnego rozwinięcia drugiego liścia. Do doświadczenia zostało przygotowanych po 8 siewek dla każdego genotypu, w dwóch powtórzeniach. Siewki były inokulowane wodną zawiesiną zarodników *P. nodorum* o stężeniu i umieszczone w całkowitej ciemności w warunkach kontrolowanego środowiska: tem. 22°C i 100% wilgotności przez 72 godziny. Po tym okresie siewki były prowadzone w warunkach fotoperiodu 16 godzin dzień, 8 godzin noc, temperaturze 20°C w nocy i 22°C w dzień oraz naturalnej wilgotności względnej powietrza. Przez cały okres realizacji doświadczenia ww. warunki były ściśle kontrolowane. Po 10-14 dniach inkubacji została przeprowadzona ocena stopnia porażenia liści siewek w dziewięciostopniowej skali; gdzie 1 = podatny (silne porażenie grzybem; 9 = odporny (ślady porażenia).

Wyniki:

Na podstawie fitotronowych testów odporności na *P. nodorum* zaobserwowano najmniejsze porażenia grzybem dla somaklonów pszenicy Arkadii i pszenżyta Borwo, natomiast najbardziej podatne okazały się somaklony pszenicy Wydma i somaklony pszenżyta Borowik. Po przeprowadzeniu analizy wariancji i testów post-hoc wykazano statystycznie istotne różnice dla somaklonów z odmiany pszenicy Arkadia i pszenżyta Borowik. Dla pozostałych somaklonów nie wykazano zróżnicowania istotnego statystycznie.

Wnioski

1. Zebrane dane zostaną porównane do oceny odporności na *P. nodorum* otrzymanych w roku 2016 linii DH i somaklonów.
2. Na podstawie analizy wariancji wykazano różnice istotne statystycznie dla somaklonów pszenicy Arkadia i pszenżyta Borowik.
3. Celem zwiększenia dokładności oceny należy zwiększyć doświadczenie do większej ilości powtórzeń.