

**TERESA CEGIELSKA-TARAS****KATARZYNA SOSNOWSKA****LAURENCJA SZALA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie,

Oddział w Poznaniu, Zakład Genetyki i Hodowli Roślin Oleistych, Pracownia Kultur Tkankowych

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Teresa Cegielska-Taras Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin —

Państwowy Instytut Badawczy, Radzików, 05-870 Błonie, Oddział, Poznań, Zakład Genetyki i Hodowli

Roślin Oleistych, Pracownia Kultur Tkankowych, ul. Strzeszyńska 36, 60-479 Poznań

tel. 61 8464205; wew. 206; e mail: tceg.@nico.ihar.poznan.pl

*Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.19.2018, Zadanie 51.*

## Wprowadzanie nowych alleli z pul genowych różnych gatunków z rodzaju *Brassica* do bazy genowej rzepaku ozimego

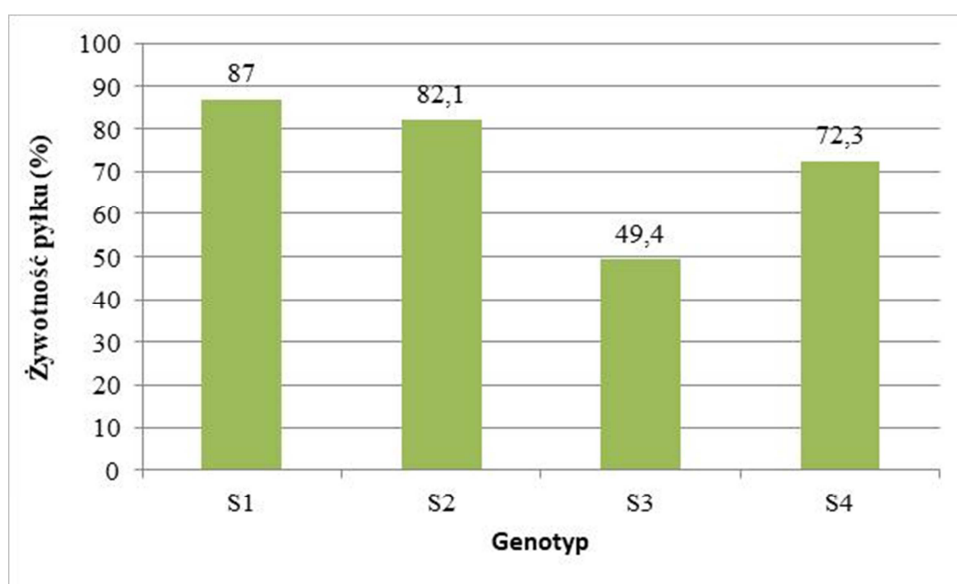
### **Introduction of new alleles from gene pools of various *Brassica* species to the winter oilseed rape genome**

**Słowa kluczowe:** androgeniza *in vitro*, *Brassica oleracea*, *Brassica napus*, *Brassica rapa*  
genotypowanie, linie semi-resyntetyzowane, resynteza, rzepak

#### 1. BADANIA NAD NATURĄ SAMONIEZGODNOŚCI WYBRANYCH LINII SEMI-RS

Celem zadania były badania nad zdolnością do wytwarzania nasion przez każdą roślinę uzyskaną z krzyżowań rzepaku resyntetyzowanego (RS) oraz rzepaku naturalnego podwójnie ulepszanego (00) poprzez analizę prawidłowego wykształcania pyłku i badanie zdolności do samozapylenia roślin semi-rezyntetyzowanych (semi-RS).

Żywotność ziaren pyłku czterech podwójnie ulepszonych (00) linii rzepaku semi-RS: S1, S2, S3, S4 określano barwiąc je 1% acetokarminem, a następnie licząc przy użyciu mikroskopu świetlnego ziarna żywotne i nieżywotne w 10 polach widzenia. U trzech linii semi-RS: S1, S2, S4 stwierdzono żywotność pyłku od 72,3% do 87,0%, a u linii S3 — 49,3% (rys. 1).



Rys. 1. Żywotność ziaren pyłku czterech linii DH semi-RS rzepaku ozimego

Po kilkakrotnym ręcznym wspomaganym zapylaniu genotypów własnym pyłkiem o niskiej żywotności ziaren są duże szanse na uzyskanie niewielkiej liczby nasion.

## 2. BADANIA NAD KRZYŻOWANIEM ROŚLIN RZEPAKU RS Z RZEPAKIEM NATURALNYM 00

Celem badań jest uzyskanie mieszańców  $F_1$  z krzyżowań rzepaku RS i rzepaku naturalnego (00), wysoko plennego, obecnie uprawianego.

Do krzyżowań wybrano 2 linie rzepaku RS: RS-61, RS-68 oraz dwie odmiany rzepaku naturalnego: tolerancyjną na kiłę kapusty odm. Platinum i charakteryzującą się dużą zdolnością plonotwórczą odm. Architect.

W wyniku krzyżowania odm. Platinum z linią RS-68 uzyskano zadawalającą liczbę nasion. Natomiast z kombinacji krzyżówkowej odm. Architect i linią RS-61 otrzymano zaledwie kilka nasion.

W krzyżowaniu rzepaku RS z odmianami rzepaku 00 mogą występować zaburzenia w prawidłowym rozwoju nasion. Linie RS niosą bowiem geny blokujące samozapylenie. Jednakże barierę tę można czasami pokonać poprzez krzyżowanie ręczne w zamkniętym pąku kwiatowym.

## 3. ANDROGENEZA *IN VITRO* MIESZAŃCÓW $F_1$ ORAZ UZYSKANIE POPULACJI LINII DH SEMI-RS

Celem badań było uzyskanie populacji androgenicznych roślin rzepaku semi-RS.

Populacje linii podwojonych haploidów rzepaku semi-RS uzyskano metodą androgenyzy *in vitro* w kulturze izolowanych mikrospor dwóch mieszańców F<sub>1</sub>. Mieszańce F<sub>1</sub> powstały z krzyżowania linii RS-63 i RS-68 z rzepakiem ozimym (00) o symbolach R2 i R3. Przygotowano 10 roślin dawców mikrospor z każdego mieszańca F<sub>1</sub>. Ploidalność roślin uzyskanych dwóch androgenicznych populacji: D-28 i D-29 oznaczana była metoda cytometrii przepływowej.

Populacja D-29 obejmowała 75 androgenicznych roślin. Analiza cytometryczna wykazała, że ok. 50% uzyskanych roślin była haploidalnych. Populacja D-28 składała się z 64 roślin, spośród których 54 były podwojonymi haploidami (84,5%).

Wydajność androgenyzy *in vitro* w kulturze izolowanych mikrospor roślin uzyskanych z udziałem rzepaku RS była niższa od wydajności androgenyzy *in vitro* prowadzonej z mikrospor rzepaku naturalnego.

#### 4. ANALIZA BIOCHEMICZNA NASION LINII DH RZEPAKU SEMI-RS

Celem badań była analiza biochemiczna zawartości glukozynolanów w śrucie i kwasu erukowego w oleju nasion oraz selekcja zeroerukowch i o niskiej zawartości glukozynolanów rzepaku semi-RS podwójnie ulepszanego.

Tabela 1

Zawartość kwasu erukowego i glukozynolanów w 50 liniach DH semi-RS

Linia DH semi-RS	Zawartość		Linia DH semi-RS	Zawartość	
	kw. erukowego (%)	glukozynolanów (μM/g nasion)		kw. erukowego (%)	glukozynolanów (μM/g nasion)
D23/1	48,0	57,2	D23/34	19,1	49,9
D23/2	32,0	32,5	D23/39	47,3	43,7
D23/3	24,3	61,2	D23/45	<b>0,0</b>	37,1
D23/4	51,9	28,1	D23/48	<b>0,0</b>	54,6
D23/5	44,1	67,7	D23/49	<b>0,0</b>	59,0
D23/7	29,9	48,8	D25/2	<b>0,0</b>	35,5
D23/8	48,0	85,8	D25/3	21,8	<b>18,4</b>
D23/9	46,3	81,1	D25/4	<b>0,0</b>	19,0
D23/10	<b>0,0</b>	73,0	D25/5	20,4	48,6
D23/12	47,9	35,1	D25/6	18,1	<b>13,7</b>
D23/13	30,4	94,6	D25/7	<b>0,0</b>	24,7
D23/14	24,2	59,2	D25/8	22,4	56,5
D23/15	25,9	83,4	D25/13	43,8	64,9
D23/16	<b>0,0</b>	64,0	D25/14	24,9	47,0
D23/17	49,8	39,6	D25/15	28,0	<b>13,8</b>
D23/19	45,0	61,7	D25/16	29,0	<b>18,6</b>
D23/20	17,6	65,0	D25/17	24,0	59,3
D23/21	49,1	23,7	D25/18	29,2	68,4
D23/22	49,8	60,3	D25/19	44,8	70,5
D23/23	26,0	95,5	D25/20	31,3	71,4
D23/24	47,0	112,6	D25/21	28,6	62,5
D23/25	40,5	57,2	D25/22	25,1	79,1
D23/26	25,1	37,9	D25/23	<b>0,0</b>	61,4
D23/29	21,5	72,1	D25/24	31,2	62,7
D23/32	18,8	<b>11,7</b>	<b>D25/25</b>	<b>0,0</b>	<b>4,7</b>

Z populacji D-25 uzyskanej z mieszańca  $F_1$  otrzymanego z krzyżowania odm. Lohana i linią RS-69 zebrano nasiona w ilości wystarczającej na wykonanie analiz biochemicznych z 30 linii DH semi-RS. Natomiast z populacji D-23 otrzymanej z mieszańca  $F_1$  z krzyżowania odm. Arot i RS 69 zebrano nasiona w odpowiedniej ilości tylko z 20 linii DH semi-RS. W analizowanym materiale roślinnym zawartość kwasu erukowego wahała się od 0,0 do 51,9%, a zawartość glukozyolanów od 4,7 do 112,6  $\mu\text{mol/g}$  nasion. W badanym materiale 10 linii semi-RS pozbawionych było kwasu erukowego, a 6 linii posiadało dopuszczalną zawartość glukozyolanów, ale tylko jedna linia semi-RS (D25/25) spełniała kryteria rzepaku podwójnie ulepszanego.

Populacje androgenicznych roślin pochodzące z krzyżowania rzepaku naturalnego i linii rzepaku resyntetyzowanego powinny być liczne z uwagi na wysoką częstotliwość występowania genów samoniezgodności wpływających na zawiązywanie nasion, a także genów warunkujących wysokie zawartości kwasu erukowego i glukozyolanów w nasionach.

#### 5. GENOTYPOWANIE UZYSKANEGO „NOWEGO” GENETYCZNIE RZEPAKU POPRZEZ SEKWENCJONOWANIE NOWEJ GENERACJI (NGS)

Celem badań było przygotowanie do sekwencjonowania wybranych roślin rzepaku RS, ich linii rodzicielskich oraz rzepaku naturalnego.

Wybrano 24 genotypy: 7 linii rzepaku RS i 10 ich form rodzicielskich oraz 7 genotypów rzepaku naturalnego. Izolację DNA wykonano zmodyfikowaną metodą z ciekłym azotem oraz buforem CTAB (Doyle i Doyle, 1990). DNA wytrącano za pomocą izopropanolu, a następnie płukano w 70% etanolu i rozpuszczano w buforze TE.

Do izolacji DNA należy pobierać fragmenty młodych liści, nie porażonych przez patogeny, aby uniknąć zanieczyszczenia przez obce DNA.