

Zad. 65. Otrzymywanie populacji homozygotycznych roślin buraka ćwikłowego z zastosowaniem embriogenezy gametycznej.

W roku 2016 badania prowadzono w ramach 6 tematów badawczych.

Temat badawczy 1

Wyprowadzanie roślin donorowych

Celem tematu było uzyskanie roślin donorowych z prawidłowo wykształconymi kwiatostanami, a w nich mikrosporami i zalążkami.

W styczniu bieżącego roku w kontenerach 15 l. z ziemią ogrodniczą i piaskiem w stosunku 1:2 wysadzone były po 2 korzenie z dwóch odmian komercyjnych Opolski, Czerwona Kula (łącznie 120 roślin) i linii hodowlanych R10, R11, R12, 155, 158, 161, F2, F5, F6 (łącznie 130 roślin). Kontenery zostały umieszczone w 2 komorach wzrostowych o regulowanej temperaturze w dzień $+20^{\circ}\text{C}$, w nocy $+18^{\circ}\text{C}$, fotoperiod 16 godz. o natężeniu $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ oraz w szklarni z doświetlaniem do 16 godz. Prowadzone były zabiegi agrotechniczne, uprawa, nawożenie, ochrona przed patogenami. Wykonywane były obserwacje pod kątem prawidłowości wykształcania kwiatostanów, a następnie obserwacje mikroskopowe rozwoju mikrospor w pąkach tych roślin. Spośród 250 wysadzonych roślin były usuwane takie, które miały nieprawidłowe kwiatostany lub źle wykształcone mikrospory. Rośliny były wysadzone zawsze z dużym nadmiarem, ponieważ zdarzały się ubytki: zamieranie roślin, męskosterylność.

Korzenie buraków dostarczone przez współpracujące spółki hodowlane były dobrej jakości. Zostały one wysadzone do podłoża i umieszczone w komorach wzrostowych łącznie 70 korzeni linii hodowlanych i 30 korzeni odmian komercyjnych. W szklarni wysadzono 150 korzeni linii hodowlanych i odmian. Rośliny pielęgnowano z należytą starannością nawożąc i prowadząc według potrzeby zabiegi ochroniarskie. Jednakże rośliny dwóch linii albo nie wytworzyły pędów kwiatostanowych, a te które wytworzyły miały kwiaty zdeformowane do tego stopnia, że nie można było zakładać kultur pylnikowych, kultur izolowanych mikrospor, ani kultur zalążków. W poprzednich latach doświadczeń stwierdzono, że u buraka ćwikłowego długość pąka jest dobrym zewnętrznym wskaźnikiem stadium rozwoju mikrospor, oraz że dla różnych genotypów optymalne dla pobudzenia androgeny stadium może być w pąkach różnej długości.

Obserwacje rozwoju żeńskich komórek rozrodczych są zdecydowanie trudniejsze, ale w ciągu naszych badań udało nam się zaobserwować, że stadium rozwoju woreczka zalążkowego jest skorelowane ze stadium rozwoju mikrospor. Można więc posłużyć się obserwacjami przebiegu mikrosporogenezy dla określenia stadium rozwoju woreczka zalążkowego.

W prowadzonym w tym roku obserwacjach stwierdziliśmy, że optymalne dla przejścia na drogę rozwoju sporofitycznego były w przypadku androgeny były pąki 1,0-2,0mm, a gynogenezy 1,8-3,0mm.

Temat badawczy 2

Indukcja gyno- i androgeny

Celem zadania była ocena wpływu genotypu na efektywność embriogenezy w kulturach zalążków i pylników, traktowania gibereliną roślin donorowych w doświadczeniach z androgeną oraz kontynuacja badań nad uzyskaniem roślin w kulturach izolowanych mikrospor.

Do wywołania embriogenezy gametycznej użyte były 2 odmiany komercyjne Opolski, Czerwona Kula i linii hodowlanych: R11, R12, 155, 158, 161, F2, F6 rosnące w warunkach

kontrolowanych i szklarniowych. Materiał roślinny – pąki kwiatowe (zadanie 1) były wyjalawiane w 70% etanolu przez 2 min., następnie 2x płukane sterylną wodą destylowaną. Z wysterylizowanych pąków kwiatowych zostały wyizolowane zalążki lub pylniki (mikroskop stereoskopowy, komora z laminarnym przepływem powietrza) i wykładane na pożywki indukcyjne.

Kultury zalążków prowadzono w temp. +27°C, przy stałym oświetleniu, a kultury pylnikowe traktowano przez 24 godz. temp. +35°C, potem umieszczane w ciemności, w temp. +24°C. Kultury izolowanych mikrospor prowadzono także w ciemności, w stałej temp. +27°C. Po upływie około 4 tygodni rozpoczęto obserwacje kultur. Efektywność gametogenezy określana była jako liczba uzyskanych embrioidów w przeliczeniu na 100 wyłożonych zalążków lub pylników, a dla kultur izolowanych mikrospor - w przeliczeniu na szalkę.

Wpływ genotypu oceniany był na podstawie liczby uzyskanych zarodków w kulturach pylnikowych i w kulturach zalążków. W celu przeprowadzenia tego doświadczenia było wyłożone 7184 pylniki (powtórzeniem jest jedna kolba, a w niej 40 pylników) oraz 1224 zalążki (powtórzeniem jest jedna kolba, a w niej 24 zalążki).

Do indukcji androgenezy w kulturach pylnikowych zastosowano pożywki indukcyjne ze 100g/l sacharozy na bazie N₆ (Chu 1975) i B₅ (Gamborg i in.1968) zestalonych agarem w ilości 6.5 g/l. Do kultur izolowanych mikrospor użyto pożywki płynne bez agaru, a do indukcji gynogenezy zastosowano pożywkę na bazie B₅ (Gamborg i in.1968).

W celu zbadania wpływu gibereliny na proces indukcji zarodków androgenetycznych zastosowano następujące sposoby traktowania nią roślin donorowych: 1 - podlewanie roztworem wodnym gibereliny (25 mg GA₃ w 0,5 l wody) od posadzenia, 2 razy w tygodniu po 250 ml na pojemnik z roślinami; 2 – podlewanie jak w kombinacji 1 i etiolacja, czyli umieszczenie roślin donorowych w odpowiedniej fazie rozwoju pąków kwiatowych w ciemnym pomieszczeniu w temperaturze około +15°C na 5 dni; 3 – moczenie korzeni buraków przed posadzeniem do podłoża w wodnym roztworze gibereliny (500mg/l) przez 1 dobę, a następnie podlewanie jak w kombinacji 1. W celu przeprowadzenia tego doświadczenia wyłożono około 3394 pylniki (powtórzeniem jest jedna kolba, a w niej 40 pylników).

Do zakładania kultur izolowanych mikrospor wysterylizowane pąki kwiatowe były użyte do przygotowania zawiesiny mikrospor poprzez homogenizację i cykl wirowań. Kultury izolowanych mikrospor prowadzono na jednej odmianie testowej. Założono 18 serii kultur izolowanych mikrospor. Liczba szalek w każdej serii była zróżnicowana i uzależniona od ilości mikrospor w otrzymanej zawieszynie.

Badając wpływ genotypu na efektywność androgenezy również i w tym roku stwierdzono bardzo duże różnice pomiędzy badanymi liniami i odmianami. Linia F2 okazała się bardzo embriogenna w kulturach pylnikowych, gdy pąki były pobierane z roślin rosnących w komorze wzrostowej. U trzech linii, których dawcy pylników byli umieszczeni w tych samych warunkach nie otrzymano w ogóle zarodków. Porównując 2 zastosowane pożywki stwierdzono, że jednoznacznie lepsza okazała się pożywka B₅. Na pożywce N₆ uzyskano zarodki tylko u tej najbardziej embriogenicznej linii w warunkach komory wzrostowej. Natomiast gdy kultury były zakładane z pąków roślin rosnących w szklarni najwięcej zarodków otrzymano z linii R11. Z trzech linii nie otrzymano zarodków. Również dla roślin rosnących w szklarni pożywka N₆ okazała się gorsza, uzyskano zaledwie kilka zarodków z linii 161.

Badane linie różniły się też zdolnością do gynogenezy i to zarówno, gdy rośliny donorowe były uprawiane w komorze jak i szklarni. Przy czym należy zauważyć, że szczególnie linie oznaczone literą F były embriogenne. Z pąków roślin uprawianych w komorze wzrostowej najwięcej zarodków otrzymano z linii F6, a w szklarni linii F2.

W doświadczeniu nad wpływem GA₃ na indukcję androgenozy z roślin traktowanych GA₃ stosując podlewanie uzyskano mniej zarodków na 100 wyłożonych pylników niż w kombinacji kontrolnej, natomiast podlewanie poprzedzone moczeniem korzeni przed posadzeniem w roztworze GA₃ przez 1 dobę dało podobne wyniki jak w kontroli. Wyraźne zwiększenie liczby otrzymanych zarodków ze 100 wyłożonych pylników osiągnięto przy połączeniu podlewania GA₃ z etiolacją przez 5 dni. Liczba reagujących pylników była najwyższa w kombinacji kontrolnej. Nawet przy połączeniu podlewania i etiolacji była niższa niż w kontroli.

Założono 18 serii kultur izolowanych mikrospor odmiany Opolski. Najmniejsza liczba szalek z kulturami w jednej serii to 4 a najwyższa to 13. Najczęściej było to 7-8 szalek w serii. Zakładano kultury z materiału z wszystkich miejsc uprawy roślin donorowych tj. komora wzrostowa, wolno stojący kontener, oba te miejsca miały ustalone warunki temperaturowe i oświetlenia - i ze szklarni. Zarodki otrzymano w trzech spośród 18 serii założonych ale było ich mało. Stwierdzono je w 2 seriach spośród 4 pochodzących w kontenera z 1 z komory. Wskazuje to, że regulowane warunki termiczne i oświetleniowe są ważne dla efektywności embriogenezy androgenetycznej w kulturach izolowanych mikrospor. Spośród 10 serii kultur założonych z roślin rosnących w komorze wzrostowej 4 były zakażone, z 4 założonych z roślin ze szklarni 1 była zakażona, a z 4 serii z materiału roślinnego z kontenera wszystkie były czyste. Reasumując należy stwierdzić, że najlepiej wypadły kultury izolowanych mikrospor z kontenera zarówno jak chodzi o otrzymywanie zarodków jak i o czystość Kultur.

Temat badawczy 3

Regeneracja roślin gyno- i androgenetycznych i ich adaptacja

Celem zadania badawczego była ocena wpływu 3 stężeń makroelementów i 2 stężeń gibereliny na efektywność regeneracji roślin z zarodków i 5 podłoży do ich adaptacji.

Wyniki uzyskane w roku 2015 spowodowały, że zrezygnowaliśmy z pożywek N₆ (Chu 1975), B₅ (Gamborg i in. 1968). Zarówno zarodki gynogenetyczne jak i struktury embrioidalne otrzymane w kulturach pylnikowych rosły na nich gorzej, niż na pożywce MS. W związku z tym tę pożywkę wybrano do tegorocznych doświadczeń. Zastosowane zostały 3 stężenia makroelementów: pełne i 1/2, 1/4. Zastosowano również dodatek gibereliny do pożywki regeneracyjnej. Użyto dwóch stężeń 1 i 3 mg/l.: w każdej kombinacji wyłożono po 10 zarodków w każdej z kombinacji. Liczba zarodków użytych w doświadczeniu na etapie planowania nie była możliwa do określenia, bo zależna jest od wydajności procesów andro i gynogenezy. Ta zaś związana była przede wszystkim z genotypem poszczególnych roślin, odmian, linii hodowlanych oraz wpływem badanych czynników. Współczynnik wytwarzania zarodków na drodze embriogenezy gametycznej zawierał się w przedziale od 0 do kilkuset zarodków na jeden pylnik lub zalążek. Probówki z zarodkami uzyskanymi w trakcie realizacji tematu badawczego 3 zostały umieszczone w fitotronie przy oświetleniu 16 godz. o natężeniu 30 μmol·m⁻²·s⁻¹ w temp. +20°C. W przeciągu kilku tygodni prowadzone były obserwacje skutkujące podziałem materiału na kategorie: rośliny, nieukorzenione rozety, namnożenia prawidłowe i kalusowate, zarodek. Nieukorzenione rozety, namnożenia kalusowate i prawidłowe oraz zarodki podlegać będą kolejnym pasażom. Prawidłowo uformowane rośliny zostały poddane adaptacji. W tym celu po ich wyjęciu z probówki korzenie ich zostały opłukane z pożywki w wodzie destylowanej, następnie namoczone w 2 % roztworze Kaptanu i wysadzone do autoklawowanego podłoża w wielodoniczkach. Na tym etapie przebadano wpływ poszczególnych składników podłoża na ten proces. W oparciu o wyniki z zeszłego roku zrezygnowaliśmy z podłoży zawierających ziemię ogrodniczą. Wielodoniczki z roślinami umieszczone były w warunkach wysokiej wilgotności, w tuneliku

foliowym umieszczonym w komorze wzrostowej w temp. + 20⁰C w dzień i +18⁰C w nocy przy 16 godz. oświetleniu o natężeniu 30 μmol m² s⁻¹. Po podjęciu przez rośliny samodzielnego wzrostu, wilgotność obniżano przez przewietrzanie tuneliku przez okres kilku dni, a następnie zostały umieszczone w komorze wzrostowej, w doniczkach o średnicy 10cm.

Zarodki androgenetyczne po wyłożeniu na pożywki doświadczałne w zdecydowanej części zamarły. W 6 kombinacjach zamarły wszystkie zarodki. Przeprowadzając obserwacje nie zauważono by podjęły one wzrost i rozwój. Nie stwierdzono więc wpływu dodatniego ani ujemnego stężeń makroelementów ani GA₃ i ich stężeń. Pozostałe po założeniu zaplanowanego doświadczenia zarodki wyłożono na kilka pożywek, ponieważ regeneracja w procesie androgenezy jest bardzo trudnym i nierozwiązanym zarówno przez nas jaki i kogokolwiek na świecie zagadnieniem. Wśród użytych pożywek była też ta, która w doświadczeniu GA₃ była pożywką kontrolną. Na tej pożywce zaobserwowaliśmy wzrost kalusowatych tkanek. Wskazuje to na fakt, że z doświadczeniu z GA₃ zadziałał inny czynnik niż pożywka. Zregenerowane z zarodków androgenetycznych tkanki zostały już 2- krotnie przepasażowane nadal żyją. W czasie następnych obserwacji stwierdzono po raz pierwszy organogenezę, zaobserwowano pędy. Pędy te wykazały zdolność do namnażania powstało ich całe skupisko. Aktualnie część tych pędów jest przełożona na pożywkę do namnażania a druga część na pożywki do ukorzenia.

Zarodki gynogenetyczne po wyłożeniu na pożywki z różnymi stężaniami makroelementów i GA₃ wytwarzały nieorganizowane tkanki i pędy, czyli nastąpiła organogeneza zaraz po wyłożeniu na pożywki regeneracyjne. Najwięcej zarodków podjęło wzrost i rozwój na pożywce MS z pełnym stężeniem makroelementów, mniej na pożywce z połową makroelementów, a najmniej na pożywce w której zastosowano ¼ makroelementów. GA₃ wpływało korzystnie na wywołanie organogenezy. Szczególnie korzystnie wypadała pożywka z pełnym stężeniem makroelementów i 3mg/l GA₃. Na tej pożywce 80% zarodków rozpoczęło organogenezę. Dokonano obliczeń uzyskanego namnożenia z zarodków gynogametycznych i stwierdzono, że najwięcej rozet jak i ich zaczątków uzyskano na pożywce MS z pełnym stężeniem makroelementów i dodatkiem gibereliny.

Zarodki androgenetyczne otrzymane w kulturach izolowanych mikrospor zamarły jeszcze będąc w pożywce indukcyjnej.

W tegorocznych doświadczeniach uzyskano poprawę efektywności adaptacji – wyższy procent roślin przeżył okres aklimatyzacji. Ponadto stwierdzono, że dodatek nawozów krzemowych wpływał korzystnie na proces adaptacji. Najwyższy procent zaadaptowanych roślin uzyskano w podłożu z dodatkiem 1,5g NSi i 1,6 CaSiO₃/ 1dm³ torfu.

Temat badawczy 4

Badanie ploidalności i homozygotyczności roślin gyno- i androgenetycznych

Celem zadania było określenie ilości DNA jądrowego w uzyskanych roślinach i liczby homozygot w analizowanej populacji.

Ploidalność uzyskanych roślin oceniono przy użyciu przepływowego Partec PAII. Materiałem do analiz były ich młode liście (zadanie 3) około 100 roślin. Zastosowano podstawowy bufor firmy Partec (CyStain DNA) z dodatkiem PVP 40. Wyizolowane jądra komórkowe barwiono DAPI w stężeniu 0,1mg/l. W próbach analizowano od 500 do 1000 jąder komórkowych. Rośliny o podwójnym garniturze chromosomowym poddano badaniu homozygotyczności przy pomocy 2 systemów izoenzymetycznych PGI (izomeraza fosfoglukozoizomeraza E.C. 5.3.1.9), AAT (aminotransferaza asparaginianowa E.C. 2.6.1.1). Materiał zmacerowano w buforze ekstrakcyjnym tris-maleate o pH 8,0 zawierającym w swoim składzie 10% glicerol, 10% polwinylnyrolidon (PVP-40), 0,5% Triton X-100 i 14 mM β-mercaptoethanol. Elektroforezę przeprowadzono na 10% żelu skrobiowym wg.

Gottlieba (1973), w którego skład wchodzi: 15 ml buforu litowo-borowego (wodorotlenek litu 1,20 g/l, kwas borowy 11,89 g/l), 125 ml Tris o pH 8,4 oraz skrobia ziemniaczana 16,2 g/l. Rozdział enzymów wykonano wg metody Selander i in. (1971), z zastosowaniem buforu litowo-borowego zapewniającego optymalne warunki rozdziału i stabilizacji białek przy napięciu prądu V 300 i natężeniu 50 mA. Dla wizualizacji polimorfizmu izoenzymu PGI zastosowano metodę Weeden i Gottlieb (1980), wg której żełe zostały zalane roztworem wybarwiającym (reakcyjnym) i umieszczone w ciemności w temperaturze pokojowej. Reakcja enzymatyczna (wizualizacja polimorfizmu) AAT przeprowadzono w cieplarni w temperaturze +37°C.

W 2016 roku poszerzono badanie homozygotyczności roślin poprzez użycie analizy NGS. Została ona wykonana na trzech wybranych roślinach o diploidalnej liczbie chromosomów (analiza cytometryczna) i określonych jako homozygoty przy użyciu izoenzymów PGI i AAT. Z każdej rośliny pobrano próbę około 200 mg blaszki liściowej (z młodych liści). Z prób tych wyizolowana była frakcja całkowitego RNA (najprawdopodobniej zestawem firmy Norgen Biotek). Stężenie i czystość preparatu zostały ocenione spektrofotometrycznie. Do oceny stopnia (braku) degradacji RNA wykorzystano profil elektroforetycznego rozdziału w niedenaturującym żelu agarozowym. Trzy preparaty o odpowiedniej jakości (po jednym na roślinie) przekazano firmie usługowej, która wykonała bibliotekę cDNA z poliadenylowanej frakcji (transkryptom) i poddała ją sekwencjonowaniu NGS. Surowe odczyty po wstępnej obróbce przekazano i posłużyły do właściwej analizy. Analizę bioinformatyczną wykonano przy pomocy programu CLC Genomics Workbench. Oceniono jednorodność odczytanych sekwencji dla co najmniej 100 genów z każdego chromosomu (razem 900 genów).

Ewentualne rozszczepienie sekwencji nukleotydowych genów występujących w jednej kopii było interpretowane jako dowód braku homozygotyczności. Jednorodność sekwencji wszystkich genów występujących w jednej kopii była interpretowana jako dowód homozygotyczności. W połączeniu z analizą fluorocytometryczną (określenie wielkości genomu / ploidalności) pozwoliło na jednoznaczny identyfikację podwojonych haploidów (wśród trzech wstępnie wytypowanych roślin). Dodatkowo uzyskano wiedzę o poziomie ekspresji wszystkich genów badanych roślin. Ze względu na małą początkową ilość roślin (3) nie umożliwi to uzyskania statystycznie wiarygodnego kompletnego profilu transkryptomu (nie to jest celem na tym etapie), ale może posłużyć do wytypowania "ciekawych" genów, które w późniejszym etapie mogą być przeanalizowane innymi metodami.

Badając ploidalność rozet buraka ćwikłowego otrzymanych drogą gynogenezy stwierdzono silną zależność genotypową. Rozety odmian : Opolski Czerwona Kula i linii RA-5 i 5/11 były w 100% haploidami, a u linii 4/11 diploidami.

Rośliny o podwojonej liczbie chromosomów poddane zostały analizie homozygotyczności pod względem dwóch izoenzymów. Dla izoenzymu PGI uzyskano polimorfizm pozwalający na wyznaczenie homozygot dla wszystkich badanych roślin, podczas gdy dla izoenzymu AAT nie u wszystkich roślin udało się jednoznacznie zinterpretować uzyskane zymogramy. Homozygot pod względem PGI w badanej populacji było 95%, podczas gdy w stosunku do drugiego izoenzymu wynaczono 70% homozygot i około 23% heterozygot, około 7 % stanowiły rośliny o nieczytelnym polimorfizmie prążków.

Z trzech wybranych roślin (kultury in vitro nr 399, 426, 521) wyizolowano całkowite RNA wolne od DNA. Widma absorpcji UV trzech preparatów przedstawiono na rysunku 1A. Wszystkie preparaty charakteryzowały się wysoką czystością (współczynnik $A_{280}/A_{260} > 1,9$), stężeniem wyższym od 200 ng/ μ l oraz nie były zdgradowane, o czym świadczyła obecność dwóch prążków rRNA obserwowanych na profilu elektroforetycznym. Dwa z trzech preparatów wymagał dodatkowego traktowania w celu usunięcia DNA. Skuteczność tego etapu izolacji RNA. Z preparatów przekazanych do firmy Genomed S.A. przygotowano biblioteki cDNA z frakcji poliadenylowanego RNA oraz dokonano odczytu sekwencji na

platformie Illumina HiSeq. Surowe odczyty (po odcięciu adapterów i sprawdzeniu jakości odczytu) zostały przekazane do Instytutu Ogrodnictwa. Dla prób 399, 426 i 521 odczytano odpowiednio 17,7 mln, 57,8 mln i 41,8 pojedynczych sekwencji o długości około 100 nukleotydów każda. Sekwencje odczytano w trybie sparowanym (odległość od 83 do 317 nt), co zwiększyło ich efektywną długość. Odczyty bibliotek zmapowano (oddzielnie dla każdej próby) na sekwencje 29.088 transkryptów odczytanych dla buraka cukrowego (Dohm et al., 2014). Zmapowano z sukcesem po 93% odczytów dla każdej z trzech prób, z czego od 83% do 85% zmapowano w parach. Na zestaw 29.088 transkryptów referencyjnych o łącznej długości 44.686.800 nukleotydów zmapowano odpowiednio: 16.530.673 fragmentów (łączna długość zmapowanych fragmentów: 1.645.771.149 nt) dla preparatu 1_399, 56.121.204 fragmentów (5.398.960.791 nt) dla preparatu 2_426 oraz 39.111.596 fragmentów (3.901.891.001 nt) dla preparatu 3_521. Liczbę transkryptów buraka cukrowego, do których zmapowały się odczyty uzyskane dla prób buraka ćwikłowego (przy zastosowanych parametrach mapowania: 60%,80%). Dla każdej z badanych roślin utworzono wykaz zaobserwowanych wariantów (w uproszczeniu: różnic sekwencji w porównaniu z transkryptami referencyjnymi).

W analizie uwzględniono możliwość wystąpienia błędów sekwencjonowania - wykorzystano współczynniki jakości utworzone w czasie sekwencjonowania, mapowania – do eliminacji/zredukowania tych błędów wykorzystywany był zaawansowany algorytm wbudowany w oprogramowanie bioinformatyczne. Częściowo uwzględniono też możliwość występowania w genomie kilku kopii niektórych genów różniących się między sobą.

W wyniku analizy zidentyfikowano do 172.710 potencjalnych wariantów różnicujących referencyjny transkryptom buraka cukrowego i badanej linii buraka ćwikłowego (tabela 2), co oznacza do 86.355 potencjalnych miejsc występowania zróżnicowania. Dla ponad 95% tych miejsc nie stwierdzano heterozygotyczności badanych roślin (399, 426 i 521). Oczywiście homozygotyczny charakter miały wszystkie pozostałe przeanalizowane nukleotydy (około 20.000.000 pojedynczych nukleotydów identycznych w transkrypcie referencyjnym i badanym).

Każdy chromosom był reprezentowany w analizie wariantów przez co najmniej 400 transkryptomów (genów lub ich fragmentów). Dla każdego z 9 chromosomów przeanalizowano co najmniej 4000 wariantów (SNV, MSV lub ins/del) pod względem homozygotyczności w badanej linii buraka ćwikłowego.

Temat badawczy 5

Podwajanie liczby chromosomów u roślin haploidalnych
Zastosowanie kolchicyny i innych czynników chemicznych

Celem zadania było zastosowanie na etapie regeneracji związków antymitotycznych w celu podwojenia liczby chromosomów u androgenetycznego materiału roślinnego.

Doświadczenie nad podwajaniem liczby chromosomów zostało przeprowadzone na etapie regeneracji *in vitro*. Rozety (20 rozet w każdej kombinacji, każda w osobnej probówce, a więc rozeta stanowi powtórzenie) zostały poddane działaniu w warunkach *in vitro* substancjom antymitotycznym: kolchicyny trifluraliny, amiprofos metylu (APM), oryzaliny. W tym celu zostały one przełożone w warunkach sterylnych do 20 probówek w obrębie każdego wariantu, kontrolnego, i pożywek z dodatkiem wyżej wymienionych związków antymitotycznych. Tegoroczne doświadczenie nad podwajaniem liczby chromosomów zaplanowano w oparciu o wnioski uzyskane w poprzednim roku. Zastosowane w zeszłym roku stężenia antymitotyków okazały się nie toksyczne dla rozet buraka. Jednocześnie procent roślin o podwojonym garniturze chromosomowym nie był wysoki w poszczególnych kombinacjach. Postanowiono 2x zwiększyć zastosowane poprzednio stężenia. Najlepsze

wyniki w zeszłorocznym doświadczeniu dała oryzalina, dlatego w jej przypadku wprowadzono trzy stężenia. Probówki z materiałem roślinnym zostały umieszczone w komorze wzrostowej w ciemności w temperaturze +18-20°C na okres 24 godz. Po tym czasie materiał został przeniesiony na pożywkę MS bez udziału związków antymitotycznych i następnie umieszczony w fitotronie w temperaturze +18-20°C przy oświetleniu 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, fotoperiodzie 16 godz. światła i 8 godzin ciemności. Po uzyskaniu wzrostu namnożeń do odpowiedniej objętości pozwalającej bez strat na pobór prób do badań cytometrycznych został wykonany ponowne badanie ploidalności w celu potwierdzenia skuteczności haploidyzacji przez związki antymitotyczne.

Warianty doświadczalne:

Na każdej pożywce po 20 rozet (każda rozeta w osobnej probówce - jest powtórzeniem).

1. kontrolny na pożywkę MS –
2. pożywki MS z dodatkiem APM - 100 $\mu\text{M}/\text{l}$
3. pożywki MS z dodatkiem trifluraliny - 100 $\mu\text{M}/\text{l}$
4. pożywki MS z dodatkiem oryzaliny - 75 $\mu\text{M}/\text{l}$
5. pożywki MS z dodatkiem oryzaliny - 100 $\mu\text{M}/\text{l}$
6. pożywki MS z dodatkiem oryzaliny – 125 $\mu\text{M}/\text{l}$
7. pożywki MS z dodatkiem kolchicyny - 50 $\mu\text{M}/\text{l}$

Zastosowane stężenia APM i Trifluraliny hamowały wzrost i rozwój potraktowanych nim rozet buraka ćwikłowego. W czasie, gdy z kombinacji kontrolnej i kombinacji z oryzaliną pobierano materiał do badań z ploidalności w kombinacji z APM i Trifluraliną nie było materiału roślinnego do badań ploidalności. Przeprowadzono więc kolejny pasaż na świeżą pożywkę namnażającą i w ponownej próbie znów nie uzyskano materiału do badań ploidalności. Wobec tego dokonano ponownego przełożenia kultur na świeżą pożywkę. Rozety kontrolne czyli nietraktowane antymitotykami okazały się w 100% diploidami. Po traktowaniu oryzaliną w badanych stężeniach 75 μM , 100 μM , 125 μM były w 100% diploidami. Natomiast po potraktowaniu kolchiciną 50 μM – 81,8% było haploidami. Wobec faktu, że rozety kontrolne były w 100% haploidami, co potwierdziło się też w badaniach w temacie czwartym przeprowadzono dodatkowe doświadczenie na odmianie Opolski stosując 3 kombinacje doświadczalne: traktowanie oryzaliną 75, 100, 125 $\mu\text{M}/\text{l}$ pożywki. Rozety kontrolne były w 100% haploidalne. Po zastosowaniu oryzaliny w stężeniu 75 μM uzyskano 80% rozet o podwojonym garniturze chromosomowym. Po potraktowaniu rozet oryzaliną w koncentracji 125 μM uzyskano 68,4% podwojonych haploidów. Natomiast przy użyciu oryzaliny w stężeniu 100 μM było tylko 11,8%.

Temat badawczy 6

Ocena cech użytkowych roślin gyno- i androgenetycznych

Celem zadania była ocena cech użytkowych roślin gyno- i androgenetycznych z zastosowaniem konwencjonalnych metod hodowlanych.

Otrzymane w 2015 roku nasiona z samozapylenia rośliny męskopłodnej i zapylenia jej pyłkiem roślin męskosterylnych zostały wysiane. Liczba roślin, które były oceniane zależała od liczby nasion, które wykiełkowały i wytworzy rośliny. Uzyskano trzy kwitnące rośliny. Roślina o numerze 6432 była męsko płodna, a rośliny o numerach 6430 i 6331 były męsko sterylne. Roślinę męsko płodną samozapyłano, a rośliny męsko sterylne zapyłano pyłkiem rośliny 6432. Nasiona buraków uzyskane w roku 2015 posiano na polu w Raciborowicach na glebie czarnoziem zdegradowany, przy zastosowaniu efektywnych mikroorganizmów w dawce 40 l/ha w postaci Ema Farma plus. Uzupełniające nawożenie azotowe wykonano na podstawie aktualnej analizy gleby saletrą amonową w ilości 1,0q/ha. Nasiona buraków wysiano 07.07.2016r. Po siewie nasion zastosowano 3 razy herbicyd Kemifam w dawce 1,0

L/ha. Jeden raz rośliny przzerwano ręcznie i odchwaszczono. Profilaktycznie wykonano dwukrotnie oprysk preparatem Domark 100 EC 0,25 l/ha + Superam 0,2 l/ha przeciw chwościkowi burakowemu. Buraki wykopano 18.10.2016r. Pod koniec okresu wegetacji, przed zbiorem były oceniana część nadziemna czyli rozeta. Była to ocena wizualna pokroju rozety (wzniesiony, rozłożysty, półwzniesiony) i jej średnicy (duża, średnia, mała). Korzenie zostały ocenione po zbiorze. Były to następujące cechy: kształt wielkość zgubienia korzeniowego, obecność korka, gładkość skórki.

Oceniając liście trzech obiektów hodowlanych stwierdzono niewielkie różnice w ich wielkości. Nieco mniejszy od pozostałych był liść u obiekcie 6430, także kształt liścia był inny owalny gdzie u pozostałych kształt był trójkątny (obiekt 6431) lub trójkątnie owalny (obiekt 6432). U obiekcie 6431 ogonek liściowy zakwalifikowano jako gruby podczas gdy u pozostałych ogonek był średnio gruby. Pozostałe parametry tetry dla części nadziemnych były takie same dla wszystkich. Rozeta dla wszystkich obiektów miała pokrój półwzniesiony. Ocena cech użytkowych korzeni buraka roślin uzyskanych od trzech wyżej wymienionych obiektów wykazała że najmniej korka posiadały na swej powierzchni rośliny z obiektu 6432. Także rośliny te charakteryzowały się najbardziej gładką skórka. Rośliny z obiektu hodowlanego 6430 miały średnio największą średnicę głowy podczas gdy największą średnią średnicą korzenia charakteryzowały się rośliny uzyskane z obiektu 6431