



## Synteza mieszańców pomostowych w procesie wprowadzania genomów pszenic diploidalnych do pszenicy heksaploidalnej

Wojciech Sodkiewicz, Magdalena Majewska, Teresa Sodkiewicz  
Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

### Synthesis of bridging hybrids in the process of introduction of diploid wheat genomes into hexaploid wheat

#### Summary

Wild related species are a useful reservoir of valuable genes for widening the genetic base of wheat and for the reduction of the vulnerability of wheat cultivars to pathogens, fungal diseases and environmental hazards. In this work, the action of prezygotic and postzygotic incrossability barriers was characterized, determining the possibilities of direct introduction of  $A^m$ -genome from *Triticum monococcum* and D-genome from *Triticum tauschii* into *T. aestivum* cultivars, with elimination of commonly performed bridging hybridisation with tetraploid wheat. As gene recipient parents, Polish cultivars of hexaploid wheat cv. Omega, cv. Igna (spring) and cv. Tercja (winter) were used.

Application of wheat cultivars as female parents in hybridisation with *T. tauschii* yielded a very low percentage of effective pollination (0-1.2%). In reciprocal crosses prezygotic incompatibility barriers were more weakly expressed, and percentages of effective pollination (i.e. pollination which initiates the first steps of seed development) were from 28.3 to 32.4. The ability to form callus on MS medium supplemented with concentration ( $1 \text{ mg} \cdot \text{dcm}^{-3}$  IAA and  $1 \text{ mg} \cdot \text{dcm}^{-3}$  kinetine) negatively influenced direct  $F_1$ -plants regeneration.

Introduction of  $A^m$ -genome into common wheat cultivars can be performed exclusively using *T. monococcum* as a male parent because of pollen sterility caused by *T. monococcum* cytoplasm in hybrid progeny. After pollination of *T. aestivum* stigmas with pollen of *T. monococcum* the frequency of effective pollination was 1.2-4.9%. The most important factor influencing the results of *in vitro* culture was the lethality of young seedlings, caused by postzygotic gene incompatibility.

#### Key words:

wide crossing, incompatibility barriers, *T. monococcum*, *T. tauschii*, wheat.

#### Adres do korespondencji

Wojciech Sodkiewicz,  
Instytut Genetyki Roślin,  
Polska Akademia Nauk,  
ul. Strzeszyńska 34,  
60-479 Poznań;  
e-mail:  
wsod@igr.poznan.pl

**biotechnologia**

2 (53) 80-85 2001

## 1. Wstęp

Dziki, krewniacze gatunki są użytecznym rezerwuarem całego kompleksu genów mogących służyć dla poszerzenia puli genowej pszenicy heksaploidalnej i dla zmniejszenia podatności odmian uprawnych na choroby i stresy środowiskowe. Współczesne metody pokonywania barier niezgodności przy zastosowaniu stymulacji rozwoju zygot mieszańcowych oraz hodowli *in vitro* niedojrzałych zarodków umożliwiają skuteczną hybrydyzację z wieloma taksonami o znacznym stopniu genetycznego oddalenia. Jednak sterylność takich mieszańców utrzymująca się nawet w przypadku amfiploidyzacji i brak rekombinacji genetycznej pomiędzy pszenicznymi i obcymi chromosomami stanowią dużą przeszkodę dla przeniesienia genów. Dlatego dla realizacji konkretnych celów praktycznych największe znaczenie posiadają mieszańce z dzikimi gatunkami ancestralnymi lub krewniaczymi (mającymi wspólny genom z gatunkiem biorcą genów).

Dotychczasowe próby przeniesienia genów z gatunków takich jak *Triticum monococcum* ( $A^m A^m$ ) i *Triticum tauschii* (DD) z uwagi na bariery niezgodności z pszenicą heksaploidalną *Triticum aestivum* oparte były z reguły na krzyżowaniu wymienionych diploidów z pszenicą tetraploidalną jako formą pomostową. Jednak metoda ta, powoduje zarazem przeniesienie na poziom heksaploidalny materiału genetycznego pszenicy tetraploidalnej, o małym stopniu adaptacji do warunków klimatycznych Polski. W pracy przedstawiono próby podjęte w kierunku bezpośredniego włączenia genomów *T. monococcum* i *T. tauschii* do jarych i ozimych krajowych odmian pszenicy heksaploidalnej.

## 2. Materiały i metody

Jako gatunki rodzicielskie w krzyżowaniach stosowano: dwie formy pszenicy diploidalnej *T. monococcum*, reprezentujące pochodzący ze stanu naturalnego genom  $A^m$  (*T. m. var. nigricultum* Flaksb. i *T. m. var. macedonicum* Papag.), dwie formy *T. tauschii* (o numerach kolekcyjnych D51 i D98) reprezentujące genom D, oraz krajowe odmiany pszenicy heksaploidalnej: Omega, Igna (formy jare) i Tercja (f. ozima). Krzyżowanie przeprowadzono w warunkach szklarniowych. W terminie 10 dni po zapyleniu kontrolowano rozwój załazni w każdym zapylnym kwiecie odnotowując początkowe stadia rozwoju ziarniaka jako „liczbę skutecznych zapyleń” (SZ), a następnie po 18 dniach obserwowano możliwości rozwojowe ziarniaków określając „liczbę ziarniaków przeżywających do 18 dni” (ZP). W ziarniakach wyjmowanych z kłosów po tym terminie określano stopień rozwoju zarodka i endospermy. Hodowlę zarodków prowadzono na pożywce MS (1) w modyfikacji University of Manitoba dla zarodków zbóż (2). Różnice pomiędzy wariantami krzyżowania dotyczące skuteczności zapyleń oraz efektywności uzyskiwania zarodków mieszańcowych opracowano przy zastosowaniu testu zgodności  $\chi^2$ .



Kontrolę mieszańcowego pochodzenia wyhodowanych roślin  $F_1$  przeprowadzono metodą pomiaru zawartości DNA jądrowego (barwionego jodkiem propidyny) w komórkach liści przy użyciu cytometrii przepływowej.

### 3. Wyniki i dyskusja

W przypadku stosowania odmian pszenicy heksaploidalnej w charakterze form matecznych przygotowane bariery niekrzyżowalności w zapyleniach pyłkiem *T. tauschii* oddziaływały tak silnie, że wszystkie zapylenia kłosów odmiany Omega okazały się nieskuteczne, pomimo dużej liczby zapylnych kwiatów, a jedynie w odmianach Igna i Tercja uzyskano pojedyncze ziarniki (tab. 1A).

Znacznie wyższą częstość skutecznych zapyleń (ok. 140 x) uzyskiwano natomiast w odwrotnym kierunku krzyżowania, gdzie formy *T. tauschii* były roślinami matecznymi (tab. 1B). Taka relacja wzajemna zapyleń pozostaje w zgodzie z prawidłowościami ustalonymi dla interploidalnych krzyżowań pszenicy w których stwierdzono, że skuteczność zapyleń jest wyższa, kiedy rośliną mateczną jest gatunek z mniejszą liczbą chromosomów (w przeciwieństwie do zdolności kiełkowania ziarniaków, która lepsza jest w odwrotnym kierunku krzyżowania) (3-5).

Tabela 1

Skuteczność zapyleń i rozwój ziarniaków mieszańcowych w krzyżowaniach odmian pszenicy heksaploidalnej z diploidalnymi pszenicami z genomem  $A^m$  i D

Kombinacja krzyżowania	Liczba zapylnych kwiatów	Skuteczne zapylenia (SZ)		Ziarniki przeżywające powyżej 18 dni	
		liczba	(%)	liczba	(%)
<b>A.</b> Omega (6x) x D98(2x)	392	0	0,00	–	–
Omega (6x) x D51(2x)	265	0	0,00	–	–
Igna (6x) x D51(2x)	80	1	1,25	1	100,0
Tercja(6x) x D51(2x)	231	1	0,43	1	100,0
Razem pszenica (6x) x D(2x)	968	2	0,21	2	100,0
<b>B.</b> D98 (2x) x Omega (6x)	519	168	32,36	163	97,0
D51 (2x) x Omega (6x)	459	130	28,32	130	100,0
D98 (2x) x Tercja (6x)	430	132	30,70	130	98,5
Razem D (2x) x pszenica (6x)	1408	430	30,54	423	98,4
<b>C.</b> Omega (6x) x Tm16 (2x)	397	5	1,26	5	100,0
Tercja (6x) x Tm10 (2x)	364	18	4,95	18	100,0
Razem pszenica (6x) x Tm(2x)	761	23	3,02	23	100,0

Jednakże, nie można wykluczyć możliwości, że przedstawione różnice skuteczności zapyleń stanowią konsekwencję prawidłowości o bardziej specyficznym charakterze pojawiającej się w krzyżowaniach kozińców z pszenicami, bowiem wyraż-



nie wyższą liczbę ziarniaków mieszańcowych uzyskiwano również, wtedy gdy jako formy mateczne stosowano kozieńce *Aegilops juvenalis* i *Ae. triaristata* o heksaploidalnej, a zatem równej z pszenicą liczbie chromosomów (6,7).

Krzyżowanie *T. aestivum* z diploidalnymi dawcami genomu  $A^m$  (*T. monococcum*) wykonano stosując heksaploidalne pszenice uprawne jako formy mateczne, z uwagi na sterylizujące oddziaływanie cytoplazmy *T. monococcum* przy odwrotnym kierunku krzyżowania (8). Cytoplazma *T. monococcum* powoduje również wystąpienie chlorozy siewek, w efekcie oddziaływania z pojedynczym chromosomem z genomu B (9). Ogólnie, krzyżowania wykonane z udziałem pyłku *T. monococcum* były w istotnym stopniu skuteczniejsze od zapyleń pyłkiem *T. tauschii*, tak w ujęciu grupowym ( $\chi^2 = 21,77^{**}$ ) jak i w porównaniu ścisłym, analogicznych krzyżowań wykonanych na odmianie Tercja ( $\chi^2 = 7,90^{**}$ ). Zwraca również uwagę fakt, że jako forma mateczna, odmiana Tercja wykazywała istotnie wyższą zgodność z *T. monococcum* niż odm. Omega ( $\chi^2 = 7,59^{**}$ ), analogicznie jak to można było zauważyć w zapyleniach pyłkiem *T. tauschii*.

Postzygotyczne bariery niezgodności mieszańcowej przejawiały się w odmienny sposób w każdym z trzech typów wykonanych krzyżowań i miały istotne znaczenie dla otrzymywania mieszańców  $F_1$ . Z dwóch ziarniaków powstałych w rezultacie krzyżowania *T. aestivum* x *T. tauschii* tylko jeden posiadał zarodek (duży i zróżnicowany), który rozwinął się w roślinę mieszańcową. Drugi ziarniak natomiast posiadał obfite bielmo, ale bez zarodka (tab. 2A), co świadczy, że zapłodnienie i dalszy rozwój w tym wariantcie krzyżowania przebiegać mogą różnymi drogami.

Krzyżowania odwrotne – *T. tauschii* x *T. aestivum* spowodowały powstanie ziarniaków, które w ponad 90% przypadków zawierały zarodki. Wyraźnie dominował typ całkowicie bezbielmowego ziarniaka z zaawansowanym w rozwoju zarodkiem osiągającym etap różnicowania (tab. 2B). Cechą decydującą o możliwości otrzymywania roślin mieszańcowych, jak się okazało, była skłonność zarodków do kalusowania pomimo ich zaawansowania w rozwoju.

Próby włączenia genomu  $A^m$  z *T. monococcum* do pszenicy heksaploidalnej doprowadziły do powstania ziarniaków, z których wszystkie posiadały zarodki. W niektórych ziarniakach stwierdzono obecność zarodków bliźniaczych i stąd liczba zarodków wyłożonych na pożywki przekroczyła liczbę zebranych ziarniaków (tab. 2C). Kiedy pszenicą mateczną była odmiana Tercja, niektóre ziarniaki posiadały również rozwinięte bielmo. Decydujący wpływ na proces tworzenia mieszańców pomostowych o genotypie  $AA^mBD$ , miała ograniczona żywotność roślin  $F_1$ . Znaczna część zarodków, która podjęła rozwój na pożywce zamierała po pewnym okresie rozwoju i zjawisko to występowało także na etapie ukorzenionych już siewek.

Wyniki uzyskane w hodowli zarodków z krzyżowania *T. aestivum* x *T. monococcum* świadczą zatem, że również w przypadku stosowania *T. monococcum* jako partnera męskiego występują przejawy niezgodności, prowadzące, jak się okazało, do zamierania siewek mieszańcowych.

Tabela 2

Charakterystyka 18-dniowych ziarniaków mieszańcowych powstałych z krzyżowania pszenic heksaploidalnych z diploidalnymi pszenicami z genomem  $A^m$  i D

Kombinacja krzyżowania	Liczba		Stopień rozwoju w ziarniaku							Liczba	
	ziarniaków	wytworzonych zarodków	zarodka				endospermy			wyszczepionych zarodków	uzyskanych roślin $F_1$
			zarodek globularny	stadium torpedy	zarodek zróżnicowany		obfita	śladowa	brak		
					małe▲	duże▲▲					
<b>A.</b> Tercja x D51	1	0	-	-	-	-	1	-	-	0	-
Igna x D51	1	1	-	-	-	1	-	-	1	1	1
Razem psz.(6x) x D(2x)	2	1	-	-	-	1	1	-	1	1	1
<b>B.</b> D51 x Omega	130	129	-	11	59	59	-	-	129	62	10
D98 x Omega	163	155	2	14	67	72	-	7	155	154	2
D98 x Tercja	130	117	7	22	34	54	2	2	125	99	4
Razem D(2x) x psz.(6x)	423	401	9	47	160	185	2	9	409	315	16+
<b>C.</b> Omega x Tm16	5	5	3	2	-	-	-	1	4	5	0
Tercja x Tm10	18	23	12	11	-	-	15	-	3	23	4
Razem psz.(6x) x Tm (2x)	23	28	15	13	-	-	15	1	4	28	4

+ - rośliny powstałe bezpośrednio z rozwoju zarodka

▲ - inicjacja rozwoju skutelum + plumula

▲▲ - rozróżnione skutelum + oś zarodka

Blżej nieokreślone przyczyny wywołujące dużą śmiertelność roślin mieszańcowych, a także niedorozwój organów generatywnych u mieszańców z genomem  $A^m$  występowały również we wcześniejszych próbach wytworzenia takich mieszańców (10,11). Wydaje się jednak, że jest możliwe znalezienie partnerów o lepszej zgodności genowej (zcb. odm. Tercja). Fakt taki może mieć duże znaczenie dla prób transferu genów z całej grupy pszenic diploidalnych z genomem  $A^m$  (*T. urartu*, *T. boeoticum*, *T. monococcum*).

## Literatura

1. Murashige J., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
2. Kaltsikes P. J., Gustafson J. P., (1986), *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2-Crops*, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg.
3. Oehler E., (1934), *Züchter. Jg.*, Berlin, 205-211.
4. Wawakuwa S., (1934), *Japanese Journal of Bot.*, VII (1-2), 151-185.
5. Vavilov N. I., (1967), *Izbrannyye proizvedenia (Summa of works)*, Ed. Bachtcev F. H., 116-123, Nauka Press. Comp., Leningrad.



6. Stefanowska G., Tarkowski Cz., Gruszecka D., Prażak R., (1992), 13<sup>th</sup> EUCARPIA Congress, Angers, France, 271-273.
7. Prażak R., (1997), Zesz. Nauk. Akad. Rol. im. H. Kołłątaja w Krakowie, 318, 47-53.
8. Maan S. S., Lucken K. A., (1968), *Proc. Third Int. Wheat Genet. Symp.*, Eds. Finley K. W., Shephard K. W., 135-140, Canberra, Butterworths, Sydney, Australia.
9. Sodkiewicz W., (1997), *Rozprawy i Monografie*, 7, IGR PAN, Poznań.
10. Bijral J. S., Gupta B. B., Singh B., Sharma T. R., Kanwal K. S., (1990), *Z. Pflanzenzücht.*, 96, 271-278.
11. Gonzalez J. M., Bernard S., Bernard M., (1993), *Euphytica*, 68, 187-192.