



Ocena efektywności regeneracji wybranych linii podwojonych haploidów rzepaku ozimego (*Brassica napus* ssp. *oleifera*)

Anna Turczynowska, Zbigniew Broda

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy,
Poznań

Regeneration efficiency evaluation of selected rapeseed (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) doubled haploid lines

Summary

Regeneration is an important step in a process of obtaining valuable plants under *in vitro* conditions. The aim of the research was to characterize the regeneration efficiency of 14 rapeseed (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) doubled haploid lines which were supposed to reveal different tissue response under *in vitro* conditions. The plant material consisted of cotyledonous and hypocotylous explants placed on MS medium with the addition of 1mg/l and 0,1mg/l BAP. Regeneration efficiency evaluation was calculated on the basis of shoot regenerating explants number in relation to the total number of explants. The examined genotypes were characterized by varied regeneration ability and closely related DH lines with high and low regeneration efficiency were determined.

Key words:

regeneration ability, rapeseed, doubled haploids.

Adres do korespondencji

Anna Turczynowska,
Katedra Genetyki
i Hodowli Roślin,
Uniwersytet Przyrodniczy,
Poznań,
ul. Wojska Polskiego 71c,
60-625 Poznań;
e-mail:
anturczy@up.poznan.pl

1. Wstęp

Regeneracja jest istotnym etapem w procesie otrzymywania wartościowych roślin w kulturach *in vitro*. Warunkiem skutecznych systemów otrzymywania roślin w ten sposób jest ich zdolność do regeneracji. Zanalizowanie podłoża genetycznego regeneracji roślin pozwoliłoby na zwiększenie wydajności identyfika-

cji i selekcji genotypów wykorzystywanych w badaniach genetycznych i programach hodowlanych.

Określenie regionów chromosomowych, a tym samym genów mających prawdopodobny wpływ na zdolność do regeneracji w kulturze *in vitro* jest możliwe dzięki wykorzystaniu nowoczesnych metod diagnostycznych. Należą do nich m.in. hybrydyzacje subtrakcyjne oparte na analizie porównawczej genomowego DNA pochodzącego z roślin różniących się pod względem wybranej cechy. Metody te pozwalają na zidentyfikowanie różnic występujących pomiędzy badanymi genomami oraz na określenie podłoża genetycznego mającego wpływ na ujawnienie się cechy w fenotypie.

W strategii hybrydyzacji subtrakcyjnej zakłada się, że porównywane genomy pochodzą od bardzo podobnych jednakże odmiennych pod względem wybranej cechy, przy czym blisko ze sobą spokrewnionych roślin tzw. linii bliskoizogenicznych (NIL, ang. *Near Isogenic Lines*). Są to linie otrzymane w wyniku wielokrotnego samozapylecia roślin mieszańcowych pochodzących z krzyżowania osobników o odmiennej charakterystyce danej cechy. Uzyskanie takich linii zajmuje ok. 8 do 9 lat. Przygotowanie materiałów odpowiednich do prowadzenia badań z wykorzystaniem hybrydyzacji subtrakcyjnej jest zatem pracochłonne i czasochłonne.

Istotne, jak się wydaje, jest poszukiwanie rozwiązań, które pozwoliłyby zastąpić dotychczas wykorzystywane modele badawcze i znaleźć alternatywę dla obecnych zastosowań. Sposobem na osiągnięcie tego celu, jak się wydaje, jest wykorzystanie roślin haploidalnych, w tym również podwojonych haploidów różnych gatunków uprawnych (w tym również rzepaku ozimego), których metody otrzymywania są bardzo dobrze rozpoznane i opracowane. Rośliny DH otrzymuje się w ciągu dwóch pokoleń, przy czym charakteryzują się one bardzo wysoką homozygotycznością materiału genetycznego.

Celem pracy było określenie efektywności regeneracji czternastu linii podwojonych haploidów rzepaku ozimego (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) na pożywkach o określonym składzie regulatora wzrostu. Badanie miało także na celu wyselekcjonowanie blisko spokrewnionych ze sobą linii o wysokiej i niskiej efektywności regeneracji, mogących posłużyć jako materiał do analiz podłoża genetycznego cechy zdolności do regeneracji z zastosowaniem hybrydyzacji subtrakcyjnej.

2. Materiały i metody

Materiałem wykorzystanym w badaniu było czternaście linii DH rzepaku ozimego wykazujących zróżnicowane zdolności regeneracyjne w warunkach kultury *in vitro*. Linie otrzymano z kultur pylnikowych odmian hodowlanych Wotan, Kana, Marita i Bor oraz mieszańca pojedynczego pomiędzy liniami DH-O-120 i C-1041 dzięki współpracy z Instytutem Hodowli i Aklimatyzacji Roślin oddział w Poznaniu. Pochodzenie otrzymanych linii pogrupowanych wg spokrewnienia przedstawiono w tabeli 1.

Tabela 1

Pochodzenie oraz grupy spokrewnienia 14 linii podwojonych haploidów rzepaku ozimego

Pochodzenie	Otrzymane linie DH
WOTAN	W-15, W-69, W-70, W-78, W-131
KANA	K-5, K-24
MARITA	Mr-2, Mr-5
BOR	B-18, B-21
Mieszaniec pojedynczy DH-O-120 x C-1041	H-105, H-129, H-396

W doświadczeniu tym użyto dwóch typów eksplantatów, tj. hypokotyli i liścieni. Eksplantaty pozyskiwano z sześciodniowych siewek rzepaku ozimego. W celu ich otrzymania odkażano powierzchniowo nasiona wymienionych linii rzepaku wg standardowych procedur (płukanie w podchlorynie sodu rozcieńczonym z wodą destylowaną w stosunku 1:5 przez 5 minut), przemywano 3-krotnie wodą destylowaną i wysiewano na podstawowej pożywce MS (1) zawierającej niezbędne składniki organiczne i sole mineralne. Nasiona kiełkowano w odpowiednich warunkach naświetlenia (16-godzinne oświetlenie o natężeniu 4500 lux), temperatury (24°C) i wilgotności w pokoju hodowlanym.

Eksplantaty pobierano z młodych siewek po upływie 5 dni. Uzyskane eksplantaty inkubowano ponownie na pożywce MS, zależnie od układu doświadczenia z dodatkiem 6-benzyloaminopuryny (BAP) w ilości 1mg/l i 0,1mg/l. Kontrolę stanowiła pożywka MS bez dodatku regulatora. Regulator wzrostu BAP przechowywano w postaci roztworu 70% alkoholu etylowego i dodawano do pożywki tuż przed jej rozlaniem na płytki. W każdej płytce umieszczano po trzy eksplantaty pochodzące z pojedynczej siewki, w tym dwa liścienie i hypokotyl. Kombinacja obejmowała 5 płytek w każdym z pięciu powtórzeń, a zatem 15 wyłożonych eksplantatów na powtórzenie. Ogółem wyłożono 3150 eksplantatów w tym 1050 eksplantatów hypokotylowych i 2100 eksplantatów liścieniowych.

Obserwacji regeneracji dokonywano po 28. dniach kultury. Genotypową zdolność do regeneracji określano na podstawie stosunku liczby eksplantatów regenerujących pędy do ogółu wyłożonych eksplantatów. Efektywność regeneracji stanowił iloraz liczby eksplantatów o uformowanych pędach do liczby założonych eksplantatów wg wzoru $E = R/T \times 100\%$, gdzie E to efektywność regeneracji, R – liczba eksplantatów regenerujących pędy, T – ogólna liczba eksplantatów (2).

W celu określenia istotności różnic w regeneracji na pożywkach pomiędzy spokrewnionymi ze sobą liniami wykonano test t Welcha dla dwóch prób o nierównej wariancji. W hipotezie zerowej zakładano równość średnich dla obu prób, a zatem brak istotnych różnic w efektywności regeneracji pomiędzy dwoma badanymi liniami, natomiast w hipotezie alternatywnej, że średnie z tych prób istotnie się różnią.

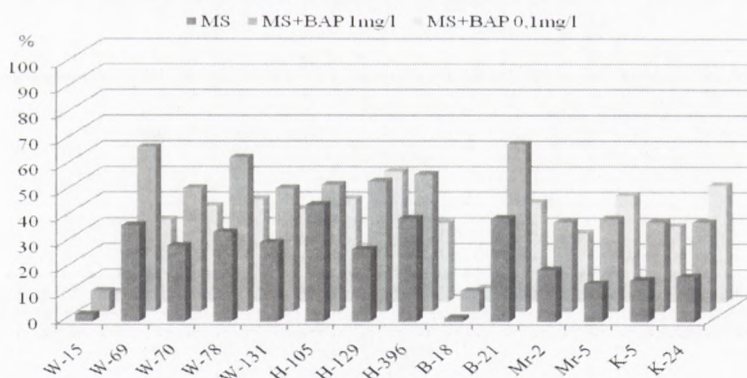
Za pary linii o odmiennej charakterystyce regeneracji na pożywkach MS zawierających BAP w dwóch różnych stężeniach przyjęto linie, dla których średnia efektywność regeneracji z obu badanych typów pożywek różniła się istotnie od siebie.

3. Wyniki i dyskusja

Z danych literaturowych wynika, że zdolność do regeneracji jest determinowana przez genotyp, warunki środowiska (pożywka, regulatory wzrostu, czynniki fizyczne), stadium rozwojowe rośliny, jej kondycję oraz interakcje zachodzące pomiędzy tymi czynnikami (3). Na regenerację komórek roślinnych w kulturze *in vitro* wpływ mogą wywierać również różne czynniki genetyczne zależnie od odmiany czy pochodzenia. Genotypy mogą charakteryzować się także różnymi wymaganiami, co do składu pożywki. Reakcja eksplantatów na zastosowane warunki kultury *in vitro* może być bardzo odmienna. Te same linie czy odmiany utrzymywane w tych samych warunkach często nie dają całkowicie powtarzalnych wyników (4,5), co może wynikać ze specyficznych wymagań pojedynczych roślin, co do warunków kultury *in vitro* oraz większej lub mniejszej zdolności do regeneracji poszczególnych genotypów. Warto jednak zauważyć, że regulatory wzrostu i rozwoju oraz interakcje czynników środowiskowych (np. światło, temperatura, pH, regulatory wzrostu,) wykazują mniejszy wpływ na zdolność do regeneracji niż genotyp (5).

W obrębie analizowanych linii DH zaobserwowano zróżnicowanie genotypowe dotyczące efektywności regeneracji na zastosowanych pożywkach, co przedstawiono na wykresie.

Pożywką na której linie pochodzące z odmiany Wotan wykazywały najwyższą zdolność do regeneracji była pożywka MS zawierająca dodatek regulatora wzrostu BAP w ilości 1 mg/l. Najwyższą średnią efektywność regeneracji roślin z tej grupy na



Wykres. Efektywność regeneracji (%) 14 linii podwojonych haploidów rzepaku ozimego (*Brassica napus* ssp. *oleifera*) na pożywkach MS z dodatkiem regulatora wzrostu BAP o stężeniu 1 i 0,1 mg/l.

tej pożywce zaobserwowano dla linii W-69 wynoszącą 64%. Nieco niższą średnią efektywność na tej samej pożywce zaobserwowano w linii W-78 wynoszącą 60%. Linie W-70 oraz W-131 charakteryzowały się tą samą średnią efektywnością regeneracji wynoszącą na pożywce zawierającej BAP w stężeniu 1 mg/l – 48%. Najniższą natomiast efektywność regeneracji wykazała linia W-15, która wynosiła 8%. Odpowiednio efektywność regeneracji dla tych linii na pożywce MS zawierającej 0,1 mg/l BAP wynosiła 32% dla linii W-69, ok. 37% dla linii W-70, 40% dla linii W-78, 36% dla linii W-131 i tylko 4% dla linii W-15. W przeprowadzonym teście t Welcha potwierdzono istotność różnic w regeneracji na zastosowanych pożywkach pomiędzy linią W-15 a pozostałymi liniami z tej grupy.

Zróżnicowanie pod względem zdolności do regeneracji zaobserwowano także między liniami B18 i B21, których efektywność regeneracji wahała się dla pierwszej z nich w przedziale od ok. 5 do 8% na pożywkach MS z dodatkiem BAP w ilości 0,1mg/l oraz z dodatkiem BAP w stężeniu 1mg/l, a dla drugiej od ok. 39 do ok. 65% na tych samych pożywkach. Jednakże na bazie testu t Welcha nie potwierdzono istotności różnic w regeneracji pomiędzy tymi liniami jednocześnie dla obu pożywek. Linie Mr-2 i Mr-5 nie wykazały istotnego statystycznie zróżnicowania zdolności regeneracyjnych na żadnej z zastosowanych pożywek, co również dotyczy linii K-5 i K-24. Na zastosowanych pożywkach efektywność regeneracji linii H-105, H-129 i H-396 pochodzących z mieszańca pojedynczego DH-O-120xC-1041 mieściła się w zakresie od ok. 31 do ok. 53% i również nie różniła istotnie od siebie. Wyniki testu t Welcha dla wszystkich analizowanych linii DH przedstawiono w tabeli 2.

Tabela 2

Analiza zróżnicowania zdolności do regeneracji linii DH rzepaku. Zastosowano test t Welcha

Test t Welcha dla dwóch prób	Poziom istotności $\alpha = 0,05$	
	pożywka MS + BAP 1 mg/l	pożywka MS + BAP 0,1 mg/l
1	2	3
W-15 x W-69	0,002896*	0,000882*
W-15 x W-70	0,002570*	0,0016*
W-15 x W-78	0,0003456*	0,000164*
W-15 x W-131	0,001966*	0,005279*
W-69 x W-70	0,2067	0,4248
W-69 x W-78	0,729	0,1720
W-69 x W-131	0,2009	0,6015
W-70 x W-131	1	0,6784
W-70 x W-78	0,2217	0,871
W-78 x W-131	0,2097	0,596
H-105 x H-129	0,82	0,02290*

1	2	3
H-105 x H-396	0,6259	0,4524
H-129 x H-396	0,7584	0,3642
B-18 x B-21	4,848e-05*	0,005811
Mr-2 x Mr-5	0,05307	0,8387
K-5 x K-2	0,6962	0,05908

*gwiazdką zaznaczono istotność różnic na poziomie $\alpha = 0,05$.

Linie W-69, W-70, W-78 i W-131 charakteryzowały się najwyższymi zdolnościami regeneracyjnymi w grupie podwojonych haploidów pochodzących od odmiany Wotan. Podobnie wysoką efektywnością regeneracji charakteryzowała się linia B-21. Linie W-15 i B-18 wykazały najniższą średnią efektywność regeneracji wynoszącą dla obu podwojonych haploidów 4,89%. W wyniku testowania statystycznego, tylko linia W-15, jak się okazało, była istotnie różna pod względem zdolności do regeneracji od pozostałych linii z grupy bliskiego spokrewnienia.

Na podstawie uzyskanych wyników doświadczeń wykazano, że pary blisko ze sobą spokrewnionych podwojonych haploidów: W-15xW-69, W-15xW-70, W-15xW-78, W-15xW-131 mogą stanowić materiał do przeprowadzenia na nich analiz molekularnych z zastosowaniem hybrydyzacji subtrakcyjnej, ponieważ tylko one okazały się istotnie różne pod względem zdolności regeneracyjnych na zastosowanych pożywkach.

Przeprowadzone doświadczenie w warunkach *in vitro* było w pełni kontrolowane pod względem warunków temperatury, oświetlenia i składu chemicznego podłoża. Zaobserwowane podczas doświadczenia różnice w efektywności regeneracji oraz zakres zmienności tej cechy mogą wskazywać na ważne zróżnicowanie genotypowe wśród testowanych linii. Dzięki uzyskanym wynikom można przypuszczać, że genotyp w istotny sposób wpływa na regenerację, co pozostaje w zgodzie z wcześniejszymi doniesieniami o zdolności regeneracji eksplantatów kawy (6), *Primula ssp.* (7), *Triticum ssp.* (8) i trzciny cukrowej (9).

4. Podsumowanie

Doświadczenie to pozwoliło zaobserwować zróżnicowanie genotypowe wśród testowanych roślin oraz wyselekcjonować linie DH charakteryzujące się wysoką i niską zdolnością do regeneracji na zastosowanych pożywkach, przy czym właściwość ta została zachowana w kolejnych powtórzeniach eksperymentu. Zdolność eksplantatów roślinnych do regeneracji jest jednak cechą złożoną, na którą wpływ mają różne czynniki zarówno genetyczne jak i środowiskowe. Dlatego też wyselekcjonowane linie zostaną wykorzystane do przeprowadzenia na nich bardziej wnikli-

wych analiz z zastosowaniem metod subtrakcyjnych. Prowadzenie dalszych szczegółowych badań jest konieczne dla lepszego zrozumienia mechanizmów regeneracji eksplantatów roślinnych rzepaku w warunkach kultury *in vitro*.

Literatura

1. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 437-497.
2. Zandecka-Dziubak J., Łuczkiwicz T., (2000), *Rośliny Oleiste – Oilseed Crops*, XXI (2), 615-620.
3. Bolibok H., Rakoczy-Trojanowska M., (2006), *Euphytica*, 149, 73-83.
4. Broda Z., (1984), *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Rozprawy Naukowe*, 140, 1-42.
5. Wojciechowski A., (1998), *Roczniki Akademii Rolniczej w Poznaniu. Rozprawy Naukowe*, 289, 1-58.
6. Molina M. D., Aponte E. M., Cortina H., Moreno G., (2000), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 71, 117-123.
7. Schween G., Schwenkel H. G., (2003), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 72, 53-61.
8. Zale J. M., Borchardt-Wier H., Kidwell K. K., Steber C. M., (2004), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 76, 277-281.
9. Gandonou L., Errabii T., Abrini J., Idaomar M., Chibi F., Skali S., (2005), *African Journal of Biotechnology*, 4, 1250-1255.