



Kultura mikrospor rzepaku ozimego (*Brassica napus* L.) w połączeniu z innymi technologiami *in vitro*

Teresa Cegielska-Taras, Laurencja Szala, Iwona Bartkowiak-Broda
Zakład Roślin Oleistych, Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin,
Poznań

Microspore culture of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.) in conjunction with other *in vitro* technologies

Summary

Microspore culture in conjunction with other technologies such as selection, mutagenesis and transformation has been used for the production of novel genotypes of *Brassica napus* L. for crop improvement. The example of *in vitro* selection of microspore – derived embryos includes: a) ploidy level, b) seed oil composition (for example: high level of erucic acid), c) genotypes with restorer gene for CMS-*ogura* system (by means of isozyme marker PGI-2), d) herbicide resistant forms. Efficiency of microspore mutagenesis has been done by the treatment of freshly isolated microspores with UV and MNU. Direct delivery of foreign gene to the microspores (microprojectile bombardment) combined with the use of *Agrobacterium tumefaciens* to microspore derived embryos seems to be a promising way of oilseed rape transformation.

Key words:

microspore culture, *in vitro* selection, *in vitro* mutagenesis, gene transfer, *Brassica napus*.

Adres do korespondencji

Teresa Cegielska-Taras,
Zakład Roślin Oleistych
Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
ul. Strzeszyńska 36,
60-479 Poznań;
e-mail:
tceg@nico.ihar.poznan.pl

1. Wprowadzenie

Od prawie czterdziestu lat (1) metoda otrzymywania roślin z haploidalnych komórek gametofitu męskiego (mikrospor) umożliwiającą uzyskanie całkowicie homozygotycznych form z heterozygotycznego materiału w ciągu jednego pokolenia, fascynuje genetyków oraz hodowców. Indukowanie haploidów z mikro-

spor jest jedną z atrakcyjnych dróg otrzymywania dużej liczby haploidalnych roślin, a po podwojeniu liczby chromosomów uzyskania podwojonych haploidów (DH). Pierwsze linie podwojonych haploidów rzepaku, pozwalające na zastosowanie w praktyce uzyskiwano z kultur pylnikowych, ale w ograniczonej ilości (2,3). Dopiero wprowadzenie i rozwój metody kultury izolowanych mikrospor (4-6) umożliwiły dysponowanie dowolną liczbą haploidów oraz podwojonych haploidów w cyklu hodowlanym oraz w badaniach i manipulacjach genetycznych. Kultura mikrospor rzepaku ozimego oferuje także inne biotechnologiczne możliwości.

2. Androgeniza *in vitro* rzepaku ozimego

Hodowla haploidów i podwojonych haploidów zaczyna się od wyboru dawcy mikrospor i zazwyczaj początek bierze od ręcznego przepylecia dwóm starannie wyselekcjonowanych form. Z izolowanych mikrospor tego mieszańca otrzymuje się tyle androgenicznych roślin, ile wymagają potrzeby badawcze bądź hodowlane. Ten proces androgenizacji *in vitro* dla rzepaku ozimego składa się z czterech etapów: a) izolacji mikrospor, b) podwojenia liczby chromosomów *in vitro*, c) embriogenezy *in vitro*, d) konwersji *in vitro* zarodków w rośliny lub regeneracji *in vitro* roślin poprzez wtórną embriogenezę. Podstawowym warunkiem wykorzystania systemu haploidalnego jest dysponowanie wydajną metodą uzyskiwania roślin podwojonych haploidów (5). Najpierw opracowano system stymulowania embriogenezy mikrospor rzepaku ozimego (rys. 1) oraz regeneracji roślin z zarodków mikrosporowych (MDE) poprzez wtórną embriogenezę (7-9). Dalszym udoskonaleniem było wprowadzenie metody kolchicynowania *in vitro* mikrospor zaraz po ich izolacji (10-12). Rośliny otrzymane z mikrospor traktowanych kolchicyną na tym etapie są zdrowe i rozwijają się prawidłowo w porównaniu do form traktowanych kolchicyną w fazie młodych roślin. Dużym usprawnieniem było zastosowanie metody pozwalającej na otrzymywanie roślin bezpośrednio z zarodków mikrosporowych (6,13).

W pracy przedstawiono przykłady łączenia kultury izolowanych mikrospor z innymi metodami stosowanymi na poziomie *in vitro*, głównie w oparciu na prowadzonych badaniach nad rzepakim ozimym w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR. Dla uzyskania nowych pożądaných genotypów *Brassica napus* są wykorzystywane technologie *in vitro* takie jak: selekcja, mutageniza oraz wprowadzanie obcego DNA bezpośrednio do mikrospor lub androgenicznych zarodków.

3. Selekcja *in vitro*

Jednym ze strategicznych celów współczesnej hodowli roślin jest wydajne skrócenie czasu tworzenia nowych form hodowlanych, a szczególnie najdłuższego etapu hodowli – selekcji genotypów o pożądaných cechach. Rozwój zarodków z mikro-

spor stwarza warunki do manipulowania dużą populacją przy stosunkowo niewielkim koszcie i nakładzie pracy. Wczesna identyfikacja i możliwość eliminacji zarodków o niepożądanych cechach, szczególnie w przypadku rzepaku ozimego, bardzo obniża koszty uzyskania właściwej linii DH. Jedynie wybrane formy doprowadzane są do uzyskania roślin, które następnie kwitną i zawiązują nasiona. Na poziomie *in vitro* prowadzona jest selekcja zarodków mikrosporowych: a) o podwojonej liczbie chromosomów, b) o zmienionym składzie ilościowym kwasów tłuszczowych oleju, c) posiadających gen restorer dla systemu CMS-*ogura*, d) odpornych na herbicyd, a uzyskanych z mutowanych mikrospor.

3.1. Selekcja zarodków o podwojonej liczbie chromosomów

U *Brassica napus* 70-80% roślin otrzymanych z mikrospor jest haploidalne (14). Zastosowanie kolchicynowania *in vitro* mikrospor rzepaku umożliwia otrzymywanie około 80-90% diploidów (11,12). Przy masowym uzyskiwaniu DH możliwość selekcji diploidów już we wczesnych stadiach rozwoju zarodka, przy zastosowaniu ilościowego oznaczenia jądrowego DNA metodą cytometrii przepływowej, bardzo usprawnia i przyspiesza otrzymywanie linii DH (15). Wczesna identyfikacja i możliwość eliminacji haploidalnych zarodków z procesu hodowlanego, szczególnie w przypadku rzepaku ozimego, są bardzo korzystne. Okres jaryzacji młodych roślin trwa bowiem około 7-8 tygodni. Natomiast identyfikacja haploidalnych zarodków na poziomie *in vitro* przy wczesnej selekcji pożądanego genotypu (np. wykazującego obecność markera genu restorera), pozwala na kolchicynowanie otrzymanych z nich już młodych roślin (przed kwitnieniem) co skraca czas uzyskiwania nasion z wybranych form.

3.2. Selekcja zarodków o zmienionym składzie ilościowym kwasów tłuszczowych oleju

Zarodki androgeniczne rzepaku w określonym stadium rozwoju są w przemianach metabolicznych odpowiednikiem zarodków zygocytynych (z nasion) i są wykorzystywane do selekcji na zawartość poszczególnych kwasów tłuszczowych (12,16-18). Selekcja *in vitro* zarodków otrzymanych metodą izolowanych mikrospor z wysokoerukowych, a zarazem niskoglukozynolanowych form rzepaku ozimego na zawartość kwasu erukowego (C22:1) w oleju, pozwoliła dokonać wyboru genotypów o wysokiej zawartości C22:1 (19). Procentowe zawartości C22:1 w liścieniach zarodków mikrosporowych (rys. 3) i w nasionach uzyskanych z tych samych linii DH wykazywały wysoką wartość współczynnika korelacji ($r = 0,78$), (12).

3.3. Selekcja zarodków z genem restorerem dla systemu CMS-ogura

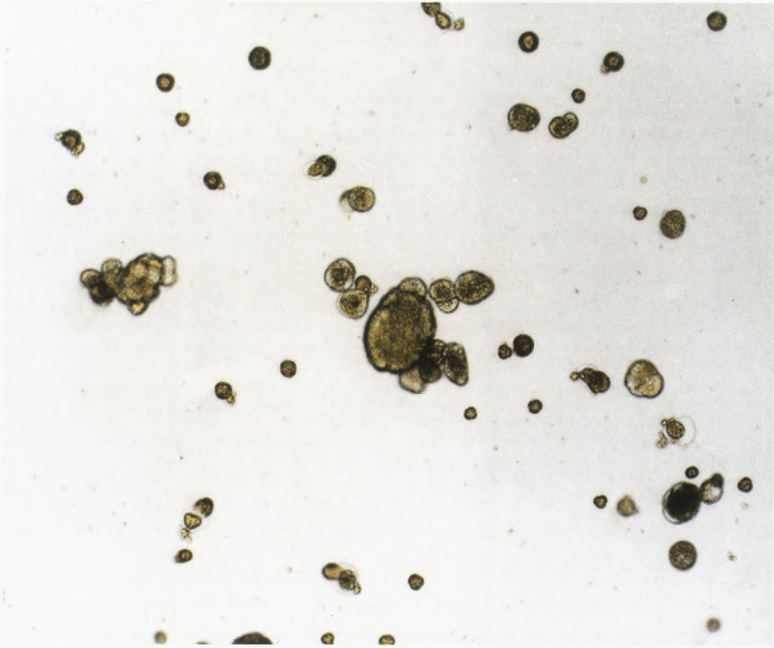
We współpracy z Pracownią Heterozji Zakładu Roślin Oleistych metodę otrzymywania DH wykorzystuje się w programie selekcji niskoglukozynolanowych form rzepaku ozimego z genem restorerem dla genowo-cytoplazmatycznej męskiej niepłodności CMS-ogura. Gen restorer przeniesiony do genotypu rzepaku z genomu rzodkwi jest bowiem ściśle sprzężony z jednym z genów warunkujących wysoką zawartość niepożądanych związków siarkowych – glukozynolanów. Silne sprzężenie markera izoenzymatycznego fosfoglucoizomerazy (PGI w drugim obszarze aktywności) z genem restorerem znalazło zastosowanie w hodowli odmian mieszańcowych do identyfikacji linii restorerów (20). Wykorzystując ten fakt możliwa jest selekcja linii DH o pożądanym genotypie już na etapie *in vitro* zarodków otrzymanych z kultury izolowanych mikrospor rzepaku (21). Częstotliwość występowania markera PGI-2 wskazująca na obecność genu restorera identyfikowana w MDE u różnych mieszańców jest inna. Do dalszej kultury *in vitro* i hodowli doprowadzane są tylko formy androgeniczne wykazujące obecność genu restorera (rys. 2).

3.4. Selekcja zarodków odpornych na herbicyd, a uzyskanych z mutowanych mikrospor

Prowadzenie kultury *in vitro*, np. mikrosporowych zarodków na pożywce z dodatkiem czynnika selekcyjnego jest łatwym sposobem selekcji pozytywnej. Możliwy jest zatem do przeprowadzenia wybór z bardzo dużej populacji androgenicznych zarodków poświadczonych form. W ten sposób uzyskano rzepak odporny przede wszystkim na substancje czynne herbicydów (22). Mutageneza *in vitro* mikrospor w połączeniu z selekcją *in vitro* zarodków rozwijających się ze zmutowanych mikrospor rzepaku stanowi wydajny system otrzymywania zróżnicowanych form rzepaku (23). W Zakładzie Roślin Oleistych prowadzone są badania nad otrzymaniem odpornych na herbicyd linii DH rzepaku ozimego poprzez poddanie mutacji mikrospor i prowadzenie w kulturze na pożywce selekcyjnej androgenicznych zarodków (24).

4. Mutageneza *in vitro*

Mutageneza mikrospor daje liczne korzyści w stosunku do mutagenezy nasion w tworzeniu zmienności w programach hodowlanych. Traktowanie mutagenem pojedynczej, całkowicie zdolnej do rozwoju haploidalnej komórki mikrospory, przedstawia jedyną w swoim rodzaju sposobność dla selekcji haploidów ujawniających działanie dominujących i recesywnych alleli. Dodatkowo, bezpośredni rozwój zarodka z mikrospory rzepaku pozwala uniknąć wielu problemów związanych z genetyczną niestabilnością i tworzeniem się chimericznych struktur, jak to się zdarza



Rys. 1. Embriogeneza mikrospor rzepaku ozimego.



Rys. 2. Elektroforetyczny obraz systemu izoenzymatycznego PGI-2 dla zarodków: R R – homozygota z genem restorerem, r r – homozygota bez genu restorera.



Rys. 3. Zarodek mikrosporowy rzepaku ozimego przed pobraniem (A) i po pobraniu (B) liścieni do analizy na zawartość kwasu erukowego.

w przypadku heterozygotycznych poliploidów. Technika ta wykorzystywana jest do otrzymania linii rzepaku odpornych na herbicyd (23,25) oraz zmian w ilościowym składzie kwasów tłuszczowych, np. podwyższenie do 70,4% zawartości kwasu oleinowego w oleju (26). Indukcję zmienności genetycznej rzepaku ozimego prowadzi się poprzez mutagenезę *in vitro*: a) mikrospor naświetlanych promieniami UV, b) mikrospor traktowanych mutagenem chemicznym NMU (nitrozometylomocznik). Opracowano i opisano metodę indukcji mutacji promieniami UV oraz NMU mikrospor zaraz po ich izolacji (24).

5. Wprowadzanie obcego DNA bezpośrednio do mikrospor bądź zarodków mikrosporowych

Mikrospory rzepaku o dużym potencjale regeneracyjnym są bardzo korzystnym obiektem transformacji. Obcy gen wprowadzany jest do komórki o haploidalnym zestawie chromosomów, a po zabiegu kolchicynowania uzyskuje się natychmiast homozygotę. Możliwa jest genetyczna transformacja mikrospor *Brassica napus* poprzez mikrowstrzeliwanie (27,28) oraz przy użyciu *Agrobacterium tumefaciens* (29). Większość prowadzonych badań nad wykorzystaniem mikrospor do transformacji dotyczy rzepaku jarego. Natomiast niewiele jest prac zakończonych powodzeniem w odniesieniu do rzepaku ozimego. Optymalizacja warunków wprowadzania obcego DNA do mikrospor rzepaku ozimego w celu polepszenia wydajności uzyskanych transformowanych zarodków mikrosporowych jest bardzo ważnym zadaniem, gdyż częstotliwość pozytywnego wyniku w eksperymentach z wprowadzaniem obcego DNA jest nadal niewielka. W Zakładzie Roślin Oleistych podjęto badania nad wprowadzaniem do izolowanych mikrospor rzepaku ozimego obcego DNA metodą mikrowstrzeliwania oraz kokultury młodych zarodków z *Agrobacterium tumefaciens*. Opracowywane są metody prowadzenia kultur mikrospor, stymulacji embriogenezy oraz organogenezy po wprowadzeniu obcego DNA.

Literatura

1. Guha S., Maheshwari S. C., (1964), Nature (London), 204, 497.
2. Keller W. A., Armstrong K. C., (1978), Z. Pflanzenzucht., 80, 100-108.
3. Nałęczyńska A., Cegielska T., (1984), Genet. Polon., 25, 217-276.
4. Lichter R., (1982), Z. Pflanzenphysiol., 105, 427-434.
5. Nałęczyńska A., Cegielska T., Szała L., (1995), Rośliny Oleiste, XVI, 43-46.
6. Cegielska-Taras T., Szała L., (1998), Rośliny Oleiste, XIX, 2, 353-357.
7. Loh C. S., Ingram D. S., Hanke D. E., (1983), New. Phytol., 95, 349-358.
8. Nehlin L., Möllers C., Glimelius K., (1995), Plant Science, 111, 219-227.
9. Cegielska-Taras T., Szała L., (1997), Rośliny Oleiste, XVIII, 21-30.
10. Chen Z. Z., Synder S., Fan Z. G., Loh W. H., (1994), Plant Breed., 113, 217-221.
11. Möllers C., Iqbal M. C. M., Röbbelen G., (1994), Euphytica, 75, 95-104.

12. Cegielska-Taras T., Szała L., Nałęczyńska A., Kołodziej K., Ogrodowczyk M., (1999), *J. Appl Genet.*, 40, 305-315.
13. Kott L. S., Beversdorf W. D., (1990), *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 23, 187-192.
14. Chen J. L., Beversdorf W. D., (1992), *Plant Cell, Tissue Organ Culture*, 31, 141-149.
15. Cegielska-Taras T., Szała L., Trybus M., (1999), *Rośliny Oleiste*, XX, 1, 11-18.
16. Wiberg E., Rählen L., Hellmann M., Tillberg E., Glimelius K., Stymne S., (1991), *Theor. Appl. Genet.*, 82, 515-520.
17. Albrecht S., Möllers C., Röbbelen G., (1994), *J. Plant Physiol.*, 143, 526-529.
18. Albrecht S., Möllers C., Röbbelen G., (1995), *Plant Breed.*, 1114, 210-214.
19. Cegielska-Taras T., Szała L., Nałęczyńska A., Kołodziej K., Ogrodowczyk M., (1999), *Rośliny Oleiste*, XX, 243-249.
20. Delourme R., Eber F., (1992), *Theor. Appl. Genet.*, 85, 222-228.
21. Cegielska-Taras T., Szała L., Gazecka B., Liersch A., Popławska W., Bartkowiak-Broda I., (1997), *Zeszyty Naukowe Akademii Rolniczej, Kraków*, 250, 325-328.
22. Huang B., (1992), *In Vitro Cell. Dev. Biol.*, 28P, 53-58.
23. Ahmad I., Day J. P., MacDonald M. V., Ingram D. S., (1991), *Annales of Botany*, 67, 521-525.
24. Cegielska-Taras T., Szała L., Krzymański J., (1999), *Proceedings of 10th International Rapeseed Congress*, Canberra, Australia CD-ROM.
25. Swanson E. B., Herrgesell M. J., Amoldo M., (1989), *Theor. Appl. Genet.*, 78, 525-530.
26. Turner J., Facciotti D., (1990), *Proc. 6th Crucifer Genetics Workshop*, 24, Eds. McFerson J. R., Kresovich S., Dwyer S. G, USDA ARS Geneva, NY.
27. Fukuoko H., Ogawa T., Matsuoka M., Ohkawa Y., Yano H., (1998), *Plant Cell Reports*, 17, 323-328.
28. Nehlin L., Möllers C., Bergman P., Glimelius K., (1999), in: *Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences*, Uppsala, Acta Universitatis Agriculture Sueciae. Agraria 140.
29. Dormann M., Wang H. M., Datt N., Ferrie A. M. R., Keller W. A., Oelck M. M., (1995), *Proceedings of 9th International Rapeseed Congress*, Ed. Murphy D., Cambrige, 3, 816-818.