



Próby indukowania haploidów żyta (*Secale cereale* L.) metodą kultur pylnikowych

Zbigniew Broda, Sylwia Mikołajczyk

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Akademia Rolnicza im. Augusta Cieszkowskiego, Poznań

The induction of haploids of rye (*Secale cereale* L.) by the anther culture

Summary

Haploid plants are often used for genome mapping, to induce mutations and also for the production of homozygous plants. They are also needed in heterosis breeding. Androgenesis is one of the methods of their obtainment. The study focused on the development of induction haploid plants and double haploid lines of rye.

In the experiment, seven varieties of rye were used: Amilo, Dańkowskie Nowe, Dańkowskie Złote, Kier, Motto, Walet, Warko. The seedlings were vernalised at natural conditions or in the refrigerator. Plants were grown in the greenhouse. Spikes with pollen at the uninucleate stage were harvested and stored at 4°C in the dark for 48 hours.

The influence of the varieties and the medium used on the androgenesis was tested. Modified N₆ and potato medium were used. Anthers were cultivated in the dark for 4 weeks at 28°C. Very low incidence of callus-producing plants (0,0-0,3%) and of any regenerated plants was observed.

Key words:

rye, anther culture, haploid.

Adres do korespondencji

Zbigniew Broda,
Katedra Genetyki
i Hodowli Roślin,
Akademia Rolnicza
im. Augusta Cieszkowskiego,
ul. Wojska Polskiego 71C,
60-625 Poznań.

1. Wstęp

Haploidy są to rośliny o liczbie chromosomów charakterystycznej dla gamet danego gatunku. Znajdują one szereg zastosowań w badaniach genetycznych dotyczących mutacji, mapowania genomów oraz poszukiwania markerów. Można je również

wykorzystywać w hodowli heterozyjnej roślin do otrzymywania linii podwojonych haploidów będących homozygotami. Stosując klasyczne metody hodowli roślin, takie jak chów wsobny, do otrzymania linii homozygotycznych potrzeba kilku lat. Wykorzystując techniki kultur *in vitro* możemy uzyskać te linie nawet w ciągu roku.

W ostatnich latach wzrasta znaczenie haploidów w hodowli takich gatunków jak: pszenica, pszenżyto, jęczmień, rzepak, tytoń i wielu innych. Jedną z metod ich otrzymywania jest androgeneza, do której wykorzystuje się techniki kultur pylników i izolowanych mikrospor. Celem przeprowadzonego eksperymentu było opracowanie metodyki uzyskiwania roślin haploidalnych żyta.

2. Materiał roślinny i metodyka

Materiał badawczy stanowiło siedem odmian żyta ozimego (*Secale cereale* L.): Amilo, Dańkowskie Nowe, Dańkowskie Złote, Kier, Motto, Walet, Warko, z których losowo wybrano około 300 genotypów. Siewki były jarowizowane w naturalnych warunkach przez dwa miesiące (listopad, grudzień) lub w chłodziarni w temperaturze 1°C przez 8 tygodni. Dalszy wzrost roślin odbywał się w szklarni. Kłosa z mikrosporami w stadium jednojądrowym traktowano obniżoną temperaturą (4°C przez 48 h).

Losowo wybrane kwiatostany z poszczególnych odmian odkażano w 6% podchlorynie sodu przez 5 min, a następnie dwukrotnie płukano w wodzie destylowanej sterylnej. Z kłosek izolowano pylniki i umieszczano w płytkach Petriego o średnicy 5 cm w liczbie 40-50 sztuk. Kultury pylników prowadzono stosując pożywki N₆ (1) oraz pożywki ziemniaczane (P₄ i W₅) z modyfikacjami (2) (tab. 1).

Tabela 1

Skład pożywek indukcyjnych stosowanych do kultur pylników żyta

Składnik	Pożywka		
	N ₆ (1) (mg/l)	P ₄ (2) (mg/l)	W ₅ (2) (mg/l)
1	2	3	4
KNO ₃	2830	1150	1500
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	–	100	–
(NH ₄) ₂ SO ₄	–	100	250
KH ₂ PO ₄	400	200	200
KCl	–	35	–
CaCl ₂ · 2H ₂ O	166	–	80
MgSO ₄ · 7H ₂ O	185	125	100
Na ₂ – EDTA	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8	27,8	27,8
MnSO ₄ · 4H ₂ O	4,4	–	5
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	1,5	–	2
H ₃ BO ₃	1,6	–	2
KJ	0,8	–	1
glicyna	2,0	–	2
tiamina – HCl	–	1,0	1

1	2	3	4
pirydoksyna – HCl	–	–	0,5
kwask nikotynowy	0,5	–	0,5
glutamina	–	200	–
IAA	–	1,5	–
2,4 – D	–	–	1,0
picloram	–	–	1,0
kinetyna	–	0,5	–
sacharoza	–	90 000	–
maltoza	–	–	90 000
ekstrakt ziemniaczany	–	100	100

3. Wyniki

Kalus oraz embrioidy tworzyły się na wyłożonych pylnikach po sześciu tygodniach prowadzenia kultury. W prowadzonych kulturach pylników żyta najkorzystniejsza do indukcji androgenozy okazała się pożywka ziemniaczana W₅ (2) (tab. 1), na której najlepiej regenerowały embrioidy i kalus odmiany Amilo. Pozostałe dwie pożywki nie powodowały indukcji androgenozy. Na wyłożonych ogółem 5250 pylników (na każdą pożywkę 1750 pylników) zaledwie 9 z nich podjęło rozwój w warunkach *in vitro*. Otrzymano kalus oraz embrioidy, z których niestety nie udało się zregenerować roślin (tab. 2).

Tabela 2

Wpływ odmiany oraz pożywki na indukcję androgenozy w kulturach pylników żyta

Odmiana	Pożywka indukcyjna					
	N ₆		P ₄		W ₅	
	Liczba wyłożonych pylników	Procent powstałych embrioidów i kalusów (%)	Liczba wyłożonych pylników	Procent powstałych embrioidów i kalusów (%)	Liczba wyłożonych pylników	Procent powstałych embrioidów i kalusów (%)
Amilo	250	0	250	0	250	0,3
Dańkowskie Nowe	250	0	250	0	250	0,1
Dańkowskie Złote	250	0	250	0	250	0,1
Kier	250	0	250	0	250	0
Motto	250	0	250	0	250	0
Walet	250	0	250	0	250	0
Warko	250	0	250	0	250	0

4. Dyskusja

Efektywność androgenezy zależy od szeregu czynników, a głównie od: genotypu, stadium rozwojowego mikrospor, warunków wzrostu roślin donorowych i traktowania wstępnego kłosów oraz składu pożywki.

W wielu pracach podkreśla się decydujące znaczenie genotypu dla przebiegu kultur *in vitro*. Już w pierwszych artykułach dotyczących indukowania haploidów u żyta (*Secale cereale* L.) zaobserwowano niski odsetek regenerujących roślin, z których na dodatek liczne są albinotyczne, np. Wenzel i in. (3) z 84 000 wyłożonych na pożywki pylników otrzymali 68 roślin, z czego 61 albinotycznych. W omawianej pracy wykorzystano siedem podstawowych odmian żyta ozimego, z których losowo wybrano około 300 genotypów. Ich potencjał regeneracyjny jest zróżnicowany, ale można powiedzieć, że raczej niski. W związku z bardzo niskim odsetkiem regenerujących eksplantatów w przeprowadzonym eksperymencie trudno wnioskować, która z siedmiu badanych odmian ma zdolności androgenne. W wielu innych doświadczeniach dotyczących otrzymywania haploidów z różnych genotypów *Secale cereale* zaobserwowano bardzo duże trudności w indukowaniu androgenezy (3-6).

Kolejnym czynnikiem decydującym o powodzeniu androgenezy u żyta są warunki wzrostu roślin donorowych i traktowanie wstępne kłosów. W dyskutowanej pracy wykorzystano dwie metody jarowizacji: w warunkach naturalnych oraz z wykorzystaniem chłodziarek. Czas działania niskiej temperatury był identyczny – 8 tygodni. Rośliny dalej rosły w szklarni lub w warunkach polowych. Flehinghaus i in. (6) wskazują jako optymalny dla roślin czas wernalizacji wynoszący 10 tygodni w temperaturze 2°C, przy czym jarowizacja poniżej 8 tygodni powoduje słabe kłoszenie oraz niską reakcję pylników w kulturach *in vitro*. Jarowizacja i dalszy wzrost roślin donorowych z cytowanej pracy przebiegały w ściśle kontrolowanych warunkach. Z kolei Daniel (7) jako korzystniejsze warunki do wernalizacji wskazuje temperaturę 4°C przez 14 tygodni, a dalszy wzrost roślin odbywał się w niższych temperaturach niż stosowane przez Flehinghaus-Roux i in. (6). Deimling i Flehinghaus-Roux (8) wskazują na bardzo silny wpływ temperatury na androgenezę i podkreślają, że zdolności regeneracyjne spadają drastycznie w miesiącach maj – wrzesień, kiedy nie można regulować temperatury w szklarni.

Kłosa w odpowiedniej fazie rozwojowej poddawano działaniu niskiej temperatury (4°C przez 48-72 h). Wenzel i in. (9) traktowali kłosa temperaturą 6°C przez 6 do 10 dni, a Daniel (7) oraz Flehinghaus-Roux i in. (10) stosowali temperaturę 4°C przez 7 dni. Z kolei Orlikowska (4) oraz Wenzel i Thomas (11) nie poddawali kłosów działaniu niskiej temperatury twierdząc, że czynnik ten nie wpływa na androgenezę.

W prezentowanej pracy wykorzystano pylniki znajdujące się w stadium mikrospor średnio- i późnojednojądrowych wzorując się między innymi na pracy Flehinghaus-Roux i in. (10).

Kolejnym czynnikiem decydującym o przebiegu regeneracji w kulturach pylników żyta jest pożywka. Z wszystkich zastosowanych najkorzystniejsza, jak się oka-

zało, jest pożywka W_5 (2) zawierająca ekstrakt ziemniaczany oraz maltozę jako źródło węgla organicznego. Wadą jej jest ekstrakt ziemniaczany ponieważ jego standaryzacja nie jest możliwa, a skład trudny do ustalenia. Na pożywce N_6 stosowanej przez Wenzla i in. (9) nie zaobserwowano tworzenia się kalusa lub embrioidów, podobnie jak na pożywce P_4 (2).

Do najważniejszych czynników decydujących o przebiegu androgenezy należą: genotyp, warunki wzrostu roślin donorowych i traktowanie wstępne kłosów, stadium rozwojowe mikrospor, skład pożywki oraz warunki prowadzenia kultury. Warunkiem wykorzystania każdej techniki kultur *in vitro* w hodowli jest jej prostota, wysoka efektywność oraz niskie koszty. Czynnikiem ograniczającym wykorzystanie kultur pylników żyta do uzyskiwania haploidów i linii podwojonych haploidów, a dalej w hodowli heterozyjnej, są przede wszystkim niska efektywność androgenezy oraz wysoki udział roślin z defektami chlorofilowymi.

Literatura

1. Chu C. C., (1978), Proc. Symp. Plant Tissue Culture. Science, Peking, 45-50.
2. Konzak C. F., Zhou H., (1991), Cereal Research Comm., 19, 147-164.
3. Wenzel G., Hoffmann F., Thomas E., (1976), Theor. Appl. Genet., 48, 205-208.
4. Orlikowska T., (1977), Genetica Polonica, 18, 1, 51-58.
5. Sharma G. C., Wen Chung Wang, Sapra V. T., (1982), Cereal Research Comm., 10, 3-4, 143-150.
6. Flehinghaus-Roux T., Deimling S., Geiger H. H., (1991), Plant Cell Reports, 10, 397-400.
7. Daniel G., (1993), Plant Breeding, 110, 259-261.
8. Deimling S., Flehinghaus-Roux T., (1997), *Haploidy in rye*, in: *In vitro Haploid Production in Higher Plants*, Eds. Sopory S. K., Veilleux R. E., Kluwer Academic Publishers, 4, 181-204.
9. Wenzel G., Hoffmann F., Thomas E., (1977), Theor. Appl. Genet., 51, 81-86.
10. Flehinghaus-Roux T., Deimling S., Geiger H. H., (1995), Plant Breeding, 114, 259-261.
11. Thomas E., Hoffmann F., Wenzel G., (1975), Z. Pflanzenzüchtg., 75, 106-113.