

„Badania nad zwiększeniem efektywności uzyskiwania haploidów w procesie androgenezy oraz optymalizacja parametrów otrzymywania podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego”.

Nr decyzji MRiRW: HORhn-801-8/14, zadanie nr 18

Kierownik: dr Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina

Wykonawcy: dr Aleksandra Ponitka, dr Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina, mgr Hanna Pudelska, mgr Jolanta Woźna

Zgodnie z harmonogramem prowadzono badania nad otrzymywaniem podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego poprzez modyfikacje pożywki indukującej androgenezę w kulturach pylnikowych oraz testowanie czynników, potencjalnie mających wpływ na efektywność kolchicynowania *in vivo*.

Cele projektu:

- 1) Badanie efektywności uzyskiwania roślin o podwojonej liczbie chromosomów pszenżyta ozimego i jarego w wyniku zastosowania kolchicyny w pożywce indukującej androgenezę w kulturach pylnikowych.
- 2) Ocena całkowitej efektywności otrzymania linii DH uzyskanych w warunkach *in vitro* spontanicznie, indukowanych kolchicyną w pożywce oraz w procesie kolchicynowania roślin haploidalnych pszenżyta ozimego i jarego.

Material i metody:

Z roślin 20 form mieszańcowych pszenżyta ozimego i 15 jarego pokolenia F₁ lub F₂ kłosa zawierające pylniki w stadium mikrospor umieszczano w roztworze wg pożywki N6 (Chu i wsp., 1975) z dodatkiem 2,0 mg/l 2,4-D, w temperaturze 4°C, przez 6 dni, w ciemności. Wykonano 4 następujące doświadczenia:

Doświadczenie 1. Pylniki z roślin 14 mieszańców pszenżyta ozimego wyłożono na pożywkę płynną oraz zestaloną agarozą C17 (Wang i Chen, 1983) + 0,5 mg/l kinetyny + 2,0 mg/l 2,4-D + 90 g/l maltozy.

Doświadczenie 2. Pylniki z roślin 10 mieszańców pszenżyta jarego wyłożono na pożywkę jak w doświadczeniu 1.

Doświadczenie 3. Pylniki z roślin 6 mieszańców pszenżyta ozimego wyłożono na pożywkę płynną C17 + 0,5 mg/l kinetyny + 2,0 mg/l 2,4-D + 90 g/l maltozy z dodatkiem 0,1 mg/l lub 1,0 mg/l kolchicyny przez 24, 48 i 72 godziny.

Doświadczenie 4. Pylniki z roślin 5 mieszańców pszenżyta jarego wyłożono na pożywkę jak w doświadczeniu 3.

Pylniki z pożywki zawierającej kolchicynę przenoszono na taką samą pożywkę bez kolchicyny i inkubowano w temperaturze 28°C, w ciemności. Androgeniczne struktury hodowano na pożywce regeneracyjnej 190-2 (Zhuang i Xu, 1983) z dodatkiem 1,0 mg/l kinetyny i 0,5 mg/l NAA oraz 30 g/l sacharozy, w temperaturze 22°C, przy oświetleniu 12 godzin na dobę. Poziom ploidalności androgenicznych roślin pszenżyta ozimego i jarego badano poprzez ocenę intensywności fluorescencji DNA w zawieszynie komórek liści z wykorzystaniem cytometru przepływowego (typ PARTEC). Efektywność uzyskiwania roślin o podwojonej liczbie chromosomów oceniono na podstawie badania poziomu ploidalności zregenerowanych roślin z pożywki zawierającej kolchicynę oraz z pożywki kontrolnej bez kolchicyny. Rośliny haploidalne form ozimych i jarych oraz wszystkie pozostałe regeneranty nie badane cytometrem traktowano roztworem 0,1% kolchicyny z dodatkiem 4% DMSO oraz 25 mg/l GA₃, w temperaturze 25°C. Zastosowano 4 warianty kolchicynowania haploidów (A, B, C, D) oraz 2 warianty dla pozostałych regenerantów (A i B):

wariant A – kolchicyna przez 6 godzin,
wariant B – kolchicyna przez 6 godzin + chłodzenie w temperaturze 2-4°C przez 5 dni,
wariant C – kolchicyna przez 8 godzin,
wariant D – kolchicyna przez 8 godzin + chłodzenie w temperaturze 2-4°C przez 5 dni.

Po wyflukaniu kolchicyny rośliny wysadzono do ziemi w celu osiągnięcia dojrzałości. Całkowita efektywność uzyskiwania linii DH może być oceniona dopiero w 2015 roku po zsumowaniu spontanicznie podwojonych haploidów (wyodrębnionych na podstawie badań cytometrycznych) oraz podwojonych po kolchicynowaniu haploidów.

Wyniki:

W dwóch pierwszych doświadczeniach badano wpływ pożywki C17 płynnej i zestalonej agarozą na indukcję androgenyzy i regenerację zielonych roślin w kulturach pylnikowych 14 form mieszańcowych pszenżyta ozimego oraz 10 form jarego. Wyłożono około 28000 pylników z form ozimych i stwierdzono na pożywce płynnej wyższą efektywność, zarówno androgenicznych struktur jak i zielonych roślin, a mianowicie z 9637 pylników otrzymano 8613 androgenicznych struktur tj. średnio 89,4/100 pylników (od 23,3 do 182,5 w zależności od genotypu) oraz 223 zielone rośliny tj. 2,3/100 pylników (od 0,2 do 5,4 w zależności od genotypu). Natomiast na pożywce zestalonej agarozą z 11679 pylników otrzymano 7322 androgenicznych struktur tj. średnio 62,7 /100 pylników (od 6,8 do 128,9 w zależności od genotypu) oraz 210 zielonych roślin tj. 1,8/100 pylników (od 0,3 do 5,7 w zależności od genotypu).

Z form jarych wyłożono około 25000 pylników i stwierdzono, podobnie jak w pszenżycie ozimym na pożywce płynnej, wyższą efektywność androgenicznych struktur, natomiast procent zielonych roślin był podobny na obu postaciach pożywki. Z 7810 pylników otrzymano 7031 androgenicznych struktur tj. średnio 90,0/100 pylników (od 8,6 do 342,5 w zależności od genotypu) oraz 195 zielone rośliny tj. 2,5/100 pylników (od 0,3 do 17,3 w zależności od genotypu). Natomiast na pożywce zestalonej agarozą z 8920 pylników otrzymano 5717 androgenicznych struktur tj. średnio 64,1 /100 pylników (od 6,0 do 239,2 w zależności od genotypu) oraz 242 zielonych roślin tj. 2,7/100 pylników (od 0,1 do 17,9 w zależności od genotypu). Obserwowano większe zróżnicowanie efektywności uzyskiwania struktur i roślin między poszczególnymi formami jarymi niż ozimymi. Notowano podobną średnią efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur i zielonych roślin, zarówno na pożywce płynnej, jak i zestalonej agarozą. Podsumowując wyniki uzyskane łącznie z pożywek stałej i płynnej, stwierdzono, również podobny poziom androgenicznych struktur (średnio 81,0/100 pylników) i zielonych roślin (2,4/100 pylników) dla form ozimych oraz dla jarych (odpowiednio 88,8 struktur i 2,7 roślin).

W dwóch kolejnych doświadczeniach badano wpływ kolchicyny w pożywce płynnej C17 na tworzenie podwojonych haploidów u 6 form mieszańcowych pszenżyta ozimego i 5 jarego. Zastosowano dwa stężenia kolchicyny (0,1 i 1,0 mg/l) przez 24, 48 i 72 godziny. Stwierdzono obniżanie efektywności tworzenia androgenicznych struktur oraz zielonych roślin pszenżyta ozimego stosując stężenie 1,0 mg/l kolchicyny przez 48 i 72 godziny, a szczególnie przez 72 godziny. Jednocześnie dłuższy czas stosowania kolchicyny powodował wzrost liczby roślin o podwojonej liczbie chromosomów we wszystkich badanych formach. Najwięcej podwojonych haploidów notowano stosując stężenie 1,0 mg/l kolchicyny przez 24 godziny oraz 0,1 mg/l przez 48 godzin. W tych warunkach uzyskano niższą efektywność androgenicznych struktur i zielonych roślin w porównaniu z kontrolą, jednak procent podwojonych haploidów był wyższy i wynosił średnio 66,2% (56,3 do 77,8% w zależności od genotypu). Ogółem na pożywki z kolchicyną z 6 form wyłożono 7150 pylników i uzyskano 6604 androgenicznych struktur (92,4/100 pylników) oraz 205 roślin (2,9/100 pylników). Przy użyciu cytometru zbadano 139 roślin, wśród których stwierdzono 92 rośliny o podwojonej liczbie chromosomów (tj. 66,2%), natomiast w warunkach kontrolnych (bez kolchicyny) poziom spontanicznie podwojonych haploidów wynosił 30,3%.

Z trzech form pszenżyta jarego nie udało się zregenerować roślin lub było ich bardzo mało i dlatego przedstawiono wyniki tylko dla 2 form. Podobnie jak w formach ozimych, przy wyższym stężeniu kolchicyny (1,0 mg/l) oraz czasie 72 godziny, obserwowano obniżenie efektywności otrzymywania androgenicznych struktur i zielonych roślin. Najwięcej podwojonych haploidów notowano stosując stężenia 0,1 oraz 1,0 mg/l kolchicyny przez 72 godziny. W tych warunkach stwierdzono podwyższenie ilości roślin o podwojonej liczbie chromosomów (odpowiednio w dwóch formach 60,6% i 40,9%) w porównaniu z kontrolą bez kolchicyny (średnio około 30,0%). Ogółem na pożywki z kolchicyną z dwóch form jarych wyłożono 2460 pylników i uzyskano 4333 androgenicznych struktur (176,1/100 pylników) oraz 130 roślin (5,3/100 pylników). Przy użyciu cytometru zbadano 55 roślin, wśród których stwierdzono 29 rośliny o podwojonej liczbie chromosomów (średnio 52,7%).

Poziom ploidalności losowo wybranych 469 roślin pszenżyta ozimego i 246 jarego oznaczono na podstawie analiz cytometrycznych. Uzyskano średnio 37,3% spontanicznie podwojonych haploidów (od 3,0 do 72,2% w zależności od genotypu) w 17 formach pszenżyta ozimego, natomiast w 9 formach pszenżyta jarego notowano średnio 32,9% spontanicznych podwojeń (od 15,4 do 56,4%).

Podsumowując wyniki, łącznie z pożywek stałej i płynnej, z pszenżyta ozimego i jarego otrzymano podobny poziom androgenicznych struktur z 20 form ozimych (średnio 81,0/100 pylników) i zielonych roślin (2,4/100 pylników) oraz z 15 form jarych (odpowiednio 88,8 struktur i 2,7 roślin). Obserwowano znacznie większe zróżnicowanie wyników dla poszczególnych form jarych (od 7,2 do 287,2 androgenicznych struktur/100 pylników oraz od 0,1 do 17,6 roślin/100 pylników) niż w ozimych (od 14,8 do 152,1 androgenicznych struktur/100 pylników oraz od 0,1 do 5,6 roślin/100 pylników).

Na podstawie analiz cytometrycznych wyodrębniono 279 haploidów ozimych i 155 jarych. Założono dwa doświadczenia, w których haploidy kolchicynowano wg wariantów A, B, C, D, natomiast regeneranty nieoznaczone (629 roślin = 264 ozimych oraz 361 jarych) kolchicynowano wg wariantów A i B. Aktualnie wszystkie rośliny, zarówno podwojone haploidy oznaczone cytometrycznie, jak i po kolchicynowaniu *in vivo* zostały wysadzone w szklarni (ozime po jaryzacji). Dopiero w 2015 roku, po osiągnięciu dojrzałości roślin, możliwa będzie ocena całkowitej efektywności uzyskiwania linii DH.

Wnioski:

1. Zastosowanie płynnej pożywki indukującej androgenezę zwiększyło efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur, zarówno form ozimych jak i jarych, w porównaniu z pożywką zestaloną agarozą. Zwiększenie efektywności otrzymywania androgenicznych struktur w płynnej pożywce nie jest jednak równoznaczne z podwyższeniem regeneracji roślin.
2. Wydaje się celowe stosowanie pożywki stałej indukującej andogenezę, ze względu na ryzyko infekcji w płynnych kulturach pylnikowych, w których również czasochłonne jest przekładanie na pożywkę regeneracyjną pojedynczych struktur.
3. Odpowiedni dobór stężenia kolchicyny i czasu traktowania w płynnych kulturach pylnikowych pozwala zwiększyć częstotliwość uzyskiwania regenerantów pszenżyta ozimego i jarego o podwojonej liczbie chromosomów, jednak stosowanie kolchicyny w pożywce obniża efektywność otrzymywania struktur i roślin.