

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

**Nr decyzji MRiRW:** HOR hn-801-PB-9/16, zadanie nr 18

**Kierownik:** dr Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina

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

Zgodnie z harmonogramem kontynuowano badania nad zastosowaniem kolchicyny w kulturach pylnikowych mieszańców pszenżyta ozimego i jarego oraz doświadczenia dotyczące kolchicynowania haploidów w warunkach *in vivo*.”

### **Cele projektu:**

- 1) Uzyskanie podwojonych haploidów z form mieszańcowych pszenżyta ozimego i jarego wybranych pod względem komponentów cechujących się skłonnością do androgenezy
- 2) Otrzymanie linii DH z mieszańców pszenżyta ozimego i jarego poprzez traktowanie roślin haploidalnych roztworem kolchicyny w warunkach *in vivo* oraz wybór optymalnych warunków podwajania liczby chromosomów.

### **Materiał i metody:**

Materiał doświadczalny stanowiły rośliny mieszańcowe pszenżyta ozimego i jarego: dwie formy ozime i dwie jare, w których stwierdzono najwyższą efektywność indukowania procesu androgenezy w 2015 roku (po jednej z Hodowli Roślin DANKO i Strzelce) oraz osiem form ozimych i osiem jarych wybranych na podstawie ich pochodzenia i komponentów niosących cechę skłonności do androgenezy (po cztery z Hodowli Roślin DANKO i Strzelce).

Ze wszystkich roślin mieszańcowych pszenżyta ozimego i jarego ścinano pędy z kłosami zawierającymi pylniki w stadium jednojądrowych mikrospor. Pędy umieszczano w roztworze mikro i makroelementów wg pożywki N6 (Chu i in. 1975) z dodatkiem  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  2,4-D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy), w temperaturze  $4^{\circ}\text{C}$ , przez 6 dni, w ciemności. Pylniki izolowano w sterylnych warunkach i wyłożono na pożywkę indukującą androgenezę, wybraną na podstawie dwuletnich doświadczeń: C17 (Wang, Chen 1983) zestaloną agarozą z dodatkiem  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  kinetyny,  $90 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  maltozy oraz  $2,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  2,4-D oraz  $1,0 \text{ mg/l}$  kolchicyny przez 24 godziny. Pylniki z pożywki zawierającej kolchicynę przeniesiono na pożywkę C17 bez kolchicyny. Wszystkie kultury pylnikowe inkubowano w temperaturze  $28^{\circ}\text{C}$ , w ciemności. Z każdej formy mieszańcowej wyłożono po około 3000 pylników - łącznie około 60000 pylników. Dla zregenerowania roślin wszystkie uzyskane struktury androgeniczne przełożono po 30 sztuk na szalki o średnicy 9 cm. Po 4 tygodniach kultur pylnikowych uzyskane androgeniczne struktury przenoszono na pożywkę regeneracyjną 190-2 (Zhuang, Xu 1983) z dodatkiem  $1,0 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  kinetyny i  $0,5 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$  NAA (kwas L-naftalenooctowy) oraz  $30 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$  sacharozy.

W 2015 roku najwyższą efektywność uzyskiwania podwojonych haploidów w procesie kolchicynowania androgenicznych struktur otrzymano na pożywce 190-2 z dodatkiem  $1,0 \text{ mg/l}$  kolchicyny stosowanej przez 24 godziny. W celu zweryfikowania ubiegłorocznych wyników struktury uzyskane z 2 form ozimych i 2 jarych (wybranych ze względu na wysoką efektywność indukcji androgenicznych struktur w 2015 roku) wyłożono w równej ilości na pożywkę regeneracyjną z dodatkiem kolchicyny i bez kolchicyny.

Po 24 godzinach struktury z pożywki z kolchicyną przeniesiono na pożywkę kontrolną. Wszystkie kultury androgenicznych struktur prowadzono w temperaturze 22°C, na świetle o natężeniu 80-100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  przez 12 godzin na dobę. Poziom ploidalności androgenicznych roślin pszenżyta ozimego i jarego badano poprzez ocenę intensywności fluorescencji DNA w zawiesinie komórek liści z wykorzystaniem cytometru przepływowego (typ PARTEC). Do badań pobierano fragmenty liści z regenerantów o wysokości około 15 cm, rosnących w ziemi w kontrolowanych warunkach. Efektywność uzyskiwania roślin o podwojonej liczbie chromosomów została określona na podstawie ilości otrzymanych androgenicznych struktur i zregenerowanych roślin po porównaniu wpływu pożywek – indukcyjnej i regeneracyjnej, zawierających kolchicynę z pożywkami kontrolnymi bez kolchicyny.

W czerwcu 2016 roku, po uzyskaniu dojrzałości roślin pszenżyta ozimego i jarego otrzymanych w doświadczeniach w 2015 roku zebrano kłosa z nasionami i na tej podstawie oceniono efektywność uzyskania linii DH w wyniku zastosowania kolchicyny zarówno w kulturach pylnikowych (*in vitro*) jak również w wyniku kolchicynowania haploidów (*in vivo*). Rośliny androgeniczne (1500 prób), otrzymane w kulturach pylnikowych w 2016 roku, oznaczono przy pomocy analiz cytometrycznych i po oddzieleniu spontanicznie podwojonych haploidów, poddano procesowi podwajania liczby chromosomów poprzez kolchicynowanie w warunkach wybranych na podstawie dwuletnich doświadczeń.

1. Połowę otrzymanych roślin haploidalnych form jarych, po przycięciu korzeni na długość 2 cm, zanurzano do wysokości 1,5 cm powyżej węzła krzewienia, w roztworze 0,05% kolchicyny z dodatkiem 2% DMSO (dimetylosulfotlenek) oraz 25  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  GA<sub>3</sub> (kwas giberelinowy), w temperaturze 25°C przez 6 godzin w temperaturze 25°C.

1a. Połowę otrzymanych roślin haploidalnych form ozimych, po przycięciu korzeni na długość 2 cm, zanurzano do wysokości 1,5 cm powyżej węzła krzewienia, w roztworze 0,1% kolchicyny z dodatkiem 4% DMSO (dimetylosulfotlenek) oraz 25  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  GA<sub>3</sub> (kwas giberelinowy), w temperaturze 25°C przez 6 godzin w temperaturze 25°C.

2. Drugą połowę haploidów zarówno jarych jak i ozimych poddano kolchicynowaniu na pożywce regeneracyjnej poprzez dolanie 0,05% roztworu kolchicyny z dodatkiem 2% DMSO (dimetylosulfotlenek) oraz 25  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  GA<sub>3</sub> na 6 godzin w temperaturze 25°C, a następnie rośliny zostały wypłukane pod bieżącą wodą.

Uwzględniając wyniki doświadczeń z 2014 i 2015 roku, po płukaniu roślin pod bieżącą wodą przez 24 godziny w celu usunięcia kolchicyny zastosowano dodatkowe chłodzenie wszystkich roślin w temperaturze 2-4°C przez 5 dni. W bieżącym roku, ostatecznie na podstawie wyników z dwóch poprzednich lat, wybrano dla form jarych niższe stężenie kolchicyny i DMSO natomiast dla form ozimych dwukrotnie wyższe stężenie obu związków. Haploidy ozime charakteryzują się lepszą żywotnością i przeżywalnością po zastosowaniu kolchicyny w porównaniu z roślinami jarymi, a ponadto wyższe stężenie roztworu kolchicyny użyte dla form ozimych wpływa na podwyższenie procentu linii DH. Następnie wszystkie kolchicynowane rośliny wysadzono do doniczek z ziemią w celu osiągnięcia dojrzałości.

### **Wyniki:**

Wyniki doświadczeń dotyczących zastosowania kolchicyny w pożywce C17 w stężeniu 1,0 mg/l przez 24 godziny potwierdzają trafność wyboru stężenia i czasu stosowania kolchicyny w pożywce indukującej proces androgenyzy. Na pożywce z dodatkiem kolchicyny stwierdzono nieznaczny spadek indukcji androgenicznych struktur i regeneracji zielonych roślin, zarówno w formach jarych jak i ozimych, w porównaniu z efektywnością na pożywce bez kolchicyny. Efektywność uzyskiwania zarówno struktur jak i roślin była również zbliżona

do ubiegłorocznych wyników i wynosiła średnio około 80% androgenicznych struktur oraz około 3,5% zielonych roślin.

W doświadczeniu dotyczącym zastosowania kolchicyny w pożywce regeneracyjnej 190-2 (dla struktur androgenicznych), prowadzonym na 4 formach ozimych i 4 jarych, stwierdzono prawie identyczną regenerację zielonych roślin na pożywce z dodatkiem kolchicyny i bez kolchicyny tj. średnio około 6,0% zarówno w formach ozimych jak i jarych. Analizy cytometryczne 996 roślin pobranych z 10 genotypów ozimych i 504 roślin pobranych z 10 genotypów jarych wykazały, średnio 28,5% podwojonych haploidów wśród roślin ozimych oraz 33,7% roślin DH wśród jarych. Ponadto odnotowano około 6,0% roślin aneuploidalnych, zarówno w formach ozimych jak i jarych.

Na podstawie badań prowadzonych w bieżącym roku na 5 formach ozimych i 5 jarych, charakteryzujących się najwyższą efektywnością indukcji i regeneracji w kulturach pylnikowych, stwierdzono że zastosowanie kolchicyny w pożywce indukcyjnej znacząco wpłynęło na uzyskiwanie podwojonych haploidów. Porównując efektywność uzyskiwania roślin DH z trzech różnych warunków: (1) pożywka C17 bez kolchicyny oraz pożywka 190-2 bez kolchicyny; (2) pożywka C17 z kolchicyną oraz pożywka 190-2 bez kolchicyny; (3) pożywka C17 bez kolchicyny oraz pożywka 190-2 z kolchicyną, stwierdzono najwyższy procent podwojonych haploidów zarówno w formach ozimych jak i jarych po zastosowaniu kolchicyny w pożywce indukcyjnej C17, (średnio około 40,0%; przy czym w zależności od genotypu 31,2-73,7% ozimych oraz 36,2-71,4% jarych,). Po dodaniu kolchicyny do pożywki regeneracyjnej 190-2 otrzymano mniej roślin DH tj. średnio około 35,0% (16,7-67,7% ozimych oraz 18,6-52,9% jarych,), natomiast najmniej podwojonych haploidów notowano w warunkach kontrolnych – bez kolchicyny w obu pożywkach C17 i 190-2 (średnio tylko 30,0% (27,1-52,6 ozimych i 27,1-42,9 jarych).

Ogółem z każdego genotypu wyłożono po około 3000 pylników (łącznie 60600), z których otrzymano 48362 androgenicznych struktur (79,8/100 pylników) oraz 2275 zielonych roślin (3,8/100 pylników) w tym: z 10 genotypów pszenżyta ozimego wyłożono 31200 pylników i otrzymano 19864 androgenicznych struktur (81,0/100 pylników) oraz 1386 zielonych roślin (4,4/100 pylników); z 10 genotypów pszenżyta jarego wyłożono 29400 pylników i otrzymano 23099 androgenicznych struktur (78,6/100 pylników) oraz 889 zielonych roślin (3,0/100 pylników).

Należy podkreślić, że rozwój androgenicznych struktur i regenerację zielonych roślin zaindukowano we wszystkich badanych genotypach, jednakże efektywność wahała się od 24,5 struktur do 161,7/100 pylników oraz od 0,3 do 10,3 roślin/100 pylników. Pomimo, że występowało znaczne zróżnicowanie w wydajności metody dla poszczególnych genotypów, to średnia efektywność indukcji androgenicznych struktur i regeneracji roślin była podobna u form ozimych i jarych i wynosiła odpowiednio około 80,0% struktur i około 3,5% roślin/100 pylników.

Analiza efektywności indukowania procesu androgenezy i regeneracji roślin w kulturach pylnikowych 2 form pszenżyta ozimego i dwóch jarego, badanych w 2015 i 2016 roku, wykazała powtarzalność wyników w procesie indukcji struktur androgenicznych. Natomiast efektywność regenerowania roślin różniła się w dwóch kolejnych latach, w dwóch formach była znacznie wyższa, a w dwóch pozostałych niższa, jednak androgeniczne rośliny otrzymano w obu sezonach.

Po uzyskaniu dojrzałości roślin pszenżyta ozimego i jarego wysadzonych do ziemi w 2015 roku oceniono efektywność uzyskania linii DH w wyniku zastosowania kolchicyny w kulturach *in vitro* oraz w warunkach *in vivo*. Ogółem z 643 roślin ozimych otrzymano 263 (40,9%) podwojonych haploidów, natomiast z 1150 roślin jarych otrzymano 535 (46,5%) linii DH. Rośliny DH bardzo rzadko wytwarzały kłosa całkowicie wypełnione ziarnem, większość kłosów miała ziarniaki osadzone w sektorach kłosa, a czasem tylko po kilka ziarniaków w

kłosisie. Stwierdzono, że efektywność uzyskania podwojonych haploidów zarówno pszenżyta ozimego jak i jarego była nieco wyższa gdy kolchicynę zastosowano w kulturach *in vitro* i wynosiła dla form ozimych średnio 21,6% (w zależności od genotypu od 9,1-50,0%) oraz dla form jarych 24,2% (od 8,8-53,3%), w porównaniu z kolchicynowaniem w warunkach *in vivo*, odpowiednio w formach ozimych – 19,3% (od 8,6-36,0%), oraz w jarych 22,3% (od 0-41,7%).

Analizując wyniki z 2015 roku, dotyczące kolchicynowania haploidów *in vivo* oraz *in vitro*, stwierdzono, że najczęściej podwojonych haploidów występowało w warunkach B tj. przy traktowaniu roślin na pożywce regeneracyjnej 0,05% roztworem kolchicyny przez 6 godzin z chłodzeniem w temperaturze 2-4°C przez 5 dni. Korzystniejsze było stosowanie kolchicyny w warunkach *in vitro* w porównaniu z warunkami *in vivo*.

W 2016 roku zastosowano dwa warianty kolchicynowania haploidów, wybrane jako najlepsze, na podstawie dwuletnich doświadczeń:

Dla form ozimych – wariant B (traktowanie roślinek *in vitro* roztworem kolchicyny 0,1% przez 6 godzin + chłodzenie) oraz wariant D (traktowanie roślin *in vivo* roztworem kolchicyny 0,1% przez 6 godzin + chłodzenie)

Dla form jarych – wariant B (traktowanie roślinek *in vitro* roztworem kolchicyny 0,05% przez 6 godzin + chłodzenie) oraz wariant D (traktowanie roślin *in vivo* roztworem kolchicyny 0,05 % przez 6 godzin + chłodzenie).

Kolchicynowano 647 haploidów ozimych i 304 jarych wyodrębnionych na podstawie analiz cytometrycznych 1500 roślin. Rośliny haploidalne podzielono na 2 części i poddano kolchicynowaniu w warunkach B i D. Pozostałe rośliny (390 ozimych i 385 jarych) nieoznaczone cytometrycznie kolchicynowano w warunkach D. Wszystkie rośliny po kolchicynie rosną w szklarni, przy czym przeżywalność ich wynosi około 80%. Zakładając powtarzalność wyników w latach 2015 i 2016 dotyczącą efektywności uzyskania androgenicznych struktur i roślin oraz linii DH, ściśle związaną z przeżywalnością roślin po kolchicynie, przewiduje się otrzymanie linii podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego na poziomie roku 2015 tj. około 50% w stosunku do wszystkich regenerantów.

#### **Wnioski:**

1. W kulturach pylnikowych form ozimych i jarych w dwóch kolejnych latach uzyskano podobną średnią efektywność androgenicznych struktur, zielonych roślin oraz linii DH, niezależnie od badanych genotypów, co świadczy o zoptymalizowaniu metody dla pszenżyta.
2. Najwyższą efektywność otrzymywania podwojonych haploidów, zarówno w formach ozimych jak i jarych w trzech kolejnych latach realizacji projektu, stwierdzono po zastosowaniu kolchicyny w stężeniu 1,0 mg/l w pożywce indukującej proces androgenezy.
3. W wyniku kolchicynowania haploidów *in vivo* najczęściej roślin DH zarówno ozimych jak i jarych uzyskano, gdy haploidy rosnące w pożywce regeneracyjnej traktowano 0,05% roztworem kolchicyny przez 6 godzin z dodatkowym chłodzeniem przez 5 dni.
4. Ze względów ekonomicznych wydaje się korzystniejsze zastosowanie kolchicyny w kulturach *in vitro* (w stężeniu 1,0%) zamiast traktowania roztworem kolchicyny otrzymanych roślin zielonych w warunkach *in vivo* (w stężeniu 1000 mg/l).
5. Stwierdzono, że jedynie suma podwojonych haploidów otrzymanych podczas stosowania kolchicyny, na różnych etapach hodowli pylników oraz kolchicynowanie *in vivo* haploidalnych roślin stwarza możliwość wytwarzania takiej ilości linii DH, która może być wykorzystywana w programach hodowlanych.

6. Na podstawie wyników z dwóch poprzednich lat można przypuszczać, że efektywność uzyskania podwojonych haploidów w roku 2016 będzie zbliżona do efektywności z 2015 roku, a mianowicie około 50-60% linii DH w stosunku do kolchicynowanych regenerantów.

**Materiały opublikowane:**

Ślusarkiewicz-Jarzina A., Pudelska H, Woźna J, Pniewski T. 2016. Improved production efficiency of doubled haploids of winter and spring triticales using combined in vitro and in vivo colchicine treatments. *J. Appl. Genet.* Nr DOI: 10.1007/s13353-016-0387-9.