

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

Nr decyzji MRiRW: HORhn-801-PB-22/15, zadanie nr 18

Kierownik: dr Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina

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

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

Cele projektu:

- 1) Określenie efektywności uzyskiwania roślin o podwojonej liczbie chromosomów pszenżyta ozimego i jarego w wyniku zastosowania kolchicyny w pożywce indukującej androgenezę oraz w pożywce regeneracyjnej.
- 2) Ocena efektywności otrzymania linii podwojonych haploidów w warunkach *in vivo*, w procesie kolchicynowania roślin haploidalnych pszenżyta ozimego i jarego.

Material i metody:

Materiałem doświadczalnym było 10 ozimych form mieszańcowych pszenżyta oraz 17 form jarych pochodzących ze Spółek Hodowli Roślin: DANKO-Choryń i Strzelce. Rośliny hodowano w szklarni stosując doświetlanie przez 8 godzin/dobę w temperaturze 22°C w dzień i 17°C w nocy. Ścinano pędy z kłosami zawierającymi pylniki z mikrosporami w stadium jednojądrowym z dużą wakuolą i umieszczano w roztworze mikro- i makroelementów według pożywki N6 (Chu i in., 1975) z dodatkiem auksyny 2,4-D (kwas 2,4 dichlorofenoksyoctowy) w stężeniu 2,0 mg/l, w temperaturze 4°C, przez 6 dni, w ciemności. Pylniki izolowano w sterylnych warunkach i wykładano na pożywkę indukującą androgenezę, wybraną na podstawie ubiegłorocznych doświadczeń: C17 (Wang, Chen 1983) zestaloną agarozą z dodatkiem 0,5 mg·dm⁻³ kinetyny, 90 g·dm⁻³ maltozy oraz 2,0 mg·dm⁻³ 2,4-D oraz 1,0 mg/l kolchicyny przez 24 godziny. Pylniki z pożywki zawierającej kolchicynę przenoszono na pożywkę C17 bez kolchicyny. Wszystkie kultury pylnikowe inkubowano w temperaturze 28°C, w ciemności. Z każdej formy mieszańcowej wyłożono po około 2250 pylników (łącznie około 60000 pylników). Dla zregenerowania roślin wszystkie uzyskane struktury androgeniczne przekładano po 30 sztuk na szalki o średnicy 9 cm.

Po 4 tygodniach kultury uzyskane androgeniczne struktury przenoszono na pożywkę regeneracyjną 190-2 (Zhuang, Xu 1983) z dodatkiem 1,0 mg·dm⁻³ kinetyny i 0,5 mg·dm⁻³ NAA (kwas L-naftalenoctowy) oraz 30 g·dm⁻³ sacharozy i hodowano w temperaturze 22°C, przy oświetleniu 80–100 μmoli fotonów m⁻²s⁻¹ przez 12 godzin. Z 5 form ozimych i 5 jarych (wybranych ze względu na wysoką efektywność indukcji androgenicznych struktur) uzyskane struktury umieszczano po połowie na pożywce regeneracyjnej z dodatkiem 1,0 mg/l kolchicyny przez 24 godziny oraz na pożywce bez kolchicyny. Następnie struktury z pożywki z kolchicyną przenoszono na pożywkę kontrolną bez kolchicyny. Wszystkie kultury androgenicznych struktur prowadzono w temperaturze 22°C, na świetle o natężeniu 80-100 μmol fotonów m⁻² s⁻¹ przez 12 godzin na dobę.

Poziom ploidalności androgenicznych roślin pszenżyta ozimego i jarego badano poprzez ocenę intensywności fluorescencji DNA w zawieszinie 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 w temperaturze 22/17°C, dzień/noc, przy oświetleniu 200 μmoli fotonów m⁻²s⁻¹ przez 12 godzin. Poziom indukcji androgenicznych struktur i regeneracji zielonych roślin określano w stosunku do liczby wyłożonych pylników. Efektywność uzyskiwania roślin o podwojonej liczbie chromosomów oceniano na podstawie badania poziomu ploidalności zregenerowanych roślin z pożywek C17 i 190-2 z kolchicyną, w odniesieniu do pożywki kontrolnej, bez kolchicyny.

W czerwcu 2015 roku zebrano kłosa z nasionami z roślin pszenżyta ozimego i jarego otrzymanych w doświadczeniach w 2014 roku. Oceniono efektywność uzyskania linii DH w wyniku zastosowania kolchicyny w pożywce C17 oraz w warunkach *in vivo*. Efektywność linii DH oznaczano w stosunku do wszystkich uzyskanych roślin androgenicznych.

W doświadczeniach przeprowadzonych w 2015 roku zastosowano następujące warunki kolchicynowania haploidów *in vivo*: (1) Połowę otrzymanych roślin haploidalnych form ozimych i jarych, po wyjęciu z ziemi i 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 $25 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ GA₃ (kwas giberelinowy), w temperaturze 25°C przez 6 godzin. (2) Drugą połowę haploidów poddano kolchicynowaniu na pożywce regeneracyjnej w probówkach poprzez dolanie na powierzchnię pożywki 0,05% roztworu kolchicyny na 6 godzin.

Wszystkie rośliny zarówno kolchicynowane w probówkach jak i wyjęte z ziemi płukano pod bieżącą wodą przez 24 godziny a następnie umieszczano w wodzie i chłodzono w temperaturze 2-4°C przez 5 dni.

Wyniki:

W doświadczeniu dotyczącym zastosowania kolchicyny w pożywce indukcyjnej C17 (w stężeniu 1,0 mg/l przez 24 godziny – wybranym na podstawie ubiegłorocznych badań) stwierdzono, że procent androgenicznych struktur i zielonych roślin był bardzo zbliżony w obu warunkach – z kolchicyną i bez, zarówno w formach jarych jak i ozimych. Uzyskano średnio około 90% androgenicznych struktur oraz około 3% zielonych roślin zarówno w formach ozimych jak i jarych. Prowadząc w bieżącym roku kultury pylnikowe 10 form ozimych i 17 jarych, potwierdzono trafność wyboru stężenia i czasu stosowania kolchicyny w pożywce indukującej proces androgenyzy w celu podwyższenia efektywności otrzymywania podwojonych haploidów. Zastosowanie kolchicyny w pożywce indukcyjnej nie obniżyło znacząco efektywności uzyskiwania androgenicznych struktur i regeneracji zielonych roślin, ale znacząco wpłynęło na uzyskanie roślin DH. Na podstawie analiz cytometrycznych 557 roślin pobranych z 5 genotypów ozimych i 533 roślin pobranych z 5 genotypów jarych stwierdzono, średnio 46,5% podwojonych haploidów wśród roślin ozimych oraz 36,8% roślin DH wśród jarych. Ponadto odnotowano po kilka procent roślin aneuploidalnych, odpowiednio 2,2% ozimych i 3,7% jarych. W doświadczeniu dotyczącym zastosowania kolchicyny w pożywce regeneracyjnej 190-2 obserwowano prawie identyczną regenerację zielonych roślin na pożywce z dodatkiem kolchicyny i bez kolchicyny tj. średnio około 5,0% w formach ozimych i około 7,0% w jarych. Można więc stwierdzić, że dodanie kolchicyny do pożywki regeneracyjnej nie zmniejsza efektywności otrzymywania zielonych roślin. Jednak porównując efektywność uzyskiwania roślin DH z trzech różnych warunków: (1) z pożywki C17 bez kolchicyny oraz pożywki 190-2 bez kolchicyny; (2) pożywki C17 z kolchicyną oraz pożywki 190-2 bez kolchicyny; (3) pożywki C17 bez kolchicyny oraz pożywki 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 55,0%; przy czym w zależności od genotypu 16,4-67,4% ozimych oraz 18,6-52,9% jarych). Po dodaniu kolchicyny do pożywki regeneracyjnej 190-2 otrzymano mniej roślin DH tj. średnio około 45,0% (od 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 36,5% wśród roślin ozimych i 24,4% wśród jarych).

Ogółem z 60430 pylników wyłożonych z 27 form otrzymano 54003 androgenicznych struktur (89,4/100 pylników) oraz 1793 zielonych roślin (3,0/100 pylników) w tym: z 10 genotypów pszenżyta ozimego wyłożono 22420 pylników i otrzymano 19864 androgenicznych struktur (88,6/100 pylników) oraz 643 zielone rośliny (2,9/100 pylników); z 17 genotypów pszenżyta jarego wyłożono 38010 pylników i otrzymano 34139 androgenicznych struktur (89,8/100 pylników) oraz 1150 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 21,5 struktur do 164,1/100 pylników oraz od 0,1 do 20,8 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 90,0% struktur i około 3,0% roślin/100 pylników.

Po uzyskaniu dojrzałości roślin pszenżyta ozimego i jarego wysadzonych do ziemi w 2014 roku oceniono efektywność uzyskania linii DH w wyniku zastosowania kolchicyny w pożywce C17 oraz w warunkach *in vivo*. Ogółem z 733 roślin ozimych otrzymano 182 (24,8%) podwojonych

haploidów, natomiast z 603 roślin jarych otrzymano tylko 46 (7,6%) 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 kłosie. Pozostałe rośliny nie przeżyły (około 30%) lub w ogóle nie zawiązały nasion (około 40%). Wynik ten sugeruje, że w kolejnych eksperymentach dotyczących kolchicynowania regenerantów w warunkach *in vivo* należy zmniejszyć stężenie roztworu kolchicyny oraz DMSO, lub skrócić czas ekspozycji roślin. Na podstawie uzyskanych wyników można jednak stwierdzić, że efektywność uzyskania podwojonych haploidów zarówno pszenżyta ozimego jak i jarego była nieco wyższa gdy kolchicynę zastosowano w pożywce C17 i wynosiła dla form ozimych średnio 13,6% (w zależności od genotypu od 0-25,0%) oraz dla form jarych 4,5% (również od 0-25,0%), w porównaniu z kolchicynowaniem w warunkach *in vivo*, odpowiednio w formach ozimych – 11,2% (od 0- 30,4%), oraz w jarych 3,1% (od 0-16,7%).

Analizując wyniki dotyczące kolchicynowania haploidów *in vivo* stwierdzono, że najwięcej podwojonych haploidów występowało w warunkach B tj. przy traktowaniu roślin 0,1% roztworem kolchicyny przez 6 godzin z chłodzeniem w temperaturze 2-4°C przez 5 dni.

W 2015 roku zastosowano o połowę mniejsze stężenie kolchicyny (0,05%) i DMSO (2,0%), ze względu na wcześniej stwierdzoną niską przeżywalność roślin po kolchicynie. Zastosowano 4 warianty kolchicynowania roślin w warunkach *in vivo*:

Wariant A – roślinki w probówkach traktowano roztworem kolchicyny przez 6 godzin;

Wariant B – roślinki w probówkach traktowano roztworem kolchicyny przez 6 godzin + chłodzenie;

Wariant C – roślinki wyjęte z ziemi traktowano roztworem kolchicyny przez 6 godzin;

Wariant D – roślinki wyjęte z ziemi traktowano roztworem kolchicyny przez 6 godzin + chłodzenie

Rośliny haploidalne (286 ozimych i 317 jarych) wyodrębnione na podstawie analiz cytometrycznych podzielono na 4 części i poddano kolchicynowaniu w różnych warunkach (A,B,C,D). Wszystkie pozostałe rośliny nieoznaczone cytometrycznie tj. 86 roślin z 5 genotypów ozimych i 617 z 12 genotypów jarych kolchicynowano w warunkach D.

Rośliny ozime przechodzą okres jarowizacji w chłodni, natomiast rośliny zarówno form jarych jak i ozimych są sukcesywnie wysadzone do ziemi po okresie aklimatyzacji w pokoju hodowlanym. Następnie wszystkie rośliny będą hodowane do dojrzałości w szklarni. Całkowita efektywność uzyskiwania linii DH może być oceniona dopiero w 2016 roku po zsumowaniu spontanicznie podwojonych haploidów (wyodrębnionych na podstawie badań cytometrycznych) oraz podwojonych po kolchicynowaniu haploidów.

Wnioski:

1. Najwyższą efektywność otrzymywania podwojonych haploidów zarówno w formach ozimych jak i jarych (około 55,0%) stwierdzono po zastosowaniu kolchicyny w pożywce indukcyjnej C17, w porównaniu z dodaniem kolchicyny do pożywki regeneracyjnej 190-2 (około 45,0%) oraz warunkami kontrolnymi – bez kolchicyny (tylko 36,5% wśród roślin ozimych i 24,4% wśród jarych).
2. W wyniku kolchicynowania haploidów *in vivo* najwięcej roślin DH zarówno ozimych jak i jarych uzyskano w warunkach, gdy haploidy traktowano 0,1% roztworem kolchicyny przez 6 godzin z dodatkowym chłodzeniem przez 5 dni.
3. Na podstawie jednorocznych wyników stwierdzono, że dla otrzymywania roślin DH ze względów ekonomicznych korzystniejsze wydaje się stosowanie kolchicyny (w stężeniu 1,0%) w pożywce C17 indukującej androgenezę, niż traktowanie roztworem kolchicyny otrzymanych roślin zielonych w warunkach *in vivo* (w stężeniu 1000 mg/l).

Materiały opublikowane:

Publikacja: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 2015. Doubled haploid production of winter and spring triticale hybrids using colchicine in anther cultures. [Biuletyn IHAR, 276: 57-67.](#)

Publikacja: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Kaczmarek Z. 2014 (wydane w 2015). The efficiency of the production doubled haploid spring triticale through anther culture. [Zeszyty Naukowe UP we Wrocławiu, Rolnictwo CIX, 605: 65-74.](#)

Plakat: Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A., Pudelska H., Woźna J. 2015. Comparison of the effectiveness of haploid and doubled haploid induction in anther culture of winter and spring forms of triticale (*× Triticosecale* Wittm.). [Streszczenie plakatu: BioTechnologia 96\(1\): 94.](#)