

WZÓR streszczenia zadania za 2018 r. w Programie Badań Podstawowych w Produkcji Roślinnej (nie dłuższe jak 1 (max. 2) strony A4 bez tabel, rysunków, wykresów

(Symbol zadania w Planie IHAR-PIB) 4-1-02-4-02 (85)

„Tytuł zadania” (nazwisko kierownika), np.:

„Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury *in vitro*” (prof. dr hab. J. Zimny).

Cele zadania:

Zadanie obejmowało cztery tematy:

- 1) Sprawdzenie skuteczności stresów pozytywnie korelujących z regeneracją podwojonych haploidów. Celem badań była ocena regeneracji roślin drogą androgenezy u 15 genotypów, w wyniku zastosowania 2 rodzajów stresu w 2 poziomach.
- 2) Zbadanie wpływu czynników stresowych i składu pożywek na zjawisko albinizmu regenerantów. Celem prac było określenie możliwości ograniczenia zjawiska albinizmu poprzez dobór stresu inicjującego androgenezę oraz modyfikację składu pożywek zastosowanych na etapie indukcji procesu.
- 3) Zbadanie wpływu ustalonego stresu, warunków kultury i systemu podwajania liczby chromosomów na liczbę regenerowanych zielonych roślin. Celem prac było sprawdzenie wpływu wybranych warunków stresu i kultury *in vitro* na liczbę zregenerowanych zielonych roślin i efektywność podwojenia liczby chromosomów.
- 4) Ocena wpływu herbicydów antymitotycznych na podwajanie liczby chromosomów w kulturach *in vitro* – badania wstępne (drugi rok). Badania obejmowały przetestowanie wytypowanych w roku ubiegłym inhibitorów mitozy na przeżywalność androgenicznych roślin.

...

Wyniki i dyskusja: Ad 1) Wyniki uzyskane w roku bieżącym pokazują, że opracowana metoda zaindukowania androgenezy daje pozytywny efekt dla większości genotypów, chociaż tworzenie embriogenicznej tkanki kalusowej nie zawsze przekłada się na uzyskiwanie zielonych regenerantów. Tylko z połowy badanych genotypów udało się zregenerować zielone rośliny w ilości kilkudziesięciu sztuk. Wydaje się, że przyczyną takiego stanu rzeczy jest po pierwsze zależność genotypowa o czym wiadomo z publikacji, które ukazywały się na przestrzeni wielu lat. W przypadku niektórych gatunków jednoliściennych badaczom udało się znaleźć modelowy genotyp. Dla kępki (Dactylis glomerata L.; Conger i in., 1983) jest to odm. Potomac, dla jęczmienia odm. Igr (Hoekstra i in., 1992), dla pszenżyta odm. Bogo (Oleszczuk i in. 2004). Dzięki znalezieniu modelowego genotypu żyta dalsze badania nad kulturami *in vitro* mogłyby być łatwiej przeprowadzone i dawać powtarzalne wyniki. W wyniku prowadzonych prac udało się wyselekcjonować takie modelowe genotypy żyta, które z mniejszą lub większą powtarzalnością pozwalają na testowanie czynników determinujących androgenezę.

Wyniki i dyskusja: Ad 2) Wytypowano genotypy o wysokim potencjale regeneracyjnym. Poziom albinizmu wahał się w granicach od 0 do 90%, w zależności od rodzaju zastosowanego stresu i pożywki. Uzyskane dane wskazują na to, że poprzez dobór odpowiednich warunków kultury *in vitro*, zwłaszcza rodzaju stresu przeprogramowania mikrospor, możliwa jest redukcja albinizmu. Wydaje się, że najlepszym stresem, w kontekście zminimalizowania tego zjawiska jest chłodzenie kłosów w temperaturze 4°C przez okres 14 dni, a następnie inkubowanie wyizolowanych pylników w roztworze mannitolu przez kolejne 7 dni, w temperaturze 4°C, ale z wyjątkami. Próby ograniczenia albinizmu poprzez dodawanie tiosiarczanu srebra do pożywki (Würschum i wsp. 2015), jak też indukowania androgenezy na pożywce KBP (Kumlehn i in. 2006) nie przyniosły oczekiwanych rezultatów, ale poziom regeneracji roślin zielonych pozwala sądzić, że mamy do czynienia ze zjawiskiem kumulowania się zdolności do androgenezy w niektórych genotypach.

Wyniki i dyskusja: Ad 3) potomstwo regenerantów od wczesnych etapów wzrostu wykazywało niejednakową intensywność rozkrzewiania. W obrębie jednej kombinacji genotypowej niewielkie różnice w budowie morfologicznej najlepiej można było zaobserwować począwszy od fazy strzelania w źdźbło. Dla większości linii długość kolejnych faz rozwojowych, do fazy pełnej dojrzałości, nie odbiegała od czasu trwania poszczególnych faz rozwojowych, charakterystycznych dla typowego żyta ozimego. Spowolniony wzrost i niski wigor dotyczył 5% ocenianych linii. Obserwowano rozpiętość w liczbie wytworzonych pędów (od 1 do 10), długości źdźbła (od 53 cm do 85 cm) oraz długości kłosów. Kłosa różniły się również kształtem, zbitością i ustawieniem w stosunku do źdźbła. Wszystkie rośliny wykłosiły się i wykazały częściową płodność. Efektywność zawiązywania ziarniaków wynosiła 20-70%. Liczba nasion w kłosie była wyższa na skutek wolnego

przepyleń, a ziarniaki były większe i lepiej wypełnione. Pierwsze pokolenie wytworzonych drogą androgenezy linii żyta charakteryzowało się dużą różnorodnością morfologiczną, którą trudno było odnieść do konkretnego stresu jak i genotypu. Zmienność wśród uzyskanych linii pochodzących z heterozygotycznego materiału wynikała z odmienności każdej komórki haploidalnej, co przekładało się na powstawanie regeneratów o unikalnej kombinacji genów, a tym samym odmiennych fenotypie niż rośliny rodzicielskie. Poza tym występowanie zjawiska zmienności somklonalnej i gametoklonalnej w kulturach tkankowych zwiększa szanse na dodatkowe zróżnicowanie wśród wyprowadzonych roślin. Z tych powodów oceniane powinny być potomstwo uzyskanych regeneratów. Obserwowana zmienność w potomstwie regeneratów dotyczyła głównie częściowej płodności pojedynczych roślin niezależnie od ich pochodzenia.

Wyniki i dyskusja: Ad 4) W doświadczeniach użyto osobniki pochodzące z 3 genotypów, znajdujące się w stadium ukorzeniania się/ krzewienia na pożywce N6 z 2mg/l IAA, gdzie zastosowano przez 3 i 4 dni, 2 herbicydy w stężeniu: 5 μ M oryzalina oraz 10 μ M trifluralina.

W obrębie badanych linii nie znaleziono powiązania pomiędzy liczbą regeneratów, które przeżyły/wypadły po wysadzeniu do gleby, a rodzajem związku antymitotycznego i czasem jego ekspozycji - otrzymane wskaźniki nie odbiegały od danych kontrolnych. Na tym etapie trudno było zaobserwować wpływ użytych związków na powstawanie zaburzeń rozwojowych. Skuteczne, indukowane podwojenie liczby chromosomów zależy od kilku czynników, gdzie do najważniejszych należą rodzaj eksplantatu/tkanki i wybór związku antymitotycznego. Ważnym aspektem jest określenie dawek inhibitorów mitotycznych najbardziej optymalnych i czasu inkubacji w ich obecności. Efektem zastosowania zbyt wysokich stężeń był spadek przeżywalności eksplantatów, zaś zbyt małych – niewielka efektywność diploidyzacji.

1. Podsumowanie i wnioski:

T1. Zastosowana metodyka indukowania androgenezy sprawdza się dla większości badanych obiektów chociaż regenerację zielonych roślin można uzyskać tylko u niektórych genotypów. Poszczególne genotypy inaczej reagują na używane stresy, co powoduje konieczność dostosowania sposobu przeprogramowania drogi rozwojowej komórek szlaku haploidalnego do konkretnego genotypu. Najbardziej uniwersalnym typem stresu wydaje się być chłodzenie pędów z kłosami w połączeniu z późniejszą inkubacją pylników w roztworze mannitolu lub chłodzenie pędów z kłosami przez okres 21 dni.

T2. Genotyp roślin donorowych ma kluczowe znaczenie dla efektywności procesu androgenezy, regeneracji roślin jak również poziomu albinizmu, ale poprzez dobór warunków zewnętrznych możliwe jest zmniejszenie względnej liczby roślin bezchlorofilowych. Rodzaj stresu miał wpływ na liczbę albinotycznych roślin dla większości genotypów. Pożywka KBP nie wpłynęła istotnie na poprawę wydajności regeneracji roślin.

T3. Efektywność spontanicznej diploidyzacji u żyta jest wysoka i wynosi 65%. Zmienność w potomstwie regeneratów dotyczy głównie częściowej płodności pojedynczych roślin niezależnie od ich pochodzenia.

T4. Użyte do podwojenia liczby chromosomów herbicydy antymitotyczne nie miały wpływu na spadek przeżywalności regeneratów wysadzonych do gleby. Niezależnie od zastosowanego herbicydu i czasu jego ekspozycji liczba roślin niepłodnych była wysoka. Oryzalina wykazała silniejsze działanie fitotoksyczne w porównaniu do trifluraliny na etapie małych roślin.

Najważniejsze osiągnięcia naukowe i praktyczne (zwięzły opis):

Wyniki badań prowadzonych w ciągu ostatniej dekady pomogły określić niektóre czynniki związane z regeneracją roślin żyta z mikrospor, ale do tej pory wiele problemów pozostało nierozwiązanych. Jednym z nich jest zależność genotypowa, która nadal pozostaje głównym czynnikiem ograniczającym efektywność uzyskiwania roślin homozygotycznych. Zależność genotypową po raz kolejny potwierdzają nasze badania chociaż podnosząca się wydajność regeneracji u niektórych genotypów jak u linii 6 świadczy o stopniowym postępie w stwarzaniu kulturom odpowiednich do rozwoju warunków, a z drugiej strony o możliwości kumulowania się genów odpowiedzialnych za zdolność do androgenezy w konkretnych liniach żyta.

Wykorzystanie uzyskanych wyników:

Istnieje duże zainteresowanie wykorzystaniem linii DH w hodowli heterozyjnej zbóż. U żyta ma to szczególne znaczenie. Udoskonalona metoda androgenezy zostanie wykorzystana w hodowli tego gatunku do szybkiej homozygotyzacji partnerów do krzyżowań w procesie tworzenia odmian heterozyjnych. W dużej mierze zależy to od przełamania bariery niskiej wydajności regeneracji dla różnych genotypów. Warunki kultury zostały już znacząco zbadane i zoptymalizowane. Wyselekcjonowano też linie o wysokiej efektywności androgenezy.

Krótką informacją o wynikach współpracy naukowo-technicznej krajowej i zagranicą (przy współpracy z zagranicą podać kraj, firmę, temat).

Współpraca ze spółkami Poznańska Hodowla Roślin, HR Smolice i HR Danko. Wyprowadzenie linii do badań.

Wykaz prac opublikowanych w roku sprawozdawczym:

Publikacja: Zimny J., Michalski K. 2019. The development of rye (*Secale cereale* L.) in vitro culture techniques for biotechnology and crop improvement. *Acta Biologica Cracoviensia*, 2019 DOI: 10.24425/abcsb.2019.127735

Wykłady: 4th Edition of Global Conference on Plant Science and Molecular Biology, September 19-21, 2019 Londyn

XI Konferencja "Kultury in vitro w biotechnologii i fizjologii roślin. Kraków.2019. Czy możemy wpływać na pojawianie się albinotycznych regenerantów w trakcie androgenezy żyta

Plakaty: Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury in vitro” – Sesja sprawozdawcza z PBwPR 2019 Radzików