4-1-02-4-02 Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury *in vitro*.

(prof. dr hab. J.Zimny).

**Cele projektu:**

1) Zbadanie interakcji pomiędzy genotypem i pożywką oraz wskazanie warunków środowiskowych sprzyjających podziałom mikrospory żyta. Poszukiwano czynników chemicznych, fizycznych, ale również organicznych (kultury „niańki”) zwiększających liczbę zielonych regenerantów i ograniczających zjawisko albinizmu,

2) Określenie wpływu substancji chemicznych działających podobnie jak kolchicyna, ale bardziej przyjaznych dla środowiska na proces podwajania liczby chromosomów i uzyskiwania płodnych linii homozygotycznych,

3) Ocena potomstwa regenerantów, ocena poziomu płodności otrzymanych regenerantów. sprawdzenie wpływu zastosowanych warunków stresu i kultury in vitro na efektywność podwojenia liczby chromosomów.

**Wyniki:**

Zadanie obejmowało 4 zagadnienia

**1.** Zbadanie interakcji pomiędzy genotypem i pożywką, wskazanie warunków środowiskowych sprzyjających podziałom mikrospory żyta - pożywki, wpływ widma światła na regenerację, 5 genotypów.

Niezwykle ważna dla uzyskania wyników doświadczeń była wstępna ocena cytologiczna rozwoju mikrospor przeprowadzona w fazie strzelania w źdźbło. Do eksperymentów pobierane były tylko kłosy znajdujące się na właściwym etapie rozwoju - od stadium średniej do późnej mikrospory.

Wzbogacenie pożywki indukującej o trichostatynę A (TSA) nie miało istotnego wpływu na wydajność indukowania androgenezy w kulturach in vitro. Dodanie tego związku do obu wymienionych wcześniej pożywek nie spowodowało zahamowania indukcji androgenezy u genotypów, u których rozwój kalusa następował bez trichostatyny A, ale też dla większości kombinacji nie obserwowano pozytywnego wpływu na wydajność androgenezy. W przypadku tylko jednej kombinacji pożywki (KBP+T) i genotypu „8” wynik indukowania androgenezy był lepszy niż na pożywce bez trichostatyny. W pozostałych przypadkach trichostatyna nie miała wpływu lub odnotowano jej negatywny wpływ na liczbę reagujących pylników.

Średnia obliczona dla pięciu genotypów dość wyraźnie wskazuje na światło zielone jako najbardziej poprawiające efektywność androgenezy. W porównaniu do kultur w ciemności, wszystkie rodzaje światła monochromatycznego miały pozytywny wpływ na kultury z pojedynczych kłosów. Mniej oczywiste są wyniki dotyczące reakcji pylników na kulturę w obecności światła. Najwyższą efektywność androgenezy uzyskano dla linii B20 i 5 na świetle odpowiednio zielonym i czerwonym, ale dla trzech genotypów (5, B20 i B14) odnotowano wysoką efektywność reakcji pylników w ciemności! Jeśli zsumujemy wyniki uzyskane dla pojedynczych genotypów i wyciągniemy średnie to okaże się, że przeciętnie światło zielone poprawia efektywności androgenezy w porównaniu do kultur w ciemności, i to tak w przypadku procentu kłosów jak i procentu pylników, które zareagowały.

Badano też wpływ światła na regenerację roślin. Średnia obliczona dla pięciu genotypów dość wyraźnie wskazuje na światło zielone jako najbardziej poprawiające efektywność regeneracji zielonych roślin. Światło białe zazwyczaj stosowane do regeneracji roślin okazało się mniej efektywne niż pozostałe dwa światła monochromatyczne- niebieskie i czerwone.

**2.** Badania nad określeniem warunków indukowania podziałów komórkowych i rozwoju zarodków w kulturach izolowanych mikrospor żyta.

Kultury izolowanych mikrospor (KIM). Zastosowanie w stosunku do ściętych pędów z kłosami stresu obniżonej temperatury(4˚C/2 tyg.) w połączeniu z inkubacją pylników w 4˚C/4 dni w roztworze mannitolu zwiększało efektywność indukcji embriogenezy w KIM prawie 3 krotnie (0,015% vs 0,45%) oraz efektywność regeneracji roślin dwukrotnie (9% vs 18%). Przetestowano wpływ kultury “niańki” w formie zalążni (izolowanych ze świeżych kłosów, pochodzących z pszenicy odm. Svilena, o wysokim potencjale androgenicznym, poddanych 7 dniowej prekulturze na pożywce KBP, dodawanych po 3 szt. na ml pożywki) na efektywność inicjacji procesu embriogenezy. Zastosowanie zalążni nie zwiększało żywotności mikrpospor żyta po tygodniu kultury, jak również efektywności indukcji androgenezy, natomiast przyspieszało proces – nieco szybciej powstawały agregaty komórkowe i struktury zarodkopodobne.

**3.** Ocena wpływu herbicydów antymitotycznych na podwajanie liczby chromosomów w kulturach in vitro.

W ramach przeprowadzonych prac zbadano wpływ herbicydu z grupy fosforotioamidów - amiprofos-methylu (APM) na efektywność podwojenia garnituru chromosomowego w liniach wytworzonych drogą androgenezy. Zastosowane APM 50 i 100 µM w przy najdłuższym czasie działania (48 godzin) nie zwiększało efektywności podwajania liczby chromosomów u regeneratów w porównaniu do kontroli.

Nie odnotowano znaczących różnic dotyczących ploidalności roślin zregenerowanych na pożywkach o różnej zawartości auksyny 2.4D.

**4.** Morfologiczna i cytometryczna ocena poziomu płodności otrzymanych regenerantów.

Dokonano morfologicznej i cytometrycznej oceny potomstwa regenerantów oraz oceny poziomu płodności otrzymanych regenerantów. Potomstwo regenerantów dwóch genotypów uprawiano w fitotronie w warunkach symulujących warunki polowe. Siewki obu genotypów wykazywały niejednakową intensywność rozkrzewiania. W obrębie jednego genotypu występowały niewielkie różnice w budowie morfologicznej roślin. Dopiero w fazie strzelania w źdźbło zarysowały się różnice głównie w długości źdźbła. Dla obu linii długość kolejnych faz rozwojowych do fazy pełnej dojrzałości, nie odbiegała od czasu trwania poszczególnych faz rozwojowych, charakterystycznych dla typowego żyta ozimego.

Ocenę poziomu ploidalności w stadium krzewienia, po wysadzeniu z kultur in vitro do gleby, przeprowadzono dla 104 regenerantów. Efektywność spontanicznego podwajania liczby chromosomów wyniosła 68,26%. Haploidy stanowiły 31,73%. Nie odnotowano obecności roślin aneuploidalnych, ani osobników o innej ploidalności np. tetraploidalnych. Obserwowano zaburzenia płodności pojedynczych roślin niezależnie od ich pochodzenia.

**Wnioski:**

1) Wzbogacenie pożywki indukującej o trichostatynę A (TSA) nie wpływało pozytywnie na wydajność indukowania androgenezy w kulturach in vitro

2) Połączenie chłodzenia kłosów z prekulturą pylników w mannitolu zwiększyło efektywność indukcji embriogenezy i regeneracji w porównaniu do samego traktowania kłosów chłodem.

3) Zastosowanie zalążni jako kultury niańki nie jest czynnikiem niezbędnym do zaindukowania androgenezy w KIM żyta.

4) Zastosowane trzy kolory światła monochromatycznego okazały się być skuteczne w indukowaniu androgenezy z mikrospor.

5) Światło białe zazwyczaj stosowane do regeneracji roślin okazało się mniej efektywne niż pozostałe zastosowane barwy światła monochromatycznego.

6) Efektywność spontanicznej diploidyzacji żyta jest wysoka – 68,26%

7) Zastosowane herbicydów : oryzaliny (5 µM), trifluraliny (10µM) APM (50 i 100 µM) oraz 2,4-D w badanych reżimach czasowych na różnych etapach kultur in vitro nie zwiększało efektywności podwajania liczby chromosomów u regenerantow w stosunku do kontroli.

8) Zmienność w potomstwie regenerantów dotyczy długości źdźbła i liczby pędów, ale istotna jest głównie upośledzona płodność pojedynczych roślin niezależnie od ich pochodzenia.