

# Przeniesienie zdolności do androgenezy z linii modelowych do linii hodowlanych żyta w oparciu o opracowane markery molekularnych tej cechy

Krzysztof Michalski, Janusz Zimny

Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin, IHAR-PIB Radzików

## Wstęp

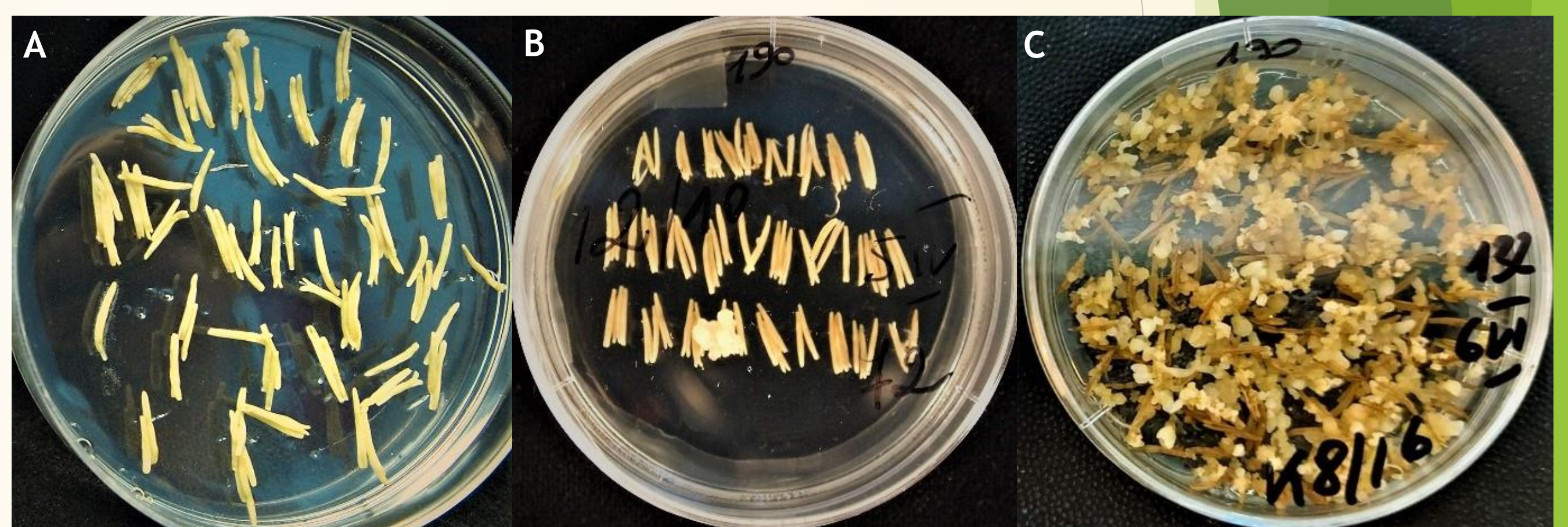
Technologia podwojonych haploidów odgrywa znaczącą rolę w hodowli roślin poprzez skrócenie czasu potrzebnego do wytworzenia nowych homozygotycznych. Hodowla mieszańcowa żyta oparta jest o krzyżowanie homozygotycznych męskosterylnych linii matecznych z ojcowskimi liniami przywracającymi płodność. Uzyskany w pokoleniu F<sub>1</sub> efekt heterozji gwarantuje następnie wysoki plon.

Tradycyjnie, linie homozygotyczne żyta wyprowadzane są na drodze wielopokoleniowego chowu wsobnego. Jest to jednak proces długotrwały i żmudny. Publikowane współcześnie strategie hodowli roślin zawsze przewidują zastosowanie linii DH w procesie powstawania odmiany [1]. Udoskonalone metody androgenezy będą znajdować coraz większe zastosowanie w hodowli zbóż. Jednak ich wdrożenie do codziennej praktyki hodowlanej zależy w największej mierze od tego, czy zostanie przełamana bariera niskiej wydajności regeneracji.

W ramach prowadzonych badań zamierzamy wykazać, że cecha androgeniczności przenosi się do potomstwa. Aby osiągnąć ten cel proponujemy przeniesienie tej cechy drogą krzyżowania linii o wysokiej zdolności do androgenezy do linii hodowlanych oraz wyselekcjonowanie sekwencji powiązanych ze zdolnością do androgenezy. Poznanie tych sekwencji pozwoli na zaprojektowanie markerów PCR, które umożliwią monitorowanie tej cechy w genotypach hodowlanych.

## Materiały i metody

Materiał badawczy stanowiły pędy kłonośne 20 badanych linii wsobnych żyta oraz jednej linii kontrolnej o wysokim potencjale androgenezy. Obcięte kłosa poddawano analizie mikroskopowej, celem ustalenia stadiów rozwoju mikrospor, po czym umieszczano w pojemnikach z wodą i poddawano stresowi chłodu (4°C) przez 14 dni. Po tym czasie, wykonywano ponowną analizę mikroskopową. Pylniki pochodzące z kłosów, w których mikrospory zareagowały na stres chłodu, wykładano na stałą pożywkę indukującą 190-2 [2]. Pylniki z pozostałych kłosów umieszczano na kolejny tydzień w 0,4M roztworze mannitolu celem wymuszenia reakcji androgenicznej. Następnie, one także przenoszone były na podłoże 190-2. Zaindukowane struktury embriogeniczne przenoszono na podłoże pozbawione 2,4-D celem regeneracji roślin.



Fot.1 (A) Kultura pylnikowa przykładowej (#6) linii nieandrogenicznej – brak wytworzonego kalusa. (B) Kultura pylnikowa linii badanej, o niskim potencjale androgenicznym (#12) – widoczne są niewielkie ilości kalusa. (C) Kontrolna linia reagująca silnym „przeprogramowaniem” i wytworzeniem embriogenicznego kalusa (patrz: Tab. 1) .

Tab. 1. Zestawienie odpowiedzi androgenicznej 20 badanych linii wsobnych oraz jednej, wysoce androgenicznej linii kontrolnej.

Lp	Genotyp	Liczba kłosów		Liczba pylników		Liczba kalusów		Liczba roślin zielonych	
		mannitol	pożywka stała	mannitol	pożywka stała	mannitol	pożywka stała	mannitol	pożywka stała
1	HRSM 213-2Rj-97-01	8	1	668	144	0	0	0	0
2	HRSM 213-2Rj-97-03	10	4	1476	636	3	0	0	0
3	HRSM 213-2Rj-97-05	10	3	1644	432	0	0	0	0
4	HRSM 323-R-1-01	10	2	1453	360	2	0	0	0
5	HRSM 323-R-1-02	5	4	760	570	4	0	0	0
6	HRSM 323-R-1-03	6	1	984	144	0	0	0	0
7	HRSM 323-R-1-06	10	8	1644	1000	3	0	0	0
8	HRSM 318-R-01	10	6	1704	912	1	0	0	0
9	HRSM 318-R-02	9	4	1532	628	13	0	0	0
10	HRSM 318-R-03	9	3	1404	424	5	0	0	0
11	HRSM 96-2Rj-9-01	10	4	1824	648	3	0	0	0
12	HRSM 96-2Rj-9-02	12	4	1712	576	2	0	0	0
13	HRSM 96-2Rj-9-05	11	5	1884	816	17	0	0	0
14	HRSM 143-3R-59-01	9	4	1380	624	0	0	0	0
15	HRSM 143-3R-59-02	3	2	372	360	2	0	0	0
16	HRSM 100-2Rj-26-01	7	3	924	456	5	0	0	0
17	HRSM 100-2Rj-26-04	9	1	1248	132	4	0	0	0
18	HRSM256-R-j-2-01	2	3	312	565	0	0	0	0
19	HRSM 256-R-j-2-05	9	0	1392	0	27	0	0	0
20	HRSM 256-R-j-2-06	11	6	1548	880	0	0	0	0
	suma	170	68	25865	10307	91	0	0	0
21	Z8 kontrola	12	0	1892	0	1306	0	92	0

## Wyniki i dyskusja

W wyniku przebadania 21 genotypów żyta wyselekcjonowano linie, które reagują w kulturach in vitro z najniższą efektywnością.

Niezwykle ważna dla uzyskania miarodajnych wyników doświadczeń była wstępna, cytologiczna ocena rozwoju mikrospor przeprowadzona w fazie strzelania w źdźbło. Wszystkie kłosa były sprawdzane pod względem dojrzałości mikrospor. Do eksperymentów pobierane były tylko kłosa znajdujące się na właściwym etapie rozwoju - od stadium średniej do późnej mikrospory.

Dobór sposobu indukowania mikrospor do androgenezy wymaga indywidualnego podejścia zarówno do poszczególnych genotypów, jak również do sposobu prowadzenia kultury. Zastosowano typ stresu, który wcześniej uznano za najefektywniejszy - chłodzenie pędów z kłosami przez okres 14 dni, w połączeniu z późniejszą inkubacją pylników w roztworze mannitolu.

Po zakończeniu procesu traktowania stresem chłodu wykonano cytologiczną ocenę rozwoju mikrospor pod kątem ich przeprogramowania na wegetatywny szlak rozwojowy. Pylniki w których odnotowano „przeprogramowane” mikrospory po okresie chłodzenia wykładano na pożywki stałe, zaś te „nieprzeprogramowane” na roztwór mannitolu, a dopiero potem na pożywkę stałą.

W wyniku przeprowadzonych eksperymentów wyselekcjonowano linie które nie reagowały przeprogramowaniem oraz kalusowaniem w warunkach zastosowanych w doświadczeniu. Jedną z tych linii została wykorzystana do wykonania krzyżowania z linią wysoce androgeniczną. Uzyskany w ten sposób materiał zostanie wykorzystany na dalszych etapach projektu.

Źródła

1. Marulanda J.J., Mi X., Melchinger A.E., Xu J.-L. Würschum T., Longin C.F. Optimum breeding strategies using genomic selection for hybrid breeding in wheat, maize, rye, barley, rice and triticale THEORETICAL AND APPLIED GENETICS; 129, 10; 1901-191  
2. Zimny J., Sylwia Oleszczuk, Aleksandra Zimny, Katarzyna Makowska, Andrzej Czaplicki. 2021. Rye microspores response to stress and in vitro culture conditions. Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury in vitro. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin Nr 295 / 2021 : 189-1923