

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 16.

Tytuł zadania: **Badania nad optymalizacją metod indukowanego podwajania garnituru chromosomowego w haploidalnych regenerantach pszenżyta.**

Kierownik zadania: *dr S. Oleszczuk*

Cel zadania:

Zbadanie wpływu związków antymitotycznych na efektywność podwajania genomu i wytworzenie płodnych regenerantów pszenżyta na drodze androgenezy.

Materiały i metody:

Materiał wyjściowy uzyskano w wyniku ukierunkowanych krzyżowań genotypów pszenżyta ozimego o różnym pochodzeniu. Z otrzymanych ziarniaków wytworzono rośliny donorowe, z których po prekulturze (3 tyg /4°C) pędów kłonośnych wyizolowano pylniki (stadium wakuolizacji mikrospor) na pożywki indukujące w celu zainicjowania procesu androgenezy. Wytworzone struktury androgeniczne przenoszono na pożywki regeneracyjne. Procedurę podwajania genomu przeprowadzono w oparciu o bezpośrednie działanie związków z grupy dinitroanilin (trifluralina -T) oraz fosforotioamidów (aminoprophos-methyl-APM) na regeneranty znajdujące się na pożywkach regeneracyjnych. Zbadano efekt wpływu powyższych związków antymitotycznych w zależności od stężenia (5 i 10 μ M) oraz czasu działania (2-7dni). Poziom ploidalności zregenerowanych roślin określono przy pomocy cytometru przepływowego.

Wyniki i dyskusja:

Efektom krzyżowania roślin wyjściowych było otrzymanie 4 nowych form mieszańcowych pszenżyta ozimego. Androgeniczne regeneranty uzyskano dla wszystkich krzyżówek, a liczba roślin zielonych/kłosa wahała się od 9 do 24,5. Potomstwo mieszańca Bo 2544 (powstał w oparciu o system DH) odznaczało się najwyższą wartością wskaźnika regeneracji. Przeżywalność eksplantatów poddawanych działaniu inhibitorów mitozy była zależna od etapu rozwojowego rośliny, stężenia inhibitorów i czasu ekspozycji. Negatywny wpływ badanych związków najszybciej zauważalny był na najmniejszych roślinach (0,5-1cm), czego efektem było żółknięcie tkanek, spowolnienie wzrostu i anomalie morfologiczne. Trifluralina miała bardziej negatywny wpływ na wzrost i rozwój eksplantatów, w porównaniu do APM stosowanego w tych samych dawkach, niezależnie od czasu działania. Przeżywalność regenerantów na skutek 5 dniowej ekspozycji na 5 i 10 μ M APM wahała się od ok. 50% do 95%, natomiast po zastosowaniu 10 μ M T wskaźnik ten był dwukrotnie niższy. Zastosowanie stężenia T rzędu 10 μ M przy 7-dniowym traktowaniu było przyczyną najwyższego odsetka śmiertelności roślin. Część eksplantatów wykazywała liniowo specyficzną reakcję na zastosowany związek. Regeneranty ze spontanicznie podwojoną liczbą chromosomów w próbach kontrolnych stanowiły od 28,6 do 63,8% badanych linii. W zależności od genotypu, udział DH uzyskanych w wyniku indukowanej diploidyzacji *in vitro* wahał się od 31,5% do 64%. Nie zaobserwowano wpływu badanych związków na zjawisko aneuploidalności oraz powstawania roślin o wyższej ploidalności. Występowanie aneuploidów, stanowiących ponad 5% wszystkich roślin wykazano zarówno u form tri- jak i heksaploidalnych. Ponadto otrzymano 1,2% hiperploidów (9x-0,9% i 12x-0,3%) oraz 0,8 % osobników miksploidalnych. Efektywność indukowanego podwojenia nie była wyraźnie zależna od badanych stężeń antymitotyków oraz nie wzrastała z wydłużeniem czasu inkubacji w ich obecności.

Pomimo, że pszenżyto podatne jest na androgenezę i regenerację tą drogą roślin, jest gatunkiem wykazującym niestabilność meiotyczną, która jest wyższa w mieszańcach F₁ niż w ustabilizowanych formach rodzicielskich. Istotną kwestią w jej ograniczeniu może być użycie komponentów powstałych w oparciu o linie DH. Przy optymalizacji metody diploidyzacji niskie stężenie antymitotyków może być niewystarczająco skuteczne, natomiast zbyt wysokie może mieć letalny wpływ na traktowane eksplantaty. Fitotoksyczny efekt inhibitorów mitozy, przy dawkach podwajających liczbę chromosomów w dużym stopniu może obniżać przeżywalność eksplantatów. Rośliny na wczesnych stadiach rozwoju wydają się charakteryzować dużo większą wrażliwością na te same dawki antymitotyków w porównaniu z tkanką kalusową. Tworzenie roślin innych niż DH nie musi być bezpośrednio związane z zastosowaniem konkretnego antymitotyku ze względu na skłonność pszenżyta do zaburzeń mejozy oraz możliwość nabycia nowej zmienności w warunkach *in vitro*.

Wnioski:

- Wykorzystanie jako komponentów form o wysokim stopniu homozygotyczności może przyczynić się do podniesienia stabilności genetycznej mieszańców, charakteryzujących się wyższą efektywnością androgenezy i regeneracji roślin ze spontanicznie podwojonym genomem.
- Trifluralina ma bardziej toksyczny wpływ na wzrost i rozwój eksplantatów w porównaniu do aminoprofos-metylu stosowanego w tej samej dawce i takim samym czasie inkubacji.
- Skuteczność działania herbicydów antymitotycznych w warunkach *in vitro* wydaje się być zależna od genotypu. Tylko w niektórych przypadkach ich działanie miało marginalną przewagę nad spontanicznym podwojeniem.