

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 52.

Tytuł zadania: **Badania nad indukcją embriogenezy mikrospor u roślin z rodzaju *Brassica*.**

Kierownik zadania: **prof. dr hab. T. Cegielska-Taras**

#### Cele zadania:

A/ Badanie wpływu warunków wzrostu - na kondycję fizjologiczną roślin dawców mikrospor.

B/ Badania nad ustaleniem markera morfologicznego - długości pąka – powiązanego ze stadium mikrospory zdolnej do zmiany z rozwoju generatywnego na wegetatywnego.

C/ Badania nad wpływem skutecznej stymulacji izolowanych mikrospor do podziałów w kulturze *in vitro*.

D/ Badania nad kulturą zarodków mikrosporowych rzepaku i gorczycy.

E/ Badania nad konwersją zarodków mikrosporowych w rośliny lub stymulacją wtórnej embriogenezy.

#### Materiał wykorzystywany we wszystkich tematach

Materiałem do badań w realizowanych tematach było 10 różnych genetycznie dawców mikrospor rzepaku ozimego oraz gorczyca biała (*Sinapis alba*) podwójnie ulepszona odm. Warta.

ad. A/ Badanie wpływu warunków wzrostu - na kondycję fizjologiczną roślin dawców mikrospor.

#### Metody

Nasiona badanych dawców wysiewano w kilku etapach. W fazie czterech liści rośliny jaryzowano przez 7 tygodni w temperaturze 4°C, przy ośmiogodzinnym oświetleniu. Po tym czasie dalsza ich wegetacja przebiegała w fitotronie przy 16 godzinnym fotoperiodzie, temperaturze dnia/nocy 13°/10°C. Część roślin gorczycy białej rozwijała się w fitotronie bez okresu jaryzacji, a część roślin gorczycy białej przejdzie okres jaryzacji podobny jak rośliny rzepaku.

#### Wyniki

Warunki wzrostu roślin donorowych mają istotny wpływ na uzyskanie efektu wydajnej embriogenezy mikrospor w kulturze *in vitro*. Rośliny rzepaku w fazie 4-5 właściwych liści rozpoczynały okres sztucznej wernalizacji. Po okresie jaryzacji rośliny rozwijały się w warunkach fitotronu - temperatura dzień/noc 13°/10°C. Rośliny podzielono na trzy grupy. Pierwsza grupa roślin przechodziła okres jarowizacji sześć tygodni. Okres rozwoju pędów generatywnych tych roślin wynosił więcej niż trzy miesiące. Druga grupa roślin okres jaryzacji przechodziła w ciągu 7 tygodni. Pędy kwiatowe rozwijały się w ciągu 2-2,5 miesiąca. Wszystkie rośliny rozwijały się równomiernie tworząc prawidłowo wykształcone pędy generatywne. Trzecia grupa roślin, przechodziła okres jaryzacji 8 tygodni. Rośliny rozwijały się podobnie jak w przypadku siedmiotygodniowego okresu jaryzacji.

Rośliny gorczycy białej w sztucznych warunkach wzrostu, bez traktowania chłodem rozwijały się nierównomiernie wytwarzając pędy generatywne fizjologicznie słabe. Natomiast rośliny po okresie traktowania chłodem przez 7 tygodni, po przeniesieniu do fitotronu w krótkim czasie wytwarzały pędy kwiatowe.

#### Dyskusja

Hodowla haploidów i podwojonych haploidów zaczyna się od wyboru rośliny dawcy mikrospor. Zasadniczym warunkiem uzyskania efektywnej androgenezy jest kondycja fizjologiczna roślin dawców mikrospor, przede wszystkim w badaniach z rzepakiem ozimym, gdy rośliny muszą przejść okres wernalizacji. Warunki sztucznej jaryzacji form ozimych, parametry temperatury, oświetlenia oraz czas traktowania chłodem roślin są różne w zależności od danego ośrodka czy laboratorium. (Kott i in. 1990). Jak wynika z prezentowanych badań testowane linie rzepaku ozimego nie miały zróżnicowanych wymagań jarowizacyjnych. Nawet po najkrótszym okresie wernalizacji, w warunkach komory chłodniczej, w fitotronie wytworzyły pędy generatywne, ale w dłuższym czasie. Natomiast po 7 i 8 tygodniach działania chłodu nie zaobserwowano znaczących różnic w tempie rozwoju pędów kwiatowych.

Gorczyca biała roślina jara, podwójnie ulepszona jest bardzo wrażliwa na warunki prowadzenia uprawy w sztucznym środowisku. Natomiast rośliny po okresie jaryzacji przez 7 tygodni wzrastały szybciej i były bujniejsze.

Kott L., Beversdorf W.D. 1990. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 23: 187-192.

#### Wnioski

- Wymagania jaryzacyjne badanych genotypów nie były większe niż 7 tygodni, co świadczy o ich podobnych zdolnościach do wernalizacji. Możliwe, że pula genetyczna rzepaku ozimego została znacznie zawężona pod względem tej cechy w trakcie procesów hodowlanych.
- Gorczyca biała po okresie działania chłodu rozwija się szybciej i posiada bujne pędy generatywne.

ad. B/ Badania nad ustaleniem markera morfologicznego - długości pąka – powiązanego ze stadium mikrospory zdolnej do zmiany z rozwoju generatywnego na wegetatywny.

#### Wyniki

Po zakwitnięciu pierwszego kwiatu na pędzie generatywnym rzepaku ozimego pobierano pąki do analizy cytologicznej. Na preparacie mikroskopowym oceniano stadium mikrospor z pylników pobranych z pąków o danej długości. Wybierano jedynie pąki o takiej długości, które zawierają pylniki z mikrosporami w późnym stadium jednojądrowym. Dla większości badanych linii były to pąki od 3,5 mm do 3,8 mm. Wyjątek stanowiła jedna linia, której pąki w większym zakresie długości (3,2-3,8 mm), zawierały mikrospory w stadium odpowiednim do izolacji. Natomiast wyróżniały się dwie linie nr 9, dla której ustalono długość pąków 4,0-4,3 mm oraz linia nr 10, u której selekcjonowano pąki o długości 4,5-5,5mm.

Z gorczycą białą postępowano podobnie. Pylniki o długości ok. 3mm zawierały mikrospory w stadium jednojądrowym.

#### Dyskusja

Ważnym czynnikiem warunkującym skuteczną indukcję androgenezy *in vitro* jest prawidłowe określenie stadium rozwoju mikrospor. Jedynie mikrospora w późnym stadium jednojądrowym, kiedy synteza DNA jest zakończona krótko po pierwszej mitozie, jest najbardziej podatna na zmianę drogi rozwojowej (Dunwell 2010). W prezentowanych badaniach stosowany pomiar pąka kwiatowego z roślin rozwijających się w kontrolowanych warunkach wzrostu był użytecznym sposobem na powtarzalność efektów kultury izolowanych mikrospor. Zmienność długości pąka kwiatowego w badanym materiale była niewielka. Wyróżniały się dwa genotypy linia nr 9 i linia nr 10, u których pąki o długości 4,0 do 5,5 mm, zawierały pylniki z mikrosporami w pożądanym stadium. W literaturze spotyka się prace, które opisują długości pąków kwiatowych od 3,0 do 4,0 mm selekcjonowanych do izolacji mikrospor (Tsuwamoto, Takahata 2008). Dla gorzycy białej po raz pierwszy badano korelację długości pąka kwiatowego ze stadium rozwoju mikrospory.

Dunwell J.M. 2010. Plant Biotechnology Journal 8: 377-424.

Tsuwamoto R., Takahata Y. 2008. Breeding Science 58: 251-259.

#### Wnioski

Obserwacje cytologiczne mikrospor w pylnikach i ustalanie długości pąków selekcjonowanych do izolacji mikrospor determinują efektywność procesu androgenezy.

ad. C/ Badania nad czynnikami skutecznej stymulacji izolowanych mikrospor do podziałów w kulturze *in vitro*.

#### Metody

##### Kultura izolowanych mikrospor rzepaku ozimego

Z selekcjonowanych pąków kwiatowych rzepaku ozimego izolowano mikrospory wg/ modyfikowanej metody Lichtera (1982). Po trzykrotnym odplukaniu i wirowaniu końcowe stężenie mikrospor wynosiło od 80 do 100 000 ml<sup>-1</sup>. Po ostatnim wirowaniu mikrospory zawieszano w pożywce NLN-13 lub NLN-13 z 0,05% kolchicyną. W następnym dniu mikrospory po odplukaniu zawieszano w świeżej pożywce NLN-13 w stężeniu około 50 000- 40 000 ml<sup>-1</sup>. Kultury izolowanych mikrospor prowadzono w ciemności w temperaturze 30°C przez 10 dni, 32,5° przez 1 dzień, a następnie szalki przenoszone były do 30°C oraz 1 dzień w temperaturze 32,5°C. Po tym okresie szalki z mikrosporami przenoszone były do termostatu w ciemności i temperaturze 24°C.

##### Kultura izolowanych mikrospor gorzycy białej podwójnie ulepszonej

Z wyselekcjonowanych pąków preparowano pylniki, które wykładano na pożywkę stałą (Leelavathi i in. 1984.). Pre-kulturę pylników prowadzono jeden dzień w niskiej temperaturze (4°C lub 1°C). Następnie z tych pylników izolowano mikrospory w pożywce KB5. Szalki z izolowanymi mikrosporami przenoszono do termostatu z temperaturą 24°C.

#### Wyniki

##### Rzepak

Badano wpływ kolchicyny na skuteczność podziałów mikrospor rzepaku zaraz po ich izolacji oraz warunki temperatury inkubacji mikrospor w pierwszych dniach prowadzenia kultury. Prowadzono wstępne obserwacje kultury mikrospor z dwu dawców o zróżnicowanej zdolności do podziałów. Pierwsza linia wykazywała podatność do stymulacji podziałów (w standardowym toku postępowaniu) i do pożywki dodano 0.05% kolchicyny zaraz po izolacji mikrospor. Uzyskano wówczas 236 zarodków. Natomiast z kultury bez dodania kolchicyny do pożywki otrzymano 158 zarodków mikrosporowych rzepaku. Druga linia charakteryzowała się niską podatnością do podziałów. Z kultury w której mikrospory zawieszono były w NLN z kolchicyną, uzyskano 7 zarodków. Natomiast nie uzyskano żadnych zarodków z kultury NLN bez kolchicyny.

Badano także wpływ temperatury na inicjację podziałów mikrospor mierzoną liczbą uzyskanych zarodków. Obserwacje prowadzone były na 10 roślinach dawcach zróżnicowanych genetycznie.

Z przeprowadzonych wstępnych badań wynika, że reakcja na stymulację do podziałów mikrospor wysoką temperaturą, zależy od genotypu dawcy. Miara skuteczności tego postępowania była liczba uzyskanych androgenicznych zarodków. W pierwszych przeprowadzonych eksperymentach zauważono, że genotypy o niskich skłonnościach do androgenezy, w trzech badanych wariantach temperaturowych, wykazywały niską stymulacją mikrospor do podziałów.

Wyniki badań prezentowano w formie plakatu i wykładu Zał. 1,2.

#### Gorzycza

Mikrospory izolowane z pylników po jednym dniu w temp. 1<sup>0</sup>C były całkowicie obkurczone. Natomiast po jednym dniu w temperaturze 4<sup>0</sup> C znaczna część mikrospor nie była obkurczona. Po izolacji i odpłukaniu mikrospory zawieszano w samej pożywce KB5 lub z dodatkiem 0,2 mg/l ABA. W drugiej serii doświadczeń mikrospory zawieszono w pożywce KB5 z dodatkiem 0.025% kolchicyny, szalka kontrolna była bez kolchicyny. Po 20 godzinach mikrospory odpłukano i zawieszono w świeżej pożywce.

Dodatek kolchicyny powodował obkurczanie mikrospor gorzycy. Natomiast w pożywce z ABA po paru dniach zaobserwowano pierwsze podziały mikrospor gorzycy. Są to pierwsze eksperymenty z inicjacją podziałów mikrospor gorzycy.

Lichter R. 1982. Z. Pflanzenphysiol. 105: 427-434

#### Dyskusja

Od początku prowadzenia badań nad skuteczną indukcją mikrospor do podziałów, w różnych ośrodkach badawczych, stosowano różne czynniki stymulujące podziały. Zastosowanie szoku termicznego przez Kellera i Armstronga (1978) stanowiło przełom w uzyskiwaniu efektywnej embriogenezy w kulturach pylników rzepaku. Okazało się, że stres temperaturowy jest niezbędny do zainicjowania procesu androgenezy roślin z rodzaju *Brassica*. Wysoka temperatura w przedziale 30<sup>0</sup>-35<sup>0</sup> C przez pierwsze 3-10 dni od izolacji stymuluje znacząco embriogenezę (Nehlin 1999). We wcześniejszych badaniach (Cegielska-Tars i in. 2002) wykazano, że inkubacja mikrospor przez 10 dni w temp. 30<sup>0</sup>C, jest optymalną do inicjowania podziałów. Natomiast w prezentowanych badaniach oprócz 30<sup>0</sup>C, zastosowano także inkubację jeden dzień w 32,5<sup>0</sup>C, a następnie 30<sup>0</sup>C oraz jedną dobę w 32,5<sup>0</sup>C. Zaobserwowano zróżnicowaną reakcję na stymulację wysoką temperaturą mikrospor do podziałów z różnych genetycznie dawców.

Nie opublikowano dotychczas prac dotyczących kultury izolowanych mikrospor gorzycy białej podwójnie ulepszonej, warunków prowadzenia kultury i stymulacji podziałów mikrospor. Prezentowane wyniki są pierwszymi informacjami o kulturze izolowanych mikrospor i indukcji embriogenezy mikrospor gorzycy białej.

Cegielska-Taras T., Tykarska T., Szała L., Kuraś L., Krzymański. 2002. Euphytica 124, 341-347.

Keller W.A., Armstrong K.C. 1978. Z. Pflanzenzuchtung 80: 100-108.

Nehlin L. 1999. Doctoral thesis Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala 8-42.

#### Wnioski

- Wstępne wyniki wskazują na stymulujący wpływ kolchicyny na kulturę izolowanych mikrospor.
- Stres temperaturowy jest niezbędny do zainicjowania podziałów mikrospor. Ze wstępnych obserwacji wynika, że wysokość temperatury i czas indukcji jest zależny prawdopodobnie od genotypu dawcy.

- Pierwsze wyniki o indukcji embriogenezy mikrospor wskazują na możliwość uzyskiwania androgenicznych roślin gorczycy białej rośliny obcoplejnej.

#### ad. D/ Badania nad kulturą zarodków mikrosporowych rzepaku i gorczycy białej.

##### Metody

Prawidłowo wykształcone zielone zarodki w kulturze płynnej NLN z 13% sacharozą przenoszono na pożywkę NLN z 8% sacharozą oraz na świeżą pożywkę NLN z 13% sacharozą. Obserwowano rozwój i stan fizjologiczny zarodków mikrosporowych po kilkunastu dniach prowadzenia kultury. Następnie zarodki przenoszono na pożywkę stałą i traktowano chłodem (1°C przez 14 dni).

Pierwsze zarodki mikrosporowe gorczycy przeniesiono na pożywkę MS z kinetyną.

##### Wyniki

Wstępne wyniki wskazują, że redukcja sacharozy w pożywce nie wpływa negatywnie na ich rozwój. Zaobserwowano, że zarodki zarówno z 8% sacharozy jak i 13% sacharozy w pożywce nie ulegają zmianom morfologicznym. Nie stwierdzono zróżnicowania w tempie dalszego rozwoju zarodków. Będą kontynuowane dalsze badania nad rozwojem zarodków mikrosporowych z obu wariantów pożywek. Zaobserwowano powolny rozwój pędów z zarodków androgenicznych gorczycy białej na pożywce MS z kinetyną.

##### Dyskusja

W pracach nad konwersją zarodków stwierdzono, że redukcja sacharozy w pożywce NLN z 13% do 8%, stymuluje merystem wierzchołkowy pędu do rozwoju. Wówczas istnieje szybki sposób uzyskania pędów poprzez konwersję zarodków. We wstępnych badaniach nie stwierdzono takiej zależności. Będą prowadzone dalsze badania nad skuteczną stymulacją merystemu wierzchołkowego zarodków androgenicznych rzepaku.

##### Wnioski

- Ze wstępnych obserwacji wynika, że redukcja sacharozy w pożywce NLN z 13% do 8% nie wpływa negatywnie na rozwój zarodków mikrosporowych.
- Pierwsze obserwacje wskazują, że wysokie stężenie kinetyny stymuluje powstawanie pędów z zarodków androgenicznych gorczycy białej.

#### ad. E/ Opracowanie warunków konwersji zarodków mikrosporowych w rośliny lub stymulacja wtórnej organogenezy.

##### Metody

W pełni wykształcone zarodki androgeniczne z płynnej kultury przenoszono na pożywkę stałą B5 z 2% sacharozą oraz z dodatkiem 0,1% GA3 na okres 14 dni i umieszczano w temperaturze 1°C przy ośmiogodzinnym oświetleniu. Po tym czasie szalki przenoszono do warunków pokoju hodowlanego. Przez kolejne kilka tygodni obserwowano konwersje zarodków w rośliny. Obliczano liczbę uzyskanych pędów po konwersji.

Zarodki, które nie uległy konwersji, przenoszono na pożywkę MS z 2% sacharozą oraz kinetyną w stężeniu  $10^{-4}$  mola.

##### Wyniki

Z wyłożonych zarodków mikrosporowych po traktowaniu chłodem (1°C) wstępnie zaobserwowano zbliżony procent konwersji dla zarodków rozwijających się na pożywce B5 bez GA3 i z GA3.

Zarodki, które nie uległy konwersji przenoszono na pożywkę z kinetyną, która skutecznie wpływała na rozwój pędów. Przez zastosowanie tych dwu metod istnieje możliwość, że z każdego zarodka androgenicznego rzepaku istnieje możliwość uzyskania roślin

##### Dyskusja

Najkorzystniejszą metodą w masowym uzyskiwaniu podwojonych haploidów jest stymulowanie konwersji zarodków w rośliny. Niska temperatura stymuluje rozwój merystemu wierzchołkowego zarodka nie tylko do konwersji w roślinę, ale także do szybszego uzyskiwania pędów poprzez inicjację organogenezy wtórnej. Z przeprowadzonych wstępnych badań wynika, że wystarczy jeden pasaż na pożywkę z kinetyną, dla uzyskania prawidłowego pędu z zarodka, który nie uległ konwersji po kulturze traktowanej chłodem. Wiele publikacji poświęconych konwersji zarodków mikrosporowych

w rośliny dotyczyło rzepaku jarego (Kott, Beversdorf 1990). Jednak warunki kultury dla tych roślin są nieskuteczne dla rzepaku ozimego. Dlatego podjęto badania nad uzyskiwaniem roślin z androgenicznych zarodków rzepaku ozimego.

Cegielska-Taras T., Tykarska T., Szała L., Kuraś L., Krzymański J. 2002. Euphytica 124, 341-347.

Kott L., Beversdorf W.D. 1990. Plant Cell, Tissue

### Wnioski

Wstępne wyniki wskazują, że:

- kwas giberelinowy może wzmacniać stymulację rozwoju merystemu wierzchołkowego zarodka,
- niska temperatura (1°C) indukuje merystem wierzchołkowy do rozwoju w roślinę w procesie konwersji jak i wtórnej organogenezy.