Postęp Biologiczny 2016

Streszczenie tematu 52

***4-2-01-4-03* „Badania nad indukcją embriogenezy mikrospor u roślin z rodzaju *Brassica* sp.”(prof. dr hab. T. Cegielska-Taras)**

Celem badań jest opracowanie optymalnej i skutecznej stymulacji embriogenezy mikrospor w kulturze *in vitro* izolowanych mikrospor oraz uzyskanie homozygotycznych linii z gatunków rodzaju *Brassica.*

Efektywność procesu embriogenezy mikrospor rzepaku ozimego uwarunkowana jest wieloma czynnikami endogennymi i egzogennymi, spośród których do najważniejszych można zaliczyć: genotyp rośliny–dawcy mikrospor, jej stan fizjologiczny, warunki wzrostu rośliny na poszczególnych etapach rozwoju do kwitnienia, a także rodzaj pożywek i regulatorów wzrostu, substancji stymulujących bezpośrednio proces embrio- i organogenezy oraz temperatura w jakiej przebiega kultura.

Brassica napus L. - rzepak ozimy
Warunki wzrostu roślin donorowych są bardzo istotne dla masowej produkcji podwojonych haploidów. Podstawowym warunkiem jest zapewnienie roślinom dawcom mikrospor kontrolowanych warunków środowiska o zminimalizowanych wahaniach temperatury i światła w trakcie rozwoju szczególnie pędu kwiatowego. W prowadzonych badaniach u dwóch dawców obserwowano bardziej jednorodny wzrost w warunkach 15°/10° C, a u trzeciego dawcy mieszańca D10, bardziej równomierny wzrost roślin, a tym samym rozwój pąków obserwowano w warunkach 12°/7°C przy tym samym fotoperiodzie.
Długość paka kwiatowego roślin z rodzaju *Brassica* jest ściśle skorelowana ze stadium rozwoju mikrospory. Jednakże korelacja ta jest zmienna dla różnych genotypów i różnych gatunków *Brassica* sp. Dla trzech dawców mikrospor rzepaku ozimego wyznaczano marker morfologiczny - długość pąka kwiatowego skorelowaną ze stadium rozwoju mikrospory, w którym jest ona podatna na zmianę drogi z generatywnej na wegetatywną. Dla roślin rozwijających się w stałych warunkach temperatury i światła długość pąka kwiatowego wynosiła dla genotypu D10 4,4-5,0 mm, dla genotypu DC 3,5-3,8 mm, a dla genotypu 19 było to 3,2-3,8 mm
Morfologiczny marker - długość pąka kwiatowego - wskazujący na stadium rozwoju mikrospory podatnej do zmiany z rozwoju generatywnego na wegetatywny jest skuteczny jedynie wówczas gdy rośliny dawcy będą wzrastały w tych samych kontrolowanych warunkach.
U *Brassica napus* zmianę drogi z gametofitowej na sprofitową (embriogenną) inicjuje się szokiem cieplnym. Traktowanie wysoką temperaturą w przedziale 32°C - 35°C generuje powstawanie zarodków u różnych gatunków *Brassica* (przeg. Cegielska-Taras in. 2015). Dlatego niniejsze badania prowadzone były dla porównania skuteczności stymulacji mikrospor do podziałów dwoma temperaturami 30°C i 32°C. Dla badanego genotypu warunki inkubacji mikrospor w temperaturze 30°C przez 10 dni okazały się skuteczniejsze. Dla uzyskania efektywnego resultatu androgenezy *in vitro* optymalne warunki indukcji mikrospor do podziałów powinny być ustalane eksperymentalnie dla danego genotypu dawcy

Dla optymalizacji procesu uzyskiwania androgenicznych roślin z kultury izolowanych mikrospor badano wpływ kinetyny na stymulację pędów z zarodków od początku ich wyłożenia na pożywkę stałą. Najwyższą efektywność w tworzeniu pędów z zarodków mikrosporowych uzyskano z kultury zarodków rozwijających się na pożywce MS z kinetyną. Także i czas uzyskiwania pędów był krótszy. Badane genotypy dawców charakteryzowały się dużą skłonnością do tworzenia pędów z zarodków mikrosporowych i pozytywnie reagowały na pożywkę MS z dodatkiem kinetyny.

Spontaniczne podwojenie liczby chromosomów w trakcie trwania kultury *in vitro* rzepaku wynosi od 10-20 %. Dlatego podwojenie liczy chromosomów substancją antymitotyczną jest pożądane dla uzyskania licznych populacji podwojonych haploidów. Kolchicyna jest jedną z najbardziej skutecznych i łatwych w użyciu substancji w procesie podwajania liczby chromosomów. Skłonność do sztucznej duplikacji chromosomów jest uwarunkowana genetycznie. Potwierdzają to przeprowadzone badania. Jedna populacja androgenicznych roślin D10 zawierała 46,2% diploidów, a

druga o symbolu 19 aż 87,9%. Zastosowanie kolchicyny w stadium mikrospor jest najbardziej efektywnym sposobem podwajania liczby chromosomów.
Innym sposobem podwajania liczby chromosomów jest metoda traktowania roztworem kolchicyny młodych haploidalnych roślin. Ustalenie liczby chromosomów młodym roślinom (w stadium 4-6 liści) na podstawie ilości jądrowego DNA umożliwiło wybór roślin haploidalnych.

Uzyskanie pierwszych nasion z podwojonych haploidów jest zależne od stopnia ich samopylności. Rzepak jest rośliną fakultatywną częściowo obcopylną a częściowo samopylną. Jednocześnie rzepak ma bardzo duży współczynnika rozmnażania, więc nawet zebranie pojedynczych nasion pozwola na utrzymanie linii DH. Dla uzyskania pierwszych nasion z niektórych podwojonych haploidów wymagane jest wspomaganie zapylaniem ręcznym.

Sinapis alba gorczyca biała
Rośliny gorczycy białej po okresie jarowizacji bardzo dobrze rozwijały się warunkach 15°/10° C i 16 godzinnym fotoperiodzie. U tak prowadzonych roślin wyznaczono długość paka kwiatowego dla stadium mikrospory podatnej na zmianę drogi rozwoju 3-3,5 mm.
U gorczycy białej rośliny obcopylnej i samoniezgodnej trudna jest stymulacja mikrospor do podziałów. Następuje to jedynie w takich mikrosporach, które nie otrzymały genów samoniezgodności w procesie mejozy. Dlatego wydajność androgenezy w kulturze izolowanych mikrospor jest bardzo niska, ale możliwa.