

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2016 roku

1. Tytuł zadania: Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury in vitro.

2. Kierownik zadania Prof. dr hab. Janusz Zimny

Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-Państwowy Instytut Badawczy

05-870 onie, Radzików

Tel. 22 7334521, e-mail: j.zimny@ihar.edu.pl

3. Cele zadania Ocena wpływu wybranych czynników egzogennych takich jak stres przeprogramowania mikrospor oraz pożywka indukująca na reakcje mikrospor w warunkach kultury in vitro co w konsekwencji zostaje odzwierciedlone w efektywności pozyskiwania zielonych podwojonych haploidów.

3. 1. Temat badawczy 1

Analiza wpływu różnych czynników stresowych na indukcję androgenezy.

Cel tematu badawczego 1

Celem prac było zbadanie różnych rodzajów stresu na efektywność zaindukowania mikrospor do podziałów mitotycznych przy równoczesnym wykorzystaniu techniki izolowanych mikrospor oraz kultur pylnikowych.

Materiały i metody

Wyjściowy materiał doświadczalny pochodził z programu hodowli żyta ozimego realizowanego w firmach hodowlanych Danko i Poznańskiej Hodowli Roślin, gdzie został otrzymany w wyniku krzyżowań genotypów o zróżnicowanym pochodzeniu. Do pojedynczej izolacji wykorzystywano od 10 do 15 kłosów. Procedura izolacji zakładała odwirowanie mikrospor żywotnych od splazmolizowanych poprzez wirowanie zawiesiny komórek w gradiencie mannitolu i maltozy (kultury mikrospo KM). Mikrospory żywotne zawieszano w płynnych pożywkach indukujących w szalkach Petriego (35 mm średnicy). Pylniki wykładano na zestalone pożywki indukujące, które odpowiadały swoim składem tym stosowanym dla KM jedynie z dodatkiem phytagelu jako czynnika zestalającego. Dalsze postępowanie z kulturami pylnikowymi (KP) odbywało się analogicznie do KM.

Ocena wpływu różnych czynników stresowych na indukcję androgenezyw KP została oszacowana jako procentowy udział reagujących pylników spośród wszystkich wyłożonych na pożywki stałe.

W prezentowanym zadaniu założono przetestowanie 9 kombinacji stresów dla 3 genotypów. W przypadku KM dla każdego genotypu i każdej kombinacji stresowej przeprowadzono 3 odrębne izolacje mikrospor.

Wyniki

Prace dotyczyły jednoczesnego indukowania procesu androgenezy zarówno w KM i KP, co miało na celu wyeliminowanie mogącej pojawić się zmienności warunków w czasie uprawy roślin jak również prowadzenia kultury *in vitro*. Otrzymane wyniki potwierdzają ogromne znaczenie doboru czynnika stresogennego w przeprogramowaniu mikrospor, niemniej jednak decydujący wpływ ma genotyp rośliny donorowej. Spośród 3 badanych genotypów, genotyp S555N/151 wydaje się być odporny na zaindukowanie procesu androgenezy. Mimo iż efektywność izolacji komórek haploidalnych była na tym samym poziomie co w pozostałych dwóch genotypach to po 7 dniach trwania kultury żywotność mikrospor spadała w większości przypadków do 0. Dla pozostałych 2 genotypów: poziom żywotności mikrospor był zależny od zastosowanego stresu. Najlepsze wyniki uzyskano dla stresu gdzie pędy z kłosami były chłodzone w 4°C przez 14 dni a następnie wyizolowane pylniki dodatkowo inkubowane w 0,3 M roztworze mannitolu w temperaturze 4°C przez 7 dni. Nieco gorsze wyniki uzyskano przy chłodzeniu pędów z kłosami w 4°C przez okres 21 dni. We wszystkich kombinacjach dla których zastosowano szok wysokiej temperatury żywotność mikrospor po 7 dniach trwania kultury spadła do 0

W KP działanie czynników stresowych oszacowano na podstawie procentowego udziału reagujących pylników w stosunku do wszystkich wyłożonych po upływie 4 tygodni od założenia kultury. Otrzymane wyniki potwierdziły całkowitą odporność genotypu S555N/151 na zaindukowanie androgenezy. W przypadku pozostałych dwóch genotypów haploidalną embriogenezę udało się zaindukować dla wszystkich zastosowanych stresów poza jednym (mannitol 32°C /24h), gdzie pylniki były poddane szokowi cieplnemu. Najlepsze wyniki dla obu genotypów otrzymano dla stresu chłodzenia kłosów przez 21 dni. Na podobnym poziomie pylniki reagowały dla stresu, gdzie kłosa były chłodzone przez 14 dni i dodatkowo przez kolejne 7 dni w roztworze mannitolu.

Dyskusja

Z doniesień literaturowych wiadomo o stosowaniu przez lata wielu pożywek do indukcji androgenezy u żyta. W naszych badaniach pożywka 190-2 została zastosowana ze względu na jej przydatność sprawdzoną wcześniej w naszym laboratorium oraz przez innych badaczy. W celu zaindukowania procesu androgenezy konieczne jest spełnienie kilku podstawowych warunków takich jak: dobry stan fizjologiczny rośliny donorowej, stadium rozwojowe mikrospor, zaindukowanie mikrospor do procesu androgenezy czy skład pożywek sprzyjający podziałom komórkowym. W przedstawionym zadaniu badawczym skupiono uwagę na etapie zaindukowania mikrospor do podziałów mitotycznych. Przeprogramowanie mikrospor z naturalnej dla nich drogi rozwojowej, prowadzącej do wytworzenia ziarna pyłku, na drogę sporofitową polegającą na podziałach mitotycznych, w konsekwencji których powstaje zarodek androgeniczny, wymaga poddania komórek działaniu stresu. Stres powoduje zablokowanie ekspresji genów związanych z powstawaniem ziaren pyłku np.: gromadzeniem się ziaren skrobi, a urochomione są geny skorelowane z procesem embriogenezy. Okazuje się, że jest to newralgiczny moment dla komórki, w którym bardzo łatwo można ją poddać zbyt silnemu stresowi prowadzącemu do jej śmierci, lub wręcz przeciwnie, stresowi który nie będzie w stanie zmienić jej drogi rozwojowej. Dobór czynnika stresowego jest więc czynnikiem szczególnej uwagi. Dane literaturowe pokazują, że rodzaj stresu powinien być dobrany nie tylko do odpowiedniego gatunku roślin, ale również i genotypu. Nasze badania zdają się potwierdzać istotność tego elementu procesu androgenezy. Nie wszystkie zaproponowane rodzaje czynnika stresowego nadają się do wykorzystania w przypadku genotypów żyta. Pokazaliśmy, że niestety istnieją genotypy całkowicie odporne na indukowanie androgenezy. U pozostałych dwóch genotypów udało się wytypować najbardziej odpowiednie dla nich, ale różniące się od siebie sposoby zaindukowania procesu. Co ciekawe przedstawione badania pokazały różnicę w efektywności wzbudzania androgenezy w zależności od rodzaju prowadzonej kultury. Kultury mikrospor wydają się być dużo bardziej wrażliwe na działanie stresu niż kultury pylników, co może być związane również ze stresem

samej procedury izolacji mikrospor. Niemniej jednak udało się wytypować właściwy rodzaj stresu zarówno dla KM jak i KP.

Wnioski

Dobór sposobu indukowania mikrospor do androgenyzy wymaga indywidualnego podejścia zarówno do poszczególnych genotypów, jak również do rodzaju stosowanej kultury. KM wydają się być bardziej wrażliwe na rodzaj użytego stresu niż KP. Najodpowiedniejszym typem stresu wydaje się być chłodzenie pędów z kłosami przez okres 21 dni, lub chłodzenie pędów z kłosami w połączeniu z późniejszą inkubacją pylników w roztworze mannitolu. Stosowanie wysokich temperatur w przypadku KM wydaje się być stresem za mocnym powodującym 100% śmiertelność komórek.

3.2 Temat badawczy 2

Zbadanie wpływu czynników stresowych i składu pożywek na zjawisko albinizmu regenerantów.

Cel tematu badawczego 2

Celem prac jest zbadanie czy można oddziaływać poprzez dobór stresu, a także poprzez modyfikację pożywki do kultur *in vitro* na liczbę regenerowanych roślin albinotycznych.

Materialy i metody

Doświadczenia w ramach realizacji tematu 2 zostały przeprowadzone na 5 genotypach żyta, wyprowadzonych i wytypowanych w spółkach Danko i Poznańska Hodowla Roślin.

Badania przeprowadzone zostały z wykorzystaniem KP, na których przetestowano 3 rodzaje stresów, łącznie z dwoma rodzajami pożywek indukujących: 190-2 i 190-2 wzbogaconą o 10 mg/l gumy arabskiej. W rezultacie dla każdego genotypu przeprowadzono 6 kombinacji testowych. Dla każdej z kombinacji wykładano na pożywki 20 kłosów. Kultury pylników przeprowadzono zgodnie z opisem w zadaniu 1. Rozszerzenie zadania 2 polegało na dalszym prowadzeniu KP na pożywkach indukujących. Wytworzone w czasie inkubacji struktury androgeniczne przenoszono na pożywkę regeneracyjną 190-2 uzupełnioną regulatorami wzrostu zgodnie z pracą Pauka i in. (1991) i umieszczono w warunkach fotoperiodu dzień/noc 16/8 godz. Otrzymane rośliny, w celu wytworzenia systemu korzeniowego, przeniesiono na pożywkę ukorzeniającą N6I (Pauk i in. 1991) z dodatkiem 2mg/l IAA. Ukorzone regeneranty wysadzono do plat i po aklimatyzacji w fitotronie, zostały przeniesione do 4°C celem jaryzacji.

W celu oszacowania reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury dokonana została ocena: liczby zregenerowanych wszystkich roślin w przeliczeniu na 100 pylników (TP/100P), liczby zielonych roślin w przeliczeniu na 100 pylników (GP/100P) oraz częstotliwości pojawiania się zjawiska albinizmu określanego jako % zregenerowanych roślin bezchlorofilowych spośród wszystkich zregenerowanych.

Wyniki

Do realizacji tej części doświadczeń wybrano trzy stesy, które charakteryzowały się największym odsetkiem reagujących pylników. W ten sposób wytypowano stesy 4°C /21 dni 4°C/ 14 dni + pylniki, mannitol 4°C/ 7 dni, 4°C/ 14 dni + pylniki, mannitol 32°C /24h. Po 4 tygodniach prowadzenia kultury *in vitro* pylników obserwowano pojawianie się pierwszych kalusów. Z czasem rozwijało się coraz więcej kalusa i pojawiały się dobrze uformowane zarodki posiadające typowe dla rodziny *Poaceae* elementy anatomiczne, jak tarczkę, oś

zarodkową, koleoptyl i coleorhizę. Takie struktury były przenoszone na pożywkę regeneracyjną. Wyniki przedstawione w prezentowanym zadaniu dotyczyły etapu regeneracji roślin. Zebrane w czasie trwania doświadczenia dane wskazują na nadrzędny i zasadniczy wpływ genotypu roślin donorowych na jakościową i ilościową regenerację roślin. Wśród analizowanych genotypów wytypowane zostały takie, które charakteryzowały się bardzo dobrą efektywnością regeneracji, jak i całkowicie odporne na zaindukowanie procesu androgenezy a tym samym zerową regenerację.

Rodzaj stosowanego szoku przeprogramowania mikrospor, jak również rodzaj pożywki indukującej ma znaczący wpływ na poszczególne parametry androgenezy. Każdy z badanych genotypów reagował w swoisty dla niego sposób.

W obrębie poszczególnych genotypów można zauważyć większy wpływ stosowanej kombinacji stresowej na liczbę regenerujących albinosów niż wariantu pożywki indukującej. Spośród wszystkich badanych kombinacji, najniższy poziom albinizmu obserwowano dla stresu chłodzenia pędów z kłosami przez okres 21 dni. Dla dwóch genotypów: na zregenerowanych 619 roślin nie zanotowano żadnej rośliny bezchlorofilowej. Dla pozostałych reagujących genotypów średni poziom albinizmu wynosił od 37% do 76%. Należy zaznaczyć, że ten rodzaj stresu umożliwił otrzymanie bezkonkurencyjnie najlepszej efektywności regeneracji, gdzie dla najlepszego genotypu średnia liczba zregenerowanych zielonych roślin wynosiła 37 w przeliczeniu na 100 wyłożonych pylników.

Stosowanie gumy arabskiej (GA) w pożywce indukującej nie miało zasadniczego wpływu na poziom albinizmu, jednakże w znaczący sposób oddziaływało na liczbę ogólnie zregenerowanych roślin.

Dyskusja

Jednym z podstawowych problemów, z jakim stykają się badacze pracujący nad indukowaniem embriogenezy z mikrospor jest często pojawiające się zjawisko braku chlorofilu u regenerujących roślin. Takie rośliny nie są zdolne przeprowadzania procesu fotosyntezy, ale są w stanie osiągnąć wczesne stadia rozwojowe. (Makowska, Oleszczuk 2014). Albinizm jest zjawiskiem wpływającym w znacznym stopniu na efektywność regeneracji w kulturach androgenicznych żyta. Rośliny albinotyczne z racji pierwotnego i nieodwracalnego braku chlorofilu są w stanie rozwijać się w ograniczonym zakresie, jedynie na sztucznych podłożach. Dlatego też są całkowicie bezużyteczne zwłaszcza w kontekście hodowli roślin. Albinizm jest zjawiskiem nieodłącznie towarzyszącym produkcji roślin zbożowych na drodze androgenezy. Od wielu lat prowadzone są badania mające na celu z jednej strony zidentyfikowanie źródeł tego zjawiska, z drugiej zaś zminimalizowanie jego występowania w czasie haploidalnej embriogenezy. Przedstawione powyżej badania ogniskują się na poszukiwaniu sposobów zmniejszenia liczby regenerujących się roślin bezchlorofilowych. Zaprezentowane dane wskazują, że zdecydowanie największe znaczenie w redukcji liczby roślin albinotycznych ma genotyp roślin donorowych. Jednakże poprzez dobór odpowiednich warunków kultury *in vitro*, w tym rodzaju stresu przeprogramowania mikrospor możliwa jest redukcja zjawiska albinizmu. Wydaje się, że najlepszym sposobem prowadzącym do zminimalizowania tego zjawiska jest chłodzenie kłosów przez okres 3 tygodni. Nasze badania pokazały, że zastosowanie wysokiej temperatury w czasie przeprogramowania mikrospor znajdowało odbicie w zwiększonej liczbie zregenerowanych roślin albinotycznych. Nie zauważono natomiast znaczącego wpływu składu pożywki indukującej na liczbę pozyskanych roślin bezchlorofilowych. Analiza różnic w poziomie albinizmu pomiędzy poszczególnymi kombinacjami stresu i pożywki wskazują na to, że źródeł albinizmu należy dopatrywać się na wczesnych etapach androgenezy.

Wnioski

Genotyp roślin donorowych ma kluczowe znaczenie dla efektywności procesu androgenezy, regeneracji roślin jak również poziomu albinizmu, niemniej jednak możliwy

jest wpływ na te parametry poprzez odpowiedni dobór warunków zewnętrznych. Jednym z nich jest rodzaj zastosowanego stresu przeprogramowania mikrospor na drogę sporofitową. Zastosowanie stresu polegającego na chłodzeniu pędów z kłosami przez 21 dni może w przypadku niektórych genotypów w znacznym stopniu obniżyć nasilenie pojawiania się roślin bezchlorofilowych wśród regenerantów. Rodzaj zaproponowanych pożywek indukujących nie wpływał na poziom albinizmu w kulturach *in vitro*, jednakże w zasadniczy sposób podnosił ogólną efektywność regeneracji roślin.

3.2 Temat badawczy 3

Zbadanie wpływu ustalonego stresu, warunków kultury i systemu podwajania liczby chromosomów na liczbę regenerowanych zielonych roślin. Morfologiczna i cytometryczna ocena, ocena poziomu płodności otrzymanych regenerantów.

Cel tematu badawczego 3

Celem prac jest sprawdzenie wpływu wybranych warunków stresu i kultury *in vitro* na liczbę zregenerowanych zielonych roślin i efektywność podwojenia liczby chromosomów.

Materiały i metody

Badania prowadzono z wykorzystaniem zielonych regenerantów otrzymanych w wyniku indukowania androgenezy pod wpływem stresów. Regeneraty oceniano w trakcie wegetacji pod względem cech morfologicznych. Przy pomocy cytometru przepływowego zbadany został poziom ploidalności 172 regenerantów. Poziom ploidalności zregenerowanych roślin został określony w stadium siewki wg zmodyfikowanej procedury Galbraith i in. (1983) z wykorzystaniem buforu stosowanego przez Śliwińską (2008), z dodatkiem DAPI (1 µg/ml). Zawartość jądrowego DNA w analizowanych próbkach oceniano przez porównanie pików fazy G0/G1 cyklu komórkowego z pikami roślin kontrolnych.

Rośliny haploidalne zostały poddane kolchicynowaniu, a spontanicznie podwojone haploidy będą doprowadzane do dojrzałości. Badania przeprowadzono dotąd na 172 roślinach z trzech genotypów.

Wyniki

Dla 5 genotypów, dla których przeprowadzona była jakościowa ocena regeneracji (zadanie 2), otrzymano w sumie 1752 rośliny z czego 61% stanowiły rośliny zielone. Spośród tej puli regenerantów wybrano 172 rośliny na których w ramach realizacji zadania 3 przeprowadzono ocenę morfologiczną oraz analizy poziomu ploidalności z wykorzystaniem cytometru przepływowego. Uzyskane wyniki dowodzą dużej zmienności w budowie morfologicznej regenerantów, które różniły się od siebie pokrojem, wzrostem, szerokością liści, skłonnością do krzewienia. Spośród 172 zregenerowanych roślin badanych przy pomocy cytometru przepływowego 34 okazały się być diploidalne. Trzy są tetraploidami, dwa triploidami, a 5 aneuploidami. Uwidocznily się znaczące różnice pomiędzy genotypami pod względem liczby zregenerowanych spontanicznie podwojonych haploidów. Dla genotypu pierwszego jest to prawie 25 procent, a dla drugiego 12,8%, dla trzeciego 10%. Wśród regenerantów odnotowano też pojedyncze przypadki triploidów, tetraploidów i aneuploidów.

Dyskusja

W czasie realizacji tematu uzyskaliśmy bardzo interesujące wyniki dotyczące regeneracji roślin zielonych. Spośród 5 przebadanych genotypów udało się nam wyselekcjonować jeden z nich, który odznaczał się bardzo wysokim jak na żyto poziomem regeneracji. Średnia efektywność regeneracji zielonych roślin w przeliczeniu na 100 pylników wynosiła 37.

Poziom spontanicznie podwojonych haploidów jest niższy nawet dla najlepszego pod tym względem genotypu w porównaniu do danych przytoczonych przez Tenhola-Roininen i in. (2006) gdzie podwojonych haploidów było ponad 50%. Można przypuszczać, że rośliny oszacowane jako diploidalne będą płodne i zawiążą nasiona. Należy jednak spodziewać się, że ze względu na samoniezhodność gamet żyta tylko część roślin uda się rozmnożyć w efekcie samozapylenia. Część wyda nasiona w wyniku obcozapylenia. Rośliny te nie będą co prawda homozygotyczne, ale będą niosły w sobie geny odpowiedzialne za zdolność żyta do androgenezy i jako takie będą dobrym materiałem do dalszych prac badawczych oraz hodowlanych.

Wnioski

Rodzaj stresu zastosowany do przeprogramowania rozwoju mikrospor wpływa zdecydowanie na liczbę roślin zregenerowanych w kulturach pylników żyta.

Dodanie gumy arabskiej do pożywki podnosi liczbę zregenerowanych roślin.

Liczba spontanicznie podwojonych haploidów zależy od genotypu badanej rośliny.

Spośród regenerujących roślin można wyselekcjonować osobniki tri i tetraploidalne

Uwagi końcowe

W Polsce i innych krajach europejskich klimatu umiarkowanego (m.in. Niemcy, Finlandia) istnieje duże zainteresowanie prowadzeniem prac dotyczących embriogenezy z mikrospor u żyta. Dlatego zaprezentowane tu badania podstawowe, pozwolą odpowiedzieć na pytanie, co powoduje przeprogramowanie rozwoju mikrospory u żyta i co pozwala na wywołanie tego zjawiska na szerszą skalę. Wyniki badań zostaną wykorzystane w pracach nad kierowanym efektem heterozji.