

SPRAWOZDANIE MERYTORYCZNE – streszczenie

z realizacji zadania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej w 2017 roku

1. Tytuł zadania

Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury *in vitro*.

(Prof. dr hab. Janusz Zimny)

Cele zadania: Ocena wpływu wybranych czynników egzogennych takich jak stres przeprogramowania mikrospor oraz pożywki indukującej na reakcję mikrospor w warunkach kultury *in vitro*, co w konsekwencji zostaje odzwierciedlone w efektywności pozyskiwania zielonych podwojonych haploidów jak też zbadanie wpływu herbicydów antymitotycznych na podwajanie liczby chromosomów.

Wyniki: (1) Analiza wpływu różnych czynników stresowych na indukcję androgenezy. Otrzymane wyniki wskazują na ogromne znaczenie zastosowanego czynnika stresogennego w indukowaniu androgenezy żyta. W kulturach pylnikowych działanie czynników stresowych oszacowano na podstawie procentowego udziału reagujących pylników w stosunku do wszystkich wyłożonych po upływie kilku tygodni od założenia kultury. Spośród 3 badanych genotypów, SO1715/14b oraz NS 10/3 zareagowały wyraźnie słabiej w porównaniu z NS 10/1 i to niezależnie od zastosowanego stresu. W przypadku dwóch genotypów (NS 10/3 i NS 10/1) haploidalną embriogenezę udało się zaindukować dla większości zastosowanych stresów. W przypadku stresu bez fazy chłodzenia (mannitol + BAP) nie udało się pobudzić do rozwoju mikrospor nawet u najlepiej reagującego genotypu -NS 10/1. Najwyższy wskaźnik reagujących pylników otrzymano po zastosowaniu stresów, przy których decydujące znaczenie miał chłód. Stres chłodu w kombinacji z inkubacją pylników w mannitolu lub pożywce SolA¹ pozwalał na uzyskanie pozytywnych wyników dla wszystkich badanych genotypów. Uzyskane dane wskazują, że najbardziej uniwersalne są stresse polegające na chłodzeniu kłosów przez 21 dni (stres A) oraz na chłodzeniu kłosów przez 21 dni i dalszej inkubacji pylników w roztworze mannitolu przez 7 dni w temp. 4°C (stres D).

Wyniki: (2) Zbadanie wpływu czynników stresowych i składu pożywek na zjawisko albinizmu regenerantów. Badano związek pomiędzy genotypem roślin donorowych, rodzajem prekultury oraz zastosowaniem w pożywce indukującej tiosiarczanu srebra (STS), a poziomem zjawiska albinizmu wśród zregenerowanych roślin. W badaniach użyto trzy stresse, które charakteryzowały się największym odsetkiem reagujących pylników w zadaniu nr.1. We wszystkich kombinacjach zregenerowano rośliny. Poziom ogólnej regeneracji wahał się od 0 do 64 roślin na 100 pylników. Wytypowano genotypy o wysokim potencjale regeneracyjnym (NS10/4 i NS10/1) oraz takie, dla których możliwe było otrzymanie zaledwie kilku roślin (SO1715/14b). Średni poziom albinizmu wahał się w granicach 7,2 do 66,7%, w zależności od rodzaju zastosowanego stresu i pożywki. Najwyższy odsetek roślin bezchlorofilowych otrzymano dla stresu B (kłosa w 4oC / 21 dni) i G (kłosa w 4oC / 14 dni → pylniki w SolA 4oC/7 dni) u dla genotypu SO1715/14b. Podobną tendencję zaobserwowano dla genotypu o najwyższym potencjale regeneracyjnym (NS10/1). Potraktowanie kłosów stresem D (kłosa w 4oC / 21 dni → pylniki w mannitolu 4oC / 7 dni) przyczyniło się do ograniczenia zjawiska albinizmu średnio o 10% dla większości genotypów. Wbrew postawionej hipotezie dodatek STS nie spowodował obniżenia liczby zregenerowanych roślin albinotycznych.

Wyniki: (3) Zbadanie wpływu ustalonego stresu, warunków kultury na liczbę regenerowanych zielonych roślin ich budowę morfologiczną i płodność. Na etapie aklimatyzacji w szklarni odnotowano bardzo silne zamieranie wyprowadzonych roślin- wypadło ok. 50% posadzonych obiektów. Spośród puli prawidłowo rozwijających się regenerantów wybrano 100, na których przeprowadzono ocenę morfologiczną oraz analizy poziomu ploidalności. Dla wszystkich badanych genotypów już na etapie krzewienia, uzyskane rośliny, wykazywały zmienność fenotypową, odbiegając swoją budową morfologiczną od roślin donorowych. Obserwowano duże różnice w zdolności krzewienia się, szerokości i długości blaszek liściowych. Regeneranty oznaczone jako DH często reprezentowały cechy typowe dla haploidów. U niektórych regenerantów obserwowano pasiastą liści. Uwidocznili

¹ Coronado MJ, Hensel G, Broeders S, Otto I, Kumlehn J (2005) Immature pollen-derived doubled haploid formation in barley cv. Golden Promise as a tool for transgene recombination. APP. 27(4): 591–599.

się różnice pomiędzy genotypami pod względem liczby spontanicznych DH. Regeneranty takie stanowiły ponad 80% roślin analizowanych. Badania wykazały występowanie również dwóch form triploidalnych, które były niepłodne. Nie obserwowano roślin aneuploidalnych.

Liczba spontanicznie podwojonych haploidów wyniosła 87,5% dla NS 10/4, 86%, dla NS 10/1 oraz 44% dla S01715/14b. Dojrzewające kłosa często na etapie kwitnienia nie wyrzucały pylników. Ich niepłodność potwierdzała się brakiem nasion przy swobodnym przepyleniu. Kłosa w dużym stopniu charakteryzowały się częściową płodnością (2 - 41 ziarniaków na kłos). Ze swobodnego zapylenia uzyskano więcej ziarniaków w kłosie, a jednocześnie ziarniaki były większe i lepiej wypełnione niż w przypadku samozapylenia. Długość kłosa wahała się od 4,5 do 10,5 cm. Tylko z 5 izolowanych kłosów udało się zebrać nasiona w liczbie od 10 do 26 na kłos. Dopiero ocena wszystkich płodnych regenerantów pozwoli na wyciąganie wniosków dotyczących wpływu stresów na możliwość uzyskiwania płodnych linii.

Wyniki (4) Ocena wpływu herbicydów antymitotycznych na podwajanie liczby chromosomów w kulturach *in vitro* – badania wstępne. Przeżywalność eksplantatów w formie siewek uzyskanych z zarodków zygotycznych, poddawanych działaniu inhibitorów mitozy zależna była od ich stężenia i czasu ekspozycji. Oryzalina (O) niezależnie od czasu stosowania, wykazywała silniejsze działanie fitotoksyczne ograniczając przeżywalność eksplantatów, w porównaniu do trifluraliny (T). Siewki poddane działaniu trifluraliny na standardowych pożywkach zdolne były do kontynuowania dalszego rozwoju. Przeżywalność eksplantatów ekspozycyjnych przez 48h na 10μM trifluraliny wynosiła po 2 tyg kultury ok. 95%, natomiast po zastosowaniu oryzaliny w takim samym stężeniu wskaźnik ten był prawie dwukrotnie niższy. Przeżywalność i witalność siewek traktowanych herbicydami antymitotycznymi były zależne od ich stadium rozwojowego. Nawet przy niewielkiej różnicy wielkości siewek, poddanych np. 24 h ekspozycji na herbicydy w najwyższych stężeniach przeżywalność ulegała dodatkowemu obniżeniu o 30-50%. Jednak w przypadku najwyższego stężenia oryzaliny siewki, u których rozwój został zahamowany zaczynały „odbijać” po ok. 3-4 tyg kultury. Po 7h ekspozycji na oryzalinę w stężeniu 5 i 10 μM odpowiednio 58% i 33% eksplantatów było w stanie dalej kontynuować swój rozwój. Wrażliwość siewek była zmienna w zależności od warunków oświetlenia i ciemności (światło ograniczało toksyczny wpływ oryzaliny). Na podstawie reakcji siewek androgeniczne regeneranty na etapie ukorzeniania/krzewienia pochodzące z genotypów NS10/1 NS10/3 poddano działaniu w warunkach *in vitro* 5 μM O/7h i 10μM T/24h. Niezależnie od stężenia zastosowanego herbicydu i czasu jego działania nie zaobserwowano jakiegokolwiek negatywnego wpływu na przeżywalność uzyskanych regenerantów u obu genotypów. Przeżywalność roślin obniżyła się dopiero po przeniesieniu ich do gleby, jednak wskaźnik ten nie różnił się od kontroli. Ocena wpływu zastosowanych związków na poziom ploidalności regenerantów, znajdujących się obecnie w jarowizacji, zostanie przeprowadzona w następnym roku kalendarzowym.

Wnioski

Dobór sposobu indukowania mikrospor do androgenezy wymaga indywidualnego podejścia w zależności od genotypu. 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 i to tak w celu indukowania androgenezy jak i ze względu na liczbę albinotycznych regenerantów.

Wzbogacenie pożywek indukujących o STS nie wpływa na poziom albinizmu w kulturach *in vitro*. Dodanie tiosiarczanu srebra do pożywki nie podnosi liczby zregenerowanych roślin.

Liczba spontanicznie podwojonych haploidów zależy od genotypu badanej rośliny.

Oryzalina wykazuje silniejsze działanie fitotoksyczne w porównaniu do trifluraliny. Pomimo zatrzymania rozwoju na skutek zastosowania związków antymitotycznych rośliny są w stanie aktywizować swój rozwój.