

**TADEUSZ ŁUCZKIEWICZ****JERZY NAWRACAŁA****MAŁGORZATA STRYBE****KAROLINA SATKIEWICZ**

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Akademia Rolnicza im. A. Cieszkowskiego w Poznaniu

## Analiza genetyczna kilku cech ilościowych związanych z regeneracją lniarki siewnej (*Camelina sativa* L.) w warunkach kultur *in vitro*

### Genetic analysis of several quantitative traits linked with regeneration of false flax (*Camelina sativa* L.) in *in vitro* tissue cultures

Sześć zróżnicowanych genotypów lniarki siewnej (*Camelina sativa* L), pochodzących z kolekcji europejskich skrzyżowano diallelicznie (typ II Griffinga). Z roślin mieszańców F<sub>1</sub> oraz rodziców, wyszczepiono na pożywkę indukującą regenerację roślin (MS + 1mg/l BAP) eksplantaty liścieniowo-hypokotylowe. Po ośmiu tygodniach kultury oceniano masę wytworzonej tkanki kalusowej i zregenerowanych części roślin, liczbę zregenerowanych pędów, długość pędów i liczbę liści na pędach. Obliczenia wykonano programem DGH2 (Kala i in., 1996). Stwierdzono, że regeneracja roślin przebiegała drogą organogenezy pośredniej. Z jednego eksplantatu zregenerowało średnio od 2,8 do 5,8 pędów, najwięcej z mieszańców kombinacji krzyżówkowej linia 4 × linia 13. Najdłuższe były pędy zregenerowane z eksplantatów linii 15 (4,3 cm). Ocena GCA wykazała, że linia 15 zwiększała w mieszańcach długość zregenerowanych pędów, linia 13 zwiększała istotnie liczbę liści na pędzie, natomiast linia 9 zmniejszała masę kalusa i zregenerowanych części rośliny. Odziedziczalność w szerokim sensie i wąskim sensie była bardzo niska — dla długości pędów wynosiła odpowiednio 0,57 i 0,04 oraz dla liczby liści na pędach 0,38 i 0,15. Istotne efekty dominowania wykazano dla długości pędu.

**Słowa kluczowe:** lniarka, kultury *in vitro*, ogólna zdolność kombinacyjna, odziedziczalność

Diallel crosses (Griffing's type II) between six different genotypes of false flax (*Camelina sativa* L.) originated from European collections were done. Explants (hypocotyl-cotyledon parts) from F<sub>1</sub> hybrids and parental plants were placed on induction medium (MS + 1 mg/l BAP). After 8 weeks of the *in vitro* culture maintenance, a number of shoots regenerated from each explant, number of leaves per explant, length of shoots as well as weight of callus and of the regenerated parts of plant were determined. It was found that the shoots regenerated by indirect organogenesis process. From one explant 2.8–5.8 shoots were regenerated. The highest number of shoots were obtained with hybrid plants of the line 4 × line 13 cross. The longest shoots (4.3 cm) were regenerated from the explants of line 15. Analysis of general combining ability showed that line 15 affected in hybrid plants the increase

in length of regenerated shoots, line 13 — the increase in number of leaves on shoots, and line 9 — the decrease in weight of callus and of the regenerated parts of plant. Heritability both in broad and narrow sense was very low: 0.57 and 0.04 for the length of shoots, and 0.38 and 0.15 for the number of leaves per shoot, respectively. Effects of domination were found to be significant for the length of shoots.

**Key words:** false flax, in vitro culture, general combining ability, heritability

## WSTĘP

Lnianka siewna (*Camelina sativa* L.) jest jedną z najstarszych roślin uprawnych, charakteryzującą się wieloma zaletami, które czynią z niej roślinę atrakcyjną dla rolnictwa. Między innymi można ją uprawiać na glebach piaszczystych, zdegradowanych, na których inne gatunki oleiste zawodzą, dobrze znosi wiosenne przymrozki w porównaniu z innymi jarymi gatunkami oleistymi. Lnianka siewna daje dobrej jakości, szybko schnący olej techniczny, który służy do wyrobu farb olejnych i lakierów (Krzymański, 1961). Dzięki wspaniałej równowadze korzystnych kwasów tłuszczowych szczególnie omega kwasów tłuszczowych, które korzystnie wpływają na czynności serca oraz obniżają zawartość cholesterolu we krwi, olej z lnianki może konkurować z innymi, wysokiej jakości olejami jadalnymi dostępnymi na naszym rynku. Nieliczne prace nad tym gatunkiem sprawiają, że pełny potencjał rolniczy i hodowlany tego gatunku nie jest jeszcze dostatecznie poznany. Gatunek jest słabo opracowany pod wieloma względami m.in. w kulturach *in vitro* nie dopracowano się efektywnych metod regeneracji (Zandecka-Dziubak i Łuczkiwicz, 1999 i 2000). Oprócz składu pożywki na efektywność regeneracji ma w dużym stopniu wpływ genotyp rośliny. Niewiele jest jednak prac dotyczących dziedziczenia cech związanych z regeneracją roślin w kulturach *in vitro*. Badania takie wykonane na podstawie krzyżowań diallelicznych przeprowadzono u pszenicy (Ekin i Konzak, 1994), ryżu (Imuta i in., 1991), lucerny (Kielly i Bowley, 1997) i soi (Roy i Maloo, 2001). Najczęściej oceniano zdolność genotypów do tworzenia kalusa (Kielly i Bowley, 1997) i regeneracji pędów (Sparrow i in., 2004).

W prezentowanej pracy podjęto próbę oceny ogólnej i specyficznej zdolności kombinacyjnej oraz oszacowania odziedziczalności niektórych cech obserwowanych podczas regeneracji roślin lnianki siewnej.

## MATERIAŁ I METODY

Genotypy rodzicielskie do krzyżowania wybrano, na podstawie 3-letnich doświadczeń polowych, ze zgromadzonej w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin Akademii Rolniczej w Poznaniu kolekcji 29 europejskich jarych form (odmian i rodów) lnianki siewnej (*C. sativa* L.). Sześć zróżnicowanych pod względem analizowanych cech ilościowych genotypów krzyżowano diallelicznie (model II wg Griffinga, 1956). Nasiona mieszańców F<sub>1</sub> (15 kombinacji krzyżówkowych) oraz form rodzicielskich odkażano przez 5 min. w ACE (substancja czynna 5% roztwór podchlorynu sodu), przepłukano 3-krotnie w wodzie destylowanej i wyłożono na bibułę filtracyjną na płytkach Petri'ego. Kiełkowanie przeprowadzono w pokoju hodowlanym w temperaturze 26°C, przy 16 h fotoperiodzie i natężeniu światła wynoszącym 3800 luxów. Z czterodniowych siewek

wycinano eksplantaty liścieniowo-hypokotylowe, które umieszczano na pożywce MS (Murashige i Skoog, 1962) z dodatkiem 1 ml/l BAP (6-benzylaminopuryna) (Zandacka-Dziubak, 2000). Z każdego genotypu na pożywkę wyłożono 30 eksplantatów, które po 23 dniach hodowli przenoszono na pożywkę o tym samym składzie. Po 6 tygodniach przeprowadzono obserwacje dotyczące liczby pędów zregenerowanych z eksplantatu, liczby liści na zregenerowanych pędach, długości pędów oraz łącznej masy kalusa i zregenerowanych części roślin. Obliczenia średnich wartości cech, analizę wariancji, istotność efektów ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) oraz odziedziczalność w szerokim i wąskim sensie obliczono programem DGH2 (Master i Jinks, 1982; Kala i in., 1996).

## WYNIKI I DYSKUSJA

**Przebieg regeneracji**

Tkanka kalusowa zaczęła się rozwijać na wszystkich eksplantatach, w dolnej części segmentu hypokotylowego po 7 do 12 dni inkubacji w pokoju hodowlanym.

Tabela 1

**Zmienność analizowanych cech lniarki siewnej w warunkach kultur *in vitro* u genotypów rodzicielskich oraz mieszańców pokolenia F<sub>1</sub> krzyżówek diallelicznych**  
**Variability of analyzed traits of false flax in *in vitro* culture of parental genotypes and F<sub>1</sub> progeny from diallel crosses**

Genotyp Genotype	Liczba pędów zregenerowanych/ eksplantat Number of shoots regenerated per explant			Liczba liści / eksplantat Number of leaves per explant			Długość pędu Length of shoots (cm)			Masa kalusa i zregenerowanych części rośliny Weight of callus and regenerated parts of plant (g)		
	P	$\bar{x}$	W	P	$\bar{x}$	W	P	$\bar{x}$	W	P	$\bar{x}$	W
20	1-11	5,1	54,0	3-58	30,1	34,9	1,1-7,0	3,0	51,9	0,5-2,1	0,7	94,0
20×9	1-7	4,0	38,0	7-49	22,8	32,1	1,2-6,1	3,5	38,2	0,1-0,7	0,4	40,3
20×15	1-10	3,9	74,8	5-73	23,6	58,1	1,0-5,3	2,5	51,8	0,1-1,1	0,5	70,9
20×4	1-12	5,1	49,2	3-54	23,1	23,7	1,1-4,5	2,5	38,2	0,2-1,0	0,4	54,0
20×29	1-9	4,1	45,7	9-56	28,9	21,2	2,1-6,1	3,6	29,8	0,1-1,2	0,5	61,2
20×13	1-8	4,8	52,0	7-75	30,9	34,4	1,2-6,3	3,6	38,3	0,1-1,7	0,7	67,3
9	1-8	3,8	56,5	3-46	19,8	31,6	0,5-7,2	2,6	67,4	0,1-1,8	0,4	105,9
9×15	1-8	4,3	52,3	8-65	31,0	34,2	1,1-8,0	3,8	46,9	0,1-2,1	0,6	69,7
9×4	1-7	2,8	62,3	6-42	17,1	46,0	1,0-4,5	2,3	41,8	0,1-0,6	0,3	62,4
9×29	1-9	3,3	74,3	10-61	23,2	39,1	1,2-9,1	4,1	40,3	0,1-1,3	0,4	82,5
9×13	1-9	3,8	55,7	8-69	24,1	28,2	1,0-5,3	2,7	38,7	0,1-0,8	0,3	64,8
15	2-14	5,1	58,9	11-65	30,3	33,1	2,3-9,0	4,3	44,0	0,1-2,9	0,8	87,2
15×4	1-10	3,5	62,5	4-55	21,3	38,0	1,1-6,0	3,0	46,2	0,1-1,2	0,5	68,6
15×29	1-7	3,6	39,7	13-48	24,0	31,8	1,9-5,2	3,4	27,6	0,2-0,8	0,4	44,3
15×13	1-7	2,8	52,6	10-52	23,0	33,6	1,4-5,4	3,0	46,7	0,1-2,3	0,5	95,2
4	1-7	4,3	37,5	4-44	22,9	20,9	1,3-6,3	3,1	42,0	0,1-0,9	0,4	50,7
4×29	1-12	4,4	64,7	4-63	25,3	36,0	1,1-5,2	2,7	49,0	0,1-2,5	0,6	96,6
4×13	4-9	5,8	25,8	15-53	35,9	21,7	2,2-7,1	3,8	32,4	0,2-1,1	0,6	38,6
29	1-7	3,5	48,8	4-46	21,0	40,4	1,1-6,6	2,7	47,2	0,2-3,3	0,8	107,5
29×13	1-12	4,6	61,5	8-71	36,5	25,8	1,9-4,3	3,0	25,7	0,1-3,5	0,6	111,1
13	2-13	4,7	67,1	8-65	33,4	30,5	1,3-5,0	3,0	36,3	0,1-2,8	0,8	101,6

W — Współczynnik zmienności; Coefficient of variability

P — Przedział; Range

Jej wzrost nie był intensywny. Tworzenie pędów odbywało się z części liścieniowej eksplantatu, już po dwóch tygodniach hodowli obserwowano początki wzrostu pędu i liści. Podobny przebieg regeneracji u lniarki obserwowała Zandecka-Dziubak (2000). Tworzące się pędy przenoszono na świeże pożywki. Po 6 tygodniach z jednego eksplantatu zregenerowało średnio w zależności od genotypu od 2,8 do 5,8 pędów (tab. 1). Najwięcej pędów zregenerowały eksplantaty z mieszańców kombinacji krzyżówkowych  $4 \times 13$  i  $20 \times 4$ , a następnie form rodzicielskich nr 15 i 20 (tab. 1). Współczynnik zmienności dla liczby zregenerowanych pędów wahał się od 25,8 do 74,8%. Na zregenerowanych pędach, mających bardzo krótkie międzywęzła, obserwowano dużą liczbę liści. W konsekwencji z jednego eksplantatu wyrastało ponad 30 liści (tab. 1). Zmienność liczby liści wytworzonych na pędach zregenerowanych z jednego eksplantatu była najmniejsza z obserwowanych cech. Najdłuższe były pędy zregenerowane z eksplantatów genotypu nr 15 (4,3 cm), natomiast wśród mieszańców najdłuższe pędy obserwowano na eksplantatach z kombinacji krzyżówkowej  $9 \times 29$  (tab. 1). Cecha ta charakteryzowała się zmiennością podobną jak zmienność liczby liści (25,7–67,4%). Średnia masa wytworzonych pędów i liści wraz z tkanką kalusową wahała się od 0,3 do 0,8 g i była cechą o największej zmienności (tab. 1).

#### GCA i SCA

Właściwy dobór komponentów rodzicielskich do krzyżowań jest jednym z warunków zapewniających skuteczność hodowli. Oszacowanie zdolności kombinacyjnej ułatwia ten wybór, zwiększając prawdopodobieństwo uzyskania wartościowego potomstwa. (Lonc i in., 1993). Przeprowadzona ocena efektów ogólnej zdolności kombinacyjnej wykazała, że większość efektów GCA była nieistotna statystycznie (tab. 2).

Tabela 2

#### Efekty ogólnej zdolności kombinacyjnej (GCA) dla sześciu genotypów rodzicielskich lniarki siewnej (*Camelina sativa* L.)

#### Effects of general combining ability (GCA) for six parental genotypes of false flax (*Camelina sativa* L.)

Genotyp Genotype	Liczba pędów zregenerowanych na eksplantat Number of shoots regenerated per explant	Liczba liści na eksplantat Number of leaves per explant	Długość pędu Length of shoot	Masa kalusa i zregenerowanych części rośliny Weight of callus and regenerated parts of plant
20	0,43	-0,08	-0,81	0,01
9	-0,42	-2,61	-0,08	-0,11*
15	-0,22	-1,52	0,35**	0,02
4	0,21	-0,73	-0,10	-0,05
29	-0,25	0,41	-0,64	0,06
13	0,25	4,53**	-0,03	0,08

\*\* Istotne na poziomie  $\alpha = 0,01$  Significant at  $\alpha = 0,01$

\* Istotne na poziomie  $\alpha = 0,05$  Significant at  $\alpha = 0,05$

Dodatknie efekty GCA odnotowano jedynie dla linii 15 i 13. Mieszańce, których jednym z komponentów rodzicielskich była linia 15, miały zwiększoną długość zregenerowanych pędów, a mieszańce, których jednym z komponentów rodzicielskich była linia 13,

charakteryzowały się zwiększoną istotnie liczbą liści na pędzie. Ujemne efekty GCA wykazano w przypadku linii 9 dla masy kalusa i zregenerowanych części rośliny (tab. 2).

Spośród piętnastu mieszańców, aż dla jedenastu kombinacji krzyżówkowych efekty SCA były nieistotne (tab. 3). Dodatkowo efekty SCA zostały oszacowane dla mieszańca z kombinacji krzyżówkowej linia 9 × linia 15 w przypadku liczby liści oraz dla mieszańca z kombinacji krzyżówkowej linia 4 × linia 13 w przypadku długości zregenerowanego pędu. Ujemnymi wartościami SCA dla liczby zregenerowanych pędów charakteryzował się mieszaniec z kombinacji krzyżówkowej linia 15 × linia 13. Natomiast dla liczby liści z eksplantatu ujemne efekty SCA wykazano u mieszańca linia 20 × linia 15. U żadnego mieszańca pokolenia F<sub>1</sub> nie stwierdzono istotnych statystycznie efektów SCA dla masy kalusa i zregenerowanych części roślin (tab. 3).

Tabela 3

**Efekty specyficznej zdolności kombinacyjnej (SCA) dla piętnastu mieszańców pokolenia F<sub>1</sub> krzyżówek diallelicznych roślin lnianki siewnej (*Camelina sativa* L.)**  
**Effects of specific combining ability (SCA) for fifteen F<sub>1</sub> hybrids of false flax (*Camelina sativa* L.) diallel crosses**

Genotyp Genotype	Liczba — Number		Długość pędu Length of shoot	Masa kalusa i zregenerowanych części rośliny Weight of callus and regenerated parts of plant
	pędów zregenerowanych eksplantat of shoots regenerated per explant	liści na eksplantat of leaves per explant		
20×9	-0,13	-0,11	0,45	-0,04
20×15	-0,43	-13,83**	-1,02	-0,10
20×4	0,33	-1,74	-0,53	-0,07
20×29	0,25	2,91	0,56	-0,15
20×13	-0,05	0,85	0,47	0,05
9×15	0,82	9,53*	0,35	0,17
9×4	-1,16	-5,21	-0,68	-0,10
9×29	-0,14	-0,20	1,07	-0,08
9×13	-0,15	-3,46	-0,39	-0,19
15×4	-0,62	-1,80	-0,40	-0,01
15×29	-0,05	-0,54	-0,10	-0,23
15×13	-1,35*	-5,65	-0,57	0,14
4×29	0,27	0,02	-0,31	0,13
4×13	1,17	6,51	0,77*	0,04
29×13	0,43	5,96	-0,13	-0,03

\*\* Istotne na poziomie  $\alpha = 0,01$  Significant at  $\alpha = 0,01$

\* Istotne na poziomie  $\alpha = 0,05$  Significant at  $\alpha = 0,05$

### Odziedziczalność

Obliczono odziedziczalność dla dwóch cech: długości zregenerowanych pędów i liczby liści na pędach. Odziedziczalność w szerokim sensie dla długości pędów wynosiła 0,57 oraz dla liczby liści na pędach 0,38. Odziedziczalność w wąskim sensie była bardzo niska dla długości pędów wynosiła 0,04, a dla liczby liści na pędzie 0,15. Dla pozostałych cech nie określono wartości odziedziczalności ze względu na duży błąd spowodowany zbyt dużą zmiennością danej cechy ilościowej. Nie wykazano także addytywnego działania genów. Jedyne istotne efekty dominowania oszacowano dla długości pędu.

#### WNIOSKI

1. Z wyszczepionych eksplantatów regeneracja pędów następowała drogą organogenezy pośredniej. Wytworzone pędy były krótkie z dużą liczbą liści.
2. Cechy ilościowe analizowane w warunkach kultur *in vitro* charakteryzowały się dużą zmiennością, a największą łączną masą kalusa i zregenerowanych części rośliny.
3. Ocena GCA wykazała, że jedynie linia 15 zwiększała w mieszańcach długość zregenerowanych pędów, a linia 13 zwiększała istotnie liczbę liści na pędzie.
4. Dodatkowo, istotne efekty specyficznej zdolności kombinacyjnej odnotowano u jednego mieszańca w przypadku liczby liści na eksplantat oraz u jednego mieszańca w przypadku długości zregenerowanego pędu.
5. Analiza genetyczna cech ilościowych związanych z regeneracją roślin w kulturach *in vitro* może być utrudniona ze względu na dużą zmienność otrzymanyh wyników, a także ze względu na możliwość wystąpienia zmienności somaklonalnej i epigenetycznej.

#### LITERATURA

- Ekiz H., Konzak C. F. 1994. Preliminary diallel analysis of anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breed.* 113: 47 — 52.
- Griffing B. 1956. Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. *Aust. J. Biol. Sci.* 9: 463 — 492.
- Imuta I., Kikuchi F., Namai H., Ukai Y. 1991. Diallel analysis of callus formation ability in anther culture of rice. *Jpn. J. Breed.* 41: 153 — 162.
- Kala R., Chudzik H., Dobek A., Kielczewska H. 1996 DGH2.
- Kielly G. A., Bowley S. R. 1997. Quantitative genetic analysis of *in vitro* callus proliferation in alfalfa. *Can. J. Plant Sci.* 77 (2): 225 — 229.
- Krzymański J. 1961. Chromatograficzne określenie zmian składu kwasów tłuszczowych oleju rzepakowego i lniankowego w wyniku ozimizacji. *Hod. Rośl. Aklim.* T. 5 Z. 6: 799 — 807.
- Matter K., Jinks J. L. 1982. *Biometrical genetics*. 3<sup>rd</sup> ed. Chapman and Hall, London.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473 — 497.
- Roy P. K., Maloo S. R. 2001. Diallel study on some *in vitro* callus traits of soybean (*Glycine max* (L.) Merrill). *J. Genet. Breed.* 55 (4): 357 — 362.
- Sparrow P., Townsend T., Morgan C., Dale P., Arthur A., Irwin J. 2004. Genetic analysis of *in vitro* shoot regeneration from cotyledonary petioles of *Brassica oleracea*. *Theor. Appl. Genet.* 108 (7): 1249 — 1255.
- Zandecka-Dziubak J. 2000. Regeneracja roślin *Camelina sativa* L. w kulturach *in vitro*. Praca doktorska. AR w Poznaniu.
- Zandecka-Dziubak J., Łuczkiwicz T. 1999. Regeneracja pędów z segmentów hypokotylowych lnianki siewnej *Camelina sativa* L. w kulturach *in vitro*. *Rośliny Oleiste. Oilseed Crops*, XX (2): 631 — 636.
- Zandecka-Dziubak J., Łuczkiwicz T. 2000. Efektywność embriogenezy somatycznej w kulturach *in vitro* lnianki siewnej (*Camelina sativa* L.). *Rośliny Oleiste. Oilseed Crops*, XXI (2): 615 — 620.