

AGNIESZKA KATAŃSKA**ZBIGNIEW BRODA**

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin

Akademia Rolnicza w Poznaniu

Wpływ 2,4 D i picloramu na indukcję androgenezy pszenżyta ozimego (*Triticosecale* Wittm.)

The influence of 2.4 D and picloram on androgenesis of winter triticales (*Triticosecale* Wittm.)

Obiektem badań były odmiany pszenżyta ozimego: Bogo, Hewo, Tornado, Kitaro, Sekundo, Kazo oraz 1 ród SZDB 154. Celem pracy było określenie wpływu stężenia mieszaniny auksyn — 2,4 D i picloramu na efektywność androgenezy wybranych odmian pszenżyta ozimego. W doświadczeniu zastosowano pożywkę C_{17} (Wang i Chen, 1983) z dodatkiem 2,4 D i picloramu w następujących stężeniach: 1 mg 2,4 D + 0,5 mg picloramu / na litr pożywki; 1 mg 2,4 D + 1,0 mg picloramu / na litr pożywki; 1 mg 2,4 D + 1,5 mg picloramu / na litr pożywki; Pożywkę bez auksyn traktowano jako kontrolę dla powyższego doświadczenia. Uzyskany kalus hodowano na pożywce regeneracyjnej 190-2 (Zhuang i Jia, 1983). Wyższe stężenie mieszaniny auksyn wpłynęło pozytywnie na indukcję kalusa. Najwyższą efektywność androgenezy zaobserwowano u odmiany Kazo na pożywce C_{17} z dodatkiem 1 ml 2,4 D i 1,5 mg picloramu / na litr pożywki — 47,6 kalusów embriogennych na 100 wyłożonych. Najniższą, u odmiany Kitaro na pożywce C_{17} bez dodatku mieszaniny auksyn — 3,3 kalusów embriogennych na 100 wyłożonych pylników. Obserwowano również wpływ genotypu odmian na indukcję androgenezy. Niezależnie od poziomu stężenia auksyn kalus embriogeny najintensywniej tworzył się u odmiany Kazo, natomiast najslabiej u odmiany Kitaro. W doświadczeniu najwięcej zielonych roślin otrzymano u odmiany Kazo na pożywce C_{17} z dodatkiem 1 mg 2,4 D i 1,5 mg picloramu na litr pożywki.

Słowa kluczowe: androgeneza, auksyna, *in vitro*, odmiany, pszenżyto, pylniki

The research was carried on cultivars of winter triticales: Bogo, Hewo, Tornado, Kitaro, Sekundo, Kazo and one breeding line SZDB 154. It aimed at determination of the influence of 2.4 D and picloram mixture concentration on effectiveness of androgenesis in selected cultivars of winter triticales. In the experiment the medium C_{17} (Wang and Chen, 1983) with 2.4 D and picloram was applied at the following concentration levels: 1 mg 2.4 D + 0.5 mg picloram / 1 litre of medium; 1 mg 2.4 D + 1.0 mg picloram / 1 litre of medium; 1 mg 2.4 D + 1.5 mg picloram / 1 litre of medium. Higher concentration of auxine mixture caused better callus induction. The highest effectiveness of androgenesis was observed in Kazo on the C_{17} medium with 1 mg of 2.4 D / 1 litre of medium. The lowest effectiveness was observed in the Kitaro cultivar. The influence of genotype on androgenesis induction was distinct. Independently on the level of the auxine concentration, embryogenic callus developed most intensely

in Kazo, and least intensely in Kitaro. In the experiment, the highest number of regenerated plants was obtained in Kazo on the C₁₇ medium with 1 mg of 2,4 D + 1.5 mg of picloram per one litre medium.

Key words: androgenesis, anthers, auxine, *in vitro*, triticale, varieties

WSTĘP

W ostatnich latach wzrasta znaczenie podwojonych haploidów w hodowli wielu gatunków w tym także pszenżyta ozimego. Zainteresowanie praktyki hodowlanej podwojonymi haploidami wynika przede wszystkim z możliwości otrzymywania roślin w pełni homozygotycznych. Pozwala to na skrócenie cyklu hodowlanego nawet o kilka lat.

Haploidy oraz linie podwojonych haploidów znajdują szereg zastosowań w badaniach nad ekspresją genów i stanowią cenny materiał wyjściowy w hodowli heterozyznej. Wykorzystywane są między innymi do mapowania genomów, ustalania homologii genomów, krzyżowań oddalonych mających na celu wprowadzenie nowych cech np. odporności na choroby.

Do indukowania haploidów u pszenżyta ozimego najczęściej wykorzystuje się technikę kultur pylnikowych. Jednakże ciągle niezadowalające wyniki skłaniają do podejmowania dalszych prac nad podniesieniem efektywności pozyskiwania roślin haploidalnych u tego gatunku.

Obok takich czynników jak: fizjologiczna kondycja roślin donorowych, stadium rozwojowe mikrospor, traktowanie wstępne kłosów obniżoną temperaturą oraz genotyp, decydujących o efektywności tej metody, niezmiernie ważna jest optymalizacja składu pożywek oraz dobór odpowiednich regulatorów wzrostu i rozwoju, zwłaszcza zaś auksyn. Ze względu na najlepsze zdolności indukujące podziały komórkowe i różnicowanie się kalusa (Zheng i in., 1999) najczęściej w androgenezie roślin zbożowych jest używana auksyna 2,4D w stężeniu 2 mg/l. Również inne badania potwierdzają najwyższą skuteczność auksyny 2,4D w procesie androgenezy w porównaniu z innymi związkami z grupy auksyn (Hassawi i in., 1990; Marciniak, 1999). Jednak równie dobrą efektywność androgenezy można uzyskać stosując mieszaniny auksyn. Przeprowadzone przez Marciniaka (1999) badania porównawcze pomiędzy pojedynczo podawanymi do pożywki auksynami a ich mieszaninami, sugerowały, iż najlepszą indukcję kalusa oraz regenerację uzyskano uzupełniając pożywkę mieszaniną 2,4D i picloramu w stężeniu 1:1.

Ze względu na badania przeprowadzone w Katedrze, które potwierdziły korzystniejszy wpływ mieszaniny 2,4D i picloramu (1:1) na przebieg androgenezy w porównaniu do 2,4D, podjęto próbę określenia optymalnego stężenia tej mieszaniny w pożywce indukującej.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiło 6 odmian pszenżyta ozimego: Bogo, Kitaro, Tornado, Sekundo, Kazo, Hewo oraz ród hodowlany SZD154B.

Materiał roślinny, w postaci podkiełkowanych ziarniaków, jarowizowano w warunkach sztucznych w temperaturze 2°C. Po upływie 8 tygodni siewki przenoszono do doniczek.

Na jedną doniczkę przypadały 4 rośliny. Wzrost roślin odbywał się w szklarni przy ustaleniu 16/8 fotoperiodu. Doświadczenia w szklarni prowadzono na przełomie zimy i wiosny, aby zapewnić dobre warunki temperaturowe do wzrostu roślin donorowych. Kłosa po ścięciu traktowano wstępnie obniżoną temperaturą 4°C przez okres 11 dni.

Materiał odkażano w 5% podchlorynie sodu, a następnie płukano w wodzie destylowanej sterylnej. Pylniki pobierano ze środkowej partii kłosa w fazie rozwoju mikrospor — średnio- lub późno- jednojądrowej. Dla każdej kombinacji (odmiana × pożywka) wykładano po 150 pylników. Eksperyment przeprowadzono w 3 powtórzeniach.

W doświadczeniu zastosowano pożywkę indukującą rozwój roślin haploidalnych — C₁₇ (Wang i Chen, 1983) z dodatkiem 2,4 D (kwas 2,4-dichlorofenoksyoctowy) i picloramu (kwas 4-amino 3, 5, 6 trichloropikolinowy) w następujących stężeniach:

- 1 mg 2,4 D + 0,5 mg picloramu / litr pożywki,
- 1 mg 2,4 D + 1,0 mg picloramu / litr pożywki,
- 1 mg 2,4 D + 1,5 mg picloramu / litr pożywki.

Pożywkę bez auksyn traktowano kontrolnie dla powyższego doświadczenia. Hodowlę pylników prowadzono przez 8 tygodni w zaciemnieniu w temperaturze 26°C. Otrzymany kalus przekładano na pożywkę regeneracyjną 190-2 (Zhuang i in., 1983) z dodatkiem 0,5 mg kinetyny i 0,5 mg NAA.

Procent uzyskanego kalusa oraz zregenerowanych roślin obliczono w stosunku do wyłożonych pylników.

Analizę statystyczną wykonano dla liczby uzyskanego kalusa oraz sumy otrzymanych roślin zielonych i albinotycznych. W celu określenia istotności różnic między kombinacjami doświadczalnymi zastosowano analizę wariancji oraz test Newmanna-Keulsa. W obliczeniach statystycznych korzystano z danych transformowanych wg formuły $y = \arcsin x$. Analizy przeprowadzono wykorzystując pakiet Statistica 5.0.

WYNIKI I DYSKUSJA

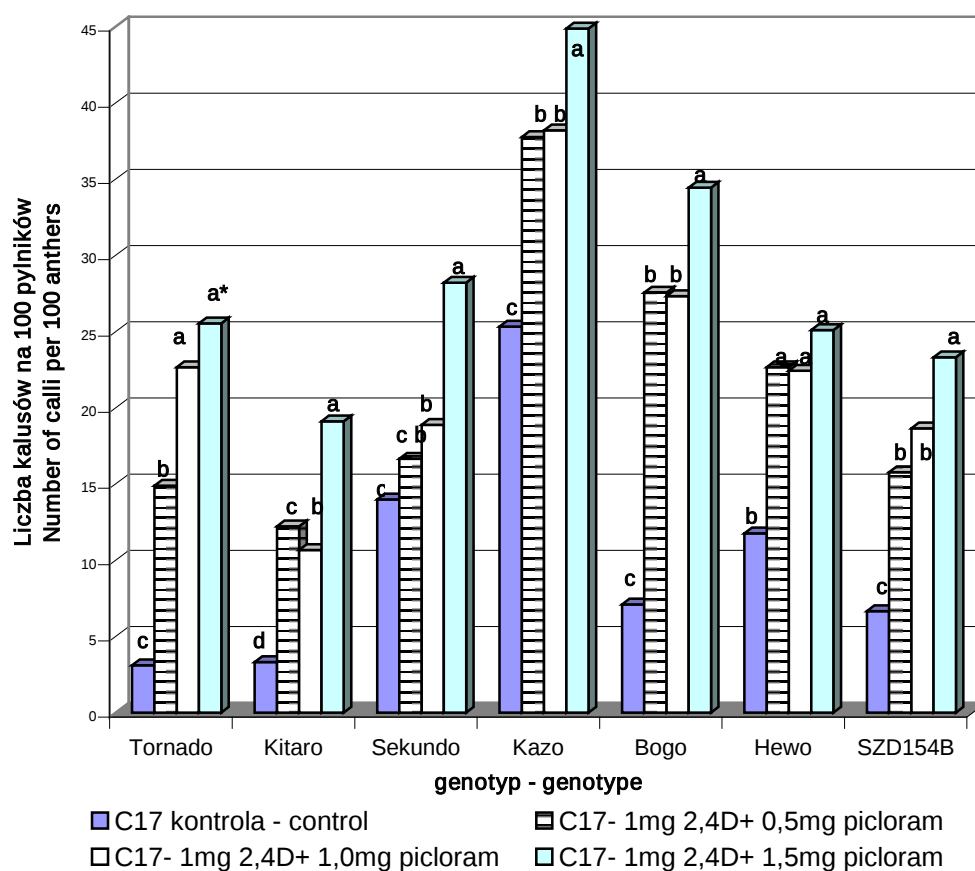
Na podstawie analizy wariancji stwierdzono istotny wpływ stężenia mieszaniny auksyn oraz genotypu na proces tworzenia się kalusa oraz sumę zregenerowanych roślin zielonych i albinotycznych. Również interakcja pomiędzy stężeniem auksyn a genotypem wpływała istotnie na badane cechy (tab. 1).

Wpływ mieszaniny 2,4 D i picloramu podanej w różnych stężeniach na indukcję kalusa przedstawiono na rysunku 1. Pomimo tego, że niekiedy dodatek do pożywki regulatorów wzrostu i rozwoju nie jest niezbędny (Sharma i in., 1982; Rogalska i Mikulski, 1995), to w większości danych literaturowych określa się rolę auksyn w kulturach pylnikowych jako pozytywnie wpływającą na rozwój kalusa. W niniejszym doświadczeniu zaobserwowano podobne zależności.

Tabela 1

Wpływ stężenia mieszaniny 2,4 D i picloramu na indukcję androgenyzy wyrażoną liczbą uzyskanych kalusów na 100 wyłożonych pylników u wybranych odmian pszenżyta ozimego
Testing of hypotheses concerning genotypes, concentrations of auxines and interaction between these factors in variance analysis of two-factorial experiment with triticale

Odmiany Cultivars	Liczba uzyskanych kalusów na 100 wyłożonych pylników Number of obtained calli per 100 anthers plated			
	kontrola control	1 mg/l 2,4 D+ 0,5mg/l picloram	1 mg/l 2,4 D+ 1,0mg/l picloram	1 mg/l 2,4 D+ 1,5mg/l picloram
Bogo	7,1	29,6	30,0	36,0
Hewo	11,6	23,0	23,0	25,1
SZDB 154	6,6	17,0	20,3	26,3
Tornado	5,0	14,0	25,4	28,0



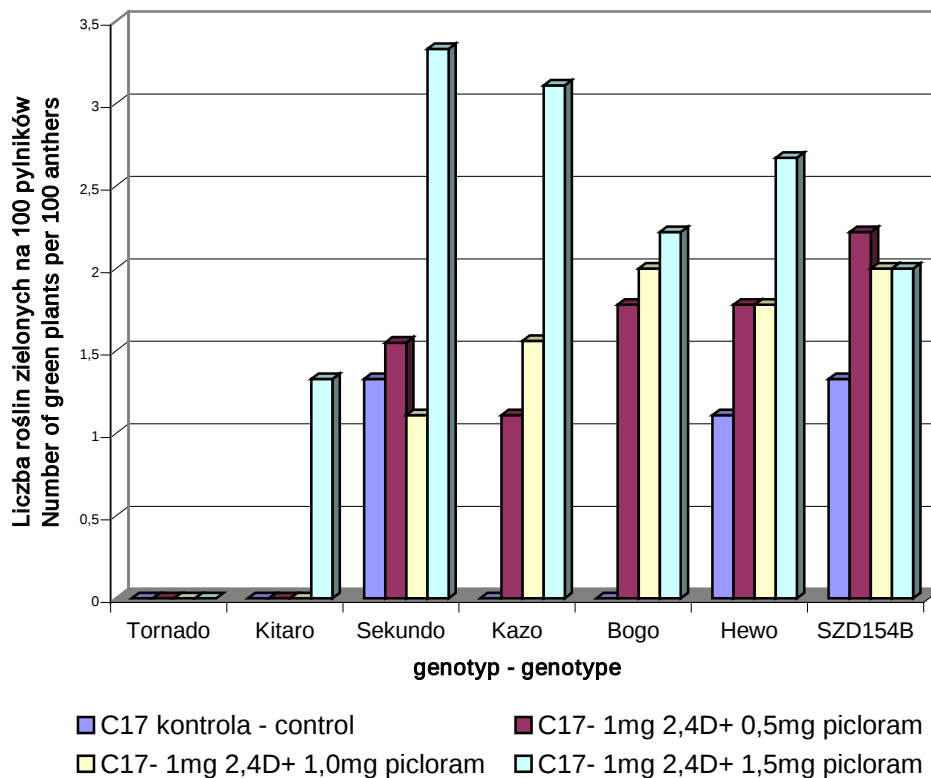
a* Wartości dla każdej odmiany oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie $\alpha = 0,05$ wg testu Newmanna-Keulsa
 a* Values for each cultivar designated with the same letter do not differ significantly, according to the Newmann-Keuls test

Rys. 1. Wpływ genotypu pszenżyta oraz mieszaniny 2,4D i picloramu na efektywność wytwarzania tkanki kalusowej

Fig. 1. Influence of genotype and concentration of mixture 2.4 D and picloram on induction of callus

Mieszanina auksyn w przypadku wszystkich badanych genotypów działała stymulująco na rozwój kalusa w porównaniu do kontroli. Pożywka z dodatkiem 1mg 2,4D i 1,5 mg picloramu okazała się najlepszą pod względem tworzenia tkanki kalusowej dla większości badanych genotypów (rys. 1). Jedynie u odmian Tornado i Hewo nie obserwowano istotnej różnicy pomiędzy najwyższym stężeniem — 1 mg/l 2,4D i 1,5 mg/l picloramu a stężeniem 1 mg/l 2,4D i 1 mg/l picloramu. Najwyższy poziom indukcji kalusa obserwowano u odmiany Kazo na pożywce uzupełnionej 1 mg/l 2,4D i 1,5 mg/l picloramu. Liczba kalusów w przypadku tej odmiany wyniosła 44,9%. Najniższą frekwencję kalusa otrzymano prowadząc kulturę pylników odmiany Tornado na pożywce niezawierającej badanych auksyn — 3,1%.

Większość genotypów odmian również pod względem liczby uzyskanych roślin zielonych pozytywnie zareagowała na auksyny dodane do pożywek indukujących. Regeneracja roślin zielonych u większości badanych odmian najkorzystniej przebiegała na pożywce uzupełnionej najwyższym stężeniem auksyn — 1 mg/l 2,4D i 1,5 mg/l picloramu. (rys. 2).

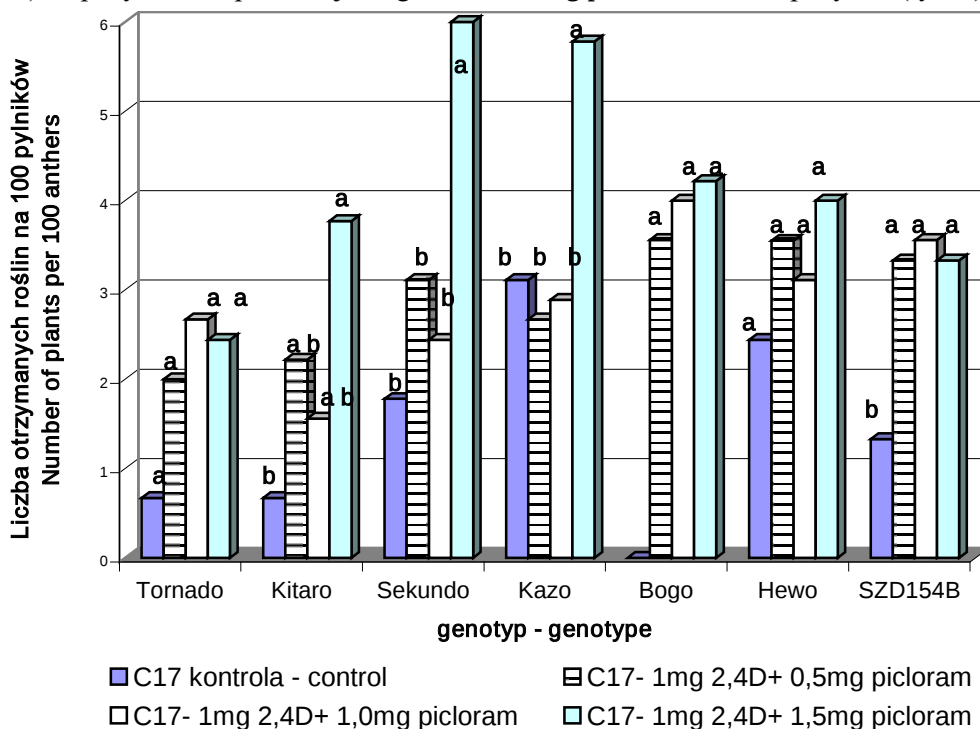


Rys. 2. Wpływ genotypu pszenżyta oraz stężenia 2,4D i picloramu na efektywność regeneracji roślin zielonych

Fig. 2. Influence of genotype and concentration of mixture 2.4 D and picloram on regeneration of green plants

Najwięcej roślin zielonych otrzymano w przypadku odmiany Sekundo (3,3%) oraz Kazo (3,1%) na pożywce uzupełnionej 1 mg/l 2,4D i 1,5 mg/l picloramu. Tylko ród SZD154B wykazał wyższy poziom regeneracji na pożywce zawierającej 1,0 mg 2,4D i 0,5mg picloramu/l. W przeprowadzonym doświadczeniu u odmiany Tornado niezależnie od zastosowanego stężenia auksyn nie otrzymano roślin zielonych.

Większość badanych genotypów regenerowało (suma roślin zielonych i albinotycznych) na pożywce uzupełnionej 1 mg 2,4D i 1,5 mg picloramu na litr pożywki (rys. 3).



a* Wartości dla każdej odmiany oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie $\alpha = 0,05$ wg testu Newmanna-Keulsa
 a* Values for each cultivar designated with the same letter do not differ significantly, according to the Newmann-Keuls test

Rys. 3. Wpływ genotypu pszenżyta oraz stężenia mieszaniny 2,4D i picloramu na efektywność regeneracji roślin (suma roślin zielonych i albinotycznych)
Fig. 3. Influence of genotype and concentration of mixture 2.4 D and picloram on regeneration of plants (total for green and albino plants)

Jednak tylko u odmiany Sekundo i Kazo wyniki uzyskane na tej pożywce okazały się istotnie różne od wyników otrzymanych na pożywkach zawierających niższe stężenie mieszaniny auksyn. Najwięcej roślin, aż 6% otrzymano prowadząc kulturę pylników odmiany Sekundo na pożywce z dodatkiem najwyższego stężenia auksyn. Równie wysoki poziom regeneracji roślin uzyskano w przypadku Kazo na podłożu zawierającym 1 mg/l 2,4D i 1,5 mg/l picloramu — 5,8%. W przeprowadzonym doświadczeniu jedynie

w przypadku Bogo na pożywce kontrolnej nie otrzymano w efekcie prowadzenia kultur pylnikowych roślin zielonych i albinotycznych.

Ważnym czynnikiem wpływającym na przydatność auksyn w androgenezie jest uzyskanie optymalnego stężenia podanej auksyny w pożywce indukującej. W pracach standardowych przyjmuje się, że 2,4D podawana jest do pożywki w stężeniu 2 mg/l. Zheng i wsp. (1999) ustalili, na podstawie przeprowadzonych badań, w których testowali cztery stężenia 2,4D (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/l), że najwyższą efektywność tworzenia kalusa i regeneracji pszenicy obserwować można uzupełniając pożywkę 1–2 mg/l auksyny. Jednak badania nad kulturami pylnikowymi owsa sugerowały wyższe stężenie 2,4D (nawet przy 6 mg/l) zwłaszcza, na pierwszym etapie kultury (Kiviharju i in., 1999). Wysokie stężenie auksyn również pozytywnie wpływało na proces indukcji androgenezy kukurydzy (Kuo i in., 1994), jęczmienia, (Marsolais i in., 1985) oraz pszenicy (Hu Han, 1997).

PODSUMOWANIE

Najlepsze rezultaty w badaniach nad otrzymywaniem form haploidalnych drogą androgenezy uzyskano stosując pożywkę C17 uzupełnioną 1 mg/l 2,4D i 1,5 mg/l picloramu.

W przeprowadzonych badaniach stwierdzono wpływ genotypu na przebieg androgenezy. Najlepszymi zdolnościami do tworzenia kalusa oraz regeneracji roślin wykazała się odmiana Kazo.

LITERATURA

- Hassawi D. S., Qi J., Liang G. H. 1990. Effects of Growth Regulator and Genotype on Production of Wheat and Triticale Polyhaploids from Anther Culture, *Plant Breeding* 104: 40 — 45.
- Hu Han. 1997. *In vitro* induced haploids production in higher plants, vol 4. Kluwer Dordrecht, The Netherlands: 73 — 97.
- Kiviharju E. M., Tauriainen A. A. 1999. 2,4D-dichlorophenoxyacetic acid and kinetin in anther culture of cultivated and wild oats and their interspecific crosses: plant regeneration from *A. sativa* L. *Plant Cell Reports* 18: 582 — 588.
- Marsolais A. A., Kasha K. J. 1985. Callus induction from microspores: the role of sucrose and auxin in a barley culture medium. *Can J. Bot.* 63: 2209 — 2212.
- Marciniak K. 1999. Wpływ mieszaniny auksyn w pożywce indukującej na efektywność androgenezy u pszenżyta ozimego. Materiały I Krajowej Konferencji: Haploidy i Linie Podwojonych Haploidów w Genetyce i Hodowli Roślin. PTG — PAN: 17 ss.
- Rogalska S. Mikulski W. 1995. Androgeneza u pszenżyta (*X Triticosecale* Wittm.). *Biul. IHAR* 195/196: 21 — 31.
- Sharma G. C., Wang W. C. and Sapra V. T. 1982. Effect of genotype, media and temperature pretreatment on callus initiation in triticale, wheat, and rye anther cultures. *Cereal Research Comm.* 10/3–4: 143 — 150.
- Wang, Chen. 1983. Preliminary study on prediction of height of pollen H2 generation in winter wheat grown in the field. *Acta Agron. sin.* 9: 283 — 284.
- Zheng, Konzak. 1999. Effect of 2,4D-dichlorophenoxyacetic acid on callus induction and plant regeneration in anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) *Plant Cell Reports* 19, (1): 69 — 73.
- Zhuang J. J., Jia X. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu H. & Vega MR (eds) *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement* (p 431) Science Press, Beijing.