

KATARZYNA KARSKA

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Oddział w Krakowie

Androgeneza w kulturach pylnikowych jęczmienia jarego

Androgenesis from spring barley anthers culture

Trzyletnie badania nad androgenezą w kulturach pylnikowych *in vitro* 11 odmian i 5 mieszańców F₁ jęczmienia jarego dały zróżnicowane wyniki dotyczące zdolności do androgenozy wśród tych genotypów. Potwierdzono zależność genotypową w procesie androgenozy i zależność zdolności do androgenozy poszczególnych genotypów od pożywki. Zastosowano cztery pożywki indukujące (FHG₀, FHG₁, BAC₄, BAC₅) i dwie pożywki regeneracyjne (FHGR₁, FHGR₂). W pierwszym roku badań procent zregenerowanych roślin zielonych wynosił dla genotypu F₁16 — 5%, F₁471 — 5%, F₁463 — 1,2% i dla odmiany Haisa — 2%. Pozostałe genotypy zregenerowały w rośliny albinotyczne. Zauważono wśród genotypów mieszańcowych F₁ wpływ rośliny matecznej na zdolność do androgenozy. W drugim roku prowadzonego doświadczenia wszystkie badane odmiany wykazały się dobrą reakcją androgeniczną (25% pylników tworzących kalus), jednakże regeneracja uzyskanych kalusów była słaba. Otrzymano jedynie 2 zielone rośliny z pylników odmiany Olga. W trzecim roku badań uzyskano 5 zielonych roślin z odmiany Krona i 1 zieloną roślinę odmiany Olga. Odmiana Haisa nie powtórzyła wyniku androgenozy z pierwszego roku badań. Na tej samej pożywce indukującej i regeneracyjnej wyrosły jedynie rośliny albinotyczne. Oceniono, że pożywki: FHG₀ i BAC₅ okazały się lepsze w indukowaniu procesu androgenozy od pożywek FHG₁ i BAC₄. Natomiast między pożywkami regeneracyjnymi FHGR₁ i FHGR₂ nie zanotowano różnic.

Słowa kluczowe: androgeniza *in vitro*, *Hordeum vulgare* L., jęczmień, kultury pylnikowe

Three-years study on androgenesis in anther cultures of 11 cultivars and 5 F₁ hybrids of spring barley demonstrated in different androgenesis ability of the investigated forms. The genotype dependent androgenesis ability and the genotype x medium interaction were confirmed. Four induction media (FHG₀, FHG₁, BAC₄, BAC₅) and two regeneration media (FHGR₁, FHGR₂) were applied. In the first year of study the following percentages of regenerated green plants were recorded for the genotypes: F₁ 16 — 5%, F₁ 471 — 5%, F₁ 463 — 1,2% and for the cultivar Haisa — 2%. The remaining genotypes regenerated into albino plants. Among the hybrid genotypes an influence of mother plant on androgenesis ability was observed. In the second year of study all the cultivars showed good androgenesis response (25% responding anthers), however regeneration of calli was poor: only 2 green plants was obtained from the cultivar Olga. In the third year 5 green plants from the cultivar Krona and 1 from the cultivar Olga were obtained. The result of androgenesis in the cultivar Haisa from the first year was not repeated — only albino plants regenerated. Furthermore, among the applied media the FHG₀ and BAC₅ proved to be more favorable than the FHG₁ and BAC₄ in androgenesis induction, whereas there were no differences in effect of the regeneration media FHGR₁ and FHGR₂.

Key words: androgenesis *in vitro*, anther culture, barley *Hordeum vulgare* L.

WSTĘP

Wytwarzanie roślin haploidalnych *in vitro* stosuje się w programach hodowlanych do produkcji homozygotycznych linii o korzystnych cechach z heterozygotycznych genotypów w czasie krótszym niż przy użyciu klasycznych metod (Kuhlmann i Foroughi-Wehr, 1989; Kasha i in., 1995). U jęczmienia rośliny haploidalne uzyskuje się bądź drogą androgenezy — techniką kultur pylnikowych lub izolowanych mikrospor, bądź techniką eliminacji chromosomów w krzyżówkach oddalonych (metoda "Bulbosum") (Kao, 1988; Szarejko, 1994). Kultury pylnikowe *in vitro* są jedną z najbardziej obiecujących metod umożliwiających szybkie i wydajne otrzymywanie roślin haploidalnych (Karska, 1998). Głównym problemem związanym z techniką kultur pylnikowych u zbóż jest zależność procesu androgenezy od genotypu (Devaux i in., 1993). W przypadku jęczmienia dla odmiany "Igri" — modelowej w androgenezie — uzyskano kilkaset zielonych roślin na 100 pylników, podczas gdy w badaniach nad innymi formami częstotliwości te nie przekraczały od kilku do kilkunastu procent, bądź regeneracja w ogóle nie nastąpiła (Luckett, Smithard, 1992). Dodatkowym problemem jest występowanie wśród androgenicznych regenerantów licznych roślin albinotycznych, które powstają na skutek zmian w ultrastrukturze chloroplastów, mających miejsce w trakcie hodowli *in vitro* (Mouritzen i Holm, 1994). Zależność procesu androgenezy od genotypu rośliny i od stosowanej pożywki, problem z regeneracją roślin zielonych, a także niejednokrotnie różny stopień ploidalności uzyskanych regenerantów sugerują, że należy wciąż udoskonalać metodę kultur pylnikowych. Metoda ta daje zadowalające rezultaty, wówczas gdy bada się większą liczbę różnych genotypów, modyfikuje pożywkę i warunki prowadzenia kultury (Lezin i in., 1996; Szarejko, 1994). Współdziałanie genotypów z pożywką oraz wysoka częstość roślin bezchlorofilowych wciąż stanowią ograniczenie w stosowaniu metody kultur pylnikowych do produkcji cennych haploidów (Foroughi-Wehri in., 1982; Larsen i in., 1991; Ghaemi i in., 1995; Lezin i in., 1996; King i Kasha, 1997).

Pomimo wielu badań nad optymalizacją tej techniki nie uzyskano metody uniwersalnej, dającej zadowalające wyniki dla każdej odmiany. Ciągłe istnieje wiele odmian, dla których otrzymanie linii podwojonych haploidów drogą androgenezy nie powiodło się.

Dlatego też celem niniejszej pracy była ocena zdolności do androgenezy wśród wybranych genotypów jęczmienia jarego i ocena przydatności zastosowanych pożywek indukujących i regeneracyjnych.

MATERIAŁ I METODY

Materiał do badań stanowiło 11 odmian i 5 mieszańców F_1 jęczmienia jarego badanych przez trzy lata (1997–1999), zróżnicowanych pod względem cech morfologicznych i użytkowych. W pierwszym roku badania nad androgenezą w kulturach pylników przeprowadzono na ośmiu genotypach jęczmienia jarego. Były to trzy odmiany: Haisa, Golden Promise i Start oraz 5 mieszańców F_1 , wywodzących się z tych odmian. Rodowód tych mieszańców zamieszczono w tabeli 1.

W drugim roku do zapoczątkowania kultury pylników użyto ośmiu innych odmian jęczmienia jarego, również zróżnicowanych pod względem morfologicznym i użytkowym. Odmianę Haisa potraktowano jako odmianę modelową (ok. 2 zielone rośliny na 100 wyłożonych pylników). Na podstawie wyników uzyskanych w latach 1997–1998 do dalszych prac wybrano pięć odmian (w tym odmiana Haisa) o najlepszych zdolnościach androgenicznych. Rośliny donorowe rosły w warunkach polowych w Zakładzie Roślin Zbożowych Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin w Krakowie, w standardowych warunkach uprawy i nawożenia. Z każdego poletka pobierano kłosy, zawierające pylniki z mikrosporami w fazie średnio i późno jednojądrowej. Ścięte kłosy podzielono na dwie grupy. Jedną grupę poddano działaniu niskiej temperatury (4°) przez 14 do 21 dni, a drugiej grupy nie chłodzono. W każdym kłosie oznaczano stadium rozwoju mikrospory, badając pod mikroskopem preparaty rozgniatane i barwione acetocarminem.

Po zewnętrznej dezynfekcji kłosów 70% etanolem w aerozolu preparowano pylniki i umieszczano je na szalkach o średnicy 60 mm (około 50 pylników/szalka) na stałej pożywce do indukcji androgenezy. W pierwszym roku badań używano pożywki FHG (Hunter, 1987) zmodyfikowanej dodatkiem 2mg/l auksyny NAA (własna modyfikacja oznaczona jako FHG₀). W drugim roku zastosowano dwie pożywki indukujące FHG i BAC₃ (według Szarejko i Kasha, 1991): obie z takim samym składem hormonów wzrostu: 2 mg/l NAA i 1 mg/l BAP, zestalone agarozą, według własnej modyfikacji — oznaczone odpowiednio jako FHG₁ i BAC₄. W trzecim roku badań powtórzono pożywkę indukującą FHG₀, a jako drugą zastosowano pożywkę BAC₃ zmodyfikowaną przez użycie auksyny IAA do ilości 1,5 mg/l (BAC₅).

Po 3 tygodniach inkubacji w temperaturze 28°C w ciemności pojawiające się 2–4mm wielkości struktury embrioidalne przenoszono w równych ilościach, niezależnie od pożywki indukującej, na pożywki regeneracyjne na bazie pożywki FHG: pożywka FHGR1 z hormonami wzrostu (auksyna NAA-1,4 mg/l i cytokinina BAP-0,4 mg/l) i pożywka FHGR2 bez hormonów wzrostu. Regeneracja następowała w temperaturze 20°C przy cyklu dobowym 16 h/8 h i natężeniu światła 40 uE/m²s. Uzyskane zielone regeneranty wysadzano do gleby i hodowano w warunkach szklarniowych. Oceniano indukcję androgenezy jako ilość pylników reagujących na 100 wyłożonych pylników. Wydajność androgenezy mierzono liczbą struktur embrioidalnych w przeliczeniu na 100 inkubowanych pylników. Wydajność regeneracji oceniano na podstawie liczby roślin zielonych i albinotycznych na 100 inkubowanych pylników albo na 100 otrzymanych androgenicznych embrioidów.

WYNIKI I DYSKUSJA

W tabeli 1 przedstawiono ogólną wydajność androgenezy i regeneracji roślin jęczmienia jarego w kulturach pylnikowych przy zastosowaniu pożywki indukującej FHG₀ i pożywek regeneracyjnych: FHGR1, FHGR2 dla 3 odmian i 5 wywodzących się z nich mieszańców pokolenia F₁.

Tabela 1

Ogólna wydajność androgenezy i regeneracji roślin jęczmienia jarego w kulturach pylnikowych przy zastosowaniu pożywki indukcyjnej FHGo i pożywek regeneracyjnych: FHGR1, FHGR2
The effect of FHGo induction medium and FHGR1, FHGR2 regeneration media on calli induction and plant regeneration from spring barley anther culture

Genotyp Genotype	Liczba wyłożonych pylników No. of anthers plated	% pylników tworzących kalus Responding anthers (%)	Liczba kalusów/ embrioidów na 100 inkubowanych pylników Calli/embryoids per 100 anthers plated	Pożywka regeneracyjna Regeneration medium	Liczba zregenerowanych roślin na 100 inkubowanych pylników. No. of regenerated plant lets per 100 anthers plated		
					Zielone Green	Albinotyczne Albino	Razem Total
Haisa	890	21,8	22,5	FHGR1	0,9	9,8	10,7
				FHGR2	1,0	3,5	4,5
463	830	14,6	18,1	FHGR1	0	0,4	0,4
(F ₁ 467 × Haisa)				FHGR2	1,2	1,3	2,5
464 (F ₁ 468 × Haisa)	240	6,3	8,5	FHGR1	0	2,9	2,9
				FHGR2	0	3,8	3,8
Start	680	12,0	13,4	FHGR1	0	0	0
				FHGR2	0	0	0
16 (F ₁ 367 × Start)	280	12,5	12,5	FHGR1	0,7	5,0	5,7
				FHGR2	4,6	1,4	6,0
21(F ₁ 369 × Start)	250	2,8	2,8	FHGR1	0	1,2	1,2
				FHGR2	0	2,4	2,4
Golden Promise	750	7,5	8,0	FHGR1	0	0,9	0,9
				FHGR2	0	0,8	0,8
471(F ₁ 466 × Golden Promise)	400	8,8	10,0	FHGR1	1,5	0	1,5
				FHGR2	3,0	0,3	3,3
Srednia	4320*	10,8	12,0	FHGR1	0,4	2,5	2,9
Mean				FHGR2	1,2	1,7	2,9

* Całkowita liczba wyłożonych pylników

* Total number of plated anthers

Okazało się, że najlepszą zdolnością do androgenezy odznaczały się odmiana Haisa oraz jej mieszańce 467 × Haisa. U tej odmiany 21,8% wyłożonych pylników tworzyło kalus, a 22,5% dawało embrioidy i kalusy. W przypadku mieszańca liczba reagujących pylników i liczba otrzymanych kalusów była niższa i wynosiła odpowiednio 14,6 i 18,1%. Drugi mieszańiec wywodzący się z odmiany Haisa odznaczał się wyraźnie słabszą zdolnością do androgenezy — z pylników tych roślin 6,3% tworzyło kalus, a 8,3% embrioidy. Podobne zjawisko obserwowano w przypadku odmiany Start, u której kalusy tworzyło 12,0% pylników, natomiast u innych jej mieszańców; (369 × Start) reagowało tylko 2,8% pylników, oraz (367 × Start) 12,5% pylników. Dla mieszańców 16 i 471 w wyniku regeneracji ze 100 wyłożonych pylników otrzymano 5 zielonych roślin, dla odmiany Haisa 2 zielone rośliny i dla jej mieszańca; 463 — 1,2 zielone rośliny. Pozostałe genotypy zregenerowały w rośliny albinotyczne. Z pylników odmiany Start nie uzyskano roślin. Natomiast zdolnością do androgenezy wykazały się jej mieszańce, przy czym mieszańiec 16 dawał rośliny zielone, a 21 tylko albinotyczne.

Uzyskane wyniki zdają się potwierdzać możliwość dziedziczenia zdolności do androgenezy i regeneracji zielonych roślin u jęczmienia, którą sygnalizuje w swoich pracach Devaux i Zivy (1994). Różnice w ilości reagujących pylników oraz w ilości

uzyskanych roślin zielonych i albinotycznych, obserwowane przy tej samej formie ojcowskiej, ale różnych formach matecznych, sugerują silny wpływ rośliny matecznej na zdolność do androgenezy, jednak wyjaśnienie tego zjawiska wymagałoby podjęcia dodatkowych badań i wykraczało poza ramy niniejszej pracy.

Na podstawie wyznaczonych średnich i wariancji ilości zregenerowanych roślin zestawionych w tabeli 1 a, można stwierdzić, że przy równych średnich (3,33) wariancja ilości regenerantów na pożywce FHGR1 jest znacznie większa (13,75) od wariancji ilości regenerantów na pożywce FHGR2 (2,78). Świadczy to o istotnej interakcji między zastosowaną pożywką regeneracyjną a badanymi genotypami. Porównanie liczby roślin na pożywkach FHGR1 i FHGR2 wykazało, że więcej roślin zielonych wyrosło na pożywce FHGR2 (bez hormonów wzrostu). Na pożywce FHGR1 zregenerowało więcej roślin albinotycznych. Obserwacje te są sprzeczne z danymi Devaux i wsp. (1993) oraz Szarejko (1994), którzy stwierdzili, że obecność hormonów wzrostu w pożywce regeneracyjnej istotnie wpływa na ilość zielonych roślin haploidalnych. Na podstawie tego zjawiska wysnuto wniosek, że skład pożywki regeneracyjnej winien być dobierany dla każdego genotypu indywidualnie.

Tabela 1a

Zestawienie średnich i wariancji ilości zregenerowanych roślin jęczmienia w kulturach pylnikowych
Comparison of means and variances of the regenerated plantlets numbers in the barley anther culture

Pożywka/Genotyp Medium/Genotype	Ilość powtórzeń No. of replication	Średnia Mean	Wariancja Variance
R1	7	3,33	13,75
R2	7	3,33	2,78
Haisa	2	7,60	19,22
463	2	1,45	2,21
464	2	3,35	0,41
16	2	5,85	0,05
21	2	1,80	0,72
Golden Promise	2	0,85	0,01
471	2	2,40	1,62

*Odmiana Start nie została umieszczona w tabeli z powodu braku zregenerowanych roślin

*The cultivar Start has not been placed in this table due to the lack of regenerated plants

W drugim roku badań hodowano pylniki pobrane z dziewięciu odmian jęczmienia jarego, na dwóch pożywkach indukujących FHG₁ i BAC₄ i dwóch regeneracyjnych: FHGR1, FHGR2. Otrzymane wyniki przedstawiono w tabelach 2 i 2 a. Stwierdzono, że u odmiany Haisa procent pylników tworzących kalus przy użyciu pożywek: FHG₁ i BAC₄ był porównywalny do wyniku na pożywce FHGo (ok.24%). Jednakże procent uzyskanych kalusów (6%) i zregenerowanych roślin (ok. 1%) okazał się znacznie mniejszy niż w roku poprzednim. Brak było także roślin zielonych. Pozostałe badane odmiany wykazały się dobrą reakcją androgeniczną (średnio 25% pylników tworzących kalus). Dla każdej z nich pożywka indukująca BAC₄ okazała się lepsza (29% pylników tworzących kalus) od pożywki indukującej FHG₁(22,3% pylników tworzących kalus) (tab. 2 a). Obserwowano również istotną zależność procesu androgenezy od genotypu rośliny (tab. 2 a).

Tabela 2

Ogólna wydajność androgenezy i regeneracji roślin jęczmienia jarego w kulturach pylnikowych przy zastosowaniu pożywki indukującej FHG₁, BAC₄ i pożywek regeneracyjnych FHGR1, FHGR2
The effect of FHG₁ BAC₄ induction media and FHGR1, FHGR2 regeneration media, on callous induction and plant regeneration from spring barley anther culture

Genotyp Genotype	Pożywka indukcyjna Induction medium	Liczba wyłożonych pylników No. of anthers plated	% pylników tworzących kalus Responding anthers (%)	Liczba kalusów/embrioidów na 100 inkubowanych pylników Calli/embryoids per 100 anthers plated	Pożywka regeneracyjna Regeneration medium	Liczba zregenerowanych roślin na 100 inkubowanych pylników No. of regenerated plant lets per 100 anthers plated		
						Zielone Green	Albinotyczne Albino	Razem Total
Haisa	FHG ₁	450	23,6	5,5	FHGR1	0,0	0,4	0,4
	BAC ₄	600	23,7	0,5	FHGR2	0,0	0,5	0,5
Bryl	FHG ₁	500	37,8	2,0	FHGR1	0,0	2,0	2,0
	BAC ₄	700	44,1	3,6	FHGR2	0,0	1,3	1,3
Olga	FHG ₁	550	17,6	0,7	FHGR1	0,2	0,2	0,4
	BAC ₄	750	24,4	0	FHGR2	0,1	0,0	0,1
Krona	FHG ₁	650	11,6	0,2	FHGR1	0,0	0,2	0,2
	BAC ₄	700	26,7	0,1	FHGR2	0,0	0,0	0,0
Rataj	FHG ₁	600	14,0	0	FHGR1	0,0	0,7	0,7
	BAC ₄	650	18,5	2,6	FHGR2	0,0	0,5	0,5
Rasbet	FHG ₁	700	28,1	0	FHGR1	0,0	0,0	0,0
	BAC ₄	750	30,4	0	FHGR2	0,0	0,0	0,0
Rabel	FHG ₁	450	40,7	0	FHGR1	0,0	0,0	0,0
	BAC ₄	350	55,7	0	FHGR2	0,0	0,0	0,0
Atol	FHG ₁	450	9,8	7,1	FHGR1	0,0	2,2	2,2
	BAC ₄	550	14,6	0,2	FHGR2	0,0	0,7	0,7
Rodion	FHG ₁	650	13,6	7,7	FHGR1	0,0	3,6	3,6
	BAC ₄	650	22,0	3,2	FHGR2	0,0	2,4	2,4
Średnia	FHG ₁	5000*	22,0	2,9	FHGR1	0,1	1,2	1,2
Mean	BAC ₄	5700*	29,0	1,3	FHGR2	0,2	0,7	0,7

* Całkowita liczba wyłożonych pylników — * Total number of plated anthers

Tabela 2 a

Ilość reagujących pylników (tworzących androgeniczny kalus) na 100 wyłożonych pylników w zależności od genotypu i pożywki indukującej
Androgenetic response of barley anthers, per 100 anthers plated depending on genotype and induction medium

Genotyp Genotype	Pożywka indukująca Induction medium		Średnia Mean
	FHG ₁	BAC ₄	
Rabel	40,7	55,7	48,5 a
Bryl	37,8	44,1	42,0 b
Rasbet	28,1	30,4	29,0 c
Haisa	23,6	23,7	24,0 d
Olga	17,6	24,4	21,0 d
Krona	11,6	26,7	19,5 de
Rodion	13,6	22,0	18,0 e
Rataj	14,0	18,5	16,5 e
Atol	9,8	14,6	12,5 e
Średnia — Mean	22,3	29,0	25,7

NIR = 4,0 — LSD = 4,0

Wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy p = 0,05

Means followed by the same letter were not significantly different at p = 0.05

Regeneracja uzyskanych kalusów była jednak słaba. Otrzymano tylko 2 zielone rośliny z pylników odmiany Olga. Z kalusów pozostałych odmian wyrosły rośliny albinotyczne. Najwięcej kalusów i zregenerowanych roślin albinotycznych otrzymano z odmiany Rodion (ok. 11% kalusów i 6% roślin albinotycznych).

W tabeli 3 zestawiono wyniki androgenozy pięciu odmian jęczmienia jarego, wybranych spośród dziewięciu odmian badanych w poprzednim roku. Odmiany te charakteryzowały się dobrą zdolnością do androgenozy, do której użyto dwie pożywki indukujące: FHGo i BAC₅ i dwie pożywki regeneracyjne: FHGR1 i FHGR2. Nie stwierdzono istotnych różnic pomiędzy badanymi pożywkami ani między genotypami. Wszystkie odmiany bardzo dobrze reagowały w kulturze pylników (ponad 50% pylników tworzących kalus).

Tabela 3

Ogólna wydajność androgenozy i regeneracji roślin jęczmienia jarego w kulturach pylnikowych przy zastosowaniu pożywek indukujących: FHGo i BAC₅ i pożywek regeneracyjnych: FHGR1, FHGR2
The effect of FHGo and BAC₅ induction media and FHGR1, FHGR2 regeneration media, on callus induction and plant regeneration from spring barley anther culture

Genotyp Genotype	Pożywka Indukcyjna Induction Medium	Liczba wyłożonych pylników No. of anthers plated	% pylników tworzących kalus Responding anthers (%)	Liczba kalusów/embrioidów na 100 inkubowanych pylników Calli/embryoids per 100 anthers plated	Pożywka regeneracyjna Regeneration medium	Liczba zregenerowanych roślin na 100 inkubowanych pylników. No. of regenerated plantlets per 100 anthers plated		
						Zielone Green	Albinotyczne Albino	Razem Total
Haisa	FHGo	1400	51,7	1,1	FHGR1	0,0	0,4	0,4
	BAC ₅	1350	51,4	0,6	FHGR2	0,0	0,5	0,5
Olga	FHGo	1350	49,0	0,0	FHGR1	0,0	0,1	0,1
	BAC ₅	1300	62,2	1,2	FHGR2	0,2	0,0	0,2
Bryl	FHGo	750	52,0	0,3	FHGR1	0,0	0,5	0,5
	BAC ₅	1150	39,7	2,2	FHGR2	0,0	1,0	1,0
Krona	FHGo	700	56,6	0,0	FHGR1	0,3	1,6	1,9
	BAC ₅	1100	66,7	22,6	FHGR2	0,2	1,6	1,8
Rodion	FHGo	1250	62,2	4,0	FHGR1	0,0	1,4	1,4
	BAC ₅	1150	63,5	0,2	FHGR2	0,0	0,7	0,7
Średnia	FHGo	5450*	54,4	1,1	FHGR1	0,3	0,8	0,9
Mean	BAC ₅	6050*	56,8	5,4	FHGR2	0,2	0,8	0,8

* Całkowita liczba wyłożonych pylników

* Total number of plated anthers

Odmiana Haisa nie powtórzyła wyniku androgenozy z pierwszego roku badań na tych samych pożywkach indukującej FHGo i regeneracyjnych FHGR1 i FHGR2. Ponad 50% reagujących pylników dało 1,1% kalusów, a w wyniku regeneracji wyrosły jedynie rośliny albinotyczne. Natomiast odmiana Krona wyróżniła się spośród innych odmian, gdyż z pylników tej odmiany uzyskano na pożywce BAC₅ 22,6% embrioidów, z których zregenerowało pięć zielonych roślin. U odmiany Olgi podobnie jak w roku poprzednim z 1% kalusów zregenerowano jedną zieloną roślinę.

W ciągu trzyletnich badań nad androgenezą u jęczmienia jarego stosowano cztery rodzaje pożywek indukujących: FHGo, FHG₁, BAC₄, BAC₅ według własnej modyfikacji. Po przeprowadzeniu analizy wariancji, indukcji androgenozy na tych pożywkach dla pięciu

genotypów jęczmienia, stwierdzono istotne różnice między kombinacjami pożywek stosowanymi w latach 1998–1999 (tab. 4). Pożywki FHG₀ i BAC₅ okazały się znacznie lepsze w indukowaniu procesu androgenozy (uzyskano ponad 50% pylników reagujących) od pożywek FGH₁ i BAC₄ (ok. 25% pylników reagujących). Przy porównywalnych średnich, dotyczących ilości reagujących pylników dla ww. kombinacji pożywek, znaczne różnice w wariancjach sugerują o zależności badanych genotypów od stosowanej pożywki.

Tabela 4

Zestawienie średnich i wariancji dla indukcji androgenozy (% pylników reagujących) na poszczególnych pożywkach indukujących: FHG₀, BAC₅, FGH₁, BAC₄
Means and variances for effect of the induction media: FHG₀, BAC₅, FGH₁, BAC₄ on percentage of responding anthers

Pożywka Medium	Średnia Mean	Wariancja Variance
FHG ₀	58,8	96,7
BAC ₅	56,8	124,7
FGH ₁	21,2	109,2
BAC ₄	27,6	59,3

NIR = 11,4 — LSD = 11,4

W tabeli 5 zestawiono średnie wartości zregenerowanych roślin (zielonych i albinotycznych) na 100 embrioidów uzyskanych z pylników 13 genotypów jęczmienia jarego, przy użyciu dwóch pożywek regeneracyjnych: FHGR1, FHGR2 (analiza danych z trzech lat badań). Analiza wariancji nie wykazała różnic między zastosowanymi pożywkami. Stwierdzono natomiast istotne różnice między genotypami.

Tabela 5

Ilość zregenerowanych roślin jęczmienia (zielonych i albinotycznych) na 100 androgenicznych embrioidów w zależności od genotypu
Barley plants regenerated from 100 androgenetic embryos depending on genotype

Genotyp Genotype	Pożywka regeneracyjna Regeneration medium		Średnie Means
	FHGR1	FHGR2	
Krona	6	7	6,5 ^a
463	2	14	8,0 ^a
Golden Promise	10	10	10 ^a
Olga	16	11	13,5 ^a
Atol	30	12	21,0 ^a
471	15	33	24,0 ^a
Haisa	38	16	27,0 ^{ab}
Rodion	35	20	27,5 ^{ab}
Bryl	23	34	28,5 ^{ab}
Rataj	23	35	29,0 ^{ab}
464	35	45	40,0 ^{ab}
16	45	48	46,5 ^{abc}
21	42	85	63,5 ^{abc}
Średnia — Mean	24,6	28,5	

NIR = 19,5 — LSD = 19,5

Wartości średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy p = 0,05

Means followed by the same letter were not significantly different at p = 0.05

Z przeprowadzonych badań wynika, że zregenerowane rośliny z tkanki kalusowej w większości były albinotyczne. Problem roślin bezchlorofilowych, wśród regenerantów roślin zbożowych uzyskanych drogą kultur pylnikowych, jest wciąż aktualny (Wędzony, 1999). Duża liczba roślin albinotycznych uzyskanych w procesie androgenezy drogą pośrednią poprzez kalus może wynikać z nieprawidłowego tworzenia chloroplastów. Caredda i wsp. (1999) podają, że w trakcie rozwoju androgenicznych zarodków jęczmienia bezpośrednio z mikrospor ponad 30% plastydów wykazało nienormalności w budowie. Natomiast podczas rozwoju androgenicznych zarodków poprzez tkankę kalusową nieprawidłowo wykształconych plastydów było ponad 50%. Badania przeprowadzone nad androgenezą u jęczmienia jarego dowodzą, że proces ten uzależniony jest od wielu czynników: genetycznych, stanu fizjologicznego roślin matecznych, właściwego stadium rozwoju mikrospor w wykładanych pylnikach, warunków prowadzenia kultury pylników, składu stosowanych pożywek (Hunter, 1987; Szarejko, 1994; Góralski i in., 1999), co może w pewnym stopniu wyjaśniać problemy z uzyskaniem haploidów tą drogą. Zdaniem Devaux i wsp. (1993) oraz Immones i Anttila (1999) długotrwałe (21–28 dni) przetrzymywanie kłosów w temperaturze 4°C przed wyłożeniem pylników na pożywkę jest czynnikiem stymulującym dla genotypów o niskiej zdolności do androgenezy. W przeprowadzonym doświadczeniu działanie chłodu na kłosa okazało się nieistotne w inicjowaniu procesu androgenezy. Zauważono jednak, że badane genotypy różnie reagowały na długość okresu chłodzenia, co jest zgodne z doniesieniami Luckett i Darvey, (1992). Mimo zaobserwowanych trudności, możliwość wykorzystania wytworzonych roślin haploidalnych w praktyce sprawia, że badania w tym zakresie powinny być prowadzone z użyciem nowych ciekawych genotypów.

WNIOSKI

1. W wyniku zastosowanej metody kultur pylnikowych (pożywki, warunki prowadzenia kultury) stwierdzono, że przebadane genotypy znacznie różniły się między sobą zdolnością do androgenezy.
2. Potwierdzono zależność zdolności do androgenezy poszczególnych genotypów od pożywki w procesie androgenezy, co stanowi utrudnienie w opracowywaniu wydajnej metody wytwarzania roślin haploidalnych.
3. Odmiana Haisa wybrana po pierwszym roku badań jako odmiana o dobrych zdolnościach androgenetycznych (2% zielonych roślin haploidalnych) słabo reagowała w latach następnych (rośliny albinotyczne). Świadczy to o tym, że na zainicjowanie procesu androgenezy mają wpływ oprócz pożywki również inne czynniki m.in. stan fizjologiczny roślin donorowych.

LITERATURA

- Caredda S., Dedaux P., Sangwan R. S., Clement C. 1999. Differential development of plastids during microspore embryogenesis in barley. *Protoplasma* 208: 1 — 4.
- Devaux P., Hou L., Ullrich S. E., Huang Z., Kleinhofs A. 1993. Factors affecting anther culturability of recalcitrant barley genotypes. *Plant Cell Reports* 13: 32 — 36.

- Devaux P., Zivy M. 1994. Protein markers for anther cultur ability in barley. *Theor. Appl. Genet.* 88: 701 — 706.
- Foroughi-Wehr B., Friedt W., Wenzel G. 1982. On the genetic improvement of androgenetic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theor. Appl. Genet.* 62: 233 — 239.
- Ghaemi M., Sarrafi A., Alibert G. 1995. Influence of genotype media composition, cold pretreatment and their interactions on androgenesis in durum wheat (*Triticum turgidum*). *Cereal Res. Commun.*: 215 — 220.
- Góralski G., Matthysrochon E., Vergne P., Przywara L. 1999. Androgenic development: A fascinating embryo formation process. *Acta Biol. Cracoviensia Series Bot.* 41: 51 — 65.
- Hunter C. P. 1987. Plant generation method. European Patent Application No. 0245 898 A2: 1 — 8.
- Immones S., Anttila H. 1999. Cold pretreatment to enhance green plant regeneration from rye anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 57: 121 — 127.
- Kao K. N. 1988. *In vitro* culture in barley breeding. In: Semi-dwarf cereal mutants and their use in cross-breeding II. IAEA-TECDOC 455, Vienna: 183 — 191.
- Karska K. 1998. Próba wyselekcjonowania genotypów kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata*) i życicy trwałej (*Lolium perenne*) o wysokich zdolnościach androgenetycznych. *Biul. IHAR* 208: 175 — 183.
- Kasha K. I., Yao Q., Simion E., Hu T., Oro R. 1995. Production and applications of doubled haploids in crops. *FAO/IAEA International symposium on the use of induced mutations and molecular techniques for crop improvement*. IAEA — SM-340/009: 3 — 6, 9 — 12.
- Kuhlmann U., Foroughi-Wehr B. 1989. Production of doubled haploid lines in frequencies sufficient for barley breeding programs. *Plant Cell Rep.* 8: 78 — 81.
- King S. P., Kasha K. J. 1997. Anther and isolated microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). Submitted as a chapter in the book: *In vitro* androgenesis in seed plants. Chapman and Hall: 4 — 7, 14 — 15.
- Larsen E. T., Tuveson I. K. D., Andersen S. B. 1991. Nuclear genes affecting percentage of green plants in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Theor. Appl. Genet.* 82: 417 — 420.
- Lezin F., Sarrafi A., Alibert G. 1996. The effect of genotype, ploidy level and cold pre treatment on barley anther culture responsiveness. *Cereal Res. Commun.* 1: 7 — 11.
- Luckett D. I., Darvey N. L. 1992. Utilisation of microspore culture in wheat and barley improvement. *Aust. J. Bot.* 40: 807 — 828.
- Luckett D. I., Smithard R. A. 1992. Doubled haploid production by anther culture for Australian barley breeding. *Aust. J. Agric. Res.* 43: 67 — 78.
- Mouritzen P., Holm P. B. 1994. Albinism in microspore cultures of barley (*Hordeum vulgare*) results from chloroplasts genome breakdown during regeneration. (Abstract). VIIIth International Congress of Plant Tissue Cell Culture, Florence (Italy): 12 — 17.
- Szarejko I. 1994. Techniki otrzymywania podwojonych haploidów i ich wykorzystanie w hodowli roślin. *Materiały z VII Ogólnopolskiej Konferencji Kultur In vitro*, Katowice-Ustroń: 39 — 48.
- Szarejko I., Kasha K. J. 1991. Induction of anther culture derived doubled haploids in barley. *Cereal. Res. Commun.* 19: 219 — 237.
- Wędzony M. 1999. Wpływ analogów auksyn na efektywność otrzymywania linii podwojonych haploidów pszenżyta i pszenicy metodą krzyżowania z kukurydzą. *Monografie 9. Polska Akademia Nauk. Zakład Fizjologii Roślin*, Warszawa: 83 — 85.