

AURELIA ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA**ALEKSANDRA PONITKA**

Instytut Genetyki Roślin PAN w Poznaniu

Otrzymywanie podwojonych haploidów z mieszańców ozimych i jarych pszenżyta z zastosowaniem kolchicyny w kulturach pylnikowych *

Doubled haploid production of winter and spring triticales hybrids using colchicine in anther cultures

Celem pracy było podwyższenie efektywności otrzymywania podwojonych haploidów w kulturach pylnikowych 6 form mieszańcowych pszenżyta ozimego i 6 form jarych poprzez zastosowanie kolchicyny w pożywce indukującej androgenezę. Modyfikowano stężenie kolchicyny i czas traktowania (0,1 mg/l lub 1,0 mg/l kolchicyny odpowiednio przez 24, 48 i 72 godziny) w płynnej pożywce C17. Stwierdzono, że optymalnymi parametrami zastosowania kolchicyny były stężenia 1,0 mg/l przez 24 godziny oraz 0,1 mg/l przez 48 godzin. Na podstawie analiz cytometrycznych, w tych warunkach stwierdzono zwiększenie liczby roślin o podwojonej liczbie chromosomów. Wynik ten obserwowano u 6 form ozimych (średnio 66,2%) oraz u 2 form jarych (średnio 52,7%), w porównaniu z warunkami kontrolnymi na pożywce bez kolchicyny, w których uzyskano około 30% podwojonych haploidów.

Słowa kluczowe: kolchicyna, kultury pylnikowe, podwojone haploidy, pszenżyto ozime i jare

The aim of this work was to increase the efficiency of doubled haploids production in anther cultures of 6 winter and 6 spring triticales hybrids. The colchicine concentration and the time of its use (0.1 mg/l or 1.0 mg/l colchicine, for 24, 48 and 72 h, respectively) in androgenesis inducing C17 liquid medium were modified. It was found that the optimal parameters of colchicine treatment were 1.0 mg/l for 24 hours, and 0.1 mg/l for 48 hours. Based on flow cytometry analysis, in those conditions an increase in a number of doubled haploids was observed. The increase was observed in 6 forms of winter (average 66.2%) and 2 forms of spring triticales (average of 52.7%), as compared to control conditions (the C17 medium without colchicine), producing of about 30.0% of doubled haploids

Key words: colchicine, anther culture, doubled haploids, winter and spring triticales

* Praca wykonana w ramach projektu MRiRW: HORhn-801-8/14, zadanie 18

WSTĘP

Zadaniem hodowli roślin jest tworzenie nowych odmian, bardziej plennych i o polepszonych cechach użytkowych. Jest to proces długotrwały i wynosi u pszenżyta od 10 do 12 lat. W hodowli konwencjonalnej zarejestrowanie nowych odmian jest poprzedzone kilkuletnim procesem homozygotyzacji, w celu otrzymania wyrównanych materiałów. Często rejestracja wyprowadzonych materiałów jako nowych odmian, pomimo korzystnych wartości gospodarczych nie zawsze jest możliwa ze względu na niedostateczne wyrównanie. Zmienność rekombinacyjną na poziomie gametycznym można utrwalić w krótkim czasie, wykorzystując haploidalne stadium rośliny dla uzyskiwania całkowicie homozygotycznych linii z heterozygotycznego materiału. Zastosowanie metody kultur pylnikowych stwarza możliwość regeneracji haploidalnych roślin w procesie indukowanej androgenezy. U pszenżyta haploidy oraz podwojone haploidy uzyskuje się najczęściej poprzez androgenezę z wykorzystaniem kultur pylnikowych (Gonzales i in., 1997; Ponitka i in., 1999; Tuveson i in., 2000; Arzani i Darvey, 2002; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Wędzony, 2003; Lantos i in., 2014). Androgeniza jest procesem, podczas którego w pylnikach hodowanych na pożywce następuje zmiana kierunku rozwoju mikrospor wykazujących zdolność do regeneracji roślin. Dotychczas dla podniesienia efektywności indukcji procesu androgenezy i regeneracji zielonych roślin w kulturach pylnikowych pszenżyta stosowano między innymi stresy termiczne przed wyłożeniem pylników na pożywkę, modyfikacje składu pożywek indukujących i regeneracyjnych dotyczące głównie zawartości cukrów, substancji wzrostowych oraz witamin (Sharma i in., 1982; Hassawi i Liang, 1990; Hassawi i in., 1990; Karsai i in., 1994; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 1997; Ponitka i in., 1999; Immonen i Robinson, 2000; Tuveson i in., 2000; González i Jouve, 2000, 2005; Arzani i Darvey, 2002; Lantos i in., 2014; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2014). Androgeniczne rośliny uzyskane metodą kultur pylnikowych najczęściej są haploidami, ale występują również spontanicznie podwojone haploidy lub aneuploidy (Muranty i in., 2002; Warzecha i in., 2005; Oleszczuk i in., 2011; Ponitka i Ślusarkiewicz-Jarzina, 2011). Liczbę chromosomów roślin haploidalnych można podwoić stosując różne związki indukujące, jak kolchicina (Redha i in., 1998; Arzani i Darvey, 2001; Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Oleszczuk i in., 2004), oryzalina, trifluralin (Wan i in., 1991), czy kofeina (Thomas i in., 1997), przy czym najczęściej stosowana jest kolchicina. W procesie podwajania liczby chromosomów roślin haploidalnych pszenżyta najczęściej prowadzi się kolchicynowanie w warunkach *in vivo*, poprzez zanurzenie haploidalnych roślin zielonych, uzyskanych w wyniku regeneracji struktur androgenicznych otrzymanych bądź z zastosowaniem kultur pylnikowych czy też kultur izolowanych mikrospor, w roztworze kolchicyny o stężeniu 1000 mg/l (Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Würschum i in., 2012). Z uwagi na toksyczny charakter odczynnika, jego wysokie stężenie oraz stosowane stosunkowo duże objętości, w różnych ośrodkach na świecie podejmowano próby zmian procedury kolchicynowania, polegające na dodawaniu induktora w pierwszych etapach androgenezy i w mniejszym stężeniu; szczególną uwagę zwracano na efektywność otrzymywania roślin zielonych w odniesieniu do liczby wyłożonych pylników lub izolowanych mikrospor, porównując do warunków

kontrolnych, bez stosowania kolchicyny w pierwszych etapach androgenozy. Arzani i Darvey (2001), prowadząc androgenezę metodą kultur pylnikowych, do pożywki MC17 indukującej powstawanie struktur androgenicznych, dodawali kolchicynę w stężeniu 400 mg/l, a także dimetylosulfotlenek (DMSO) w stężeniu 1,5%, przy inkubacji przez 72 godziny; w tych warunkach nie uzyskano zwiększonej liczby roślin DH, ani roślin zielonych, w porównaniu do warunków kontrolnych. Natomiast Würschum i in. (2012), stosując metodę izolowanych mikrospor testowali dodawanie kolchicyny do pożywki indukującej NBP99 w trzech stężeniach, 0,1 mg/l, 0,4 mg/l oraz 2,0 mg/l, odpowiednio przez 24, 48 i 72 godziny. W prowadzonych od lat badaniach własnych, dla otrzymania roślin DH pszenżyta stosowano z dobrymi rezultatami metodę kultur pylnikowych, prowadząc indukcję struktur androgenicznych w pożywce C17, oraz indukcję podwajania liczby chromosomów *in vivo* (Ponitka i Śluskarkiewicz-Jarzina, 2007).

Dla zwiększenia efektywności, obniżenia kosztów, a także ograniczenia ekspozycji badacza na działanie toksycznego związku w roztworze o wysokim stężeniu kolchicyny (1000 mg/l) rozpoczęto prace mające na celu modyfikację stosowanej dotąd metody poprzez dodanie kolchicyny w pierwszym etapie procesu androgenozy do pożywki C17.

MATERIAŁ I METODY

Materiałem doświadczalnym było 6 ozimych form mieszańcowych pszenżyta (CT 13001, CT 13073, CT 13139, Bo 2526, Bo 2544, Bo 2626) oraz 6 form jarych (M 417, M 437, M 443, TJ 14071, TJ 14074, TJ 14088) pochodzących ze Spółek Hodowli Roślin: DANKO-Choryń i Strzelce.

Rośliny hodowano w szklarni stosując doświetlanie przez 8 godzin/ dobę w temperaturze 22°C w dzień i 17°C w nocy. Ścinano pędy z kłosami zawierającymi pylniki z mikrosporami w stadium jednojądrowym z dużą wakuolą i umieszczano w roztworze mikro- i makroelementów według pożywki N6 (Chu i in., 1975) z dodatkiem auksyny 2,4-D (kwas 2,4 dichlorofenoksyoctowy) w stężeniu 2,0 mg/l, w temperaturze 4°C, przez 6 dni, w ciemności. Pylniki izolowano w sterylnych warunkach i umieszczano w płynnej pożywce C17, indukującej androgenezę (Wang i Chen, 1983), z dodatkiem kolchicyny w stężeniu 0,1 mg/l lub 1,0 mg/l, odpowiednio przez 24, 48 i 72 godziny. Wykładano po około 1500 pylników z każdej formy mieszańcowej (200 pylników na szalki o średnicy 6 cm). Pylniki z pożywki zawierającej kolchicynę przenoszono na pożywkę bez kolchicyny i inkubowano w temperaturze 28°C, w ciemności. Androgeniczne struktury hodowano na pożywce regeneracyjnej 190-2 (Zhuang i Xu, 1983) z dodatkiem kinetyny w stężeniu 1,0 mg/l, w temperaturze 22°C, przy oświetleniu 80–100 $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ przez 12 godzin. W celu regeneracji roślin wszystkie uzyskane struktury androgeniczne (o średnicy około 2 mm) przekładano po 6 tygodniach kultury na szalki o średnicy 9 cm (po 30 sztuk na szalkę). Poziom ploidalności zielonych roślin pszenżyta ozimego i jarego określano z wykorzystaniem cytometru przepływowego firmy PARTEC. Do badań pobierano fragmenty liści z roślin o wysokości około 15 cm, rosnących w ziemi w kontrolowanych warunkach, w temperaturze 22/17°C, dzień/noc, przy oświetleniu 200 $\mu\text{moli fotonów m}^{-2}\text{s}^{-1}$ przez 12 godzin. Poziom indukcji androgenicznych struktur i regeneracji zielonych roślin

określano w stosunku do liczby wyłożonych pylników, w przeliczeniu na 100. Efektywność uzyskiwania roślin o podwojonej liczbie chromosomów oceniano na podstawie badania poziomu ploidalności zregenerowanych roślin z pożywki C17 z kolchicyną, w odniesieniu do pożywki kontrolnej, bez kolchicyny.

WYNIKI

Wpływ zastosowania kolchicyny na indukcję androgenezy i regenerację zielonych roślin

Wykazano niezależnie od genotypu pszenżyta ozimego (tab. 1) oraz jarego (tab. 2) zmniejszenie efektywności indukcji androgenezy oraz regeneracji zielonych roślin wraz ze zwiększeniem stężenia kolchicyny w pożywce C17 (tab. 1 i 2). Na przykład, dla form ozimych traktowanych kolchicyną w stężeniu 0,1 mg/l otrzymano łącznie 3708 struktur i 118 roślin zielonych, natomiast przy zastosowaniu dziesięciokrotnie wyższego stężenia, 1,0 mg/l łącznie otrzymano 2866 androgenicznych struktur i 87 roślin zielonych. Zaobserwowano również, niezależnie od genotypu, spadek efektywności indukcji struktur androgenicznych i regeneracji roślin zielonych ze wzrostem czasu inkubacji pylników w pożywce z kolchicyną, przy czym największy spadek notowano po 72 godzinach (tab. 1).

Tabela 1

Efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur, zielonych roślin oraz podwojonych haploidów z 6 mieszańców pszenżyta ozimego na pożywce C17 z dodatkiem kolchicyny
Frequencies of embryo-like structures, green plants and doubled haploids from 6 winter triticale hybrids on C17 medium supplemented with colchicine

Genotyp Genotype	Czas i stężenie kolchicyny Time and concentration colchicine	Liczba pylników No. of anthers	Struktury androgeniczne Androgenic structures		Zielone rośliny — Green plants									
					wszystkie otrzymane total obtained		badane-cytometr — analyzed-cytometer							
							Σ		haploidy haploids		podwojone haploidy doubled haploids		aneuploidy aneuploids	
L. No.	%	L. No.	%	L. No.	%	L. No.	%	L. No.	%	L. No.	%			
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	
	kontrola — control	200	460	230,0	10	5,0	6	4	66,6	1	16,7	1	16,7	
CT 13001	24h-0,1mg/l	200	403	201,5	7	3,5	3	2	66,7	1	33,3	-	-	
	24h-1,0mg/l	200	340	170,0	9	4,5	3	2	66,7	1	33,3	-	-	
	48h-0,1mg/l	200	305	152,5	7	3,5	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	48h-1,0mg/l	200	280	140,0	5	2,5	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	72h-0,1mg/l	200	185	92,5	4	2,0	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	72h-1,0mg/l	200	157	78,5	1	0,5	1	0	0	1	100,0	-	-	
	bez kontroli without control	1200	1670	139,2	33	2,8	16	7	43,8	9	56,3	-	-	

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
CT 13073	kontrola — control	210	49	21,0	5	2,4	5	4	80,0	1	20,0	-	-
	24h-0,1mg/l	210	30	14,3	4	1,9	4	2	50,0	2	50,0	-	-
	24h-1,0mg/l	210	52	24,8	4	1,9	4	1	25,0	3	75,0	-	-
	48h-0,1mg/l	210	31	14,8	5	2,4	5	2	40,0	3	60,0	-	-
	48h-1,0mg/l	210	38	18,1	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	72h-0,1mg/l	210	17	8,1	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	72h-1,0mg/l	210	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
	bez kontroli without control	1260	168	13,3	13	1,0	13	5	38,5	8	61,5	-	-
CT 13139	kontrola — control	220	512	232,7	18	8,1	4	2	50,0	2	50,0	-	-
	24h-0,1mg/l	220	540	245,5	16	7,3	4	2	50,0	2	50,0	-	-
	24h-1,0mg/l	220	265	120,5	9	4,1	4	1	25,0	3	75,0	-	-
	48h-0,1mg/l	220	287	130,5	6	2,7	3	0	0	3	100,0	-	-
	48h-1,0mg/l	220	189	85,9	5	2,3	3	1	33,3	2	66,7	-	-
	72h-0,1mg/l	220	20	9,1	2	0,9	2	0	0	2	100,0	-	-
	72h-1,0mg/l	220	9	4,1	2	0,9	2	0	0	2	100,0	-	-
	bez kontroli without control	1320	1310	99,2	40	3,0	18	4	22,2	14	77,8	-	-
Bo 2526	kontrola — control	200	198	99,0	10	5,0	7	4	57,1	2	28,6	1	14,3
	24h-0,1mg/l	200	203	101,5	11	5,5	7	3	42,9	4	57,1	-	-
	24h-1,0mg/l	200	187	93,5	8	4,0	8	3	37,5	5	62,5	-	-
	48h-0,1mg/l	200	170	85,0	7	3,5	7	3	42,9	4	57,1	-	-
	48h-1,0mg/l	200	100	50,0	5	2,5	5	2	40,0	3	60,0	-	-
	72h-0,1mg/l	200	54	27,0	2	1,0	2	0	0	2	100,0	-	-
	72h-1,0mg/l	200	52	26,0	2	1,0	2	0	0	2	100,0	-	-
	bez kontroli without control	1200	766	63,8	35	2,9	31	11	35,5	20	64,5	-	-
Bo 2544	kontrola — control	220	349	158,6	17	7,7	6	2	33,3	2	33,3	2	33,4
	24h-0,1mg/l	220	408	185,5	15	6,8	6	2	33,3	3	50,0	1	16,7
	24h-1,0mg/l	220	317	144,1	10	4,5	6	1	16,7	4	66,7	1	16,6
	48h-0,1mg/l	220	260	118,2	10	4,5	6	3	50,0	3	50,0	-	-
	48h-1,0mg/l	220	179	81,4	8	3,6	6	2	50,0	4	66,7	-	-
	72h-0,1mg/l	220	98	44,5	7	3,2	5	1	20,0	4	80,0	-	-
	72h-1,0mg/l	220	79	35,9	5	2,3	5	0	0	4	80,0	1	20,0
	bez kontroli without control	1320	1371	103,9	55	4,2	34	7	20,6	22	64,7	3	8,8
Bo 2626	kontrola — control	210	318	151,4	7	3,3	5	2	40,0	2	40,0	1	20,0
	24h-0,1mg/l	210	319	151,9	7	3,3	5	3	60,0	2	40,0	-	-
	24h-1,0mg/l	210	272	129,5	6	2,9	6	1	16,7	4	66,7	1	16,6
	48h-0,1mg/l	210	238	113,3	5	2,4	5	2	40,0	3	60,0	-	-
	48h-1,0mg/l	210	214	101,9	5	2,4	5	1	20,0	4	80,0	-	-
	72h-0,1mg/l	210	140	66,7	3	1,4	3	0	0	3	100,0	-	-
	72h-1,0mg/l	210	136	64,8	3	1,4	3	0	0	3	100,0	-	-
	bez kontroli without control	1260	1319	104,7	29	2,3	27	7	25,9	19	70,4	1	3,7

Σ — wszystkie analizowane rośliny; total plant analyzed

L. — liczba; No. — number

W przypadku badań 6 form jarych pszenżyta, w tabeli 2. przedstawiono wyniki dla 3 form, M 437, M 443 oraz TJ 14071; z trzech pozostałych form, TJ 14088, TJ 14074, M 417 nie udało się zregenerować roślin. W genotypach M 437 oraz M 443 stwierdzono, podobnie jak we wszystkich badanych formach ozimych, spadek efektywności otrzymywania

androgenicznych struktur i zielonych roślin przy wyższym stężeniu kolchicyny (1,0 mg/l) stosowanym przez 72 godziny. Obserwowano wówczas od 84,3 do 184,8 struktur/ 100 pylników (w zależności od genotypu), średnio 120,0 oraz od 2,5 do 15,6 zielonych roślin/ 100 pylników, średnio 6,8 porównaniu z warunkami kontrolnymi (tab. 2).

Tabela 2
Efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur, zielonych roślin oraz podwojonych haploidów z 3 mieszańców pszenżyta jarego na pożywce C17 z dodatkiem kolchicyny
Frequencies of embryo-like structures, green plants and doubled haploids from 3 spring triticale hybrids on C17 medium supplemented with colchicine

Genotyp Genotype	Czas i stężenie kolchicyny Time and concentration colchicine	Liczba pylników No. of anthers	Struktury androgeniczne Androgenic structures		Zielone rośliny – Green plants									
					wszystkie otrzymane total obtained		badane-cytometr — analyzed-cytometer							
							Σ		haploidy haploids		podwojone haploidy doubled haploids		aneuploidy aneuploids	
L. No.	/100 anthers	1. No.	%	L. No.	L. No.	%	L. No.	%	L. No.	%	L. No.	%		
M 437	kontrola — control	200	555	277,5	20	10,0	6	4	66,7	2	33,3	-	-	
	24h-0,1mg/l	200	566	283,0	21	10,5	6	2	33,3	3	50,0	1	16,7	
	24h-1,0mg/l	200	487	243,5	15	7,5	6	3	50,0	3	50,0	-	-	
	48h-0,1mg/l	200	409	204,5	16	8,0	6	2	33,3	4	66,7	-	-	
	48h-1,0mg/l	200	377	188,5	13	6,5	5	1	20,0	4	80,0	-	-	
	72h-0,1mg/l	200	258	129,0	9	4,5	5	2	40,0	3	60,0	-	-	
	72h-1,0mg/l	200	182	91,0	5	2,5	5	2	40,0	3	60,0	-	-	
	bez kontroli without control	1200	2279	189,9	79	6,6	33	12	36,4	20	60,6	1	3,0	
M 443	kontrola — control	210	539	256,7	15	7,1	4	3	75,0	1	25,0	-	-	
	24h-0,1mg/l	210	509	242,4	16	7,6	4	2	50,0	2	50,0	-	-	
	24h-1,0mg/l	210	394	187,7	10	4,8	4	3	75,0	1	25,0	-	-	
	48h-0,1mg/l	210	370	176,2	8	3,9	4	3	75,0	1	25,0	-	-	
	48h-1,0mg/l	210	321	152,9	8	3,9	4	3	75,0	1	25,0	-	-	
	72h-0,1mg/l	210	307	146,2	4	1,9	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	72h-1,0mg/l	210	177	84,3	5	2,4	3	1	33,3	2	66,7	-	-	
	bez kontroli without control	1260	2078	164,9	51	4,1	22	13	59,1	9	40,9	-	-	
TJ 14071	kontrola — control	226	810	358,4	39	17,2	15	10	66,7	5	33,3	-	-	
	24h-0,1mg/l	224	785	350,5	45	20,1	16	10	62,5	5	31,3	1	6,2	
	24h-1,0mg/l	224	750	334,8	42	18,8	15	10	66,7	5	33,3	-	-	
	48h-0,1mg/l	224	685	305,8	40	17,9	15	10	66,7	5	33,3	-	-	
	48h-1,0mg/l	224	575	256,7	40	17,9	15	10	66,7	5	33,3	-	-	
	72h-0,1mg/l	224	490	218,8	35	15,6	15	8	53,3	4	26,7	3	20,0	
	72h-1,0mg/l	224	414	184,8	35	15,6	15	8	53,3	4	26,7	3	20,0	
	bez kontroli without control	1344	3699	275,2	237	17,6	91	56	61,5	28	30,8	7	7,7	

Σ — wszystkie analizowane rośliny; total plant analyzed

L. — liczba; No. — number

Łącznie z trzech genotypów jarych, stosując stężenie kolchicyny 0,1 mg/l otrzymano 4379 androgenicznych struktur i 194 rośliny zielone, przy czym po 24 godzinach traktowania kolchicyną otrzymano 1860 struktur i 82 rośliny, po 48 godzinach 1464 struktury i 84 rośliny oraz po 72 godzinach 1055 struktur i 48 roślin. Natomiast przy stężeniu kolchicyny

1,0 mg/l otrzymano łącznie 3677 struktur i 173 rośliny (po 24 godzinach traktowania kolchicyną otrzymano 1631 struktur i 67 roślin, po 48 godzinach 1273 struktury i 61 roślin oraz po 72 godzinach 773 struktury i 45 roślin). Ogółem, na pożywki z kolchicyną z trzech badanych form jarych wyłożono 3804 pylników i uzyskano 8056 androgenicznych struktur (211,7/100 pylników) oraz 367 roślin zielonych (9,7/100 pylników). Natomiast na pożywkę kontrolną bez kolchicyny wyłożono 636 pylników, z których otrzymano 1904 struktury (299/100 pylników) oraz 75 roślin (11,8/100 pylników) (tab. 2).

Wpływ zastosowania kolchicyny na efektywność otrzymywania roślin DH

Badania wpływu kolchicyny w pożywce C17 na efektywność otrzymywania roślin DH wykazały wzrost efektywności otrzymywania roślin DH we wszystkich badanych formach, zarówno ozimych, jak i jarych, przy czym najwyższy procent otrzymanych roślin DH w stosunku do roślin zielonych uzyskano przy zastosowaniu kolchicyny w stężeniu 1,0 mg/l przez 72 godziny. W tabeli 3 zamieszczono wyniki analiz cytometrycznych 172 roślin pszenżyta ozimego i 171 jarego. Wśród 139 roślin zielonych otrzymanych z form ozimych po zastosowaniu kolchicyny w pożywce C17 stwierdzono 66,2% podwojonych haploidów, 30,9% haploidów oraz 2,9% aneuploidów, natomiast spośród 146 regenerantów jarych 55,5% było haploidami, 39% diploidami oraz 5,5% aneuploidami (tab. 3).

Tabela 3

Poziom ploidalności roślin uzyskanych z mieszańców pszenżyta ozimego i jarego oznaczony cytometrycznie

Ploidy level of plants obtained from winter and spring triticale hybrids analyzed using cytometry

Forma pszenżyta Triticale forms	Warunki doświadczenia Experimental conditions	Badane rośliny Analyzed plants	Haploidy Haploids		Podwojone haploidy Doubled haploids		Aneuploidy Aneuploids	
		liczba number	liczba number	%	liczba number	%	liczba number	%
Ogółem ozime Total winter	bez kolchicyny without colchicine	33	18	54,5	10	30,3	5	15,2
	z kolchicyną with colchicine	139	43	30,9	92	66,2	4	2,9
Ogółem jare Total spring	bez kolchicyny without colchicine	25	17	68,0	8	32,0	-	-
	z kolchicyną with colchicine	146	81	55,5	57	39,0	8	5,5

W warunkach kontrolnych bez kolchicyny, zarówno w pszenżycie ozimym jak i jarym uzyskano odpowiednio tylko 30,3% i 32,0% roślin DH. Wśród badanych form jarych, najwięcej podwojonych haploidów w stosunku do roślin zielonych obserwowano przy obu badanych stężeniach, 0,1 oraz 1,0 mg/l kolchicyny przez 72 godziny w formach M 437 i M 443 (odpowiednio 60,0% i 66,7%). Jednak z uwagi na fakt, że w tych warunkach następuje znaczny spadek indukcji struktur androgenicznych i regeneracji zielonych roślin, jako optymalne parametry dla uzyskania roślin DH poprzez zastosowanie kolchicyny w pożywce C17 przyjęto stężenie 1,0 mg/l przez 24 godziny. W tych warunkach notowano niższą efektywność androgenicznych struktur (od 24,8 do 170,0/100 pylników w zależności od genotypu, średnio 113,7) i zielonych roślin (od 2,9 do 4,5/100 pylników w zależności od genotypu, średnio 3,7) w porównaniu z warunkami kontrolnymi (tab. 1 i 2).

Podobne wyniki otrzymano stosując kolchicynę w stężeniu 0,1 mg/l przez 48 godzin (tab. 1 i 2). W tych warunkach notowano od 14,8 do 152,5 struktur/ 100 pylników (w zależności od genotypu), średnio 102,4, oraz od 2,4 do 4,5 zielonych roślin/ 100 pylników, średnio 3,2. Stosując stężenie kolchicyny 1,0 mg/l przez 24 godziny oraz 0,1 mg/l przez 48 godzin obserwowano podwyższenie udziału procentowego podwojonych haploidów wśród zielonych regenerantów wszystkich form ozimych, odpowiednio średnio o 63,2% oraz 82,3%, w porównaniu z warunkami kontrolnymi, w których otrzymano średnio jedynie 31,5% roślin DH.

DYSKUSJA

Badano wpływ stężenia kolchicyny dodanej do pożywki C17 indukującej androgenezę oraz czasu inkubacji pylników w pożywce na efektywność indukcji struktur androgenicznych, regeneracji roślin zielonych oraz otrzymywania roślin DH z 6 ozimych oraz, ostatecznie, z 3 jarych form mieszańcowych pszenżyta. Wykazano znaczne zwiększenie liczby roślin DH u 6 badanych form ozimych i 2 jarych w wyniku zastosowania kolchicyny w pożywce C17. Analizując efektywność uzyskiwania androgenicznych struktur i zielonych roślin ze wszystkich badanych form, wykazano, że wyższe stężenie kolchicyny, 1,0 mg/l, i dłuższy czas traktowania pylników, 72 godz., powodowały około trzykrotne obniżenie indukcji androgenicznych struktur i regeneracji zielonych roślin zarówno w formach ozimych jak i jarych. Natomiast średnia efektywność otrzymywania podwojonych haploidów na pożywce z kolchicyną była trzykrotnie wyższa u form ozimych (przy parametrach 1,0 mg/l, przez 72 godziny) i dwukrotnie wyższa u form jarych (przy wszystkich parametrach) w porównaniu z warunkami kontrolnymi. Jednocześnie, zgodnie z przewidywaniami, na pożywce z dodatkiem kolchicyny zarówno w stężeniu 0,1 mg/l jak i 1,0 mg/l obserwowano obniżenie poziomu indukcji androgenicznych struktur i regeneracji zielonych roślin.

Arzani i Darvey (2001), w doświadczeniach z kolchicyną dodaną w stężeniu 400 mg/l do pożywki indukcyjnej MC17 wykazali dziesięciokrotne zmniejszenie efektywności uzyskiwania zielonych roślin u większości badanych form (z 0,6 do 0,06/100 pylników). Ponadto nie obserwowano podwyższenia liczby roślin DH; wśród 14 badanych form odnotowano średnio tylko 9,0% spontanicznych podwojeń. Würschum i in. (2012), stosując kolchicynę w trzech stężeniach (0,1 mg/l, 0,4 mg/l oraz 2,0 mg/l) przez, odpowiednio 24, 48, i 72 godziny, obserwowali w ciągu pierwszych godzin hodowli mikrospor pszenżyta na pożywce NBP99 (wg Eudes i Amundsen, 2005) podwyższenie efektywności uzyskania zielonych roślin z 48,3% w warunkach kontrolnych do 72% po użyciu kolchicyny w stężeniu 0,4 mg/l przez 24 godziny oraz w stężeniu 0,1 mg/l przez 72 godziny (z 48,3 do 69,5%). Równocześnie obserwowali wzrost procentowy roślin DH, np. z 29,2% na pożywce bez kolchicyny, do 50% przy stężeniu kolchicyny 0,4 mg/l przez 24 godziny.

Sariano i in. (2007) w badaniach prowadzonych w kulturach pylnikowych i kulturach izolowanych mikrospor pszenicy na pożywce MS3M, stanowiącej zmodyfikowaną

pożywkę MS (Hu i Kasha, 1997) wykazali, że zastosowanie kolchicyny podczas pierwszych godzin kultury podwyższyło około trzykrotnie liczbę zregenerowanych zielonych roślin DH w trzech genotypach na cztery badane. Redha i Talaat (2008) stosując kolchicynę również w kulturach pylnikowych pszenicy obserwowali obniżenie liczby androgenicznych struktur u dwóch form na trzy badane: dla formy ICR-4 od 135,4 struktur na pożywce bez kolchicyny do 33,3/ 100 pylników na pożywce z kolchicyną oraz odpowiednio dla formy V-15 od 132,5 do 14,9 struktur/ 100 pylników. Natomiast liczba roślin DH wzrosła w obu formach, odpowiednio od 1,7 i 3,1 do 11,3 i 25,7/ 100 pylników.

Wcześniejsze badania własne (Ślusarkiewicz-Jarzina i Ponitka, 2003; Ponitka i Ślusarkiewicz-Jarzina, 2011; Ślusarkiewicz-Jarzina i in., 2014) wykazały, że efektywność otrzymywania spontanicznie podwojonych haploidów pszenżyta na pożywce C17 bez kolchicyny wynosiła, np. u 7 form ozimych w zależności od genotypu, od 29,6 do 75,9% roślin DH (średnio 57,5%), u 15 form od 17,6 do 80,0% (średnio 38,0%) spontanicznych dihaploidów oraz u 6 form jarych od 17,2 do 55,9% (średnio 35,4%). Również Oleszczuk i in. (2004) w kulturach izolowanych mikrospor pszenżyta odmiany Bogo stwierdzili tylko 30,8% roślin ze spontanicznie podwojoną liczbą chromosomów (w różnych doświadczeniach od 10,0 do 70,0%).

Porównując efektywność uzyskiwania spontanicznie podwojonych haploidów z wynikami prezentowanymi w tej pracy, dotyczącymi efektywności otrzymywania roślin DH pod wpływem kolchicyny w pożywce indukującej androgenezę stwierdzono, że zastosowanie kolchicyny w stężeniach 1,0 mg/l przez 24 godziny oraz 0,1 mg/l przez 48 godzin w kulturach pylnikowych pszenżyta powoduje podwyższenie efektywności otrzymywania roślin DH. Ponadto, ze względów ekonomicznych korzystniejsze jest zastosowanie kolchicyny w pożywce indukującej androgenezę (w stężeniu 0,1 lub 1,0 mg/l), w porównaniu do traktowania roztworem kolchicyny otrzymanych roślin zielonych w warunkach *in vivo* (w stężeniu 1000 mg/l). Jednak aby wiarygodnie ocenić opłacalność stosowania kolchicyny w kulturach pylnikowych, jako technikę alternatywną do kolchicynowania haploidów *in vivo*, autorzy pracy zamierzają wykonać doświadczenia w kilku powtórzeniach wybierając genotypy pszenżyta charakteryzujące się sprawdzoną, wysoką efektywnością indukcji androgenicznych struktur i regeneracji roślin.

WNIOSKI

1. Optymalizacja stężenia kolchicyny i czasu traktowania pylników w płynnej pożywce C17 podwyższyła efektywność uzyskiwania podwojonych haploidów pszenżyta ozimego i jarego
2. W celu obniżenia kosztów uzyskiwania roślin DH pszenżyta należy stosować kolchicynę w pożywce indukującej androgenezę; powoduje to znaczne obniżenie kosztów w porównaniu do metody dotąd stosowanej, polegającej na traktowaniu roztworem kolchicyny roślin zielonych w warunkach *in vivo*, poprzez zanurzenie haploidalnych roślin w roztworze kolchicyny
3. Prezentowane badania są pilotażowe i dlatego autorzy zamierzają przetestować więcej kombinacji stężenia kolchicyny i czasu jej stosowania w pożywce indukującej

androgenezę pszenżyta w celu zoptymalizowania warunków dla uzyskiwania wysokiej efektywności podwojonych haploidów

LITERATURA

- Arzani A., Darvey N. L. 2001. The effect of colchicine on triticale anther-derived plants: Microspore pre-treatment and haploid-plant treatment using a hydroponic recovery system. *Euphytica* 122: 235 — 241.
- Arzani A., Darvey N. L. 2002. Androgenetic response of heterozygous triticale populations using a greenhouse hydroponic system. *Euphytica* 127: 53 — 60.
- Chu C. C., Wang C. C., Sun C. S., Hsu C., Yin K. C., Chu C. Y., Bi F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sinica* 18: 659 — 668.
- Eudes F., Amundsen E. 2005. Isolated microspore culture of Canadian 6x triticale cultivars. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 82: 233 — 241.
- González J. M., Hernández I., Jouve N. 1997. Analysis of anther culture response in hexaploid triticale. *Plant Breed.* 116: 302 — 304.
- González J. M., Jouve N. 2000. Improvement of anther culture media for haploid production in triticale. *Cereal Res. Comm.* 28: 65 — 71.
- González J. M., Jouve N. 2005. Microspore development during *in vitro* androgenesis in triticale. *Biol. Plant.* 49: 23 — 28.
- Hassawi D. S., Liang G. H. 1990. Effect of cultivar, incubation temperature, and stage of microspore development on anther culture in wheat and triticale. *Plant Breed.* 105: 332 — 336.
- Hassawi D. S., Jiahua Q. I., Liang G. H. 1990. Effect of growth regulator and genotype production of wheat and triticale polyhaploids from anther culture. *Plant Breed.* 104: 40 — 45.
- Hu T., Kasha K. J. 1997. Improvement of isolated microspore culture in wheat (*Triticum aestivum* L.) through ovary culture. *Plant Cell Rep.* 16: 520 — 525.
- Immonen S., Robinson J. 2000. Stress treatment and ficoll for improving green plant regeneration in triticale anther culture. *Plant Sci.* 150: 77 — 84.
- Karsai I., Bedö Z., Hayes P. M. 1994. Effect of induction medium pH and maltose concentration on *in vitro* androgenesis of hexaploid winter triticale and wheat. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 39: 49 — 53.
- Lantos C., Bóna L., Boda K., Pauk J. 2014. Comparative analysis of *in vitro* anther and isolated microspore culture in hexaploid triticale (x *Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. *Euphytica* 197: 27 — 37.
- Muranty H., Sourdille P., Bernard S., Bernard M. 2002. Genetic characterization of spontaneous diploid androgenetic wheat and triticale plants. *Plant Breed.* 121: 470 — 474.
- Oleszczuk S., Sowa S., Zimny J. 2004. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (x *Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep.* 22: 885 — 893.
- Oleszczuk S., Rabiza-Swider J., Zimny J., Łukaszewski A. J. 2011. Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (X *Triticosecale* Wittmack). *Plant Cell Rep.* 30/4: 575 — 586.
- Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A., Wędzony M., Marcińska I., Woźna J. 1999. The influence of various *in vitro* culture conditions on androgenetic embryo induction and plant regeneration from hexaploid triticale (x *Triticosecale* Wittm.). *J. Appl. Genet.* 40: 165 — 174.
- Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A. 2007. The effect of liquid and solid medium on production of winter triticale (x *Triticosecale* Wittm.) anther-derived embryos and plants. *Cereal Res. Comm.* 35: 15 — 22.
- Ponitka A., Ślusarkiewicz-Jarzina A. 2011. Otrzymywanie spontanicznych i indukowanych linii podwojonych haploidów pszenżyta ozimego z wykorzystaniem kultur pylnikowych. *Biul. IHAR* 260: 183 — 191.
- Redha A., Attia T., Büter B., Saisintong S., Stamp P., Schmid J. E. 1998. Improved production of doubled haploids by colchicine application to wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Plant Cell Rep.* 17: 974 — 979.
- Redha A., Talaat A. 2008. Improvement of green plant regeneration by manipulation of anther culture induction medium of hexaploid wheat. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 92: 141 — 146.

- Sharma C. C., Wang W. C., Sapra V. T. 1982. Effect of genotype, media and temperature pretreatment on callus initiation in triticale, wheat and rye anther cultures. *Cereal Res. Comm.* 10: 143 — 150.
- Soriano M., Cistue L., Valles M. P., Castillo A. M. 2007. Effects of colchicine on anther and microspore culture of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 91: 225 — 234.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 1997. Effect of genotype and media composition on embryoid induction and plant regeneration from anther culture in triticale. *J. Appl. Genet.* 38: 253 — 258.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 2003. Efficient production of spontaneous and induced doubled haploid triticale plants derived from anther culture. *Cereal Res. Comm.* 31: 289 — 296.
- Ślusarkiewicz-Jarzina A., Ponitka A. 2014. Efektywność otrzymywania podwojonych haploidów pszenżyta jarego z wykorzystaniem kultur pylnikowych. *Zeszyty Naukowe UW we Wrocławiu (seria Rolnictwo)* 605: 65 — 74.
- Thomas J., Chen Q., Howes N. 1997. Chromosome doubling of haploids of common wheat with caffeine. *Genome* 40: 552 — 558.
- Turesson S., Liungberg N., Johansson N., Karlsson K. E., Suis L. W., Josset J. P. 2000. Large-scale production of wheat and triticale double haploids through the use of a single-anther culture method. *Plant Breed.* 119: 455 — 459.
- Wan Y., Duncan D. R., Rayburn A. L., Petolino J. F., Widholm J. M. 1991. The use of antimicrotubule herbicides for the production of doubled haploid plants from anther-derived maize callus. *Theor. Appl. Genet.* 81: 205 — 211.
- Wang P., Chen Y. 1983. Preliminary study on production of high of pollen H2 generation in winter wheat grown in the field. *Acta Agron. Sin.* 9: 283 — 284.
- Warzecha R., Sowa S., Salak-Warzecha K., Oleszczuk S., Śliwińska E., Zimny J. 2005. Doubled haploids in production of male sterility maintaining triticale (*xTriticosecale* Wittmack) lines. *Acta Physiol. Plant.* 27: 245 — 250.
- Wędzony M. 2003. Protocol for anther culture in hexaploid triticale (*x Triticosecale* Wittm.). In: Małuszyński M., Kasha K. J., Foster B. P., Szarejko I. (eds). *Doubled Haploid Production in Crop Plants - A Manual*. Kluwer Academic Publishers Dordrecht /Boston/ London, pp: 123 — 128.
- Würschum T., Tucker M. R., Reif J. C., Maurer H. P. 2012. Improved efficiency of doubled haploid generation in hexaploid triticale by *in vitro* chromosome doubling. *BMC Plant Biol.* 12: 109 — 116.
- Zhuang J. J., Xu J. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*, Science Press. Beijing: 431.