

EFEKTYWNOŚĆ ANDROGENEZY W KULTURACH IZOLOWANYCH MIKROSPOR RZEPAKU (*Brassica napus* L. var. *oleifera*)

Iwona Żur

Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego Polskiej Akademii Nauk w Krakowie

Wstęp

Metoda uzyskiwania roślin z haploidalnych komórek gametofitu męskiego (mikrospor) stanowi od prawie czterdziestu lat [GUHA, MAHESHWARI 1964] niezwykle cenny instrument badawczy o dużym znaczeniu praktycznym. Metoda ta pozwala na uzyskiwanie roślin haploidalnych oraz podwojonych haploidów z form heterozygotycznych w ciągu jednego pokolenia, skraca czas niezbędny do wyrównania uzyskanych linii i zwiększa efektywność selekcji cech. Umożliwia również badania i manipulacje genetyczne. W chwili obecnej kultury izolowanych mikrospor stanowią powszechny i wydajny system stosowany w hodowli rzepaku (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). W Polsce badania wykorzystujące kultury izolowanych mikrospor prowadzone są m. in. w Zakładzie Roślin Oleistych IHAR [CEGIELSKA-TARAS, SZALA 1997, 1998; CEGIELSKA-TARAS i in. 2001] oraz w Katedrze Genetyki i Hodowli Roślin AR w Krakowie [KRUCZKOWSKA i in. 1994, 1998]. Wiadomo jednakże, iż rozwój mikrospor warunkowany jest poligenicznie oraz że cechy genomowe mają decydujące znaczenie dla zdolności do rozwoju androgenicznego, wytwarzania zarodków a następnie zielonych roślin. W większości publikowanych doniesień badania dotyczące kultur izolowanych mikrospor rzepaku prowadzone są na jarej odmianie Topas, niezwykle podatnej na indukcję androgenyzy. Odmiany ozime z reguły charakteryzują mniejsze zdolności androgeniczne. Niewiele również wiadomo o zdolnościach do androgenyzy polskich odmian tego gatunku.

Celem eksperymentów, które stanowiły wstęp do badań nad procesem androgenyzy u rzepaku, była ocena zdolności do rozwoju androgenicznego w kulturach izolowanych mikrospor kilku odmian ozimych i jarych rzepaku.

Materiał i metody

Badania prowadzono na 3 odmianach rzepaku ozimego (Górczański, Bolko, Leo) oraz dwóch odmianach rzepaku jarego (Spok, Star). Metodę izolacji i hodowli kultur mikrospor oparto o procedurę opracowaną przez COVENTRY i in. [1988] modyfikując ją w trakcie kolejnych eksperymentów.

Hodowla roślin macierzystych

Rośliny hodowano w warunkach szklarniowych, w wazonach wypełnionych mieszaną gleby, torfu i piasku (1 : 1 : 1; v:v:v) w 20°C i fotoperiodzie 16/8 godz. (dzień/noc). Odmiany ozime przenoszono do lad chłodniczych w fazie 3–5 liści, gdzie podlegały 8-tygodniowej wernalizacji (5°C, 16/8 godz. dzień/noc). Po zakończeniu wernalizacji rośliny przenoszono ponownie do warunków szklarniowych. Od momentu pojawienia się kwiatostanów temperaturę obniżano do 12°C.

Izolacja mikrospor

Do izolacji pobierano pąki od 2,5 do 4 mm, zawierające zielone lub przezroczyste pylniki. Pąki dezynfekowano (70% etanol przez 1 min oraz 5,6% podchloryn sodu przez 10 min) a następnie delikatnie rozcierano w moździerzu, dodając około 5 cm³ schłodzonej pożywki B₅ zawierającej 130 g·dm⁻³ sacharozy [GAMBORG i in. 1968]. Uzyskaną zawiesinę filtrowano przez sitka o średnicy 1 mm i 74 μm i odwirowywano (1000 rpm, 5–8 min). Supernatant usuwano a uzyskany osad przemywano trzykrotnie w pożywce B₅ (1000 rpm, 5 min). Gęstość zawiesin doprowadzano do ok. 10⁵ mikrospor·cm⁻³. Kultury hodowano w zmodyfikowanej pożywce NLN [LICHTER 1982] zawierającej 130 g·dm⁻³ sacharozy, pozbawionej ekstraktu ziemniaczanego i substancji hormonalnych (określanej jako NLN 13%).

Hodowla izolowanych mikrospor

Zawiesinę mikrospor przenoszono na szalki Petriego o średnicy 9 cm (po 10 ml na szalkę) i umieszczano w ciemności w 30°C. Po 14 dniach hodowli kultury przenoszono na wytrząsarkę (60 rpm), do temperatury 26°C. Po kolejnych 7 dniach hodowli rozwijające się zarodki pobierano, przenoszono na stałą pożywkę B₅ i umieszczano na świetle, w temperaturze 4°C. Po 10 dniach kultury przenoszono do 26°C, gdzie pozostawały aż do momentu pełnej regeneracji roślin.

Wprowadzone modyfikacje procedury:

- wzbogacenie pożywki hodowlanej NLN 13% o 0,03% węgiel aktywowany (AC),
- umieszczanie zawiesiny mikrospor na podłożu pożywki stałej (½ NLN, 130 g·dm⁻³ sacharozy, 4% agarżel, Sigma-Aldrich,
- zastąpienie 14 dniowego okresu indukcji w 30°C – trzydniową indukcją w 32,5°C.

Wyniki

Stwierdzono wyraźne zróżnicowanie odmianowe pod względem zdolności do rozwoju androgenicznego. Generalnie testowane odmiany ozime charakteryzowały się niewielkimi zdolnościami do androgenyzy: ilość zregenerowanych zarodków wahała się 0,4 (odm. Górczański) do 4,3 (odm. Bolko) na 10⁵ mikrospor (tab. 1). Ilość zarodków zdolnych do regeneracji wynosiła od 0 do 25%.

U odmian jarych nie uzyskano indukcji embriogenezy stosując klasyczną metodę izolacji i hodowli mikrospor (tab. 1). W wielu powtórzeniach eksperymentu po 3 dniach hodowli obserwowano jedynie pojawianie się powiększonych,

kulistych mikrospor o wyraźnie widocznej, granularnej cytoplazmie. W niektórych powtórzeniach obserwowano również powiększone mikrospory o granularnej cytoplazmie ale wyraźnie owalnym kształcie. Nie obserwowano podziałów komórkowych i wykształcania struktur emboidalnych.

Tabela 1; Table 1

Wydajność androgenazy w kulturach izolowanych mikrospor
kilku odmian rzepaku ozimego i jarego (*Brassica napis* L. var. *oleifera*)

The effectiveness of androgenesis in isolated microspore cultures
of some spring and winter rape (*Brassica napis* L. var. *oleifera*) cultivars

Odmiana Cultivar	Średnia liczba zarodków na szalce/ (średnia ilość na 10 ⁵ mikrospor) Mean number of embryos on a plate/ (mean number per 10 ⁵ microspores)	Liczba zregenerowanych roślin (% liczby zarodków) Number of regenerants (% of embryo number)
Górczański	125 /(0,4)	31 (25%)
Bolko	430 /(4,3)	5 (4%)
Leo	15 /(2,1)	0
Star	0	0
Spok	0	0

Zastosowane modyfikacje metody hodowli izolowanych mikrospor (hodowla na podłożu pożywki stałej i zmiana parametrów stresu termicznego) nie wpłynęły istotnie na wydajność androgenazy. Korzystny efekt obserwowano jedynie w przypadku zastosowania AC: u odm. Spok, AC wywołał indukcję rozwoju androgenicznego u dwu z 10⁵ izolowanych mikrospor. 73% zarodków rozwijało się w rośliny.

Dyskusja

Mechanizm pozwalający na zmianę rozwoju mikrospory z gametofitycznego na sporofityczny nadal pozostaje nie wyjaśniony. Wiadomo, że do indukcji androgenazy konieczne jest zadziałanie pewnych czynników stresowych, jednakże tylko część mikrospor w wyniku reakcji na nie, przekształca się w zarodki, z których tylko część ma zdolność do pełnej konwersji w płodne rośliny [KRUCZKOWSKA i in. 1998]. Przeciętnie ok. 40% mikrospor podejmuje podziały, 5–10% tworzy dojrzałe zarodki [CUSTERS i in. 1994] z których 50–70% ulega pełnej konwersji [FOISSET i in. 1997]. Do najważniejszych czynników wpływających na wydajność androgenazy zalicza się genotyp, stan fizjologiczny rośliny macierzystej oraz stadium rozwojowe mikrospory. Prawdopodobnie te czynniki zadecydowały o bardzo niskiej wydajności androgenazy uzyskanej w przeprowadzonych eksperymentach. Podobną wydajność embriogenezy (13 zarodków na 10⁵ mikrospor) u odmiany Bolko uzyskali w swoich badaniach KRUCZKOWSKA i in. [1998]. Źródłem zmienności osobniczej może być również stan fizjologiczny rośliny różnicując, np. zdolność do embriogenezy czy optymalny termin pobierania pąków. Wielkość pobieranych do izolacji pąków jest istotnym parametrem, na podstawie którego wnioskuje się o stadium rozwojowym zawartych w nich mikrospor. Ponieważ na podstawie badań morfologicznych wiadomo, iż indukcji embriogenicznej ulegają jedynie mikrospory w fazach od „późnojedonajdrowej” do „wczesnodwujadrowej” [KOTT i in. 1988a; PECHAN, KELLER 1988] dobór właściwego terminu pobierania pąków może przesą-

dzić o uzyskiwanych wynikach. Ponieważ dane literaturowe dotyczą głównie odmiany Topas [COVENTRY i in. 1988; TELMER i in. 1992; CUSTERS i in. 1994] istnieje możliwość iż nie są one optymalne dla innych, w tym i badanych odmian. Wniosek ten potwierdza pojawianie się w kulturach powiększonych owalnych mikrospor o wyraźnie widocznej granularnej cytoplazmie (mikrospory, które przed indukcją przeszły już pierwsze podziały – wg COVENTRY i in. [1988]). Zdolność do embriogenezy może być również modyfikowana zegarem biologicznym, co może potwierdzać fakt, iż nie uzyskano indukcji embriogenezy u odmian jarych, które wg publikowanych doniesień [KRUCZKOWSKA i in. 1998] powinny charakteryzować się większym potencjałem rozwoju androgenicznego niż odmiany ozime.

Korzystny wpływ AC sugeruje obecność w pożywce substancji hamujących rozwój potencjalnie embriogenicznych mikrospor. KOTT i in. [1988b] stwierdził iż dwujądrowe, niezdolne do androgenyzy mikrospory wydzielają substancje o charakterze hydrofilnym i termostabilnym hamujące embriogenezę zdolnych do rozwoju komórek. Ponieważ zidentyfikowano cały szereg substancji mających zdolności hamowania embriogenezy [NOMA i in. 1982] m.in. dwutlenek węgla, etylen, auksyny czy gibereliny, a wiele z nich może być adsorbowanych na powierzchni AC, trudno jest wnioskować jaka substancja czy też substancje są bezpośrednią przyczyną opisanego zjawiska. Ocena taka wymaga dodatkowych, bardziej szczegółowych badań.

Wnioski

1. Uzyskana niewielka wydajność androgenyzy w kulturach izolowanych mikrospor rzepaku wydaje się być wynikiem nałożenia się szeregu czynników natury genetycznej, biochemicznej i fizjologicznej.
2. Uzyskane wyniki sugerują, iż nawet przy niewielkich genetycznie zaprogramowanych zdolnościach do androgenyzy możliwe jest zaindukowanie rozwoju embriogenicznego przy starannym doborze materiału roślinnego i optymalizacji warunków hodowli.

Literatura

- CEGIELSKA-TARAS T., SZALA L. 1997. *Regeneracja roślin z mikrospоровych zarodków rzepaku ozimego (Brassica napus L.)*. Rośliny Oleiste XVIII: 21–30.
- CEGIELSKA-TARAS T., SZALA L. 1998. *Metoda bezpośredniego uzyskiwania podwojonych haploidów z mikrospоров zarodków rzepaku ozimego (Brassica napus L.)*. Rośliny Oleiste XIX: 353–358.
- CEGIELSKA-TARAS T., SZALA L., BARTKOWIAK-BRODA I. 2001. *Kultura mikrospоров rzepaku ozimego (Brassica napus L.) w połączeniu z innymi technologiami in vitro*. Biotechnologia 1(52): 81–86.
- COVENTRY J., KOTT L., BEVERSDORF W.D. 1988. *Manual for microspore culture technique for Brassica napus*. Department of Crop Science, Technical Bulletin OAC Publication 0489, University of Guelph, Guelph.

- CUSTERS J.B.M., CORDEWENER J.H.G., NÖLLEN Y., DONS H.J.M., VAN LOOKEREN CAMPAGNE M.M. 1994. *Temperature controls both gametophytic and sporophytic development in microspore cultures of Brassica napus*. Plant Cell Rep. 13: 267–271.
- FOISSET N., DELOURME R., LUCAS M.O., RENERD M. 1997. *In vitro androgenesis and segregation distortion in Brassica napus L.: spontaneous versus colchicine-doubled lines*. Plant Cell Rep. 16: 464–468.
- GAMBORG O.L., MILLER R.A., OJIMA K. 1968. *Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells*. Exp. Cell Res. 50: 151–158.
- GUHA S., MAHESHWARI S.C. 1964. *In vitro production of embryos from anthers of Datura*. Nature 204: 497.
- KOTT L.S., POLSONI L., BEVERSDORF W.D. 1988a. *Cytological aspects of isolated microspore cultures of Brassica napus*. Can. J. Bot. 66: 1658–1664.
- KOTT L.S., POLSONI L., ELLIS B., BEVERSDORF W.D. 1988b. *Autotoxicity in isolated microspore cultures of Brassica napus*. Can. J. Bot. 66: 1665–1670.
- KRUCZKOWSKA H., PAWŁOWSKA H., SKUCIŃSKA B. 1994. *Kultury mikrospor w polskim materiale rzepaku ozimego*. Rośliny Oleiste XV: 51–54.
- KRUCZKOWSKA H., PAWŁOWSKA H., SKUCIŃSKA B. 1998. *Haploidyżacja rzepaku – badania podstawowe i zastosowanie*. Rośliny Oleiste XIX: 343–352.
- LICHTER R. 1982. *Induction of haploid plants from isolated pollen of Brassica napus L.* Z. Pflanzenphysiol. 105: 427–434.
- NOMA M., HUBER J., ERNST D., PHARIS R.P. 1982. *Quantitation of gibberellins and the metabolism of [³H]gibberellin A₁ during somatic embryogenesis in carrot and anise cell cultures*. Planta 155: 369–376.
- PECHAN P.M., KELLER W.A. 1988. *Identification of potentially embryogenic microspores in Brassica napus*. Physiol. Plant. 74: 377–384.
- TELMER C.A., SIMMONDS D.H., NEWCOMB W. 1992. *Determination of developmental stage to obtain high frequencies of embryogenic microspores in Brassica napus*. Physiol. Plant. 84: 417–424.

Słowa kluczowe: androgeniza, *Brassica napus* L. var. *oleifera*, kultury izolowanych mikrospor, rzepak

Streszczenie

Celem eksperymentów było porównanie zdolności do rozwoju androgenicznego w kulturach izolowanych mikrospor kilku odmian rzepaku ozimego i jarego (*Brassica napus* L. var. *oleifera*). Stosując klasyczną wg COVENTRY i in. [1988] procedurę izolacji i hodowli mikrospor u odmian ozimych rzepaku uzyskano od 0,4 do 4,3 zarodków na 10⁵ mikrospor, z których od 0 do 25% okazało się zdolnymi do regeneracji roślin. Nie uzyskano indukcji androgenyzy u odmian jarych. Spośród wprowadzonych modyfikacji jedynie dodatek do pożywki hodowlanej 0,03% węgla aktywowanego wywołał pozytywny efekt stymulując indukcję rozwoju androgenicznego u 2 z 10⁵ izolowanych mikrospor. 73% zarodków uległo pełnej konwersji.

Tak niewielka wydajność androgenezy wydaje się być skutkiem nałożenia się kilku czynników natury genetycznej, biochemicznej (skład pożywki) i fizjologicznej (faza rozwojowa mikrospor, zegar biologiczny). Uzyskane wyniki sugerują, że nawet przy genetycznie zakodowanych niskich zdolnościach rozwoju androgenicznego istnieje możliwość uzyskania poprawy efektywności androgenezy pod warunkiem starannego doboru materiału roślinnego i optymalizacji warunków hodowli.

THE EFFECTIVENESS OF ANDROGENESIS
IN MICROSPORE CULTURE OF RAPE
(*Brassica napus* L. var. *oleifera*)

Iwona Żur

Department of Plant Physiology,
Polish Academy of Sciences, Kraków

Key words: androgenesis, *Brassica napus* L. var. *oleifera*, microspore culture, rape

Summary

Effect of genotype on androgenesis effectiveness in microspore culture of few *Brassica napus* L. var. *oleifera* cultivars was under the study. Classic procedure of microspore isolation and culture (according to COVENTRY et al. [1988]) in the case of three winter cultivars resulted in initiation of embryogenic development of 0.4 to 4.3 per 10^5 microspores. The average frequency of the plant conversion was 0–25%. No embryo formation was observed in the case of both spring cultivars. Among a few modifications introduced, only addition of 0.03% of activated charcoal stimulated embryogenesis initiation. Average efficiency of embryo development was 0.02% but 73% of them were able to plant conversion.

Such poor androgenesis frequency was possibly the effect of genetic, biochemical (medium composition) and physiological (the phase of microspore development, seasonal variation) factors overlapping. However, the results suggest that even at genetically low androgenic ability, significant improvement of embryo production is possible by careful selection of plant material and optimization of culture conditions.

Dr inż. Iwona Żur
Zakład Fizjologii Roślin im. F. Górskiego
Polska Akademia Nauk
ul. Podłużna 3
30–239 KRAKÓW