

ANDROGENEZA U AMFIDIPOLOIDALNYCH MIESZAŃCÓW F₁ I ODMIAN *Festulolium*

Zbigniew Zwierzykowski, Aleksandra Ponitka, Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina,
Elżbieta Zwierzykowska, Agnieszka Leśniewska-Bocianowska

Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Wstęp

Mieszańce międzyrodzajowe uzyskane z krzyżowania tetraploidalnych form życicy wielokwiatowej (*Lolium multiflorum* LAM., $2n = 4x = 28$) i kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis* HUDS., $2n = 4x = 28$) łączą w swoich genotypach wiele komplementarnych cech użytkowych, m.in. jakość życicy i odporność na stropy abiotyczne kostrzewy. Z tego typu mieszańców amfidiploidalnych wytworzono w Europie szereg odmian uprawnych, określanych nazwą *Festulolium braunii* (K. Richter) A. Camus; w Polsce wyhodowano trzy odmiany *Festulolium* – Felopa, Sulino i Rakopan. Analizy struktury genomowej przeprowadzone u tych odmian (reprezentujących pokolenie F₈) wykazały, że chromosomy *L. multiflorum* i *F. pratensis* są prawie całkowicie wymieszane i ekwiwalentne genetycznie, dlatego cała pula genowa obu gatunków może być dostępna do manipulacji [ZWIERZYKOWSKI i in. 1998b].

Wykorzystanie androgenyzy u oddalonych mieszańców kompleksu *Lolium-Festuca* umożliwia powstanie genotypów o nowych kombinacjach genów, których nie można uzyskać przy zastosowaniu konwencjonalnych metod hodowlanych. Wydajny system produkcji haploidów (polihaploidów) może przyspieszyć proces hodowli mieszańców międzyrodzajowych *Lolium-Festuca*. W ostatnich latach opracowano efektywne procedury kultur pylnikowych dla regeneracji dużych populacji roślin androgenicznych i różnicowanych genotypów z mieszańców pochodzących z dwóch kombinacji krzyżowań: *L. multiflorum* (4x) × *F. arundinacea* (6x) [HUMPHREYS i in. 1997, 1998; ZWIERZYKOWSKI i in. 1998a, 1999; ZARE i in. 1999] i *F. pratensis* (4x) × *L. multiflorum* (4x) oraz powstałych z nich odmian *Festulolium* [OHNOUTKOVA i in. 1997; PONITKA i in. 1998; LEŚNIEWSKA i in. 2001].

Celem prezentowanej pracy było: (1) uzyskanie roślin haploidalnych poprzez kultury pylnikowe, zarówno z roślin pokolenia F₁ mieszańca *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) × *F. pratensis* ($2n = 4x = 28$) jak i z pochodzącej z tego mieszańca odmiany hodowlanej Rakopan, (2) określenie liczby chromosomów i płodności męskiej u otrzymanych roślin androgenicznych. Wyniki badań dotyczące mieszańców F₁ i odmiany Rakopan porównano z danymi uzyskanymi wcześniej dla dwóch innych odmian *Festulolium* – Felopa i Sulino [PONITKA i in. 1998; LEŚNIEWSKA i in. 2001].

Materiał i metody

Materiał do badań stanowiło 11 roślin pokolenia F_1 oraz 17 roślin odmiany Rakopan. Z wybranych roślin rosnących w warunkach szklarniowych ścinano kwiatostany i umieszczano je w roztworze makro- i mikroelementów wg pożywki N6 [CHU i in. 1975], przez 3–6 dni w temp. 4°C. Pylniki w stadium jednojądrowych ziaren pyłku wykładano na pożywkę indukcyjną PII [CHUANG i in. 1978] z dodatkiem kwasu 2,4-dwuchlorofenoksyoctowego 0,5 mg·dm⁻³ i maltozy 90 g·dm⁻³. Kultury inkubowano w ciemności w temp. 30°C. Rozwijające się z mikrospor zarodki androgeniczne i/lub kalus przenoszono na pożywkę regeneracyjną 190-2 [ZHUANG, JIA 1983] i hodowano na świetle (16 godz. na dobę) w temp. 22°C. Zregenerowane zielone rośliny androgeniczne wysadzano do doniczek z ziemią i po okresie aklimatyzacji przenoszono do szklarni.

Liczbę chromosomów roślin androgenicznych analizowano w komórkach stożków wzrostu korzeni stosując standardowe procedury utrwalania i barwienia chromosomów [ZWIERZYKOWSKI, RYBCZYŃSKI 1998].

W okresie kwitnienia roślin androgenicznych prowadzono obserwacje pęknięcia pylników. U roślin z pękającymi pylnikami określano procent żywotności ziarn pyłku po ich wybarwieniu w mieszaninie acetokarminu i gliceryny (1 : 1).

Wyniki i dyskusja

Na pożywkę indukcyjną PII wyłożono ogółem 8299 pylników z 11 roślin F_1 i 18001 pylników z 17 roślin odmiany Rakopan. Z pylników pochodzących z siedmiu roślin F_1 i trzynastu roślin odm. Rakopan rozwijały się zarodki androgeniczne i/lub kalus. Frekwencja formowania zarodków/kalusów w zależności od genotypu osiągała wartości od 1,6 do 84,5 na 100 pylników – u mieszańców F_1 i od 0,4 do 155,5 na 100 pylników – u odmiany Rakopan (tab. 1 i 2).

Efektywność regeneracji roślin androgenicznych z badanych genotypów była bardzo zróżnicowana. U mieszańców F_1 obserwowano od 0 do 15 (średnio 2,6) roślin zielonych i od 0 do 45 (średnio 9,5) roślin albinotycznych na 100 wyłożonych pylników, natomiast u odmiany Rakopan – od 0 do 13 (średnio 1,4) roślin zielonych i od 0 do 44 (średnio 7,7) roślin albinotycznych na 100 pylników. Ogółem z mieszańców F_1 uzyskano 219, a z odmiany Rakopan – 245 zielonych roślin androgenicznych. Porównując wyniki androgenicy z mieszańców F_1 i odmiany Rakopan z wynikami otrzymanymi dla odmian Felopa i Sulino [PОНГКА i in. 1998; LEŚNIEWSKA i in. 2001] nie stwierdzono istotnej różnicy ani w częstości formowania androgenicznych zarodków i/lub kalusów ani w efektywności regeneracji roślin zielonych i albinotycznych. W obrębie czterech grup badanych genotypów wyjściowych, największą frekwencję regeneracji roślin zielonych (średnio 11,8 na 100 pylników) stwierdzono u odmiany Sulino, natomiast najmniejszy udział roślin albinotycznych (średnio 5,9 na 100 pylników) – u odmiany Felopa (tab. 3).

Liczbę chromosomów określono u 174 roślin androgenicznych pochodzących z mieszańców F_1 i 115 roślin – z odmiany Rakopan. Wśród analizowanych roślin przeważały 14-chromosomowe dihaploidy – 74,7% u F_1 i 83,5% u odmiany Rakopan, natomiast 28-chromosomowe spontanicznie podwojone haploidy stanowiły 12,2% – u odmiany Rakopan i 19,0% – u mieszańców F_1 . Frekwencja dihaploidów i podwojonych haploidów u odmian Felopa i Sulino była podobna (tab. 4). W obrębie każdej grupy roślin androgenicznych występowały nieliczne aneuploidy.

Tabela 1; Table 1

Wyniki kultur pylnikowych u mieszańców *F₁* *L. multiflorum* (4x) × *F. pratensis* (4x)
 Results of anther culture in *F₁* hybrids of *L. multiflorum* (4x) × *F. pratensis* (4x)

Nr rośliny wyjściowej Initial plant no.	Liczba wyłożonych pylników No. of anthers cultured	Zarodki androgeniczne/ kalusy Androgenic embryos/calli		Rośliny zielone Green plants			Rośliny albinotyczne Albinotic plants		
		liczba number	na 100 pylników per 100 anthers	liczba number	na 100 zarodków per 100 embryos	na 100 pylników per 100 anthers	liczba number	na 100 zarodków per 100 embryos	na 100 pylników per 100 anthers
<i>F₁</i> - 2	865	0							
<i>F₁</i> - 3	1303	92	7,1	1	1,1	0,1	23	25,0	1,8
<i>F₁</i> - 6	780	659	84,5	121	18,4	15,5	354	53,7	45,4
<i>F₁</i> - 8	237	11	4,6	0			13	118,2	5,5
<i>F₁</i> - 9	1053	519	49,3	62	11,9	5,9	230	44,3	21,8
<i>F₁</i> - 17	1438	219	15,2	13	5,9	0,9	133	60,7	9,3
<i>F₁</i> - 19	451	14	3,1	15	107,1	3,3	6	42,9	1,3
<i>F₁</i> - 20	492	0							
<i>F₁</i> - 21	291	0							
<i>F₁</i> - 29	569	0							
<i>F₁</i> - 32	820	13	1,6	7	233,3	0,9	27	207,7	3,3
Ogółem; Total	8299	1527	18,4	219	14,3	2,6	786	51,5	9,5

Tabela 2; Table 2

Wyniki kultur pylnikowych u odmiany *Festulolium* Rakopan
Results of anther culture in *Festulolium* cv. Rakopan

Nr rośliny wyjściowej Initial plant no.	Liczba wyłożonych pylników No. of anthers cultured	Zarodki androgeniczne/ kalusy Androgenic embryos/calli		Rośliny zielone Green plants			Rośliny albinotyczne Albinotic plants		
		liczba number	na 100 pylników per 100 anthers	liczba number	na 100 zarodków per 100 embryos	na 100 pylników per 100 anthers	liczba number	na 100 zarodków per 100 embryos	na 100 pylników per 100 anthers
R - 1	804	0							
R - 2	1152	0							
R - 3	794	12	1,5	0			0		
R - 5	1110	0							
R - 6	1073	176	17,9	6	3,4	0,6	42	23,9	3,9
R - 7	1120	6	0,5	0			0		
R - 8	1130	1313	116,2	53	4,0	4,7	489	37,2	43,3
R - 9	1094	69	6,3	22	31,9	2,0	72	104,4	6,6
R - 10	1633	107	6,6	1	0,9	0,1	10	9,3	0,6
R - 11	522	0							
R - 12	1091	373	34,2	0			26	7,0	2,4
R - 13	1521	6	0,4	0			3	50,0	0,2
R - 18	1002	1558	155,5	136	8,7	13,6	447	28,7	44,6
R - 20	782	80	10,2	0			13	16,3	1,7
R - 22	1068	112	10,5	2	1,8	0,2	58	51,8	5,4
R - 23	950	41	4,3	0			17	41,5	1,8
R - 24	1125	146	13,0	25	17,1	2,2	202	138,4	18,0
Ogółem; Total	18001	3999	22,2	245	6,1	1,4	1379	34,5	7,7

Tabela 3; Table 3

Efektywność uzyskiwania roślin androgenicznych z amfidiploidalnych mieszańców F₁ (*F. pratensis* × *L. multiflorum*) i odmian *Festulolium* – Sulino, Felopa i Rakopan

Effectiveness of androgenic plant production from amphidiploid F₁ hybrids (*F. pratensis* × *L. multiflorum*) and *Festulolium* cultivars Sulino, Felopa and Rakopan

Genotyp wyjściowy Initial genotype	Liczba wyłożonych pylników No. of anthers cultured	Liczba zarodków No. of androgenic embryos	Liczba otrzymanych roślin No. of plants obtained		Liczba roślin/100 pylników No. of plants/100 anthers	
			zielonych green	albinotycznych albinotic	zielonych green	albinotycznych albinotic
F ₁	8299	1527	219	786	0,1–15,5	1,3–45,4
cv. Sulino	7973	1550	942	687	3,1–58,9	0,8–32,2
cv. Felopa	10110	5924	188	593	0,2–16,4	0,4–42,5
cv. Rakopan	18001	3999	245	1379	0,1–13,6	0,6–44,6

Tabela 4; Table 4

Ploidalność roślin androgenicznych uzyskanych z amfidiploidalnych mieszańców F₁ (*F. pratensis* × *L. multiflorum*) i odmian *Festulolium* – Sulino, Felopa i Rakopan

Ploidy of androgenic plants obtained from amphidiploid F₁ hybrids (*F. pratensis* × *L. multiflorum*) and *Festulolium* cultivars Sulino, Felopa and Rakopan

Genotyp wyjściowy Initial genotype	Liczba roślin badanych No. of plants studied	Ploidalność roślin androgenicznych Ploidy of androgenic plants		
		dihaploidy dihaploids (2n = 14)	podwojone haploidy doubled haploids (2n = 28)	aneuploidy ^a aneuploids
F ₁	174	130 (74,7%)	33 (19,0%)	11
cv. Sulino	529	443 (83,7%)	63 (11,9%)	23
cv. Felopa	115	87 (75,7%)	12 (10,4%)	16
cv. Rakopan	115	96 (83,5%)	14 (12,2%)	5

a) rośliny z liczbą chromosomów; plants with the chromosome number: 15, 16, 21, 29

W obrębie dihaploidów 9,0% roślin pochodzących z odmiany Rakopan i 13,6% – z mieszańców F₁ miało całkowicie bądź częściowo pękające pylniki, natomiast wśród spontanicznie podwojonych haploidów, pękające pylniki obserwowano u 67,0% roślin powstałych z odm. Rakopan oraz u 84,0% – z mieszańców F₁. Wszystkie rośliny androgeniczne z pękającymi pylnikami miały żywotne ziarna pyłku, przy czym ich stopień wybarwienia wykazywał dużą zmienność, od 7,3% do 78,7%.

W populacji roślin androgenicznych pochodzących z odmian Felopa i Sulino około 10% roślin, zarówno spontanicznie podwojonych haploidów jak i dihaploidów, wykazywało płodność męską [LEŚNIEWSKA i in. 2001]. Płodne dihaploidy otrzymane na drodze androgenyzy z tetraploidalnych mieszańców F₁ i odmian *Festulolium* nie były dotąd odnotowane w piśmiennictwie światowym.

Diploidalne mieszańce pokolenia F₁ *L. multiflorum* (2n = 2x = 14) × *F. pratensis* (2n = 2x = 14), mające w swych zestawach chromosomowych po 7 kompletnych chromosomów *Lolium* i *Festuca*, wykazują całkowitą męską i żeńską

sterylność. Natomiast u części 14-chromosomowych dihaploidów uzyskanych na drodze androgenozy z tetraploidalnych odmian *Festulolium* (reprezentujących pokolenie F_8), a także z roślin pokolenia F_1 obserwuje się częściową męską płodność. Wstępne analizy struktury genomowej roślin androgenicznych przy użyciu metody genomowej hybrydyzacji *in situ* wykazały, że w zestawach chromosomowych dihaploidów powstałych z form pokolenia F_8 zdecydowanie przeważają chromosomy translokowane, tj. chromosomy *Lolium* z fragmentami chromatyny *Festuca* i chromosomy *Festuca* z fragmentami chromatyny *Lolium* [LEŚNIEWSKA i in. 2001]. Prawdopodobnie obecność pewnych kompozycji chromatyny jednego i drugiego gatunku warunkuje częściową płodność, zaś innych – sterylność roślin dihaploidalnych. Prowadzone są badania nad wyjaśnieniem genetycznego podłoża tego zjawiska.

Wnioski

1. Opracowane procedury kultur pylnikowych dla mieszańców oddalonych kompleksu *Lolium-Festuca* umożliwiają wytworzenie stosunkowo dużych populacji roślin androgenicznych (haploidów i spontanicznie podwojonych haploidów).
2. Androgeniza u amfidiploidalnych odmian hodowlanych *Festulolium* pochodzących z mieszańców *L. multiflorum* ($2n = 4x = 28$) \times *F. pratensis* ($2n = 4x = 28$) pozwala na tworzenie genotypów o nowych kombinacjach genów, których nie można uzyskać przy zastosowaniu konwencjonalnych metod hodowlanych.

Literatura

- CHU C.C., WANG C.C., SUN C.S., HSU C., YIN K.C., CHU C., YBI F.Y. 1975. *Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources*. Sci. Sin. 18: 659–668.
- CHUANG C.C., OUYANG J.W., CHIA H., CHOU S.M., JIN J.K. 1978. *A set of potato media for wheat anther culture*. Proc. Symp. on Plant Tissue Culture, Science Press, Peking, China: 51–56.
- HUMPHREYS M.W., ZARE A.G., PASAKINSKIENE I., KERLAN M.C. 1997. *The potential of anther culture derived from a Lolium multiflorum \times Festuca arundinacea ($2n = 5x = 35$) hybrid as a novel forage grass crop*. Proc. of the 20th Meeting of EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section, Radzików, Poland, Sept. 1996: 298–305.
- HUMPHREYS M.W., ZARE A.G., PASAKINSKIENE I., THOMAS H., ROGERS W.J., COLLIN H.A. 1998. *Interspecific genomic rearrangements in androgenic plants derived from a Lolium multiflorum \times Festuca arundinacea ($2n = 5x = 35$) hybrid*. Heredity 80: 78–82.
- LEŚNIEWSKA A., PONITKA A., ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA A., ZWIERZYKOWSKA E., ZWIERZYKOWSKI Z., JAMES A., THOMAS H., HUMPHREYS M.W. 2001. *Androgenesis from Festuca pra-*

tensis × *Lolium multiflorum* amphidiploid cultivars in order to select and stabilise rare gene combinations for grass breeding. Heredity 86(2): 167–176.

OHNOUTKOVA L., FOJTIK A., DOLEŽEL J. 1997. Production of haploid and polyhaploid plants in *Lolium* × *Festuca* hybrids. Proc. of the 20th Meeting of EUCARPIA Fodder Crops and Amenity Grasses Section, Radzików, Poland, Sept. 1996: 354–355.

PONITKA A., ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA A., ZWIERZYKOWSKA E., ZWIERZYKOWSKI A. 1998. Efektywność uzyskiwania androgenicznych roślin *Festulolium* (*Festuca pratensis* × *Lolium multiflorum*). Mat. kraj. konf. „*Festulolium* – osiągnięcia i perspektywy”, Poznań, listopad 1998: 40–41.

ZARE A.G., HUMPHREYS M.W., ROGERS W.J., COLLIN H.A. 1999. Androgenesis from a *Lolium multiflorum* × *Festuca arundinacea* hybrid to generate extreme variation for freezing-tolerance. Plant Breed. 118: 497–501.

ZHUANG J.J., JIA X. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus, w: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Science Press, Beijing: 431.

ZWIERZYKOWSKI Z., LUKASZEWSKI A.J., LEŚNIEWSKA A., NAGANOWSKA B. 1998a. Genomic structure of androgenic progeny of pentaploid hybrids, *Festuca arundinacea* × *Lolium multiflorum*. Plant Breed. 117: 457–462.

ZWIERZYKOWSKI Z., RYBCZYŃSKI J.J. 1998. Plant regeneration from immature inflorescence-derived callus of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.): chromosome number and fertility of regenerated plants. J. Appl. Genet. 39: 217–224.

ZWIERZYKOWSKI Z., TAYYAR R., BRUNELL M., LUKASZEWSKI M. 1998b. Genome recombination in intergeneric hybrids between tetraploid *Festuca pratensis* and *Lolium multiflorum*. J. Hered. 89: 324–328.

ZWIERZYKOWSKI Z., ZWIERZYKOWSKA E., ŚLUSARKIEWICZ-JARZINA A., PONITKA A. 1999. Regeneration of anther-derived plants from pentaploid hybrids of *Festuca arundinacea* × *Lolium multiflorum*. Euphytica 105: 191–195.

Słowa kluczowe: androgeneza, odmiany *Festulolium*, dihaploidy, podwojone haploidy, liczba chromosomów, płodność

Streszczenie

W pracy przedstawiono wyniki dotyczące wykorzystania androgenезы do produkcji roślin haploidalnych z mieszańców pokolenia F₁ *Lolium multiflorum* (2n = 4x = 28) × *Festuca pratensis* (2n = 4x = 28) i z nowej odmiany *Festulolium* – Rakopan. Ogółem z mieszańców F₁ uzyskano 219 zielonych roślin (średnio 1,4 na 100 pylników), a z odmiany Rakopan – 245 roślin (średnio 2,6 na 100 pylników). Wśród analizowanych cytologicznie roślin androgenicznych przeważały 14-chromosomowe dihaploidy – 74,7% u F₁ i 83,5% u odm. Rakopan, natomiast 28-chromosomowe spontanicznie podwojone haploidy stanowiły: 19,0% – u F₁ i 12,2% – u odm. Rakopan. Część spontanicznie podwojonych haploidów (67,0–84,0%) i dihaploidów (9,0–13,6%) wykazywała płodność męską. Płodne dihaploidy mogą stanowić interesujący materiał wyjściowy do hodowli traw.

ANDROGENESIS IN AMPHIDIPOID F_1 HYBRIDS
AND CULTIVARS OF *Festulolium*

Zbigniew Zwierzykowski, Aleksandra Ponitka, Aurelia Ślusarkiewicz-Jarzina,
Elżbieta Zwierzykowska, Agnieszka Leśniewska-Bocianowska
Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences, Poznań

Key words: androgenesis, *Festulolium* cultivars, dihaploids, doubled haploids, chromosome number, fertility

Summary

Paper presents the results of androgenesis from *Lolium multiflorum* ($2n = 4x = 28$) \times *Festuca pratensis* ($2n = 4x = 28$) F_1 hybrids and from new *Festulolium* cultivar Rakopan. Both F_1 hybrids and cv. Rakopan were amenable to anther culture. Totally, 219 green androgenic plants (mean 1.4 per 100 anthers) from F_1 hybrids and 245 plants (mean 2.6 per 100 anthers) from cv. Rakopan were produced. Among cytologically studied androgenic plants more frequent were 14-chromosome dihaploids (74.7% in F_1 , and 83.5% in cv. Rakopan), whereas 28-chromosome spontaneous doubled haploids amounted of 19.0% in the F_1 and 12.2% in cv. Rakopan. A part of spontaneous doubled haploids (67.0–84.0%) and dihaploids (9.0–13.6%) were male fertile. Fertile dihaploids provide the interesting initial material for grass breeding programmes.

Doc. dr hab. Zbigniew **Zwierzykowski**
Instytut Genetyki Roślin
Polskiej Akademii Nauk
ul. Strzeszyńska 34
60-479 POZNAŃ