

INDUKCJA ANDROGENEZY U KAPUSTY GŁOWIASTEJ METODĄ KULTUR PYLNIKÓW I IZOLOWANYCH MIKROSPOR

Adela Adamus, Lucyna Samek, Agnieszka Ciepichał

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa,
Akademia Rolnicza im. H. Kołłątaja w Krakowie

Wstęp

Nowoczesne programy hodowlane bazują na tworzeniu odmian mieszańcowych, które pod względem wielu cech użytkowych przewyższają odmiany populacyjne. U roślin obcopolnych otrzymywanie homozygotycznych form rodzicielskich dla odmian F1, poprzez kolejne lata samozapylenia trwa bardzo długo. Chów wsobny prowadzi często do wystąpienia depresji wsobnej, utrudniającej prace hodowlane. Skrócenie prac hodowlanych nad nowymi odmianami jest szczególnie ważne w przypadku roślin dwuletnich. Należy do nich kapusta, której znaczenie gospodarcze w Polsce jest duże. Rośliny o haploidalnej liczbie chromosomów można otrzymać w kulturach *in vitro* wykorzystując procesy androgenozy. Podwojenie liczby chromosomów u tych roślin pozwala otrzymać podwojone haploidy (DH), które są homozygotami pod względem wszystkich par alleli.

Możliwość zastosowania roślin haploidalnych w hodowli związana jest z uzyskiwaniem jak największej ich liczby. W przypadku niskiej efektywności metod haploidyzacji ważnym zagadnieniem jest znalezienie genotypów o wysokiej zdolności do androgenozy oraz opracowanie metod zwiększania przeżywalności zarodków i ich rozwoju w rośliny.

Materiał i metody

Badania nad indukcją androgenozy u kapusty głowiastej białej (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* L. f. *alba*), których wyniki przedstawiono w niniejszej pracy prowadzono w latach 1999–2001. Materiałem wyjściowym były linie hodowlane pochodzące ze spółek hodowlano-nasiennych. Rośliny w fazie inicjacji kwiatostanów umieszczano w komorze fitotronowej z kontrolowaną temperaturą 14°C, 16 godzinnym dniem i natężeniem oświetlenia 6000 lux. Takie warunki wzrostu roślin donorowych dają większą szansę otrzymania haploidalnych zarodków, niż kiedy rosną one w szklarni czy w polu.

Indukcja androgenozy w kulturach pylników

Pąki kwiatowe (3–4 mm długości) pobrane z roślin donorowych odkażano 50% alkoholem (30 s), 10% chloraminą T (15 min) i płukano trzykrotnie wodą jałową. Następnie w sterylnych warunkach izolowano z nich pylniki i wykładano na pożywkę agarową, przygotowaną na bazie B5 według Gamborga z modyfikacją Kellera [KELLER i in. 1975] z dodatkiem sacharozy ($100 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$) oraz pH ustalonym na 5,8. Pylniki wykładano na szalki Petriego i kultury prowadzono w ciemności, w temperaturze 34°C przez 24 godz., a następnie w temperaturze 25°C do pojawienia się androgenicznych zarodków (po 5–6 tygodniach).

Indukcja androgenozy w kulturach izolowanych mikrospor

Do zakładania kultur izolowanych mikrospor pąki kwiatowe odkażano jak w przypadku kultur pylników. Izolacja mikrospor polegała na ostrożnym gniececiu pąków w płynnej pożywce NLN-13 [LICHTER 1989] i filtrowaniu przez sito nylonowe o oczkach $44 \mu\text{m}$. Uzyskaną zawiesinę płukano trzykrotnie po 5 min w pożywce, wirowano (1000 obrotów na minutę), zlewano płyn z nad osadu i dopełniano świeżą pożywką. Zawiesinę o gęstości 50 000 szt. mikrospor na cm^3 pożywki umieszczano w plastikowych szalkach Petriego. Kultury mikrospor prowadzono w ciemności, w temperaturze 34°C przez 24 godz., a następnie w temperaturze 25°C . Po 3 tygodniach szalki przenoszono na wytrząsarke. Pojawienie się pierwszych androgenicznych zarodków obserwowano po 3–4 tygodniach.

W czasie trwania kultury prowadzono obserwacje rozwoju zarodków i obliczono ich całkowity plon. Efektywność androgenozy oceniano przeliczając uzyskane embrioidy na 100 wyłożonych na pożywkę pylników lub pąków użytych do założenia kultury mikrospor.

Regeneracja zarodków w rośliny

Prawidłowo wykształcone i dojrzałe zarodki otrzymane z kultur pylników lub mikrospor przenoszono na agarową pożywkę regeneracyjną B5 (z dodatkiem sacharozy – $20 \text{ g} \cdot \text{dm}^{-3}$ i bez substancji wzrostowych). Dalszy rozwój zarodków przebiegał w pokoju wzrostowym, w temperaturze 25°C i przy 16-godzinnym dniu. Do oświetlenia zastosowano lampy o natężeniu oświetlenia 4000 lux. Rozwijające się zarodki pasażowano na świeże pożywki co 4 tygodnie. Przeżywalność androgenicznych zarodków obliczono ze stosunku liczby zarodków wyłożonych na pożywkę do liczby rozwijających się w rośliny.

Część zarodków przed pierwszym pasażem na agarową pożywkę regeneracyjną B5 poddano desykcji, aby sprawdzić jak taki sposób traktowania wpływa na ich przeżywalność. Dojrzałe zarodki przenoszono do płynnej pożywki NLN 13 z dodatkiem kwasu abscysynowego (ABA) $5 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$. Szalki inkubowano w ciemności i na wytrząsarce przez 24 godz. Następnie zarodki przenoszono na szalki z warstwą bibuły filtracyjnej, szalki zamykano i umieszczano w ciemności w temperaturze 25°C . Po ok. 3 tygodniach odwodnione zarodki przekładano na pożywkę regeneracyjną [ADAMUS, SAMEK 2001].

Wyniki i dyskusja

W ciągu 3 lat w laboratorium Katedry Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa Akademii Rolniczej w Krakowie przeprowadzono indukcję androgenyzy u 47 różnych linii hodowlanych kapusty głowiastej białej, z zastosowaniem dla każdego z badanych genotypów dwu technik: kultur pylników i izolowanych mikrospor. Średnio około 50% badanych linii posiadało zdolność do tworzenia zarodków drogą androgenyzy (tab. 1).

Tabela 1; Table 1

Zdolność do androgenyzy u kapusty głowiastej białej zależnie od zastosowanej techniki indukcji

Capability for androgenesis of white cabbage depending on the induction technique

Rok badań Year of study	Liczba badanych obiektów Number of studied entries	Kultury pylników Anther cultures (% obiektów; % entries)		Kultury mikrospor Microspore cultures (% obiektów; % entries)	
		embriogennych* embryogenic	„opornych” recalcitrant	embriogennych* embryogenic	„opornych” recalcitrant
1999	4	50	50	50	50
2000	24	25	75	42	58
2001	19	68	32	58	42
Razem; Total Średnio; Mean	47	47,7	52,3	50,0	50,0

* obiekty, u których otrzymano androgeniczne zarodki; objects in which androgenic embryos were obtained

Większość badanych materiałów charakteryzowała się niską wydajnością androgenyzy, co jest potwierdzeniem danych przytaczanych przez światową literaturę, która kapustę głowiastą białą zalicza do gatunków o małej zdolności do androgenyzy [ROULUND i in. 1990; OSOLNIK i in. 1993; GÓRECKA i in. 1995; ADAMUS 2001]. Badane obiekty w kulturach pylników tworzyły od kilku do kilkudziesięciu zarodków na 100 pylników (średnia wydajność 3,4 zarodka na 100 pylników), a w kulturach mikrospor średnio 15 zarodków na 100 pąków (tab. 2). Należy jednak zwrócić uwagę na fakt, że u niektórych obiektów po zastosowaniu techniki kultur mikrospor obserwowano wysoką wydajność sięgającą powyżej 400 zarodków na 100 pąków. Obiekty te mogą zostać wykorzystane do krzyżowania z formami cennymi gospodarczo, lecz o niskiej zdolności do androgenyzy w celu podwyższenia wydajności tego procesu. Wyniki te potwierdzają znaną prawidłowość, że czynnik genetyczny ma duży wpływ na efektywność androgenyzy. Wielu autorów obserwowało dużą zmienność liczby otrzymywanych zarodków pomiędzy liniami, odmianami, klonami a nawet poszczególnymi roślinami [ROULUND i in. 1990; GÓRECKA i in. 1995].

W ciągu trzech lat prowadzonych badań możliwe było porównanie dwu technik indukcji androgenyzy (tab. 1 i 2). Ogółem otrzymano około 1600 androgenicznych zarodków. W kulturach izolowanych mikrospor tworzyło się ich 3-krotnie więcej (1205 sztuk) niż gdy zastosowano kultury pylników (389 sztuk). Liczba obiektów u których obserwowano pozytywną androgeniczną odpowiedź była podobna w obydwu zastosowanych technikach. W przypadku metody mikro-

por wynosiła średnio 50%. W kulturach pylników, obiektów o wysokiej zdolności do androgenezy było 48%. Kultura mikrospor uważana jest za bardziej wydajną metodę indukcji androgenezy niż kultury pylników. Mimo, że technika ta wymaga wyposażenia laboratorium w dodatkowy sprzęt (np. mikroskop odwróconego pola, wirówka, wytrząsarka) i większej precyzji w zakładaniu doświadczeń, to ilości otrzymanych zarodków i wcześniejsze ich pojawianie się przemawiają na jej korzyść. U gatunków należących do rodzaju *Brassica* uwolnienie mikrospor od hamującego embriogenezę wpływu ściany pylnikowej, powodowało nawet kilkudziesięciokrotny wzrost wydajności androgenezy [SIEBEL, PAULS 1989; TAKAHATA, KELLER 1991; DUIJS i in. 1992; VYVAĐILOVA i in. 1998].

Tabela 2; Table 2

Efektywność androgenezy u kapusty głowiastej białej
zależnie od zastosowanej techniki indukcji

Efficiency of androgenesis in white cabbage depending on the induction technique

Rok badań Year of study	Kultury pylników Anther cultures				Kultury mikrospor Microspore cultures			
	ogółem total		zarodków na 100 pylników; embryos per 100 anthers		ogółem total		zarodków na 100 pąków; embryos per 100 buds	
	pylników anthers	zarodków embryos	średnio mean	zakres zmienności range	pąków buds	zarodków embryos	średnio mean	zakres zmienności range
1999	800	22	2,7	3–5	640	27	4,2	0,5–8
2000	2850	114	4,0	0,2–14	2360	805	34,1	3–440
2001	7389	253	3,4	0,2–27	5668	373	6,6	0,2–200
Razem; Total Średnio; Mean	11039	389	3,4	0,2–27	8668	1205	14,9	0,2–440

Tabela 3; Table 3

Wpływ desykcacji na rozwój zarodków kapusty głowiastej białej
Effect of desiccation on the development of white cabbage embryos

Rok badań Year of study	Liczba zarodków regenerowanych Number of regenerated embryos	Liczba zarodków rozwijających się w rośliny Embryos developing into plants	
		sztuk; number	%
Bez desykcacji; Without desiccation			
2000	151	13	8,6
2001	247	60	24,3
Z zastosowaniem desykcacji; After desiccation			
2000	335	145	43,3
2001	893	332	37,2

Przeżywalność androgenicznych zarodków umieszczonych bezpośrednio na pożywce regeneracyjnej jest niska. W doświadczeniach nad kapustą głowiastą i brokułem rozwijało się 20–30% zarodków [KELLER, ARMSTRONG 1983; GÓRĘCKA i

in. 1995]. U kapusty chińskiej prawidłowy rozwój podejmowało tylko 8% [CAO i in. 1994], a u rzodkwi 9% zarodków [ADAMUS 1994]. W celu polepszenia tej cechy w roku 2000 i 2001 zastosowano modyfikację polegającą na poddaniu zarodków desykcji. Odwodnieniu przed wyłożeniem na pożywkę regeneracyjną poddano łącznie 1228 zarodków (tab. 3). Zabieg ten obniżał liczbę zarodków zamierających i nienormalnie rozwijających się, a zwiększał liczbę otrzymanych roślin o około 35% w 2000 r. i 13% w 2001 r. Średnio, odwodnienie zwiększało przeżywalność zarodków około dwukrotnie. Desykcja androgenicznych zarodków jest więc u kapusty głowiastej zabiegiem bardzo celowym. Jest to ważny element metodyczny, gdyż w przypadku genotypów o niskiej wydajności androgeny umożliwia prawidłowy rozwój większości otrzymanych zarodków w rośliny. Badania wpływu procesu desykcji na rozwój zarodków prowadzili także inni autorzy [TAKAHATA i in. 1993; RUDOLF i in. 1999; HANSEN 2000]. We wszystkich przypadkach odnotowano, że odwodnienie androgenicznych zarodków przed wyłożeniem na pożywki regeneracyjne znacznie zwiększało liczbę prawidłowo wykształconych roślin.

Ogólna liczba otrzymanych zarodków oraz około 40% ich przeżywalność są powodem, że metoda indukcji androgeny w kulturach *in vitro* z powodzeniem może być użyta do otrzymywania materiału hodowlanego zastępującego homozygotyczne linie wsobne, których wyprowadzanie trwa przez wiele pokoleń. Metoda ta pozwala na znaczne skrócenie czasu hodowli, a linie DH kapust mogą być wykorzystane w programach hodowlanych odmian mieszańcowych [MICHALIK i in. 2001; POLAK i in. 2002].

Literatura

- ADAMUS A. 1994. *Androgeniza u Raphanus sativus i Brassica oleracea var. italica, przeżywalność i ploidalność roślin uzyskanych z zarodków*. Prace Ogrodu Botanicznego PAN 5/6: 507–512.
- ADAMUS A. 2001. *Androgenesis in Polish Brassica oleracea L. genotypes*. Agriculture and biotechnology „Biotechnological approaches for utilization of gametic cells”. Cost 824 final meeting Bled, Slovenia: 133–136.
- ADAMUS A., SAMEK L. 2001. *Wydajność kultur mikrospor i przeżywalność zarodków kapusty głowiastej białej*. Folia Horticulturae, Ann. 13/1A: 75–80.
- CAO M.Q., LI Y., LIU F., DORÉ C. 1994. *Embriogenesis and plant regeneration of pak-choi (Brassica rapa L. ssp. chinensis) via in vitro isolated microspore culture*. Plant Cell Reports 13: 447–450.
- DUIJS J.G., VOORIPS R.E., VISSER D.L., CUSTERS J.B.M. 1992. *Microspore culture is successful in most crop types of Brassica oleracea L.* Euphytica 60: 45–55.
- GÓRCECKA K., KRZYŻANOWSKA D., GLAPŚ T., HOSER-KRAUZE J. 1995. *Wpływ różnych czynników na efektywność androgeny u kapusty głowiastej*. Mat. V Ogólnopolskiego Zjazdu Hodowców Roślin Ogrodniczych. Skierniewice, 23–24 II 1995, Cz. I: 76–82.
- HANSEN M. 2000. *ABA treatment and desiccation of microspore-derived embryos of cabbage (Brassica oleracea ssp. capitata L) improves plant development*. Journal of Plant Physiology 156(2): 164–167.
- KELLER W.A., ARMSTRONG K.C. 1983. *Production of haploids via anther culture in Brassica oleracea var. italica*. Euphytica 32: 151–159.

- KELLER W.A., RAJHATHY T., LACAPRA J. 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. 17: 655–666.
- LICHTER R. 1989. Efficient yield embryoids by culture of isolated microspores of different Brassicaceae species. Plant Breeding 103: 119–123.
- MICHALIK B., ADAMUS A., NOWAK E. 2001. *Rośliny haploidalne w hodowli warzyw w Polsce*. Folia Horticulturae, Ann. 13/1A: 25–29.
- OSOLNIK B., BOHANEC B., JELASKA S. 1993. Stimulation of androgenesis in white cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata*) anthers by low temperature and anther dissection. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 32: 241–246.
- POLAK A., KARPIŃSKI S., ADAMUS A. 2002. *Linie podwojonych haploidów kapusty – ocena i zastosowanie w hodowli*. Konferencja, 100-lecie Katedry Hodowli Roślin i Nasiennictwa AR w Krakowie, 21–22 maja 2002: 34.
- ROULUND N., HANSTED L., ANDERSEN S.B., FARESTVEIT B. 1990. Effect of genotype, environment and carbohydrate on anther culture response in head cabbage (*Brassica oleracea* L. convar. *capitata* (L.) Alef.). Euphytica 49: 237–242.
- RUDOLF K., BOHANEC B., HANSEN M. 1999. Microspore culture of white cabbage *Brassica oleracea* var. *capitata* L.: genetic improvement of non-responsive cultivars and effect of genome doubling agents. Plant Breeding 118(3): 237–241.
- SIEBEL J., PAULS K.P. 1989. A comparison of anther and microspore culture as a breeding tool in *Brassica napus*. Theor Appl Genet. 78: 473–4479.
- TAKAHATA Y., BROWN D.C.W., KELLER W.A., KAIZUMA N. 1993. Dry artificial seed and desiccation tolerance induction in microspore-derived embryos of brocoli. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 35: 121–129.
- TAKAHATA Y., KELLER W.A. 1991. High frequency embryogenesis and plant regeneration in isolated microspore culture of *Brassica oleracea* L. Plant Science 74: 235–242.
- VYVADILOVA M., KUCERA V., TOMASKOVA D. 1998. Embryogenesis in isolated microspore cultures in different genotypes of *Brassica oleracea*. Zahradnictvi 25: 9–14.

Słowa kluczowe: androgeniza, kapusta głowiasta, kultury pylników, mikrospory, zarodki

Streszczenie

Badaniami objęto 47 różnych linii hodowlanych kapusty głowiastej białej, stosując dla każdego z genotypów dwie techniki: kultury pylników i izolowanych mikrospor. Stwierdzono, że około połowa badanych linii posiadała zdolność do tworzenia androgenicznych zarodków. Większość obiektów charakteryzowała się niską zdolnością do androgenyzy. W kulturach pylników otrzymano od kilku do kilkudziesięciu zarodków na 100 pylników, a w kulturach mikrospor średnio 15 zarodków na 100 pąków. Porównanie obu technik wykazało, że w kulturach izolowanych mikrospor otrzymano 3-krotnie więcej zarodków niż gdy zastosowano kultury pylników. Liczba linii, u których obserwowano pozytywną androgeniczną odpowiedź, była podobna w przypadku obydwu metod.

Przeżywalność zarodków kapusty umieszczonych bezpośrednio na pożywce regeneracyjnej była niska. W celu poprawienia tej cechy zastosowano modyfikację polegającą na poddaniu zarodków zabiegowi desykcji. Zabieg ten obniżał liczbę zarodków zamierających i nienormalnie rozwijających się, a zwiększał liczbę otrzymanych roślin około dwukrotnie.

INDUCTION OF ANDROGENESIS IN WHITE CABBAGE BY MEANS OF ANTHHER CULTURES AND ISOLATED MICROSPORES

Adela Adamus, Lucyna Samek, Agnieszka Ciepichał

Department of Genetics, Plant Breeding and Seed Science,
Agricultural University, Kraków

Key words: androgenesis, white cabbage, anther and microspore cultures, embryos

Summary

Induction of androgenesis was investigated in 47 breeding lines of white cabbage, using two techniques, i.e. anther and isolated microspore cultures. Approximately half of studied lines showed the ability to production of androgenic embryos. Most of them indicated low androgenic capability. Several to several tens embryos per 100 anthers were obtained from anther cultures, while 15 embryos per 100 buds were produced on average from isolated microspores. Comparison of both techniques showed that the isolated microspores produced approximately three times more embryos than the anther cultures. The number of entries positively responding to induction of androgenesis was similar in both methods.

Survival rate of cabbage embryos placed directly on the conversion medium was low. In order to improve it, a modified technique, including embryo desiccation step, was applied. That treatment lowered the frequency of deteriorated and abnormally developed embryos and doubled the number of obtained plants.

Dr hab. Adela **Adamus**

Katedra Genetyki, Hodowli i Nasiennictwa

Akademia Rolnicza im. Hugona Kołłątaja

al. 29 Listopada 54

31-425 KRAKÓW

e-mail: adamusa@ogr.ar.krakow.pl