

## STRES OSMOTYCZNY I STRES TEMPERATURY W KULTURZE *in vitro* PYLNIKÓW JĘCZMIENIA <sup>1</sup>

Hanna Kruczkowska, Helena Pawłowska, Barbara Skucińska

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

### Wstęp

Homozygotyczne linie podwojonych haploidów (linie DH) można uzyskać ze zróżnicowanego genetycznie materiału w ciągu jednej generacji, podczas gdy przy użyciu metod tradycyjnych osiąga się homozygotyczność dopiero po kilkuletniej selekcji. Linie DH są przydatne w hodowli krzyżówkowej, mutacyjnej i heterozyjnej. Szczególną zaletą haploidów jest to, że nawet pojedyncze haploidalne komórki, np. mikrospory, mogą być poddane mutacji, transformacji lub selekcji, stanowiąc w ten sposób źródło nowej zmienności, łatwej do utrwalenia. Korzyści wynikające z zastosowania haploidów sprowadzają się w sumie do znacznego skrócenia czasu potrzebnego do wyhodowania nowej odmiany rolniczej, a tym samym zmniejszenia kosztów hodowli. Warunkiem włączenia haploidyacji do programu hodowlanego jest jednak duża wydajność indukcji struktur zarodkowych oraz ich zdolność do dalszego rozwoju i podwojenia liczby chromosomów. Od lat osiemdziesiątych ubiegłego wieku trwają intensywne badania nad opracowaniem wydajnych procedur haploidyacji, lecz dotychczas u nielicznych gatunków roślin uprawnych powstały nowe odmiany z udziałem haploidów.

U jęczmienia stosuje się trzy sposoby uzyskania haploidów. Najdawniej – metodą bulbosową [KASHA, KAO 1970], dzięki której wyhodowano już kilkadziesiąt odmian. Nieco później wykorzystano do haploidyacji indukcję androgeny w kulturze *in vitro* pylników [CLAPHAM 1971, 1973] lub mikrospor jęczmienia [SUNDERLAND, XU 1982]. W Polsce prowadzono głównie badania nad metodą bulbosową [ADAMSKI 1979; ADAMSKI i in. 1983], którą wdrożono do hodowli w niewielkim zakresie [ADAMSKI i in. 1995]. Badania nad androgenezą w polskich materiałach hodowlanych podjęto stosunkowo niedawno [KRUCZKOWSKA i in. 2002]. Biorąc pod uwagę dużą dostępność i liczebność ziaren pyłku potencjalna wydajność androgeny jest wielokrotnie większa niż innych sposobów pozyskania haploidów. Stopniowo ta metoda jest doskonalona i w różnych laboratoriach opracowuje się poszczególne czynniki związane z wydajnością androgeny.

Krytyczne znaczenie dla zmiany drogi rozwoju mikrospor z gametycznej na sporofityczną ma stres, któremu poddaje się kłosa lub izolowane pylniki przed kulturą *in vitro*. U jęczmienia najczęściej stosuje się stres niskiej temperatury lub stres osmotyczny przez zanurzenie w roztworze mannitolu. Celem pracy było zbadanie wpływu różnych stężeń mannitolu w połączeniu ze zróżnicowaną tempe-

<sup>1</sup> Badania wykonano w ramach projektu Komitetu Badań Naukowych Nr 5PO6A00916.

raturą, zastosowanych w czasie traktowania wstępnego przed wyłożeniem pylników na pożywkę.

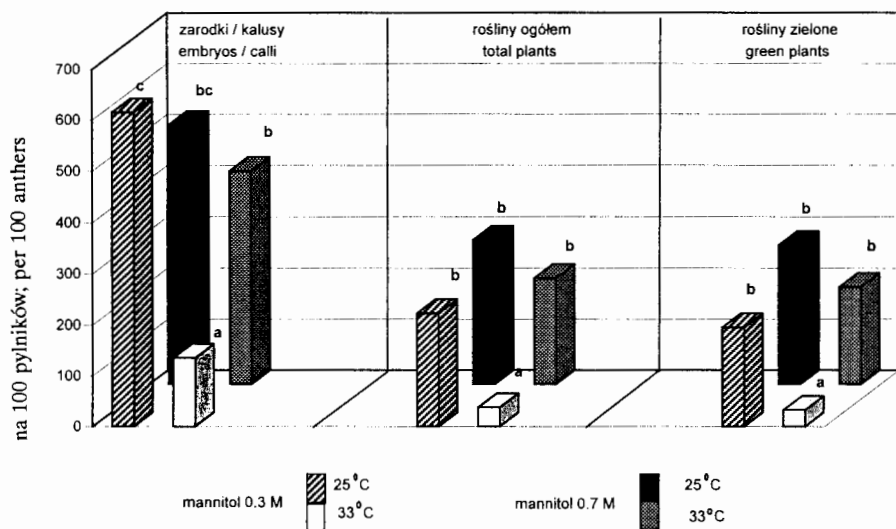
### Materiał i metody

Badania prowadzono na 4 polskich odmianach jęczmienia jarego oraz modelowej odmianie Igri, o biotypie ozimym. Żadna z polskich odmian nie dorównywała odmianie Igri w wydajności androgenezы. 'Mobek', 'Sezam' i 'Rodos' przewyższały jednak pod tym względem odmianę Rastik [KRUCZKOWSKA i in. niepubl.].

Rośliny pochodziły z pola lub z pomieszczenia wegetacyjnego o warunkach kontrolowanych (temperatura 17°C, napromieniowanie 280  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , fotoperiod 16/8 godz.). Żdźbła pobrano przed kłoszeniem, kierując się odległością liścia flagowego od kolejnego liścia na żdźble. Kłosy zamknięte w pochwach liściowych, po umyciu w wodzie bieżącej i sterylnej, spryskano 70% etanolem. W warunkach sterylnych wydobyto kłosy z pochew i dokonano ich selekcji na podstawie obserwacji mikroskopowej mikrospor ze środkowej części kłosa tak, aby pylniki przeznaczone do kultury zawierały większość mikrospor w stadium średnio- i późno-jednojądrowym. Pylniki poddano traktowaniu wstępnemu przez 4 doby w roztworze mannitolu o stężeniu 0,3; 0,7 i/lub 1,0; 1,5  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , w temperaturze 25°C i 33°C. Odmiana Igri była badana w większości kombinacji doświadczenia, pozostałe odmiany tylko w niektórych kombinacjach. W każdej kombinacji pylniki w 5 powtórzeniach po 20, wyłożono na pożywkę FHG [HUNTER 1988, cyt. za HU 1997] z dodatkiem 0,2  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  2,4-D i 1  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$  BAP, zestaloną gelritem. Kultury prowadzono w ciemności w temperaturze 25°C. Zarodki i kalusy (o zbitej strukturze), powstałe w ciągu 6 tygodni kultury i większe niż 1,5 mm, przenoszono na pożywkę regeneracyjną FHG różniącą się od poprzedniej brakiem 2,4-D oraz zmniejszoną ilością BAP (0,4  $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ ) i maltozy (30  $\text{g}\cdot\text{dm}^{-3}$ ). Kulturę prowadzono na świetle w temperaturze około 25°C przez 5 tygodni. Wyniki przeliczone na 100 pylników opracowano analizując etap indukcji androgenezы (liczba zarodków i kalusów) oraz regeneracji roślin (liczba roślin ogółem i roślin zielonych). Analizy zmienności wykonano w układzie całkowicie rozlosowanym, grupy jednorodne wyznaczono za pomocą testu Duncana przy  $p = 0,95$ .

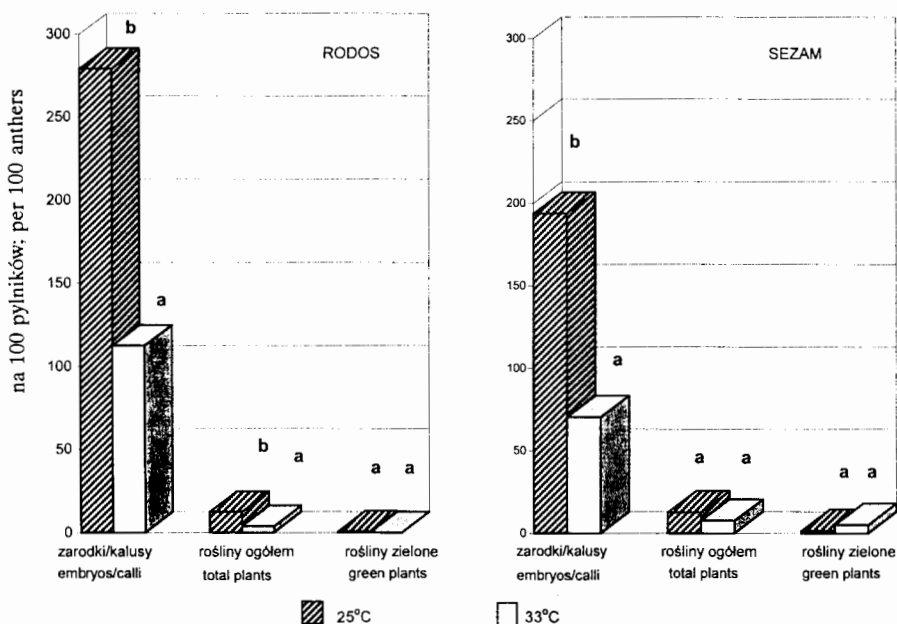
### Wyniki

Na wykresie 1 przedstawiono dane uzyskane dla odmiany Igri traktowanej mannitolem o stężeniu 0,3  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  i 0,7  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  w temperaturze 25°C i 33°C. Wyniki potwierdziły znacznie wyższą zdolność tej odmiany do androgenezы w porównaniu z pozostałymi odmianami. Przy traktowaniu wstępnym mannitolem o stężeniu 0,3  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  zastosowanie temperatury 33°C istotnie pogorszyło wszystkie parametry kultury w porównaniu z temperaturą 25°C. Podwyższona temperatura bardziej negatywnie wpłynęła na rozwój roślin niż indukcję androgenezы. Przy stężeniu mannitolu 0,7  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  wyższa temperatura miała mniejsze znaczenie. U odmian Rodos i Sezam, u których wpływ temperatury badano tylko przy stężeniu 0,3  $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  mannitolu, reakcja na podwyższenie temperatury była podobna: temperatura 33°C wpłynęła istotnie na zmniejszenie liczebności struktur embriogennych, natomiast ze względu na małą liczbę uzyskanych roślin udowodniono tylko wpływ temperatury na liczbę roślin ogółem u odmiany Rodos (rys. 2).



Rys. 1. Wpływ temperatury i stresu osmotycznego na androgenezę w kulturze *in vitro* pylników jęczmienia odmiany Igrı

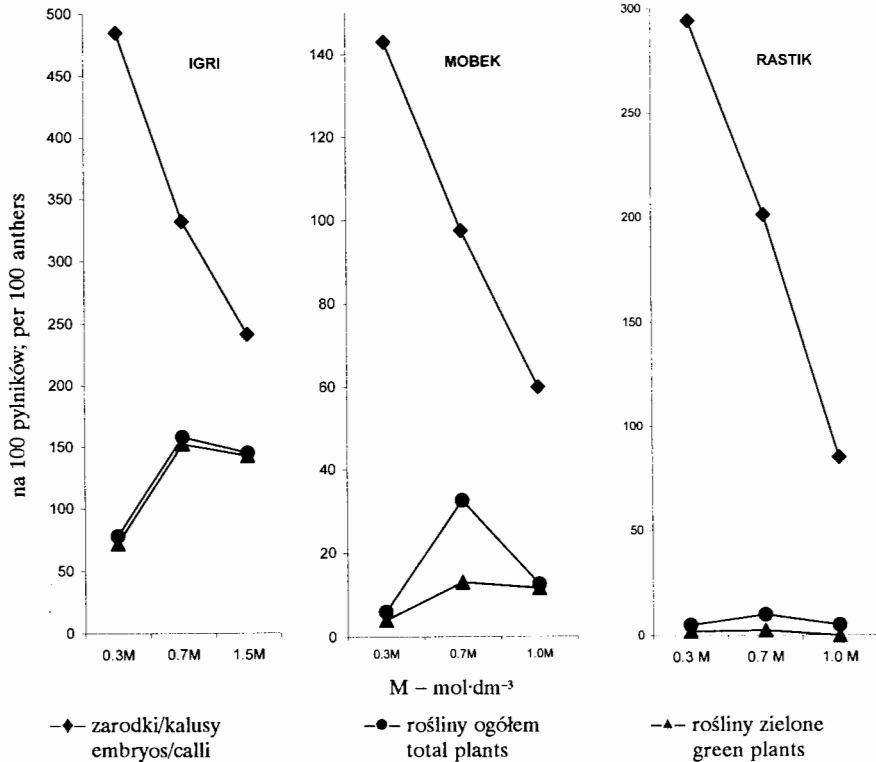
Fig. 1. Effect of heat and osmotic stresses on androgenesis in *in vitro* culture of barley anthers in Igrı cv.



Rys. 2. Wpływ temperatury na skuteczność traktowania wstępnego 0,3 mol·dm<sup>-3</sup> mannitolem pylników jęczmienia

Fig. 2. Effect of temperature on the efficiency of pretreating barley anthers with 0.3 mol·dm<sup>-3</sup> mannitol concentration

U odmian Igri, Mobek i Rastik porównano skuteczność różnych stężeń mannitolu zastosowanych w temperaturze 25°C. Wpływ stężenia mannitolu na indukcję androgenezы i regenerację roślin nie został udowodniony statystycznie, lecz obserwowano taką samą tendencję w reakcji badanych odmian (rys. 3). Stężenie 0,7 mol·dm<sup>-3</sup> i wyższe (1,0 mol·dm<sup>-3</sup> i 1,5 mol·dm<sup>-3</sup>) zmniejszyły liczbę tworzących się w pylnikach zarodków i kalusów, natomiast regeneracja roślin, w tym roślin zielonych była wyższa przy stężeniu 0,7 mol·dm<sup>-3</sup> niż przy stężeniu 0,3 mol·dm<sup>-3</sup>. Zastosowanie wyższego stężenia niż 0,7 mol·dm<sup>-3</sup> nie spowodowało dalszego zwiększenia regeneracji roślin.



Rys. 3. Androgeneza w kulturze *in vitro* pylników jęczmienia pod wpływem mannitolu o różnym stężeniu

Fig. 3. Effect of various mannitol concentrations on the androgenesis in *in vitro* culture of barley anthers

## Dyskusja

Stres jest głównym czynnikiem indukującym embriogenezę w kulturze *in vitro* pylników i mikrospor. INDRIANTO i in. [1999] wyróżnili 4 rodzaje stresu najczęściej stosowane u różnych gatunków roślin uprawnych: chłodzenie (4–6°C), podwyższona temperatura (30–35°C), niedobór węglowodanów i azotu oraz trak-

towanie kolchicyną. Należy również wziąć pod uwagę, że obok stresu zastosowanego do indukcji androgenyzy mogą działać równocześnie inne, niekontrolowane czynniki stresowe jak oddzielenie kłosa od rośliny, wirowanie lub niektóre stresujące składniki pożywki. Zbyt niska wydajność haploidyzacji spowodowała, że podjęto próby wzmocnienia stresu, zwiększając jego natężenie i wydłużając czas działania oraz zastosowano równocześnie dwa czynniki stresowe [KASHA i in. 2001] lub chłodzenie kłosów, a następnie głodzenie i podwyższoną temperaturę w kulturze mikrospor [INDRIANTO i in. 1999].

Użycie mannitolu jako czynnika zwiększającego ciśnienie osmotyczne roztworu, a tym samym powodującego głodzenie mikrospor zaproponowali u jęczmienia ROBERTS-OEHLSCHLAGER i DUNWELL [1990]. Najczęściej stosuje się stężenie  $0,3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  mannitolu przez 4 dni w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . CISTUÉ i in. [1994] badając odmiany o różnej zdolności do androgenyzy uznali za bardziej korzystne stężenie  $0,7 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , a CASTILLO i in. [2000] uzyskali lepsze wyniki u małowydajnych odmian przy stężeniu  $1,0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  i  $1,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Nasze badania na zróżnicowanym pod względem skłonności do androgenyzy materiale, potwierdziły większą skuteczność stężenia  $0,7 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , jednak przy wyższych stężeniach  $1,0 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  i  $1,5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  uzyskano wydajność zielonych roślin, podobną jak przy stężeniu  $0,7 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ . Wyniki doświadczenia potwierdziły również odmienny wpływ mannitolu na fazę indukcji i fazę rozwoju roślin, wykazany we wcześniejszych badaniach [KRUCZKOWSKA i in. 2002].

Stres podwyższonej temperatury był skuteczny w kulturze mikrospor rzepaku [KELLER, ARMSTRONG 1978] tytoniu i pszenicy [TOURAEV i in. 1996; LIU i in. 2002]. Komentując wpływ podwyższonej temperatury wskazuje się również na możliwość szybszego udostępniania w tych warunkach składników pożywki. W kulturze pylników i mikrospor jęczmienia standardowo traktuje się wstępnie kłosa chłodem ( $4^\circ\text{C}$ ), najczęściej przez 28 dni. KASHA i in. [2001] połączyli stres osmotyczny mannitolu z krótkim (4 dni) chłodzeniem kłosów przed izolacją mikrospor. Krótkotrwałe połączenie tych stresów w stosunku do izolowanych pylników było nieskuteczne [KRUCZKOWSKA i in. 2002]. Należy więc zastrzec, że działanie stresu na kłosa, pylniki i mikrospory może być odmienne ze względu na fizyczną zapórę jaką stanowią plewy, plewki i ściana pylnika. W niniejszej pracy po raz pierwszy badano u jęczmienia wpływ podwyższonej temperatury, równocześnie ze stresem osmotycznym. W temperaturze  $33^\circ\text{C}$  wszystkie wyniki, dotyczące liczby zarodków i kalusów oraz roślin, były gorsze niż w temperaturze  $25^\circ\text{C}$ . Niekorzystny wpływ tej temperatury ujawnił się szczególnie przy stężeniu  $0,3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$  mannitolu, ograniczając najbardziej zdolność zarodków do dalszego rozwoju.

## Wnioski

Stosując w traktowaniu wstępnym pylników jęczmienia równocześnie stres osmotyczny i stres podwyższonej temperatury ( $33^\circ\text{C}$ ) wykazano, że ta temperatura wpłynęła niekorzystnie na wydajność androgenyzy, szczególnie na rozwój roślin z zarodków. Porównując skuteczność różnych stężeń mannitolu wybrano jako optymalne stężenie  $0,7 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ , które w temperaturze  $25^\circ\text{C}$  przyczyniło się do liczniejszego przekształcania się struktur zarodkowych w zielone rośliny, mimo ograniczenia liczby zarodków i kalusów w fazie indukcji androgenyzy.

## Literatura

- ADAMSKI T. 1979. *The obtaining of autodiploid barley lines using haploids from the cross *Hordeum vulgare* L. × *Hordeum bulbosum**. Genet. Pol. 20: 31–42.
- ADAMSKI T., JEŻOWSKI S., KURHAŃSKA G., SURMA M. 1983. *Zastosowanie metody bulbosowej w hodowli jęczmienia i otrzymywanie form haploidalnych oraz linii autodiploidalnych*. Hodowla Roślin 4: 1–5.
- ADAMSKI T., SURMA M., JEŻOWSKI S. 1995. *Badania nad introdukcją cytoplazmy *Hordeum bulbosum* do wybranych genotypów jęczmienia uprawnego (*H. vulgare* L.)*. Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo 39: 103–109.
- CASTILLO A.M., VALLÉS M.O., CISTUÉ L. 2000. *Comparison of anther and isolated microspores cultures in barley. Effects of culture density and regeneration medium*. Euphytica 113: 1–8.
- CISTUÉ L., RAMOS A., CASTILLO A.M., ROMAGOSA I. 1994. *Production of large number of doubled haploid plants from barley anthers pretreated with high concentrations of mannitol*. Plant Cell Rep. 13: 709–712.
- CLAPHAM D. 1971. *In vitro development of callus from the pollen of *Lolium* and *Hordeum**. Z. Pflanzenzücht. 65: 285–292.
- CLAPHAM D. 1973. *Haploidy *Hordeum* plants from anthers in vitro*. Z. Pflanzenzücht. 69: 142–155.
- HU H. 1997. *In vitro induced haploids in wheat*, in: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*. Jain S.M., Sopory S.K., Veilleux R.E. (eds). Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht: 73–97.
- INDRIANTO A., HEBERLE-BORS E., TOURAEV A. 1999. *Assessment of various stresses and carbohydrates for their effect on the induction of embryogenesis in isolated wheat microspores*. Plant Sci. 143: 71–79.
- KASHA K.J., KAO K.N. 1970. *High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.)*. Nature 225: 874–875.
- KASHA K.J., SIMION E., ORO R., YAO Q.A., HU T.C., CARLSON A.R. 2001. *An improved in vitro technique for isolated microspore culture of barley*. Euphytica 120: 379–385.
- KELLER W.A., ARMSTRONG K.C. 1978. *High frequency production of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures*. Z. Pflanzenzücht. 80: 100–108.
- KRUCZKOWSKA H., PAWŁOWSKA H., SKUCIŃSKA B. 2002. *Influence of anther pretreatment on the efficiency of androgenesis in barley*. J. Appl. Genet. 43(3): 287–296.
- LIU W., ZHENG M.Y., KONZAK C.F. 2002. *Improving green plant production via isolated microspore culture in bread wheat (*Triticum aestivum* L.)*. Plant Cell Rep. 20: 821–824.
- ROBERTS-OEHLISCHLAGER S.L., DUNWELL J.M. 1990. *Barley anther culture: pretreatment on mannitol stimulates production of microspore derived embryos*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 20: 235–240.
- SUNDERLAND B., XU Z.H. 1982. *Shed pollen culture in *Hordeum vulgare**. J. Exp. Bot. 33: 1086–1095.
- TOURAEV A., INDRIANTO A., WRATSCHKO I., VICENTE O., HEBERLE-BORS E. 1996. *Effi-*

*cient microspore embryogenesis in wheat (Triticum aestivum L.) induced by starvation at high temperature. Sex. Plant Reprod. 9: 209–215.*

**Słowa kluczowe:** androgeneza, jęczmień, mannitol, stres temperatury

### Streszczenie

Zmianę drogi rozwoju mikrospor z gametofitycznej na sporofityczną stymuluje się działając czynnikami stresowymi, którym poddaje się kłosa lub pylniki przed kulturą *in vitro*. U jęczmienia najczęściej stosuje się stres chłodzenia (4°C) lub stres osmotyczny przy pomocy 0,3 mol·dm<sup>-3</sup> mannitolu. Celem pracy było zbadanie wpływu na androgenezę różnych stężeń mannitolu w połączeniu z temperaturą 25°C i 33°C. U odmiany modelowej Igrī udowodniono, że przy traktowaniu 0,3 mol·dm<sup>-3</sup> mannitolem temperatura 33°C działała negatywnie na liczbę uzyskanych zarodków i roślin, a szczególnie na przekształcanie się zarodków w zielone rośliny. Przy wyższym stężeniu mannitolu (0,7 mol·dm<sup>-3</sup>) temperatura miała mniejsze znaczenie. U innych odmian, u których badano wpływ temperatury tylko przy niższym stężeniu mannitolu, reakcja na podwyższenie temperatury była podobna. U wszystkich badanych odmian stężenie 0,7 mol·dm<sup>-3</sup> mannitolu było korzystniejsze niż 0,3 mol·dm<sup>-3</sup>: mimo ograniczenia liczby struktur embriogennych wpłynęło dodatnio na ich dalszy rozwój. Zastosowanie wyższego stężenia mannitolu (1,0 mol·dm<sup>-3</sup>, 1,5 mol·dm<sup>-3</sup>) w temperaturze 25°C nie zwiększyło liczby roślin zielonych.

### OSMOTIC AND HEAT STRESSES IN *in vitro* ANTHHER CULTURE OF BARLEY

Hanna Kruczkowska, Helena Pawłowska, Barbara Skucińska  
Department of Plant Breeding and Seed Science,  
Agricultural University, Kraków

**Key words:** androgenesis, barley, heat stress, mannitol

### Summary

The change in the developmental pathway of microspores from gametophytic to sporophytic one is stimulated by stress applied to spikes or anthers before *in vitro* culture. In barley, two most commonly used types of stress are chilling (4°C) and osmotic stress by 0.3 mol·dm<sup>-3</sup> mannitol. The research aimed at determining the effect of various mannitol concentrations combined with the temperature of 25 or 33°C. In the model Igrī cultivar, the temperature 33°C combined with 0.3 mol·dm<sup>-3</sup> mannitol treatment were found to have a harmful effect on the number of obtained embryos and plants, and particularly on the development of embryos into green plants. At higher mannitol concentration (0.7 mol·dm<sup>-3</sup>), the temperature was less important. In other cultivars, in which the effect of temperature was examined only at lower mannitol concentration, the

response to increased temperature was similar. In all the tested cultivars, 0.7 mol·dm<sup>-3</sup> mannitol concentration was more favourable than 0.3 mol·dm<sup>-3</sup>: despite limiting the number of embryo-like structures, it showed a positive effect on their further development. Using of higher mannitol concentrations (1.0 mol·dm<sup>-3</sup>, 1.5 mol·dm<sup>-3</sup>) at 25°C did not increase the number of green plants in comparison to 0.7 mol·dm<sup>-3</sup>.

Dr inż. Hanna **Kruczkowska**  
Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa  
Akademia Rolnicza  
ul. Łobzowska 24  
31-140 KRAKÓW  
e-mail: rkhrn@ar.krakow.pl