



Uzyskiwanie transgenicznych linii podwojonych haploidów tytoniu metodą kultur tkankowych

Anna Czubacka, Teresa Doroszewska

Zakład Hodowli i Uprawy Roślin Specjalnych, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa, Puławy

Obtaining double haploid transgenic tobacco lines by the tissue culture method

Summary

In the study on double haploid (DH) lines of tobacco, two cultivars – MN944 and BY103 transformed with a construct carrying the coat protein gene of *Lettuce Mosaic Virus* (LMV) CP were used. The hybrids F_1 from crossing transgenic line BY103 with its non-transformed equivalent as well as transgenic MN944 line with cv. Wiślica were used for producing haploids *via* induced androgenesis. Double haploids were received by regeneration from stem fragments. The course of meiosis in pollen mother cells was analysed and pollen viability was estimated.

Key words:

androgenesis, double haploid, meiosis, transgene.

1. Wstęp

Transformacja odmian uprawnych tytoniu genem białka płaszczka wirusa mozaiki sałaty *Lettuce Mosaic Virus* (LMV) CP daje możliwość otrzymania linii odpornych na wirus Y ziemniaka *Potato Virus Y* (PVY), który jest rozpowszechniony w uprawach tytoniu, ziemniaka i innych roślin z rodzaju *Solanaceae* (1,2). LMV, podobnie jak PVY należy do rodzaju *Potyvirus*, przy czym LMV nie wywołuje objawów chorobowych na tytoniu (3).

Proces uzyskania stabilnych linii transgenicznych odpornych na PVY przebiega w ciągu kilku pokoleń. Jednym ze sposobów

Adres do korespondencji

Anna Czubacka,
Zakład Hodowli i Uprawy
Roślin Specjalnych,
Instytut Uprawy
Nawożenia
i Gleboznawstwa,
ul. Czarotoryskich 8,
24-100 Puławy.

przyspieszenia go jest tworzenie form homozygotycznych na drodze androgenezy, czyli otrzymywania roślin z haploidalnych komórek gametofitu męskiego (mikrospor) (4,5). Praktyczne wykorzystanie roślin haploidalnych jest często utrudnione wskutek ich całkowitej bezpłodności, związanej z brakiem koniugacji chromosomowej w procesie mejozy. Podwojenie liczby chromosomów jest zatem podstawowym elementem przywrócenia płodności i wykorzystania linii homozygotycznych w dalszej hodowli. Poliploidyzację można prowadzić m.in. poprzez poddanie merystemów wierzchołkowych działaniu kolchicyny zakłócającej proces tworzenia wrzeciona kariokinetycznego (5) lub na drodze spontanicznej poliploidyzacji w trakcie regeneracji pędów w kulturze (6).

Uzyskano formy haploidalne z mieszańców transgeniczej linii hodowlanej MN944 T₁ z nie transformowaną odmianą Wiślica oraz z mieszańców transgeniczej linii hodowlanej BY103 T₁ z jej nie transformowanym odpowiednikiem BY103. W pracy tej przedstawiono sposób otrzymania podwojonych haploidów metodą kolchicynowania kielkujących roślin haploidalnych oraz poprzez kulturę fragmentów walca osiowego łodygi dojrzałych roślin haploidalnych.

2. Materiały i metody

Materiał wyjściowy do otrzymania podwojonych haploidów stanowiły mieszańce F₁ uzyskane ze skrzyżowania linii transgenicznych zawierających gen białka płaszczka wirusa mozaiki sałaty LMV CP, warunkujący odporność na PVY, z nie transformowanymi odpowiednikami.

Produkcję haploidów prowadzono z roślin mieszańcowych odpornych na PVY. W tym celu pobierano pylniki z pąków kwiatowych, odkażano przez 30 minut w 10% roztworze podchlorynu wapnia, płukano w sterylnej wodzie destylowanej i wykładano je na pożywkę wg Nitsch i Nitsch (7).

Dla uzyskania podwojonych haploidów wszystkie kielkujące rośliny haploidalne zanurzano w 0,3% roztworze kolchicyny na 5 godzin w temperaturze 23-25°C, a następnie płukano 3-krotnie w sterylnej wodzie destylowanej i przenoszono na pożywkę wg Linsmaier i Skoog (8).

Zastosowano również inną metodę diploidyzacji roślin polegającą na regeneracji roślin z fragmentów rdzenia łodygi. W tym celu fragmenty łodyg roślin haploidalnych odkażano w 10% roztworze podchlorynu wapnia przez 30 minut, płukano 3-krotnie sterylną wodą destylowaną, a następnie wycinano tkankę walca osiowego i wykładano na pożywkę wg Lloyd (9) zawierającą 2 mg/l kinetyny, 2 mg/l IAA i 0,5 mg/l kwasu foliowego oraz 3% sacharozy i 0,8% agaru, pH = 5,6. Zregenerowane pędy roślin przenoszono na pożywkę wg Linsmaier i Skoog z dodatkiem 0,2 mg/l NAA i 0,2 mg/l IAA, a po ukorzenieniu adaptowano do warunków szklarniowych.

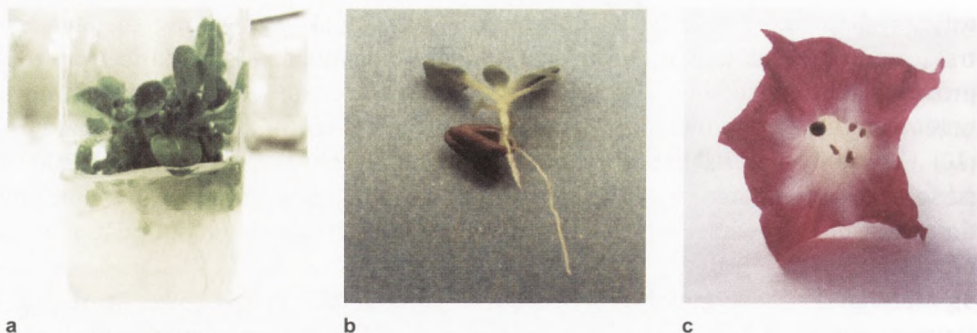
Analizy cytologiczne dojrzałych roślin haploidalnych, poddanych uprzednio działaniu kolchicyny, obejmowały ustalenie liczby chromosomów w komórkach mi-

totycznych płatków korony, pobranych z młodych pąków kwiatowych. Materiał traktowano przez 5 godzin 8-hydroksychinoliną z maltozą w celu skrócenia i rozproszenia chromosomów. Następnie płatki umieszczano w utrwalczu Carnoya w temperaturze pokojowej na 24 godziny, zgodnie z metodą podaną przez Burns (10). Utrwalony materiał hydrolizowano w roztworze utrwalcza Farmera i 10% kwasu solnego w temperaturze 60°C, płukano 3 razy wodą destylowaną i przenoszono do utrwalcza. Preparaty mikroskopowe barwiono acetokarminem z dodatkiem jonów żelazowych.

Materiał do badań mejotycznych stanowiły młode pączki kwiatowe, które przetrzymywano przez 12 godzin w temperaturze ok. 4°C w celu wyeliminowania lepkości chromosomów. Po wstępnej ocenie fazy mejotycznej w rozmazie acetokarminowym przenoszono pylniki do utrwalcza Carnoya zgodnie z metodyką opisaną przez Burns (10). Preparaty barwiono acetokarminem z dodatkiem jonów żelazowych. Konfiguracje mejotyczne obejmowały koniugacje chromosomów w diakinezie i metafazie I oraz obserwacje dalszych faz mejotycznych. Żywotność pyłku określano jako procentowy udział dojrzałych ziaren wybarwiających się acetokarminem spośród ogólnej liczby 500 liczonych ziaren.

Detekcję transgeny u form mieszańcowych oraz roślin haploidalnych i podwojonych haploidów prowadzono metodą PCR. W tym celu izolowano genomowy DNA (11). Próbkę DNA zawieszano w 100 µl sterylnej wody i przechowywano w temp. 4°C. Mieszanina reakcyjna do PCR w przeliczeniu na jedną próbkę o objętości 50 µl zawierała: 0,5 × PCR bufor, 2 µl 25 mM MgCl₂, 1 µl 10 mM dNTPs, po 25 ng odpowiednich starterów (3), 0,75 jednostki polimerazy firmy Fermentas, 1 µl matrycy DNA. Amplifikację prowadzono przy użyciu termocyklera Perkin-Elmer przy następujących parametrach: 94°C – 4 min; 30 cykli: 95°C – 30 s, 58°C – 30 s, 72°C – 45 s; 72°C – 10 min. Produkty amplifikacji rozdzielano elektroforetycznie na 1,2% żelu agarozowym z dodatkiem 0,2 µg/ml bromku etydyny w buforze 1 × TBE (100 mM Tris, 90 mM H₃BO₃, 1 mM EDTA, pH 8,5).

Badania odpornościowe w kierunku PVY, prowadzono poprzez inokulację roślin wykazujących obecność transgeny. Inokulum przygotowano z roślin zainfekowanych PVY i ocenionych uprzednio serologicznie. Z roślin pobierano liście wierzchołkowe, ucierano w moździerzu i wyciskano sok, którym zakażano posypane korundem rośliny. Inokulacje prowadzono w stadium 5-6 liści. W ciągu 48 h zakażone rośliny chroniono przed bezpośrednim wpływem światła. Po ok. 3 tygodniach wykonywano testy DAS-ELISA (Double Antibody Sandwich Enzyme Linked Immunosorbent Assay) przy użyciu przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko różnym szczepom wirusa Y (MoAbs anti Y) oraz skierowanych przeciwko szczepom nekrotycznym PVY (MoAbs anti Y^N) produkowanych przez firmę BIOREBA. Jako kontrolę pozytywną użyto porażone rośliny podatnej na wirus odmiany Samsun H. Kontrolę negatywną stanowiły rośliny nie zakażane i negatywne przeciwciała. Za zdrowe uznawano rośliny bezobjawowe o wartościach testu poniżej 0,1.



Rys. 1. Rośliny haploidalne: (a,b) w kulturze *in vitro*, (c) kwiat – widoczne słabo wykształcone pylniki.

3. Wyniki i dyskusja

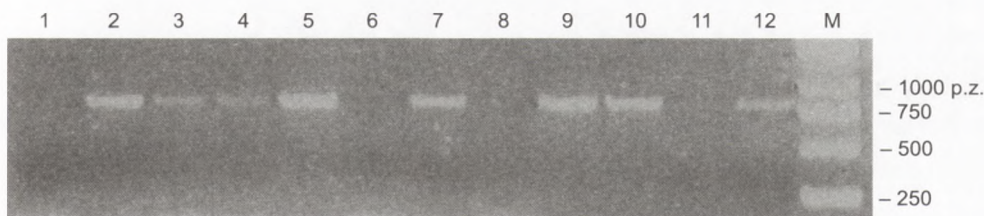
Detekcja molekularna form mieszańcowych oraz badania odpornościowe pozwoliły na wyselekcjonowanie roślin zawierających gen LMV CP oraz wykazujących odporność na PVY. Uzyskano 5 roślin pochodzących z krzyżowania MN944 T₁ × Wiślica oraz 6 z krzyżowania BY103 T₁ × BY103, które zawierały transgen i wykazywały odporność na PVY. Metodą androgenezy uzyskano 100 roślin haploidalnych (rys. 1).

3.1. Uzyskiwanie podwojonych haploidów metodą kolchicynowania

W wyniku traktowania kielkujących roślin haploidalnych roztworem kolchicyny część uległa zatruciu, co przejawiało się silnym niedorozwojem systemu korzeniowego, bądź degeneracją całych roślin. Uzyskano 37 roślin pochodzących z krzyżówki MN944 T₁ × Wiślica oraz 34 rośliny otrzymane z krzyżówki BY103 T₁ × BY103 i poddano je badaniom na obecność transgeny i odporność na PVY.

Większość roślin wykazywała obecność transgeny (tab. 1, rys. 2), natomiast obserwowano duże zróżnicowanie pod względem odporności na PVY w obrębie badanych genotypów, pochodzących z dwóch różnych form mieszańcowych (tab. 1). Zdecydowanie więcej roślin odpornych uzyskano w obrębie tych, których formą ojcową była odmiana Wiślica. Mogło to wynikać z częściowej odporności tej odmiany na PVY, zdecydowanie przewyższającej odmianę BY103 (12).

W przeprowadzonych analizach cytologicznych odpornych roślin transgenicznych, poddanych uprzednio działaniu kolchicyny, wykazano, że większość roślin pochodzących z obydwu form mieszańcowych zawierała 24 chromosomy mitotyczne (tab. 2), co wskazywało na ich haploidalny charakter.



Rys. 2. Analiza elektroforetyczna produktów amplifikacji DNA z roślin haploidalnych. Ścieżki: (1-5) MN944 T₁ × Wiślica, (6-10) BY103 T₁ × BY103, 11 – kontrola negatywna (roślina nie transformowana), 12 – kontrola pozytywna (pKYL MVCP), M – marker mas cząsteczkowych.

Tabela 1

Detekcja transgenu LMV CP i odporność haploidalnych roślin transgeniczných na PVY

Badana cecha		Liczba roślin	
		MN944 T ₁ × Wiślica	BY103 T ₁ × BY103
obecność transgenu	+	31	34
	-	6	8
	razem	37	42
odporność na PVY	zdrowe	22	7
	chore	9	27
	razem	31	34

(+) obecność transgenu, (-) brak transgenu.

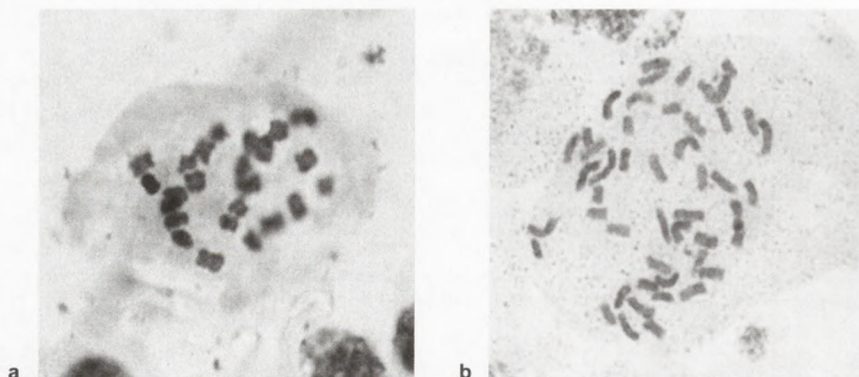
Tabela 2

Badania cytologiczne form haploidalnych poddanych działaniu kolchicyny

Liczba chromosomów	Liczba roślin	
	MN944 T ₁ × Wiślica	BY103 T ₁ × BY103
24	30	43
24 lub 48	8	3
razem	38	46

W niektórych roślinach stwierdzono obecność komórek zawierających 48 chromosomów somatycznych oraz komórki 24-chromosomowe (rys. 3). Formy te, określono jako miksploidalne, tzn. tylko w części ich komórek doszło do podwojenia liczby chromosomów pod wpływem kolchicyny. Rośliny te okazały się nieplodne.

Uzyskanie miksploidów stanowiących 81% otrzymanych w wyniku kolchicynowania młodych roślin bananowca w kulturze *in vitro* opisał także Roux (13).



Rys. 3. Chromosomy mitotyczne w komórkach roślin haploidalnych i podwojonych haploidów: (a) komórka haploidalna – widoczne 24 chromosomy, (b) komórka o podwojonej liczbie chromosomów – widocznych 48 chromosomów.

Metoda uzyskania podwojonych haploidów drogą kolchicynowania nie przyniosła w naszych warunkach oczekiwanych rezultatów. Powodem tego była najprawdopodobniej silna selekcja pod względem obecności transgenu oraz odporności na PVY. Można wnosić, że podwojone haploidy nie zostały uwzględnione w dalszych badaniach z powodu braku transgenu, a przede wszystkim wskutek podatności na PVY. Celem pracy było bowiem uzyskanie podwojonych haploidów odpornych roślin transgenicznych. Otrzymywanie roślin DH przy użyciu kolchicyny daje na ogół dobre efekty. Burk i in. (14) stosując tę metodę uzyskali podwojone haploidy tytoniu (do podwojenia liczby chromosomów doszło w 31,71% roślin haploidalnych traktowanych kolchicyną) przy zastosowaniu podobnych warunków (0,4% roztwór kolchicyny przez 3-4 h).

3.2. Uzyskiwanie podwojonych haploidów metodą regeneracji fragmentów łodyg

Do badań nad uzyskaniem transgenicznych roślin DH przeznaczono rośliny haploidalne zawierające transgen oraz charakteryzujące się wysoką odpornością na PVY. Fragmenty łodyg tych roślin wyłożono na pożywkę regeneracyjną. Po ok. dwudziestu dniach obserwowano regenerację roślin z większości wyłożonych skrawków.

W badaniach cytologicznych ukorzenionych regenerantów stwierdzono obecność zarówno roślin haploidalnych – zawierających 24 chromosomy jak też podwojonych haploidów – mających 48 chromosomów w komórkach somatycznych. Liczebność roślin haploidalnych była wyższa, jednakże tą metodą uzyskano 66 roślin DH, co stanowiło 34% wszystkich zregenerowanych roślin (tab. 3).

Tabela 3

Diploidyzacja roślin metodą regeneracji w kulturze *in vitro*

Genotyp	Liczba zregenerowanych roślin		
	haploidy	podwojone haploidy	razem
MN944 T ₁ × Wiślica	96	40	136
BY103 T ₁ × BY103	32	26	58

Na podstawie doniesień literaturowych wiadomo, że możliwe jest otrzymanie tą metodą większej liczby podwojonych haploidów (45,7% zregenerowanych roślin) przy zastosowaniu nieco odmiennych warunków. Fragmenty łodyg w kulturach *in vitro* przechowywano przez 28 dni w ciemności, a następnie przepasażowano na pożywkę wzbogaconą o 6-benzylaminopurynę (BAP) i 4-krotnie większą zawartość kinetyny (15).

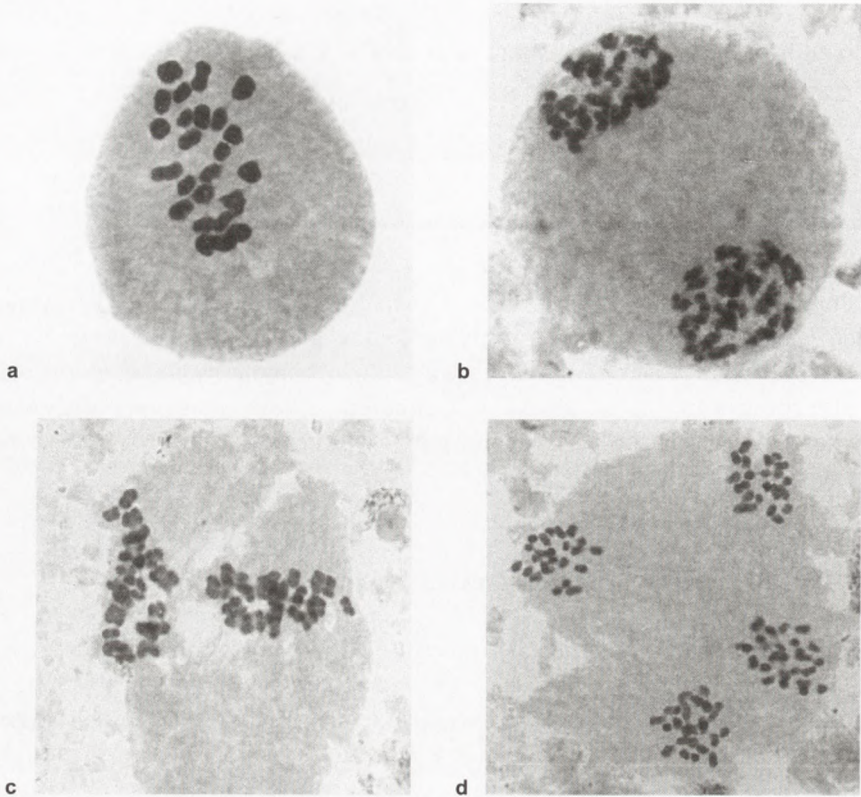
3.3. Przebieg mejozy i płodność pyłku roślin DH

Analizy mejotyczne obejmowały obserwacje koniugacji chromosomów w diakinizie, metafazie I i II oraz w późniejszych stadiach (rys. 4). W przeprowadzonej analizie konfiguracji mejotycznych w komórkach macierzystych pyłku dwunastu wybranych roślin podwojonych haploidów nie wykazano w większości z nich żadnych nieprawidłowości w przebiegu tego procesu. Obserwowano prawidłową liczbę – 24 bivalenty, co świadczyło o wysokiej homologii chromosomów. Nie stwierdzono obecności univalentów. W metafazie I komórek macierzystych pyłku chromosomy tworzyły regularną płytkę metafazową.

W nielicznych komórkach macierzystych pyłku dwóch roślin DH pochodzących z mieszańców BY103 T₁ × BY103 zaobserwowano zakłócenia w późniejszych stadiach mejozy: chromosomy opóźnione w anafazie I oraz opóźnianie się chromosomów w telofazie I, które nie zostały włączone do jąder potomnych tworząc mikrojądra.

Nieprawidłowości w przebiegu mejozy obserwowano też w nielicznych roślinach tytoniu innych odmian. Zakłócenia dotyczyły głównie anafazy, gdzie obserwowano pojedyncze opóźnione chromosomy oraz pojedyncze mostki chromatydowe, a także obecność mikrojąder w stadium tetrad. Występowanie takich konfiguracji zostało opisane jako przypuszczalny wynik amplifikacji identycznych lub bardzo podobnych sekwencji DNA, która zachodzić może w trakcie trwania androgenyzy lub przed nią. Zmiany takie ujawniają się w wyraźniejszy sposób w potomstwie mieszańców DH x odmiana rodzicielska (16,17).

Prawidłowy przebieg mejozy zanotowany w większości roślin DH potwierdzony został w wynikach badania żywotności pyłku, jakie przeprowadzono u 27 roślin DH (20 pochodzących z krzyżówki MN944 T₁ × Wiślica oraz 7 z krzyżówki BY103 T₁ × BY103),



Rys. 4. Konfiguracje mejotyczne w komórkach macierzystych pyłku podwojonych haploidów: (a) me-
tafaza I, (b) telofaza I, (c) metafaza II, (d) tetrada.

(tab. 4). W przypadku podwojonych haploidów MN944 $T_1 \times$ Wiślica żywotność pyłku poszczególnych roślin była podobna, o czym świadczy niska wartość współczynnika zmienności (cv) i wahała się w przedziale 82-95,6%. Natomiast w przypadku podwojonych haploidów BY103 $T_1 \times$ BY103 dwie rośliny, w których obserwowano nieprawidłowości w konfiguracjach mejotycznych wykazały jednocześnie mniejszą żywotność pyłku (45,9 i 43,2%), podczas gdy żywotność pyłku pozostałych roślin oceniono na 62,3-89,7%.

Tabela 4

Żywotność pyłku podwojonych haploidów

Genotyp	Średnia żywotność pyłku (%)	cv
MN944 $T_1 \times$ Wiślica	90,7	3,86
BY103 $T_1 \times$ BY103	69,7	27,85

cv – współczynnik zmienności.

Również Hamada (15) podaje, że większość roślin DH tytoniu, jakie uzyskał, wykazywała żywotność pyłku powyżej 90%, niektóre poniżej 80%, a tylko nieliczne traktowane uprzednio w formie haploidalnej czynnikiem mutagennym – 17,7%. U tych ostatnich zanotowano niewłaściwy przebieg mejozy (24 bivalenty, spóźnione chromosomy, tetrazy z pustomi mikrosporami).

4. Podsumowanie

Prawidłowy przebieg mejozy oraz wysoka żywotność pyłku większości transgenicznych roślin DH świadczy o tym, że obecność obcego genu, jak również haploidyżacja roślin, a później podwojenie liczby chromosomów nie powodują zakłóceń w procesie powstawania i dojrzewania mikrospor. Daje to możliwość uzyskania kolejnych pokoleń podwojonych haploidów, które pozwolą na ocenę sposobu dziedziczenia genu LMV CP, a także wyprowadzenie linii wysoce odpornych na PVY.

Zestawienie wyników dwóch metod uzyskiwania linii DH: chemicznej przy użyciu kolchicyny oraz regeneracji z fragmentów łodygi, wskazuje jednoznacznie na wyższą wydajność tej drugiej. Ma to szczególne znaczenie w przypadku uzyskiwania podwojonych haploidów mających spełniać dodatkowe kryteria, jak obecność transgeny i odporność na choroby. Skuteczność metody regeneracyjnej wynikała zapewne z faktu, że do podwojenia liczby chromosomów przeznaczono rośliny o pożądanym cechach, tj. zawierających transgen i jednocześnie odpornych na PVY.

Literatura

1. Chrzanowska M., Doroszewska T., (1997), *Phytopathol. Pol.*, 13, 63-71.
2. Chrzanowska M., Doroszewska T., Zagórska H., (2002), *Acta Agrobotanica*, 55, 59-67.
3. Dinant S., Maisonneuve B., Albouy J., Chupeau Y., Chupeau M.Ch., Bellec Y., Gaudefroy F., Kusiak Ch., Souche S., Robaglia Ch., Lot H., (1997), *Mol. Breed.*, 3, 75-86.
4. Cegielska-Taras T., Szała L., Bartkowiak-Broda I., (2001), *Biotechnologia*, 1, 81-86.
5. Wędzony M., (2001), *Biotechnologia*, 1, 51-62.
6. Laskowska D., (1999), *Studia nad uzyskaniem mieszańca N. tabacum L. var TB566 z N. alata Linket Otto i możliwościami jego wykorzystania w hodowli odmian odpornych na TSWV*, praca doktorska, IUNG, Puławy, 11.
7. Nitsch C., Nitsch J. P., (1969), *Science*, 163, 85-87.
8. Linsmayer E. M., Skoog F., (1965), *Physiol. Plantarum*, 18, 100-127.
9. Lloyd R., (1975), *Tob. Sci.*, 19, 4-6.
10. Burns J. A., (1964), *Tob. Sci.*, 8, 1-2.
11. Chachulska A. M., (1998), *Potato virus phylogeny and engineered virus resistance*, praca doktorska, IBB PAN, Warszawa, 38.
12. Doroszewska T., Chrzanowska M., (2001), *Inf. Bul. Joint Meeting of CORESTA Agronomy & Phytopathology Study Groups*. Cape Town. RPA, 60.
13. Roux N. S., Dolezel J., Zapata-Arias F. J., (1998), *Plant Biotech. and In Vitro Biol. In the 21st Cent.*, 255-258.
14. Burk L. G., Gwynn G. R., Chaplin J. F., (1972), *The J. of Heredity*, 63, 355-360.
15. Hamada K., Inoue M., Tanaka A., Watanabe H., (2001), *Plant Biotech.*, 18, 251-257.
16. Reed S. M., Burns J. A., (1989), *Amer. J. Bot.*, 76, 958-965.
17. Reed S. M., Wernsman E. A., Burns J. A., (1991), *Crop Sci.*, 31, 97-101.