



Wpływ stężenia 2,4-D i stresu osmotycznego na androgenezę w kulturze pylników jęczmienia

Hanna Kruczkowska, Helena Pawłowska, Barbara Skucińska
Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Akademia Rolnicza, Kraków

The effect of 2,4-D concentration and osmotic stress on the androgenic response in anther culture of barley

Summary

Induction of androgenesis in *in vitro* microspore culture of barley is the most efficient method of haploidisation, but it is difficult to use in the conditions of a plant breeding station. For this reason, the method has been improved side by side with the technique of anther culture. In anther culture of 3 barley cultivars, pretreatment with 0.7 mol dm^{-3} mannitol and the addition of 0.2 mg dm^{-3} 2,4-D to the induction medium have been shown to exert a favourable effect. In cv. Mobek, the interaction of the two tested stress agents, mannitol and auxin, has been proved.

Key words:

anther culture, barley, 2,4-D, haploidisation, mannitol.

1. Wstęp

Zaprogramowana droga rozwoju komórki, zarówno roślinnej, jak i zwierzęcej, może ulec zmianie pod wpływem stresu (Zimmerman, Cohill, 1991, cyt. za 1). Czynniki stresowe działające *in vitro* na niedojrzały pyłek roślin mogą skierować go z gametofitycznej na sporofityczną drogę rozwoju, doprowadzając do powstania roślin haploidalnych w znacznie większej liczebności niż to zdarza się w naturze wskutek nieprawidłowości w procesie mejozy lub zapłodnienia. Przydatność haploidów do szybkiej homozygotyzacji materiałów hodowlanych oraz w transgenecie,

Adres do korespondencji

Hanna Kruczkowska,
Katedra Hodowli Roślin
i Nasiennictwa,
Akademia Rolnicza,
ul. Łobzowska 24,
31-140 Kraków.

selekcji i indukowaniu mutacji *in vitro* przyczyniła się do opracowania różnych sposobów uzyskiwania haploidów u wielu gatunków roślin. Za metodę najbardziej skuteczną uważa się indukcję androgenyzy w kulturze pylników lub mikrospor *in vitro*.

W celu uzyskania haploidów u zbóż stres stosuje się głównie w czasie traktowania wstępnego kłosów lub pylników, najczęściej jest to stres temperatury lub stres osmotyczny. U jęczmienia kłosa przechowuje się w temperaturze 4°C przez kilka tygodni (2), albo zanurza się kłosa lub pylniki w roztworze 0,3 mol dm⁻³ mannitolu (alkoholu polihydroksylowego) przez 4 dni przy temperaturze 25°C (3). Działanie mannitolu zwiększa ciśnienie osmotyczne roztworu proporcjonalnie do stężenia. Różni autorzy proponują nieco odmienne warianty stosowania tych stresów. Przy chłodzeniu zaleca się różny czas poddawania kłosów niskiej temperaturze w zakresie od 1 do 42 dni (2,4-7), najczęściej jednak jest to 28 dni. Proponowano również różne stężenia mannitolu, od 0,175 mol dm⁻³ (8) nawet do 1,5 mol dm⁻³ dla odmian opornych (9), najczęściej używany jest roztwór 0,3 mol dm⁻³. Mannitol stosuje się w roztworze wodnym albo zestalony agarozą (10) lub w pożywce z makroskładnikami (8,11). Dla indukcji androgenyzy, szczególnie w kulturze mikrospor, można użyć równocześnie dwóch, a nawet trzech czynników stresowych: w kulturze mikrospor jęczmienia Kasha i in. (12) zalecili traktowanie kłosów 0,3 mol dm⁻³ mannitolem w temperaturze 4°C przez 3-5 dni, Liu i in. (13) zaproponowali u pszenicy równoczesne zastosowanie stresu temperatury (33°C), stresu osmotycznego (0,3 mol dm⁻³ mannitol) i stresu chemicznego za pomocą kwasu 2-hydroksynikotynowego (2-HNA).

Działanie stresu sprowadza się nie tylko do traktowania wstępnego materiału roślinnego przed wyłożeniem pylników lub mikrospor na pożywkę, lecz również skład pożywki indukującej może być stresujący wskutek małej ilości lub ograniczonej dostępności niektórych składników (stres głodzenia), dotyczy to głównie azotu i cukru: w często stosowanej pożywce FHG (wg Huntera 1988, cyt. za 14) ilość azotanu amonu zmniejszono dziesięciokrotnie w porównaniu z uniwersalną pożywką MS (15), a sacharozę zastąpiono wolniej rozkładającą się maltozą. Rodzaj i stężenie regulatorów roślinnych, szczególnie kwasu 2,4-dichlorofenoksyoctowego (2,4-D), również może być stresujące (16). Dodatkowym stresem może być też oddzielenie eksplantatu od rośliny macierzystej (17).

Ostateczny efekt androgenyzy mierzony wydajnością zielonych roślin haploidalnych lub podwojonych haploidów (roślin DH) jest skutkiem działania i współdziałania różnych czynników. W kulturze pylników szczególny wpływ ma genotyp i jego współdziałanie z innymi czynnikami kultury. W kulturach pylnikowych polskich odmian jęczmienia przeciętna wydajność androgenyzy wynosiła kilka zielonych roślin ze stu pylników wyłożonych na pożywkę indukującą (Kruczkowska i in. w druku).

Celem pracy było zbadanie, czy zwiększenie stresu osmotycznego i stężenia 2,4-D w pożywce indukującej może przyczynić się do zwiększenia wydajności androgenyzy oraz czy badane czynniki ze sobą współdziałają.

2. Materiał i metody

Badania prowadzono na jęczmieniu ozimym odmiany Igri, charakteryzującej się wysoką zdolnością do androgenyzy oraz na dwóch odmianach jarych, Mobek i Rastik, o znacznie mniejszej skłonności do androgenyzy. Rośliny mateczne odmiany Igri rosły w warunkach kontrolowanych (temperatura 17°C, fotoperiod 16/8 h, promieniowanie [PAR] 280 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), rośliny mateczne pozostałych odmian pochodziły z pola. Do doświadczenia przeznaczono kłosa, których pylniki zawierały mikrospery w stadium średnio- lub późnojednojądrowym i nie mniej niż 75% mikrospor było żywotnych. Po sterylizacji kłosów w 70% alkoholu, w warunkach sterylnych wydobywano pylniki i przenoszono je, w równej ilości z każdego kłosa, doroztworu 0,3 i 0,7 mol dm^{-3} mannitolu i umieszczano w termostacie w temperaturze 25°C. Po czterech dniach pylniki wykładano na pożywkę indukującą FHG według Huntera 1988 (cyt. za 14) z dodatkiem 1 mg dm^{-3} benzyloaminopuryny (BA) oraz 0,2 mg dm^{-3} lub 2 mg dm^{-3} 2,4-D. Pożywka z wyższą zawartością 2,4-D miała dwie wersje: pylniki pozostawały na tej pożywce przez cały czas indukcji lub przenoszono je po dwóch tygodniach na pożywkę z 0,2 mg dm^{-3} 2,4-D. Doświadczenie niało 9-12 powtórzeń po 120 pylników, w każdym powtórzeniu brały udział pylniki z 3 kłosów równomiernie rozłożone w poszczególnych kombinacjach. Dla każdej odmiany badano zatem 180-240 pylników w każdej kombinacji. Indukcję prowadzono w ciemności, w temperaturze 25°C przez 6 tygodni. Struktury zarodkowe (zarodki i kalusy o zbitej strukturze, o wielkości co najmniej 1,5 mm) zbierano po 4 i 6 tygodniach kultury i przenoszono na pożywkę regenerującą FHG, w której wycofano 2,4-D, obniżono stężenie BA do 0,4 mg dm^{-3} i zawartość maltozy o połowę w porównaniu z pożywką indukującą. Rośliny wyrastały w temperaturze 22-28°C, przy fotoperiodzie 16/8 h i promieniowaniu (PAR) 100-120 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Po 5 tygodniach liczono rośliny zielone i albinotyczne. Wykonano analizy zmienności wyników oddzielnie dla każdej odmiany, ze względu na bardzo dużą różnicę w reakcji na indukcję Igri i pozostałych odmian, a uzyskane wartości średnie przetestowano za pomocą testu Duncana przy $P = 0,05$.

3. Wyniki

Wyniki przedstawiające wpływ stresu osmotycznego i zawartości 2,4-D w pożywce na skuteczność indukcji androgenyzy zestawiono w tabelach 1-3. Średnia liczba zielonych roślin uzyskanych ze 100 pylników w najlepszej kombinacji dla każdej odmiany była następująca: Igri – 350,2; Mobek – 16,7; Rastik – 8,0. Odmiany różniły się także skłonnością do regeneracji roślin albinotycznych, najmniej albinosów powstawało u odmiany Igri (kilka procent), więcej u pozostałych odmian (powyżej 50%).

Tabela 1

Wpływ stężenia mannitolu i 2,4-D na indukcję androgenazy w kulturze pylników odmiany Igri

	Stężenie mannitolu [mol dm ⁻³]	2,4-D w pożywce (mg dm ⁻³)			Średnia
		0,2	2,0	2,0 → 0,2	
struktury zarodkowe	0,3	676,1	410,1	546,1	544,1 a
	0,7	618,9	443,6	441,7	501,4 a
	średnia	647,5 b	426,8 a	493,9 a	
rośliny ogółem	0,3	236,3	190,4	238,8	221,8 a
	0,7	373,8	317,5	280,5	323,9 b
	średnia	305,0 a	253,9 a	259,6 a	
rośliny zielone	0,3	220,8	175,8	226,3	207,6 a
	0,7	350,2	297,1	267,8	305,1 b
	średnia	285,5 a	236,4 a	247,1 a	
rośliny albinotyczne	0,3	15,5	14,6	12,5	14,2 a
	0,7	23,6	20,4	12,7	18,9 a
	średnia	19,6 a	17,5 a	12,6 a	

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $P = 0,05$

Stężenie mannitolu użytego do wstępnego traktowania pylników nie miało istotnego wpływu na średnią liczbę utworzonych struktur zarodkowych, lecz istotnie różnicowało wydajność androgenazy mierzoną liczbą uzyskanych zielonych roślin. Stężenie 0,7 mol dm⁻³ w porównaniu z niższym stężeniem zwiększyło liczbę roślin zielonych od 1,5 do 2,5-krotnie, szczególnie u Rastika, odmiany o najsłabszej zdolności regeneracyjnej.

Tabela 2

Wpływ stężenia mannitolu i 2,4-D na indukcję androgenazy w kulturze pylników odmiany Rastik

	Stężenie mannitolu (mol dm ⁻³)	2,4-D w pożywce (mg dm ⁻³)			Średnia
		0,2	2,0	2,0 → 0,2	
struktury zarodkowe	0,3	65,2	115,8	91,6	90,9 a
	0,7	119,2	114,2	122,5	118,7 a
	średnia	92,2 a	115,0 a	107,1 a	
rośliny ogółem	0,3	10,4	22,5	20,5	17,8 a
	0,7	12,9	25,1	18,0	18,7 a
	średnia	11,7 a	23,8 b	19,2 ab	
rośliny zielone	0,3	3,3	2,5	1,7	2,5 a
	0,7	3,7	8,0	6,7	6,1 b
	średnia	3,5 a	5,2 a	4,2 a	
rośliny albinotyczne	0,3	7,1	20,0	18,8	15,3 a
	0,7	9,2	17,1	11,3	12,5 a
	średnia	8,1 a	18,6 b	15,1 a	

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $P = 0,05$

Korzystny wpływ stężenia 0,2 mg dm⁻³ 2,4-D na liczbę utworzonych struktur zarodkowych uwidocznił się u odmian Igri i Mobek. U Igri i Rastika obydwie kombinacje, w których zastosowano wyższe stężenie 2,4-D nie różniły się istotnie bez względu na czas działania tego stężenia. Mobek reagował bardzo niekorzystnie na ciągle wyższe stężenie 2,4-D, natomiast krótkotrwałe stosowanie 2 mg dm⁻³ tej auksyny w połączeniu ze słabszym stresem osmotycznym wpłynęło istotnie na wzrost wszystkich parametrów kultury.

Tabela 3

Wpływ stężenia mannitolu i 2,4-D na indukcję androgenezę w kulturze pylników odmiany Mobek

	Stężenie mannitolu (mol dm ⁻³)	2,4-D w pożywce (mg dm ⁻³)			Średnie
		0,2	2,0	2,0 → 0,2	
struktury zarodkowe	0,3	51,9	6,9	65,1	41,3 a
	0,7	68,8	4,1	27,0	33,2 a
	średnia	60,3 b	5,5 a	46,1 b	
rośliny ogółem	0,3	17,0 ab	3,1 a	31,9 bc	17,4
	0,7	35,4 c	1,8 a	9,1 a	15,4
	średnia	26,2	2,5	20,5	
rośliny zielone	0,3	2,8 a	0,0 a	9,3 ab	4,0
	0,7	16,7 b	0,0 a	2,2 a	6,3
	średnia	9,7	0,0	5,7	
rośliny albinotyczne	0,3	14,3 abc	3,1 a	22,6 c	13,3
	0,7	18,6 bc	1,8 a	6,9 ab	9,1
	średnia	16,5	2,5	14,8	

Średnie oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie przy $P = 0,05$

Reakcja odmian na badane czynniki kultury była zróżnicowana. Zdolność do regeneracji zielonych roślin u Igri i Rastika zależała głównie od stężenia mannitolu, natomiast te odmiany nie wykazywały istotnych różnic pod wpływem zastosowanych stężeń auksyny. Mobek okazał dużą wrażliwość na wyższe stężenie auksyny, wyrażającą się znacznym spadkiem zdolności do embriogenezy i w konsekwencji brakiem regeneracji zielonych roślin. U tej odmiany obserwowano istotnie pozytywną reakcję na początkowo wysokie, a następnie obniżone stężenie auksyny we współdziałaniu ze słabszym stresem osmotycznym. Podobną tendencję zauważono u Igri.

4. Dyskusja

U zbóż największą wydajność haploidów osiąga się w kulturze mikrospor. Kisha, który wraz ze swoim zespołem przez szereg lat doskonalił tę technikę u jęczmienia, przyznał jednak, że jej ujemną cechą są trudności z wdrożeniem wynikające z potrzeby zapewnienia ściśle kontrolowanych warunków wzrostu roślinom matecznym

oraz odpowiedniego wyposażenia, reżimu sterylności i precyzji w pracach laboratoryjnych (12). Z tych powodów równolegle doskonalili się technikę kultury pylników, w której można wykorzystać rośliny rosnące w polu i przeciętnie wyposażone laboratoria *in vitro* (Kruczkowska i in. w druku).

Traktowanie wstępne mannitolem sprzyja regeneracji zielonych roślin (10,12,18). Cistué i in. (10) i Castillo i in. (9), badając różne stężenia mannitolu (0,3-1,5 mol dm⁻³), wykazali zależność między wzrastającym stężeniem a liczbą uzyskanych zielonych roślin; odmiany odporne na indukcję reagowały pozytywnie na silniejszy stres. W naszych wcześniejszych badaniach, prowadzonych na 5 odmianach, za optymalne uznano stężenie 0,7 mol dm⁻³ (19). W tej pracy u wszystkich badanych odmian zwiększenie stężenia mannitolu z 0,3 do 0,7 mol dm⁻³ okazało się korzystne, szczególnie u Rastika, odmiany o najmniejszej zdolności do regeneracji zielonych roślin.

U zbóż najczęściej używaną auksyną do indukcji somatycznej embriogenezy na kalusujących fragmentach roślin jest 2,4-D. Biorąc pod uwagę podobieństwo pomiędzy somatyczną embriogenezą i androgenezą indukowaną *in vitro*, przydatność tej auksyny jest, jak się wydaje, oczywista. Niektórzy autorzy stosują jednak inne auksyny, szczególnie dotyczy to kultur mikrospor (12,11), mimo że – jak podaje Kasha – 2,4-D charakteryzuje się stabilnym stężeniem w porównaniu z kwasem fenylaoctowym (PAA), którego zastosowanie wymaga eksperymentalnego ustalenia stężenia zależnie od genotypu (1-10 mg dm⁻³). Zakres stężenia 2,4-D stosowanego w kulturze pylników jest węższy, jednak aplikacja wybranego stężenia wymaga ostrożności ze względu na reakcję na tę silną auksynę: w przeciwieństwie do Igri i Rastika u odmiany Mobek stężenie 2 mg dm⁻³ 2,4-D okazało się szkodliwe. Zróżnicowana reakcja odmian na stężenie 2,4-D może być wynikiem endogennego poziomu auksyny oraz właściwości ściany pylnika. Na podstawie badań Hoekstra i in. (16), potwierdzonych również w naszych doświadczeniach, optymalne stałe stężenie tej auksyny w kulturze pylników jęczmienia ustalono na poziomie 0,2 mg dm⁻³. Według Hoekstra i in. (16) bez traktowania wstępnego 2,4-D działa jak czynnik stresujący, który indukuje androgenezę. Można było zatem oczekiwać współdziałania obydwu czynników stresujących, tj. mannitolu i 2,4-D. Udowodniono takie współdziałanie u odmiany Mobek, bardzo wrażliwej na wyższe stężenie auksyny: zastosowanie stężenia 2 mg dm⁻³ 2,4-D przez krótszy czas dało pozytywne rezultaty tylko przy niższym stężeniu mannitolu.

5. Podsumowanie

Indukcja androgenozy w kulturze *in vitro* mikrospor jęczmienia jest najbardziej wydajną metodą haploidyzacji, lecz trudną do zastosowania w warunkach stacji hodowlanej. Z tego powodu równolegle doskonalili się technikę kultury mikrospor i kultury pylników. W kulturze pylników 3 odmian jęczmienia o różnej zdolności do androgenozy wykazano pozytywny wpływ traktowania wstępnego 0,7 mol dm⁻³

mannitolem oraz dodatku $0,2 \text{ mg dm}^{-3}$ 2,4-D w pożywce indukującej. U odmiany Mobek udowodniono współdziałanie dwóch badanych czynników stresowych, manitolu i auksyny.

Literatura

1. Zheng M. Y., (2003), *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 73, 213-230.
2. Huang B., Sunderland N., (1982), *Ann. Bot.*, 49, 77-88.
3. Roberts-Oehlschlager S. L., Dunwell S. M., (1990), *Plant Cell, Tiss. Org. Cult.*, 20, 235-240.
4. Devaux P., Hou L., Ullrich S. E., Huang Z., Kleinhofs A., (1993), *Plant Cell Rep.*, 13, 32-36.
5. Hou L., Ullrich S. E., Kleinhofs A., Stiff C. M., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 334-338.
6. Ohnoutková L., Novotný J., Müllerová E., Vagera J., Kučera L., (2000), *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*, Ed. Bohanec B., 33-37, COST 824, Bled, Slovenia 1-5 July 2000.
7. Ritala A., Salmenkallio-Marttila M., Kurtén U., Mannonen L., Oksman-Caldentey K. M., (2000), *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*, Ed. Bohanec B., 23-27, COST 824, Bled, Slovenia 1-5 July 2000.
8. Manninen O., (1997), *Agric. Food Sci.*, Finland 6, 389-398.
9. Castillo A. M., Vallés M. P., Cistué L., (2000), *Biotechnological Approaches for Utilization of Gametic Cells*, Ed. Bohanec B., 15-21, COST 824, Bled, Slovenia 1-5 July 2000.
10. Cistué L., Ramos A., Castillo A. M., Romagosa I., (1994), *Plant Cell Rep.*, 13, 709-712.
11. Li H., Devaux P., (2003), *Plant Sci.*, 164, 379-386.
12. Kasha K. J., Simion E., Oro R., Yao Q. A., Hu T. C., Carlson A. R., (2001), *Euphytica*, 120, 379-385.
13. Liu W., Zheng M. Y., Polle E. A., Konzak C. F., (2002), *Crop. Sci.*, 42, 686-692.
14. Hu H., (1997), *In Vitro Haploid Production in Higher Plants*, vol. 4, Eds. Jain S. M., Sopory S. K., Veilleux R. E., 73-97, Kluwer Acad. Publishers, Dordrecht.
15. Murashige T., Skoog F., (1962), *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
16. Hoekstra S., Bergen van S., Brouwershaven van I. R., Schilperoort R. A., Heidekamp F., (1996), *J. Plant Physiol.*, 148, 696-700.
17. Wilson H. M., Mix G., Foroughi-Wehr B., (1978), *J. Exp. Bot.*, 29, 227-238.
18. Kruczkowska H., Pawłowska H., Skucińska B., (2002), *J. Appl. Genet.*, 43, 287-296.
19. Kruczkowska H., Pawłowska H., Skucińska B., (2002), *Zesz. Probl. Post. Nauk Roln.*, 488, 119-126.