



Izolowane mikrospory jako źródło podwojonych haploidów jęczmienia

Sylwia Oleszczuk, Janusz Zimny
Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, Radzików

Isolated microspores as a source doubled haploids of barley

Summary

In vitro techniques for doubled haploids (DH) production allow for obtaining homozygous lines in a single generation. This is connected with shorter breeding cycle of the new variety. DH lines have a potential for being used in the selection of recombinants, stabilising of transformed lines and molecular mapping. DH lines are produced from isolated microspores through haploid embryogenesis. Microspore culture has several advantages over anther culture: it reduces the time of cultures, enables monitoring of the earliest phase of embryogenesis, allows direct development of embryos, facilitates the *in vitro* selection and mutation, allows for avoiding regeneration from somatic anther tissues. Moreover, microspore culture appears to be a promising tool in genetic manipulations (transformation, mutagenesis) and it can be used as a source of proplasts and suspensions.

Here we report on how to induce microspore embryogenesis, resulting in plant formation. The switch of microspore development from gametophytic to sporophytic pathway has been stimulated by various stress factors like cold and heat shock, starvation. Stress treatment not only stops pollen development but also re-programmes the microspore towards embryo formation. The effects of various parameters including pretreatment, carbohydrates and nurse culture have been investigated. After optimising the culture conditions we were able to regenerate high number of fertile plants.

Key words:

microspore, doubled haploids, haploid embryogenesis.

Adres do korespondencji

Sylwia Oleszczuk,
ZBiCR, Instytut Hodowli
i Aklimatyzacji Roślin,
Radzików,
05-870 Błonie.

1. Wstęp

Techniki *in vitro* otrzymywania podwojonych haploidów (DH) pozwalają na uzyskanie w ciągu jednego pokolenia linii homozygotycznych, z czym związane jest skrócenie cyklu hodowlanego

nowych odmian. DH umożliwiają zwiększenie efektywności selekcji pożądanych rekombinantów, utrwalenie linii transformantów oraz konstruowanie map genetycznych. Jednym ze sposobów pozwalających na otrzymanie DH jest haploidalna embriogeneza wykorzystująca kultury izolowanych mikrospor. Kultury takie mają wiele zalet. Krótki czas prowadzenia, możliwość śledzenia wczesnych stadiów embriogenezy, bezpośredni rozwój zarodków, łatwe stosowanie czynników selekcyjnych i mutagennych oraz możliwość uniknięcia regeneracji z somatycznej tkanki pylnika stanowią o ich wyższości nad kulturami pylników. Poza tym umożliwiają prowadzenie badań podstawowych, manipulacji genetycznych (transformacja, mutageneza) oraz mogą być źródłem zawiesin i protoplastów.

W przedstawionej pracy optymalizacja warunków kultury izolowanych mikrospor zmierzała do uzyskania jak największej liczby płodnych regenerantów. Określono wpływ wstępnego traktowania (kłosów, pylników), cukrów i kultury niańki na wzrost efektywności haploidalnej embriogenezy.

2. Materiały i metody

W doświadczeniach wykorzystano odmianę Scarlett jęczmienia browarnego. Źródłem eksplantatu były chłodzone (4°C) przez 1-4 tygodni kłosy oraz pylniki wypreparowane z kłosów i poddane wstępnej kulturze, polegającej na umieszczeniu ich w roztworze 0,3 M mannitolu w temperaturze 26, 32 i 4°C. Izolację mikrospor z kłosów przeprowadzono w blenderze, a do uwolnienia mikrospor z izolowanych pylników użyto mieszadła magnetycznego. Żywe mikrospory w odpowiednim zagęszczeniu ($1-5 \times 10^4$ mikrospor/ml) umieszczano w płynnej pożywce w ciemności na 2-4 tygodnie. Powstające zarodki przenoszono na pożywkę regeneracyjną. Zregenerowane roślinki umieszczano w doniczkach z glebą. Regeneranty wyprowadzone z mikrospor poddano badaniom cytologicznym polegającym na określeniu liczby chromosomów w komórkach merystematycznych stożków wzrostu korzeni. Analizy te prowadzono w połączeniu z obserwacjami płodności u zregenerowanych roślin. W przeprowadzonych eksperymentach przetestowano wpływ rodzaju cukru (maltoza i sacharoza) oraz kultury niańki (pochodzącej z odmiany Igri) w postaci: załączni, pylników oraz mieszaniny mikrospor i wielokomórkowych agregatów na wzrost i rozwój izolowanych mikrospor.

3. Wyniki i dyskusja

Zmianę rozwoju mikrospor z drogi gametofitowej na sporofitową stymulowano stosując różnego rodzaju czynniki stresowe, którym poddawano, przed właściwą kulturą *in vitro*, ścięte kłosy lub wyizolowane pylniki. Pod wpływem stresu uruchomiony został mechanizm indukujący rozwój zarodków, co jednocześnie uniemożliwia po-

wstanie dojrzałych ziaren pyłku. Wstępne traktowanie kłosów niską temperaturą wpłynęło pozytywnie na tworzenie się agregatów komórkowych i liczbę uzyskanych zarodków. Czas działania niskiej temperatury miał wpływ na żywotność mikrospor. Długotrwałe chłodzenie kłosów powodowało spadek żywotności oraz sprzyjało powstawaniu roślin albinotycznych. Niska temperatura, jako podstawowy czynnik indukujący embriogenezę była stosowana też przez innych autorów (1-3). Kolejnym stresem wpływającym na rozwój mikrospor w kierunku sporofitu okazało się tzw. „głodzenie”, czyli kultura pylników na pożywkach ubogich w cukry i azot (4-6). Podczas procesu ewolucji „głodzenie”, powodowane niedoborem składników odżywczych, wpływało na proces różnicowania się komórek oraz zmianę faz rozwojowych różnych organizmów. Zatem samo „głodzenie” może mieć wpływ na indukcję embriogenezy w kulturze mikrospor, gdzie ma miejsce zmiana drogi rozwojowej z gametofitowej na sporofitową, co zaobserwowano w tych badaniach. Zastosowanie niskiej i wysokiej temperatury w połączeniu z „głodzeniem” pylników pozwoliło również na przeprogramowanie procesów zachodzących w mikrosporach w kierunku embriogenezy. W temperaturze 32°C tworzyło się najwięcej zarodków. W literaturze spotykane są przykłady bezpośredniego łączenia stresu „głodzenia” ze stresem niskiej (7,8) lub wysokiej temperatury (9). Wpływ wysokiej temperatury wiązany jest z rolą białek szoku cieplnego (HSP) (10). Być może oba te stropy, chociaż w różny sposób, prowadzą do uruchomienia genów indukujących syntezę białek szoku cieplnego, których zmiana poziomu w organizmach może być regulowana rozwojowo oraz pod wpływem stresów. Jeżeli w rzeczywistości obecność specyficznych białek HSP jest wymagana podczas embriogenezy, może to wyjaśniać dlaczego stres konieczny jest do indukcji tego procesu.

Jednym z czynników, od którego zależała wydajność kultury izolowanych mikrospor, był rodzaj użytego cukru. Przez dobór odpowiedniego rodzaju i stężenia cukru można zwiększyć częstość podziałów mikrospor prowadzących do powstania minikalusów, z których regenerowano zarodki i rośliny. Procent mikrospor dzielących się był najwyższy przy zastosowaniu maltozy jako źródła węgla i regulatora ciśnienia osmotycznego. Ponadto maltoza w stężeniu 90 i 117g/l wpłynęła pozytywnie na wzrost liczby zielonych roślin. W literaturze wyniki badań nad rodzajem stosowanych cukrów są sprzeczne. Chociaż wielu autorów wykazało pozytywny efekt działania sacharozy na kulturę mikrospor (11,12), to istnieje wiele danych potwierdzających wyniki uzyskane w tej pracy, podkreślających istotną rolę maltozy dla rozwoju zarodków i zielonych roślin (2,13). Indrianto i in. (7) sugerują, że mikrospory na pożywce z maltozą podlegają podczas pierwszych dni kultury stresowi „głodzenia” indukującego embriogenezę, wywołanego niedoborem łatwo dostępnego źródła węgla. Sytuacja ta może być związana również z powolną hydrolizą maltozy przez komórki roślinne w porównaniu do szybko hydrolizującej sacharozy (14). Rolę maltozy także można łączyć z utrzymaniem podczas całej kultury właściwego osmotikum, co tłumaczono jej powolnym rozkładem do glukozy. Poza tym można przypuszczać, że rola maltozy może być związana z indukcją genów odgrywających ważną rolę w zmianie drogi rozwojowej z gametofitowej na sporofitową.

Spośród 3 rodzajów kultury „niańki” największą efektywność haploidalnej embriogenezy uzyskano stosując mieszaninę mikrospor i wielokomórkowych agregatów uzyskanych z odmiany Igri. Chociaż załącznie również wpływały na wzrost wydajności embriogenezy to na podstawie tych badań wykazano, że nie są one konieczne do zainicjowania podziałów. Rezultaty te są sprzeczne z doniesieniami Brunsina i in. (15), w których wykazano, że wspólna kultura z załącznikami podnosiła procent żywotnych mikrospor oraz z wnioskami Mejzy i in. (12), według których, załącznie inicjują embriogenezę mikrospor. W badaniach tych obecność załączni pozwalała natomiast na utrzymanie embriogenezy na wysokim poziomie. Przypuszcza się, że pozytywna rola załączni (3,12) może być związana z uwalnianiem przez nie substancji typu hormonalnego korzystnie wpływających na podziały mikrospor (16). Chociaż mechanizm działania załączni nie jest poznany to w badaniach Puolimatki i in. (3) oraz Puolimatki i Pauka (17) dowiedziono, że jest on raczej związany z utrzymaniem embriogenego rozwoju niż z zainicjowaniem pierwszych podziałów komórkowych mikrospor. W przeprowadzonych przez nas eksperymentach potwierdzamy spostrzeżenia tych naukowców.

Największą grupę regenerantów wyprowadzonych z mikrospor tworzyły rośliny całkowicie płodne – około 80% wszystkich uzyskanych regenerantów. Na podstawie badań cytologicznych stwierdzono, że blisko 100% płodnych roślin stanowiły formy ze spontanicznie podwojoną liczbą chromosomów ($2n = 14$).

Literatura

1. Mordhorst A. P., Lörz H., (1993), *J. Plant Physiol.*, 142, 485-492.
2. Scott P., Lyne R. L., (1994), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 36, 129-133.
3. Puolimatka M., Laine S., Pauk J., (1996), *Cereal Research Comm.*, 24, 393-400.
4. Hoekstra S., van Bergen S., van Brouwershaven I. R., Schilperoort R. A., Heidekamp F., (1996), *J. Plant Physiol.*, 148 (6), 696-700.
5. Cistue L., Ziauddin A., Simion E., Kasha K. J., (1995), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 42, 163-169.
6. Roberts-Oehlschlanger S., Dunwell S. M., (1990), *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 20, 235-240.
7. Indrianto A., Heberle-Bors E., Touraev A., (1999), *Plant Sci.*, 143, 71-79.
8. Hu T., Kasha K. J., (1999), *Genome*, 42, 432-441.
9. Touraev A., Indrianto A., Wratschko I., Vicente O., Heberlebors E., (1996), *Sexual Plant Reprod.*, 9, 209-215.
10. Cordewener J. H. G., Busink R., Traas J. A., Custers J. B. M., Dons H. J. M., van Lookeren Campagne M. M., (1994), *Planta*, 195, 50-56.
11. Pescitelli S. M., Johnson C. D., Petolino J. F., (1990), *Plant Cell Rep.*, 8, 628-631.
12. Mejza S. J., Morgant V., DiBona D. E., Wong J. R., (1993), *Plant Cell Rep.*, 12, 149-153.
13. Jähne A., Lörz H., (1995), *Plant Sci.*, 109, 1-12.
14. Scott P., Lyne R. L., ap Ress T., (1995), *Planta*, 197, 435-441.
15. Bruins M. B. M., Rakoczy-Trojanowska M., Sniijders C. H. A., (1996), *Cereal Research Comm.*, 24, 401-408.
16. Köhler F., Wenzel G., (1985), *J. Plant Physiol.*, 121, 181-191.
17. Puolimatka M., Pauk J., (1999), *J Plant Physiol*, 154, 367-373.