



III KONGRES
BIOTECHNOLOGII



Ocena potencjału tworzenia kalusa przez pylniki roślin uzyskanych w wyniku krzyżowania odmiany Linola z roślinami innych odmian lnu oleistego

Karolina Wielgus¹, Grażyna Mańkowska¹, Wojciech Białas²

¹Zakład Biotechnologii i Biologii Molekularnej, Instytut Włókien Naturalnych, Poznań

²Katedra Biotechnologii i Mikrobiologii Żywności, Akademia Rolnicza, Poznań

Estimation of callus formation capability of anthers obtained as a result of crossing Linola cultivar with other linseed cultivar plants

Summary

Identification of responsive genotypes and development of an efficient and cost-effective doubled haploid production system in linseed (*Linum usitatissimum* L.) is required for application in practical breeding program. Although the technique has been improved in recent years, there is limited data on the inheritance of callogenesis and plant regeneration in linseed anther culture. The objective of this research was to estimate the influence of the 'Linola' cultivar genome and other cultivars used for crossing with 'Linola' plants in a process declining during the anther cultures in F₁ generation. 3144 anthers altogether were placed on the medium, on average 393 from each population. Hybrid lines obtained as a result of crossing 'Linola' x 'A.C. Emmerson' were not capable to form callus. The anthers from crossing of 'Linola' x 'Szafir', 'Linola' x 'Opal' and 'Linola' x 'Bionda' were characterized with higher than average capacity to form callus, while the anthers from crossing of 'Linola' x 'Norlin', 'Linola' x 'Vinny' and 'Linola' x 'Oliwin' had lower potential of forming callus.

Key words:

anthers, callus, linseed, F₁ generation.

Adres do korespondencji

Karolina Wielgus,
Zakład Biotechnologii
i Biologii Molekularnej,
Instytut Włókien
Naturalnych,
ul. Wojska Polskiego 71B,
60-630 Poznań;
e-mail:
wielgusk@inf.poznan.pl

biotechnologia

2 (81) 84–89 2008

1. Wstęp

Len jest gatunkiem diploidalnym ($2n = 30$), samopylnym (obcopylność stanowi 5-10%) (1), cenionym od wielu lat jako roślina włóknodajna. Obecnie dużym zainteresowaniem cieszą się badania nad wykorzystaniem do celów przemysłowych oleju lnianego. Olej lniany charakteryzuje się wysoką zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych, co umożliwia jego zastosowanie w produkcji kosmetyków, szybko schnących farb i lakierów, oleju oświetleniowego, tuszu drukarskiego i biopaliw (2). Dla spożywczego zastosowania oleju lnianego szczególnie istotna jest wysoka zawartość kwasu linołenowego, zwłaszcza kwasu α -linolenowego należącego do rodziny omega 3, stanowiącej niezbędny składnik prawidłowej diety człowieka (3). Uprawy oleistych odmian lnu o największym znaczeniu gospodarczym i przemysłowym znajdują się w krajach o klimacie umiarkowanym, zwłaszcza w Argentynie, Indiach, Chinach, Kanadzie, Stanach Zjednoczonych i Rosji. Obecnie na świecie produkowane są 3 miliony ton oleju lnianego rocznie (4) i trwają poszukiwania nowych odmian cennych dla przemysłu.

Wykorzystanie procesu androgenezy umożliwia otrzymanie homozygotycznych linii w postaci haploidów i podwojonych haploidów (DH), które stanowią bardzo dobry materiał do badań nad genetycznym uwarunkowaniem cech ilościowych (4,5), a wykorzystanie DH w programach hodowlanych lnu umożliwia skrócenie czasu koniecznego do otrzymania stabilnych genetycznie linii i wyprowadzenia z nich odmian o pożądanych cechach. Procedura otrzymywania roślin w kulturach pylnikowych obejmuje inicjację tworzenia się kalusa z mikrospor oraz różnicowanie korzeni i pędów (7,8). Opisano dużą zmienność tych procesów w kulturach pylnikowych różnych genotypów lnu oleistego (3,6). W procesie dziedziczenia tych cech obserwuje się zarówno addytywne jak i nieaddytywne oddziaływania genów (9). Mimo że technikę kultur pylnikowych lnu udoskonalono znacznie w ostatnich latach, informacje dotyczące dziedziczenia potencjału tworzenia kalusa i regeneracji roślin pozostają nadal znikome.

Celem pracy było określenie wpływu genomu odmiany Linola charakteryzującej się niską zawartością kwasu linołenowego i siedmiu innych odmian użytych do krzyżowania z roślinami 'Linola' na procesy zachodzące podczas prowadzenia kultur pylnikowych w pokoleniu F_1 .

2. Materiały i metody

2.1. Materiał roślinny

Badania prowadzono na roślinach odmiany Linola oraz roślinach odmian Bionda, Szafir, Opal, Oliwin, Vinny, A.C. Emerson i Norlin, o znanej możliwości tworzenia kalusa i potencjale regeneracyjnym kultur pylnikowych. Rośliny wysadzono do wa-

zonów w szklarni Zakładu Doświadczalnego IWN Pętkowo. Podczas uprawy nie stosowano środków ochrony roślin.

2.2. Kultury pylnikowe

Pylniki pobierano z pąków kwiatowych, zebranych z roślin macierzystych w początkowym okresie kwitnienia. Kultury pylnikowe prowadzono według procedury opisanej przez Rutkowską-Krause (6). Wszystkie doświadczenia wykonano w trzech powtórzeniach (131 pylników na powtórzenie).

2.3. Hodowla *ex vitro*

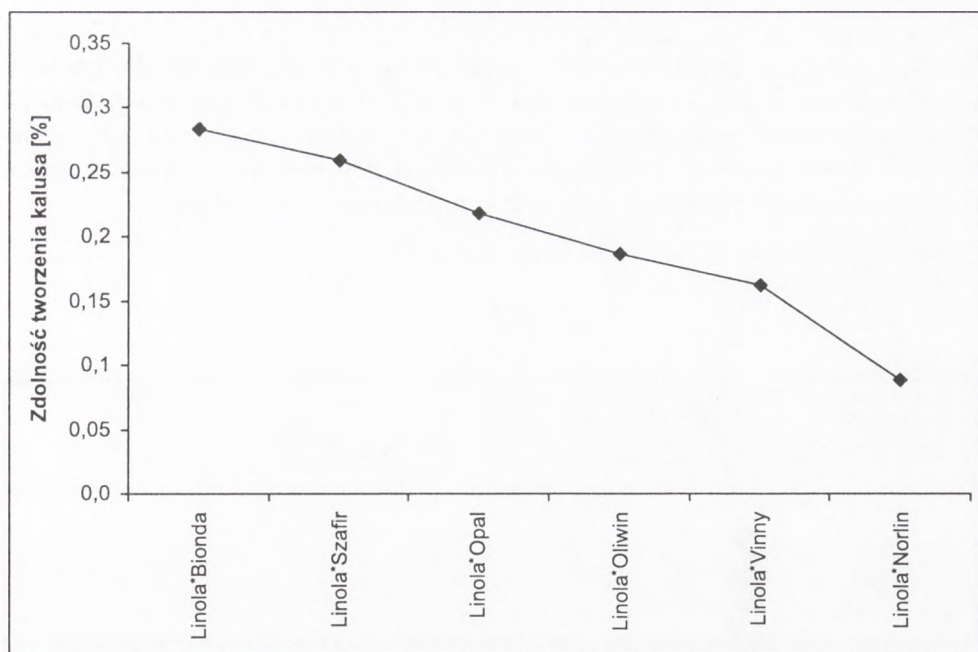
Ukorzenione rośliny poddawano aklimatyzacji i ukorzenianiu w sterylnej ziemi ogrodniczej w temperaturze 18-20°C, i fotoperiodzie 16/8 godzin. Przez początkowe dwa tygodnie rośliny przykrywano szklanym naczyniem w celu ograniczenia parowania wody.

2.4. Analiza statystyczna

Uzyskane wyniki były poddane analizie statystycznej. Zastosowano: transformację zmiennej zależnej za pomocą funkcji $\text{ArcSin}\sqrt{Y}$, analizę wariancji na poziomie istotności 0,05 oraz test Tukeya HSD.

3. Wyniki i dyskusja

Wykorzystanie haploidalnego materiału roślinnego jest coraz częściej stosowane w programach hodowlanych (4). Powszechne zastosowanie procesu androgenezy jest jednak limitowane wieloma czynnikami, m.in. czynnikami genetycznymi, wpływającymi na możliwości poszczególnych genotypów w tworzeniu kalusa i regeneracji roślin w warunkach *in vitro* (1,3,11,12). Krzyżowanie roślin odmiany Linola z roślinami siedmiu innych odmian lnu oleistego umożliwiło obserwację wpływu genomu form rodzicielskich na możliwość tworzenia kalusa otrzymanych mieszańców (F_1) w kulturach pylnikowych. Łącznie na pożywkę wyłożono 3144 pylniki, średnio 393 pylniki z każdej populacji roślin. Mieszańce uzyskane w kombinacji krzyżowania 'Linola' x 'A.C. Emerson' były pozbawione zdolności tworzenia kalusa w kulturach pylnikowych i pominięto je w analizach statystycznych (rys. 1).



Rys. 1. Wpływ genotypu form rodzicielskich na zdolność mieszańców do tworzenia kalusa. Na osi rzędnych podano wartości – po transformacji zmiennej zależnej za pomocą funkcji $\text{ArcSin}\sqrt{Y}$.

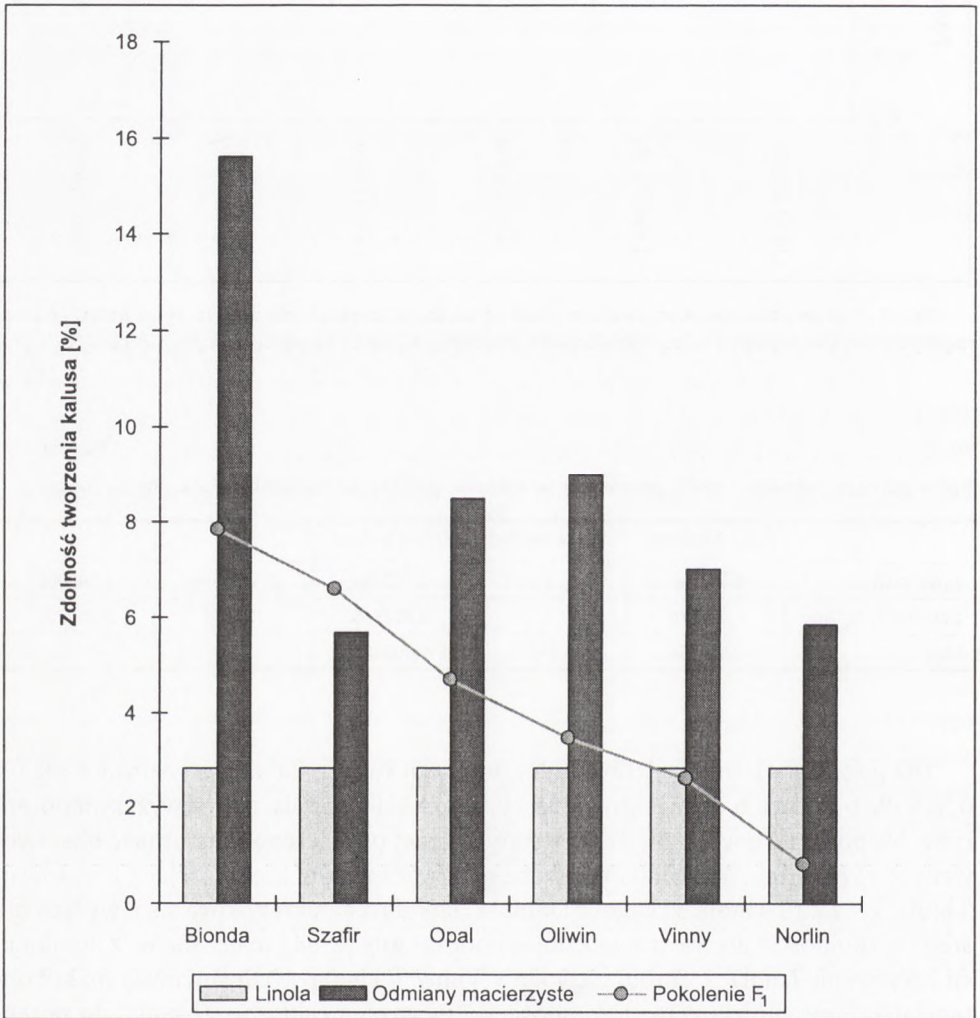
Tabela 1

Wpływ genotypu (odmiany i roślin potomnych) na zdolność pylników do tworzenia kalusa. Analiza wariancji

	Suma kwadratów	Stopnie swobody	Średni kwadrat	F	p
wyraz wolny	0,802164	1	0,802164	7711,308	0,000000
zmienna (odmiana)	0,077270	6	0,012878	123,801	0,000000
błąd	0,001456	14	0,000104		

Dla pozostałych mieszańców średni potencjał tworzenia kalusa wynosił 4,2%: od 0,57% dla populacji o najniższym potencjale do 8% dla populacji o najwyższym potencjale. Na podstawie wyników analizy statystycznej potwierdzono istotność obserwowanych różnic (tab. 1). Pylniki mieszańców uzyskanych w kombinacjach krzyżowań 'Linola' x 'Szafir', 'Linola' x 'Opal' i 'Linola' x 'Bionda' charakteryzowały się wyższą niż średnią zdolnością do tworzenia kalusa, podczas gdy pylniki mieszańców z kombinacji krzyżowań 'Linola' x 'Norlin', 'Linola' x 'Vinny' i 'Linola' x 'Oliwin' miały niższy potencjał kalusotwórczy. Wzrost zdolności do tworzenia kalusa w stosunku do potencjału pylników z odmiany Linola stwierdzono dla pylników w F_1 z następujących kombinacji krzyżowań: 'Linola' x 'Bionda', 'Linola' x 'Szafir', 'Linola' x 'Opal' i 'Linola' x

'Oliwin'. Najwyższy wzrost potencjału (o 5%) obserwowano dla mieszańców 'Linola' x 'Bionda', natomiast największy spadek potencjału (o 2%) był widoczny dla mieszańców 'Linola' x 'Norlin'. Na podstawie testu Tukeya HSD mieszańce podzielono na cztery grupy obejmujące rośliny o zbliżonej zdolności tworzenia kalusa (tab. 2). Generalnie, zdolność do tworzenia kalusa i potencjał regeneracyjny pylników uzyskanych mieszańców był średnio o 1,5% wyższy niż pylników 'Linola' (rys. 2).



Rys. 2. Porównanie zdolności do tworzenia kalusa odmian macierzystych i mieszańców uzyskanych w wyniku krzyżowania.

Tabela 2

Zdolność genotypów do tworzenia kalusa – grupy jednorodne, wyznaczone na podstawie testu Tukeya HSD

Pokolenie F ₁	Zdolność do tworzenia kalusa	Grupa 1	Grupa 2	Grupa 3	Grupa 4
Linola*Norlin	0,088947			****	
Linola*Vinny	0,161894	****			
Linola*Oliwin	0,186457	****			
Linola*Opal	0,218301				****
Linola*Szafir	0,259714		****		
Linola*Bionda	0,284014		****		

Literatura

1. Evtimova M., Vlahova M., Atanasov A., (2005), JNF, 2, 17-34.
2. Acikgoz C., Kockar O. M., (2007), J. Anal. Appl. Pyrolysis, 78, 406-412.
3. Wielgus K., Mańkowska G., (2006), Rośliny Oleiste, 2, 213-222.
4. Millam S., Obert B., Pretova A., (2005), Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 82, 93-103.
5. Adamska E., Cegielska-Taras T., Szała L., (2002), Rośliny Oleiste, 2, 215-222.
6. Chen Y., Kenaschuk E., Dribnenki P., (1998), Plant Breed., 117, 463-467.
7. Obert B., Bartosova Z., Pretova A., (2004), J. Nat. Fibres, 1, 1-14.
8. Chen Y. R., Kenaschuk E., Dribnenki P., (1999), Plant Cell Tiss. Org., 57, 195-198.
9. Lassaga S. L., Camadro E. L., Bonell M. L., Franzone P., (2004), Plant Breed., 123, 502-504.
10. Rutkowska-Krause I., Mankowska G., Lukaszewicz M., Szopa J., (2003), Plant Cell Rep., 22, 110-116.
11. Chen Y., Dribnenki P., (2002), Plant Cell Rep., 21, 204-207.
12. Nichterlein K., (2003), *Doubled haploid production in crop plants*, Eds. Kasha K. J., Maluszynski M., Forster B. P., 249-254, Kluwer Academic Publisher, New York.