



## Wykorzystanie androgenezy w kulturach pylnikowych do otrzymywania homozygotycznych roślin marchwi

Krystyna Górecka, Dorota Krzyżanowska, Waldemar Kiszczak, Urszula Kowalska, Ryszard Górecki

Instytut Warzywnictwa im. Emila Chroboczka, Skierniewice

### Obtaining homozygous carrot plants with the aid of androgenesis in anther cultures

#### Summary

Experiments with anther cultures of 22 carrot cultivars were carried out to study the effect of various factors on the effectiveness of embryogenesis in these cultures. The factors included: the stage of microsporogenesis, genotype, training of donor plants and their growth conditions. A modified B<sub>5</sub> medium (Gamborg, et al. 1968) containing 500 mg L<sup>-1</sup> glutamine, 100 mg L<sup>-1</sup> serine, 0.1 mg L<sup>-1</sup> of 2,4D, 0.1 mg L<sup>-1</sup> NAA, 100 g L<sup>-1</sup> sucrose and 6.5 g L<sup>-1</sup> agar were used to induce androgenesis. Regeneration was carried out on MS media and B<sub>5</sub> with reduced concentration of sucrose at 20 g L<sup>-1</sup> without aminoacids and hormones or with small amount of hormones. Substrates that were a mixture of various components, such as peat, sand, mineral wool and charcoal, were used for adaptation. Ploidy of the obtained plants was determined by cytometry method. Homozygosity of the plants was established using two isoenzymatic systems: PGI — phosphoglucose isomerase, and AAT — aspartate aminotransferase. Anatomical studies of embryogenesis during anther cultures were also carried out to confirm the androgenetic origin of embryos.

It was found that the uninucleate stage was the most suitable time to stimulate microspores to produce embryos, and that bud length was a good external indicator of the stage of microsporogenesis. The studied cultivars differed in their ability to undergo androgenesis *in vitro*. It was shown that it was not necessary to remove all shoots and umbels except the main one. Generally, the embryos were obtained regardless of the way the donor plants were trained, even when the plants were not trained at all. The donor plants grown in a greenhouse produced more embryos than the plants grown in the field. On MS and B<sub>5</sub> media without hormones, used to regenerate plants from embryos, secondary

#### Adres do korespondencji

Krystyna Górecka,  
Instytut Warzywnictwa  
im. Emila Chroboczka,  
ul. Konstytucji 3 Maja 1/3,  
96-100 Skierniewice

#### biotechnologia

2 (81) 142–152 2008

embryogenesis was found to take place followed by a conversion of embryos to complete plants, which subsequently resulted in better adaptation (more than 80% of plants became adapted). Cytometric studies revealed that more than 90% of the obtained androgenetic plants had a doubled chromosome complement. By analyzing the AAT and PGI isoenzymes, it was found that the obtained carrot androgenetic plants were homozygotes. Anatomical studies confirmed that embryos were formed from microspores.

**Key words:**

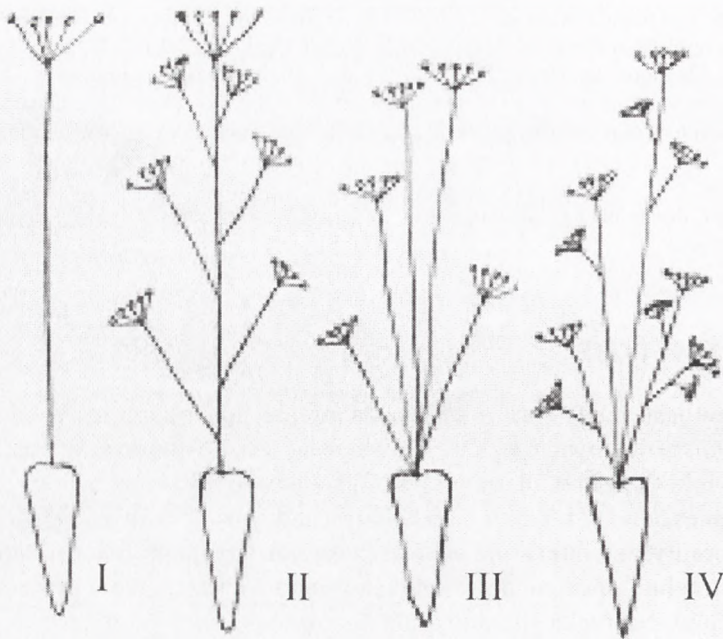
adaptation, donor plants, embryogenesis, genotype, growth conditions, regeneration, stage of microsporogenesis.

## 1. Wstęp i cel pracy

Marchew jest warzywem o dużym znaczeniu gospodarczym w wielu krajach, w tym w Polsce. Jednym z jej dużych walorów jest dostępność w postaci surowej przez cały rok. Coraz popularniejsze stają się mrożonki z marchwi, soki marchwiowe i soki mieszane, w których marchew jest jednym z głównych składników. Przemysł farmaceutyczny interesuje się marchwią, jako źródłem  $\beta$ -karotenu. Z tych powodów potrzebne są ciągle nowe odmiany marchwi, szczególnie przystosowane do nowych celów. Na rynku dominują aktualnie nowoczesne odmiany mieszańcowe, których hodowla jest trudna i długotrwała, a do ich wyprowadzenia potrzebne są linie homozygotyczne. Zastosowanie kultur pylnikowych i otrzymanie roślin androgenicznych może znacznie przyczynić się do skrócenia okresu homozygotyzacji. Wobec bardzo małej ilości informacji w literaturze światowej na temat badań nad kulturami pylnikowymi marchwi (1-5) zagadnienie to wydało się nam nie tylko praktycznie użyteczne, ale także fascynujące i godne dokładnego opracowania. Badania nad zastosowaniem kultur pylnikowych dla otrzymywania kultur homozygotycznych marchwi były prowadzone w Instytucie Warzywnictwa w Skierniewicach.

## 2. Materiał i metody

Materiał do badań stanowiły rośliny 22 genotypów marchwi wybrane przez hodowców. Korzenie jarowizowano przez 3 miesiące, w chłodni, w temp.  $+4^{\circ}\text{C}$ , wysadzano po dwie sztuki do 10 l pojemników z mieszaniną torfu z piaskiem (1:2) z dodatkiem kredy i Azofoski, umieszczano w ogrzewanej szklarni lub wysadzano w polu. Po pojawieniu się zaczątków pędów kwiatostanowych rośliny prowadzono czterema sposobami: 1) na jeden pęd i jeden baldach główny, 2) na pęd z baldachem głównym i wyrastające z niego pędy pierwszego rzędu zakończone baldachami, 3) na kilka pędów wyrastających z korzenia, każdy z baldachem, 4) na wszystkie wyrastające z korzenia pędy kwiatostanowe (rys. 1). Z baldachów pobierano pąki kwiatowe różnej wielkości (od 0,7 do 1,8 mm), badano stadium rozwoju zawartych w nich mikrospor oraz sprawdzano, które ze stadiów jest najbardziej przydatne dla indukcji androgenezы. Do dalszych prac używano pąków o długości skorelowanej



Rys. 1. Sposoby prowadzenia roślin donorowych.

z optymalnym stadium rozwojowym mikrospor. Pąki kwiatowe sterylizowano przez 2 min w 70% etanolu, izolowano z nich pylniki i umieszczano w 100 ml kolbach Erlenmeyera, zawierających ok. 30 ml pożywki do indukcji androgenozy. Stosowano pożywkę B5 (6), zmodyfikowaną przez Kellera (7), a następnie przez Andersena i in. (1) zawierającą 500 mg glutaminy, 100 mg seryny, 0,1 mg 2,4 D, 0,1 mg NAA oraz 100 g sacharozy w 1 litrze. Doprowadzano pH do 5,8 i zestalano agarem (6,5 g/l). W każdej kolbce umieszczano po 40 pylników. Kultury zakładano z ok. 500 pylników każdej odmiany. Kolby z pylnikami umieszczano w ciemności, w temp. +27°C. Po pojawieniu się zarodków wystawiano je na światło ciągle i w tej samej temperaturze trzymano do ich zazielenienia się zarodków, po czym zarodki opisywano, liczone i przekładano na pożywki regeneracyjne.

Początkowo do regeneracji roślin z zarodków marchwi otrzymanych w kulturach pylnikowych stosowano pożywki używane z powodzeniem do regeneracji zarodków androgenetycznych rzepaku (8), czy też kapusty głowiastej (9). Na początku były to pożywki: B5 zawierająca 20 g/l sacharozy i 20 mg/l kinetyny oraz MS (10), zawierająca 20 g/l sacharozy, 1 mg/l BA oraz 0,001 mg/l NAA. Wyrastające na nich pędy ukorzeniano na pożywkach ukorzeniających zawierających auksyny: IAA, NAA i IBA. Do dalszych doświadczeń stosowano pożywki B5 i MS bez hormonów z 20g/l sacharozy. Ukorzenione rośliny wysadzano do wielodoniczek zawierających podłoża o różnym składzie. Były to: torf, torf z piaskiem, piasek oraz wełna mineralna, z do-

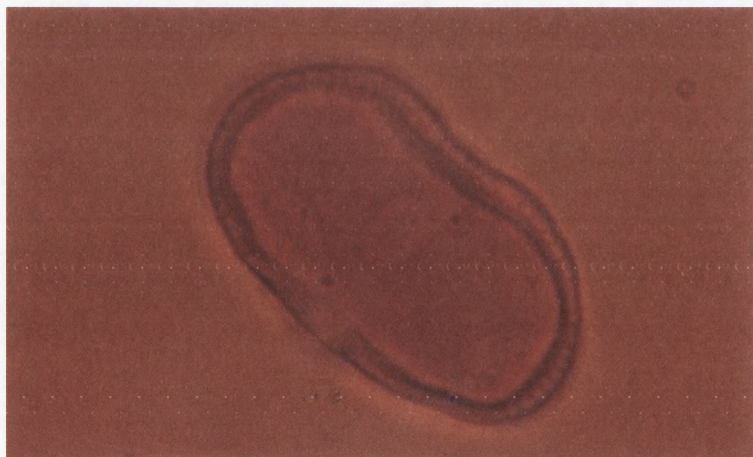
datkiem węgla brunatnego, supersorbentu Alcosorb 400, szczepionki Glomus oraz kredy i wieloskładnikowych nawozów.

Adaptację prowadzono w warunkach 100% wilgotności, przy 16 godz. oświetleniu i temp. + 16°C w nocy i + 20°C w dzień. Zaadaptowane rośliny androgenetyczne marchwi poddawane były ocenie. Określano ich ploidalność pośrednio, przy użyciu cytometru przepływowego Partec CA II (11). Przeprowadzano też ocenę ich homozygotyczności poprzez analizę elektroforetyczną dwóch systemów izoenzymatycznych PGI (izomeraza glukozyfosforanowa) i AAT — GOT (aminotransferaza aspartanowa).

W celu stwierdzenia, czy zarodki powstają z mikrospor prowadzono obserwacje preparatów gniecionych z pylników w trakcie trwania kultury. Obserwowano i dokumentowano następujące w mikrosporach podziały prowadzące do powstania zarodków androgenetycznych.

### 3. Wyniki i dyskusja

Izolowane z pąków kwiatowych pylniki marchwi zawierały mikrospory w różnych stadiach rozwojowych z przewagą jednego z nich. Stadium jednojądrowe (fot. 1) okazało się optymalne dla indukcji androgenezy. W przeprowadzonych obserwacjach wykazano, że stadium mikrosporogenezy było skorelowane z długością pąka kwiatowego. Optymalna dla androgenezy długość pąka była różna w zależności od genotypu i wahała się od 0,5 mm do 1,8 mm. Dla odmiany Feria F<sub>1</sub> wynosiła 1,0 mm — 1,3 mm, a dla odmiany HCM 0,5 mm — 0,9 mm. Zagadnienie to zostało dokładnie przedstawione w publikacji Kiszczaka i in. (12), gdzie stwierdzono, że dla każdego genotypu marchwi przed zakładaniem kultur pylnikowych należy



Fot. 1. Mikrospora jednojądrowa.

określić optymalną długość pąka. Zarodki otrzymano z pylników pochodzących z roślin donorowych, prowadzonych wszystkimi wymienionymi sposobami, nie stwierdzono istotnych różnic w wydajności androgenazy. Tym samym potwierdzono, że nie jest konieczne prowadzenie roślin donorowych na 1 pęd kwiatostanowy zakończony kwiatostanem głównym, jak zalecali Andersen i in. (1).

W prezentowanych badaniach nad androgenazą w kulturach pylnikowych marchwi zaobserwowano, że warunki wzrostu roślin donorowych wpływają w sposób istotny na efektywność androgenazy. Była ona wyższa, gdy rośliny donorowe rosły w szklarni. Uzyskano o 29% więcej zarodków z pylników z roślin odmiany Feria F<sub>1</sub> uprawianych w szklarni, natomiast dla odmiany HCM z roślin rosnących w szklarni uzyskano 10 razy więcej zarodków w przeliczeniu na 100 wyłożonych pylników niż z roślin rosnących w polu. Andersen i in. (1) rośliny donorowe do zakładania kultur pylnikowych marchwi uprawiali w polu, podczas gdy Wang i in. (13) stwierdzili, że naturalne dla danego gatunku warunki panujące podczas kwitnienia są optymalnymi warunkami wzrostu dla roślin donorowych. W publikacji Góreckiej i in. (14) omówiono wpływ sposobu prowadzenia oraz warunków wzrostu roślin donorowych na androgenazę w kulturach pylnikowych marchwi.

Liczba uzyskiwanych zarodków zależała od odmiany. Wśród przebadanych odmian były silnie embriogenne, jak Feria F<sub>1</sub> (ponad 40 zarodków na 100 wyłożonych pylników); słabo embriogenne jak CxC9900 F<sub>1</sub> czy Nerac F<sub>1</sub> (około 0,2 zarodka na 100 wyłożonych pylników); a także nieembriogenne, jak Lucky B F<sub>1</sub> czy Berjo, z których nie otrzymano zarodków (tab. 1). W licznych pracach wykazuje się znaczącą rolę genotypu w procesie otrzymywania zarodków w procesie androgenazy. Andersen i in. (1) w pracy dotyczącej androgenazy w kulturach pylnikowych marchwi również obserwowali tę zależność. Górecka i Krzyżanowska (15) w badaniach androgenazy w kulturach pylnikowych kapusty głowiastej wykazali, że odmiany, a także kłony wyprowadzone z poszczególnych roślin różniły się znacznie efektywnością tego procesu. Podczas prac prowadzonych w Instytucie Warzywnictwa (16) stwierdzono wyraźne różnice w liczbie uzyskanych zarodków w kulturach pylnikowych marchwi między badanymi odmianami, a także pomiędzy roślinami w obrębie odmiany.

Tabela 1

## Wpływ genotypu marchwi na wydajność androgenazy (10 wybranych odmian)

Odmiana	Liczba wyłożonych pylników	Liczba uzyskanych zarodków	Liczba zarodków na 100 pylników	Liczba reagujących pylników	(%) reagujących pylników
1	2	3	4	5	6
CxC9900 F <sub>1</sub>	1146	3	0,3	2	0,2
Lucky B F <sub>1</sub>	1079	0	0,0	0	0,0
HCM	3868	213	5,6	48	1,3
Beta III	4341	1	0,0	1	0,0

1	2	3	4	5	6
Perfekcja	533	2	0,4	1	0,2
Kazan F <sub>1</sub>	480	12	2,5	11	2,3
Nerac F <sub>1</sub>	400	1	0,3	1	0,3
Berjo F <sub>1</sub>	480	0	0,0	0	0,0
Feria F <sub>1</sub>	776	361	46,1	89	11,5
Neptune F <sub>1</sub>	1066	3	0,3	2	0,2

Początkowo regenerację roślin z androgenetycznych zarodków marchwi prowadzono dwuetapowo. Na pożywce MS zawierającej BA oraz NAA, z wyłożonych zarodków powstawały liczne pędy (pierwszy etap), z których na pożywkach ukorzeniających powstawały kompletne rośliny (etap drugi) (fot. 2 a,b,c). Średnio ukorzeniało się 18,9% pędów, najwięcej (ponad 30) na pożywce zawierającej IAA i NAA, a najmniej (poniżej 10%) na pożywce zawierającej IBA i IAA. Na pożywce B5 z 20 mg/l kinetyny, wszystkie zarodki marchwi zamierały. Natomiast na pożywkach B5 i MS bez hormonów z 20 g/l sacharozy, na wyłożonych na nie zarodkach, a także na powstałych z nich roślinkach zachodziła wtórna embriogeneza i następnie konwersja w kompletne rośliny (fot. 3 a,b,c). Metodą tą udało się otrzymać ponad 100



Fot. 2a. Regeneracja dwuetapowa — indukcja wytwarzania pędów.



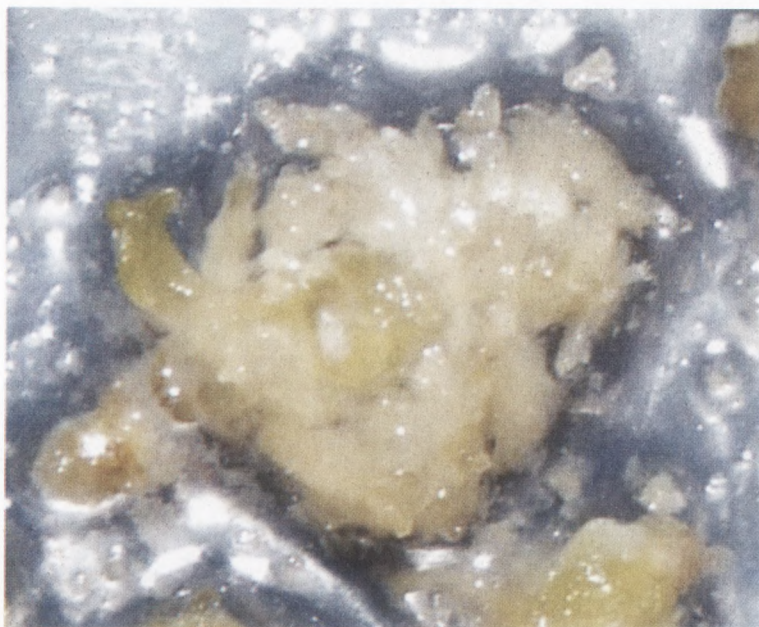
Fot. 2b. Regeneracja dwuetapowa — pędy przeniesione na pożywkę do ukorzeniania.



Fot. 2c. Regeneracja dwuetapowa — kompletna roślina.

roślin z jednego zarodka najbardziej embriogennej odmiany w ciągu 12. tygodni na pożywce B5. Zjawisko wtórnej embriogenezy w badaniach nad androgenezą w kulturach pylnikowych marchwi obserwowali Tiukavin i in. (4).

Rośliny androgenetyczne marchwi otrzymane dwuetapowo z trudnością adaptowały się po wyjęciu ze szkła. Na podłożu torfowym zawierającym kredę i Azofoskę zaadaptowało się niewiele ponad 30% wysadzonych roślin. Przy stosowaniu innych podłoży wynik ten nie był wcale lepszy (17). Natomiast rośliny zregenerowane poprzez wtórną embriogenezę adaptowały się do warunków zewnętrznych znacznie lepiej (ponad 60% zaadaptowanych roślin w podłożu torfowym) (tab. 2).

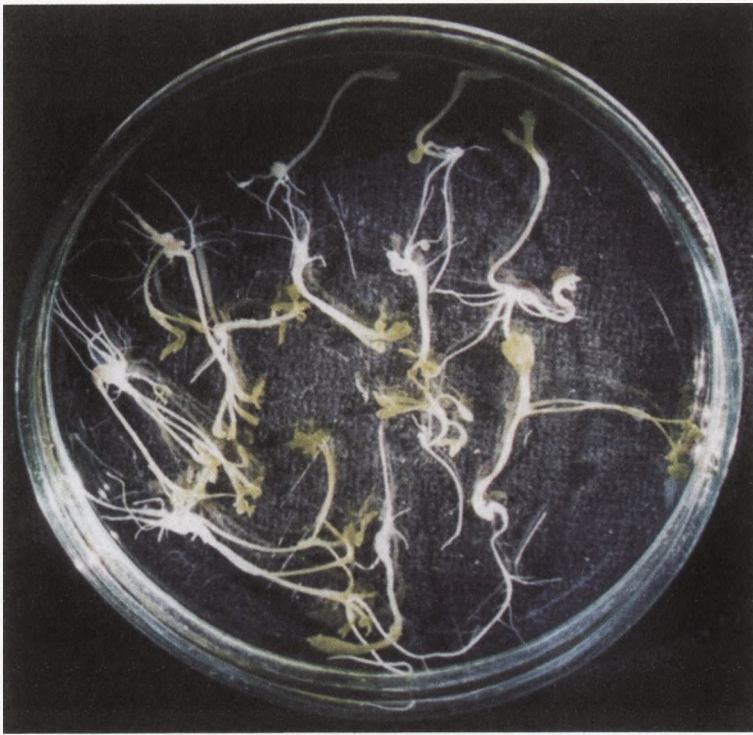


Fot. 3a. Regeneracja jednoetapowa — wtórna embriogeneza.



Fot. 3b. Regeneracja jednoetapowa — konwersja zarodków.





Fot. 3c. Regeneracja jednoetapowa — kompletne rośliny.

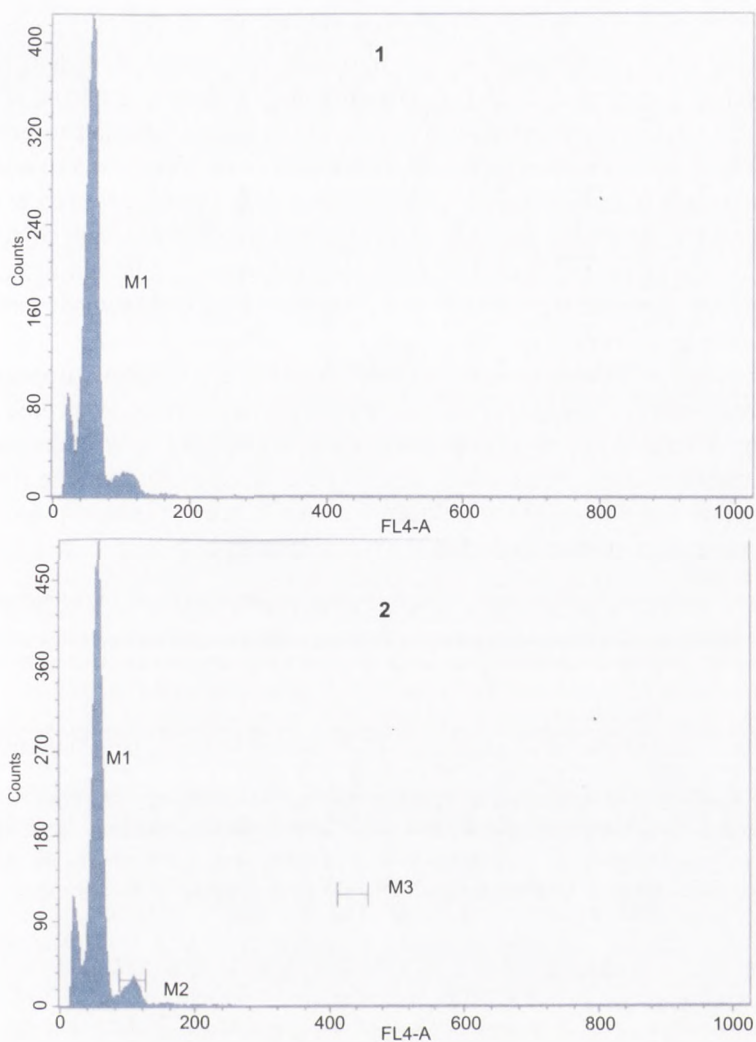
Tabela 2

Wpływ sposobu regeneracji roślin marchwi z zarodków androgenetycznych na ich adaptację po wysadzeniu do podłoża torfowego

Sposób regeneracji roślin z zarodków	Liczba roślin wysadzonych do podłoża	(%) roślin zaadaptowanych
regeneracja dwuetapowa uzyskanie pędów + ukorzenianie	69	34,8
regeneracja poprzez wtórną embriogenezę	225	64,8

Rośliny marchwi, które pomyślnie przeszły proces adaptacji w badaniach cytometrycznych okazały się w ponad 90% diploidami (rys. 2). Wśród roślin wyprowadzonych z kultur pylnikowych u rodzaju *Brassica* wielu autorów stwierdziło znaczny procent roślin diploidalnych (18-20).

Ploidalność androgenetycznych roślin marchwi otrzymywanych przez innych autorów kształtowała się w różny sposób, jednak przeważały rośliny diploidalne. Andersen i in. (1) prowadzili badania przez 3 lata i każdego roku otrzymywali inny procent roślin haploidalnych: 40,5% w pierwszym roku, 4% w trzecim, a w drugim roku badań otrzymali tylko diploidy i tetraploidy. Tiukavin i in. (4) otrzymali również



Rys. 2. Cytopter przepływowy – piktogramy: 1 – kontrola, 2 – roślina diploidalna.

większość roślin diploidalnych. Stwierdzili oni, że podwojenie liczby chromosomów zachodzi już w zarodkach androgenetycznych marchwi, jeszcze przed ich wydostaniem się z pylnika.

Na podstawie analizy elektroforetycznej dwóch systemów izoenzymatycznych potwierdzono homozygotyczny charakter większości otrzymanych roślin (zwłaszcza analiza AAT). Obserwowano jednak dużą częstotliwość zmienności somaklonalnej generowanej przez kultury *in vitro*.

Czas od założenia kultury do pojawienia się zarodków był różny. Wahał się on od dwóch tygodni do dwóch miesięcy. Podczas obserwacji w mikroskopie świetlnym pre-

paratów gniecionych z pylników w trakcie trwania kultury można było zaobserwować podziały mikrospor i powstawanie proembrionów. Nie zaobserwowano podziałów w tkankach budujących pylnik i dlatego stwierdzono, że zarodki uzyskane w kulturach pylników mają gametyczne pochodzenie (fot. 2). Badania anatomiczne prowadzone podczas kultury pylników marchwi przez Tiukavina i in. (4) również na to wskazywały.

Podsumowując można stwierdzić, że w wyniku badań prowadzonych w Instytucie Warzywnictwa opracowano metodę otrzymywania androgenetycznych roślin marchwi przy użyciu kultur pylnikowych. W kolejnych etapach zidentyfikowano embriogene odmiany, zbadano wpływ wybranych czynników na efektywność embriogenezy w kulturze pylników.

Opracowano efektywny sposób regeneracji roślin z zarodków, poprzez wywołanie wtórnej embriogenezy i konwersję zarodków w roślinie. W ocenie otrzymanych roślin wykazano, że są one podwojonymi haploidami, a w badaniach anatomicznych potwierdzono, że zarodki pochodzą z mikrospor. Otrzymane rośliny marchwi przekazano hodowcy, który po ocenie cech fenotypowych wytypuje linie przydatne do tworzenia nowych odmian.

Badania były częściowo finansowane z funduszy grantu Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego nr 2 P06A 028 28.

## Literatura

- Andersen S. B., Christiansen I., Farestveit B., (1990), in: *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Ed. Bajaj Y. P. S., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 393-402.
- Hu K. L., Matsubara S., Murakami K., (1993), *J. Jap. Soc. Hort. Sci.*, 62, 561-565.
- Matsubara S., Dohya N., Murakami K., Nishio T., Doré C., (1995), *Acta Hort.*, 392, 129-137.
- Tyukavin G. B., Shmykova N. A., Mankhova M. A., (1999), *Russ. J. Plant Phys.*, 46, 876-884.
- Ferrie A. M. R., Bethune T., Kernan Z., (2005), *Acta Phys. Plant.*, 27(4B), 735-741.
- Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima O., (1968), *Exp. Cell Res.*, 50, 151-158.
- Keller W. A., (1984), in: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant*, Ed. Vasil J. K., Academic Press, 302-310.
- Nałęczyńska A., (1991), *Hodowla Roślin, Aklimatyzacja i Nasiennictwo*, 35,1/2, 3-28.
- Górecka K., (1998), Instytut Warzywnictwa. Prace Habilitacyjne, nr 14. „Uzyskanie linii homozygotycznych kapusty głowiastej (*Brassica oleraceae* L. var. *capitata* L.) przy pomocy kultur pylnikowych”.
- Murashige T., Skoog F., (1962), *Phys. Plantarum*, 15, 473-497.
- Doležel J., (1991), *Phytochem. Analysis*, 2, 143-154.
- Kiszczał W., Górecka K., Krzyżanowska D., Kowalska U., (2005), *Vegetable Crops Research Bulletin*, 62, 81-90.
- Wang M., van Bergen S., van Duijn B., (2000), *Plant Physiol.*, 124, 523-530.
- Górecka K., Krzyżanowska D., Kiszczał W., Górecki R., (2005), *Vegetable Crops Research Bulletin*, 63, 25-32.
- Górecka K., Krzyżanowska D., (2001), *Vegetable Crops Research Bulletin*, 54, 7-11.
- Górecka K., Krzyżanowska D., Górecki R., (2005), *J. of Appl. Genet.*, 46(3), 265-269.
- Górecki R., Górecka K., Krzyżanowska D., Kozik E., Nowak R., Adasik B., (2001), *Vegetable Crops Research Bulletin*, 54, 25-28.
- Stipic M., Champion B., (1997), *Plant Breeding*, 116, 2, 153-157.
- Wang M., Farnham M. W., Nannes J. S. P., (1999), *Plant Breeding*, 118, 3, 249-252.
- Górecka K., Krzyżanowska D., Kowalska U., (2008), *Vegetable Crops Research Bulletin*, (w druku).