„POSZUKIWANIE NOWEJ ZMIENNOŚCI GENETYCZNEJ W OBRĘBIE RODZAJÓW *LUPINUS, PISUM* I *VICIA* - KRZYŻOWANIA ODDALONE I ANDROGENEZA

A. Ślusarkiewicz-Jarzina, M. K. Wojciechowicz, H. Pudelska

Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Celem badań było wytworzenie gospodarczo wartościowych form łubinu (wczesnych i odpornych na antraknozę) oraz grochu (o sztywnej łodydze) poprzez krzyżowanie oddalone międzygatunkowe i międzyrodzajowe. Ponadto podjęto próbę indukcji androgenezy w pylnikach roślin mieszańcowych pokolenia F1 grochu, łubinu wąskolistnego oraz bobiku w celu skrócenia cyklu hodowlanego.

Materiałem doświadczalnym do krzyżowań międzyrodzajowych w obrębie gatunku *Lupinus* (łubin) były *L. albus, L. luteus, L. angustigolius oraz L. mutabilis*, natomiast do krzyżowań międzygatunkowych użyto *Pisum sativum* (Acord) i *Vicia faba v. equina* (Fernando). Z roślin rosnących w warunkach szklarniowych i w pokoju hodowlanym pobierano zamknięte pąki kwiatowe przed pyleniem oraz pąki z pękającymi pylnikami i sterylizowano w 5% roztworze podchlorynu wapnia przez 5 minut, po czym kilkakrotnie płukano wodą sterylną. Następnie w sterylnych warunkach izolowano niedojrzałe zalążnie z genotypów matecznych i po dwóch, trzech lub czterech dobach zapylano pyłkiem genotypów ojcowskich. Łubiny krzyżowano w obu kierunkach, a mianowicie: *L. albus* x *L. luteus* i *L. angustigolius*, *L. luteus* x *L. albus* i *L. angustigolius* a także *L. angustigolius* x *L. albus* i *L. luteus*. Rośliny *L. mutabilis* stosowano tylko jako zapylacz dla trzech pozostałych rodzajów łubinu. Wykonano około 1000 krzyżowań *in vitro* między czterema rodzajami łubinu oraz 200 krzyżowań między grochem *Pisum sativum* (Acord) i bobikiem *Vicia faba v. equina* (Fernando). Wyizolowane zalążnie wykładano na pożywki MS (Murashige i Skoog, 1983) lub N6 (Chu i in., 1975) bez substancji wzrostowych. Po kilku dniach od zapylenia zalążnie z powiększonymi zalążkami przenoszono na pożywkę B5 (Gamborg, 1963).

Materiałem doświadczalnym do kultur pylnikowych były rośliny mieszańcowe pokolenia F1: grochu (Batuta x Zekon), łubinu wąskolistnego (Pumba x Wars-685/15-W459) oraz bobiku (2015), wysiane w szklarni oraz w pokoju hodowlanym. Z mieszańców tych pobierano pąki kwiatowe zawierające pylniki w stadium jednojądrowych mikrospor z dużą, centralną wakuolą i jądrem położonym przyściennie w cytoplazmie. Stadium rozwojowe mikrospor oznaczano pod mikroskopem na preparatach rozgniatanych, barwionych acetokarminem. Pąki w odpowiednim stadium sterylizowano w 5% wodnym roztworze podchlorynu wapnia przez 5 minut, po czym kilkakrotnie płukano wodą sterylną. Następnie w sterylnych warunkach izolowano pylniki i wykładano na pożywki indukujące proces androgenezy. Zastosowano dwie pożywki podstawowe: MS oraz N6 z dodatkiem 2,4-D (kwas dichlorofenoksyoctowy) w różnych stężeniach 2,0; 3,0 i 4,0 mg/l). Na każdy wariant pożywki z poszczególnych genotypów wykładano po około 500 pylników, po 50 pylników na szalkę o średnicy 6 mm (łącznie około 6000). Kultury pylnikowe inkubowano w temperaturze 28°C, w ciemności przez 4-6 tygodni. Uzyskane androgeniczne struktury przenoszono na pożywkę regeneracyjną 190-2 (Zhuang, Xu 1983) zawierającą 1,0 mg/l kinetyny i 0,5 mg/l NAA (kwas L-naftalenooctowy).

W wyniku doświadczeń dotyczących krzyżowań oddalonych i indukcji androgenezy wykonanych na materiale doświadczalnym hodowanym w szklarni oraz w pokoju hodowlanym stwierdzono, że materiał wyjściowy hodowany w szklarni jest przydatniejszy do kultur *in vitro*. Przetestowanie warunków hodowli roślin doświadczalnych (temperatury i fotoperiodu) pozwoliło określić optymalną temperaturę tj. 15/20°C odpowiednio noc/dzień oraz oświetlenie 12 godzin/dobę przy natężeniu PAR 200 µmol m^{-2}. Na podstawie analiz mikroskopowych określono stadium pylników zawierających jednojądrowe mikrospory, optymalne do wykładania pylników na pożywki indukujące proces androgenezy (Fot.1).

Przetestowano pożywki i wybrano: do kultur *in vitro* zapylanych zalążni – pożywka MS bez substancji wzrostowych, do kultur *in vitro* niedojrzałych zalążków – zmodyfikowana pożywka B5, do kultur pylnikowych roślin pokolenia F1 – pożywka Ms z dodatkiem 3,0 mg/l 2,4-D, do kultur struktur androgenicznych oraz kalusów – zmodyfikowana pożywka 190-2.

Wyizolowane, powiększone zalążki z krzyżowania *L. albus* x *L. luteus* wyszczepiano w warunkach *in vitro* na pożywkę B5 i hodowano w pokoju hodowlanym w temperaturze 25°C, przy oświetleniu 80–100 µmoli fotonów $m^{-2}s^{-1}$ przez 12 godzin (Fot. 2D, 2E,). Natomiast struktury androgeniczne grochu (Batuta x Zekon) uzyskane w kulturach pylnikowych przenoszono na pożywkę regeneracyjną i hodowano w temperaturze 22°C, przy oświetleniu 80–100 µmoli fotonów $m^{-2}s^{-1}$ przez 12 godzin (Fot. 3D, 3E). Obecnie kalusy i roślinki z krzyżowania *L. albus* x *L. luteus* oraz kalusy z kultur pylnikowych rosną w pokoju hodowlanym. Wykonano analizy mikroskopowe: pylników pobieranych w różnym stadium kultur pylnikowych i stwierdzono pierwsze podziały jąder szlaku androgenicznego oraz pojedyncze struktury androgeniczne (Fot. 2A, 2B, 2C) , jak również zalążków utrwalanych po różnym czasie od zapylenia i stwierdzono rozwój zapylonych woreczków zalążkowych (Fot. 3A, 3B, 3C).

Literatura do pożywek:

CHU CC, WANG C, SUN CS, HSU C, YIN KC, CHU CY, and BI FY. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Science Sinica* 18: 659–668.

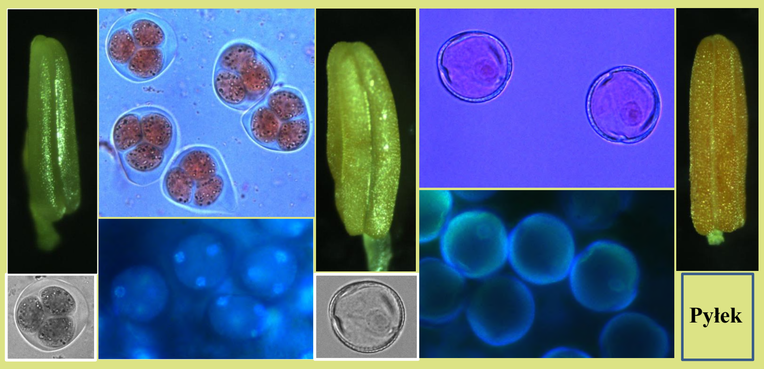
GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A. and OJIMA, K. (1968). Nutrient requirements for suspension cultures of soyabean root cells. *Experimental Cell Research*, 50: 151-158.

MURASHIGE T, SHOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol Plant 15:473-497

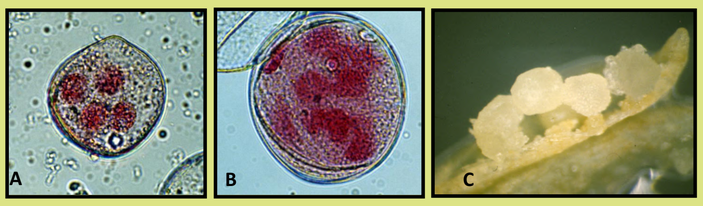
ZHUANG JJ, and XU J. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu Hand Vega MR [eds.], *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*, 431. Science Press, Beijing.

KRAJOWE ŹRÓDŁA BIAŁKA ROŚLINNEGO

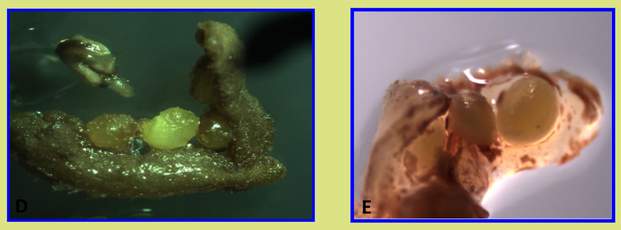
Fot. 1.
Analiza mikroskopowa pylników w celu określenia stadium mikrospor najefektywniejszych w procesie androgenezy



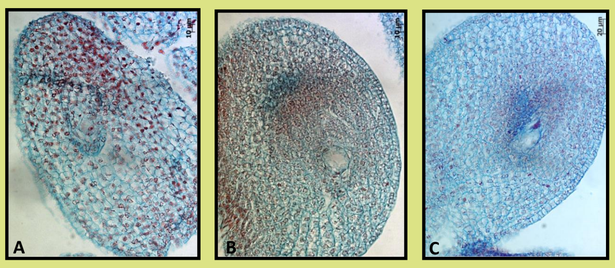
Pylnik zielony: Tetrady — Pylnik żółtawy: mikrospory 1-jądrowe rozmiar pylnika 0,3-0,4 cm — Pylnik pomarańczowy



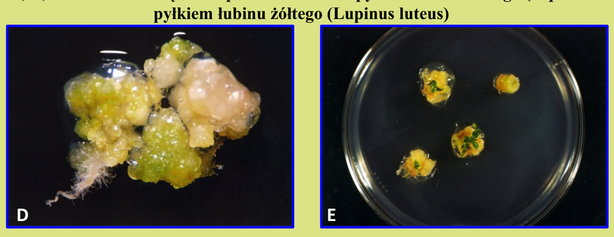
Fot. 2A, B, C. Struktury androgeniczne w pylnikach łubinu wąskolistnego pokolenia F1 (Pumba x Wars) – 685/15- W459



Fot. 2D i 2E. Powiększone zalążki *Lupinus luteus* zapylone pyłkiem *Lupinus albus*



Fot. 3 A, B, C. Woreczki zalążkowe po 3 dniach od zapylenia łubinu białego (*Lupinus albus*) pyłkiem łubinu żółtego (Lupinus luteus)



Fot. 3D i 3E. Tkanka kalusowa oraz początki regeneracji roślinek z zalążków otrzymanych w krzyżowaniu *Lupinus luteus* x *Lupinus albus*