



## Porównanie metod mikrorozmnażania polskich odmian jęczmienia i owsa

Hanna Kruczkowska, Helena Pawłowska, Barbara Skucińska  
Katedra Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Uniwersytet Rolniczy, Kraków

### Comparison of micropropagation methods in Polish cultivars of barley and oat

#### Summary

Obtaining transgenic plants in cereal cultivars of agronomic value requires an efficient method of micropropagation which does not cause additional variation. Recently suggested protocols consist in inducing regeneration of multiple shoots from apical meristems of seedlings derived *in vitro* from mature dry seeds. We have compared the efficiency of three protocols: after Zhang et al. (4), Sharma et al. (8) and Ganeshan et al. (10) in several Polish cultivars of barley and oat. In the examined cultivars, the protocol after Ganeshan et al. (10) proved to be more efficient, less laborious and faster.

#### Key words:

micropropagation, shoot apical meristems, multiple shoots, barley, oat.

### 1. Wstęp

Mikrorozmnażanie jest wykorzystywane w hodowli zbóż do namnażania cennych genotypów i mutantów, jak też utrzymywania kolekcji i niektórych linii, np. linii wolnych od patogenów. Dla ulepszenia wartościowych odmian drogą transgenezy niezbędna jest, oprócz odpowiedniej metody wprowadzania genów do komórek, wydajna procedura mikrorozmnażania, nie wnosząca dodatkowej zmienności.

Gatunki zbóż klimatu umiarkowanego są stosunkowo odporne przy mikrorozmnażaniu, ponieważ niewiele rodzajów eksplantatów jest zdolnych do regeneracji, a wydajność tego procesu jest niezadowolająca i w znacznym stopniu zależna od genotypu.

#### Adres do korespondencji

Helena Pawłowska,  
Katedra Hodowli Roślin  
i Nasiennictwa,  
Uniwersytet Rolniczy,  
ul. Łobzowska 24,  
31-140 Kraków;  
e-mail:  
rkhrn@ar.krakow.pl

Początkowo za najlepsze uznano eksplantaty z niedojrzałych tkanek i organów, najczęściej niedojrzałych zarodków, które w kulturze kalusowały i z kalusa powstawały pędy przybyszowe lub zarodki somatyczne (1). Te metody wymagały uprawy roślin matecznych, a pośrednictwo kalusa niosło niebezpieczeństwo zmienności genetycznej, albinizmu i obniżonej płodności. W kilku pracach wskazano również na możliwość bezpośredniej indukcji zarodków somatycznych na fragmentach tarczek zarodkowych (2,3).

W ostatnich latach opracowano metody mikrorozmnażania zbóż z wykorzystaniem dojrzałych suchych ziarniaków. Merystemy wierzchołkowe siewek uzyskanych w kulturze są zdolne do namnożenia pędów bez kalusa. Ten sposób regeneracji jest mniej zależny od genotypu i zdecydowanie ogranicza niebezpieczeństwo występowania niepożądanego zmienności somaklonalnej. Komórki merystemu wierzchołkowego mogą być obiektem transformacji, np. metodą mikrowstrzeliwania, a następnie po namnożeniu są zdolne do regeneracji transformantów bez pośrednictwa kalusa. Suche nasiona są dostępne przez cały rok, a tok prac technicznych jest łatwiejszy (4-10).

Celem pracy było porównanie przydatności trzech procedur – wg Zhang i wsp. (4), wg Sharma i wsp. (8) i Ganeshan i wsp. (10) – do mikrorozmnażania kilku polskich odmian jęczmienia i owsa. Zgodnie z naszą wiedzą nie stosowano dotąd u owsa procedury wg Sharma i wsp. (8,9).

## 2. Materiał i metody

Do doświadczenia wzięto dojrzałe suche ziarniaki jęczmienia browarnego odmian Basza i Stratus oraz owsa odmian Chwat (tylko w doświadczeniu wstępnym), Bohun i Szakal. Nasiona otrzymano od hodowców tych odmian i przechowywano je w temperaturze 4°C.

W doświadczeniu wstępnym porównano dwie procedury oznaczone jako Z i S, tj. wg Zhang i wsp. (4) oraz Sharma i wsp. (8), a w doświadczeniu głównym – procedury S i G, tj. wg Sharma i wsp. (8) oraz Ganeshan i wsp. (10). Ziarniaki dezynfekowano w nierozcieńczonym Domestosie przez 45 min, płukano w sterylnej wodzie, izolowano zarodki i wykładano na odpowiednie pożywki w celu uzyskania siewek. Eksplantatami były wierzchołki pędów siewek.

Skład pożywek podstawowych dla badanych metod jest podobny, różnice dotyczą głównie zastosowania regulatorów wzrostu, tj. 2,4-D (kwas 2,4-dichloro-fenoxyoctowy), BAP (6-benzylaminopuryna), picloramu (kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy), TDZ (tidiazuron).

Zgodnie z procedurami Z i G, przez cały okres kultury utrzymywano ten sam poziom regulatorów: Z – 0,5 mg/l 2,4-D + 2 mg/l BAP, G – 1 mg/l TDZ dla jęczmienia (pożywka MBT1) i 1 mg/l TDZ + 1 mg/l BAP dla owsa (pożywka T1B1).

W procedurze S żywka indukująca charakteryzuje się wysokim poziomem regulatorów (pożywka MPT: 2 mg/l picloramu + 3 mg/l TDZ), który w dalszych etapach

kultury obniża się: w pożywce mnożącej MPT1 – 2 mg/l picloramu + 2,5 mg/l TDZ, w pożywce wydłużającej pędy MPT2 – 0,1 mg/l picloramu + 1 mg/l TDZ. U owsa w kombinacji S pasaż mnożący (pożywka MPT1) i pasaż wydłużający pędy (pożywka MPT2) przeprowadzono w trzech wersjach: S1 – 1x pasaż mnożący + 1x pasaż wydłużający (zgodnie ze schematem podanym przez autorów metody); S2 – 2x pasaż mnożący + 1x pasaż wydłużający; S3 – 1x pasaż mnożący + 2x pasaż wydłużający.

Dla każdej odmiany i metody wyłożono po 250 zarodków na 10 płytek Petriego (9 cm). Eliminowano płytki z zakażeniami oraz takie, na których żaden eksplantat nie podjął regeneracji pędów. Pędy ukorzeniano na pożywkach zaleconych przez autorów metod. Kulturę prowadzono w ciągu 10-11 tyg. + 2-4 tyg. przeznaczone na ukorzenianie.

Dla danych przedstawionych w tabelach 2-4 przeprowadzono analizę zmienności i wyznaczono LSD przy  $P = 0,05$ .

### 3. Wyniki i dyskusja

W doświadczeniu wstępnym wydajność procedur Z i S, wyrażona średnią liczbą pędów uzyskanych z jednego eksplantatu, nie różniła się istotnie (danych nie przedstawiono). W doświadczeniu głównym zastosowano ponownie procedurę S, wprowadzając jej modyfikacje, nie powtórzono natomiast procedury Z ze względu na jej większą pracochłonność (odplewanie, kilkakrotne przycinanie pędów).

Straty poniesione w pierwszej fazie kultury wynikały z zakażeń (różne źródła materiału) oraz braku reakcji niektórych eksplantatów na indukcję morfogenezy (tab. 1). Skuteczność indukcji zależała od gatunku i procedury. U owsa udział reagujących eksplantatów był ogólnie wysoki (66-82%), u jęczmienia zdecydowanie lepsza była reakcja na procedurę G niż S. Na pożywkach według procedury S eksplantaty jęczmienia albo nie podejmowały organogenezy i zamierały (Basza), albo podejmowały ją nieliczne (Stratus), a w dalszym toku kultury pędy regenerowały bardzo wolno.

**Tabela 1**

#### Indukcja organogenezy

Gatunek	Odmiana	Procedura	Liczba eksplantatów (powtórzeń)	Liczba reagujących eksplantatów (%)
1	2	3	4	5
jęczmień zwyczajny	Basza	G	47 (2)*	41 (87,2)
		S	140 (7)	0 (0)
	Stratus	G	246 (10)	222 (90,2)
		S	124 (7)	18 (14,5)

1	2	3	4	5
owies zwyczajny	Bohun	G	200 (8)	154 (77,0)
		S	192 (9)	142 (74,0)
	Szakal	G	121 (5)	99 (81,8)
		S	128 (6)	84 (65,6)

G – wg Ganeshan i wsp. (10), S – wg Sharma i wsp. (8), \* – po eliminacji płytek z eksplantatami zakażonymi lub nieregenerującymi pędów.

W wyniku porównania wydajności obu metod zastosowanych u owsa (tab. 2) wykazano, że u badanych odmian istotnie lepsza była procedura G: u odmiany Bohun otrzymano prawie dwukrotnie więcej pędów w przeliczeniu na reagujący eksplantat niż w kombinacji S, a u odmiany Szakal – prawie sześciokrotnie więcej.

Tabela 2

**Porównanie wydajności mikrorozmnażania owsa, uzyskanej za pomocą dwóch metod**

Odmiana	Procedura	Liczba eksplantatów (powtórzeń)	Eksplantaty niemnożące pędów (%)	Liczba uzyskanych pędów	Średnia liczba pędów z eksplantatu	
					wyłożonego	reagującego
Bohun	G	200 (8)	23,0	5613	28,1	36,7
	S	75 (3)	18,6	1161	15,5	19,0
Szakal	G	121 (5)	18,2	6500	54,2	66,2
	S	55 (3)	10,9	575	10,4	11,5
LSD $_{\alpha=0,05}$					6,53	7,24

G – wg Ganeshan i wsp. (10), S – wg Sharma i wsp. (8).

Na podstawie porównania wydajności mikrorozmnażania obu gatunków i ich odmian metodą G (tab. 3) wykazano, że w tym samym czasie kultury owies regenerował znacznie więcej pędów niż jęczmień. Wystąpiły też istotne różnice odmianowe: Stratus był ponad 2,5 raza bardziej wydajny niż Basza, Szakal prawie dwa razy lepszy niż Bohun. W publikacjach autorów obu procedur również podkreślono szczególną oporność jęczmienia na indukcję organogenezy i jej zależność od genotypu.

Tabela 3

## Wydajność mikrorozmnazania jęczmienia i owsa metodą wg Ganeshan i wsp. (10)

Gatunek	Odmiana	Liczba eksplantatów (powtórzeń)	Eksplantaty niemnożące pędów (%)	Liczba uzyskanych pędów	Średnia liczba pędów z eksplantatu	
					wyłożonego	reagującego
jęczmień zwyczajny	Basza	47 (2)	12,8	295	6,3	7,2
	Stratus	246 (10)	9,8	4212	17,1	19,0
owies zwyczajny	Bohun	200 (8)	23,0	5613	28,1	36,4
	Szakał	121 (5)	18,2	6500	54,2	66,2
LSD $_{\alpha=0,05}$					5,55	5,96

Modyfikacja metody S polegająca na powtórzeniu pasażu wydłużającego pędy okazała się istotnie korzystna, ponieważ w kombinacji S3 otrzymano 3-4 razy więcej pędów niż w S1 (tab. 4). Być może przyczyną wolnego wzrostu pędów owsa była niekorzystna reakcja na picloram lub zbyt wysokie stężenie zastosowanych regulatorów. W badaniach Ganeshan i wsp. (7,10) we wszystkich fazach mikrorozmnazania optymalne stężenie TDZ było niższe niż w pracach Sharma i wsp. (8,9).

Tabela 4

## Skuteczność modyfikacji metody wg Sharma i wsp. (8) u odmian owsa

Kombinacja	Odmiana Bohun			Odmiana Szakał		
	Liczba eksplantatów (powtórzeń)	Średnia liczba pędów z eksplantatu		Liczba eksplantatów (powtórzeń)	Średnia liczba pędów z eksplantatu	
		wyłożonego	reagującego		wyłożonego	reagującego
S 1	75 (3)	15,5	19,0	55 (3)	10,4	11,5
S 2	100 (4)	18,2	22,6	49 (2)	14,3	20,1
S 3	75 (3)	45,9	56,2	55 (3)	43,0	46,4
LSD $_{\alpha=0,05}$		3,76	19,04		17,61	14,39

S1 – 1 x pasaż mnożący + 1 x pasaż wydłużający pędy, S2 – 2 x pasaż mnożący + 1 x pasaż wydłużający pędy, S3 – 1 x pasaż mnożący + 2 x pasaż wydłużający pędy.

Pędy obu gatunków o długości 3-5 cm lub większe ukorzeniały się w 70-100% w ciągu 2-4 tygodni.

#### 4. Podsumowanie

– Wierzchołki siewek, uzyskane w kulturze z dojrzałych suchych ziarniaków badanych odmian jęczmienia i owsa, mnożyły pędy bez pośrednictwa kalusa. W czasie jednego cyklu kultury, tj. 3-3,5 miesięcy, uzyskano średnio od kilku do kilkudziesięciu namnożonych roślin z jednego eksplantatu, zależnie od gatunku, odmiany i zastosowanej metody.

– Owies liczniej mnożył pędy niż jęczmień. U obu gatunków wystąpiły istotne różnice odmianowe w zdolności do regeneracji pędów.

– Zastosowane metody różniły się wydajnością, pracochłonnością i długością okresu kultury. Najbardziej skuteczna okazała się procedura G wg Ganeshan i wsp. (10). Procedura Z wg Zhang i wsp. (4) była nieco bardziej pracochłonna (odplewanie, kilkakrotne przycinanie pędów). Wykazano, że w porównaniu z procedurą G metoda S wg Sharma i wsp. (8) była mniej efektywna, ponieważ charakteryzowała się niższym udziałem regenerujących eksplantatów, większą pracochłonnością (różne pożywki dla kolejnych etapów kultury) i koniecznością wydłużenia cyklu mikro-rozmnażania.

#### Literatura

1. Cummings D. P., Green C. E., Stuthman D. D., (1976), *Crop Sci.*, 16, 465-470.
2. Fernandez S., Michaux-Ferrière N., Coumans M., (1999), *Plant Growth Regulation*, 28, 147-155.
3. Eudes F., Acharya S., Laroche A., Selinger L. B., Cheng K. J., (2003), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 73, 147-157.
4. Zhang S., Zhong H., Sticklen M. B., (1996), *J. Plant Physiol.*, 148, 667-671.
5. Zhang S., Williams-Carrier R., Jackson D., Lemaux P. G., (1998), *Planta*, 204, 542-549.
6. Zhang S., Cho M. J., Koprek T., Yun R., Bregitzer P., Lemaux P. G., (1999), *Plant Cell Rep.*, 18, 959-966.
7. Ganeshan S., Båga M., Harvey B. L., Rossnagel B. G., Scoles G. J., Chibbar R. N., (2003), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 73, 57-64.
8. Sharma V. K., Hänsch R., Mendel R. R., Schulze J., (2004), *Plant Cell Rep.*, 23, 9-16.
9. Sharma V. K., Hänsch R., Mendel R. R., Schulze J., (2005), *Plant Breeding*, 124, 242-246.
10. Ganeshan S., Chodaparambil S. V., Båga M., Fowler D. B., Hucl P., Rossnagel B. G., Chibbar R. N., (2006), *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 85, 63-73.