

Regeneracja pędów i stopień ploidalności roślin uzyskanych w kulturach *in vitro* fragmentów walca osiowego haploidalnych łodyg tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.)

Anna Trojak-Goluch

Zakład Hodowli i Biotechnologii Roślin, Instytut Uprawy Nawożenia i Gleboznawstwa – Państwowy Instytut Badawczy
Czartoryskich 8, 24-100 Puławy, Polska

Abstrakt. Materiał roślinny stanowiły haploidy uzyskane z kultury *in vitro* pylników dwukierunkowych mieszańców F_1 (BPA i WGL3, WABPA3 i WGL3, PW834 i WGL3), linii hodowlanych (PW834 i WGL3) oraz odmiany ‘Wiślica’ uzyskane uprzednio w ramach programu hodowlanego obejmującego łączenie odporności na choroby grzybowe i wirusowe w genomie tytoniu. Fragmenty walca osiowego łodygi haploidów umieszczano na pożywce Lloyd zawierającej 2 mg/l IAA i 2 mg/l kinetyny. Oceniano efektywność regeneracji pędów tytoniu, a następnie stopień ploidalności uzyskanych roślin za pomocą cytometru przepływowego. Efektywność regeneracji wyrażona liczbą pędów na eksplantat była zróżnicowana i zależała od pochodzenia haploidów (mieszaniec F_1 , linia hodowlana, odmiana). Najmniej zregenerowanych pędów (śr. 2,8/eksplantat) uzyskano z linii hodowlanej PW834. Przyczyną słabych zdolności organogenetycznych była prawdopodobnie obecność w genomie PW834 materiału genetycznego pochodzącego od *Nicotiana alata*. Największą liczbą zregenerowanych pędów (śr. 13,8 i 10,2/eksplantat) charakteryzowały się odpowiednio eksplantaty pozyskane z haploidów mieszańca WGL3 × BPA oraz ‘Wiślicy’. Ocena cytometryczna zregenerowanych roślin wykazała, że w zależności od kombinacji mieszańcowej tytoniu od 59,84% do 89,39% osobników pozostało haploidami, podczas gdy od 10,61% do 32,99% regenerantów było podwojonymi haploidami. Występowała też niewielka liczba poliploidów. Najlepszym donorem eksplantatów do indukcji podwojonych haploidów i poliploidów *in vitro* okazał się mieszaniec WGL3 × WABPA3.

słowa kluczowe: haploid, podwojony haploid, poliploid, organogeneza, efektywność regeneracji

WSTĘP

Tytoń szlachetny (*Nicotiana tabacum* L.) jest jedną z ważniejszych roślin przemysłowych uprawianych w wie-

lu rejonach świata. W ostatnich latach obserwuje się intensyfikację jego produkcji w wyniku wprowadzania do uprawy odpornych na patogeny i wysoko plonujących odmian. Uzyskiwanie nowych, homozygotycznych odmian tytoniu z wykorzystaniem klasycznych metod hodowlanych jest jednak procesem długotrwałym (Seguí-Simarro, 2010). Produkcja podwojonych haploidów (DH) tytoniu pozwala na skrócenie tego okresu i otrzymanie nowej odmiany w ciągu zaledwie kilku lat (Schnell i in., 1980). Umożliwia także selekcję genotypów o pożądanych cechach jakościowych, dlatego produkcja linii DH jest integralną częścią wielu programów hodowlanych na świecie. Pierwsze podwojone haploidy tytoniu uzyskano w kulturze *in vitro* fragmentów liści haploidów w latach 60. XX w. (Bourgin, Nitsch, 1967; Kasperbauer, Collins, 1972). Od tego czasu linie DH tytoniu uzyskuje się zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. W metodzie *in vivo* wykorzystuje się dzikie gatunki z rodzaju *Nicotiana* wykazujące zdolność indukcji haploidów (Burk i in., 1979). Zapylenie roślin *N. tabacum* pyłkiem *N. africana* stymuluje podziały komórki jajowej i partenogenetyczny rozwój haploidalnych zarodków (Doroszevska, 1994). Haploidalne siewki poddaje się działaniu środków mutagennych indukujących poliploidyzację genomu i powstawanie linii DH. Z kolei metoda *in vitro* obejmuje kultury pylnikowe bądź kultury izolowanych mikrospor, regenerację struktur androgenicznych, a następnie podwojenie liczby chromosomów przy użyciu cytostatyków. Podwojenie liczby chromosomów haploidów może także nastąpić drogą organogenezy pośredniej/bezpośredniej w warunkach *in vitro*. Uzyskane w ten sposób regeneranty wymagają weryfikacji cytologicznej, gdyż występują wśród nich zarówno osobniki haploidalne, jak i rośliny o innym stopniu ploidalności.

Wydatność regeneracji podwojonych haploidów w wyniku organogenezy pośredniej fragmentów łodygi jest uzależniona od wieku i stopnia rozwoju haploidalnej rośliny donorowej. Z reguły w tkankach starszych roślin, znajdujących się w fazie generatywnej, zdecydowanie czę-

Autor do kontaktu:

Anna Trojak-Goluch

e-mail: anngol@iung.pulawy.pl

tel. +48 81 4786 933, fax +48 81 4786 900

ściej występują komórki endomitotyczne, dające początek podwojonym haploidom. Podobnie utrzymywanie przez długi czas kultury eksplantatów sprzyja występowaniu zmienności somaklonalnej, w tym poliploidyacji genomu, a w konsekwencji regeneracji podwojonych haploidów (Hamada i in., 2001; Murashige, Nakano, 1967). Wydajność regeneracji linii DH w wyniku organogenezy jest także uzależniona od rodzaju użytego eksplantatu. Walker i Aycoc (1994), stosując kultury fragmentów nerwu głównego liści tytoniu typu Maryland, z 315 haploidów uzyskali 133 podwojone haploidy. Podobnie Smalcelj i Curkovic Perica (2000), wykorzystując jako eksplantaty nerwy liści 29 haploidów mieszańca $GV3 \times$ Virginia D, uzyskali 47 podwojonych haploidów. Z kolei Kasperbauer i in. (1983) do indukcji roślin DH użyli fragmentów korzeni haploidów. U tytoniu bardzo dobre rezultaty indukcji linii DH uzyskuje się przez wyłożenie w warunkach *in vitro* fragmentów łodyg tytoniu na podłoże MS wzbogacone w 2,0 mg/l kinetyny oraz 2,0 mg/l kwasu indoliloctowego (IAA) (Lloyd, 1975). Czubačka i Doroszevska (2004) stosując kultury rdzenia łodygi mieszańców F_1 transgenicznych linii tytoniu i nietransformowanych odpowiedników, uzyskały 66 roślin DH, co stanowiło 34% ogółu regenerantów. Badania Hamady i in. (2001) wykazały, że możliwe jest otrzymanie tą metodą większej liczby podwojonych haploidów (45,7% ogółu badanych). Wymagane jest jednak wstępne prowadzenie kultury w ciemności na podłożu zawierającym 2,0 mg/l IAA i 0,5 mg/l kinetyny, a następnie na świetle na podłożu zawierającym 4-krotnie większą dawkę kinetyny. Prezentowane przez autorów dane wskazują na znaczne zróżnicowanie zdolności do regeneracji roślin w zależności od warunków prowadzenia kultury *in vitro*.

Celem badań było określenie efektywności regeneracji roślin w wyniku organogenezy pośredniej z fragmentów łodyg 6 mieszańców F_1 tytoniu, dwóch linii hodowlanych tytoniu i odmiany uprawnej Wiślica. Analizowano również wpływ użytej formy tytoniu (haploid mieszańca F_1 , linii hodowlanej i odmiany uprawnej tytoniu) na stopień ploidalności zregenerowanych roślin.

MATERIAŁY I METODY

Materiał do indukcji podwojonych haploidów stanowiły haploidy mieszańców F_1 pochodzące z krzyżowania dwukierunkowego linii hodowlanych BPA i WGL3, WABPA3 i WGL3, WGL3 i PW834 (razem 6 obiektów badawczych). Rośliny te uzyskano w trakcie realizacji programu hodowlanego obejmującego wprowadzenie odporności na wirusa brązowej plamistości pomidora i czarną zgniliznę korzeni do odmian uprawnych tytoniu (Trojak-Goluch i in., 2017). Zestaw badanych genotypów obejmował także 2 linie hodowlane WGL3 i PW834. Jako obiekt kontrolny użyto komercyjną diploidalną odmianę Wiślica.

Fragmenty łodyg (3,5 cm) pobrane z haploidów będących w fazie kwitnienia odkażano powierzchniowo przez 20 minut w 10% roztworze podchlorynu sodu, po czym płukano trzykrotnie w sterylnej wodzie destylowanej. Następnie wycinano walec osiowy i wykładano na pożywkę wg Lloyd (1975), zawierającą 2 mg/l kinetyny, 2 mg/l IAA oraz 0,5 mg/l kwasu foliowego i inicjującą tworzenie pędów. Dla każdego obiektu badawczego wyłożono po 5 eksplantatów na szalkę, a doświadczenie wykonano w trzech powtórzeniach (każde reprezentowane przez fragmenty łodyg innej rośliny). Łączna liczba eksplantatów jednego obiektu badawczego wyniosła $5 \times 3 = 15$. Kultury prowadzono w temperaturze 24/26°C, przy oświetleniu 45 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ 16/8 godzin (dzień/noc) przez 3 miesiące. Określono zdolności regeneracyjne eksplantatów 6 mieszańców F_1 , linii hodowlanych i odmiany tytoniu poprzez określenie liczby pędów przypadających na wyłożony fragment i oznaczenie procentowego udziału eksplantatów produkujących pędy. Aktywnie rosnące pędy zawierające co najmniej 2–3 liście odcinano od kalusa i przekładano na pożywkę MS (Murashige, Skoog, 1962). Ukorzenione rośliny przenoszono do doniczek z substratem torfowym i aklimatyzowano do warunków szklarniowych. W celu określenia stopnia ich ploidalności fragmenty liści (1 cm^2) siekano w buforze ekstrakcyjnym Partec z dodatkiem 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindolel, Sigma) (Śliwińska, 2002). Mieszaninę inkubowano przez 60 sekund, filtrowano przez siatki nylonowe \varnothing 35 μm Partec CellTrics i oceniano intensywność fluorescencji DNA w zawieszinie komórek za pomocą cytometru przepływowego Beckman Coulter Cell Lab Quanta™ SC wyposażonego w lampę rtęciową. Każda próba była analizowana dwukrotnie. Pojedynczy pomiar obejmował minimum 5000 jąder komórkowych. Jako wzorzec zewnętrzną w badaniach wykorzystano diploidalną odmianę Wiślica. Określono pozycję (numer kanału) głównego piku G_0/G_1 badanej rośliny i standardu zewnętrznego. Stopień ploidalności wyznaczono ze wzoru:

$$\text{ploidalność} = \frac{\text{średnia pozycja piku } G_0/G_1 \text{ próby}}{\text{średnia pozycja piku } G_0/G_1 \text{ standardu zewnętrznego}} \times \frac{\text{ploidalność standardu zewnętrznego}}$$

Analiza statystyczna danych

Materiał roślinny traktowano jako niezależne obiekty badawcze, nie analizowano zdolności kombinacyjnej mieszańców, a uzyskane wyniki opracowano za pomocą jednoczynnikowej analizy wariancji z wykorzystaniem programu Statistica 9 (StatSoft). Istotność różnic pomiędzy średnimi oceniono na podstawie nieparametrycznego testu Kruskala-Wallisa. Dane procentowe dotyczące liczby eksplantatów regenerujących pędy poddano transformacji Bliss, $x' = \arcsin\sqrt{x}$, a następnie zastosowano test Tukeya przy poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

WYNIKI

Zdolności regeneracyjne mieszańców F₁, linii hodowlanych i odmiany uprawnej tytoniu

Eksplantaty wszystkich obiektów badawczych produkowały niewielką ilość tkanki kalusowej (ryc. 1a). Obserwowany kalus był zielony i zwarty w strukturze. Po około 40 dniach kultury, na powierzchni eksplantatów i w miejscu ich zetknięcia z pożywką zaobserwowano pojawianie się zawiązków pędów. Po kolejnych 7–14 dniach na powierzchni eksplantatów pojawiały się młode pędy (ryc. 1b). Analiza wariancji wykazała, że wykorzystane w badaniach obiekty tytoniu (mieszaniec F₁, linia hodowlana,

odmiana) wpływały w istotny sposób na zdolności morfogenetyczne eksplantatów, tj. liczbę regenerujących eksplantatów i średnią liczbę pędów/eksplantat. Stwierdzono także istotne różnice między mieszańcami tytoniu w zdolności do indukcji podwojonych haploidów i poliploidów (tab. 1).

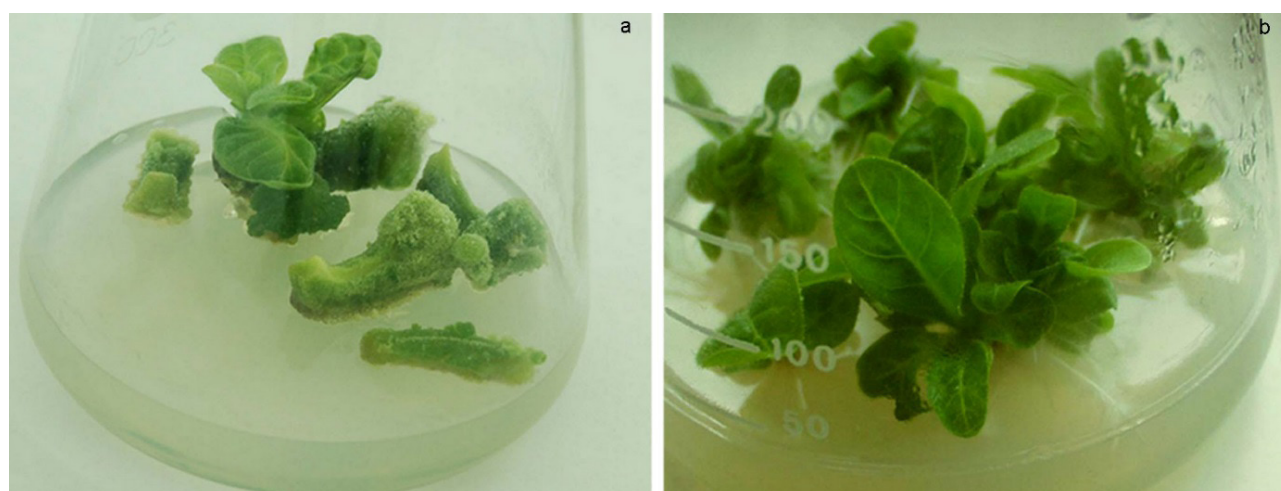
W przypadku większości badanych mieszańców tytoniu udział reagujących eksplantatów był wysoki i przekraczał 80%. Statystycznie istotnie słabiej reagowały eksplantaty pochodzące z mieszańców F₁ BPA × WGL3, w przypadku których zdolności morfogenetyczne wykazało zaledwie 53,3% fragmentów łądyg. Porównanie średniej liczby pędów na eksplantat wykazało, znaczne różnicowanie między obiektami. Najwięcej regenerują-

Tabela 1. Analiza wariancji efektywności regeneracji pędów, indukcji podwojonych haploidów i poliploidów z fragmentów walca osiowego łądygi tytoniu

Table 1. Analysis of variance of the effectiveness of shoot regeneration and tobacco polyploid induction from stem pith fragments of tobacco.

Cecha Trait	Źródło zmienności Source of variation	SS	df	MS	F	<i>p</i>
Średnia liczba pędów/eksplantat Mean no. of shoots/explant		255,81	8	31,977	7,99	0,0001*
Reagujące eksplantaty [%] Responding explants [%]		21,07	8	2,6337	3,61	0,0011*
Liczba haploidów/eksplantat No. of haploids/explant	odmiana/linia cultivar/line	726,28	8	95,28	6,47	0,0000*
Liczba DH/eksplantat No. of DH/explant		99,73	8	12,47	3,07	0,0034*
Liczba poliploidów/eksplantat No. of polyploids/explant		5,73	8	0,72	3,49	0,0011*

DH – podwojone haploidy, SS – suma kwadratów, df – stopnie swobody, MS – średnie kwadraty, * $p \leq 0,05$
DH – doubled haploid, SS – sum of squares, df – degree of freedom, MS – mean squares, * $p \leq 0,05$



Rycina 1. Regeneracja pędów z fragmentów walca osiowego łądygi tytoniu: (a) indukcja kalusa i zawiązków pędów po 40 dniach kultury na pożywce Lloyd, (b) regeneracja pędów po 54 dniach kultury

Figure 1. Shoot regeneration from stem pith fragments of tobacco: (a) induction of callus and shoot buds formation after 40 days of culture on Lloyd medium, (b) shoot regeneration after 54 days of culture.

cych eksplantatów (100%) uzyskano z odmiany Wiślica i linii hodowlanej WGL3 (tab. 2). Mieszaniec F_1 WGL3 \times BPA regenerował niemal pięć razy więcej pędów niż linia PW834 i trzy razy więcej niż mieszaniec BPA \times WGL3. Otrzymane różnice były statystycznie istotne. Efektywność regeneracji pędów na eksplantat w przypadku pozostałych mieszańców/linii hodowlanych była na zbliżonym poziomie. Bardzo dobrym materiałem do regeneracji pędów metodą organogenezy pośredniej okazała się odmiana Wiślica, dla której średnia liczba pędów na eksplantat wyniosła 10,2. Otrzymane pędy odcinano, ukorzeniano, a następnie uzyskane rośliny aklimatyzowano do warunków szklarniowych. Zregenerowane rośliny bardzo dobrze adaptowały się do warunków *in vivo*. Ogółem otrzymano 994 osobniki, których stopień ploidalności oceniano za pomocą cytometru przepływowego.

Tabela 2. Efektywność regeneracji pędów z fragmentów walca osiowego łodygi tytoniu w kulturach *in vitro*

Table 2. Effectiveness of shoot regeneration from stem pith explants of tobacco in the *in vitro* culture.

Linia/odmiana Line/cultivar	Liczba eksplantatów No. of explants	Regenerujące eksplantaty [%] Regenerating explants [%]	Średnia liczba pędów/eksplantat Mean no. of shoots/explant
BPA \times WGL3	15	53,3 a	4,4 \pm 0,6 a
WGL3 \times BPA	15	93,3 ab	13,8 \pm 2,2 c
WABPA3 \times WGL3	15	86,7 ab	6,5 \pm 0,9 ab
WGL3 \times WABPA3	15	80,0 ab	8,5 \pm 0,8 abc
PW834 \times WGL3	15	80,0 ab	5,5 \pm 1,3 ab
WGL3 \times PW834	15	93,3 ab	6,8 \pm 0,6 ab
WGL3	15	100,0 b	7,9 \pm 0,1 ab
PW834	15	66,7 ab	2,8 \pm 0,8 a
Wiślica	15	100,0 b	10,2 \pm 1,5 bc

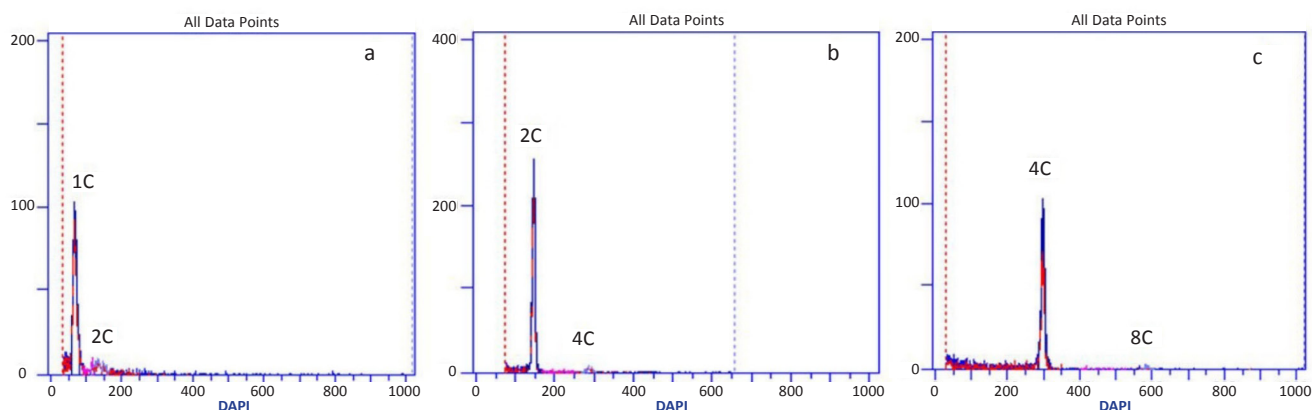
Wartości oznaczone tą samą literą w kolumnie (\pm błąd standardowy) nie różnią się istotnie statystycznie.

Values in each column followed by the same letter (\pm standard error) are not significantly different.

Poziom ploidalności zregenerowanych roślin

Stopień ploidalności zregenerowanych w warunkach *in vitro* roślin tytoniu był zróżnicowany. Wyróżniono haploidy, podwojone haploidy oraz poliploidy. Rycina 2 przedstawia histogramy ilustrujące zawartość DNA w jądrach komórkowych roślin o różnym stopniu ploidalności. Główny pik standardu zewnętrznego był umiejscowiony w kanale 150, podczas gdy u roślin haploidalnych usytuowany był w kanale 75 (ryc. 2a). Natomiast poliploidy generowały pik w kanale 300 (ryc. 2c). W badanej grupie regenerantów przeważały haploidy (73,03%) (tab. 3). Drugą pod względem liczebności grupę stanowiły podwojone haploidy (25,16%). Rzadko występowały poliploidy (1,81%).

Liczba uzyskanych haploidów na eksplantat różniła się w zależności od obiektu badawczego. Statystycznie istotne różnice odnotowano pomiędzy linią hodowlaną PW834 a linią WGL3, mieszańcem WGL3 \times BPA oraz odmianą Wiślica. Test Kruskala-Wallisa potwierdził także statystycznie istotne różnice pod tym względem pomiędzy mieszańcami PW834 \times WGL3 a WGL3 \times BPA. Spośród dziewięciu badanych obiektów, najtrudniej podwojeniu materiału genetycznego poddawały się haploidy linii PW834, dla których liczba osobników DH/eksplantat wyniosła zaledwie 0,27 (tab. 3). Podobnie słabą zdolnością wytwarzania linii DH charakteryzowały się haploidy mieszańca BPA \times WGL3. Liczba roślin/eksplantat z podwojoną zawartością DNA wyniosła w tym przypadku 0,46. Statystycznie istotnie większymi zdolnościami indukcji podwojonych haploidów wyróżniały się natomiast haploidy mieszańców



Rycina 2. Histogramy cytometryczne charakterystyczne dla roślin zregenerowanych z fragmentów walca osiowego łodygi tytoniu: (a) haploid (1C/2C), (b) podwojony haploid (2C/4C), (c) poliploid (4C/8C)

Figure 2. Flow cytometric histograms of plants regenerated from stem pith fragments of tobacco: (a) haploid (1C/2C), (b) doubled haploid (2C/4C), (c) polyploid (4C/8C).

Tabela 3. Frekwencja indukcji haploidów, podwojonych haploidów i poliploidów wśród regenerantów uzyskanych z fragmentów walca osiowego łodygi tytoniu w kulturach *in vitro*Table 3. Frequency of haploids, doubled haploids and polyploids among regenerants obtained from stem pith explants of tobacco in the *in vitro* culture.

Linia/odmiana Line/cultivar	Liczba regenerantów No. of regenerants	Liczba haploidów/ eksplantat No. of haploids/ explant	% haploidów % haploids	Liczba podwojonych haploidów/ eksplantat No. of doubled haploids/ explant	% podwojonych haploidów % doubled haploids	Liczba poliploidów/ eksplantat No. of polyploids/explant	% poliploidów % polyploids
BPA×WGL3	66	3,93 ±0,91 abc	89,39	0,46 ±0,21 a	10,61	0,00 ±0,00 a	0,00
WGL3×BPA	207	10,67 ±1,72 c	77,29	3,01 ±0,68 c	22,23	0,10 ±0,06 a	0,48
WABPA3×WGL3	97	4,07 ±0,76 abc	62,89	2,13 ±0,53 bc	32,99	0,27 ±0,16 ab	4,12
WGL3×WABPA3	127	5,06 ±0,99 abc	59,84	2,73 ±0,78 bc	32,29	0,67 ±0,27 b	7,87
PW834×WGL3	82	4,00 ±1,05 ab	71,95	1,46 ±0,54 ab	26,83	0,10 ±0,06 a	1,22
WGL3×PW834	102	4,77 ±0,61 abc	68,62	2,00 ±0,30 bc	29,69	0,13 ±0,13 a	1,69
WGL3	118	6,33 ±0,55 bc	80,51	1,53 ±0,46 ab	19,49	0,00 ±0,00 a	0,00
PW834	42	2,33 ±0,52 a	83,33	0,27 ±0,24 a	16,67	0,00 ±0,00 a	0,00
Wiślica	153	8,87 ±1,17 bc	77,12	2,33 ±0,60 bc	22,88	0,00 ±0,00 a	0,00
Ogółem; Total	994	5,37 ±0,38	73,03	1,84 ±0,18	25,16	0,13 ±0,00	1,81

Wartości oznaczone tą samą literą w kolumnie (± błąd standardowy) nie różnią się istotnie statystycznie.

Values in each column followed by the same letter (± standard error) are not significantly different.

F₁ tytoniu WABPA3 × WGL3, WGL3 × WABPA3, WGL3 × PW834, WGL3 × BPA i odmiana Wiślica. Haploidy wymienionych mieszańców wyróżniały się także większymi zdolnościami do indukcji roślin poliploidalnych w porównaniu do pozostałych, aczkolwiek uzyskane różnice potwierdzono statystycznie tylko w przypadku mieszańców WGL3 × WABPA3.

DYSKUSJA

Regeneracja tytoniu *in vitro* od lat była przedmiotem prac badawczych (Pathi i in., 2013; Skoog, Miller, 1957; Stolarz i in., 1991). Autorzy podkreślają, że jednym z czynników determinujących efektywność regeneracji pędów tytoniu szlachetnego jest genotyp. Rahman i in. (2010) prowadzili kultury fragmentów liści pięciu odmian tytoniu. Wykazali, że efektywność regeneracji pędów *in vitro* wahała się w zależności od odmiany w przedziale od 40 do 95% (Rahman i in., 2010). Podobnie Ali i in. (2007) wskazali na zróżnicowane zdolności regeneracyjne odmian tytoniu. W przeprowadzonych badaniach własnych również zaobserwowano różnice w zdolnościach do tworzenia pędów pomiędzy użytymi mieszańcami tytoniu. Zdolności regeneracyjne mieszańca WGL3 × BPA były wysokie i osiągały poziom zbliżony do uzyskanego dla odmiany uprawnej, podczas gdy dla mieszańca BPA × WGL3 były istotnie niższe (53,3%). Przyczyny zróżnicowanych zdolności organogenetycznych mieszańców BPA × WGL3 i WGL3 × BPA są trudne do wyjaśnienia. W literaturze do-

tyczącej mieszańców tytoniu brakuje doniesień na temat efektywności regeneracji pędów *in vitro* w zależności od kierunku krzyżowania linii rodzicielskich. Znane autorom prace obejmują najczęściej ocenę cech użytkowych uzyskanych regenerantów, struktury plonu (Burk, Chaplin, 1980; Walker, Aycock, 1994) bądź odporności na PVY linii DH (Smalcelj, Curkovic Perica, 2000). Wykorzystana w niniejszych badaniach linia hodowlana BPA została używana w wyniku krzyżowania międzygatunkowego *N. tabacum* 'BP-210' × *N. africana*, następnie podwojenia liczby chromosomów mieszańca i wielokrotnego krzyżowania wstecznego z odmianą BP-210 (Doroszevska, 2007). Z kolei do uzyskania linii WGL3 wykorzystano *N. tabacum* 'Wiślica' i dziki gatunek *N. glauca* (Trojak-Goluch, Berbec, 2007). Najbardziej prawdopodobną przyczyną słabszej regeneracji pędów z haploidów mieszańców BPA × WGL3 w stosunku do mieszańców WGL3 × BPA wydaje się być niezgodność czynników cytoplazmatycznych matecznej linii BPA z czynnikami jądrowymi ojcowskiej linii WGL3. Efektem tej niezgodności mogą być zakłócenia funkcjonowania komórek mieszańców i obniżenie ich zdolności totipotencjalnych. Sagi i Barnabas (1989) podają, że brak właściwego współdziałania pomiędzy genomem jądrowym i cytoplazmatycznym może modyfikować przebieg i efektywność regeneracji roślin *in vitro* w różnych genotypach pszenicy. Ponadto niezgodność genomów jądrowego i cytoplazmatycznego może być powodem występowania cytoplazmatycznej męskiej jałowości u mieszańców międzygatunkowych i form alloplazmatycznych

tytoniu (Berbeć, Berbeć, 1992) oraz modyfikować poziom odporności na choroby czy wzrost i rozwój tytoniu (Berbeć, 2001; Czubacka i in., 2019).

Mały udział eksplantatów regenerujących pędy, jak również niewielką liczbę pędów na eksplantat zanotowano także w przypadku linii hodowlanej PW384 oraz mieszańca PW834 × WGL3. Linia hodowlana PW834 została otrzymana w wyniku androgenezy *in vitro* mieszańców F₁ uzyskanych z krzyżowania odmian ‘Polalta’ i ‘Wiślica’, a następnie regeneracji podwojonych haploidów. Wielu autorów uważa, że zmienność powstająca w kulturze pylników, a także podczas podwajania liczby chromosomów w trakcie regeneracji roślin DH *in vitro* wpływa negatywnie na wzrost i rozwój roślin uzyskanych linii hodowlanych tytoniu (Brown, Wernsman, 1982; Czubacka, Doroszewska, 2004; Laskowska, Berbeć, 2006). Może być także powodem słabych zdolności organogenetycznych tych linii. W naszych badaniach równie prawdopodobną przyczyną niewielkiej liczby reagujących eksplantatów i małej liczby pędów/eksplantat była obecność w genomie PW 834 i PW834 × WGL3 materiału genetycznego odmiany ‘Polalta’. Odmiana ta nie jest uprawiana ze względu na słabe walory użytkowe, a w jej potomstwie, uzyskanym w wyniku krzyżowania z innymi genotypami tytoniu, ujawniają się liczne zaburzenia wzrostu roślin, deformacje liści i pędów spowodowane oddziaływaniem materiału genetycznego pochodzącego od dzikiego gatunku *N. alata* (Laskowska, Berbeć, 2010).

Szczegółowa analiza cytometryczna roślin zregenerowanych *in vitro* wykazała, że większość z nich stanowiły haploidy zawierające taką samą ilość DNA (1C) jak rośliny donorowe. Odnotowano jednak pewien udział podwojonych haploidów oraz poliploidów, w jądrach których stwierdzono odpowiednio 2C, 4C, 8C DNA. Ich obecność można tłumaczyć występowaniem polisomatyczności, tj. obecności komórek o różnych poziomach poloidalności w wybranych tkankach/organach roślin donorowych. Jak donosi Olszewska (1987), zjawisko to jest wynikiem endoreplikacji, czyli powtarzających się cykli syntezy DNA, separacji chromatyd i wzrostu liczby chromosomów bez występowania podziałów komórkowych. Murashige i Nakano (1967) obserwowali endopoliploidalne jądra w tkankach rdzenia łodygi diploidalnej odmiany Wisconsin 39 *N. tabacum*. Ponadto prowadząc kultury *in vitro*, wykazali, że poziom endopoliploidyzacji w tych tkankach wzrasta wraz z czasem trwania kultury.

W przeprowadzonym eksperymencie udział podwojonych haploidów wynosił 25,16% i był zbliżony do podawanego przez innych autorów (Czubacka, Doroszewska, 2004; Matthews, Vasil, 1975). Zdecydowanie wyższą frekwencję podwojonych haploidów (45,7% ogółu badanych) uzyskali Hamada i in. (2001). Autorzy zastosowali jednak nieco odmienne warunki regeneracji roślin. W pierwszym etapie kultury fragmenty łodyg utrzymywano w ciemności na pożywce MS zawierającej 2 mg/l IAA i 0,5 mg/l kinetyny. Następnie eksplantaty przeniesiono na podłoże MS zawierające 2,0 mg/l IAA

i 2 mg/l kinetyny i oświetlono światłem ciągłym o natężeniu 30,3 μmol·m⁻²·s⁻¹.

Ocena poloidalności zregenerowanych w kulturach *in vitro* roślin wykazała zależność pomiędzy genotypem rośliny donorowej a zdolnością do indukcji podwojonych haploidów. Najlepszym materiałem donorowym do otrzymywania linii DH były mieszańce WGL3 × BPA, WABPA3 × WGL3 oraz WGL3 × WABPA3. Liczba uzyskanych z nich linii DH była istotnie większa od uzyskanej dla kombinacji mieszańcowej BPA × WGL3 i linii PW834. Także Czubacka i Doroszewska (2004), wykorzystując kultury fragmentów rdzeni łodygi mieszańców F₁ uzyskanych ze skrzyżowania transgenicznych linii tytoniu z odmianami nietransformowanymi, wykazały, że genotyp ma decydujący wpływ na wydajność procesu poliploidyzacji. Jak podają, mieszańce BY103 T₁ × ‘BY103’ wyróżniały się trzykrotnie większą zdolnością indukcji podwojonych haploidów niż mieszańce MN944 T₁ × ‘Wiślica’. Zastosowana metoda regeneracji roślin z fragmentów łodyg tytoniu wykazała także wpływ genotypu dawcy eksplantatów na efektywność regeneracji roślin poliploidalnych.

WNIOSKI

1. Badane mieszańce F₁ wykazały znaczne zróżnicowanie pod względem regeneracji pędów z fragmentów walca osiowego haploidalnych łodyg tytoniu w warunkach *in vitro*. Efektywność regeneracji roślin, jak również indukcji podwojonych haploidów zależała od kierunku krzyżowania form rodzicielskich mieszańców F₁.
2. Ograniczone zdolności organogenetyczne walca osiowego haploidalnych łodyg tytoniu oraz mała frekwencja poliploidów wśród regenerantów uzyskanych z dwukierunkowych mieszańców F₁ tytoniu mogą być wynikiem niezgodności pomiędzy genomem jądrowym i cytoplazmatycznym form rodzicielskich.
3. Empiryczne określenie korzystnego kierunku krzyżowania komponentów rodzicielskich ułatwia uzyskiwanie znacznej liczby linii DH z haploidów mieszańców F₁ tytoniu, zwłaszcza tych zawierających geny dzikich gatunków, takich jak: *N. africana*, *N. glauca* i *N. alata*.

PIŚMIENNICTWO

- Ali G., Hadi F., Ali A., Tariq M., Ali Khan M., 2007. Callus induction and *in vitro* complete plant regeneration of different cultivars of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) on media of different hormonal concentration. *Biotechnology* 6(4): 561-566, doi: 10.3923/biotech.2007.561.566.
- Berbeć J., Berbeć A., 1992. Męska jałowosc u tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) uzyskana drogą jednoetapowego podstawienia cytoplazmy gatunku *Nicotiana eastii* Kostoff. *Pamiętnik Puławski*, 100: 135-139.
- Berbeć A., 2001. Floral morphology and some other characteristics of isogenomic alloplasmies of *Nicotiana tabacum* L. *Beiträge zur Tabakforschung International/Contributions to Tobacco Research*, 19(6): 309-314, doi: 10.2478/citr-2013-0717.

- Bourgin J.P., Nitsch J.P., 1967.** Production of haploids *Nicotiana* from excised stamens. *Annales de Physiologie Vegetale*, 9(9): 377.
- Brown J.S., Wernsman E.A., 1982.** Nature of reduced productivity of anther-derived dihaploid lines of flue-cured tobacco. *Crop Science*, 22: 1-5, doi: 10.2135/cropsci1982.0011183X002200010001x.
- Burk L.G., Gerstel D.U., Wernsman E.A., 1979.** Maternal Haploids of *Nicotiana tabacum* L. from Seed. *Science*, 206(4418): 585, doi: 10.1126/science.206.4418.585.
- Burk L.G., Chaplin J.F., 1980.** Variation among anther-derived haploids from a multiple disease-resistant tobacco hybrid. *Crop Science* 20(3): 334-338, doi: 10.2135/cropsci1980.0011183X002000030011x.
- Czubacka A., Doroszewska T., 2004.** Obtaining doubled haploid transgenic tobacco lines by the tissue culture method. *Biotechnologia*, 2: 37-45.
- Czubacka A., Depta A., Doroszewska T., 2019.** Zróżnicowanie reakcji odpornościowej na wirus Y ziemniaka wśród alloplazmatycznych form tytoniu. *Polish Journal of Agronomy*, 39: 27-34, doi: 10.26114/pja.iung.404.2019.39.04.
- Doroszewska T., 1994.** Studia nad mieszańcami międzygatunkowymi *Nicotiana tabacum* L. × *Nicotiana africana* Merxm., Praca doktorska, IUNG w Puławach, AR w Lublinie.
- Doroszewska T., 2007.** Uzyskanie stabilnych linii hodowlanych tytoniu z czynnikami odporności na różne izolaty wirusa Y ziemniaka (PVY) od dzikiego gatunku *Nicotiana africana* Merxm. *Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin*, 224: 273-287.
- Hamada K., Inoue M., Tanaka A., Watanabe H., 2001.** Potato Virus Y-resistance in the progeny of haploid mutants obtained by the culture of *Nicotiana tabacum* L. anthers exposed to ion beams. *Plant Biotechnology*, 18(4): 251-257, doi: 10.5511/plantbiotechnology.18.251.
- Kasperbauer M.J., Collins G.B., 1972.** Reconstitution of diploids from leaf tissue of anther-derived haploids in tobacco. *Crop Science*, 12(1): 98-101.
- Kasperbauer M.J., Legg P.D., Sutton T.G., 1983.** Growth, development, and alkaloid content of doubled haploids vs. inbreds of burley tobacco. *Crop Science*, 23(5): 965-969, doi: 10.2135/cropsci1983.0011183X002300050036x.
- Laskowska D., Berbec A., 2006.** Resistance to *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) in *Nicotiana alata* and *N. sanderae* and in hybrids between *N. tabacum* and *N. alata*. *Plant Breeding and Seed Science*, 54: 91-100.
- Laskowska D., Berbec A., 2010.** TSWV resistance in DH lines of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) obtained from a hybrid between 'Polalta' and 'Wislica'. *Plant Breeding*, 129: 731-733, doi: 10.1111/j.1439-0523.2009.01747.x.
- Lloyd R., 1975.** Tissue culture as a means of circumventing lethality in an interspecific *Nicotiana* hybrid. *Tobacco Science*, 19: 4-6.
- Matthews P.S., Vasil I.K., 1975.** The dynamics of cell proliferation in haploid and diploid tissues of *Nicotiana tabacum*. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 77(3): 222-236.
- Murashige T., Nakano R., 1967.** Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *American Journal of Botany*, 54(8): 963-970, doi: 10.2307/2440719.
- Murashige T., Skoog F., 1962.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15: 473-497, doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.
- Olszewska M., 1987.** Zmiany ilościowe i jakościowe DNA jądrowego podczas różnicowania komórek. *Rocznik Towarzystwa Naukowego Warszawskiego*, 50: 156-160.
- Pathi K.M., Tula S., Tuteja N., 2013.** High frequency regeneration *via* direct somatic embryogenesis and efficient Agrobacterium-mediated genetic transformation of tobacco. *Plant Signaling & Behavior*, 8(6): e24354, doi: 10.4161/psb.24354.
- Rahman M.A., Alam M.A., Hossain M.R., Hossain A., Afroz R., 2010.** *In vitro* regeneration of popular tobacco varieties of Bangladesh from leaf disc. *Bangladesh Journal of Agricultural Research*, 35(1): 125-134, doi: 10.3329/bjar.v35i1.5873.
- Sagi L., Barnabas B., 1989.** Evidence for cytoplasmic control of *in vitro* microspore embryogenesis in the anther culture of wheat (*Triticum-aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 78(6): 867-872, doi: 10.1007/BF00266673.
- Schnell R.J., Wernsman E.A., Burk L.G., 1980.** Efficiency of single-seed-descent vs. anther-derived dihaploid breeding methods in tobacco. *Crop Science*, 20(5): 619-622, doi: 10.2135/cropsci1980.0011183X002000050018x.
- Seguí-Simarro J.M., 2010.** Androgenesis Revisited. *Botanical Review*, 76(3): 377-404, doi: 10.1007/s12229-010-9056-6.
- Skoog F., Miller C.O., 1957.** Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11: 118-130.
- Smalcelj B., Curkovic Perica M., 2000.** Development of anther-derived flue-cured tobacco dihaploids from PVY resistant DH10 hybrid. *Die Bodenkultur*, 51(1): 11-17.
- Stolarz A., Macewicz J., Lorz H., 1991.** Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants of *Nicotiana tabacum* L. *Journal of Plant Physiology*, 137: 347-357, doi: 10.1016/S0176-1617(11)80144-6.
- Śliwińska E., 2002.** Wykorzystanie cytometrii przepływowej w biotechnologii roślin. *Biotechnologia* 1: 122-128.
- Trojak-Goluch A., Berbec A., 2007.** Meiosis and fertility in interspecific hybrids of *Nicotiana tabacum* L. × *N. glauca* Grah. and their derivatives. *Plant Breeding*, 126(2): 201-206, doi: 10.1111/j.1439-0523.2007.01341.x.
- Trojak-Goluch A., Berbec A., Doroszewska T., 2017.** Wykorzystanie gatunków z rodzaju *Nicotiana* w najnowszej krajowej hodowli odpornościowej tytoniu. *Agronomy Science*, 72(4): 47-56, doi: 10.24326/as.2017.4.5.
- Walker D.R., Ayccock M.K., 1994.** Development of anther-derived dihaploids to combine disease resistance in Maryland tobacco. *Crop Science*, 34(2): 335-338.

A. Trojak-Goluch

SHOOT REGENERATION AND PLOIDY LEVEL
OF PLANTS OBTAINED FROM STEM PITH TISSUE
IN VITRO CULTURES OF TOBACCO
(*NICOTIANA TABACUM* L.)

Summary

The plant material were haploids obtained from anther *in vitro* cultures of two-way F₁ hybrids (BPA × WGL3, WGL3 × BPA, WABPA3 × WGL3, WGL3 × WABPA3, WGL3 × PW834, PW834 × WGL3), breeding lines (WGL3 and PW834) and cultivar Wiślica, previously obtained as part of a breeding program involving combining resistance to fungal and viral diseases in the

tobacco genome. Stem pith fragments of haploids were cultured on Lloyd medium containing 2 mg/l IAA i 2 mg/l kinetin. The assessment of shoots regeneration of tobacco as well as the degree of plant ploidy were evaluated using flow cytometer. The efficiency of regeneration, expressed as the number of shoots per explant, varied and depended on the genetic origin of haploids (F_1 hybrid, breeding line, cultivar). The lowest number of regenerated shoots (2.8/explant) were obtained from the breeding line PW834. Poor organogenetic abilities were probably due to the presence of genetic material from *Nicotiana alata* in the PW834 genome. The highest number of regenerated shoots (13.8 i 10.2/explant) was

obtained from haploids of F_1 hybrids WGL3 \times BPA and cultivar Wiślca, respectively. Flow cytometry analysis of regenerants revealed that, depending on the tobacco form, 59.84 to 89.39% of the individuals remained haploids, whereas from 10.61 to 32.99% of the regenerants were doubled haploids. There was also a small number of polyploids. Hybrids WGL3 \times WABPA3 proved to be the best donor of explants for *in vitro* induction of doubled haploids and polyploids.

Keywords: haploid, doubled haploid, polyploid, organogenesis, regeneration efficiency

Artykuł został opracowany w ramach zadania 2.5 Programu Wieloletniego IUNG-PIB.

Autor

ORCID

Anna Trojak-Goluch

0000-0002-5191-4414

data zarejestrowania pracy w redakcji Polish Journal of Agronomy: 20 stycznia 2020 r.

data uzyskania recenzji: 2 marca 2020 r.

data akceptacji: 18 maja 2020 r.



This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution-ShareAlike (CC BY-SA) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).