

KATARZYNA NIEMIROWICZ-SZCZYTT

Katedra Genetyki, Hodowli i Biotechnologii Roślin, SGGW  
Nowoursynowska 166, 02-787 Warszawa,

## HAPLOIDY ROŚLIN W BIOTECHNOLOGII

W naszym otoczeniu, w ogrodzie, w polu, w lesie, nawet w kolekcjach ogrodów botanicznych nie napotykamy roślin haploidalnych. Rośliny haploidalne są dostępne jedynie w specjalistycznych laboratoriach. Zwykle są rozmnażane wegetatywnie *in vivo* lub *in vitro*. Rośliny haploidalne są trudne do otrzymania, najczęściej nieplodne i słabsze pod względem siły wzrostu i odporności od roślin, z których powstały.

Rośliny haploidalne zawierają gametyczną liczbę chromosomów w sporoficie. Innymi słowy są to takie rośliny, które mają połowę liczby chromosomów rośliny rodzicielskiej. Wyróżniamy monoploidy (monohaploidy), które powstały z diploidów i polihaploidy, które powstały z poliploidów. Dla przykładu roślinę haploidalną, która powstała z diploidalnego jęczmienia (*Hordeum vulgare*  $2n=2x=14$ ) nazwiemy monohaploidem ( $n=x=7$ ) a roślinę, która powstała z tetraploidalnego ziemniaka (*Solanum tuberosum*  $2n=4x=48$ ) nazwiemy dihaploidem ( $n=2x=24$ ). Monohaploid jęczmienia ma tylko jeden, podstawowy genom a dihaploid ziemniaka ma ich jeszcze dwa. Z dihaploidów ziemniaka można otrzymać monohaploidy. Po raz pierwszy rośliny haploidalne zostały opisane w latach dwudziestych obecnego stulecia u bielunia dziędzierzawy (*Datura stramonium*) i u tytoniu szlachetnego (*Nicotiana tabacum*). Tytoń stał się rośliną modelową w badaniach nad haploidami.

## OTRZYMYWANIE HAPLOIDÓW

Rośliny haploidalne można otrzymywać różnymi metodami. Prawie zawsze elementem tych metod jest kultura *in vitro* organów generatywnych (pylniki, załączniki, zarodków a także mikrospor na pożywkach stałych lub płynnych). Technika kultur tkanek roślinnych *in vitro* przyczyniła się do otrzymania haploidów u setek gatunków roślin. Jedną z najstarszych metod uzyskiwania haploidów polega na wykorzystaniu procesu apomiksji stymulowanej zapyleniem. Proces apomiksji, czyli mówiąc najprościej, powstawanie nasion z pominięciem procesu zapłodnienia i/lub procesu mejozy, dosyć często występuje w świecie roślin. Dla reprodukcji gatunku jest to zwykle proces marginalny.

Stymulację rozwoju zarodka haploidalnego można wywołać przez zapylenie pyłkiem obcego gatunku, pyłkiem specyficznego klonu lub zapylenie pyłkiem

napromieniowanym. Pod wpływem nietypowego zapylenia następuje rozwój haploidalnego zarodka z niezapłodnionej komórki jajowej lub innej komórki woreczka zalążkowego. Zwykle zarodek haploidalny jest odżywiany przez mniej lub bardziej rozwinięte bielmo. Bielmo rozwija się z zapłodnionej lub tylko pobudzonej do podziałów komórki centralnej.

Zarodki haploidalne zwykle zamierają, jeśli się je pozostawi w nasieniu. Trzeba je izolować i przenosić na sztuczne pożywki, tak by mogły rozwinąć się w rośliny. Dla przykładu około 50% żeńskich kwiatów ogórka zapylnych pyłkiem napromieniowanym (promieniowanie gamma, 0,3 kGy) rozwija się w owoce. W owocach, wśród licznych nasion tylko pojedyncze zawierają słabo rozwinięte zarodki. Zarodki trzeba wyjąć z nasion i przenieść na odpowiednią pożywkę. Tylko część zarodków rozwinie się w rośliny (PRZYBOROWSKI i NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1994).

Roślina monoploidalna, jaką jest haploid ogórka, jest nieplodna i nie wydaje nasion. W kulturze *in vitro* można ją rozmnożyć wegetatywnie i utrzymywać przy życiu przez dłuższy czas. Polihaploidy, otrzymywane opisywaną wyżej metodą, są zwykle bardziej żywotne i częściowo płodne. Dla przykładu dihaploidy ziemniaka ( $2n=2x=24$ ), powstałe po zapyleniu tetraploidalnego ziemniaka (*Solanum tuberosum*  $2n=4x=48$ ) pyłkiem *Solanum phureja*, nie wymagają do wzrostu sztucznej pożywki (HOUGHAS i współaut. 1958) i są częściowo płodne, chociaż zwykle samoniezgodne.

Następna metoda otrzymywania haploidów polega na wykorzystaniu procesu eliminacji chromosomów formy ojcowskiej z zarodków mieszańcowych. Proces ten zaobserwowano i wykorzystano u jęczmienia (*Hordeum vulgare*) zapylnego pyłkiem *Hordeum bulbosum*. Po kilku dniach z komórek zarodka mieszańcowego są eliminowane chromosomy *Hordeum bulbosum*. Powstaje w ten sposób zarodek haploidalny, który dla pełnego rozwoju wymaga kultury na sztucznej pożywce.

W latach sześćdziesiątych została opisana i nabrała rozgłosu trzecia metoda polegająca na indukowaniu sztucznej androgenezy *in vitro*. W wyniku kultury *in vitro* pylników *Datura stramonium* GUHA i MAHESHWARI (1964) otrzymali rośliny haploidalne. Zastosowanie tej metody pozwoliło na otrzymanie w ciągu 35 lat haploidalnych roślin, zarodków bądź kalusa u ponad 200 gatunków. W procesie androgenezy rozwój struktur haploidalnych następuje wyłącznie *in vitro* na pożywkach stałych lub płynnych. Kulturze poddaje się całe pylniki lub uwolnione (izolowane) mikrospory. Rośliną modelową w kulturach pylnikowych jest tytoń a w kulturach wolnych mikrospor rzepak i inne gatunki roślin kapustnych. Gatunkiem uniwersalnym pod względem możliwości zastosowania różnych metod indukowania haploidów jest jęczmień.

Proces gynogenezy, wykorzystywany w czwartej metodzie otrzymywania haploidów, wymaga również kultury *in vitro* na sztucznej pożywce. Haploidalne komórki gametofitu żeńskiego są indukowane do rozwoju w zarodki lub kalus pod wpływem substancji znajdujących się w pożywce. Na pożywkę wyklada się zalążnie lub zalążki, w których ukryty jest żeński gametofit.

Metoda jest trudniejsza od tej, w której wykorzystuje się androgenezę, gdyż kilka komórek woreczka zalążkowego jest otoczonych przez wiele warstw komórek zalążka i jeszcze więcej w przypadku zalążni. Najlepsze wyniki uzyskano tą metodą dla buraka cukrowego (*Beta vulgaris*), u którego nie można było uzyskać

haploidów inną metodą (POTYONDI i HESZKY 1992). Dość dobre wyniki uzyskuje się też dla jęczmienia (CASTILLO i CISTUE 1993).

Wszystkie omówione wyżej metody wymagają zastosowania kultury na sztucznej pożywce *in vitro*. Może to być kultura niedojrzałych zarodków, pylników, mikrospor, załączni lub załączków. Ważne jest by rośliny, z których zostanie pobrany materiał do kultur, rosły w odpowiednich warunkach uprawy. Otrzymanie haploidalnych roślin wymaga wysoko kwalifikowanego personelu i dobrze wyposażonego laboratorium (WENZEL i współaut. 1992).

Dobrze opracowana metoda dla danego gatunku pozwala na otrzymanie setek a nawet tysięcy roślin haploidalnych. Przykładem może być metoda „bulbosowa” dla jęczmienia, kultura pylników lub izolowanych mikrospor tytoniu i rzepaku a także zapylenie pyłkiem napromieniowanym roślin dyniowatych i kultura *in vitro* zarodków haploidalnych.

#### CHARAKTERYSTYKA I SELEKCJA HAPLOIDÓW

Rośliny haploidalne różnią się od roślin diploidalnych, ale różnice morfologiczne nie są wystarczające do udowodnienia poziomu ploidalności. Uważa się, że oszacowanie liczby chromosomów w metafazie podziału mitotycznego lub mejotycznego jest najdokładniejszą metodą sprawdzenia, czy roślina jest haploidem czy też nie. Dla wielu gatunków roślin, szczególnie tych o małych i licznych chromosomach, nie jest to zadanie łatwe.

Z pomocą przychodzi tu cytometria przepływowa, która pozwala na ocenę setek roślin w ciągu jednego dnia. Do badania w cytometrze jest wymagany jedynie niewielki wycinek tkanki, co jest bardzo ważne w przypadku badania regenerujących roślin lub kalusa. Z pomocą coraz lepszych cytometrów można selekcionować nie tylko rośliny, ale także komórki a nawet pojedyncze chromosomy. Wyodrębnienie haploidów z uzyskanej populacji może być również ułatwione przez zastosowanie genów markerowych (HAMZA i współaut. 1993, MORIGNEUX i współaut. 1993).

#### PODWAJANIE LICZBY CHROMOSOMÓW (DOUBLING)

Rośliny haploidalne rozmnażane wegetatywnie *in vivo* lub *in vitro* mogą stanowić obiekt badań same w sobie. Jednak dla otrzymania potomstwa genetywnego, szczególnie u monohaploidów, jest niezbędne podwojenie liczby chromosomów. Otrzymane w ten sposób podwojone haploidy powinny być osobnikami homogametycznymi. Dalej rozmnażane dają wyrównane, homogametyczne linie, bardzo poszukiwane przez hodowców.

W ostatnich latach pojawiły się doniesienia, że DNA haploidów ulega metylacji i mutacjom, szczególnie w kulturze pylników (DEVAUX i współaut. 1993, REED i współaut. 1994).

W pewnych przypadkach, na przykład w kulturze pylników rzepaku, podwojone haploidy powstają częściowo spontanicznie. Jeśli haploidy są stabilne, wtedy najczęściej wykorzystuje się kolchicynę do podwojenia liczby chromoso-

mów. W wyniku traktowania tkanki merystematycznej kolchicyną otrzymuje się diploidy, poliploidy i chimery (NIKOLOVA i NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1995). Przeżywalność roślin traktowanych kolchicyną można zwiększyć stosując kultury pędów lub merystemów (mikropropagacja) *in vitro*. Można też, licząc na spontaniczne podwojenie liczby chromosomów, indukować powstanie kalusa z organów rośliny haploidalnej, na przykład z eksplantatów liści, a następnie doprowadzić do różnicowania roślin (NIEMIROWICZ-SZCZYTT i współaut. 1995).

W przypadku polihaploidów dość często dochodzi do wytwarzania tak zwanych gamet niezredukowanych (NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1990). Jeśli nastąpi połączenie gamet o niezredukowanej liczbie chromosomów, to otrzymamy potomstwo płodne, najczęściej o parzystej liczbie genomów. Oznacza to, że roślin, które nawet w niewielkim procencie wytwarzają gamety niezredukowane, nie trzeba kolchicynować i można je rozmnożyć przez nasiona.

#### HAPLOIDY I CO DALEJ

Rośliny z pojedynczym genomem stanowią bardzo wartościowy materiał badawczy. Można je wykorzystać do badań porównawczych i określić, jak działają poszczególne geny, pozbawione homologicznych partnerów. Można też komórki lub protoplasty roślin haploidalnych wykorzystać do indukowania mutacji lub transformacji. Fuzja dwóch osobników haploidalnych daje najczęściej organizm diploidalny. W ten sposób można połączyć cechy wybranych osobników a także doprowadzić do utworzenia osobników o różnym udziale składników cytoplazmy i jąder łączonych form, tak zwane mieszańce niesymetryczne. Indukowanie mutacji u osobników haploidalnych ma swoje uzasadnienie, gdyż można u nich obserwować ekspresję pojedynczego genu. Przykładem mogą być prace z mutantem haploidalnego tytoniu, w wyniku których charakteryzowano transpozony (GRANDBASTIEN i współaut. 1991). Podobnie po wprowadzeniu genu do komórek organizmu haploidalnego (transformacja) można łatwiej ocenić jego ekspresję niż w roślinie diploidalnej. Przykładem może być transformacja protoplastów pochodzących z mikrospor kukurydzy i regeneracja transgenicznych, haploidalnych roślin (SUKHAPINDA i współaut. 1993). Transformacji poddaje się także zarodki haploidalne, na przykład zarodki *Datura* i *Nicotiana* (SANGWAN i współaut. 1993).

Haploidy okazały się bardzo przydatne w pracach nad mapowaniem genomów. Podwojone haploidy ryżu (TANKSLEY i współaut. 1991), jak i jęczmienia (CHALMERS i współaut. 1993, GRANER i BAUER 1993, HEUN 1992) są wykorzystywane do mapowania przy użyciu techniki RFLP. Także dihaploidy ziemniaka są wykorzystywane do analizy cechy odporności, na przykład na *Phytophthora infestans* (KHARBOTLY i współaut. 1994). Z kolei podwojone haploidy pszenicy stanowiły materiał do identyfikacji alleli locus Pm3, warunkującego odporność na mączniaka (HARTL i współaut. 1993).

Podwojone haploidy i ich generatywne potomstwo są również wykorzystywane w hodowli nowych odmian (NIEMIROWICZ-SZCZYTT 1989). Otrzymano szereg odmian rzepaku, pszenicy, ryżu, jęczmienia, ziemniaków, bawełny a nawet szparagów z linii wprowadzonych z podwojonych haploidów. Dla celów hodow-

lanych zaleca się wykorzystywanie najlepszych mieszańców F1 jako materiału wyjściowego do indukcji haploidów. Prawdopodobieństwo zaindukowania do rozwoju mikrospory lub komórki woreczka zalążkowego o szczególnie korzystnym układzie cech jest wtedy znacznie większe.

Nowe czy poprawione technologie produkcji haploidów byłyby przydatne z punktu widzenia otrzymywania dużych populacji haploidów. Bardzo obiecująca wydaje się produkcja zarodków somatycznych w bioreaktorze a dalej sztucznych nasion (MALEPSZY 1988).

#### PODSUMOWANIE

Otrzymywanie i wykorzystanie haploidów wymaga zastosowania całego szeregu metod o charakterze biotechnologicznym. Kultury tkanek i komórek na stałych lub płynnych podłożach są niezbędnym elementem otrzymywania haploidów. Kultury zawiesinowe w bioreaktorach mogą mieć znaczenie dla rozmnożenia haploidów na większą skalę. Nowe techniki molekularne umożliwiają w coraz większym stopniu precyzyjną charakterystykę haploidów a także selekcję osobników o określonych cechach użytkowych. Manipulowanie protoplastami, wywoływanie mutacji a także transformowanie komórek zmieniają zakres wykorzystania haploidów i sprawiają, że stają się poszukiwanym materiałem do badań. Obok tradycyjnego już wykorzystywania podwojonych haploidów jako materiału wyjściowego do hodowli podkreśla się obecnie ich znaczenie dla konstruowania map genomowych szeregu gatunków roślin.

#### HAPLOIDS IN BIOTECHNOLOGY

##### Summary

Biotechnology is widely applied in haploid production *via* anther or ovule culture or embryo rescue, clonal propagation, doubling, protoplast fusion, mutant induction and transformation.

In several species, new varieties and lines were used in field trials. Genomic maps are based on the RFLP technique, and doubled haploids are under construction. New molecular (RFLP, RAPD) and immunological markers are used for diagnostic assays.

#### LITERATURA

- CASTILLO A. M., CISTUE L., 1993. *Production of gynogenetic haploids of Hordeum vulgare L.* Plant Cell Reports, 12, 3, 139-143.
- CHALMERS K. J., BARUA V. M., HACKETT G. A., THOMAS W. T. B., WAUGH R., POWELL W., 1993. *Identification of RAPD markers linked to genetic factors controlling the milling energy requirement of barley.* TAG, 87, 3, 314-320.
- DEVAUX P., KILIAN A., KLEINHOF S., 1993. *Anther culture and Hordeum bulbosum -derived doubled haploids: mutations and methylation.* Molecular-and-General-Genetics, 241, 5/6, 674-679.
- GRANDBASTIEN M. H., SPIELMANN A., POUTEAU S., HUTNER E., LONGUET M., KUNERT K., MEYER C., ROUZE P., CABOCHE M., 1991. *Characterization of mobile endogenous copia-like transposable elements in the genome of Solanaceae.* [W:] *Plant molecular biology 2.* Proceedings of a NATO Advanced Study Institute, 14-23 May, 1990, Elmau, Germany, HERRMANN R. G., LARKINS B. A. (red.) 333-343, NATO ASI Series A.: Life Sciences 212, New York, USA, Plenum Press.
- GRANER A., BAUER E., 1993. *RFLP mapping of the ym4 virus resistance gene in barley.* TAG 86, 6, 689-693.

- GUHA S., MAHESHWARI S. C., 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204, 497.
- HAMZA S., CAMILLERI C., POLLIEN J. M., VAUCHERET H., BOURGIN J. P., CHUPEAU Y., 1993. Selection for spontaneous tomato haploids using a conditional lethal marker. *TAG* 86, 6, 657-664.
- HARTL L., WEISS H., ZELLER F. J., JAHOOOR A., 1993. Use of RFLP markers for the identification of alleles of the Pm3 locus conferring powdery mildew resistance in wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG* 86, 8, 959-963.
- HEUN M., 1992. Mapping quantitative powdery mildew resistance of barley using a restriction fragment length polymorphism map. *Genome* 35, 6, 1019-1025. HOUGHAS R. W., PELOQUIN S. J., ROSS R. W., 1958. Haploids of the common potato. *J. Hered.* 49, 103-106.
- KHARBOTLY EL., A., LEONARDS-SCHIPPERS C., HUIGEN D. J., JACOBSEN E., PEREIRA A., STIEKEMA W. J., SALAMINI F., GEBHARDT C., 1994. Segregation analysis and RFLP mapping of R1 and R3 alleles conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in progeny of dihaploid potato parents. *Molecular and General Genetics* 242, 6, 749-754.
- LEHMANN C., KROLOW K.D., 1991. Experiments on haploid production from tetraploid triticales by the *Hordeum bulbosum* system and anther culture. *Cereal-Research-Communication* 19, 283-290.
- MALEPSZY S., 1988. Sztuczne nasiona — przełom w nasiennictwie. *Post. Nauk Rol.* 4, 3-15.
- MURIGNEUX A., BARLOY D., LEROY P., BECKERT M., 1993. Molecular and morphological evaluation of doubled haploid lines in maize., 1. Homogeneity within DH lines. *TAG*. 86, 7, 837-842.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1989. Otrzymywanie i zastosowanie haploidów. [W:] *Biotechnologia w genetyce i hodowli roślin*. MALEPSZY S., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., PRZYBECKI Z. (red.) PWN, Warszawa, 151-118.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1990. Strawberry (*Fragaria xananassa* Duch.): *In vitro* production of haploids. [W:] *Biotechnology in Agriculture and Forestry 12. Haploids in crop improvement I*. BAJAJ Y.P.S. (red.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Hong-Kong, 403-416.
- NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., FARIS MUSTAFA N., NIKOLOVA V., RAKOCZY-TROJANOWSKA M., MALEPSZY S. 1995. Optimization of cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid production and doubling. International Conference „Agrobiotechnology”, 17-20 September 1995, Poznań, Poland, Book of Abstracts.
- NIKOLOVA V., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1995. Dyploidyżacja haploidów ogórka (*Cucumis sativus* L.) przy użyciu kolchicyny w warunkach *in vitro*. XII Zjazd Pol. Tow. Genet., Szczecin 27-29 wrzesień 1995, Book of Abstracts.
- POTYONDI L., HESZKY L., 1992. Gynogenetic haploids produced in ovule cultures of male sterile, fertile, mono- and multigerm sugar beet (*Beta vulgaris* L.) lines. *Acta Agronomica Hungarica* 41, 1-2, 125-130.
- PRZYBOROWSKI J., NIEMIROWICZ-SZCZYTT K., 1994. Main factors affecting cucumber (*Cucumis sativus* L.) haploid embryo development and haploid plants characteristics. *Plant BREEDING* 112, 70-75.
- REED S. M., BURNS J. A., WERNSMAN E. A., 1994. Cytological evaluation of tobacco doubled haploids for presence of amplified homologous chromosomal regions. *Crop Science* 34, 1, 236-239.
- SANGWAN R. S., DUCROCQ C., SANGWAN-NORREEL B., 1993. *Agrobacterium* mediated transformation of pollen embryos in *Datura innoxia* and *Nicotiana tabacum*: production of transgenic haploid and fertile homozygous dihaploid plants. *Plant-Science-Limerick* 95, 1, 99-115.
- SUKHAPINDA K., KOZUCH M. E., RUBIN-WILSON B., AINLEY W. M., MERLO D. J., 1993. Transformation of maize (*Zea mays* L.) protoplast and regeneration of haploid transgenic plants. *Plant-Cell-Reports* 13, 2, 63-68.
- TANKSLEY S. D., AHN N., CAUSSE M., COFFMAN R., FULTON T., MCCOUCH S. R., Second G., TAI T., WANG Z., WU K., YU Z., 1991. RFLP mapping of the rice genome. *Rice Genetics II*, Proc. of the Second Intern. Rice Genetics Symp. 14-18 May 1990, 435-442, IRRI, Manila, Philippines.
- WENZEL G., GRANER A., FADEL F., ZITZLSPERGER J., FOROUGHI-WEHR J., 1992. Production and use of haploids in crop improvement. [W:] *Biotechnology and crop improvement in Asia*. MOSS J. P. (red.) 169-179, Patancheru, India, ICRIASAT.