

ПРОДУКЦИЈА НА ХАПЛОИДИ КАЈ ТУТУНОТ IN VITRO

Гордана Мицеска

Научен институт за тутун - Прилеп

ВОВЕД

Со помош на половата (генеративна) репродукција, бројот на хромозомите се редуцира на половина како резултат на мејотичната делба, а нивниот број се удвојува при оплодувањето, односно при спојувањето на машките и женските гамети. Ако мејозата се случува во диплоидните растенија (2 гарнитури од хромозомите се обележуваат како $2n=2x$) клетките имаат $n=x$ хромозоми; ако клетките произлегуваат од растенија без фертилизација тие се викаат монохеплоидни растенија, кои имаат само една гарнитура на хромозоми (x).

Исто така и кај тетраеплоидните растенија (4 гарнитури на хромозоми, $2n=4x$), при мејозата се добиваат клетки со $2n=2x$ хромозоми. Ако растенијата се добиени од овие клетки без фертилизација, тие се познати како дихеплоидни растенија. Генерално кажано, хеплоидните клетки или индивидуи се тие кај кои оригиналниот број на хромозоми бил редуциран на половина.

Ако бројот на хромозоми кај монохеплоидните растенија ($n=x$) е удвоен, спонтано или при оплодување (или со помош на колхицин), тие се хомозиготни хеплоидни растенија кои имаат 2 идентични хромозомни гарнитури ($2n=2x$). Ова дуплирање е многу важно, бидејќи монохеплоидите се стерилни. Како резултат на оплодување на две клетки од кои секоја има $n=x$, но со неидентична хромозомна гарнитура, се формира хетерозиготен диплоид. Како и да е, хомозиготните индивидуи се добиваат од идентични полови клетки (гамети) при мејотичната делба. Ако два хомозигота, кои генетски се многу различни, се вкрстат меѓусебно, тогаш потомците ќе бидат идентични, но хетерозиготни.

Добивањето на спонтаните хеплоиди при вкрстување на растенијата во минатите години па и денес е предмет на интензивни испитувања. Бројот на растителни видови кои се познати денес, кај кои хеплоидите се добиени спонтано in vitro е поголем од

100, но како правило, нивното добивање е многу слабо. Добивањето на хеплоидите in vivo може да се докаже со многу различни техники (Hermsen 1977, 1984, Hermsen and Ramanna 1981, Sneep 1983, Wenzel 1980).

Затоа, целта на овој труд е да ја објасни индукцијата на хеплоидните растенија in vitro.

Hermsen (1977) испитувајќи ја стимулацијата при продукција на женските гамети (гиногенеза) или машките гамети (андрогенеза) во директни хеплоидни индивидуи, дошол до заклучок дека во гиногенезата, која зема главно место in vivo, женските клетки се стимулираат да растат без фертилизација. Во андрогенезата, која се одвива само in vitro, вегетативните или генеративните нуклеуси од поленовите зрна се стимулираат и се развиваат во хеплоидни растенија без оплодување. Во литературата која ја опишува андрогенезата in vitro (Peirik 1979; Bhojwani et al 1986), јасно се гледа дека видовите од фам. Solanaceae се способни за регенерација на хеплоиди од изолирани антери (Сл. 1)

Фамилиите Cruciferae, Graminae и Ranunculaceae можат исто така да формираат хеплоиди (Bajaj 1983; Rashid 1983). Слични резултати се добиени во последните години и кај оризот (Reeves 1986), каде може да се забележи особена корелација помеѓу вегетативната пропација и таа на антерите. Maheshwari et al. (1983) пак докажале дека хеплоидната индукција е можна кај Ангиоспермите и тоа 247 видови и хибриди од 88 рода и 34 фамилии се способни да продуцираат хеплоиди in vitro.

Понекогаш се јавуваат разлики при хеплоидната индукција иако се работи за еден ист род, таа може да биде од многу лесна до неможна. Имено, постојат типични разлики внатре во генот на *Oryza*, *Lycopersicum*, *Arabidopsis*, *Solanum*, *Triticum* и *Nicotiana*.

Cuha и Maheshwari (1964; 1966) работејќи во Индија, први покажале дека

in vitro изолираните антери од *Datura innoxia* биле способни да формираат хаплоидни ембриони.

Додека Bourgin и Nitch (1967) ги добиле првите хаплоидни растенија изолирани од антерите на *Nicotiana tabacum*. До 1964 год. имало многу публикации кои ја објаснувале продукцијата на хаплоидите in vitro. Ова било важно за генетиката, како и вкрстувањето на растенијата. Предностите на хаплоидите биле користени од Sanderland (1973), Hermsen (1977, 1984), Hermsen и Ramanna (1982), Jensen (1977), Reinert и Bajaj (1977), Debergh (1974, 1978), Wenzel (1980), Raghavan (1986).

Генетските испитувања се многу полесни како резултат на индукцијата на хаплоидите, која е проследена со удвојување на хромозомите, при што на побрз начин се добиваат хомозиготни растенија. При генетското удвојување во хомозиготните растенија, рецесивните гени не се маскирани од страна на доминантните. Продукцијата на хомозиготни растенија е важна за вкрстените видови на кои припаѓаат компатибилните растенија, додека пак хетерозиготната е докажана со помош на полинацијата. Ако полинацијата се врши со вкрстување, добивањето на хомозиготни линии е потешко. Зголемувањето на хомозиготноста е исто така опишано и како резултат на нивните полинатори. По правило, високата хомозиготност е резултат на сопствената полинација на растенијата, за да се постигне потполна хомозиготност. Како и да е потребни се од 5-7 генерации за да се постигне целосна хомозиготност. Хомозиготноста е доста важна за оние растенија кои имаат многу долга јувенилна фаза (период од семе до цветање), како и за овошните дрвја, растенијата со луковица и шумските дрвја. Иако со повторување на полинацијата може да се постигне хомозиготност, кај оваа група на растенија тоа е доста долг процес.

Ако е можна поголема популација на хаплоидни клетки, тогаш е можна и индуцираната мутација и селекција на повисоко ниво, па на пр. резистентноста против фитотоксините може да биде издвоена од хаплоидните клетки на популацијата со помош



Сл.1 . Индукција на хаплоиди од антери кај *Nicotiana tabacum* (Лаб. in vitro.ЈНУ Институт за тутун, Прилеп)
Fig.1 Induction of haploids by anther culture in *N. tabacum* (Tob. Institute, Prilep)

на додадената индукциона мутација во хаплоидните клетки. Примери на хаплоидната мутациона индукција се дадени од Nitsch et al. (1969) Sunderland (1973) и Bajaj (1983). Но, често пати in vitro хаплоидите се удвојуваат спонтано, при што се добива хомозиготно потомство. Исто така може да се каже дека додавањето на колхицинот in vitro е многу полесно отколку in vivo.

Често пати подобро е да се работи со протопласти на хаплоидите отколку со диплоиди за соматска хибридизација. Со фузијата на два хаплоидни протопласта се добиваат диплоиди, диплоидите даваат тетраплоиди и тн. Се претпоставува дека добиените монохаплоиди сами по себе не се важни во вкрстувањето на растенијата се додека тие се стерилни, па затоа прво мора да се удвојуваат за да се добијат фертилни растенија. Постојат два метода кои се употребуваат при in vitro техниката за добивање на диплоиден број на хромозоми од хаплоидните: спонтано, со помош на ендомитозата при формирање на случајни ембриони или млади фиданки, или со третирање со колхицин. Вака добиените диплоиди се почетен материјал за понатамошното вкрстување, кое пак би водело во насока на квалитативно и квантитативно добивање на добри хибридни растенија.

ДОБИВАЊЕ НА ХАПЛОИДИ IN VITRO

Испитувајќи го почетниот материјал за добивање на хаплоидни растенија, Debergh (1978) и Sanderland (1978; 1980) дошле до заклучок дека хаплоидите можат да се добијат од:

1. Антери - Испитувањата се однесуваат на начинот на изолирање на антерите, кои се изолираат во тврд или течен хранлив раствор. Понекогаш се стерилизираат затворените пупки, додека во други случаеви

сеуште затворените антери добиени од цветот кој веќе се отворил.

2. Поленови кеси - оваа е помалку употреблива техника (бидејќи има технички проблеми) и е поврзана со подоцнежната работа.

3. Сопцветија кои најчесто растат во течен медиум - овој метод, кој бил употребуван кај *Hordeum*, е корисен за тревите и другите растителни видови кои имаат мали цветови или цветови со редуцирани чашкини листови.

4. Друг метод за добивање на хаплоиди е комбинацијата со помош на гаметофитната продукција и јајцева (овариална) култура, кај *Petunia axillaris* добивањето на хаплоиди е доста ефекасно, со помош на озрачување на поленот. Озрачениот полен ја стимулира гиногенезата, а во мал дел и фертилизацијата.

Сепак, може да се каже дека поголем број на хаплоиди се добиваат од изолирани антери, или понекогаш од полен. Андрогагенезата стана важен извор на хаплоидни растенија *in vitro*. Ова е од големо значење, бидејќи поленовите гранки можат да дадат поголем број на одделни хаплоидни растенија.

Добивањето на индивидуални поленови гранки, колку и да е технички тешко (Debergh 1978; Sunderland 1978; Nitsh 1977; Wenzel 1980; Bajaj 1983), има и свои предности бидејќи:

1. Антерите повеќе не претставуваат пречка при транспортот на солите од медиумот до поленовите гранки.

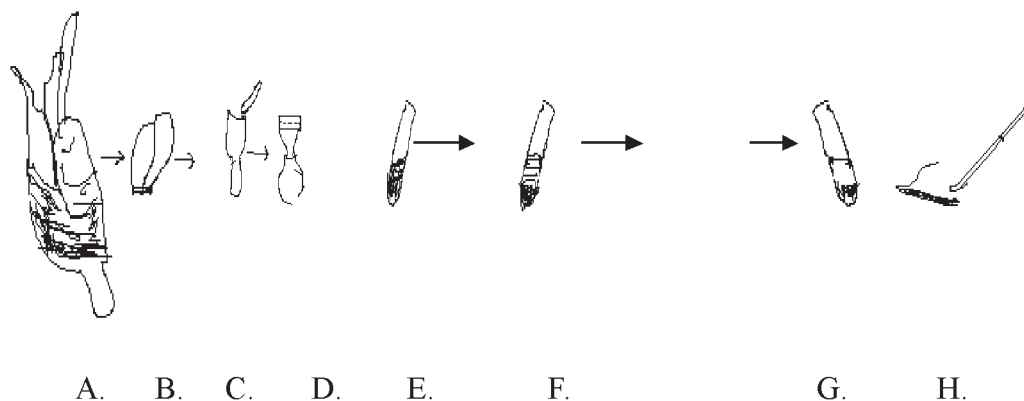
2. Со елминацијата на антерите, инхибиторите АВА и токсичните супстанции повеќе не се проблем.

3. Калусното ткиво од антерите може да биде отстрането.

4. Како почетен материјал за мутациони испитувања и генетички манипулации поленовите гранки се подобри отколку антерите.

5. Ембрионот може полесно да се добие од поленовите гранки отколку од антерите.

Добивањето на хаплоидни растенија досега се вршеше на сложени медиуми и тоа беше многу мало. Иако, поленовите култури се неуспешни за поголем број растенија, сепак тие можат да се добијаат од следниве: *Petunia hybrida*, *Lycopersicon lycopersicum*, *Brassica oleracea*, *N. Tabacum* и *Datura innoxia*.



Антери (B), кои се земени од млад цвет (A), се хомогенизираат со помош на Потеров хомогенизатор (C). На овој начин поленовата суспензија (D) е пурифицирана.

Суспензијата е издвоена (E) и центрифугирана (F), декантирана и инокулирана со пипета (G) на културен медиум во петриеве чаши (H). (Debergh 1974).

Слика 2. Метода за добивање на поленови култури
Fig. 2. Method for obtaining pollen cultures

Последниве неколку години, се направени повеќе истражувања при изолирањето на микроспорите, особено од *Brassica napus* (Keller 1986).

За растење на поленот потребна е посебна специјализирана техника:

1. Иницијално растење на затворе-

ните антери, за да можат да растат во поленовите гранки

2. Екстракција на поленовите гранки (филтрирање, миене, центрифугирање и др.)

3. Апликација на процедурата на развивање.

Хаплоидите во пракса можат да бидат добиени на 2 начина од изолирани антери (Debergh 1978, Reinert и Bajaj 1977).

1. **Директно:** од поленовите гранки (микроспорите)

2. **Индиректно:** прво се формира калус од поленовите гранки, а потоа ембрион, или коренови регенеранти. Овој тип на развиток се среќава и при добивањето на хаплоиди од микроспори со директна органогенеза.

При добивањето на хаплоидите, од голема важност е и големината и стадиумот на развиток на антерите во моментот кога се врши нивната изолатија.

Повеќе автори (Debergh 1978, Reinert и Bajaj 1977, Sunderland и Dunwell) сметаат дека антерите треба да се земаат (изолираат) кога поленовите клетки се уште ја немаат направено првата делба. Dunwell (1985) смета дека подобро е антерите да се изолираат тогаш кога ќе имаат формирано тетради односно во првата поленова митоза. Првата клеточна делба каде има мал генеративен

нуклеус и голем вегетативен нуклеус чие излегување може да се докаже со помош на Feulgen - преса, за да се издвои клеточното јадро. Во некои случаи антерите можат да бидат издвоени во подоцнежен стадиум, некогаш во текот или по првата делба на микроспорите (Nitch 1981, Sunderland 1980).

Одговор на прашањето кога треба да се изолираат поленовите гранки е даден од Heberle - Bors E. (1985). Таа заклучила дека најдобриот стадиум е многу комплексен фактор, кој се состои од 3 дела: Р - гранки (ембрионите на поленовите зрна), матурацијата, (нормално зрели поленови зрна, и нормално зрелите сидови на антерите. Најдоброт развиток секогаш се избира врз база на морфолошките карактеристики. Не секогаш морфолошките карактеристики се совпаѓаат со развитокот на микроспорите (Сл. 3). Кај тутунот, пупките кои треба да се избираат треба да имаат развиени венечни листови кои почнуваат да се покажуваат над чашкините листови на цветот.



Слика 3. Различна големина на пупките кај *Nicotiana tabaccum*
Fig. 3. *N.tabaccum* with various bud size

Формирањето на хаплоидниот ембрион од изолирани микроспори *in vitro* добро е опишан од (Debergh, 1974).

I. Прва поленова митоза при формирање на две симетрични јадра од кои двете се развиваат

II. Прва поленова митоза на две несиметрични јадра (едно вегетативно и едно генеративно) од кои вегетативното се развива, а генеративното угинува

III. Формирање на две симетрични јадра од кои генеративното се развива, а вегетативното угинува

IV. Хаплоиден ембрион

Значи, добивањето на хаплоидите од микроспорите со единечни јадра може да биде на два различни начина: (Sunderland и Dunwell 1974; Reinert и Bajaj 1977) (Сл. 4):

1. Во повеќе случаи после првата јадрена делба која се јавува во генеративните и вегетативните јадра на микроспорите, генеративните јадра дегенерираат или мируваат и само вегетативните јадра се развиваат.

2. Понекогаш вегетативните јадра дегенерираат а генеративните се развиваат. Ова е забележано кај *Hyoscyamus* (Raghvan 1976).

3. При првата делба се формираат

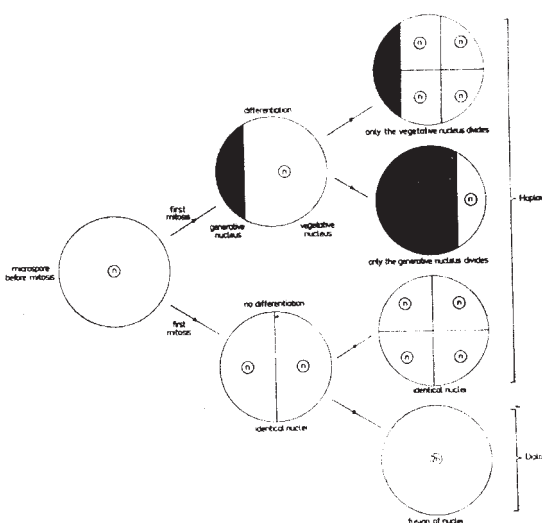
две идентични јадра и двете се развиваат. Ова не упатува кон симетрична микроспорогенеза.

По првата митоза се развиваат неидентични (асиметрични) и идентични симетрични јадра. Резултатот по втората митоза може да биде хаплоид или диплоид. Диплоидните клетки можат да се добијаат со соединување на клетките.

Од голема важност за исходот на митозата се и хранливите или минералните медиуми во кои се одгледуваат микроспороите (поленовите зрна). Обично количината на јаглехидратите се движи од 2 до 4%, Ph средината изнесува 5,8 пред автоклави-

рање, количината на стимулаторите зависи од тоа за кој стадиум на развиток се работи (органогенеза, ризогенеза или целосни растенија). Растењето во течен медиум може да биде доста повољно. Треба да се нагласи дека различните концентрации на минерални материји во хранливите медиуми зависат и од степенот на развиток на антерите во културата. Овој процес најдобро го објасниле од Wenzel и Fouroughi-Wehze (1985) кај домотот.

Физичките фактори како што се, должината на денот, зрачењето, (осветлувањето) односно фотопериодизмот, се многу важни за време на андрогенезата во услови in vitro.



Слика 4. Шематска илустрација на развиток на микроспороите in vitro (Цит. по Bajaj i Reinert 1977, Sunderland i Dunwell)
Fig. 4 In vitro growth of microspores

ЗАКЛУЧОЦИ

✓ Тутунот е идеално растение за добивање на хаплоидни култури. Тутунските култури продуцираат експлозија од хаплоиди кои денес се користат во процесите на хибридизација.

✓ Големината на цветовите е многу важен фактор за процесот на андрогенеза.

Најчесто се користат цветови чии венечни листови се појавуваат над чашкините листови.

✓ Изборот на минералниот медиум како и физичките услови (температура, светлина, влажност, фотопериодизам) се од голема важност при индукцијата на хаплоиди.

ЛИТЕРАТУРА

1. Chawala H.S. 2000. Introduction to Plant Biotechnology. Science Publishers Inc. Enfield, NH, USA.
2. King P.J. 1984. Induction and maintenance of cell suspension culture. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plant. (Vasil I.K. ed)

- Vol.1, pp130-138. Academic Press, New York.
3. Pais M.S., Mavituna F., Novais J.M., 1988. Plant Cell Biotechnology. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, Germany.
4. Мицеска Г. 2003/2004. Примена на методот на андрогенеза во услови in vitro

за добивање на дихаплодни линии тутун од ориенталски тип. Зборник на ДНУ Прилеп, стр. 199-204, том. 19/20.

5. Miceska G., Dimitrieski M., Taskoski P., Gveroska B., 2006. Possibilities for application of new methods in creation of oriental tobacco varieties resistant to *Phytophthora parasitica* var. *nicotianae* in conditions in vitro. 9th Hrvatski bioloski kongres, 23-29 Septemvri, Rovinj.

6. Мицеска Г., Димитриески М., 2006/07. Водич во културата на ткива. Списание на трудови ДНУ, Прилеп, стр. 229-234.

7. Мицеска Г. Димитриески М., 2006. Дихаплоиди од антери на ориенталски тутун и нивните морфолошки својства. Тутун/

Tobacco Vol. 56 No 5-6, стр.85-91.

8. Reinert J., Y.P.S Bajaj 1977. Plant Cell, Tissue and Organ culture. Springer. Verlag. New York p 204.

9. Sunderland, N., Collins, G. B. & Dunwell, J. M. 1974. The role of nuclear fusion in pollen embryogenesis of *Datura innoxia* Mill. - *Planta* 117:227-241.

10. Heberle - Bors E., 1985. *Z. Pflanzenzucht*. 1985. V.95 No1. pp14-22.

11. Zagorska N., Dimitrov B., Ilieva I., Gadeva P., 2001/2002. In vitro induction of androgenesis and gynogenesis in *Rubus caesius* L. and *Rubus idaeus* L. *Genetics and breeding*. Vol. 31 No 3-4 pp.3-1.

IN VITRO HAPLOID PRODUCTION IN TOBACCO

G. Miceska

*Scientific Tobacco Institute, Prilep
Republic of Macedonia*

SUMMARY

In the applications of haploid plants, chromosome doubling has a major role and has been widely researched. Chromosome doubling restores fertility to plants and often results in genetically homozygous doubled haploids. In diploid and allopolyploid species these homozygous plants have the potential to become pure breeding new cultivars or the parents for producing uniform hybrids. It is also significantly easier to select for disease, agronomic and quality traits on doubled haploid lines than on F2 plants. With autopolyploid species it is easier to breed and select at the haploid level. However, chromosome doubling to the optimum ploidy level is desired for maximum yield. Chromosome doubling procedures are dictated to some extent by the methods used to produce haploid plants. If the haploid plant is derived from the male gamete (androgenesis) it is often feasible to apply doubling treatments at the single uninucleate stage or at the first post-meiotic mitotic division (PMI). What was initially described as spontaneous doubling may actually result from the type of pretreatments used to induce embryogenesis. More recently, the use of anti-microtubule agents for induction of both embryogenesis and chromosome doubling from microspores are leading to improved doubling frequencies. Evidence suggests that much of the microspore stage doubling could arise through nuclear fusion. The female gamete is protected by the ovule, making it more difficult to study and apply treatments for chromosome doubling. These gynogenetic haploids most often have come from ovule culture or chromosome elimination and the haploid seedlings are often the stage available for treatment to double the chromosomes.

Author's address:

Gordana Miceska

Scientific Tobacco Institute, Prilep

e-mail: miceskag@mail.net.mk

7500 Prilep

Republic of Macedonia