

UZGOJ HAPLOIDNIH BILJAKA DUHANA U UVJETIMA *IN VITRO*

PRODUCTION OF HAPLOID TOBACCO PLANTS IN *IN VITRO* CONDITIONS

M. Ćurković - Perica, S. Mihaljević

SAŽETAK

Duhan, tipa flue cured; F2 generacija križanaca između sorte NC 567 i linije GV3NN11, očitovao je dobru reakciju antera na B podlozi (BAJAJ, 1983.). Broj reagiranja antera i broj dobivenih haploida ovisio je o datumu branja pupova, veličini pupova i trajanju hladnog predtretmana.

Najbolja androgeneza dobivena je upotrebom prvih cvjetnih pupova, dužine 15-20 mm. Za poticanje androgeneze bio je dovoljan hladni predtretman od jednog dana, na 4°C. Prvi haploidi pojavili su se 4 tjedna nakon nasadivanja antera na hranidbenu podlogu. Haploidi prebačeni na MS podlogu (MURASHIGE i SKOOG, 1962.) dobro su se razvijali u uvjetima 16-satnog osvjetljenja i pri temperaturi od 25°C. Nakon 5 tjedana postigli su visinu potrebnu za prebacivanje biljaka u uvjetima *in vivo*. Tokom uzgoja *in vitro*, 8 % kultura se zagadilo, a 2 % je propalo zbog aneuploidnog broja kromosoma. Kod prebacivanja u uvjete *in vivo*, propalo je 3 % haploida.

UVOD

Želeći uzgojiti kalus iz antera, GUHA i MAHESHWARI (1964.) otkrili su da se polen vrste *Datura innoxia* može potaknuti na diobu i morfogenezu kultiviranjem antera na hranidbenoj podlozi u uvjetima *in vitro*. Od tada se metoda androgeneze primjenjuje za dobivanje haploidnih biljaka, koje se koriste u genetičkim i oplemenjivačkim istraživačkim programima. Androgeneza i diploidizacija haploidnih, fertilnih biljaka, primjenjuju se u oplemenjivanju brojnih biljnih vrsta (SANGWAN I SANGWANNORREEL, 1990.). Međutim, primjena ovih metoda je ograničena, jer je androgeneza do sada potaknuta samo kod biljnih porodica *Solanaceae*, *Cruciferae*, *Gramineae*. Primjenu haploida duhana (*Nicotiana tabacum L.*), dobivenih kulturom antera, u genetičkim i oplemenjivačkim programima opisali su CHAPLIN i BURK (1974.), COLLINS I sur. (1974.), NAKAMURA i sur. (1974.), VAGERA i sur. (1976.), BURK i sur. (1979.) RUFTY i sur. (1987.) WITHERSPOON i sur. (1991.), YUNG i sur. (1991.). Kod duhana malo je primjera dobivanja nove sorte direktno diploidizacijom haploida iz kulture antera. Takav slučaj postoji u Kini (YEOMAN, 1986.). Dobiveni dihaploidi često se dalje upotrebljavaju u konvencionalnim

oplemenjivačkim programima.

S obzirom na višestruke mogućnosti upotrebe haploida duhana u selekciji, postavile smo kulturu antera radi dobivanja većeg broja haploida.

MATERIJAL I METODE

Kao biljni materijal upotrijebile smo 58 biljaka duhana (*Nicotiana tabacum L.*) tipa flue cured; F2 generacija križanaca između sorte NC 567 i linije GV3NN11, s pokusnog polja Duhanskog instituta Zagreb u Pitomači.

Pupove veličine od 13-23 mm ubrale smo 2., 12. i 22.8.1991. Pri odabiru pupova pazile smo i na omjer čaške i vjenčića. Uzimale smo one pupove kod kojih je vjenčić prerastao čašku za 2-4 mm. Nakon hladnog šoka na 4°C u trajanju od 24-96 sati, pupove smo površinski sterilizirale umakanjem u 70 %-tni etanol, 10 sekundi, a zatim u 1,5 %-tni Izosan-G („Pliva”), 10 minuta. Nakon toga pupove smo isprale tri puta po 5 minuta u sterilnoj vodi. Aseptičkim metodama kulture tkiva iz steriliziranih pupova izolirale smo antere i nasadile na krutu hranidbenu podlogu po BAJAJU (1983.) (B podloga), pH 5,7. Podloga je sterilizirana 20 minuta na 121°C. Antere smo nasadivale na kosu podlogu, epruvete promjera 30 mm. Epruvete s anterama stavile smo u komoru s temperaturom od 22°C, 14-satnim osvjetljenjem i intenzitetom svjetla od 1000 luxa.

Provele smo i citološka ispitivanja polena iz pupova određenih duljina. Antere smo zgnječile na predmetnom stakalcu i dodale 0,2 %-tni orcein. Polen smo promatrale svjetlosnim mikroskopom uz povećanje od 800x. Haploidne biljke presađivale smo na krutu hranidbenu podlogu po MURASHIGE i SKOOGU (1962.) s dodatkom tiamina i riboflavina (0,5 mg/l), nikotinske kiseline (0,5 mg/l), saharoze (20 g/l) i agara (9 g/l) (MS podloga), pH 5,7. Haploidi su uzgajani na 25°C, pri 16-satnom osvjetljenju i intenzitetu svjetla od 3000 luxa. Haploidne biljke visoke oko 15 cm presađivale smo iz epruveta u mješavinu sterilne zemlje i pijeska (volumni omjer 1:1) i prekrivale plastičnim vrećicama zbog bolje prilagodbe na rast u uvjetima *in vivo*. Haploidnost biljaka provjeravale smo citološkom metodom. Korijenčice biljaka fiksirale smo 10 minuta u mješavini metanola i ledene octene kiseline (3:1), isprale u vodi, tretirale 10 minuta u 1N HCl na 60°C, te stavile 30 minuta u 0,2 %-tnu otopinu orceina. Uzorke smo priredile squash metodom i stanice vršnog meristema pregledale pod mikroskopom.

REZULTATI I DISKUSIJA

Uspješnost androgeneze u kulturi antera određuje se postotkom reagiranja antera i brojem dobivenih haploida. Obje vrijednosti variraju ovisno o vrsti, genotipu, razvojnom stadiju polena, dužini hladnog predtretmana i sastavu hranidbene podloge (SANGWAN I SANGWAN-NORREEL, 1990.). Mi smo istraživale reakciju antera

ovisno o datumu branja, dužini hladnog predtretmana (Tablica 1) i dužini pupova (Tablica 2). Biljni materijal ubran tri puta u razmaku od po 10 dana razlikovao se po uspješnosti androgeneze. Najbolje su reagirali ranije ubrani pupovi; reakcija antera kod pupova ubranih 2.8. bila je 33,3 %, kod onih ubranih 12. 8. 18 %, a kod onih ubranih 22.8. 11 %. Uspješnost androgeneze ovisila je i o duljini hladnog predtretmana. O duljini i temperaturi hladnog predtretmana postoje različiti podaci, od 2 dana na 3-5°C (NITSCH i NORREEL, 1973.) do 12 dana na 7-8°C (SUNDERLAND I ROBERTS, 1979.). Mi smo uspoređivale uspješnost androgeneze pri hladnom tretmanu od 24-96 sati na 4°C (Tablica 1). Frekvencija *in vitro* androgeneze ovisi o razvojnom stadiju polena (SANGWAN I SANGWANORREEL, 1987.). Razvojni stadij polena vezan je uz dužinu pupa, pa se dužina pupa može upotrijebiti kao pokazatelj "starosti" antera. Iz dobivenih rezultata (Tablica 2) može se vidjeti da su najbolje reagirale antere iz pupova duljine 15-20 mm. Citološkim analizama (Sl. 1) utvrdile smo da je polen u tim pupovima bio jedno i dvojezgreni, što odgovara rezultatima (SANGWAN I SANGWANORREEL, 1987.) prema kojima je za androgenezu najpovoljniji polen u kasnoj jednojezgrenoju ili ranoj dvojezgrenoju fazi. Osim dužine pupa važan je omjer čaške i vjenčića.

Tabela 1. Uspješnost kulture antera u ovisnosti o eksperimentalnim uvjetima
Table 1. Anther culture efficiency in relation to the experimental conditions

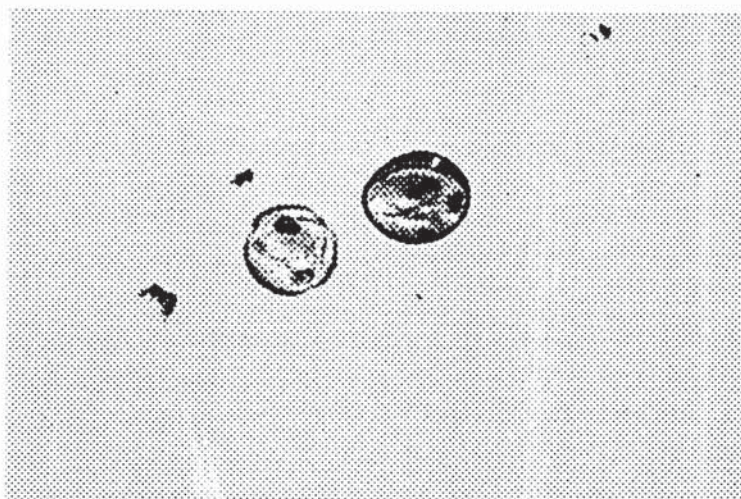
datum branja date of picking	hladni predtretman (sati) cold treatment (hours)	broj nasadenih antera no. of inoculated anthers	broj reagiranja antera no. of anthers that reacted	broj haploida no. of haploids	broj preživjelih haploida no. of haploids that survived
2.8.	72	173	68	748	653
2.8.	96	198	58	506	461
12.8.	24	283	51	375	283
22.8.	24	111	13	40	36
22.8.	48	107	11	49	46

Prvi haploidi pojavili su se 4 tjedna nakon nasadivanja antera na hranidbenu podlogu (Sl. 2). Najveći broj haploida po broju nasadenih antera (4,3) dobile smo kod pupova ubranih 2.8. i podrvgnutih hladnom predtretmanu od 72 sata. Kada su haploidi postigli veličinu od 5-20 mm presadile smo biljke na MS podlogu (Sl. 3). Biljke visoke oko 15 cm presadile smo iz ove podloge u mješavinu zemlje i pijeska i pokrivale plastičnim vrećicama. Nakon 3 tjedna stvorila se kutikula na lisnim plojkama pa smo skinule vrećice (Sl. 4). Biljke su dalje uzgajane u stakleničkim uvjetima. Preživjelo je 1.479 haploida. Citološki smo ispitale korijenčice 50 biljaka. Četrdeset i devet biljaka imalo je 24 kromosoma (Sl. 5), a jedna je imala 18 kromosoma. Ta biljka narasla je 2 cm i nije se dalje razvijala. Aneuploidija može biti jedan od razloga

što svi nasadeni haploidi nisu preživjeli. Drugi razlog je zagađenost kultura. Osmam nasadenih epruveta se zagađilo. Dio biljaka (3 %) nije podnio prienos u uvjete *in vivo*.

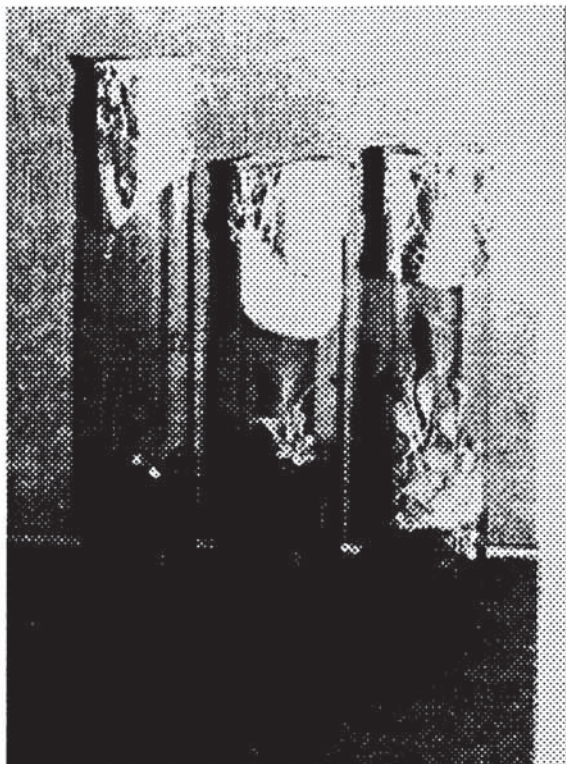
Tabela 2. Ovisnost broja reagiranih antera o dužini pupa.
Table 2. Anther response in relation to the bud length

dužina pupa bud length (mm)	broj nasadenih antera no. of inoculated anthers	reakcija antera anther response (%)
13	18	5,5
14	38	13,2
15	94	34,0
16	77	25,9
17	56	32,1
18	156	30,1
19	81	32,0
20	33	36,4
21	32	28,1
22	20	20,0
23	8	0,0

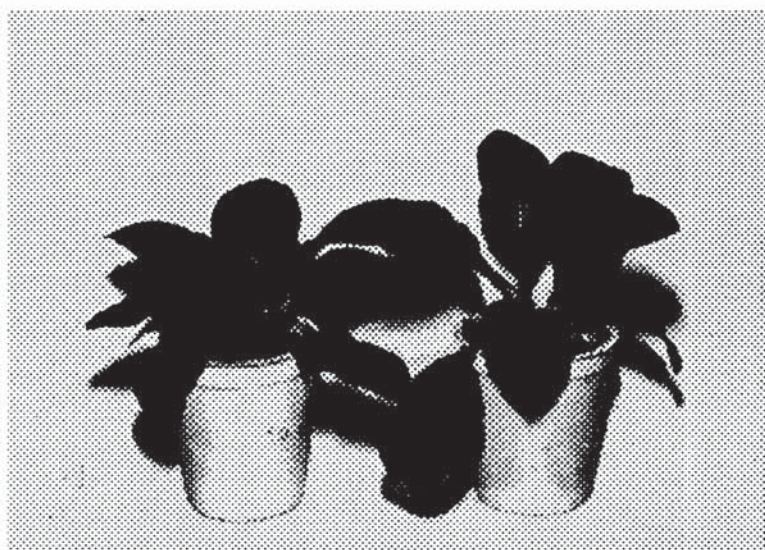


Slika 1.
Fig. 1.

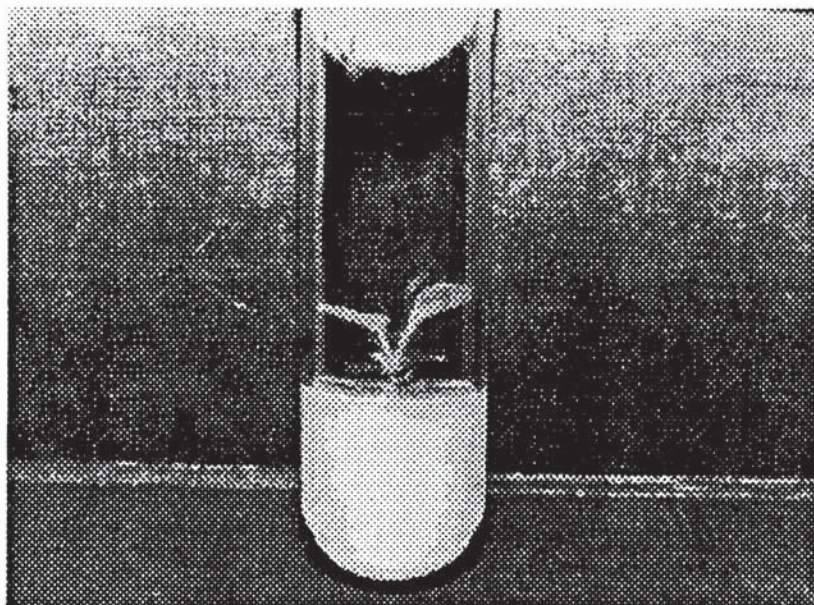
Jedno-i dvojezrena polenova zrnca u pupvima dužine 20 mm
Mono- and dinuclear pollen grains in 20 mm long tobacco buds



Slika 2. Haploidi duhana, 35, 45, 55 dana nakon nasađivanja antera na B podlogu
Fig. 2. Tobacco haploids, 35, 45, 55 days after anther inoculation on B podlogu

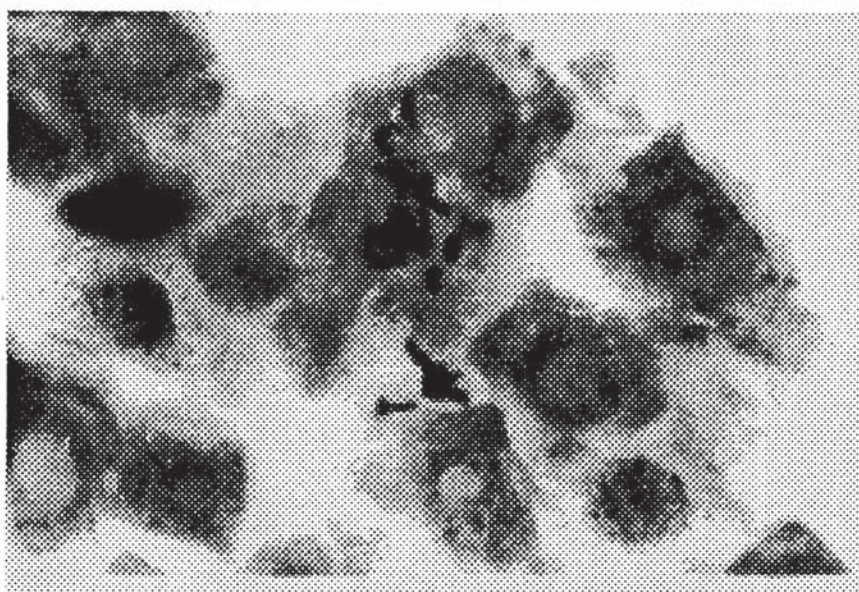


Slika 3. Haploidna biljka stara tri mjeseca, posadena u mješavinu zemlje i pijeska
Fig. 3. Three months old haploid planted in the mixture of sand and soil



Slika 4.
Fig. 4.

Haploid star dva mjeseca na MS podlozi
Two months old haploid on MS medium



Slika 5.
Fig. 5.

Metafazni kromosomi iz vršnog meristema korijena haploidne biljke duhana
Metaphase chromosomes from rooth meristem of haploid tobacco plant

ZAKLJUČAK

Uspostavljena je kultura antera radi dobivanja haploida potrebnih u oplemenjivanju duhana, tipa flue cured. Cvjetni pupovi ubrani su tijekom kolovoza. Najbolje su reagirale antere iz najranije ubranih pupova (37,2 % antera je reagiralo). Za dobru reakciju antera dovoljan je hladni predtretman od 24 sata na 4°C. Dužina pupova od 15-20 mm najpovoljnija je za poticanje androgeneze. Preživljavanje haploida je 87 %.

SUMMARY

Anther culture efficacy of flue cured tobacco; F2 generation (NC567 x GV3 NN11), on B medium (BAJAJ, 1983), was good. Number of induced anthers and number of haploids depended on the date of picking, bud length and cold treatment. The induction of androgenesis was the best in anthers from 15-20 mm long buds. Cold treatment at 4°C for 24 hours was sufficient for the androgenesis induction. The first haploids emerged four weeks after anther inoculation. Haploids that were subcultured on MS medium (MURASHIGE i SKOOG, 1962) grew well in the conditions of 16-hours illumination and at 25°C temperature. After 5 weeks haploids were high for transplantation to *in vitro* conditions eight % of cultures were lost because of contamination and 2 % because of chromosome aberrations. Three % of haploids were lost during transplantation to *in vivo* conditions.

LITERATURA

Bajaj Y P S (1983) *In vitro* production of haploids. In: Evans D A, Sharp W R, Ammirato P V, Yamada Y (eds) Handbook of Plant Cell Culture I; Techniques for Propagation and Breeding, Macmillan publishing co., New York

Burk L G, Chaplin J F, Gooding G V, Powell N T (1979) Quantity production of anther-derived haploids from multiple disease resistant tobacco hybrid. I. Frequency of plants with resistance or susceptibility to tobacco mosaic virus (TMV), potato virus Y (PVY), and root knot (RK). *Euphytica* 28, 201-208

Chaplin J F, Burk L G (1974) Use of haploid/diploid method in flue cured tobacco breeding. p. 9. Abs. Southern Agric. Workers' Cont., Memphis, Tenn.

Collins G B, Legg P D, Litton C C (1974) The use of anther-derived haploids in *Nicotiana*. II. Comparison of double haploid lines with lines obtained by conventional breeding methods. *Tob. Sci.* 18, 40-42

Guha S, Maheshwari SC (1964) *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. *Nature* 204, 497

Jensen C J (1974) Chromosome doubling techniques in haploids. In: First Int. Symp. Haploids in higher plants; Advances and potential. Univ. of Guelph, Ontario, Canada

Kasperbauer M J, Collins G B (1972) Reconstitution of diploids from leaf tissue

of anther-derived haploids in tobacco. *Crop. Sci.* 12, 98-101

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

Nakamura A, Kadotani N, Itagaki R (1974) Improvement of flue cured tobacco variety MC1610 by means of haploid breeding method. In: Kasha K J (ed) *Haploids in Higher Plants Advances and Potential*. Univ. Guelph Press, Canada, pp. 277-278

Nitsch C, Norrel B (1973) Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogène du pollen de *Datura innoxia* cultivé dans l'anthere. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 276, 303-306

Rufty R C, Wernsman E A, Gooding G W (1987) Use of detached leaves to evaluate tobacco haploids and doubled haploids for resistance to tobacco mosaic virus, *Meloidogyne incognita* and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*. *Phytopathology* 77 (1), 60-62

Sangwan R S, Sangwan-Norreel B S (1987) Biochemical cytology of pollen embryogenesis. *Int. Rev. Cytol.* 107, 221-272

Sangwan R S, Sangwan-Norreel B S (1990) Anther and pollen culture. In: Bhowani S S (ed) *Plant Tissue Culture; Applications and Limitations*. Elsevier, Amsterdam, pp. 220-241

Sunderland N, Roberts M (1979) Cold-treatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann. Bot.* 43, 405-414

Vagera J, Novak F J, Vyskot B (1976) Anther cultures of *Nicotiana tabacum* L. mutants. *Theor. Appl. Genet.* 47, 109-114

Witherspoon W D, Wernsman E A, Gooding G V, Rufty R C (1991) Characterization of a gametoclonal variant controlling virus resistance in tobacco. *Theor. Appl. Genet.* 81 (1), 1-5

Yeoman M M (1986) The present development and future of plant cell and tissue culture in agriculture, forestry and horticulture. In: Withers L A, Alderson P G (eds) *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Butterworths, London, pp. 489-500

Yung C H, Wasserman E A, Gooding G V (1991) Characterization of potato virus Y resistance from gametoclonal variation in flue - cured tobacco. *Phytopathology* 81 (8), 887-891

Adresa autora - Author's address:

Primljeno: 29. 01. 1992.

Mr Mirna Ćurković - Perica
Snježana Mihaljević, dipl. ing.
Duhanski institut Zagreb
Tobacco Institute Zagreb