

WPLYW ŚWIATŁA LASERA HELOWO-NEONOWEGO NA ANDROGENEZĘ WYBRANYCH ODMIAN PSZENŻYTA OZIMEGO

Agnieszka Katańska¹, Wojciech Rybiński², Zbigniew Broda¹

¹Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Akademia Rolnicza
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań
e-mail: katanskaa@poczta.onet.pl

²Instytut Genetyki Roślin PAN, ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Streszczenie. Materiałem badawczym były pylniki pszenżyta ozimego odmiany Tornado, Kazo, Bogo, Sekundo, Kitaro i Hewo oraz rodu SZD B 154 hodowane w kulturach *in vitro*. W doświadczeniu wykorzystano światło lasera helowo-neonowego działającego w przedziale światła czerwonego o długości fali 632 nm. Pylniki użyte w kulturach *in vitro* pobierano z roślin otrzymanych z ziarniaków napromieniowanych światłem lasera i z roślin kontrolnych. W drugim wariantcie wykorzystano część roślin kontrolnych, naświetlając pylniki bezpośrednio przed wyłożeniem na pożywkę. Pylniki, pochodzące z obu wariantów stosowania światła lasera, hodowano w kulturze *in vitro* analizując przebieg procesu androgenozy. Liczba uzyskanych kalusów na 100 wykładanych pylników wskazuje na biostymulujące działania światła lasera w porównaniu z kombinacją bez naświetlania (kontrola). Efekt biostymulacji był widoczny zarówno w odniesieniu do pylników pochodzących z roślin uzyskanych po naświetlaniu ziarniaków, jak również po bezpośrednim naświetlaniu pylników. Liczba uzyskanych roślin albinotycznych dla większości odmian była wyższa w kombinacjach ze światłem lasera, nie obserwowano natomiast jednoznacznego oddziaływania światła lasera na zwiększenie liczby zielonych roślin.

Słowa kluczowe: androgeneza, biostymulacja, laser, pszenżyto, pylniki

WSTĘP

Laser jest źródłem światła emitowanego w zakresie od ultrafioletu (poniżej długości fali 400 nm), zieleni (około 500 nm), czerwieni (600 nm) i podczerwieni (powyżej 850 nm). Ten typ światła, łatwy do zogniskowania, równoległy, koherentny, o określonej długości fali w granicach 1 nm, może zostać z powodzeniem wykorzystany do naświetlania różnorodnych obiektów biologicznych.

Światło lasera, jako wąski strumień energii elektromagnetycznej o właściwościach skupiających, monochromatycznych i polaryzacyjnych oddziałuje w sposób specyficzny na materiał genetyczny komórki, powodując w wyższych dawkach uszkodzenia chromosomów i wywoływanie zmian o charakterze mutacyjnym [3,15]. Promienie lasera oddziałując na składniki łańcucha oddechowego mogą aktywizować enzymy lub ograniczać ich działanie, zwiększać szybkość syntezy ATP i liczebność mitochondriów w komórce przy aktywizacji układu immunologicznego całego organizmu. [12,8]. Odzwierciedleniem biostymulującego charakteru światła lasera na nasiona jest wzrost indeksu mitotycznego w komórkach merystematycznych [7] i zdolności kiełkowania [9], oraz przyspieszenie wzrostu kielków, koleoptyli i korzonków zarodkowych [2], a także lepsze i bardziej wyrównane wschody [4], przyspieszenie wzrostu siewek [17], dojrzewania [10] oraz wzrost plonu [6]. Okazuje się również, że laser z powodzeniem można stosować do indukowania biostymulacji pyłku między innymi w celu lepszego osadzania ziaren u mieszańców jęczmienia przy niskim poziomie krzyżowalności rodziców [5,11], stymulacji androgenezy rozwoju mikrospor ziemniaka w metodzie pylnikowej [13] oraz stymulacji wzrostu i rozwoju łagiewek pyłkowych pomiędzy trudno krzyżującymi się gatunkami w obrębie rodzaju *Cuphea* [19]. Naświetlanie ziarniaków przed krzyżowaniem, pyłku *H.bulbosum* oraz wykładanych na pożywkę niedojrzałych zarodków w metodzie bulbosowej umożliwiło wzrost efektywności zastosowanej metody, wyrażonej liczbą uzyskiwanych linii DH jęczmienia [1,16].

Celem przeprowadzonego eksperymentu było określenie wpływu światła lasera na proces androgenezy u wybranych odmian pszenżyta ozimego.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy stanowiły pylniki sześciu odmian: Tornado, Kazo, Bogo, Sekundo, Kitaro i Hewo oraz rodu hodowlanego SZD B 154 pszenżyta ozimego. Do naświetlań obiektów użyto laser helowo-neonowy przygotowany przez Centrum Techniki Laserowej w Warszawie. Laser ten emituje fale o długości 632 nm w przedziale światła czerwonego o mocy 24 mW i jednostką mocy światła na padający obiekt, wynoszącą $1 \text{ mW} \cdot \text{cm}^{-2}$.

Zastosowano dwa warianty naświetlania. W pierwszym, pylniki użyte w kulturach *in vitro* pobierano z roślin otrzymanych z ziarniaków napromieniowanych laserem przez 45 minut oraz z roślin kontrolnych. Część roślin kontrolnych została wykorzystana w drugim wariantcie, gdzie naświetlaniu poddano bezpośrednio pylniki przez okres 5 i 15 minut. Pylniki pochodzące z wariantu 1 i 2

oraz z kombinacji bez naświetlania (kontrola) pobierano ze środkowej partii kłosa w fazie średnio lub późno jednojądrowej, po czym hodowano w warunkach *in vitro* umieszczając je na pożywce indukującej kalus – C17 [18] z dodatkiem 1 mg 2,4 D i 1 mg picloramu na litr pożywki. W każdym powtórzeniu dla jednej kombinacji (odmiana x laser) wykładano po 100 pylników. Cały eksperyment przeprowadzono w trzech powtórzeniach. Hodowlę pylników prowadzono przez 8 tygodni w zaciemnieniu w temperaturze 26° C. Powstały w tym czasie kalus przekładano na pożywkę regeneracyjną 190-2 [20] z dodatkiem 0,5 mg kinetyny i mg NAA. Kalus embriogeny pozostawał na pożywce regeneracyjnej aż do wytworzenia pędów.

Efektywność procesu androgenyzy w obu wariantach mierzono liczbą uzyskiwanych kalusów na 100 wykładanych pylników (w trzech powtórzeniach) w porównaniu z kombinacją kontrolną. Ze względu na małą ilość otrzymanych roślin albinotycznych oraz zielonych, ich liczbę podano w odniesieniu do 300 (suma pylników wyłożonych na pożywkę w trzech powtórzeniach) wykładanych pylników.

WYNIKI I DYSKUSJA

Mimo nielicznych danych literaturowych światło lasera wykorzystuje się w metodach kultur *in vitro*. Z powodzeniem stosowano je do podniesienia efektywności uzyskiwania haploidów w metodzie bulbosowej poprzez: krzyżowanie roślin pochodzących z naświetlanych ziarniaków *Hordeum bulbosum* [1], naświetlanie wykładanych na pożywkę niedojrzałych zarodków [16] oraz naświetlanie pyłku *H. bulbosum* do zapylenia *H. vulgare*. Z wyjątkiem badań ziemniaka [13,14], brakuje niestety danych literaturowych na temat wykorzystania światła lasera do stymulacji androgenicznego rozwoju pyłku. W tabeli 1 przedstawiono liczbę uzyskanych kalusów na 100 wykładanych pylników, w kombinacjach z światłem lasera i kombinacji kontrolnej. Niezależnie od tego czy wykładano pylniki pochodzące z roślin uzyskanych z naświetlanych ziarniaków (wariant 1), czy z bezpośrednio naświetlanych pylników (wariant 2), światło lasera u wszystkich badanych odmian (z wyjątkiem Tornado – wariant 1) wywołało wzrost liczby uzyskiwanych kalusów w porównaniu z kombinacją kontrolną. Wskazuje to na biostymulacyjny wpływ lasera na efektywność androgenyzy. W obu wariantach wielkość efektu biostymulacji zależna była od genotypu badanych odmian. Genotypowe różnice w reakcji na światło lasera w kulturach pylnikowych obserwowano również u ziemniaka [13], gdzie różnica pomiędzy dwoma rodami na 15 minutową ekspozycję światła wynosiła aż 70%. W kombinacji bez naświetlania liczba uzyskanych kalusów na 100 wykładanych

pylników dla badanych form wynosiła od 3,3% do 23,3%. W wariancie 1-szym zakres zmienności badanej cechy wynosił od 6,3-59,7%. Zdecydowanie najwyższą zdolnością do tworzenia kalusa charakteryzowała się odmiana Kazo. W wariancie drugim kombinacji z 5 minutowym naświetlaniem pylników zakres zmienności wynosił od 10,3-42,3%, przy czym najwięcej kalusów uzyskano dla odmian Tornado i Kazo. Przy 15 minutowej ekspozycji światła lasera liczba uzyskanych kalusów wynosiła od 10,7-44,3% i również w tym przypadku najbardziej na światło lasera reagowały odmiany Tornado i Kazo. Wysoka zdolność do androgenicznego rozwoju pyłku odmian Tornado i Kazo obserwowana w kontroli oraz we wszystkich wariantach z laserem wskazuje na znaczną przydatność tych odmian do indukcji androgenezy.

Tabela 1. Wpływ światła lasera na indukcje androgenezy wyrażoną liczbą uzyskanych kalusów na 100 wyłożonych pylników u wybranych odmian pszenżyta ozimego

Table 1. Influence of laser light on the induction of adrogenesis expressed by a number of callus obtained on 100 plated anthers for chosen cultivars of winter triticale

Odmiany Cultivars	Liczba uzyskanych kalusów na 100 wyłożonych pylników Number of callus obtained per 100 anthers plated			
	Kontrola Control	Naświetlanie ziarniaków – laser 45 min (wariant I) Irradiation of grains – laser 45 min (variant II)	Naświetlanie pylników – laser 5 minut (wariant II) Irradiation of anthers – laser 5 min (variant I)	Naświetlanie pylników – laser 15 min (wariant II) Irradiation of anthers – laser 15 min. (variant II)
Tornado	21,3	6,3	42,3	40,0
Kazo	23,0	59,7	34,3	44,3
Bogo	5,3	20,0	18,3	17,0
Sekundo	10,3	11,0	26,3	35,3
Kitaro	12,6	13,6	16,3	16,6
SZD B 154	3,3	20,0	10,3	10,7
Hewo	15,0	15,7	20,0	19,0

Tabela 2. Liczba roślin albinotycznych uzyskanych w wyniku androgenicznego rozwoju pyłku dla wybranych odmian pszenżyta ozimego**Table 2.** A number of albino plants obtained from an androgenic development of pollen for some chosen cultivars of winter triticale

Odmiany Cultivars	Kontrola Control	Naświetlanie ziaren – 45 min (wariant I) Irradiation of grains – 45 min (variant I)	Naświetlanie pylników – 5 min (wariant II) Irradiation of anthers – 5 min (variant II)	Naświetlanie pylników – 15 min (wariant II) Irradiation of anthers – 15 min (variant II)
Tornado	45	1	38	26
Kazo	0	10	23	2
Bogo	5	5	5	11
Sekundo	2	8	0	24
Kitaro	10	6	21	13
SZD B 154	0	1	0	3
Hewo	7	12	3	9

Tabela 3. Liczba zielonych roślin uzyskanych w wyniku androgenicznego rozwoju pyłku u wybranych odmian pszenżyta ozimego**Table 3.** A number of green plants obtained from an androgenic development of pollen for some chosen cultivars of winter triticale

Odmiany Cultivars	Kontrola Control	Naświetlanie ziaren – 45 min (wariant I) Irradiation of grains – 45 min (variant I)	Naświetlanie pylników – 5 min (wariant II) Irradiation of anthers – 5 min (variant II)	Naświetlanie pylników – 15 min. (wariant II) Irradiation of anthers – 15 min. (variant II)
Tornado	0	0	0	2
Kazo	9	17	16	0
Bogo	7	0	0	0
Sekundo	14	3	0	8
Kitaro	0	0	16	0
SZD B 154	0	9	6	6
Hewo	38	4	0	0

Liczba uzyskanych roślin albinotycznych (tab. 2) oraz roślin zielonych (tab. 3) wykazuje, że światło lasera nie działało tu jednoznacznie stymulująco, jak w przypadku liczby kalusów (tab. 1). W wariacie drugim obserwowano większą liczbę roślin albinotycznych, aniżeli w wariacie pierwszym. Światło lasera zwiększało szczególnie efektywnie liczbę roślin albinotycznych w obu wariantach u odmiany Kazo, a redukowało u odmiany Tornado. Zaobserwowano bardzo niejednoznaczny wpływ światła lasera dla liczby zielonych roślin (tab. 3).

Generalnie liczba zielonych roślin była niewielka, co utrudniało wyciąganie obiektywnych wniosków dotyczących wpływu lasera w obu stosowanych wariantach. Dla niektórych odmian i to w zależności od wariantu naświetlania liczba zregenerowanych roślin była wyższa aniżeli w kombinacji kontrolnej (Kazo, SZD B 154, Kitaro), a dla innych niższa (Hewo, Bogo, Sekundo). Wyniki te wskazują, że efektywność światła lasera była wyższa na pierwszym etapie androgenezy (liczba uzyskanych kalusów), a ten pozytywny efekt nie przekładał się w proporcjonalnym, czy jednoznacznym wymiarze na wynik końcowy efektywności androgenezy. Wyniki uzyskane w odniesieniu do androgenicznego rozwoju pyłku ziemniaka [13] wskazują także, że wysoka wartość stymulacji na pierwszych etapach androgenezy (procent dzielących się mikrospor po 7, 14 i 21 dniach, liczba pylników tworzących struktury makroskopowe) nie znajdowała odzwierciedlenia w wyraźnie wyższej liczbie regenerowanych zielonych roślin. Również nasze badania sugerują wpływ czynników innej natury niż oddziaływanie światła lasera na efektywność procesu androgenezy, mierzonej liczbą uzyskanych zielonych roślin.

WNIOSKI

1. Światło lasera w porównaniu z kombinacją kontrolną stymulowało androgeniczny rozwój pyłku wyrażony liczbą kalusa mikrospоровego.
2. Najwyższą liczbę kalusów obserwowano u odmiany Kazo (zarówno w kombinacji bez jak i z naświetlaniem laserem) oraz u odmiany Tornado (w wariacie z bezpośrednim naświetlaniem pylników). Wskazuje to na znaczny potencjał androgeniczny odmiany Kazo w porównaniu z pozostałymi odmianami.
3. Stymulacyjny efekt lasera na pierwszym etapie androgenicznego rozwoju pyłku (liczba kalusów) nie przekładał się jednoznacznie na wzrost liczby zielonych roślin, co wskazuje na to, że raczej czynniki innej natury decydują o efektywności tego etapu androgenezy.

PIŚMIENNICTWO

1. **Adamski T., Jeżowski S., Kraheński P., Rybiński W., Surma M.:** Wpływ światła lasera i NMNUA na efektywność otrzymywania haploidów jęczmienia metoda *H.bulbosum* I. Zeszyty Naukowe AR Kraków, 50, 293-296, 1997.
2. **Drozd D.T., Szajsner H.A., Turzyniecka-Małysz H.:** Zastosowanie światła laserowego do poprawy wartości siewnej pszenicy z lat zbioru 1993-1997. I Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Oddziaływanie pól elektromagnetycznych na środowisko rolnicze”. Lublin, 26-28.09.2001, Referaty i Doniesienia, 13-17, 2001.
3. **Dudin P.:** The frequency of waxy mutations in barley treated with laser irradiation and phytohormones. Genetyka, 26 (2), 363-366, 1990.
4. **Dziamba Sz., Dziamba M.:** Wpływ przedświeceniowego naświetlania nasion światłem na plonowanie i elementy struktury plonu jęczmienia jarego. I Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Oddziaływanie pól elektromagnetycznych na środowisko rolnicze”. Lublin, 26-28.09.2001, Referaty i Doniesienia, 19-24, 2001.
5. **Ivanov M.V., Baberski G.A., Kuznetsova I.V.:** Grain set in spring barley following pollination with pollen treated with laser light. Ispolzowanye Iskusstvennovo Klimata V Selektсии Selsko-hozaistwennych Kultur, 104-107, 1988.
6. **Klimont K.:** Badanie biostymulacji lasera na wartość siewną nasion i strukturę plonu roślin pomidora (*Lycopersicon esculentum* Mill.) i ogórka (*Cucumis sativus* L.). I Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Oddziaływanie pól elektromagnetycznych na środowisko rolnicze”, Lublin, 26-28.09.2001, Referaty i Doniesienia, 132-133, 2001.
7. **Kobrzański M., Różanowski B.:** Wpływ metali ciężkich (kadmu i ołowiu) oraz światła laserów He-Ne i Ar na aktywność mitotyczną komórek merystematycznych korzeni żyta (*Secale cereale* L.). XIV Zjazd Towarzystwa Genetycznego, Poznań, 11-13.06.2000, Streszczenia, 279, 2000.
8. **Koper R.:** Wybrane metody przedświeceniowej laserowej biostymulacji nasion roślin warzywnych. I Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Oddziaływanie pól elektromagnetycznych na środowisko rolnicze”, Lublin, 26-28.09.2001, Referaty i Doniesienia, 31-36, 2001.
9. **Laszkiewicz E.:** Zastosowanie biostymulacji laserowej do podwyższenia wartości siewnej odmian pszenicy twardej (*Triticum durum*). I Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Oddziaływanie pól elektromagnetycznych na środowisko rolnicze”. Lublin, 26-28.09.2001. Referaty i Doniesienia: 45-50, 2001.
10. **Lipski S.:** Polowa ocena napromieniowania laserowego nasion kukurydzy (*Zea mays* L.). I Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Oddziaływanie pól elektromagnetycznych na środowisko rolnicze”, Lublin, 26-28.09.2001, Referaty i Doniesienia, 57-62, 2001.
11. **Matveeva L.P.:** Effect of laser treatment of the pollen on some physiological characteristics of the hybrids in breeding spring barley. Ispolzowanye Iskusstvennovo Klimata V Selektсии Selsko-hozaistwennych Kultur, 98-104, 1988.
12. **Popp F.A.:** Biologia Światła. Wiedza Powszechna, Warszawa, 1988.
13. **Przewoźny T., Rybiński W.:** Wykorzystanie światła lasera do stymulacji androgenyzy i indukowania mutacji u ziemniaka. Prace Ogrodu Botanicznego PAN, 5/6, 547-553, 1994.
14. **Przewoźny T., Rybiński W.:** Stymulujący efekt działania światła lasera na indukcję sporofitycznego rozwoju pyłku ziemniaka. Zastosowanie kultur *in vitro* w fizjologii roślin. Edytorzy – F. Dubert, A. Skoczylas, Kraków, 285-294, 1995.
15. **Rybiński W., Patyna H., Przewoźny T.:** Mutagenic effect of laser and chemical mutagens in barley (*Hordeum vulgare* L.). Genetica Polonica, 34, 337-343, 1993.

16. **Rybiński W., Adamska E.:** Wykorzystanie światła lasera dla uzyskania stymulacji rozwoju zarodka w metodzie bulbosowej. Zeszyty Naukowe AR Kraków, 50, 289-292, 1997.
17. **Szajsner H.A., Drozd D.T.:** Ocena przedsięwziętej biostymulacji laserowej u odmian pszenżyta. I Międzynarodowa Konferencja Naukowa „Oddziaływanie pól elektromagnetycznych na środowisko rolnicze”. Lublin, 26-28.09.2001, Referaty i Doniesienia, 95-98, 2001.
18. **Wang and Chen.:** Preliminary study on prediction of height of pollen H2 generation in winter wheat grown in the field. Acta Agron. Sin., 9, 283-284, 1983
19. **Wojciechowski A., Olejniczak J., Adamska E.:** Evaluation of crossability of *Cuphea lanceolata* and *C.viscosissima* based on pollen tube growth and seed set. J. Appl. Genet., 37, 277-284, 1996.
20. **Zhuang JJ, Xu J.:** Hu H, Vega MR (ed) Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Sci. Press, Beijing, PRC, 431, 1983.

INFLUENCE OF HELIUM-NEON LASER ON ANDROGENESIS IN SOME CHOSEN VARIETIES OF WINTER TRITICALE

Agnieszka Katańska¹, Wojciech Rybiński², Zbigniew Broda¹

¹Department of Genetics and Plant Breeding, University of Agriculture
ul. Wojska Polskiego 71c, 60-625 Poznań
e-mail: katanskaa@onet.poczta.pl

²Institute of Plant Genetics, Polish Academy of Sciences
ul. Strzeszyńska 34, 60-479 Poznań

Abstract. Anthers of winter triticale of Tornado, Bogo, Sekundo, Kitaro, Kazo, Hewo and SZDB 154 breeding lines served as an initial material for the present research. In the experiment, the helium-neon laser operating in a red light range with a wavelength of 632 nm was applied. Anthers used in *in vitro* cultures were selected from the plants obtained from the grains irradiated with laser light and control plants (not irradiated). A part of control plants was used in the second variant in which anthers were irradiated right before placing them on a medium. Anthers from both variants of laser light irradiation were grown in an *in vitro* culture and the processes of androgenesis were analyzed. The number of callus obtained per 100 plated anthers indicated a biostimulating activity of laser light as compared to combinations without irradiation (control). This effect was visible in the case of plated anthers derived from the plants with grain irradiation as well as from directly irradiated anthers. The number of albino plants was higher in the combinations with laser light irradiation but no synonymous effect was observed for the number of green plants obtained.

Key words: androgenesis, anthers, biostimulation, laser, triticale