

AZ IN VITRO ANDROGENEZIS HATÉKONYSÁGÁNAK NÖVELÉSE RIZS (ORYZA SATIVA L.) DH-VONALAK ELŐÁLLÍTÁSÁRA

JANCÓS MIHÁLY¹, LANTOS CSABA², SIMONNÉ KISS IBOLYA², PAUK JÁNOS^{2*}

¹Halászati és Öntözési Kutatóintézet, Akvakultúra Rendszerek Osztály,
5540 Szarvas, Anna-liget 8.

²Gabonatermesztési Kutató Nonprofit Kft., Biotechnológia Osztály,
6726 Szeged, Alsó kikötő sor 9.
*janos.pauk@gabonakutato.hu

ABSTRACT – DH-line production of rice (*Oryza sativa* L.) via *in vitro* androgenesis

Hungary is the northernmost region of rice growing in Europe. The special climatic conditions determine the genotypes, which can be successfully cultured on these paddy fields. The rice breeders used from the beginning the most up to date methods to achieve the main goals e.g. high yield, short duration, high quality and tolerance to abiotic and biotic stresses. The doubled haploid plant production supports the conventional breeding and shortens its time. Here we report on successful induction of *in vitro* androgenesis via isolated microspore culture of Hungarian bred rice varieties (D8 and J16). The effect of different culture media (I_{mi}, C, CHB₃₋₆₀, CHB₃₋₉₀) on the callus production, green and albino plant regeneration was investigated. C and CHB₃₋₉₀ were found beneficial for the induction of *in vitro* androgenesis in isolated microspore culture.

Kulcsszavak: rizs (*Oryza sativa* L.), izolált mikrospóra tenyésztés, *in vitro* androgenézis, DH növény, tápoldat-hatás

Keywords: rice (*Oryza sativa* L.), isolated microspore culture, *in vitro* androgenesis, doubled haploid plant, culture media

Rövidítések: 2,4-D: 2,4-diklór-fenoxi-ecetsav, BAP: 6-benzil-aminopurin, IAA: indol-3-ecetsav, NAA: naftilecetsav, DH: doubled haploid

Abbreviations: 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid, BAP: 6-benzylaminopurine, IAA: indole-3-acetic acid, NAA: naphthalene acetic acid, DH: doubled haploid

BEVEZETÉS

A DH növények felhasználása a hagyományos nemesítésben nagy lehetőséget biztosít a nemesítés idejének csökkentésére, ezáltal a fajta-előállítás költségeinek mérséklésére. BLAKESLEE *et al.* (1922) első, spontán haploidokról szóló beszámolója óta az indukált haploidelőállítás a nemesítők és a növénygenetikusok kutatásainak fontos eszközévé vált.

A rizs (*Oryza sativa* L.) esetében először NIIZEKI ÉS OONO (1968) japán kutatók számoltak be arról, hogy portokkultúrában sikerült indukálniuk az *in vitro* androgenézist, majd több kutató is publikált rizs doubled haploidok előállításáról (NISHI ÉS MITSUOKA 1969; GUHA *et al.* 1970; NIIZEKI ÉS OONO 1971; GUHA 1973). A tenyésztő tápközegben 2,4-D hormont, a regeneráló táptalajban pedig IAA-t és kinetint alkalmaztak. CHU 1975-ben számolt be az N₆ táptalajról, ami az egyik legfontosabb újítás volt a rizs *in vitro* androgenézisének kutatása során. REIFFERS ÉS FREIRE (1990) 1mg/l NAA-val kiegészített N₆ táptalajt és módosított MS regeneráló táptalajt (3mg/l kinetin és 0,5mg/l NAA) használtak sikeres kísérleteikben, de beszámoltak az albínó növények magas arányáról is (a regenerált növények 27%-a). LENTINI *et al.* (1995) a maltóz és az ezüst-nitrát előnyös szerepét igazolták az androgenézis indukálása során.

Izolált mikrospóra tenyésztéssel felnevelt növényről először CHEN *et al.* (1980) közölt adatokat. Azóta számos kutató számolt be hasonló eredményekről és a mikrospóra izolálás megelőző portok előkezelés hatékonyságáról (CHO ÉS ZAPATA 1988, 1990; JIA *et al.* 1987; RAGHAVAN 1988).

A DH-előállítás a nemesítés mellett a kutatás számára is fontos eszköz. A DH populációk felhasználhatóak genetikai térképezésre, pl. AFLP markerek (MAHESWARAN *et al.* 1997) és RAPD markerek (AFZA *et al.* 2001) alkalmazásával. Lehetőséget biztosíthat homozigóta transzgenikus növények előállítására (CHAIR *et al.* 1996), illetve mutánsok izolálására mind kémiai (LEE ÉS LEE 2002), mind fizikai (CHEN *et al.* 2001) mutagének esetén.

Magyarországon a rizs tudományos háttérrel támogatott honosítása 1936-ban indult, és Obermayer Ernő vezetésével rá is találtak az első, nagy sikerrel termelt fajtára, a Dunghan Shalira (SIMON-KISS 2005). Mivel hazánk Európában a rizstermesztés északi határa, a nemesítők az eredményes termelés zálogát, az abiotikus és biotikus stresszek gyakori és súlyos hatása miatt, szinte a kezdetektől fogva a legújabb tudományos eredmények gyakorlati hasznosításában látták (HESZKY ÉS PAUK 1975). Így született a Nucleoryza fajta a mutagén kezelés alkalmazásával (SIMON-KISS 2001), és az első hazai biotechnológiai módszerekkel előállított növényfajta, a Dáma, a szomaklonális variabilitás (HSC) felhasználásával (HESZKY ÉS SIMON-KISS 1992; HESZKY *et al.* 1996). Az *in vitro* androgenezis továbbfejlesztésének közvetlen gyakorlati hasznát bizonyítják a közelmúltban elismert további rizsfajták, a Risabell, a Janka és az Ábel, amelyek nemesítése során a hagyományos pedigree módszert kombinálták a haploid előállítással (PAUK *et al.* 2009).

Az androgenezisen alapuló technikák közül a portoktenyésztés a növény nemesítés széles körben elterjedt eljárásának számít, az izolált mikrospóra tenyésztésnek azonban számos olyan előnye van (szomatikus szövetektől mentes izolált haploid sejtek, androgenezis közvetlen tanulmányozása), ami miatt a nemesítésben rendkívül fontos szerephez juthat a jövőben. Ezért munkánk során a korábbi eredményekre építve az izolált mikrospóra tenyésztés módszerét kívántuk továbbfejleszteni hazai rizsfajták felhasználásával.

ANYAG ÉS MÓDSZER

A vizsgálatainkhoz jó válaszadó képességű rizs genotípusokat választottunk (D8 és J16), amelyek a hazai rizstermesztés meghatározó fajtái. A kísérletekben használt donor genotípusok bugáit a HAKI Galambosi Rizskísérleti Telepén gyűjtöttük be. A mikrospórák ideális fejlettségi állapotát (kései egy sejtmagvas vakuólumos állapot, korai két sejtmagvas állapot) a helyszínen mikroszkóppal ellenőriztük.

Előkezelések és a mikrospórák izolálása

A begyűjtött bugákat csapvízzel töltött lombikokban, műanyag zacskóval lefedve, két-három hétig **hideg előkezelésnek** (4°C) vetettük alá a GK Kft. hidegkamrájában.

A hideg előkezelés után újból ellenőriztük a mikrospórák fejlettségi állapotát, majd a bugákat alkoholos öblítés (70% etanol, 1-2 perc) után 20 percig 2-3 csepp Tween 20 detergenssel kiegészített 50%-os háztartási hipó (2,5% nátrium hipoklorit) oldatban sterilizáltuk. Ezután a bugákat steril vízzel öblítettük le. A portokokat steril 5 ml **0,3 M mannit oldatot** és 200 mg/ml cefotaxime antibiotikumot tartalmazó 55 mm átmérőjű Petri-csészékbe izoláltuk. A portokokat ezután 3 napig 32 °C-on sötét termosztátban tartottuk, az előkezelés során a mikrospórák szinkronizálódtak.

A **mikrospórák izolálását** a korábban publikált protokollnak megfelelően végeztük sűrűség gradiens centrifugálással (LANTOS *et al.* 2005). A mikrospórákat 35 mm átmérőjű műanyag Petri-csészében 1,5 ml tenyésztő tápoldatokban (I_{mi} , C, CHB₃₋₆₀, CHB₃₋₉₀) tenyésztettük (1. táblázat) legalább négy ismétlésben. A CHB₃₋₆₀ és a CHB₃₋₉₀ a tápoldatokhoz adott maltóz mennyiségében különböztek. A tápoldatokban a mikrospórák koncentrációja körülbelül 30000 db/ml volt.

1. táblázat A rizs mikrspórák tenyésztésére alkalmazott tápoldatok (I_{mi} , C, CHB_3) és a növényregenerálásra használt táptalaj (IR) összetétele.

1. KOMPONENSEK	2. I_{mi} (MG/L)	3. CHB_3 (MG/L)	5. C (MG/L)	6. IR (MG/L)
7. NH_4NO_3	8. 1650	9.	10.	11. 1650
12. $(NH_4)_2SO_4$	13.	14. 232,0	15. 231,5	16.
17. KNO_3	18. 1900	19. 1415,0	20. 3134,0	21. 1900
22. $CaCl_2 \times 2H_2O$	23. 440	24. 83,0	25. 150,0	26. 440
27. $MgSO_4 \times 7H_2O$	28. 370	29. 93,0	30. 185,0	31. 370
32. KH_2PO_4	33. 170	34. 200,0	35. 540,0	36. 170
37. $FeSO_4$	38. 27,85	39. 27,8	40. 27,8	41. 27,85
42. NA-EDTA	43. 37,25	44. 37,2	45. 37,3	46. 37,25
47. H_3BO_3	48. 6,2	49. 5,0	50. 6,2	51. 6,2
52. $MnSO_4 \times 4H_2O$	53. 22,3	54. 5,0	55. 22,3	56. 22,3
57. $ZnSO_4 \times 7H_2O$	58. 8,6	59. 5,0	60. 8,6	61. 8,6
62. KI	63. 0,83	64. 0,4	65. 0,83	66. 0,83
67. $Na_2MoO_4 \times 2H_2O$	68. 0,25	69. 0,0125	70. 0,25	71. 0,25
72. $CuSO_4 \times 5H_2O$	73. 0,025	74. 0,0125	75. 0,025	76. 0,025
77. $CoCl_2 \times 6H_2O$	78. 0,025	79. 0,0125	80. 0,025	81. 0,025
82. INOZIT (MYO- INOSITOL)	83. 100	84. 300,0	85. -	86. 100
87. THIAMIN-HCL	88. 1	89. 2,5	90. 2,5	91. 1
92. L-GLUTAMIN	93. 500	94. -	95. -	96. 500
97. NIKOTINSAV	98. -	99. 0,5	100. 2,5	101. -
102. PIRIDOXIN HCL	103. -	104. 0,5	105. 2,5	106. -
107. GLICIN	108. -	109. 1,0	110. 2,5	111. -
112. D-BIOTIN	113. -	114. 0,25	115. -	116. -
117. CA-PANTOTHENATE	118. -	119. 0,25	120. -	121. -
122. ASZKORBINSAV	123. -	124. 0,5	125. -	126. -
127. GLUTAMIN	128. -	129. 1000,0	130. -	131. -
132. KINETIN	133. -	134. 0,5	135. -	136. 2
137. 2,4-D	138. 1,5	139. 0,5	140. -	141. -
142. NAA	143. 0,5	144. -	145. -	146. -
147. BAP	148. 1	149. -	150. -	151. -
152. IAA	153. -	154. -	155. -	156. 0,5
157. $AgNO_3$	158. -	159. -	160. 10,0	161.
162. SZACHARÓZ	163. -	164. -	165. -	166. 30 000 (30G/L)
167. MALTÓZ	168. 60 G/L	169. 60G/L ILLETVE 90 G/L	170. 60 G/L	171. -
172. PH	173. 5,8	174. 5,8	175. 5,8	176. 5,8
177. GELRITE	178. -	179. -	180. -	181. 2 800

A tenyészetekben fejlődő kalluszokat a 2-3 mm-es nagyság elérése után tovább tenyésztettük szilárd táptalajon, majd a fejlődő kalluszokat regeneráló táptalajra (24°C, 16 óra megvilágítás) helyeztük.

Az adatokat statisztikai módszerekkel (egytényezős varianciaanalízis és kétmintás t-próba) elemeztük a Minitab statisztikai programcsomag segítségével.

EREDMÉNYEK

Kísérleteink során, korábbi eredményeinknek megfelelően a portokok 3 napon át tartó 0,3 M mannit oldatos előkezelése után izoláltuk a mikrospórákat, ez az előkezelés alapvető feltétele volt a hatékony tenyésztési folyamatnak.

A rizs izolált mikrospóra tenyésztésének optimalizálásához két jó válaszadó képességű genotípust (D8, J16) választottunk ki, amelyek korábbi kísérleteink alapján jó válaszadó képességgel rendelkeznek portokkultúrában. A tápoldathatás mértékét az indukált kallusok, albínó és zöld növények számának változásán keresztül vizsgáltuk meg. Kísérleteinket négy tápoldattal folytattuk (I_{mi} , C, CHB₃₋₆₀, CHB₃₋₉₀).

A D8 és a J16 genotípus esetében is a fejlődött kallusok, a regenerált zöld és albínó növények száma széles határok között mozgott (2. és 3. táblázat).

2. táblázat Különböző tápoldatok hatása a D8 rizsfajta izolált mikrospóra tenyésztésének hatékonyságára.

TÁPOLDAT	KALLUSZ ÁTLAG* (DB/PETRI- CSÉSZE)	ALBÍNÓ NÖVÉNYEK ÁTLAGA* (DB/PETRI CSÉSZE)	ZÖLD REGENERÁNSOK ÁTLAGA (DB/PETRI CSÉSZE)
I_{mi}	54,0 ^a	15,8 ^a	0,5
C	341,0 ^b	22,0 ^a	2,3
CHB ₃₋₆₀	285,0 ^b	17,3 ^a	0,3
CHB ₃₋₉₀	291,0 ^b	32,3 ^a	3,7

* Az egyes oszlopokban lévő különböző betűk a szignifikánsan különböző értékeket jelölik 95%-os biztonság mellett.

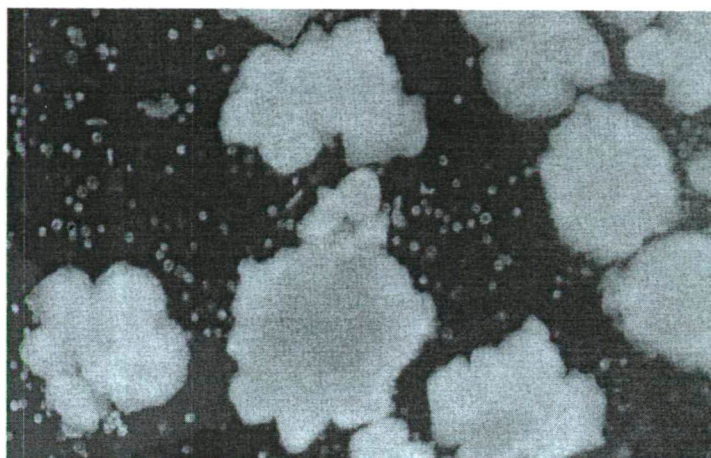
3. táblázat Különböző tápoldatok hatása a J16 rizsfajta izolált mikrospóra tenyésztésének hatékonyságára.

TÁPOLDAT	KALLUSZ ÁTLAG* (DB/PETRI CSÉSZE)	ALBÍNÓ NÖVÉNYEK ÁTLAGA* (DB/PETRI CSÉSZE)	ZÖLD REGENERÁNSOK ÁTLAGA (DB/PETRI CSÉSZE)
I_{mi}	53,3 ^a	0,3	0
C	86,7 ^a	2,0	0,3
CHB ₃₋₆₀	312,7 ^{a,b}	0	0
CHB ₃₋₉₀	343,3 ^b	0	0

* Az egyes oszlopokban lévő különböző betűk a szignifikánsan különböző értékeket jelölik 95%-os biztonság mellett.

A D8 genotípus esetében a zöld növények gyakorisága nem tette lehetővé az adatok statisztikai elemzését, az albínó növények számának vizsgálata során nem találtunk szignifikáns különbséget az egyes kezelések között. A mikrospóra tenyészetekben jelentős mennyiségű kallusz fejlődött (1. ábra), amelyek számára a C és a CHB₃₋₆₀ illetve a CHB₃₋₉₀ tápoldatok bizonyultak a legelőnyösebbnek.

A J16 genotípus izolált mikrospóra tenyészetei esetén a CHB₃ tápoldat mindkét változatában jelentős kalluszképződést figyeltünk meg (átlagosan CHB₃₋₆₀- 312,7 és CHB₃₋₉₀- 343,3 db/Petri csésze), ezek kimutathatóan is hatékonyabbnak bizonyultak az *in vitro* androgenezis indukciójához.



1. ábra Rizs mikrspóra eredetű kalluszok a tenyésztés harmadik hetén.

A regenerációs folyamat során azonban rendkívül csekély növényfejlődést tapasztaltunk, mindössze a C tápoldatból sikerült zöld növényt regenerálnunk a J16 genotípusból. Mivel a D8 esetében is alacsony volt a zöld növények száma, illetve az albínó növények aránya magas volt, ezért a hatékony növényregenerálás továbbra is kritikus pontja a mikrspóra eredetű DH növények hatékony előállításának.

KÖVETKEZTETÉSEK

Az izolált mikrspórák tenyésztése számos olyan elvi előnnyel rendelkezik, amely a növényregenerációs hatékonyság növelése esetén jelentős gyakorlati hasznosíthatóságot biztosíthat. Jelenleg az általunk alkalmazott rendszer a gyakorlatban még nem alkalmazható rutinszerűen, szemben a portoktenyésztésre alapozott DH előállítással (HESZKY ÉS SIMON-KISS 1992; HESZKY *et al.* 1996; PAUK *et al.* 2009).

A tápközeg hatásának vizsgálata során a C és a CHB₃ két változata bizonyult a leghatékonyabbnak a tenyészetekben fejlődött kalluszok számára a két donor genotípustól függően eltérő mértékben. A tápoldatok további vizsgálatát és finomítását indokolja, hogy a tenyészetekben gyenge regeneráló képességű kalluszok alakultak ki, szemben a rutinszerűen alkalmazott búza mikrspóra tenyésztéssel, ahol nagyszámú jó regeneráló képességű mikrspóra eredetű embrioid fejlődését regisztrálták (INDRIANTO *et al.* 2001), az albinizmus búza esetében is probléma. Statisztikailag nem igazolható különbséggel, de a C tápoldatban fejlődött kalluszokból regeneráltunk zöld növényeket mindkét genotípus esetén, amely megfigyelés megegyezik LENTINI *et al.* (1995) beszámolójával a maltóz és az ezüst-nitrát előnyös szerepéről az androgenezis indukálása során.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

A szerzők köszönetüket fejezik ki Fehérné Juhász Erzsébetnek, Kótai Évának és Mihály Róbertnek lelkiismeretes munkájukért és értékes tanácsaikért.

IRODALOMJEGYZÉK

- Afza, R. - Xie, J. - Shen, M. - Zapata Arias, F.J. - Fundi, H.K. - Lee, K. - Bobadilla-Mucino, E. - Kodym, A. (2001): Detection of androclonal variation in anther-cultured rice lines using rapds. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 37(5):644-647
- Blakeslee, A. - Belling, J. - Farnham, M.E. - Bergner, A.D. (1922): A haploid mutant in *Datura stramonium*. *Sci.*, 55: 646-647.
- Chair, H. - Legavre, T. - Guiderdoni, E. (1996): Transformation of haploid, microspore-derived cell suspension protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.), *Plant Cell Rep.*, 15(10), 766-770.
- Chen, Q.F. - Wang, C.L. - Lu, Y.M. - Shen, M. - Afza, R. - Duren, M.V. - Brunner, H. (2001): Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement. *Euphytica*, 120, 401-408.
- Chen, Y. - Wang, R.F. - Tian, W. Z. (1980): Studies on pollen culture in vitro and induction of plantlets in *Oryza sativa* Subsp. Keng. *Acta Genet. Sinica*, 7: 46-54 (in Chinese).
- Cho, M.S. - Zapata, F.J. (1988): Callus formation and plant regeneration in isolated pollen culture of rice (*Oryza sativa* L. cv. Taipei 309) *Plant Sci.*, 58: 239-244.
- Cho, M.S. - Zapata, F.J. (1990): Plant regeneration from isolated microspores of indica rice. *Plant Cell Physiol.*, 31: 881-885.
- Chu, C.C. - Wang, C.C. - Sun, C.S. - Hsu, C. - Yin, K.C. - Chu, C.Y. - Pi, F.Y. (1975): Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.*, 18, 659-668.
- Guha, S. (1973): Genotypic differences in the in vitro formation of embryoids from rice pollen. *J. Exp. Botany*, 24, 139-144.
- Guha, S. - Iyer, R.D. - Gupta, N. - Swaminathan, M.S. (1970): Totipotency of gametic cells and the production of haploids in rice. *Current Sci.*, 39, 174-176.
- Heszky, L.E. - Pauk, J. (1975): Induction of haploid rice plants of different origin in anther culture. *Il Riso*, 24(3), 197-204.
- Heszky, L.E. - Simon-Kiss, I. - Do Quangh, B. (1996): Release of rice variety 'DAMA' developed through haploid somaclone breeding. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotech. in Agr. and For.*, 36., 46-54.
- Heszky, L.E. - Simon-Kiss, I. (1992): "DÁMA" the First Plant Variety of Biotechnology Originating from Hungary, Registered in 1992. *Hung. Agr. Res.*, 1(1) 30-32.
- Indrianto, A. - Barinova, I. - Touraev, A. - Heberle-Bors, E. (2001): Tracking individual wheat microspores *in vitro*: identification of embryogenic microspores and body axis formation in the embryo. *Planta*, 212: 163-174.
- Jia, W.J. - Abe, T. - Futsuhara, Y. (1987): Plant regeneration by pollen culture of rice. *Rice Genet. Newsl.* 4: 109-110.
- Lantos, Cs. - Jancsó, M. - Pauk J. (2005): Microspore culture of small grain cereals. *Acta Physiol. Plant.*, 27 (4B):631-639.
- Lee, J.H. - Lee, S.Y. (2002): Selection of sable mutants from cultured rice anthers treated with ethyl methane sulfonic acid. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.*, 71(2), 165-171.
- Lentini, Z. - Reyes, Z.P. - Martinez, C.P. - Roca (1995): Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Sci.*, 110, 127-138

- Maheswaran, M. - Subudhi, P.K. - Nandi, S. - Xu, J.C. - Parco, A. - Yang, D.C. - Huang, N. (1997): Polymorphism, distribution, and segregation of AFLP markers in a doubled haploid rice population. *Theor. and Appl. Genet.*, 94(1), 39-45.
- Niizeki, H. - Oono K. (1968): Induction of haploid rice plants from anther culture. *Proc. Japan Acad.*, 44, 544-557.
- Niizeki, H. - Oono, K. (1971): Rice plants obtained by anther culture. In: *Les Cultures de Tissus des Plantes. Colloq. Int. CNRS (Paris)*, 193, 251-257.
- Nishi, T. - Mitsuoka, S. (1969): Occurrence of various ploidy plants from anther and culture of rice plant. *Jap. J. of Genetic*, 44, 341-346.
- Pauk, J. - Jancsó, M. - Simon-Kiss, I. (2009): Rice doubled haploids and breeding. In: Touraev A., Forster B.P., Mohan Jain S. (eds) *Advances in Haploid Production in Higher Plants*. Springer Publishing, pp. 189-199.
- Raghavan, V. (1988): Anther and pollen development in rice (*Oryza sativa*) *Amer. J. Bot.*, 75: 183-196.
- Reiffers, I. - Freire, A.B. (1990): Production of doubled haploid rice plants (*Oryza sativa* L.) by anther culture. *Plant Cell, Tiss. and Org. Cult.*, 21(2), 165-170.
- Simon-Kiss, I. (2001): Six Decades of Rice Cultivation and Varietal Improvement in Hungary, *Hung. Agr. Res.*, 10(1): 4-7.
- Simonné Kiss I. (2005): Rizsnemesítési kutatások Szarvason. *Agroforum*, 16(6): 13-15.