

## UTICAJ HLADNOG PRETRETMANA NA ANDROGENU SPOSOBNOST ANTERA PŠENICE

LJEVNAIĆ BRANKA, KONDIĆ-ŠPIKA ANKICA<sup>1</sup>

*IZVOD: U radu je ispitan uticaj hladnog pretretmana na androgenu sposobnost antera pšenice u kulturi in vitro. Korišćeno je 12 genotipova ozime pšenice. Pre izolacije, polovina antera bila je izložena hladnom pretretmanu na  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  5–10 dana, a druga polovina je bez pretretmana inokulisana na Potato–2 indukcionu podlogu. Rezultati su pokazali da je odsustvo hladnog pretretmana imalo uticaja na adrogeni kapacitet kod 5, dok je na prinos kalusa imalo uticaja kod 4 od 12 ispitivanih genotipova. Može se zaključiti da je uticaj pretretmana na androgenu sposobnost genotipski specifičan.*

**Ključne reči:** androgena sposobnost, pretretman, pšenica

### UVOD

Proizvodnja biljaka dvostrukih haploida (DH) skraćuje vreme i smanjuje troškove stvaranja novih sorti (Barnabás i sar., 2001; Kondić-Špika i Šesek, 2002; Ljevnaić, 2007). Od različitih tehnologija za proizvodnju dvostrukih haploida, embriogeneza mikrospora je do sada najčešće korišćena (Touraev i sar., 2001). Kod žitarica, metod oprašivanja polenom vrsta iz drugog roda (*Hordeum bulbosum*, *Zea mays*) i spašavanje embriona, predstavlja ozbiljnu konkurenciju proizvodnji DH iz mikrospora (Laurie i Bennett, 1988; Inagaki, 2003).

Za indukciju embriogeneze u kultivisanim mikrosporama neophodan je okidajući faktor u obliku stresa (Nitsch i Norreel, 1973, Touraev i sar., 1997). Kao deo strategije preživljavanja stresa, *in vitro* kultivisane mikropore, predodređene da se razvijaju u polenova zrna, napuštaju gametofitni put i reorijentišu se na sporofitni način razvoja, proizvodeći haploidne ili dvostruko haploidne embrione i biljke (Shariatpanahi, 2006a).

Embriogeneza se može indukovati u mikrosporama, ako se tretiraju cele biljke, izolovane cvasti, cvetni pupoljci, ili *in vitro* kultivisane antere i izolovane mikropore. U svim

Originalni naučni rad / *Original scientific paper*

<sup>1</sup> Mr Branka Ljevnaić, asistent na predmetu Botanika, Poljoprivredni fakultet, Trg Dositeja Obradovića 8, 21 000 Novi Sad. Dr Ankica Kondić-Špika, naučni saradnik, Institut za ratarstvo i povrtarstvo, Maksima Gorkog 30, 21 000 Novi Sad

navedenim slučajevima konverzija u sporofitni put razvoja može se indukovati izlaganjem mikrospora različitim stresovima (Shariatpanahi, 2006a). Stresovi koji se koriste u ove svrhe mogu se podeliti na fizičke (hladnoća, toplota, osmotski šok) i fiziološke, kao što je izglednjivanje (Jacquard i sar., 2006).

Upotreba hladnog pretretmana, kao oblika stresa, prvi put objavljena je 1973. godine, na anterama i izolovanim mikrosporama *Datura* (Nitsch i Norreel, 1973). Pretpostavlja se da hladni pretretman usporava degradacione procese u tkivu antera i tako štiti mikropore od toksičnih komponenti, koje se oslobađaju prilikom uvenuća antera (Duncan i Heberle, 1976).

Nedavno su objavljeni rezultati (Shariatpanahi et al. 2006b), koji ukazuju na to da je direktnom embriogenezom (bez delovanja stresnih tretmana), u kulturi izolovanih mikrospora pšenice, značajno povećana regeneraciona sposobnost i procenat zelenih biljaka. Cilj ovog rada bio je da se ispita da li je ovakvo povećanje efikasnosti moguće postići i u kulturi antera, ispitivanjem uticaja stresnog (hladnog) pretretmana na androgenezu pšenice.

## MATERIJAL I METOD RADA

Kao materijal, korišćena je F<sub>1</sub> generacija 12 kombinacija ukrštanja ozime pšenice (*Triticum aestivum* L).

Površinska sterilizacija materijala i izolacija antera rađena je prema standardnoj proceduri (Kondić i Šesek, 1999; Ljevnaić, 2007). Od svake kombinacije ukrštanja izolovano je ukupno 540 antera. Polovina je bila izložena delovanju hladnog pretretmana na 4°C, u trajanju od 5–10 dana, dok je druga polovina antera gajena direktno, bez hladnog pretretmana, na modifikovanoj Potato-2 indukcionoj hranljivoj podlozi (Chuang i sar., 1978).

Eksperiment je postavljen po slučajnom blok sistemu, u tri ponavljanja. Svako ponavljanje činile su tri epruvete sa po 30 izolovanih antera. Rezultati su obrađeni metodom analize varijanse, a značajnost razlika između tretmana određena je primenom najmanje značajne razlike (LSD).

## REZULTATI I DISKUSIJA

Androgeni kapacitet, kod antera izloženih dejstvu hladnog pretretmana, kretao se od 1.1%, kod kombinacija Bank/Rht 1 / Fantazia odeska i Bank/Rht 3 / Odeska 162 do 4.8%, kod kombinacije NS 132–05 / Kite (tab. 1). Bez delovanja hladnog pretretmana, androgeni kapacitet se kretao od 1.1 (NS 20/05 / Driada) do 5.5% (Driada / Dačia). Odsustvo hladnog pretretmana izazvalo je značajno smanjenje androgenog kapaciteta kod tri kombinacije ukrštanja (NS 20/05 / Driada, Driada / NS 40S-00 i NS 132-05 / Kite). Kod dve kombinacije ukrštanja (Driada / Dačia i Bank/Rht 3 / Odeska 162) odsustvo hladnog pretretmana imalo je stimulativan efekat na androgeni kapacitet. Prosečne vrednosti androgenog kapaciteta, za sve kombinacije ukrštanja, sa pretretmanom (2.63%) i bez pretretmana (2.41%), nisu se značajno razlikovale.

Prinos kalusa kod većine kombinacija ukrštanja nije zavisio od prisustva ili odsustva hladnog pretretmana. Nije utvrđena značajna razlika između prosečnih vrednosti za prinos kalusa u prisustvu (3.16%) i odsustvu hladnog pretretmana (3.02%). Međutim, kod dve kombinacije ukrštanja (NS 20/05 / Driada i Driada / NS 40S-00), odsustvo hladnog pretre-

tmana izazvalo je značajno smanjenje broja formiranih kalusa. Kod kombinacija Driada / Dačija i Bank/Rht 1 / Fantazia odeska, došlo je do značajnog povećanja broja formiranih kalusa kod antera koje nisu bile izložene dejstvu hladnog pretretmana (tab. 2).

1. Uticaj hladnog pretretmana na androgeni kapacitet pšenice

1. *Effect of cold pretreatment on androgenic capacity of wheat*

F <sub>1</sub> kombinacija F <sub>1</sub> combination	Androgeni kapacitet (%) Androgenic capacity (%)	
	Sa pretretmanom With pretreatment	Bez pretretmana Without pretreatment
1. NS 20/05 / Driada	3.0	1.1**
2. MV 05–2001 / Lana	3.0	2.6
3. MV 05–2001 / Žitnica	2.6	2.6
4. Driada / NS 40S–00	4.1	1.8**
5. Driada / Dačija	3.0	5.5**
6. Odeska 162 / NS KV 124-01A	2.2	1.8
7. Odeska 162 / NS 40S-00	1.5	1.8
8. Lucija / Žitnica	2.6	1.8
9. Bank/Rht 1 / Fantazia odeska	1.1	1.8
10. Odeska 133 / MV 06-02	2.6	2.2
11. Bank/Rht 3 / Odeska 162	1.1	2.2*
12. NS 132–05 / Kite	4.8	3.7*
Prosek (Mean)	2.63	2.41
LSD <sub>0,05</sub>	0,908	
LSD <sub>0,01</sub>	1,208	

2. Uticaj hladnog pretretmana na prinos kalusa u kulturi antera pšenice

2. *Effect of cold pretreatment on callus yield in wheat anther culture*

F <sub>1</sub> kombinacija F <sub>1</sub> combination	Prinos kalusa (%) Callus yield (%)	
	Sa pretretmanom With pretreatment	Bez pretretmana Without pretreatment
1. NS 20/05 / Driada	3.0	1.5*
2. MV 05–2001 / Lana	3.0	3.3
3. MV 05–2001 / Žitnica	3.0	2.6
4. Driada / NS 40S–00	5.2	1.8**
5. Driada / Dačija	4.4	7.4**
6. Odeska 162 / NS KV 124–01A	2.6	1.8
7. Odeska 162 / NS 40S–00	3.0	3.0
8. Lucija / Žitnica	3.0	2.6
9. Bank/Rht 1 / Fantazia odeska	1.1	2.6*
10. Odeska 133 / MV 06-02	3.0	3.0
11. Bank/Rht 3 / Odeska 162	1.1	2.2
12. NS 132–05 / Kite	5.5	4.4
Prosek (Mean)	3.16	3.02
LSD <sub>0,05</sub>	1,166	
LSD <sub>0,01</sub>	1,551	

Rezultati su pokazali da je, kod većine kombinacija ukrštanja moguće ostvariti jednake rezultate u broju androgenih antera i formiranih kalusa, sa ili bez delovanja hladnog pretretmana. Samo kod određenih kombinacija ukrštanja hladni pretretman može izazvati povećanje ili smanjenje androgene sposobnosti. To znači da uticaj hladnog pretretmana na androgenezu pšenice u najvećoj meri zavisi od genotipova korišćenih u ukrštanju.

Rezultati drugih autora o hladnom pretretmanu u kulturi antera pšenice su takođe kontradiktorni. Karimzadeh i sar. (1995) navode da hladni pretretman ili nema uticaja, ili je njegov uticaj na androgenezu pšenice negativan. Drugi autori (Lazar i sar., 1985.; Hu, 1986; Stober i Hess, 1997) pak ukazuju na pozitivan uticaj hladnog pretretmana na androgenu sposobnost pšenice. Ove razlike mogu biti posledica metodoloških, a pre svega genotipskih razlika u navedenim istraživanjima.

## ZAKLJUČAK

Na osnovu navedenih rezultata može se zaključiti da uticaj hladnog pretretmana na androgeni kapacitet i prinos kalusa, u kulturi antera pšenice, u najvećoj meri zavisi od genotipa biljaka donora. Kod većine kombinacija ukrštanja pretretman nema uticaja na androgenu sposobnost, dok samo u pojedinim slučajevima pretretman može imati pozitivan ili negativan uticaj na reakciju antera u kulturi *in vitro*. Iz tog razloga, može se preporučiti upotreba hladnog pretretmana kod kombinacija sa lošom androgenom sposobnošću, kao jedan od načina da se eventualno popravi androgena reakcija ovakvih genotipova.

## LITERATURA

- BARNABÁS, B., SZAKÁCS, É., KARSAI, I., BEDÖ, Z.: *In vitro* androgenesis of wheat: from fundamentals to practical application. *Euphytica*, 119: 211–216, 2001.
- CHUANG, C.C., OUYANG, T.W., CHIA, H., CHOU, S.M., CHING, C.K.: A set of potato media for wheat anther culture. In *Proc. of Symp. on Plant Tissue Culture*, Sci. Press, Peking, China, 51–56, 1978.
- DUNCAN, E.J., HEBERLE, E.: Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plantlet production. *Protoplasma*, 90: 173–177, 1976.
- HU, H.: Wheat: improvement through anther culture. In: Y.P. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 2. Crops I, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, 55–72, 1986.
- INAGAKI, M.N.: Doubled haploid production in wheat through wide hybridization. In: Maluszynski, M., Kasha, K.J., Forster, B.P., Szarejko, I. (eds) *Doubled Haploid Production in Crop Plants, a Manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 53–58, 2003.
- JACQUARD, C., ASAKAVICIUTE, R., HAMALIAN, A., SANGWAN, R., DEVAUX, P., CLÉMENT, C.: Barley anther culture: effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism. *Plant Cell Rep.*, 6: 1–7, 2006.
- KARIMZADEH, G., KOVÁCS, G., BARNABÁS, B.: Effect of cold treatment and different culture media on the androgenic capacity of two winter wheat genotypes. *Cereal Res. Comm.*, 23 (3) 223–227, 1995.
- KONDIĆ, A., ŠESEK, S.: Androgenous and regeneration abilities of homozygous and heterozygous wheat genotypes. *Genetika*, 31 (1) 59–64, 1999.

KONDIĆ-ŠPIKA, A., ŠESEK, S.: *In vitro* metode u oplemenjivanju strnih žita u Novom Sadu-dostignuća i perspektive. Zbornik radova naučnog skupa: Savetovanje o biotehnologiji u Vojvodini. Srpska akademija nauka i umetnosti, Ogranak u Novom Sadu, 12–13. septembar 2002, 113–121, 2002.

LAURIE, D.A., BENNETT, M.D.: The production of haploid wheat plants from wheat x maize crosses. *Theor. Appl. Genet.*, 76: 393–397, 1988.

LAZAR, M.D., SCHAEFFER, G.W., BAENZIGER, P.S.: The physical environment in relation to high frequency callus and plantlet development in anther cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *J. Plant Physiol.*, 121: 103–109, 1985.

LJEVNAIĆ BRANKA: Androgeneza različitih genotipova pšenice (*Triticum aestivum* L.) i citološke karakteristike regeneranta. Magistarska teza, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad, 2007.

NITSCH, C., NORREEL, B.: Effet d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere. *C. R. Acad. Sci., Paris*, 276: 303–306, 1973.

SHARIATPANAH, M.E., BAL, U., HEBERLE-BORS, E., TOURAEV, A.: Stresses applied for the re-programming of plant microspores towards *in vitro* embryogenesis. *Physiol. Plant.*, 1–16, 2006a.

SHARIATPANAH, M.E., BELOGRADOVA, K., HESSAMVAZIRI, L., HEBERLE-BORS, E., TOURAEV, A.: Direct Embryogenesis: A Novel Technique for Isolated Microspore Culture of Wheat. Abstracts of The International Conference „Haploids in Higher Plants III“, Viena, Austria, February 12–15, 2006, pp. 16 (2006b).

STOBER, A., HESS, D.: Spike pretreatments, anther culture conditions, and anther culture response of 17 German varieties of spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Breeding*, 116, 443–447, 1997.

TOURAEV, A., PFOSSER, M., HEBERLE-BORS, E.: The microspore: a haploid multipurpose cell. *Adv. Bot. Res.*, 35: 53–109, 2001.

TOURAEV, A., VICENTE, O., HEBERLE-BORS, E.: Initiation of microspore embryogenesis by stress. *Trends Plant Sci.*, 2: 297–302, 1997.

## EFFECT OF COLD PRETREATMENT ON ANDROGENOUS ABILITY OF WHEAT ANTHERS

LJEVNAIĆ BRANKA, KONDIĆ-ŠPIKA ANKICA

### Summary

In this paper the effect of cold pretreatment on androgenous ability of wheat anthers was investigated. Anthers were isolated from 12 different genotypes of wheat (*Triticum aestivum* L.). Before isolation, a half of anthers were exposed to a cold pretreatment on  $4\pm 1^{\circ}\text{C}$  for 5–10 days, while the other half of anthers were inoculated onto the Potato-2 induction medium without the cold pretreatment. The results have shown that absence of cold pretreatment had significant effect on androgenous capacity in 5 cultivars, while on callus yield had the effect in 4 from the total of 12 examined wheat genotypes. It can be concluded that the effect of cold pretreatment on androgenous ability of wheat is genotype specific.

**Key words:** androgenous ability, pretreatment, wheat