

mgr inż. Przemysław Kopec  
Wydział Rolniczo-Ekonomiczny  
Katedra Fizjologii Roślin

Streszczenie rozprawy doktorskiej

**Wykorzystanie androgenezy, gynogenezy oraz poliploidyzacji do przywracania  
płodności roślin miskanta olbrzymiego (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.)**

Promotor: prof. dr hab. inż. Agnieszka Płażek

Promotor pomocniczy: dr hab. Ewa Dubas

Miskant olbrzymi (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.; *Poaceae*) jest szybko rosnącą, wieloletnią trawą, pochodzącą z Wschodniej i Południowo-Wschodniej Azji. Od czasu kiedy został sprowadzony do Europy w 1935 roku znalazł wiele zastosowań w różnych gałęziach przemysłu. Ze względu na wysoki plon biomasy i jej skład chemiczny, miskant olbrzymi uważany jest za jedno z bardziej obiecujących źródeł odnawialnej energii. Jednakże, pewne ekofizjologiczne cechy tego gatunku (np. tolerancja niskiej temperatury i suszy) wymagają ulepszenia, co umożliwi uprawę miskanta olbrzymiego na szeroką skalę. Niestety, miskant olbrzymi jest sterylnym, naturalnym, triploidalnym mieszańcem międzygatunkowym ( $2n = 3x = 57$ ) i może być rozmnażany wyłącznie wegetatywnie przez podział kłaczy lub w kulturach *in vitro*. Sterylność tego gatunku utrudnia jego konwencjonalną hodowlę.

W niniejszej rozprawie badano możliwość otrzymania płodnych roślin *Miscanthus × giganteus* poprzez proces andro- i gynogenezy *in vitro*. Podwojenie liczby chromosomów roślinom zregenerowanym w kulturach pylnikowych lub w kulturach załązni i pąków kwiatowych stanowiło szansę otrzymania płodnych, aneuploidowych osobników. Inną użytą metodą do przywrócenia płodności miskantowi była poliploidyzacja.

Indukcję androgenezy *in vitro* poprzedzono obserwacją mikrosporogenezy. Zaburzenia mejozy występowały u ponad połowy analizowanych mejocytów, ale wyłącznie w czasie pierwszego podziału mejotycznego. Żywotność pyłku wahała się od 13,9% do 55,3% i zależała od użytego testu histochemicznego. Obserwowane duże zróżnicowanie średnicy ziaren pyłku wskazuje na posiadanie przez nie różnej liczby chromosomów.

Badane czynniki w kulturze pylnikowej stanowiły: genotyp, wstępne traktowanie i wariant pożywki indukującej. Pomimo badania wielu czynników, po izolacji i umieszczeniu w kulturze *in vitro* pylniki szybko ciemniały, degenerowały i nie tworzyły struktur androgenicznych.

Obserwacja megasporogenezy i megagametofitogenezy wykazała, że normalny rozwój woreczków zalążkowych występował wyłącznie u 9,7% zalążków. Woreczek zalążkowy miskanta olbrzymiego rozwija się według monosporowego typu Polygonum. Zalążki z prawidłowo wykształconym żeńskim gametofitem mogą zostać wykorzystane do otrzymywania haploidów. Podobnie jak w badaniach androgenyzy, genotyp, wstępne traktowanie i wariant pożywki indukującej były badane w kulturze zalążni i pąków kwiatowych. Dodatkowo badano wpływ światła na kultury gynogeniczne. W kulturze pąków kwiatowych otrzymano dwa typy kalusa: kalus embriogeny i kalus z antocyjanowymi przebarwieniami. Pomimo regeneracji roślin przez oba typy kalusa, analiza cytometryczna i obserwacja liczby chromosomów w stożkach wzrostu korzeni wskazała, że rośliny pochodziły z somatycznej tkanki, a nie z haploidalnych komórek. W kulturze zalążni, eksplantaty ciemniały i ulegały deformacji, pomimo zastosowania różnych warunków kultury.

Problem ciemnienia eksplantatów w kulturach tkankowych jest powszechnie znany i typowy dla eksplantatów bogatych w związki fenolowe. Próbowano rozwiązać tą trudność poprzez uzupełnienie pożywek substancjami wykorzystywanymi w tym celu: L-proliną, L-cysteiną, zredukowanym glutationem lub miodem. Niestety, żadna z zastosowanych substancji nie ograniczyła zjawiska ciemnienia eksplantatów.

Doświadczenie mające na celu podwojenie liczby chromosomów miskantowi olbrzymiemu przeprowadzono z wykorzystaniem młodych roślin zregenerowanych w kulturach *in vitro* i tkanki kalusowej. W obu przypadkach zastosowano cztery substancje mutagenne: trzy związki antymitotyczne (kolchicynę, oryzalinę, trifluralin) i kofeinę, która zaburza przebieg cytokinezy. Przeżywalność materiału roślinnego zależała od stężenia substancji antymitotycznych i czasu ich oddziaływania. Jedynie kofeina nie wykazywała toksycznego wpływu na rośliny i kalus. Heksaploidalne pędy otrzymano tylko poprzez moczenie korzeni wraz z węzłami krzewienia w 1,25 mM roztworze kolchicyny przez 18 godzin. W tych samym doświadczeniu, kolchicinyna i oryzalina odpowiadały za powstawanie pędów miksohaploidalnych. Heksaploidalne pędy zamierały jeszcze przed kwitnieniem. W konsekwencji poliploidizacji tkanki kalusowej otrzymano tkankę składającą się z komórek posiadających różną liczbę chromosomów. Jednakże rośliny regenerowały wyłącznie z komórek o 57 chromosomach.

Podsumowując, przywrócenie płodności roślinom *Miscanthus* × *giganteus* wykorzystując biotechnologiczne techniki (androgenezę, gynogenezę, poliploidyzację) jest utrudnione ze względu na chromosomowe niezbalansowanie gamet, wrażliwość eksplantatów na manipulacje techniczne w kulturach *in vitro* oraz niekorzystny wpływ wysokiego poziomu ploidalności na żywotność roślin.

mgr inż. Przemysław Kopec  
Faculty of Agriculture and Economics  
Department of Plant Physiology

Summary of a dissertation

**The use of androgenesis, gynogenesis and polyploidization in restoring fertility of  
*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.**

Supervisor: prof. dr hab. inż. Agnieszka Płazek

Auxiliary Promoter: dr hab. Ewa Dubas

Giant miscanthus (*Miscanthus × giganteus* Greef et Deu.; *Poaceae*) is a fast-growing perennial grass originated from East and Southeast Asia. Since it has been introduced in Europe in 1935, it found wide application in many industries. Particularly, due to high production of biomass and its chemical composition, it has been considered as one of the most promising sources of renewable energy. However, for wide cultivation, some ecophysiological traits of this species (e.g. low temperature and drought tolerance) should be improved. Unfortunately, giant miscanthus as a natural, interspecific, triploid hybrid ( $2n = 3x = 57$ ) is sterile and must be propagated vegetatively by rhizome division or *in vitro* cultures what hinder conventional plant breeding.

In this dissertation, the possibility to obtain fertile plants of *Miscanthus × giganteus* through the process of andro- and gynogenesis *in vitro* has been examined. Doubling of the chromosome number in plants regenerated from anther cultures, ovary and flower bud cultures was a chance to obtain fertile aneuploid accessions. Another tested method to restore miscanthus fertility was polyploidization.

Induction of androgenesis *in vitro* was preceded by microsporogenesis monitoring. Meiotic disturbances were identified in more than half of observed meiocytes, but only during the first meiotic division. The viability of pollen ranged from 13,9% to 55,3% and depending on histochemical test. The wide range of grains sizes observed in collected pollen suggests variation in chromosome numbers.

The effect of the genotype, the pre-treatments and the type of induction medium were tested in anther cultures. Despite of many tested factors, anthers after isolation and transfer to *in vitro* culture quickly darkened, degenerated and did not form androgenic structures.

Observation of megasporogenesis and megagametogenesis showed that the regular development of embryo sacs appeared only in 9.7% of the ovules. Embryo sac of giant miscanthus develops according to the monosporous Polygonum type. Ovules with normal mature female gametophytes might be used for production of haploids. Similarly as in the case of androgenesis studies, the genotype, the pre-treatments and the type of induction medium were tested in ovary and flower bud cultures. Additionally, the influence of light conditions on gynogenic cultures was tested. In flower bud cultures two types of calli were obtained: embryogenic callus and callus with anthocyanin discoloration. However, plant regeneration was obtained in both types of calli, flow cytometric analysis and observation of chromosomes in root tips revealed that the plants originated from somatic tissue, and not from haploid cells. Despite the used various culture conditions, in ovary cultures explants darkened and deformed.

The problem of explants darkening in *in vitro* cultures is well known and typical for phenol-rich plant explants. Standardly used substances like L-proline, L-cysteine, reduced glutathione or honey, which addition to a medium usually reduce the intensity of this phenomenon, were tested. Unfortunately, in miscanthus tissue cultures all these substances were ineffectual.

The experiment aimed at chromosome doubling of *Miscanthus × giganteus* was conducted on young plants regenerated from *in vitro* culture and callus tissue. In both cases, four mutagenic substances were used: three antimitotic compounds (colchicine, oryzalin, trifluralin) and caffeine, which disturbs cytokinesis. Survival of plant material depended on the concentrations of antimitotic agents and duration of the treatment. Among tested substances, only caffeine showed no toxicity to plants and calli. Hexaploid shoots were obtained only by soaking the roots and shoot apices in 1.25 mM solution of colchicine for 18 hours. In the same experiment, mixoploid shoots were formed after treatment of colchicine and oryzalin. However, hexaploid plants died before flowering. Polyploidization of calli resulted in tissue formation consisting of cells with different number of chromosomes. However, plants were regenerated only from cells possessing 57 chromosomes.

Concluding, restoring fertility of *Miscanthus × giganteus* by tested biotechnological techniques (androgenesis, gynogenesis, polyploidization) is hampered by chromosomal instability of gametes, sensitivity of explants to technical manipulations in *in vitro* cultures and the adverse impact of high ploidy on the plant vitality.

Remyśław Kapeć

A. Pić



UNIWERSYTEC ROLNICZY  
im. Hugona Kołłątaja w Krakowie  
WYDZIAŁ ROLNICZO-ERONOMICZNY  
Katedra Fizjologii Roślin  
30-239 Kraków, ul. Podłużna 3  
tel. +48 (12) 425 3391