

Zadanie 4: Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)

Sprawozdanie merytoryczne 2023



Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego*
PAN w Krakowie (IFR PAN)

Prof. dr hab. **Iwona Żur** (i.zur@ifr-pan.edu.pl)

Dr hab. Ewa Dubas, prof. IFR PAN

Dr Przemysław Kopeć

Dr Monika Krzewska

Mgr Agnieszka Springer



Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (KGHR UP)

dr hab. **Dorota Weigt**

Dr hab. Łukasz Wolko, prof. UP

Dr Sylwia Mikołajczyk

Mgr Katarzyna Szewczyk

Ministerstwo Rolnictwa i Rozwoju Wsi
Warszawa, 6.12.2023 r.

Podsumowanie wyników uzyskanych w roku 2022

- Potwierdzono niską podatność na indukcję embriogenezy mikrospor (EM) polskich materiałów hodowlanych pszenicy ozimej. Wykazano, iż głównymi przyczynami tego zjawiska są: niska żywotność mikrospor i zaburzenia na wczesnych etapach rozwoju struktur zarodkopodobnych (ang. *embryo-like structures*; ELS)
- Wykazano, iż modyfikacje procedury podnoszące żywotność zawiesin komórkowych wpływają niekorzystnie na efektywność indukcji EM i regeneracji roślin zielonych.
- Opracowano potencjalnie najbardziej efektywną kombinację czynników stresowych (stresu niskotemperaturowego oraz stresu osmotycznego poprzedzonego traktowaniem selenianem sodu) pozwalającą na zachowanie wysokiej żywotności przy równoczesnej efektywnej zmianie kierunku rozwoju mikrospor badanych linii pszenicy ozimej
- Wyniki badań potwierdziły hipotezę, iż linie pszenicy ozimej bardziej odporne na indukcję EM linii charakteryzuje niższa tolerancja na stres indukujący zmianę kierunku rozwoju mikrospor co związane jest z niższą wydajnością systemu antyoksydacyjnego i zaburzeniami gospodarki mineralnej.

Tematy badawcze realizowane w roku 2023

T1: Zmiana równowagi jonowej, hormonalnej i oksydo-redukcyjnej jako czynnik modyfikujący efektywność indukcji procesu EM pszenicy zwyczajnej (zadanie 3).

Celem badań było określenie równowagi hormonalnej (poziomu endogenych i egzogennie aplikowanych auksyn (Aux) i cytokinin (Ck) warunkującej prawidłową indukcję EM pszenicy zwyczajnej i stymulujących prawidłowy rozwój ELS. Zastosowano: pikloram, dikambę, 2,4-D (Aux) oraz *trans* zeatynę (tZ), kinetynę (KIN) i tidiazuron (TDZ) (Ck), które aplikowano podczas wstępnego traktowania kłosów oraz do pożywki indukcyjnej, w fazie kultury *in vitro*. Wykorzystano metody kultur izolowanych mikrospor oraz kultur pylnikowych i procedury zmodyfikowane na podstawie dotychczasowych wyników.

Cel T1 został osiągnięty

T2: Zmiana poziomu metylacji/acetylacji genomu jako czynnika modyfikującego efektywność indukcji procesu EM pszenicy zwyczajnej

Celem badań była ocena wpływu czynników warunkujących zmiany w poziomie metylacji DNA i potranslacyjnych modyfikacji białek histonowych (metylacja/acetylacja) na efektywność indukcji EM pszenicy zwyczajnej.

Cel T2 został osiągnięty

Materiały i Metody

Temat badawczy 1. Zmiana równowagi jonowej, hormonalnej i oksydo-redukcyjnej jako czynnik modyfikujący efektywność indukcji procesu EM pszenicy zwyczajnej



Materiał roślinny: 2 linie pszenicy ozimej mieszańcowa F₁ (**K393**) i linia modelowa (**PO19**)

Eksperyment 1. Modyfikacja wstępnego traktowania kłosów

Kontrola: 21d w 4°C (3 dni z dodatkiem 50 μmol/l selenian sodu (SeS) + 4 dni w 0,7 mol/l mannitol (MAN) w 20°C (NT+SeS+MAN)

Modyfikacje: MAN uzupełniano o 1) *trans*-zeatyna (**tZ**), 2) kinetyna (**KIN**), 3) tidiazuron (**TDZ**), 4) pikloram (**PIC**), 5) **2,4-D** w stężeniach 0,5 i 2,5 mg/l

Eksperyment 2. Modyfikacje składu pożywki indukcyjnej

Kontrola: pożywka KBP + 0,9 mg/l BAP

Modyfikacje: po 12 wariantów pożywki indukcyjnej dla kultur izolowanych mikrospor i kultur pylnikowych

Eksperyment 3. Analiza zawartości auksyn i cytokinin met. ultrasprawnej chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrią mas (UHPLC+MS) w pylnikach, na kolejnych etapach procedury indukcji EM. Pylniki pobierano z kłosów: 1) świeżo ściętych (**Kontrola**); 2) po 21d w 4°C (**NT**); 3) po 18d w 4°C i 3d SeS (**NT+SeS**); 4) po 18d w 4°C, 3d SeS i 4d MAN w 20°C (**NT+SeS+MAN**)

Temat badawczy 2. Zmiana poziomu metylacji/acetylacji genomu jako czynnika modyfikującego efektywność indukcji procesu EM pszenicy zwyczajnej

Materiał roślinny: 4 linie pszenicy ozimej mieszańcowe F₁ (**K393**, **K20290**) i linie modelowe (**PO19**, **DH1/2**)

Eksperyment 1. Traktowanie wstępne selenianem sodu i mannitolem (SS)

Kontrola: kłosa 10-20 dni w 4°C (C17)

Modyfikacje: 10-20 dni w 4°C (3 dni z dodatkiem 50 μmol/l selenian sodu (SeS) + 4 dni w 0,7 mol/l mannitol (MAN) w 20°C (NT+SeS+MAN)

Eksperyment 2. Traktowanie wstępne inhibitorami metylacji (IM)

Kontrola: pylniki ½ MS dla AZC, DEC (MS), pylniki ½ MS+DMSO dla ZEB, TSA (DMSO),

Modyfikacje: pylniki ½ MS + jeden z 4 inhibitorów metylacji (IM): 5-azacytydyna (AZC), 2'-deoksy-5-azacytydyna (DAC), zebularyna (ZEB), trichostatyna A (TSA). Inkubacja w ciemności przez 2 lub 7 dni w 4°C. Roztwory inkubacyjne przygotowano w stężeniach: 0 μmol/l (kontrola), 2,5 μmol/l oraz 5,0 μmol/l.

Wyniki

Temat badawczy 1. Eksperyment 1. Kultury izolowanych mikrospor

1. Średnia ilość mikrospor: **7,5 do ok. 129×10^3 w mks/kłos** (Ryc.1).

Pozytywna tendencja dla: **tZ** oraz **0,5 mg/l KIN** i **2,5 mg/l TDZ**

Negatywna tendencja dla: **2,4-D** i **PIC**

2. Żywotność mikrospor po NT/SeS/MAN: **33 - 90%**

Max. żywotność dla PO19: **2,5 mg/l tZ** i **0,5 mg/l TDZ** (90 i 80%)

Max. żywotność dla K393: **2,5 mg/l PIC** i **tZ** (80% i 79%) i

0,5 mg/l 2,4-D (79%).

3. U obu linii wysoka frekwencja embriogennych mikrospor (ELS) po traktowaniu **2,5 mg/l TDZ**, **2,5 mg/l PIC** oraz **2,5 mg/l KIN** (Ryc.2).

Dalszy rozwój hamowany w fazie globularnej (aberracje strukturalne).

Po 2,5 mg/l KIN i TDZ oraz 2,4-D rozwój struktur o cechach tkanki kalusowej.

ELS > 1mm uzyskano dla PO19 po **2,5 mg/l TDZ** (0,1 ELS/kłos); dla

K393 po **2,5 mg/l KIN** (0,1 ELS/kłos) i **2,5 mg/l TDZ** (0,5 ELS/kłos).

Nie uzyskano regeneracji roślin.

Temat badawczy 1. Eksperyment 1. Kultury pylnikowe

1. Efektywność indukcji EM dla PO19 wyniosła od **0 do 8,7 ELS/kłos**

(Ryc.3). Max. ilość ELS uzyskano dla **0,5 mg/l 2,4-D**.

Zielone regeneranty uzyskano dla **2,5 mg/l KIN** (**0,7 ZR/kłos**) oraz po

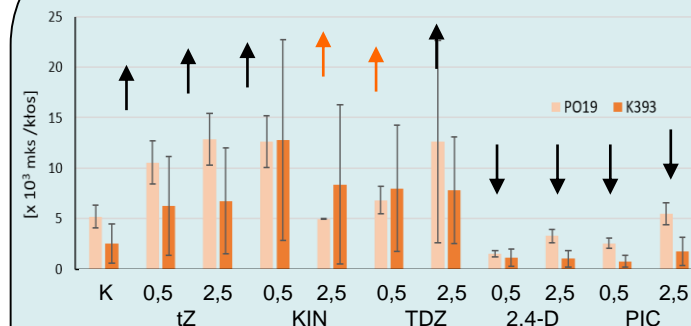
traktowaniu NT/SeS/MAN (**0,5 ZR/kłos**).

2. Efektywność indukcji EM dla K393 wyniosła od **0 do 2,4 ELS/kłos**.

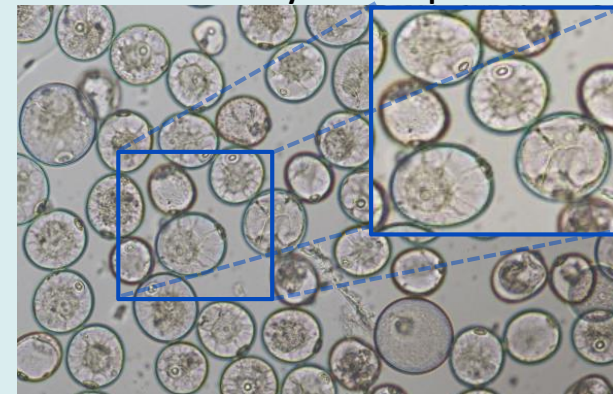
Max. ilość ELS uzyskano dla **2,5 mg/l TDZ** (0,1 AR/ kłos).

Nie uzyskano regeneracji roślin zielonych.

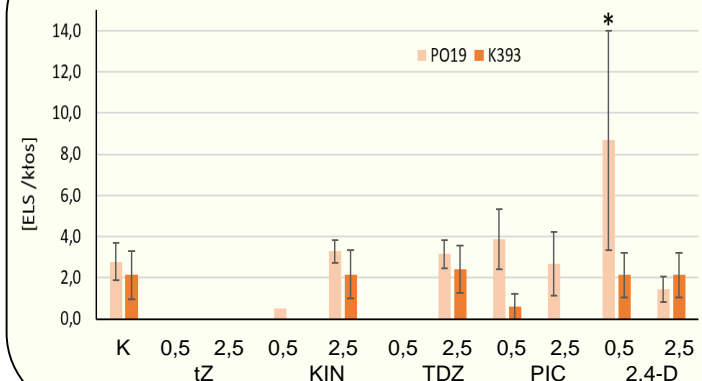
Ryc.1. Wydajność izolacji [ilość mks x 10^3 /kłos]



Ryc.2. Efektywność indukcji EM w kulturach izolowanych mikrospor



Ryc.3. Efektywność indukcji EM [ELS/kłos]



Temat badawczy 1. Eksperyment 2. Kultury izolowanych mikrospor (KIM)

Indukcję procesu EM obserwowano jedynie u K393.

Wysoką frekwencję dzielących się mikrospor i prawidłowe ELS (0,2-0,4 ELS/kłós) uzyskano na pożywkach KBP z dodatkiem:

1 mg/l TDZ (0,2 ZR/kłós), 1 mg/l PIC (0,2 ZR/kłós) i 1 mg/l DIC (0,2 AR/kłós)

Na pożywce zawierającej **1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l tZ** uzyskano prawidłowe ELS (1,5 ELS/kłós) jednak struktury te nie zregenerowały roślin.

Na pożywkach zawierających 1 mg/l KIN + 0,5 mg/l PIC oraz 1 mg/l PIC obserwowano podziały komórkowe jednak większość struktur wykazywała aberracje strukturalne.

Temat badawczy 1. Eksperyment 2. Kultury pylnikowe (KP)

W kulturach pylnikowych rozwój ELS uzyskano dla PO19, na pożywkach zawierających:

1 mg/l 2,4-D + 1 mg DIC + 4 mg/l tZ : 3,3 ELS/kłós, 0,7 ZR/kłós, 1,4 AR/kłós

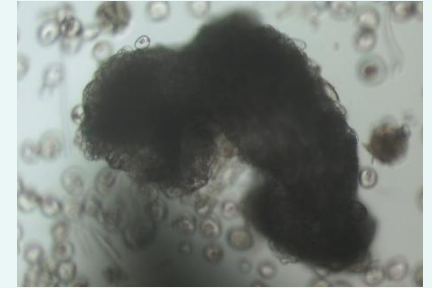
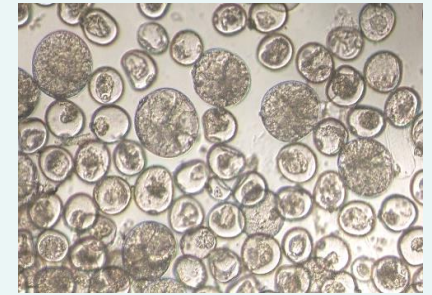
2 mg/l PIC + 2 mg/l DIC : 2,7 ELS/kłós, 0,7 AR/kłós

2 mg/l 2,4-D + 2 mg/l PIC : 5,3 ELS/kłós, 0 ZR/kłós

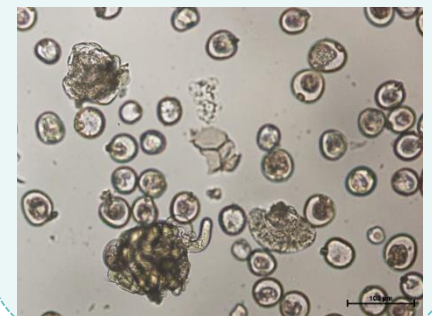
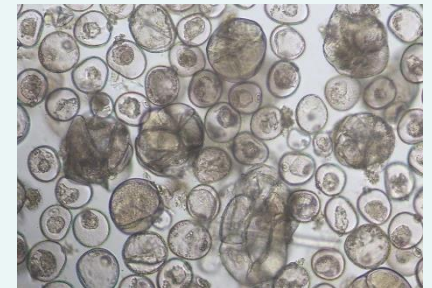
1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l DIC : 0,7 ELS/kłós, 0 ZR/kłós

2. KIM

ELS prawidłowe

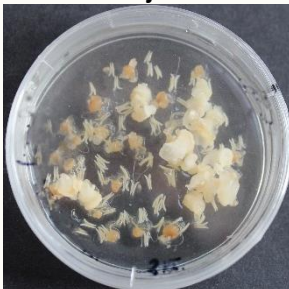


ELS prawidłowe / aberracje



2. KP

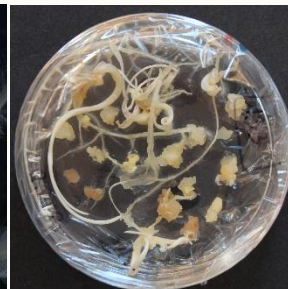
Indukcja ELS



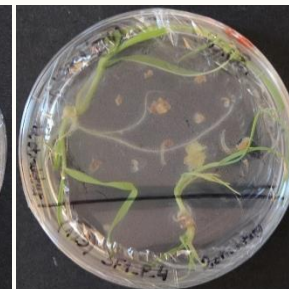
Regeneracja ELS



AR



ZR



Temat badawczy 1. Eksperyment 3. Analiza zawartości auksyn (Aux)

W pylnikach badanych linii wykryto:

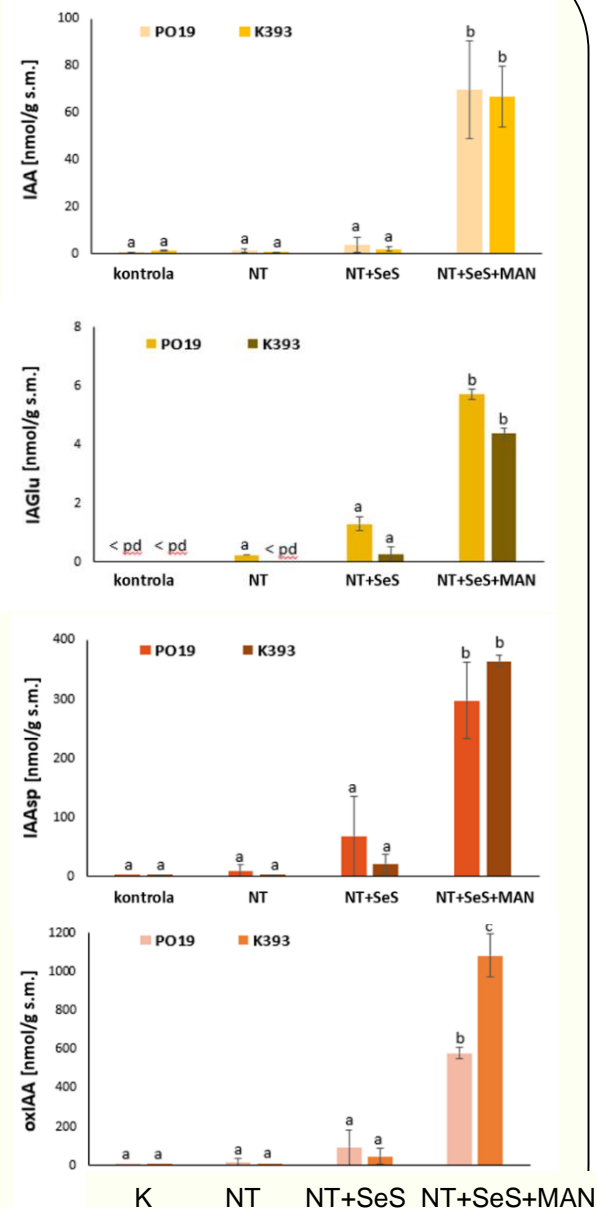
- ❖ wolny kwas indolilo-3 octowy (IAA),
- ❖ koniugaty aminokwasowe: indolilo-3-acetyloasparaginian (IAAsp) i indolilo-3-acetyloglutaminian (IAGlu)
- ❖ kwas 2-okso-indolilo-3-octowy (oxIAA).

1. W pylnikach pobieranych ze świeżo ściętych kłosów (K) całkowita pula Aux wynosiła 0,9 i 1,9 nmol/g s.m. dla PO19 i K393. Udział formy biologicznie aktywnej (IAA) wynosił 47% (PO19) - 52% (K393)

2. Traktowanie NT nie miało wpływu na zawartość poszczególnych form ani też sumaryczną zawartości Aux. Udział IAA w ogólnej puli Aux zmalał do 4% w pylnikach PO19 i 19% w pylnikach K393. Wzrósł udział oxIAA (z 18% do 59%) w pylnikach PO19 oraz IAAsp (z 36% do 61%) i oxIAA (z 12% do 20%) w pylnikach K393.

3. Traktowanie NT+SeS nie wywarło istotnego wpływu na zawartość poszczególnych form Aux u obu linii pszenicy ozimej. W pylnikach K393 nastąpił dalszy spadek udziału IAA (z 19% do 3%) i IAAsp (z 61% do 31%) na rzecz oxIAA (wzrost z 20% do 66%).

4. Traktowanie NT+SeS+MAN wywołało drastyczną zmianę zawartości Aux podnosząc ich sumaryczny poziom ponad 1000-krotnie w pylnikach PO19 i ponad 600-krotnie w pylnikach K393. Nastąpił istotny wzrost zawartości wszystkich form Aux przy zachowanym niskim udziale IAA i wysokim udziale oxIAA.



Temat badawczy 1. Eksperyment 3. Analiza zawartości cytokinin (Ck)

W pylnikach pszenicy ozimej wykryto 3 wolne, aktywne Ck_A (**tZ**, **cZ**, **iP**), szereg pochodnych (rybozydów i glikozydów) oraz **KIN** (Tabela 1).

1. W pylnikach świeżo ściętych kłosów suma zawartości Ck_A wynosiła **92 pmol/ g s.m.** i **398 pmol/ g s.m.** w pylnikach PO19 i K393, stanowiąc **6%** i **12 %** ogólnej puli Ck.

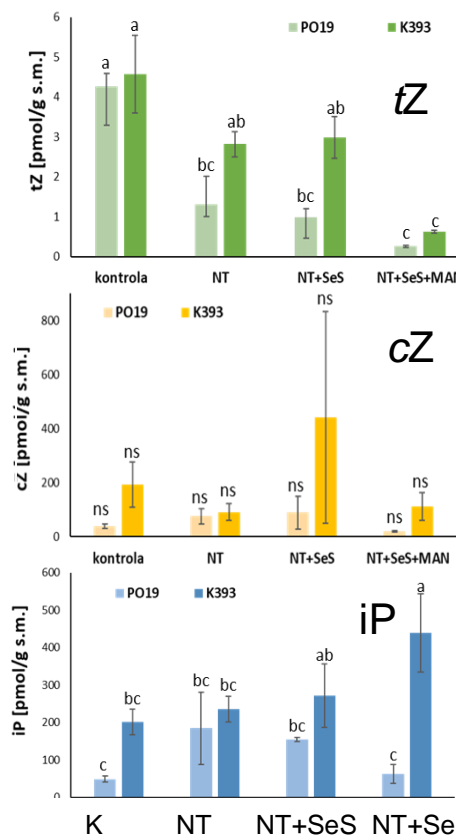
2. Traktowanie **NT** spowodowało: spadek **tZ** w pylnikach PO19, spadek **tZ9G** w pylnikach K393, wzrost **cZOG** w pylnikach PO19, wzrost **cZROG** w pylnikach K393 i pojawienie się **KIN** w pylnikach PO19. Suma zawartość Ck_A wynosiła **261 pmol/ g s.m.** i **329 pmol/ g s.m.** w pylnikach PO19 i K393, co stanowiło **7-8 %** ogólnej puli Ck.

3. Traktowanie **NT +SeS** obniżyło poziom **tZ9G** w pylnikach PO19. Suma zawartości Ck_A wynosiła **245 pmol/ g s.m.** i **716 pmol/ g s.m.** w pylnikach linii PO19 i K393, co stanowiło **6%** i **12%** ogólnej puli Ck.

4. Traktowanie **NT+SeS+MAN** wywołało spadek zawartości **tZ** i **tZ9G** oraz wzrost zawartości **cZOG** w pylnikach obu linii pszenicy ozimej, oraz wzrost zawartości **iP** i **cZROG** w pylnikach K393. Suma zawartości Ck_A wynosiła **83 pmol/ g s.m.** i **552 pmol/ g s.m.** w pylnikach PO19 i K393, co stanowiło **4%** i **15%** ogólnej puli Ck.

5. Traktowanie **NT+SeS+MAN** spowodowało zakłócenie równowagi hormonalnej (drastyczny wzrost **IAA/tZ+cZ+iP** (**IAA/Ck_A**)) w pylnikach obu badanych linii. Efekt ten był silniejszy w przypadku PO19.

Tabela 1. CK w pylnikach pszenicy ozimej	Skrót
<i>trans</i> Zeatyna	tZ
<i>cis</i> Zeatyna	cZ
N6-(Δ2-izopentenylo)adenina	iP
rybozyd <i>trans</i> Zeatyny	tZR
rybozyd <i>cis</i> Zeatyny	cZR
rybozyd N6-(Δ2-izopentenylo)adeniny	iPR
O-glukozyd <i>cis</i> -Zeatyny	cZOG
O-glukozyd rybozydu <i>cis</i> Zeatyny	cZROG
9-glukozyd <i>trans</i> Zeatyny	tZ9G
9-glukozyd <i>cis</i> Zeatyny	cZ9G
Δ2-izopentenylo)adenino-9-glukozyd	(iP9G
rybozydo-5-monofosforan <i>cis</i> Zeatyny	cZR5'MP
Δ2-izopentenylo)adenino-5-monofosforan	iPR5'MP
kinetyna	KIN



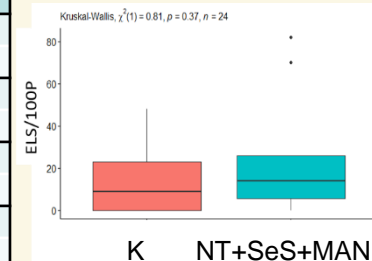
Obiekt	Traktowanie	IAA/Ck _A
PO19	kontrola	4,3
PO19	NT	4,5
PO19	NT+SeS	15
PO19	NT+SeS+MAN	841
K393	kontrola	3,3
K393	NT	1,6
K393	NT+SeS	2,6
K393	NT+SeS+MAN	121

Temat badawczy 2.

Eksperyment 1: Traktowanie NT/NT+SeS+MAN

Traktowanie NT+SeS+MAN podniosło średnią efektywność indukcji EM, nie przełamano jednak oporności genotypowej linii K393 i K20290 (nie uzyskano regeneracji roślin zielonych)

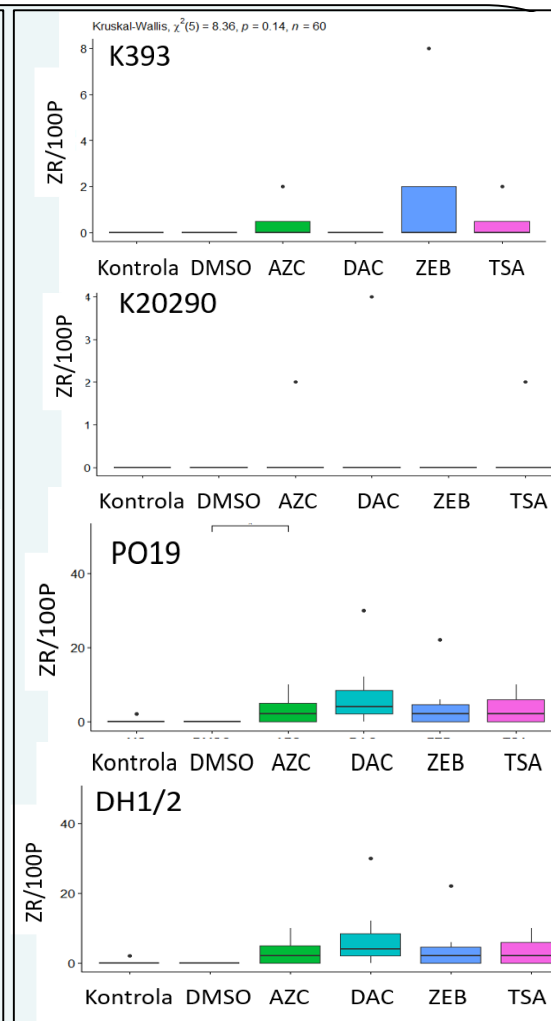
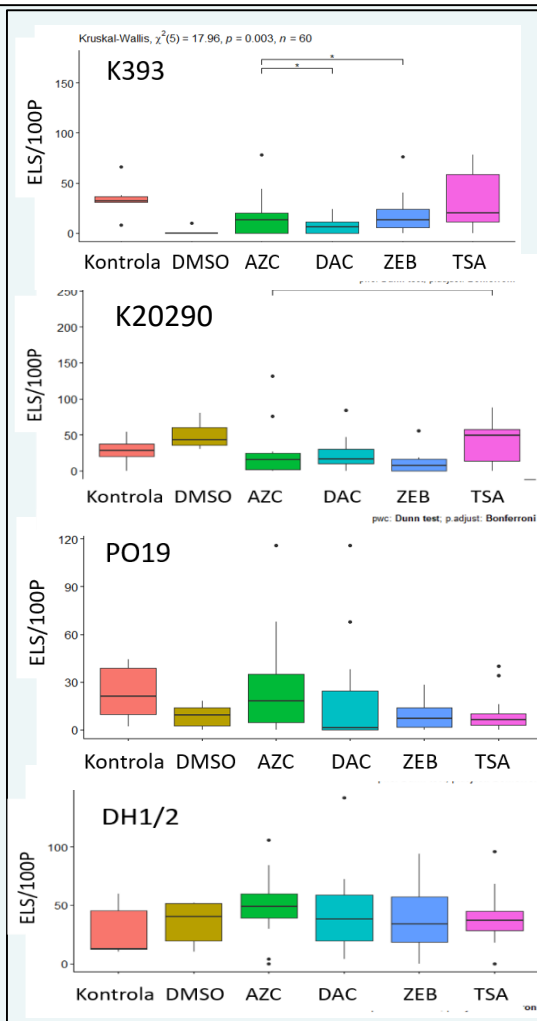
Linia	Traktowanie	ELS/100P	ZR/100P
K393	Kontrola	0,0	0,0
	NT+SeS+MAN	6,0	0,0
K20290	Kontrola	10,67	0,0
	NT+SeS+MAN	22,67	0,0
PO19	Kontrola	15,33	0,67
	NT+SeS+MAN	4,0	0,0
DH1/2	Kontrola	28,67	0,0
	NT+SeS+MAN	58,0	10,0
Średnia	Kontrola	13,67	0,17
	NT+SeS+MAN	22,67	2,5



Eksperyment 2: Traktowanie IM

1. Wykazano wpływ genotypu na wszystkie analizowane parametry efektywności EM.
2. Wszystkie analizowane IM wpłynęły na zwiększenie efektywności indukcji EM, a także regeneracji roślin zielonych.
3. IM nie przełamały oporności genotypowej linii mieszańcowej K20290.

Traktowanie	ELS/100P	ZR/100P
MS (K1)	25,06	1,39
MS+DMSO (K2)	37,22	1,22
AZC	46,53	6,94
DAC	34,64	3,39
ZEB	28,08	2,39
TSA	37,06	4,69
Średnia	34,77	3,34



Podsumowanie i Wnioski

1. Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na identyfikację kolejnej z przyczyn oporności badanych linii pszenicy ozimej na indukcję procesu EM, jaką jest drastyczna zmiana równowagi hormonalnej w reakcji na traktowanie mannitolem. Obserwowany drastyczny wzrost zawartości auksyn jest najprawdopodobniej przyczyną bardzo niskiej efektywności regeneracji roślin zielonych.
2. Modyfikacje traktowania wstępnego kłosów roztworem SS oraz inkubacja pylników w IM spowodowały wzrost efektywności indukcji EM, jednakże efektywność regeneracji RZ opornych mieszańców F1 nadal była niska.
3. W oparciu o uzyskane dane zostanie opracowana strategia dalszych modyfikacji procedury mających na celu podniesienie efektywności EM polskich materiałów hodowlanych pszenicy ozimej.

Doniesienie konferencyjne:

Wykład prezentowany na konferencji Eucarpia, VII International Conference of Cereal Biotechnology and Breeding, 6-7.11.2023 r. Wernigerode, Niemcy

Publikacje:

Manuskrypt pt. "New prospects for improving microspore embryogenesis induction in highly recalcitrant winter wheat lines" został złożony do redakcji czasopisma The Plants (Basel) (IF=4.5, 70 punktów MEiN)



Dziękujemy osobom zaangażowanym w realizację tematu badawczego 1 w roku 2023:
Dr Karel Doležal i Lenka Plačková z **Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany, Czech Academy of Sciences** w Ołomuńcu