

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

Okres realizacji: **2021**

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

Wykonawcy:



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

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Uniwersytetu Przyrodniczego
w Poznaniu (KGHR UP)



Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Temat badawczy 1 (2021): Screening podatności na indukcję procesu embriogenezy mikrospor polskich materiałów pszenicy zwyczajnej

Celem badań było **określenie stopnia podatności na indukcję procesu embriogenezy mikrospor (EM) materiałów hodowlanych pszenicy zwyczajnej otrzymanych od głównych, polskich hodowców tego gatunku:** Danko Hodowla Roślin Sp. z o.o., Poznańska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Małopolska Hodowla Roślin Sp. z o.o., Hodowla Roślin Strzelce Sp. z o.o. Grupa IHAR, Hodowla Roślin Smolice Sp. z o.o. Grupa IHAR.

Analizowano wpływ :

- ❖ **cech genotypowych**
- ❖ **warunków wzrostu i rozwoju roślin donorowych**
- ❖ **metody kultury *in vitro***

jako czynników modyfikujących:

- ❖ **żywołność mikrospor,**
- ❖ **efektywność indukcji EM**
- ❖ **zdolność do regeneracji roślin**

Wykorzystano metody **kultur pylnikowych (KP)** na pożywkach stałych i płynnych oraz **kultur izolowanych mikrospor (KIM)** standardowo stosowane w laboratoriach obu jednostek naukowych realizujących zadanie (IFR PAN i KGHR UP)

Cel zadania badawczego 1 został osiągnięty

Materiały i Metody

1. W badaniach wykorzystano **5 linii mieszańcowych** F_1 (CH1, MHR, K20290, K393 i SM IHAR) i **5 linii/odmian modelowych** (Pavon, PO19, PO20, KGHR1 i wymiennie KGHR2/DH150/DH1). Rośliny donorowe rosły w **warunkach polowych (P)**, w **komorze szklarniowej (KS)** lub **fitotronowej (KI)**.
2. Ścięte kłosa umieszczano w **4°C** na **7-14 dni (KP wg KGHR UP)** lub w **4°C** na **7-21 dni a następnie na 1-2 dni w 0,4 mol/l mannitolu (MAN) w 32°C (KIM i KP wg IFR PAN)**.
3. Wyizolowane pylniki/mikrospory przenoszono na **pożywki indukcyjne: C17_{ind} stałą lub płynną (KP)** lub **KBP_{ind} (KIM)** i „hodowano” w ciemności w **26°C**.
4. Uzyskane struktury zarodkopodobne (ELS) pasażowano na **pożywki regeneracyjne (Ms_{reg} – KP i KBP4P, K4NB – KIM)** oraz ukorzeniającą (**1/2 MS**)
5. Zregenerowane rośliny zielone wysadzono do gleby

Analizowano:

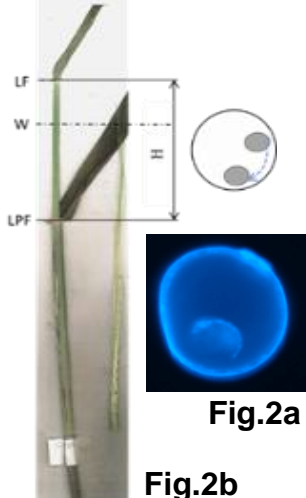
- ❖ fazę rozwojową mikrospor (barwienie acetokarminem lub DAPI)
- ❖ żywotność mikrospor (barwienie FDA)
- ❖ efektywność indukcji EM [%SLS; ELS/kłós]
- ❖ efektywność regeneracji roślin zielonych i albinotycznych [ZR/kłós; AR/kłós]
- ❖ poziom ploidalności regenerantów (analiza cytometryczna)

Fig.1. Schemat procedury indukcji EM w KP/KIM



Wyniki – kultury izolowanych mikrospor (metodyka IFR PAN):

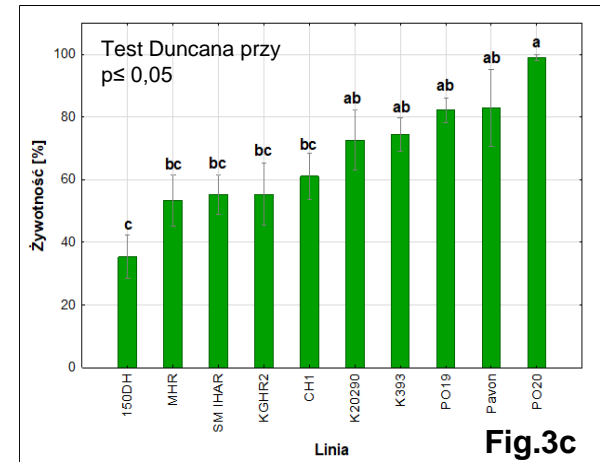
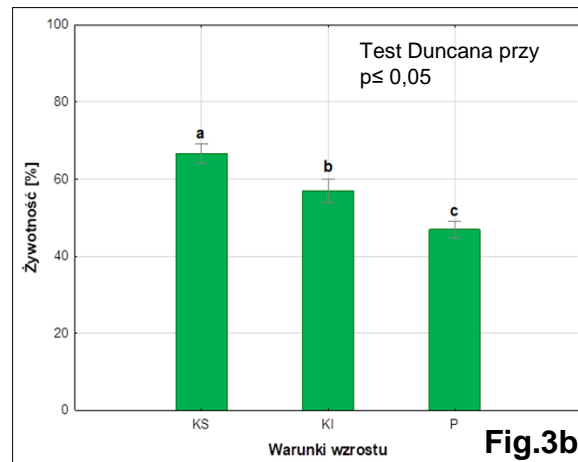
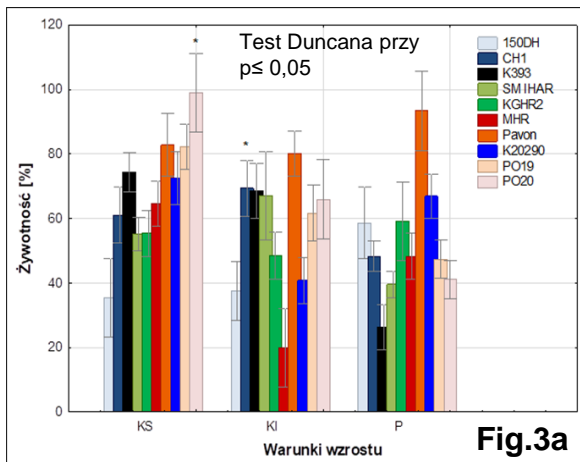
1. Wykazano, że moment osiągnięcia **stadium rozwoju mikrospor optymalnego dla indukcji EM** (Fig.2a) zależy od genotypu i warunków wzrostu roślin donorowych. Za odpowiedni parametr morfologiczny uznano położenie wierzchołka kłosa (W) w pochwie liściowej względem odległości (H) pomiędzy podstawą liścia flagowego i podstawą liści poprzedzającego liść flagowy (Fig.2b).



Parametr ten wynosił: 2/3-3/4H dla roślin rosnących w warunkach polowych (P) i komory szklarniowej (KS) oraz 1/2-3/4H dla komory fitotronowej.

Linia/Odmiana	P	KS	KI
Mieszzańcowe linie hodowlane F1 (H)			
SM IHAR	1/2	2/3	1/2 - 2/3
MHR	2/3 - 3/4	2/3 - 3/4	2/3 - 3/4
CH1	od 1/2	do 2/3	2/3
K393	1/2 - 0	3/4	2/3
K20290	od 2/3	2/3 - 3/4	1/2
Linie/odmiany modelowe (H)			
Pavon	3/4	3/4	3/4
150DH	2/3	3/4	1/2
KGHR2	3/4	3/4	2/3 - 3/4
PO19	2/3	2/3 - 3/4	1/2
PO20	2/3	2/3 - 3/4	1/2

2. Wykazano, że **żywołność mikrospor** warunkowana jest przez cechy genotypowe i warunki wzrostu roślin donorowych (Fig.3a). Wyższą żywołnością (o 10-20%) mikrospor charakteryzowały się rośliny rosnące w warunkach kontrolowanych (KS, KI) w stosunku do warunków polowych (P; Fig.3b). W warunkach KS żywołność mikrospor w najwyższym zakresie (70-99%) stwierdzono u połowy badanych linii/odmian (Fig.3c).



3. Wykazano, że **efektywność indukcji EM** określona frekwencją **tembriogennych mikrospor** zw. *star-like structures* (SLS) oraz mikrospor po pierwszym symetrycznym podziale jądra **zależy od genotypu oraz warunków wzrostu i rozwoju roślin donorowych**.

4. Wstępnym, krytycznym warunkiem indukcji EM był **poziom żywotności mikrospor przekraczający 55%** ogólnej liczby mikrospor w zawieszynie.

5. Frekwencja **SLS wynosiła od 0-100%** w zawieszynie mikrospor z roślin rosnących w warunkach kontrolowanych (KS, KI) oraz **0-24%** w zawieszynie mikrospor z roślin rosnących w warunkach polowych (P). Jednak, nawet bardzo wysoka frekwencja SLS w początkowej fazie kultury *in vitro* nie zapewniła wysokiej końcowej efektywności EM i uzyskania zielonych regenerantów. Począwszy do 7 dnia kultury *in vitro* obserwowano stopniowe zamieranie ELS, najczęściej w stadium globularnym (Tabela 1).

Tabela 1. Wpływ warunków wzrostu roślin donorowych na efektywność uzyskiwania ELS w kulturach izolowanych mikrospor linii mieszańcowych F₁ i linii/odmian modelowych pszenicy. Obserwacje mikroskopowe po 7, 14 i 28 dniach kultury *in vitro*.

Linia	7			14			28		
	P	KS	KI	P	KS	KI	P	KS	KI
150DH	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak
MHR	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak
SM IHAR	liczne struktury wielokomórkowe i pojedyncze ELS	brak	brak	liczne ELS kontynuujące rozwój	brak	brak	liczne ELS kontynuujące rozwój	brak	brak
KGHR2	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak
CH1	brak	pojedyncze struktury wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju	pojedyncze ELS; zahamowane w rozwoju	brak	pojedyncze struktury wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju	pojedyncze ELS; zahamowane w rozwoju	brak	pojedyncze struktury wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju	pojedyncze ELS; zahamowane w rozwoju
K20290	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak
K393	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak	brak
PO19	liczne struktury wielokomórkowe	brak	pojedyncze struktury wielokomórkowe	liczne ELS; kontynuujące rozwój i zahamowane w rozwoju	brak	pojedyncze struktury wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju	liczne ELS; zahamowane w rozwoju	brak	pojedyncze struktury wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju
Pavon	liczne struktury wielokomórkowe	liczne struktury wielokomórkowe	pojedyncze struktury wielokomórkowe	liczne ELS kontynuujące rozwój	liczne wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju	pojedyncze struktury wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju	liczne ELS; zahamowane w rozwoju	liczne wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju	pojedyncze struktury wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju
PO20	brak	liczne wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju	pojedyncze struktury wielokomórkowe; zahamowane w rozwoju	brak	liczne ELS; zahamowane w rozwoju	pojedyncze ELS; zahamowane w rozwoju	brak	liczne ELS; zahamowane w rozwoju	pojedyncze ELS; zahamowane w rozwoju

Wyniki – kultury pylnikowe (metodyka KHGR UP):

1. Wykazano, że **efektywność indukcji EM** [ELS/kłós] zależy od **genotypu oraz warunków wzrostu roślin donorowych**. ELS uzyskano tylko z pylników izolowanych z kłósów roślin rosnących w warunkach polowych. Ilość uzyskanych ELS była wyższa zwłaszcza w przypadku jarych materiałów modelowych (średnio 10,0 ELS/kłós dla KGHR1 i KGHR2) w stosunku do badanych linii mieszańcowych F₁ (średnio 1 ELS/kłós).

2. **Regenerację roślin zielonych** (0,2-1 ZR/kłós) uzyskano dla dwóch linii mieszańcowych (MHR, SM IHAR) oraz czterech linii/odmian modelowych (0,2-6,1 ZR/kłós).

3. Wśród regenerantów uzyskano niewielką ilość **roślin albinotycznych** (max. 0,8 AR/kłós).

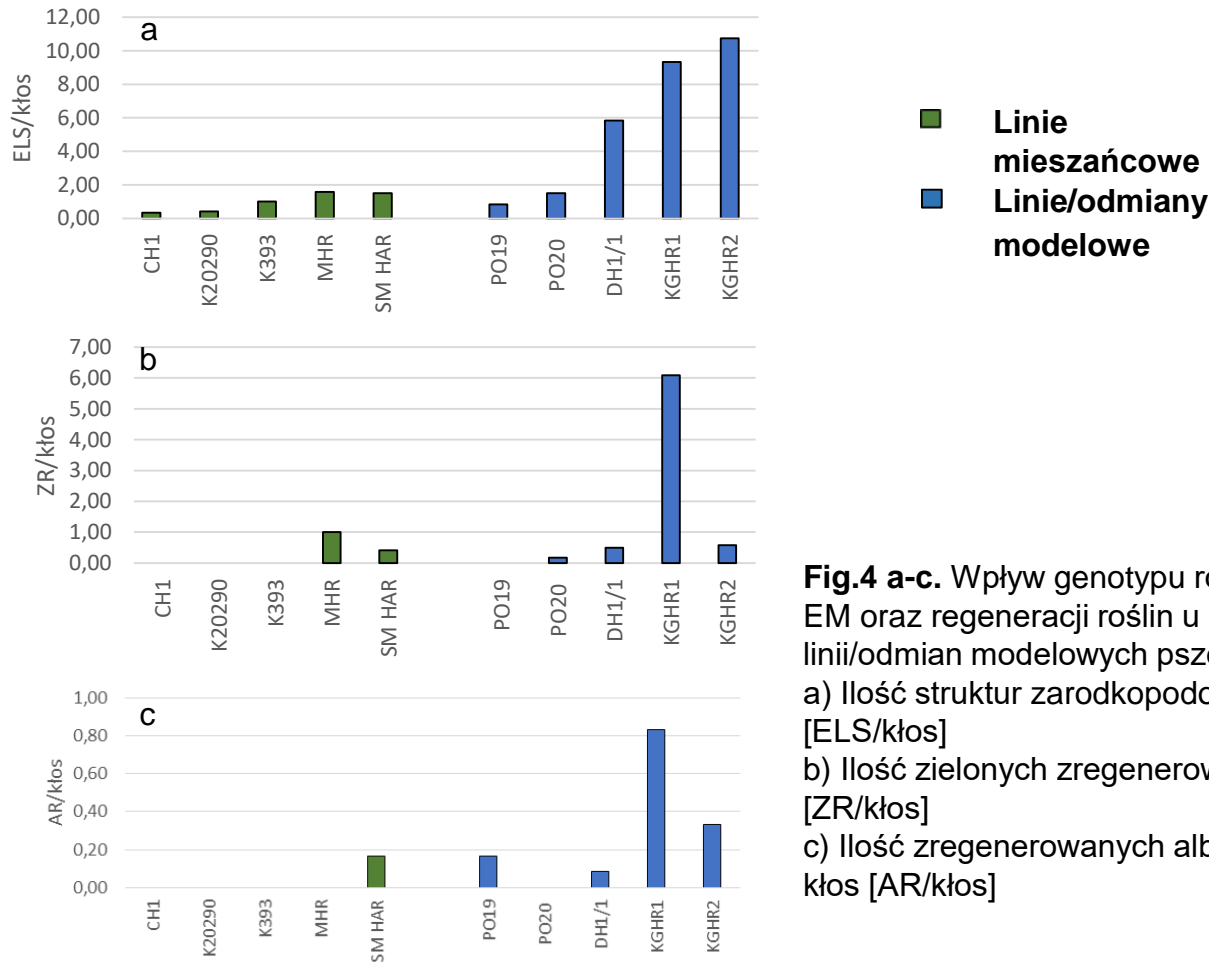


Fig.4 a-c. Wpływ genotypu roślin donorowych na efektywność indukcji EM oraz regeneracji roślin u badanych linii mieszańcowych F₁ oraz linii/odmian modelowych pszenicy rosnącej w warunkach polowych. a) Ilość struktur zarodkopodobnych w przeliczeniu na jeden kłós [ELS/kłós] b) Ilość zielonych zregenerowanych roślin w przeliczeniu na jeden kłós [ZR/kłós] c) Ilość zregenerowanych albinotycznych roślin w przeliczeniu na jeden kłós [AR/kłós]

4. Wykazano istotny wpływ **typu pożywki indukcyjnej** na efektywność EM i regenerację roślin zielonych (Fig.5-6). Istotnie wyższe parametry: ELS/kłos (1,9 *versus* 0 dla linii mieszańcowych F₁ i 9,9 *versus* 1,4 dla materiałów modelowych) oraz ZR/kłos (0,6 *versus* 0 dla linii mieszańcowych F₁ i 2,2 *versus* 0,7 dla linii/odmian modelowych) uzyskano na płynnej pożywce indukcyjnej (Tabela 2).

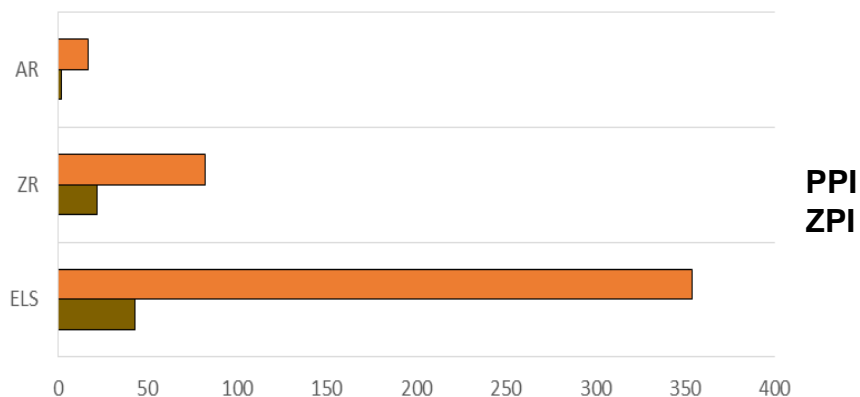


Fig.5. Efektywność indukcji EM oraz regeneracji roślin dla badanych linii mieszańcowych F₁ oraz linii/odmian modelowych pszenicy rosnącej w warunkach polowych.

ELS – suma uzyskanych struktur zarodkopodobnych; ZR – suma uzyskanych roślin zielonych; ZR – suma uzyskanych roślin albinotycznych; ZPI – zestalona pożywka indukcyjna; PPI – płynna pożywka indukcyjna

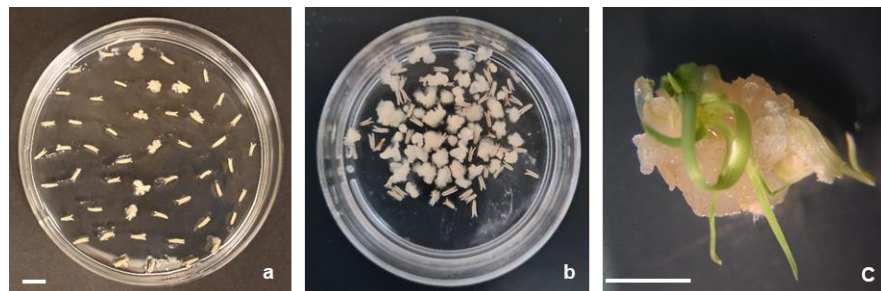


Fig.6. Indukcja EM i regeneracja roślin w kulturach pylnikowych badanych linii mieszańcowych F₁ oraz linii/odmian modelowych pszenicy.

Tabela 2. Wpływ pożywki indukującej na efektywność indukcji EM oraz regeneracji roślin u badanych linii mieszańcowych F₁ oraz linii/odmian modelowych pszenicy rosnącej w warunkach polowych.

Genotyp	ELS/kłos		ZR/kłos	
	ZPI	PPI	ZPI	PPI
<i>Mieszańcowe linie hodowlane</i>				
CH1	0,0	0,7	0,0	0,0
K20290	0,0	0,8	0,0	0,0
K393	0,0	2,0	0,0	0,0
MHR	0,0	3,2	0,0	2,0
SM IHAR	0,0	3,0	0,0	0,8
Średnia	0,0	1,9	0,0	0,6
<i>Linie/odmiany modelowe</i>				
PO19	0,0	1,7	0,0	0,0
PO20	0,2	2,8	0,0	0,3
DH1/1	0,0	11,7	0,0	1,0
KGHR1	4,5	14,2	3,0	9,2
KGHR2	2,5	19,0	0,7	0,5
Średnia	1,4	9,9	0,7	2,2

Wyniki – kultury pylnikowe (metodyka IFR PAN):

1. Efektywność indukcji EM w kulturach pylnikowych badanych linii mieszańcowych i linii/odmian modelowych była uzależniona od cech genotypowych i wyniosła 0-10,3 ELS/kłós (Fig.7). Najwyższą efektywność uzyskano dla linii modelowej 150DH na płynnej pożywce indukcyjnej (PPI).

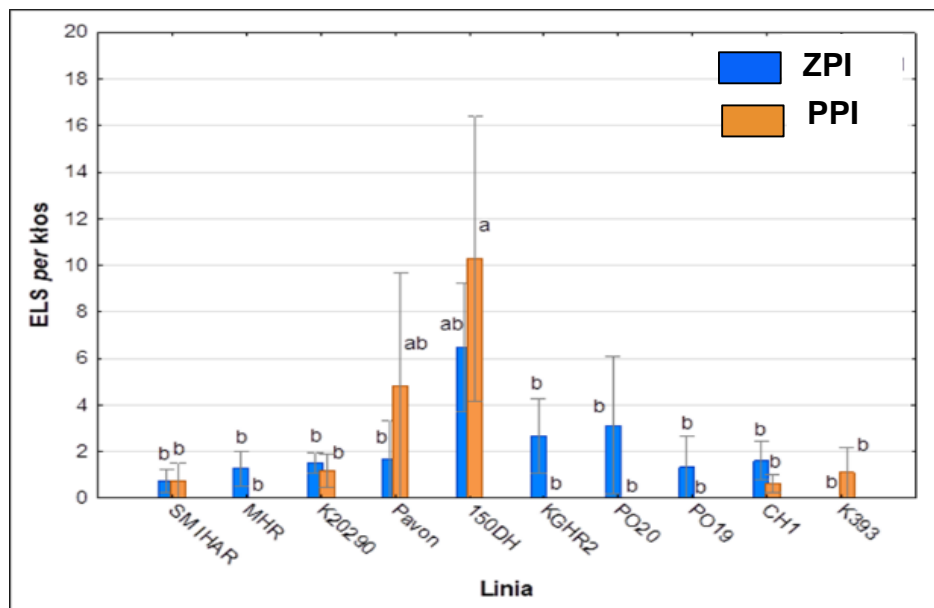


Fig.7. Wpływ genotypu roślin donorowych i typu pożywki indukcyjnej na efektywność indukcji EM oraz regeneracji roślin u badanych linii mieszańcowych F_1 oraz linii/odmian modelowych pszenicy. ELS/kłós - ilość struktur zarodkopodobnych w przeliczeniu na jeden kłós; ZPI – zestalona pożywka indukcyjna; PPI – płynna pożywka indukcyjna

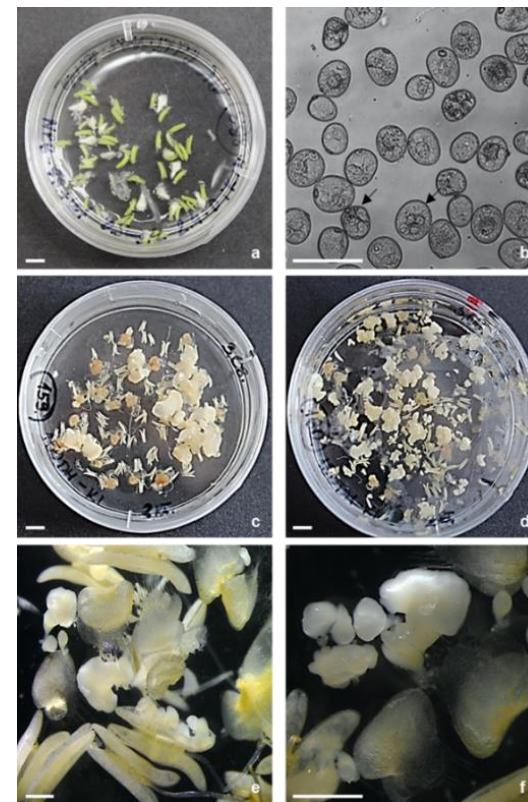


Fig.8. Kultury pylnikowe linii mieszańcowych F_1 oraz linii/odmian modelowych pszenicy na pożywce płynnej (a,b) i stałej (c,d) w dniu izolacji i po 8 tyg. kultury *in vitro* (e,f).

2. **Regenerację roślin zielonych** uzyskano dla wszystkich badanych linii mieszańcowych (CH1, K20290, K393, SM IHAR i MHR) oraz dla 3 linii/odmian modelowych (Pavon, KGHR2 i 150DH). Efektywność procesu była niska i w przypadku linii mieszańcowych dotyczyła roślin rosnących w warunkach polowych (P, Tabela 3).

3. **Spontaniczne podwojenie liczby chromosomów** uzyskano dla 1/3 zregenerowanych roślin.

Tabela 3. Wpływ genotypu, warunków wzrostu roślin donorowych i pożywki indukującej na efektywność regeneracji roślin u badanych linii mieszańcowych F₁ oraz linii/odmian modelowych.

Genotyp	Warunki wzrostu roślin donorowych	Pożywka indukcyjna	ZR/łoś (średnia ± S _D)
Linie mieszańcowe F1			
CH1	P	ZPI	0,75 ± 0,25
		PPI	0,25 ± 0,02
K20290	P	ZPI	0,42 ± 0,2
		PPI	0,25 ± 0,2
K393	P	PPI	0,17 ± 0,17
MHR	P	ZPI	0,1 ± 0,1
SM IHAR	P	ZPI	0,75 ± 0,25
Linie/odmiany modelowe			
Pavon	P	ZPI	5,0 ± 0,5
	KI	PPI	4,0 ± 0,4
KGHR2	KS	ZPI	1,5 ± 0,1
	KI	ZPI	0,5 ± 0,1
150DH	KS	PPI	0,5 ± 0,1



Fig.9. Regeneracja roślin w kulturach pylnikowych badanych linii mieszańcowych F₁ oraz linii/odmian modelowych pszenicy.

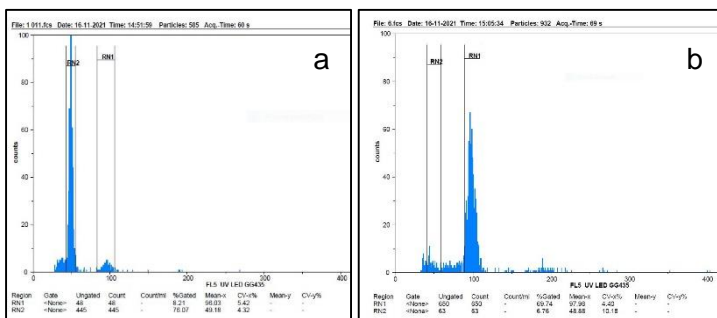


Fig.10. Przykładowe cytogramy uzyskanych regenerantów. a) Roślina haploidalna (n); b) Roślina dihaploidalna (2n)

Podsumowanie

W pierwszym roku realizacji zadania:

- Określono **parametr morfologiczny kłosów** korelujący z optymalnym do indukcji EM stadium rozwoju mikrospor.
- Oszacowano **żywoćność mikrospor oraz efektywność indukcji procesu embriogenezy i regeneracji roślin** w kulturach izolowanych mikrospor i kulturach pylnikowych prowadzonych metodami standardowymi dla IFR PAN i KGHR UP. Wykazano istotny wpływ czynników genotypowych, warunków wzrostu i rozwoju roślin donorowych oraz pożywki indukcyjnej.
- Wykazano, iż **potencjalną przyczyną oporności** badanych linii mieszańcowych w kulturach izolowanych mikrospor jest zamieranie struktur zarodkopodobnych na etapie zarodka globularnego.
- Wykazano, iż pomimo niższej żywoćności mikrospor, końcowa efektywność EM była najwyższa w kulturach pylnikowych roślin rosnących w warunkach naturalnych.
- Wykazano, iż **spontaniczne podwojenia genomu** występują u ok. 30% zregenerowanych roślin.

Wnioski

Przeprowadzone w ramach projektu badania potwierdziły, że linie mieszańcowe polskich firm hodowlano-nasiennych charakteryzuje niska podatność na indukcję procesu EM, w kulturach pylnikowych i w kulturach izolowanych mikrospor prowadzonych wg. standardowej metodyki.

Analiza uzyskanych wyników pozwoliła na identyfikację czynników warunkujących efektywność procesu oraz potencjalnych przyczyn oporności badanych linii mieszańcowych.

Uzyskane wyniki sugerują, że podniesienie efektywności EM badanych linii mieszańcowych pszenicy jest możliwe, pod warunkiem optymalizacji parametrów stresu indukującego proces EM oraz parametrów kultury *in vitro*.