

Zadanie 4

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

Sprawozdanie merytoryczne 2024



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 hab. Piotr Waligórski

Dr Przemysław Kopec

Dr Monika Krzewska



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

Tematy badawcze realizowane w roku 2024

T1: Zmiana poziomu metylacji/acetylacji genomu jako czynnik modyfikujący efektywność indukcji procesu EM pszenicy zwyczajnej

Celem badań było określenie wpływu inhibitorów metylacji DNA i deacetylacji histonów na indukcję EM i regenerację roślin, a także monitorowanie zmian epigenetycznych zachodzących po aplikacji związków demetylujących/acetylujących. Zmiany epigenetyczne oszacowano poprzez ocenę efektywności EM w kulturach pylnikowych, jak również przez analizę ogólnego poziomu metylacji DNA i histonów. Porównano wzór metylacji miejsc promotorowych wybranych genów wpływających na indukcję EM w genotypach podatnych i opornych. Wykonano też analizę ekspresji genu *Ta-MET1*, który koduje enzym metyl-transferazę biorący udział w procesie metylacji DNA.

T2: Identyfikacja białek regulujących proces EM i regenerację roślin w kulturach *in vitro* pszenicy zwyczajnej (zadanie 1)

Celem zadania było określenie wpływu wybranych substancji uczestniczących w regulacji rozwoju ELS na efektywność indukcji EM i regenerację roślin w kulturach *in vitro* pszenicy zwyczajnej. W badaniach testowano modyfikacje składu pożywki indukcyjnej poprzez dodatek substancji podtrzymujących żywotność komórek, stymulujących podziały komórkowe i różnicowanie oraz warunkujących prawidłową biogenezę chloroplastów i biosyntezę barwników chlorofilowych.

Materiały i Metody

Temat badawczy 1. Zmiana poziomu metylacji/acetylacji genomu jako czynnika modyfikującego efektywność indukcji procesu EM pszenicy zwyczajnej

Materiał roślinny: 2 linie pszenicy ozimej: mieszańcowa F₁ (**K20290**) i linia modelowa (**DH1/2**)

Traktowanie wstępne: kłosa 10-20 dni w 4 °C → izolacja pylników → inkubacja w pożywce ½ MS + **5 µmol/l** lub **7,5 µmol/l 5-azacytydyna (AZC)** lub **trichostatyna (TSA)**

Kultury pylnikowe

Indukcja: płynna pożywka C17+90 g/l maltozy+50g/l Ficall 400+1 mg/l 2,4-D+i 1 mg/l Dikamba; 28 °C, ciemność

Regeneracja: pożywka MS +0,5 mg/l NAA+0,5 mg/l kinetyna; 24 °C, 16h/8 h (dzień/noc)

Analizy:

- Efektywność indukcji EM (**ELS/100P**) i regeneracji roślin zielonych (**ZR/100P**)
- Analiza ogólnego poziomu metylacji DNA w pylnikach po inkubacji z AZA (HPLC)
- Analiza **ogólnego poziomu acetylacji histonów** w pylnikach po traktowaniu TSA (pomiar aktywności acetylotransferazy histonowej met. kolorymetryczną)
- Analiza **szczegółowego poziomu metylacji DNA** dla wybranych genów regulujących poziom metylacji i EM (TaHAG3, TaHAM, TaHAC1, TAHAC4, TaMET1) (PCR, sekwencjonowanie met. Sangera)
- Analiza poziomu ekspresji metylotransferazy DNA (Ta-MET1) w pylnikach po inkubacji z AZA (RT-PCR)

Materiały i Metody

Temat badawczy 2. Identyfikacja białek regulujących proces EM i regenerację roślin w kulturach *in vitro* pszenicy zwyczajnej (zadanie 1)

Materiał roślinny: 4 linie pszenicy ozimej:

2 linie mieszańcowe F₁ (**K393**, **K20290**) i 2 linie modelowe (**PO19**, **PO20**)

Kultury izolowanych mikrospor (KIM) i kultury pylnikowe (KP)

Traktowanie wstępne (NT+SeS+0.7M MAN):

1. kłosa 7-14 dni w 4°C + 3 dni w 50 µM selenianu sodu w 4°C + 4 dni w 0,7 M mannitol w 20°C (KIM, KP)
2. kłosa 7-14 dni w 4°C + 3 dni w 50 µM selenianu sodu w 4°C + 4 dni w 0,7 M mannitol w 4°C (KIM, KP)
3. kłosa 7-14 dni w 4°C + 3 dni w 50 µM selenianu sodu w 4°C – izolacja pylników - 4 dni w 0,7 M mannitol w 4°C (KIM)

Modyfikacje pożywki indukcyjnej:

mKBP1: 1 mg/l tidiazuron (TDZ) (KIM) oraz 4 mg/l TDZ (KP)

mKBP2 (kontrola) : 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l *trans* Zeatyna (*tZ*) (KIM) oraz
1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l Dikamba i 4 mg/l *tZ* (KP)

mKBP2 suplementowano dodatkowo:

mKBP3 i mKBP4: 5 µmol/l i 10 µmol/l kwas 2-indol-3-yl-4-oxo-4-fenylomasłowy (**PEO-IAA**; antyauksyna)

mKBP5 i mKBP6: 50 µmol/l i 100 µmol/l melatonina (**MEL**)

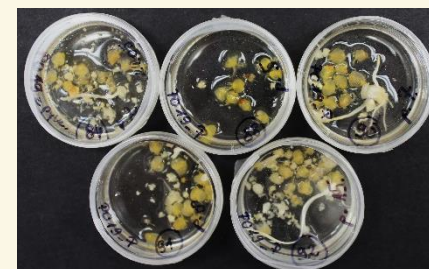
mKBP7 i mKBP8: 1 µmol/l i 2 µmol/l fitosulfokina α (**PSK-α**)

mKBP9 i mKBP10: 1 µmol/l i 2 µmol/l fluorek fenylometylosulfonylu (**PMSF**, inhibitor proteaz)

mKBP11 i mKBP12: 0,5 µmol/l i 1 µmol/l **E64** (inhibitor proteaz)

mKBP13 i mKBP14: 10 µmol/l i 60 µmol/l kwas γ-aminomasłowy (**GABA**)

mKBP15: 0,05% dimetylosulfotlenek (**DMSO**)



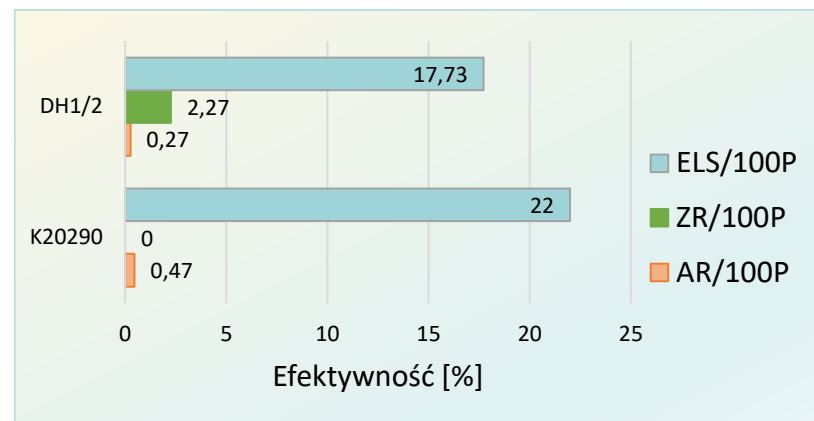
Wyniki

Temat badawczy 1. Efektywność indukcji EM i regeneracji roślin

Efektywność indukcji EM wyniosła średnio 17,7 ELS i 22 ELS na 100 pylników dla linii DH1/2 i K20290 (Ryc.1). Linia DH1/2 regenerowała średnio 2,3 ZR/100P. Linia oporna nie regenerowała roślin zielonych, uzyskano jedynie pojedyncze rośliny albinotyczne (0,5 AR/100P).

Dla linii DH1/2, najwyższą efektywność EM (40 ELS/100P) i regeneracji (8 ZR/100P) uzyskano po inkubacji bez dodatku inhibitorów metylacji DNA i deacetylacji histonów. Dla linii K202920, najwyższą efektywność EM (44 ELS/100P) uzyskano po stymulacji inhibitorem metylacji (5,0 $\mu\text{mol/l}$ AZC).

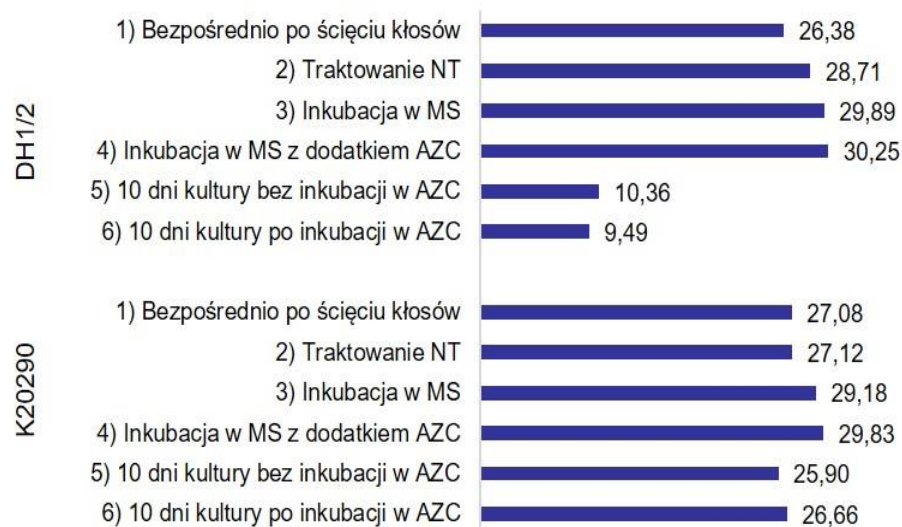
Ryc.1. Efektywność indukcji EM [ELS/100P] i regeneracji roślin [ZR/100P, AR/100P]



Temat badawczy 1. Analiza ogólnego poziomu metylacji DNA.

Wykazano, iż zawartość cytydyny metylowanej zmienia się w trakcie procedury indukcji EM. Poziom metylacji DNA w pylnikach bezpośrednio po ścięciu kłosów był podobny u obu badanych linii i wynosił 26-27% (Ryc. 2). Po traktowaniu niską temperaturą, parametr ten nieznacznie wzrastał, ale tylko u podatnej linii DH1/2. Dalszy wzrost ogólnego poziomu metylacji obserwowano u obu linii po inkubacji pylników w MS. Po 10 dniach kultury *in vitro* obserwowano znaczne obniżenie poziomu metylacji DNA, przy czym poziom metylacji cytozyny był trzykrotnie niższy w DNA izolowanym z pylników linii podatnej (DH1/2) w porównaniu do odpornej (K20290).

Ryc.2. Udział cytydyny metylowanej w całkowitej [%]



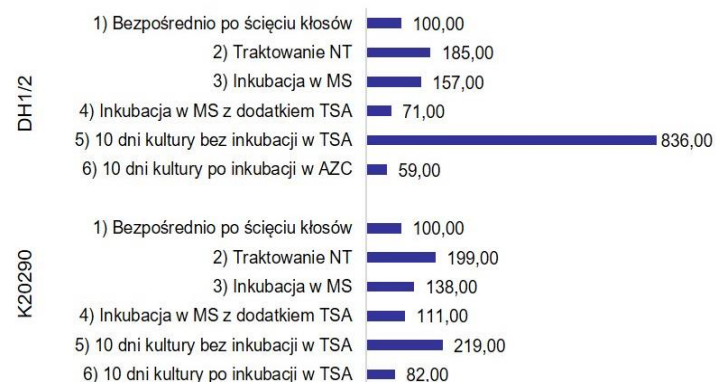
Temat badawczy 1. Analiza ogólnego poziomu acetylacji histonów

Analiza Western Blot potwierdziła obecność białek histonowych o masie 14-20,1 kDa. Procent acetylacji histonu H3 w pylnikach po traktowaniu niską temperaturą wzrastał prawie 2-krotnie w stosunku do pylników izolowanych bezpośrednio po ścięciu kłosów, a następnie malał po inkubacji w pożywce MS (Ryc.3). Jeśli inkubacja była prowadzona w pożywce suplementowanej TSA obserwowano dalszy spadek acetylacji H3 podczas prowadzenia kultury pylnikowej, przy braku TSA obserwowano wyraźny wzrost acetylacji H3 po 10 dniach kultury.

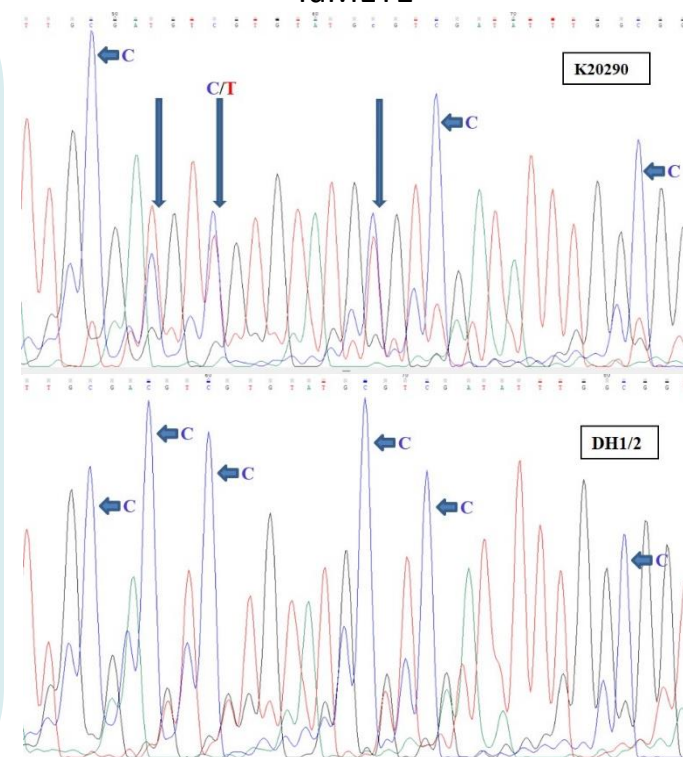
Temat badawczy 1. Analiza szczegółowego poziomu metylacji DNA

Zaprojektowano po 6 par starterów PCR komplementarnych do sekwencji promotorowych 5 genów regulujących poziom metylacji (TaHAG3; TaHAM; TaHAC1; TaHAC4; TaMET1). Dobrano optymalne warunki PCR i startery specyficzne dla każdego z genów oraz zsekwencjonowano miejsca promotorowe. W wyizolowanym DNA wykonano selektywną deaminację cytozyny do uracylu, który podczas amplifikacji PCR jest konwertowany do tyminy. Analiza porównawcza sekwencji wzorcowych i konwertowanych pozwoliła na określenie szczegółowego poziomu metylacji DNA w miejscach promotorowych genów powiązanych z efektywnością EM. W miejscu promotorowym genu *TaHAG3* stwierdzono brak metylacji wysp CpG, co wiązało się z całkowitą konwersją cytozyn (C) w tyminy (T) niezależnie od genotypu i etapu doświadczenia. Promotor genu *TaHAC4* charakteryzował się częściową metylacją, jednakże miała ona ten sam wzór w obu badanych genotypach oraz na wszystkich analizowanych etapach doświadczenia. Z kolei, w promotorze genu *TaMET1* zidentyfikowano różnice we wzorach metylacji pomiędzy genotypami. Linia mieszańcowa K20290 charakteryzowała się o 50% wyższą metylacją DNA w porównaniu do promotora linii DH1/2 (Ryc. 4).

Ryc.3. Poziom acetylacji histonu H3 [%]



Ryc. 4. Wzory metylacji w promotorze genu TaMET1

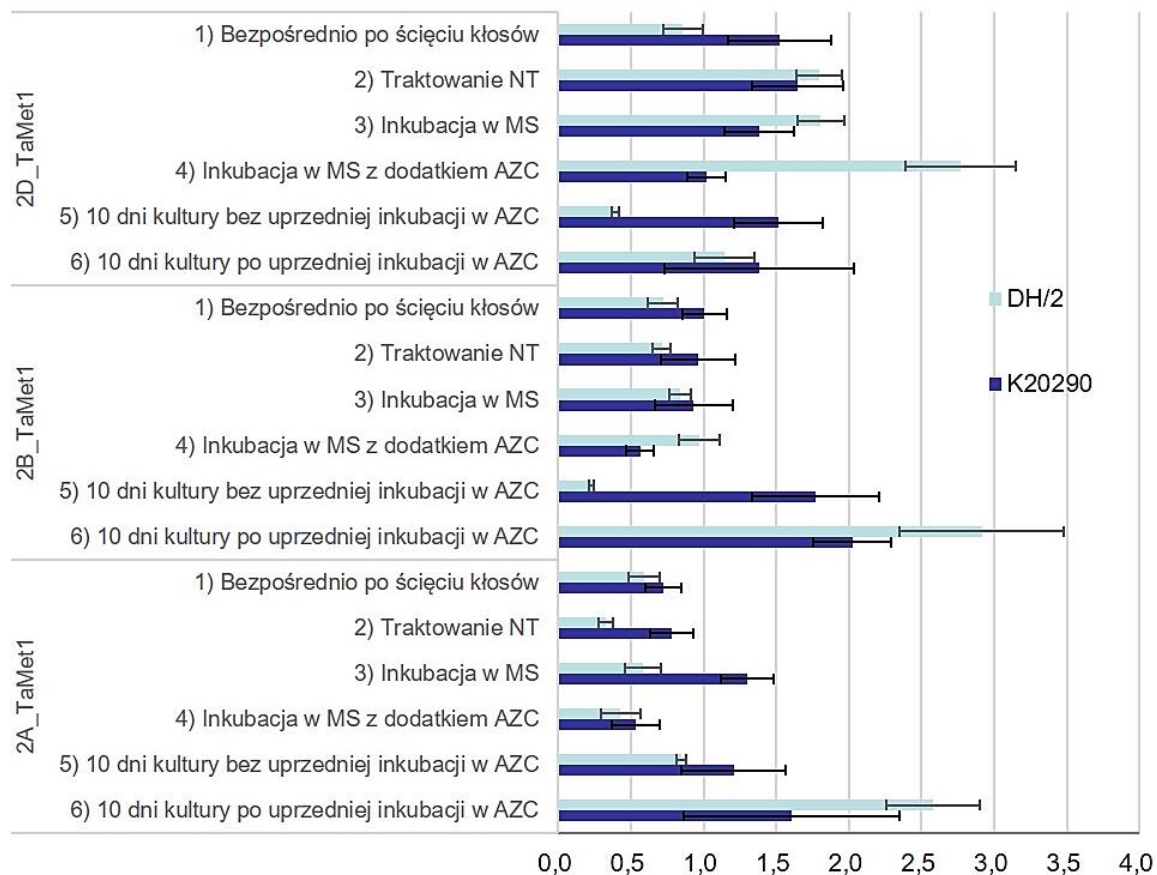


C - miejsca metylacji (brak konwersji)
C/T – brak metylacji (konwersja cytozyny w tyminę)

Temat badawczy 1. Analiza poziomu ekspresji metylotransferazy DNA (Ta-MET1)

Analizę ekspresji Ta-MET1 wykonano na kolejnych etapach procedury indukcji EM. Zaprojektowano po 3 pary starterów do RT-PCR komplementarne do sekwencji genu TaMET1 i specyficznych dla subgenomu A, B oraz D. Przeprowadzono walidację PCR w gradiencie temperaturowym dla badanych ampikonów oraz genów referencyjnych (*ARF*, *GPDH*). Analiza RT-PCR pozwoliła na określenie względnej wartości ekspresji ($\Delta\Delta Cq$) genu TaMET1, który okazał się aktywny we wszystkich trzech subgenomach pszenicy. Na początkowych etapach doświadczenia (1-4), niezależnie od genotypu, najwyższą aktywność TaMET1 obserwowano w subgenomie D (Ryc. 5). Po 10 dniach kultury wzrastała względna wartość ekspresji TaMET1 w subgenomach A i B, osiągając najwyższą wartość po 10 dniach kultury po inkubacji w AZC).

Ryc. 5. Względna wartość ekspresji ($\Delta\Delta Cq$) genu TaMET1



Obserwowano różnice we względnej wartości ekspresji TaMET1 pomiędzy badanymi genotypami. Embriogenna linia DH1/2 charakteryzowała się niższą wartością tego parametru na wszystkich etapach doświadczenia, oprócz etapu 5 (po 10 dniach kultury bez inkubacji w AZC). Średnia wartość ekspresji TaMET1 w trakcie całego doświadczenia była wyższa u linii odpornej K20290.

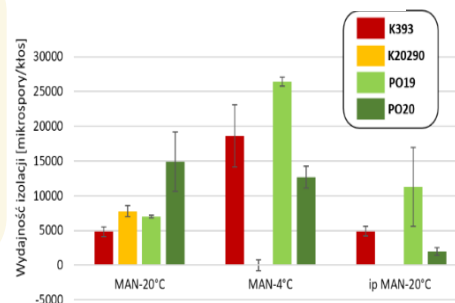
1. Zawiesiny mikrospor uzyskane wg. wstępnie stosowanej procedury charakteryzowała niska wydajność izolacji (Ryc.6A) i żywotność mikrospor (Ryc.6B) oraz niska efektywność EM (0-40 ELS/ 100 000 (10^5) mikrospor). Rośliny zielone uzyskano tylko u linii PO19 na pożywce mKBP15 z 0,05% DMSO (1,1 ZR/ 10^5 mikrospor; Ryc. 7).

Ryc.7. Efektywność EM w KIM zakładanych wg. wstępnej procedury indukcji EM (NT+SeS+MAN 20°C)

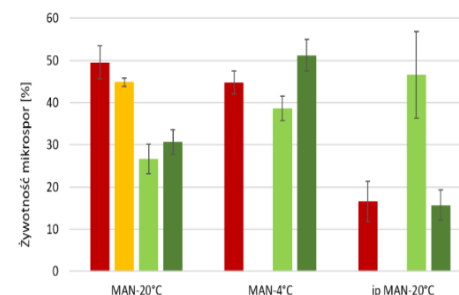
Linia	Indukcja (0d)	Indukcja (21d)	Indukcja (42d)	Regeneracja	Efektywność EM
K393					mKBP2: 11 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 4,8 AR/ 10^5 mks mKBP4: 1 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks mKBP5: 3,3 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks
K20290					mKBP5: 10 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks mKBP12: 1 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks mKBP13: 3,3 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks mKBP14: 3,3 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks
PO19					mKBP5: 8 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks mKBP7: 12,6 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks mKBP8: 22,9 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks mKBP15: 40 ELS/ 10^5 mks; 1,1 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks
PO20					mKBP3: 9 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks mKBP4: 9 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks mKBP15: 9 ELS/ 10^5 mks; 0 ZR/ 10^5 mks; 0 AR/ 10^5 mks

2. Obniżenie temp. z 20°C do 4°C w trakcie traktowania mannitołem podniosło wydajność izolacji (Fig.6A) ale nie poprawiło żywotności mikrospor (Fig.6B) ani efektywności EM.
3. Wyraźny wzrost efektywności EM uzyskano poprzez traktowanie mannitołem uprzednio wyizolowanych pylników (Ryc.8). Poprawę indukcji uzyskano na pożywce kontrolnej mKBP2. Dla odpornej linii K393 uzyskano również wzrost efektywności regeneracji roślin zielonych

Ryc.6a. Wydajność izolacji



Ryc.6b. Żywotność mikrospor [%]



Ryc.8. Efektywność EM w KIM zakładanych wg. zmodyfikowanej procedury (NT+SeS → izolacja pylników → MAN 20°C)

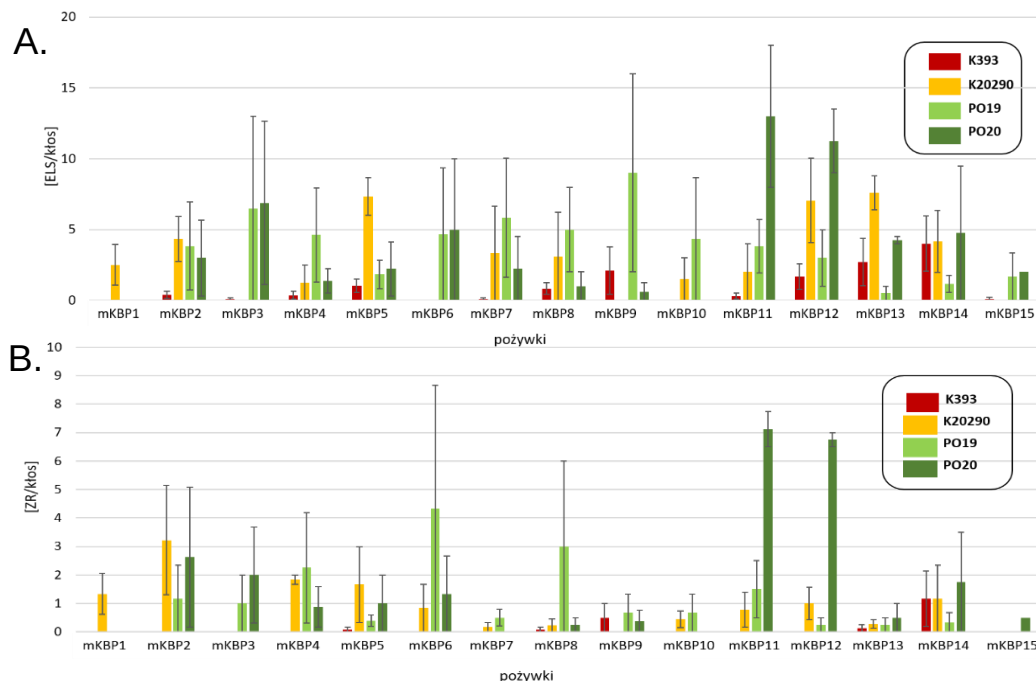
Linia	Indukcja (0d)	Indukcja (21 d)	Indukcja (42d)	Regeneracja	Efektywność EM
K393					mKBP2: 15 ELS/ 10^5 mks 4,1 ZR/ 10^5 mks 1,4 AR/ 10^5 mks
					mKBP5: 4,1 ELS/ 10^5 mks 1,4 ZR/ 10^5 mks 0 AR/ 10^5 mks
					mKBP2: 62,9 ELS/ 10^5 mks 0 ZR/ 10^5 mks 0 AR/ 10^5 mks
PO19					mKBP5: 11,3 ELS/ 10^5 mks 0 ZR/ 10^5 mks 0 AR/ 10^5 mks
					mKBP2: 10 ELS/ 10^5 mks 0 ZR/ 10^5 mks 0 AR/ 10^5 mks
PO20					mKBP2: 10 ELS/ 10^5 mks 0 ZR/ 10^5 mks 0 AR/ 10^5 mks

Temat badawczy 2. Kultury pylnikowe

W kulturach pylnikowych zakładanych wg. wstępnie stosowanej procedury uzyskano średnio od 0 do 13 ELS/kłós (Ryc. 9A). W kulturach linii K393 i K20290 najwyższą efektywność indukcji EM uzyskano na pożywkach mKBP13 i mKBP14 zawierających 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l Dikamba, 4 mg/l tZ oraz odpowiednio 10 i 60 $\mu\text{mol/l}$ GABA. Dla obu bardziej podatnych linii PO19 i PO20 zaobserwowano korzystny wpływ antyauksyny (5 $\mu\text{mol/l}$ PEO-IAA; mKBP3) oraz inhibitorów proteaz – 1 $\mu\text{mol/l}$ PMSF dla PO19 (mKBP9) i 0,5 – 1 $\mu\text{mol/l}$ E64 (mKBP11, mKBP12) dla PO20. Efektywność regeneracji roślin zielonych wyniosła od 0 do 7,1 ZR/kłós (Ryc. 9B), nie wykazano wpływu rodzaju pożywki indukcyjnej.

Obniżenie temperatury (z 20°C do 4°C) w trakcie traktowania kłósów mannitołem stymulowało rozwój ELS i regenerację roślin zielonych. Uzyskano od 5 do 24 ELS/kłós oraz od 2 do 13 ZR/kłós. W przypadku linii opornych K3939 i K20290, najlepsze rezultaty osiągnięto przy zastosowaniu 60 $\mu\text{mol/l}$ GABA (mKBP14). Dla linii bardziej podatnych najlepsze wyniki uzyskano pod wpływem 100 $\mu\text{mol/l}$ MEL (mKBP6) dla PO19 i 0,5 $\mu\text{mol/l}$ E64 (mKBP11) dla PO20 (Ryc. 10).

Ryc.9. Efektywność indukcji EM (A) i regeneracji roślin zielonych (B) w KP zakładanych wg. zmodyfikowanej procedury (NT+SeS → izolacja pylników → MAN 20°C)



Ryc.10. Efektywność EM w KP wg. zmodyfikowanej procedury (NT+SeS → izolacja pylników → MAN 20°C)

Linia	Indukcja	Regeneracja	Indukcja	Regeneracja
K393				
	mKBP9 10,5 ELS/kłós; 3 ZR/kłós; 0 AR/kłós	mKBP14 12 ELS/kłós; 6 ZR/kłós; 0 AR/kłós		
K20290				
	mKBP2 7,5 ELS/kłós; 7 ZR/kłós; 0,5 AR/kłós	mKBP14 7,5 ELS/kłós; 3,5 ZR/kłós; 0,5 AR/kłós		
PO19				
	mKBP4 14,5 ELS/kłós; 8 ZR/kłós; 1 AR/kłós	mKBP6 14 ELS/kłós; 13 ZR/kłós; 0,5 AR/kłós		
PO20				
	mKBP3 24 ELS/kłós; 7 ZR/kłós; 0 AR/kłós	mKBP11 8 ELS/kłós; 7,8 ZR/kłós; 0 AR/kłós		

Podsumowanie

1. Uzyskano poprawę efektywności EM: (1) w kulturach izolowanych mikrospor poprzez wprowadzenie traktowania mannitołem izolowanych pylników (4 dni w 20°C); (2) w kulturach pylnikowych poprzez zastosowanie niskiej temperatury (4°C) w trakcie traktowania kłosów mannitołem i modyfikację składu hormonalnego pożywki (1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Dikamba + 4 mg/l tZ). Wykazano możliwość dalszej optymalizacji procedury indukcji EM u pszenicy ozimej. W zależności od zastosowanej metody kultury *in vitro*, procedury wstępnego traktowania kłosów i cech genotypowych roślin macierzystych korzystny wpływ na przebieg EM wykazały: GABA, MEL, PSK- α i DMSO.
2. Potwierdzono pozytywny wpływ inhibitora metylacji (5,0 μ mol/l AZC) na efektywność indukcji EM u odpornej linii mieszańcowej K20290. Niestety, nie uzyskano regeneracji roślin zielonych.
3. Wykazano, iż poziom metylacji DNA ulegał istotnym zmianom w trakcie indukcji procesu EM. Po początkowym wzroście, poziom metylacji cytozyny spadł po 10 dniach kultury *in vitro* izolowanych pylników i był 3-krotnie niższy w DNA izolowanym z pylników linii podatnej DH1/2 w porównaniu do linii odpornej K20290.
4. Określono wzory metylacji miejsc promotorowych genów TaHAG3, TaHAC4 i TaMET1 wpływających na efektywność EM i stwierdzono, że były one identyczne na poszczególnych etapach eksperymentu oraz charakterystyczne dla analizowanego genotypu. Większą liczbę metylacji promotora genu TaMET1 obserwowano u linii embriogennej, co może się wiązać z obserwowaną średnio niższą ekspresją genu TaMET1, a w efekcie efektywniejszą indukcją EM.
5. Stwierdzono, iż najwyższa efektywność embriogenezy wiąże się z wysoką acetylacją histonu H3 po 10 dniach kultury bez uprzedniej inkubacji w TSA.

Miernik zadania – stopień realizacji

lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
	Analiza wpływu inhibitorów <u>metylacji</u> na efektywność EM	8	8	1,00
	Analiza ogólnego poziomu <u>metylacji</u> DNA/ <u>acetylacji</u> histonów	24	24	
	Analiza szczegółowego poziomu <u>metylacji</u> DNA	12	12	
	Analiza poziomu ekspresji Ta-MET1 (DNA METHYLTRANSFERASE)	12	12	
temat badawczy 2				
	8 modyfikacji pożywki indukcyjnej x 2 stężenia aplikowanych substancji x 4 linie pszenicy ozimej	64	64	1,00
			ŚREDNIA	1,00
			% REALIZACJI ZADANIA	100%

Doniesienia konferencyjne:

1. XXXV Konferencja Embriologicznej Rośliny- Zwierzęta- Człowiek, 20-23.05.2024, Katowice (poster)
2. Ogólnopolska Konferencja Naukowa „Nauka dla postępu biologicznego”, 21-22 maja 2024 Lublin-Urszulin (prezentacja)
3. XVI Ogólnopolska Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin PTB pt. „Biotechnologia i Kultury In Vitro Roślin w Badaniach Podstawowych i Aplikacyjnych”, 23-25.09.2024, Kraków (prezentacja, poster)

Publikacja:

Dubas i wsp. “New prospects for improving microspore embryogenesis induction in highly recalcitrant winter wheat lines” Plants 13;363. <https://doi.org/10.3390/plants13030363>

Mannitol-induced alternation of endogenous hormones balance and its effect on bread wheat (*Triticum aestivum* L.) microspore reprogramming towards embryogenic development

Agnieszka Springer¹, Karel Doležal², Lenka Plačková², Ewa Dubas¹, Monika Krzewska¹, Przemysław Kopec¹, Dorota Weigt³, Iwona Żur¹

¹The F. Górski Institute of Plant Physiology Polish Academy of Sciences, Niezapominajek 21, 30-239, Kraków, Poland

²Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, and Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371, Olomouc, Czech Republic

³Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences, 11 Dojazd St., 60-632 Poznań, Poland

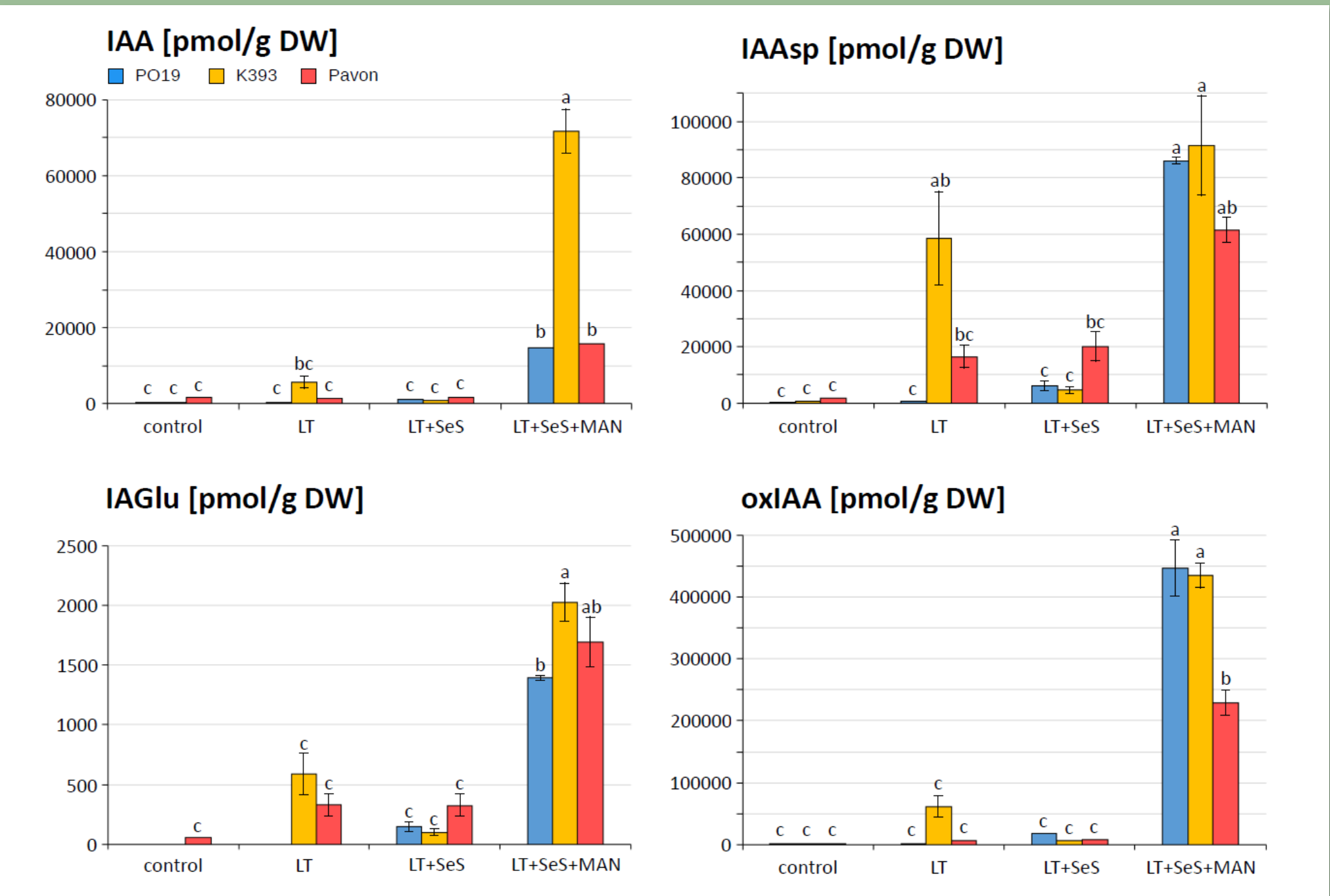


Fig. 2. AUX conjugates content in anthers of three wheat lines/cultivar (PO19, K393, Pavon) after different tillers pre-treatment
control – anthers collected from freshly cut tillers; LT – anthers collected from low-temperature pre-treated tillers (21–28 days at 4°C); LT+SeS – anthers collected from low-temperature pre-treated tillers (21–28 days at 4°C) with the last three days in 50 µmol/dm³ sodium selenate solution; LT+SeS+MAN – anthers collected from low-temperature pre-treated tillers (21–28 days at 4°C) with the last three days in 50 µmol/dm³ sodium selenate solution and the next 4 days in 0.7 mol/dm³ mannitol solution at 20°C

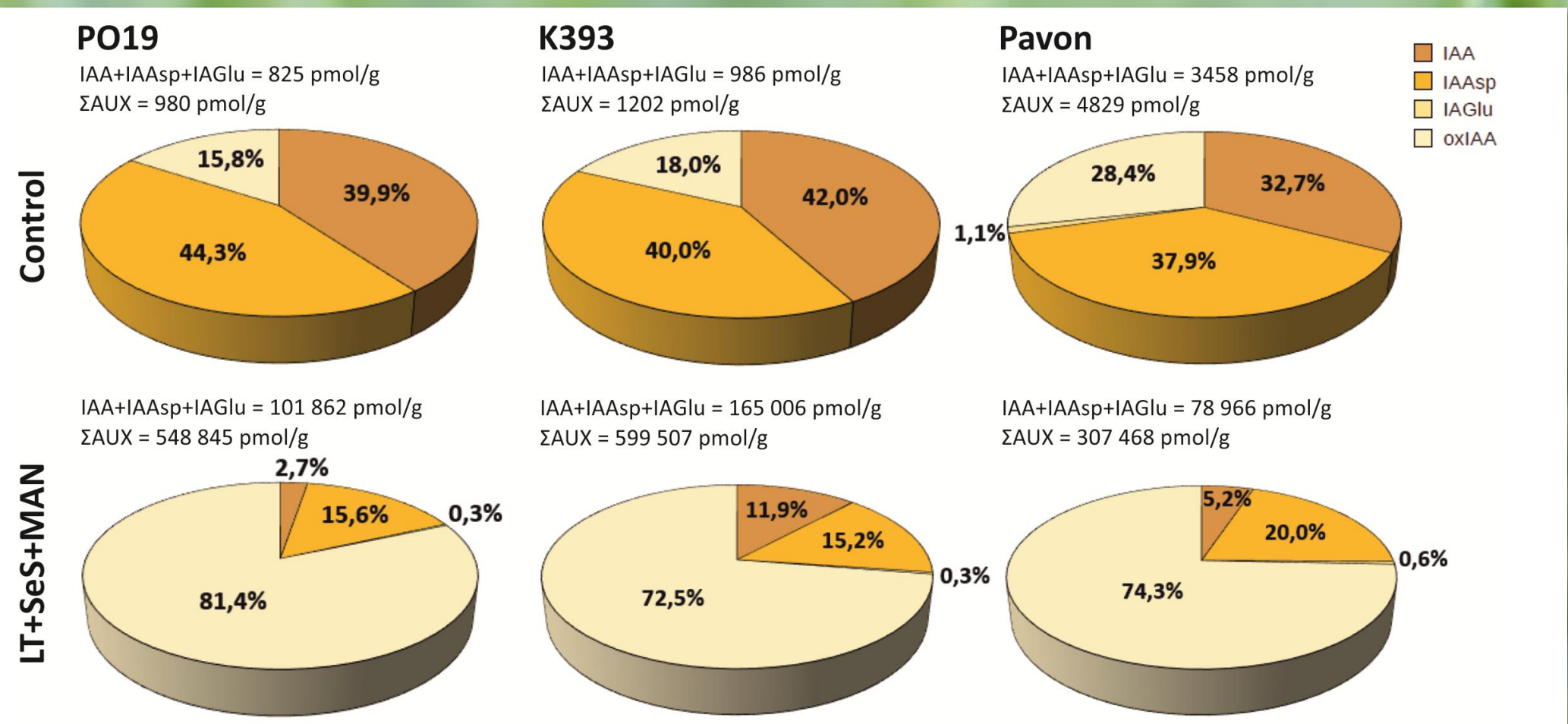


Fig. 3. Contribution of the different AUX conjugates in anthers of three wheat lines/cultivar (PO19, K393, Pavon) after different tillers pre-treatment

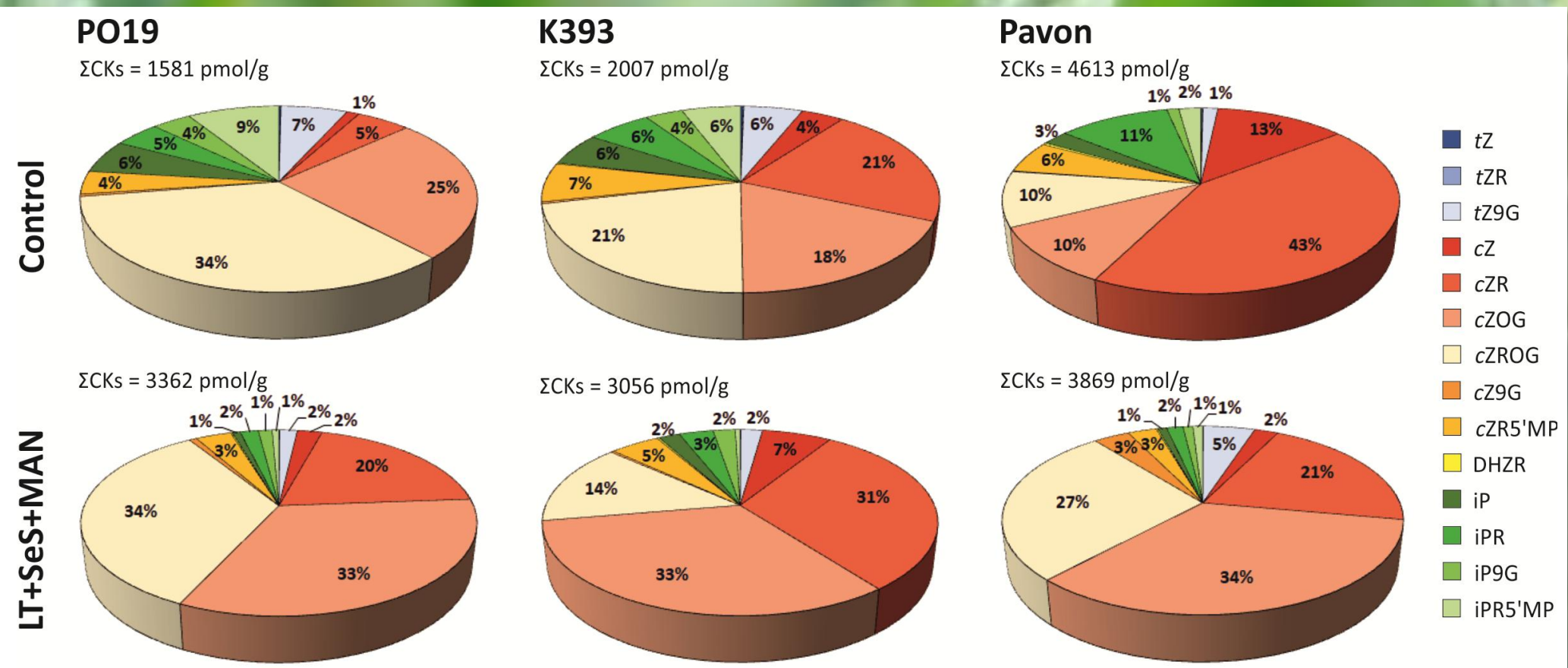


Fig. 4. Contribution of the different CK conjugates in anthers of three wheat lines/cultivar (PO19, K393, Pavon) after different tillers pre-treatment

Line/ Cultivar	Pre-treatment	IAA [pmol/g DW]	CK _A (tZ+cZ+iP) [pmol/g DW]	IAA/CK _A
PO19	Control	391	115	3.4
	LT	295	507	0.6
	LT+SeS	1230	498	2.5
	LT+SeS+MAN	14637	108	136
K393	Control	505	203	2.5
	LT	5709	234	24.3
	LT+SeS	986	372	2.7
	LT+SeS+MAN	715767	272	263
Pavon	Control	1578	708	2.2
	LT	1546	150	10.3
	LT+SeS	1722	548	3.1
	LT+SeS+MAN	15876	122	130

Table 1. The ratio of IAA/CK_A in anthers of studied wheat lines/cultivar (PO19, K393, Pavon) and the changes depending of tillers pre-treatment

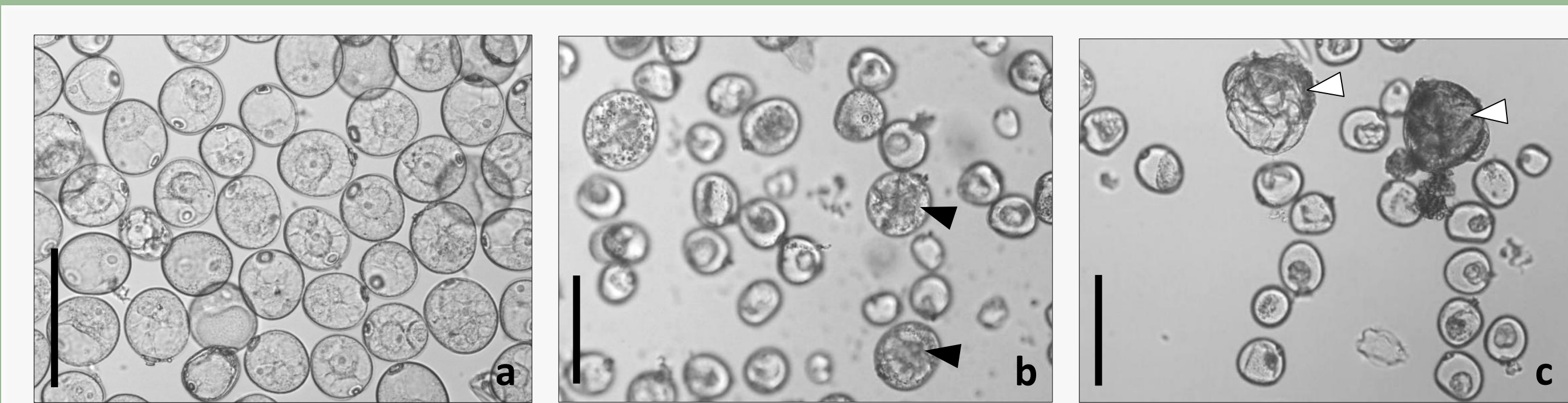


Fig. 1. Star-like structures (a), properly developed (b) and aborted multicellular structures (c). Bar 100 µm

Redirecting the development of microspores into the pathway of embryogenesis is the quickest method to obtain haploids and completely homozygous doubled haploid plants, highly advantageous in many research areas and plant breeding. The effectiveness of microspore embryogenesis (ME), however, relies on complex genetic-physiological-environmental interactions. Great efforts have already been put into the work of discovering these very complex interrelations as well as on improving the procedure of in vitro culture. In many cases, like in winter wheat, this is still far from sufficient for practical use. Our research (Dubas et al., 2024) has revealed that a sequence of low temperature (3–4 weeks at 4°C; LT), selenium salt (50 µmol/l sodium selenite; SeS) and mannitol (4 day in 0.7 M MAN at 20°C) spike treatments can improve the effectiveness of microspore reprogramming (Fig. 1a–b). The majority of embryo-like structures (ELS) produced, however, exhibited developmental defects leading to their degeneration (Fig. 1c).

Since embryo development is hormonally regulated, the aim of this study was to determine the effect of the modified tiller pretreatment (LT+SeS+MAN) on the hormonal balance and the efficiency of the ME process. The levels of auxins (AUXs) and cytokinins (CKs) were assessed in the anthers of two highly recalcitrant winter wheat lines (PO19, K393) and moderately responsive spring cultivar Pavon using the UHPLC-MS/MS method (Juzoń-Sikora et al., 2023).

In contrast to LT alone or in combination with SeS, which had little impact on indole-3-acetic acid (IAA) content and contribution of its conjugates in wheat anthers, MAN significantly increased the content of all identified AUXs (IAA, IAA-aspartate, IAA-glutamate and 2-oxindole-3-acetic acid; Fig. 2, 3). As a result, oxIAA dominated and its share in total auxin pool ranged from 72% to 81% (Fig. 3). At the same time, MAN treatment reduced or not changed the content of the most active CKs (*trans*-zeatin; *cis*-zeatin and N⁶-isopentenyladenine (iP)), while the level and share of *cis*-zeatin-O-glucoside (cZOG) increased (Fig. 4; 5). The effect of MAN in the combined treatment caused significant increase in the ratio between the active auxin content (IAA) and the total content of active, free forms of cytokinins (CK_A), i.e.: *tZ*+*cZ*+*iP*, 40-fold in PO19, almost 60-fold in Pavon and more than 100-fold in K393 compared to the control (Table 1). Such a distinctive alteration of anther hormonal balance (caused mainly by huge increase in IAA concentration) could possibly represent a factor inducing developmental abnormalities observed in microspore-derived ELS.

REFERENCES:

Dubas E, Krzewska M, Surówka E, Kopec P, Springer A, Janowiak F, Weigt D, Mikołajczyk SK, Telk A, and Żur I. 2024. New prospects for improving microspore embryogenesis induction in highly recalcitrant winter wheat lines. *Plants* 13: 363.

Juzoń-Sikora K, Nowicka A, Plačková L, Dolež K, and Żur I. 2023. Hormonal homeostasis associated with effective induction of triticale microspore embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 152: 583–604.

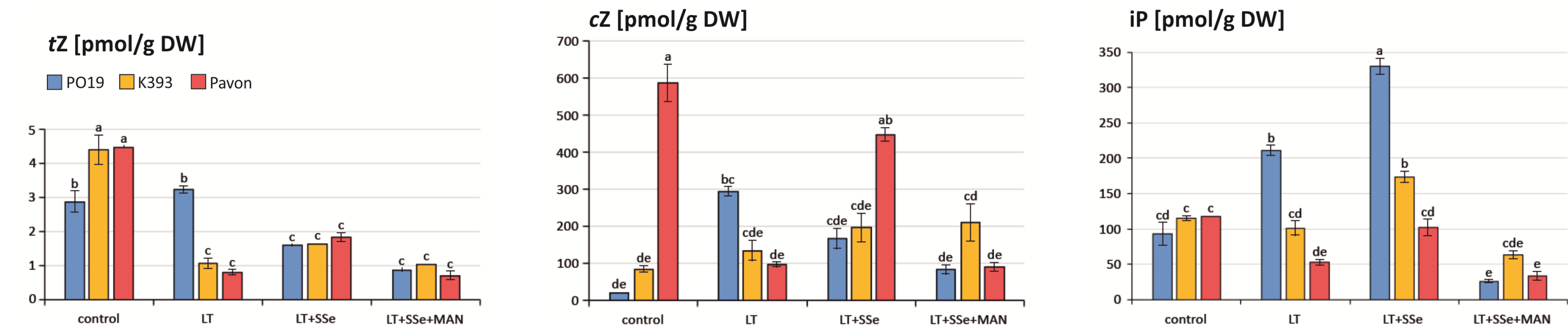


Fig. 5. CK conjugates content in anthers of three wheat lines/cultivar (PO19, K393, Pavon) after different tillers pre-treatment

ACKNOWLEDGMENT:

This research was funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development of Poland (grant number 4; DHR.hn.802.1.2023) in the frame of Basic Research for Biological Progress in Plant Production

Inhibitory metylacji zwiększają efektywność embriogenezy mikrospor pszenicy zwyczajnej

D. WEIGT¹, K. SZEWCZYK¹, S. MIKOŁAJCZYK¹, I. ŻUR³, I. SIATKOWSKI²

¹Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;

²Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych,
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;

³Instytut Fizjologii Roślin im. Franciszka Górskiego PAN, Kraków;
e-mail: dorota.weigt@up.poznan.pl

Inhibitory metylacji (IM) regulują procesy epigenetyczne i odpowiadają za aktywność genów. Do najczęściej stosowanych IM należą: 5-azacytydyna (AZC) – niemetylowany analog cytydyny oraz trichostatyna A (TSA) – inhibitor deacetylazy histonowej klasy I i II. Związki te reaktywują transkrypcję, powodując hipometylację DNA lub otwarcie chromatyny. Analiza transkryptomu pszenicy potwierdziła, że IM wpływają na wydajność embriogenezy mikrospor (EM) u różnych gatunków roślin, aktywując geny odpowiedzialne za zmianę kierunku rozwoju z generatywnego w sporofityczny oraz stymulują tworzenie embriogenego kalusa poprzez aktywację proliferacji komórek. Celem badań była analiza wpływu 5-azacytydyny oraz trichostatyny A na wydajność EM i regenerację roślin pszenicy zwyczajnej. Materiał roślinny stanowiły genotypy pszenicy charakteryzujące się zróżnicowaną zdolnością do EM. Pylniki znajdujące się w fazie jednojądrowej traktowano AZC lub TSA w różnych kombinacjach stężeń, a następnie płukano je i wykładano na płynną pożywkę indukującą C17. Każdy wariant traktowania powtarzano trzykrotnie. We wszystkich wariantach doświadczalnych zastosowano kontrole bez traktowania IM. Tworzące się struktury embriogenne pasażowano na pożywkę regeneracyjną MS. W większości analizowanych genotypów IM wpłynęły korzystnie na wydajność EM. AZC stymulowała EM wydajniej niż TSA. Struktury embriogenne i rośliny zielone uzyskano ze wszystkich genotypów, lecz nie we wszystkich kombinacjach doświadczalnych. IM nie wpłynęły istotnie na frekwencję albinosów.

Źródło finansowania: MRiRW, badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, tytuł projektu: „Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”.

Methylation inhibitors increase the efficiency of microspore embryogenesis in common wheat

Methylation inhibitors (IM) regulate epigenetic processes and are responsible for gene activity. Among the most commonly used IM are: 5-azacytidine (AZC) – an unmethylated analog of cytidine, and trichostatin A (TSA) – an inhibitor of histone deacetylase classes I and II. These compounds reactivate transcription, causing DNA hypomethylation or chromatin opening. Transcriptome analysis of wheat confirmed that IM affect the efficiency of microspore embryogenesis (ME) in various plant species by activating genes responsible for changing the direction of development from generative to sporophytic and stimulate the formation of embryogenic structures by activating cell proliferation. The aim of the research was to analyze the effect of 5-azacytidine and trichostatin A on the efficiency of ME and plant regeneration in common wheat. Plant material were wheat genotypes characterized by varying ME ability. Pollen grains in the uninucleate stage were treated with AZC or TSA at different concentrations, then rinsed and plated on liquid C17 induction medium. Each treatment combination was repeated three times. Control groups without IM treatment were used in all experimental variants. The developing embryogenic structures were transferred to regenerative MS medium. The studied IM positively influenced the efficiency of ME in most analyzed genotypes. AZC stimulated ME more efficiently than TSA. Embryogenic structures and green plants were obtained from all genotypes, but not in all treatment combinations. IM did not significantly affect the frequency of albinos.

Source of funding: Ministry of Agriculture and Rural Development, basic research for biological progress in plant production, project title “Identification of factors determining the induction of microspore embryogenesis in common wheat (*Triticum aestivum* L.)”.

Wpływ inhibitorów metylacji na kultury pylnikowe mieszańców F_1 pszenicy ozimej

K. SZEWCZYK, I. MEZOUE, M.H. NYAMBURA, D. WEIGT

Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu;
e-mail: katarzyna.szewczyk1@up.poznan.pl

W kulturach pylnikowych, pod wpływem czynników stresu, niedojrzałe mikrospory tworzą zarodki, z których następnie można otrzymać rośliny o pojedynczym lub podwojonym zestawie chromosomów. Podwojone haploidy (DH) charakteryzują się pełną homozygotycznością i są wykorzystywane w badaniach naukowych oraz hodowli nowych odmian roślin uprawnych. Efektywność indukcji embriogenezy mikrospor (EM) i regeneracji roślin u pszenicy jest zależna między innymi od genotypu rośliny donorowej, rodzaju stosowanego czynnika stresu oraz składu stosowanych pożywek. Najnowsze badania epigenetyczne wskazują, że na proces EM wpływa także metylacja genów zaangażowanych w tworzenie androgenicznych zarodków. Celem badań było sprawdzenie zdolności do indukcji EM i regeneracji roślin w kulturach pylnikowych mieszańców F_1 pszenicy ozimej traktowanych inhibitorami metylacji. Ziarniaki mieszańców F_1 zostały otrzymane w polskich spółkach hodowlanych. Wysiano je na poletku doświadczalnym Katedry Genetyki i Hodowli Roślin Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu. Kłosa ścinano, gdy mikrospory osiągały stadium jednojądrowe i poddawano stresowi chłodu (4°C) przez 10 do 20 dni. Następnie izolowano pylniki i wykładano na płynną pożywkę MS z dodatkiem inhibitorów metylacji: 5-azacytydyny (AZC) lub trichostatyny A (TSA). Pylniki inkubowano w ciemności przez 7 dni w 4°C, płukano i przenoszono na płynną pożywkę C17 na okres 8 tygodni. Otrzymane struktury embriogenne pasażowano na zestaloną pożywkę MS w celu regeneracji roślin. Obserwowano różnice w liczbie tworzących się struktur embriogennych oraz liczbie regenerujących roślin zielonych i albinotycznych pomiędzy badanymi mieszańcami F_1 pszenicy ozimej. Inhibitory metylacji wpłynęły stymulująco zarówno na indukcję EM, jak i na regenerację roślin zielonych. Stwier-

dzono, iż średnio dla wszystkich badanych genotypów łącznie, inkubacja pylników w AZC wpływała najkorzystniej na badane parametry EM. Obserwowano także regenerację roślin albinotycznych, których liczba zależała przede wszystkim od ogólnej liczby otrzymywanych roślin, a nie od traktowania inhibitorami metylacji.

Źródło finansowania: MRiRW, badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, tytuł projektu „Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”.

Effect of methylation inhibitors on anther cultures of F_1 winter wheat hybrids

In anther cultures (AC) immature microspores form embryos under stress factors. Plants obtained from them have single or double sets of chromosomes. Doubled haploids are fully homozygous and are used in scientific research and breeding of new varieties. The efficiency of microspore embryogenesis (ME) induction and plant regeneration (PR) of wheat mainly depends on the genotype of the donor plant, the type of stress factor and the composition of the media. Recent epigenetic studies indicate that the ME process is also influenced by methylation of genes involved in embryo formation. The purpose of this study was to investigate the induction ability of ME and PR in AC of F_1 winter wheat hybrids treated with methylation inhibitors. Grains of F_1 hybrids, obtained from Polish breeding companies, were sown in the experimental field. The spikes were cut when the microspores reached the uninucleate stage. Then they were exposed to cold stress (4°C) for 10 to 20 days. The anthers were isolated and plated on liquid MS medium with the addition of methylation inhibitors: 5-azacytidine and trichostatin A. Then they were incubated in the dark for 7 days at 4°C, washed and transferred to liquid C17 medium for 8 weeks. The obtained embryogenic structures were transferred onto solidified MS medium for PR. Differences were observed in the number of embryogenic structures and green and albino plants between the F_1 hybrids. Methylation inhibitors had a stimulating effect on ME induction and green PR. 5-azacytidine had the most favorable effect on the studied ME parameters on average for all the studied genotypes combined. The number of albino plants depended mainly on the total number of plants obtained, rather than on treatment.

Source of funding: MRiRW, basic research for biological progress in crop production, project title „Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”.

MANNITOL-INDUCED ALTERNATION OF ENDOGENOUS HORMONES BALANCE AND ITS EFFECT ON BREAD WHEAT (*TRITICUM AESTIVUM* L.) MICROSPORE REPROGRAMMING TOWARDS EMBRYOGENIC DEVELOPMENT

AGNIESZKA SPRINGER¹, KAREL DOLEŽAL², LENKA PLAČKOVÁ², EWA DUBAS¹,
MONIKA KRZEWSKA¹, PRZEMYSŁAW KOPEĆ¹, DOROTA WEIGT³, IWONA ŻUR¹

¹*The F. Górski Institute of Plant Physiology Polish Academy of Sciences,
Niezapominajek 21, 30-239, Kraków, Poland*

²*Laboratory of Growth Regulators, Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of
Sciences, and Faculty of Science, Palacký University, Šlechtitelů 27, 78371, Olomouc, Czech
Republic*

³*Department of Genetics and Plant Breeding, Poznań University of Life Sciences,
11 Dojazd St., 60-632 Poznań, Poland*

The effectiveness of microspore embryogenesis (ME) relies on complex genetic-physiological-environmental interactions and in some cases (e.g. winter wheat), this is far from sufficient for practical use in plant breeding. Our research (Dubas et al., 2024) has revealed that a sequence of low temperature (LT), selenium salt (SeS) and mannitol (MAN) spike treatments can improve the effectiveness of microspore reprogramming towards this alternative developmental pathway. The majority of multicellular structures produced, however, exhibited developmental defects leading to their degeneration.

Since embryo development is hormonally regulated, we assessed the levels of auxins (AUX) and cytokinins (CK) in the anthers of two winter wheat lines (PO19, K393) and the spring cultivar Pavon using the UHPLC-MS/MS method (Juzoń-Sikora et al., 2023). LT alone or in combination with SeS had little impact on AUX content and composition in wheat anthers. MAN treatment (4 days in 0.7 mol·dm⁻³ MAN) significantly increased the content of all identified AUX (indole-3-acetic acid (IAA), IAA-aspartate, IAA-glutamate and 2-oxindole-3-acetic acid). Conversely, all treatments reduced the content of the most active CK (*trans*-zeatin), while the levels of *cis*-zeatin-*O*-glucoside and *cis*-zeatin-riboside-*O*-glucoside in the studied wheat anthers increased. Such a distinctive alteration of anther hormonal balance could possibly represent a factor inducing developmental abnormalities observed in microspore-derived structures.

ACKNOWLEDGEMENTS:

This research was funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development of Poland (grant number 4; DHR.hn.802.1.2023) in the frame of Basic Research for Biological Progress in Plant Production.

REFERENCES:

- DUBAS E, KRZEWSKA M, SURÓWKA E, KOPEĆ P, SPRINGER A, JANOWIAK F, WEIGT D, MIKOŁAJCZYK SK, TELK A, and ŻUR I. 2024. New prospects for improving microspore embryogenesis induction in highly recalcitrant winter wheat lines. *Plants* 13: 363.
- JUZOŃ-SIKORA K, NOWICKA A, PLAČKOVÁ L, DOLEŽAL K, and ŻUR I. 2023. Hormonal homeostasis associated with effective induction of triticale microspore embryogenesis. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 152: 583-604.

Wpływ wybranych inhibitorów metylacji na efektywność kultur pylnikowych pszenicy ozimej

Dorota Weigt¹, Katarzyna Szewczyk¹, Sylwia Mikołajczyk¹, Idzi Siatkowski²

¹*Katedra Genetyki i Hodowli Roślin, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

²*Katedra Metod Matematycznych i Statystycznych, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu*

Związki z grupy inhibitorów metylacji (IM) wpływają na procesy epigenetyczne zwiększając aktywność genów poprzez reaktywację ich transkrypcji. Stosowane są m. in. w leczeniu wielu chorób człowieka, jak również w badaniach genomów oraz transkryptomów zwierzęcych i roślinnych. Znane są różne mechanizmy ich działania, a do najczęściej wykorzystywanych należy hipometylacja DNA i otwarcie chromatyny poprzez acetylację histonów. Analiza transkryptomu potwierdziła, że IM mogą wpływać na wydajność embriogenezy mikrospor (EM) różnych gatunków roślin modelowych i uprawnych, w tym pszenicy.

W prowadzonych badaniach, analizowano wydajność kultur pylnikowych pszenicy ozimej po traktowaniu trzema IM DNA: 5-azacytydyną (AZC), 2'-deoxy-5-azacytydyną (DAC), zebulariną (ZEB) oraz IM histonów, którym była trichostatyna A (TSA). Celem parametryzacji doświadczenia określono efektywność tworzenia struktur embriogennych i regenerujących roślin zielonych, udział roślin zielonych wśród wszystkich zregenerowanych (zielonych i albinotycznych), a także frekwencję spontanicznych podwojeń genomu.

Struktury embriogenne i rośliny zielone uzyskano ze wszystkich analizowanych genotypów, a wydajność ich tworzenia po zastosowaniu IM była istotnie wyższa niż w wariantach kontrolnych. Udział roślin zielonych wśród wszystkich zregenerowanych zależał od genotypu donorowego oraz ogólnej liczby zregenerowanych roślin, a traktowanie IM nie miało istotnego wpływu na rozwój albinosów. Podobnie, liczba spontanicznych podwojeń genomu nie zmieniała się istotnie pod wpływem traktowania IM. Przeprowadzone badania pozwalają na jednoznaczne stwierdzenie, iż IM wpływają pozytywnie na efektywność kultur pylnikowych pszenicy ozimej.

*Źródło finansowania: MRiRW, badania podstawowe na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, tytuł projektu „Identyfikacja czynników warunkujących indukcję embriogenezy mikrospor u pszenicy zwyczajnej (*Triticum aestivum* L.)”.*