

Raport 2017

Projekt MRiRW, zadanie numer 84: Identyfikacja czynników determinujących efektywność otrzymywania podwojonych haploidów żyta (*Secale cereale* L.) metodami androgenyzy i krzyżowań oddalonych.

Dotacja MRiRW: HOR hn. 802.26.2017

Temat badawczy 1/2017: Optymalizacja warunków kiełkowania i regeneracji zarodków/kalusów dla uzyskania roślin diploidalnych (DH) żyta.

Temat badawczy 2/2017: Identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną produkcję DH żyta

Z uwagi na wzrastające zainteresowanie żytem w przemyśle paszowym i spożywczym, istotnym jest przyspieszenie hodowli tego zboża. Zastosowanie metod biotechnologicznych, w tym haploidyżacja na drodze androgenyzy, pozwala na szybkie wyprowadzanie nowych, dostosowanych do potrzeb rynku rolnego odmian, stanowiąc konkurencję dla organizmów genetycznie zmodyfikowanych. Zasadniczą trudność w opracowaniu protokołu efektywnej produkcji podwojonych haploidów DH żyta stanowi zmienność genotypowa oraz wrażliwość roślin donorowych/eksplantów na warunki wzrostu i rozwoju. Dodatkowy problem stanowią zahamowanie rozwoju zaindukowanych androgenicznych struktur zarodkowych (SA) na wczesnym etapie kultury *in vitro* oraz nieprawidłowy przebieg czy nawet brak regeneracji SA w rośliny. Z tych względów, bardzo istotna jest identyfikacja czynników fizjologicznych warunkujących zwiększoną efektywność haploidyżacji żyta w androgenyzy na etapach indukcji oraz regeneracji DH.

Celami nadrzędnymi realizowanego w 2017 roku projektu były: (1) optymalizacja warunków kiełkowania i regeneracji zarodków/kalusów dla uzyskania roślin diploidalnych (DH) żyta oraz (2) identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną produkcję DH żyta.

Celami pośrednimi były: (1) ustalenie optymalnych warunków indukcji i regeneracji zarodków/kalusów w procesie haploidyżacji żyta na drodze androgenyzy, (2) Określenie, czy stężenie glutationu w tkance wegetatywnej liścia flagowego koresponduje ze stężeniem glutationu w pylnikach żyta izolowanych z kłosów wstępnie traktowanych, (3) Określenie związku pomiędzy aktywnością wybranych enzymów antyoksydacyjnych a podatnością/lub jej brakiem na indukcję i/lub regenerację sporofitowego rozwoju gametofitu męskiego na etapie wstępnego traktowania indukującego androgenyżę w kulturze pylników. (4) Określenie związku pomiędzy fragmentacją DNA *in situ* (inaczej programowaną śmiercią komórki PCD) a podatnością/lub jej brakiem na indukcję sporofitowego rozwoju gametofitu męskiego w kulturze zawieszinowej mikrospor.

Wybór genotypów został dokonany w oparciu o wyniki uzyskane w latach 2015-2016, na podstawie których wybrano sześć z 15 mieszańców pokolenia F1 (samopylnego oraz obcopylnego) żyta ozimego (*Secale cereale* L, ssp. *cereale*) udostępnionych przez polskie spółki hodowli roślin. Wybrane genotypy zostały scharakteryzowane, jako istotnie różniące się podatnością na haploidyżację i pogrupowane w taki sposób, aby w każdej z trzech wytypowanych kategorii: 1. Genotypy podatne na indukcję androgenyzy, 2) Genotypy średnio podatne na indukcję androgenyzy, 3) Genotypy odporne na indukcję androgenyzy, znalazły się jeden (do badań nad PCD) lub dwa (do badań nad efektywnością androgenyzy, zawartości glutationu czy aktywności enzymatycznej) z dotychczas przebadanych 15 mieszańców.

Scharakteryzowano efektywność procesu haploidyżacji w procesie androgenyzy (kultury pylnikowe oraz izolowanych mikrospor) na etapie indukcji i regeneracji DH.

Zoptymalizowano warunki indukcji haploidalnych zarodków żyta, co przyczyniło się do poprawy efektywności indukcji procesu androgenezy, przede wszystkim w kulturach pylników. Wykazano, że problem ze słabą efektywnością haploidyzacji jest związany z niską przeżywalnością mikrospor we wczesnym stadium rozwoju sporofitowego w kulturze *in vitro*, którą to można podnieść poprzez wprowadzenie modyfikacji (łagodzenie silnego stresu oksydacyjnego wywołanego mannitolem) już na etapie wstępnego traktowania. Czynnikiem, który decydował o przebiegu kultury w przedstawianych doświadczeniach była interakcja pomiędzy genotypem i traktowaniem wstępnym kłosów oraz interakcja pomiędzy genotypem, traktowaniem wstępnym kłosów oraz rodzajem zastosowanej pożywki indukcyjnej. Wykazano, że zaproponowane modyfikacje pożywek 190-2 (Wang i Hu 1984) indukcyjnych i regeneracyjnych (z arabinogalaktanami i węglem aktywowanym lub związkami miedzi $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) w kulturach pylników żyta pozwalają na podniesienie efektywności parametrów indukcji AS/SP i regeneracji Rtotal u 6/6 linii wszystkich trzech kategorii w kontekście podatności na androgenezę. W przypadku kultur zawieszinowych mikrospor, zastosowanie inhibitorów PCD *in vitro*, pozwoliło na przełamanie oporności u linii opornych i niemal 8-krotne podniesienie efektywności procesu u linii podatnej.

Ponadto, określono, jakie stężenie glutationu w tkance wegetatywnej liścia flagowego koresponduje ze stężeniem glutationu w pylnikach żyta izolowanych z kłosów wstępnie traktowanych. Na podstawie uzyskanych wyników, dowiedziono, że u żyta, jako gatunku opornego na indukcję androgenezy, wymagającego silnego stresu oksydacyjnego dochodzi do takich zmian w stężeniu zredukowanego (GSH) i utlenionego (GSSG) glutationu, które to różnicują linie odporne od linii podatnych i średnio podatnych na androgenezę.

W badaniach polegających na oznaczaniu aktywności enzymów szlaku glutationowego wykazano, jak aktywowany jest system antyoksydacyjny w pylnikach żyta wyizolowanych z kłosów poddanych traktowaniu wstępnemu. Pokazano zależności pomiędzy liniami, traktowaniami kłosów a aktywnością komórkowego systemu antyoksydacyjnego. Przedstawiono trójskładnikowość systemu enzymatycznego odpowiadającego za rozkładanie, czyli „zmiatanie” wolnych rodników ROS. Określono zależności pomiędzy efektywnością procesu androgenezy w kulturze pylników sześciu linii żyta na etapie indukcji i regeneracji a składowymi, zmiennymi pierwotnymi i przypadkami opisującymi aktywności badanych enzymów.

W doświadczeniu poświęconym analizie fragmentacji DNA *in situ* (inaczej programowaną śmiercią komórki PCD) w kontekście podatności/lub jej braku na indukcję sporofitowego rozwoju gametofitu męskiego w kulturze zawieszinowej mikrospor, wyjaśniono przyczynę wysokiej śmiertelności mikrospor. Stwierdzono, że na skutek uszkodzenia jąder komórkowych poprzez fragmentację DNA w procesie programowanej śmierci komórki (PCD), obniżeniu ulega żywotność mikrospor poddawanych indukcji androgenezy na etapie wstępnego traktowania kłosów oraz zahamowany zostaje rozwój struktur androgenicznych na etapie kultury *in vitro*. Jako, że PCD powoduje pęknięcia DNA w jądrach komórkowych, wykorzystano do badań znakowane fluorochromem nukleotydy wbudowywane w miejscu pęknięć DNA. O stopniu uszkodzenia informowała względna intensywność fluorescencji. Z uwagi na fakt, że zaproponowane traktowania wstępne kłosów podnoszą żywotność mikrospor, a problem z obumieraniem zaindukowanych w dużej liczbie zarodków androgenicznych znacząco limituje efektywność całego procesu androgenezy, zaproponowano analizę PCD, nie tylko w uzyskanych w wyniku izolacji –mikrosporach ale również w powstałych *in vitro* zarodkowych strukturach androgenicznych SA.

Test TUNEL w całej tkance ‘whole mount’ zarodków androgenicznych żyta pozwolił na ocenę jakości SA. Wykazano obecność licznych jąder pozytywnie wyznakowanych w kierunku PCD, której uruchomienie powodowało obumieranie SA a w konsekwencji brakregeneracji roślin.