

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

Okres realizacji: 2022

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 (2022): Screening podatności na indukcję procesu embriogenezy mikrospor polskich materiałów pszenicy zwyczajnej

Celem badań było określenie stopnia **podatności na indukcję procesu embriogenezy mikrospor (EM)** polskich materiałów hodowlanych pszenicy zwyczajnej otrzymanych od 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. Wykorzystano metody kultur izolowanych mikrospor (**KIM**) oraz kultur pylnikowych (**KP**) na pożywkach stałych i płynnych standardowo stosowane w laboratoriach obu jednostek naukowych realizujących zadanie (odpowiednio IFR PAN i KGiHR UP).

Cel zadania badawczego 1 został osiągnięty

Temat badawczy 2 (2022): Zmiana równowagi jonowej, oksydo-redukcyjnej i hormonalnej jako czynnik modyfikujący efektywność indukcji procesu EM pszenicy zwyczajnej

Celem badań było określenie roli i mechanizmu oddziaływania wybranych czynników inicjujących stres, (niska temperatura (**NT**), wysoka temperatura (**WT**), stres osmotyczny (**MAN**)) oraz zaburzających równowagę oksydacyjno-redukcyjną i jonową (zredukowany glutation (**GSH**), selenian sodu (**SS**), kwas borowy (**H₃BO₃**)) w determinacji efektywności indukcji EM pszenicy zwyczajnej.

Cel zadania badawczego 2 został osiągnięty

Materiały i Metody

Temat bad.1

1. Materiał roślinny: 5 linii mieszańcowych F_1 (CH1, MHR, K20290, K393 i SM IHAR) i 5 linii/odmian modelowych (Pavon, PO19, PO20, KGHR1 oraz KGHR2/DH150/DH1).
2. Analizowane zmienne:
 - ❖ Warunki wzrostu roślin macierzystych: poletko (P), komora szklarniowa (KS)
 - ❖ Traktowanie kłosów: 10-30 dni w 4°C (KP) i 14-35 dni w 4°C + 24h w 0,4mol/l (MAN) (KIM)
 - ❖ Pożywki indukcyjne: C17_{ind} stała lub płynna (z 50 g/l Ficollu) + 1 mg/l 2,4-D i Dikamby ± 0,5 mg/l kinetyny (KP) i KBP_{ind} + 1 mg/l 2,4-D i 50mg/l AGP (KIM)

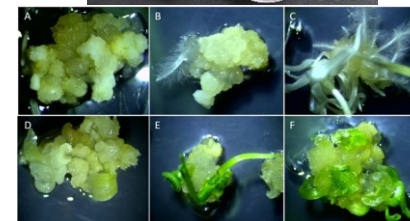


Fig.1. Schemat procedury indukcji EM

Temat bad.2

1. Materiał roślinny: 2 linie mieszańcowe F_1 (K20290 i SM IHAR) i 2 linie modelowe (PO20 i DH150) (KIM) oraz 2 linie mieszańcowe F_1 (K20290 i K393) oraz 2 linie modelowe (KGHR1 i KGHR2) (KP)
2. Traktowanie kłosów (eksperyment 1):
 - ❖ **NT: 3-5 tyg. w 4°C;**
 - ❖ **NT + WT: 3-5 tyg. w 4°C + 24h w 30°C;**
 - ❖ **NT+MAN: 3-5 tyg. w 4°C + 48h w 0,4 mol/l mannitolu (MAN), w 26°C;**
 - ❖ **NT+WT+MAN: 3-5 tyg. w 4°C + 24h w 0,4 mol/l MAN, w 30°C.**
 - ❖ **NT+MAN0.7: NT+MAN w 0,7 mol/l MAN, w 26°C, 4 dni**
3. Traktowanie kłosów (eksperyment 2):
 - ❖ **NT/SS+MAN: 50 i 100 μmol/l selenianu sodu (SS50, SS100)**
 - ❖ **NT/GSH+MAN: 0,3 i 1 mmol/l zredukowanej formy glutationu (GSH0.3, GSH1.0)**
 - ❖ **NT/ H₃BO₃+MAN: 0,8 i 1,6 mmol/l kwasu borowego (H₃BO₃ 0.8, H₃BO₃1.6).**

4. Analiza wybranych parametrów fizjologicznych w pylnikach z kłosów świeżo ściętych (K), po traktowaniu NT i po NT/SS+MAN: - **zawartość mikro- i makroelementów**; - **poziom całkowitej aktywności antyoksydacyjnej (AA)**; - **poziom reaktywnych form tlenu (RFT)**; - **zawartość H₂O₂**; - **poziom zredukowanej (ASA, GSH) i utlenionej (DHA, GSSG) formy askorbinianu i glutationu**

Wyniki

Zadanie badawcze 1

Kultury izolowanych mikrospor (KIM, metodyka IFR PAN):

1. **Żywotność mikrospor** wynosiła od 48 do 84% (**Fig. 2**) i była istotnie wyższa w kulturach zawieszinowych linii modelowych (74%) w stosunku do linii mieszańcowych (66%)

2. Wydłużony do 30 dni okres wstępnego traktowania kłosów miał negatywny wpływ na **efektywność EM ozimych linii mieszańcowych pszenicy**. Mikrospory kontynuowały rozwój generatywny, frekwencja embriogennych mikrospor była niska, a ich rozwój ulegał zahamowaniu po kilku cyklach podziałów komórkowych (**Fig.3**). Liczne mikrospory embriogenne obserwowano w kulturach linii modelowych. Jednak rozwój większości został zahamowany w stadium wielokomórkowym. Końcowa efektywność EM wyniosła 0- 0,3 ZR/kłós.

3. Wydłużenie wstępnego traktowania kłosów stymulowało rozwój endogennych zakażeń grzybowych i bakteryjnych w kulturach zawieszinowych. Dodatkowy etap dezynfekcji kłosów (0,05% $HgCl_2$) ograniczył ilość zakażeń, jednak obniżył żywotności mikrospor i powodował stopniowe obumieranie kultur w początkowych etapach rozwoju (do 14 dnia od dnia izolacji).

4. Dodatek do pożywki $50\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ AGP oraz $1\text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D nie wpłynął istotnie na przebieg procesu EM. Po 4 tyg. kultury *in vitro*, obserwowano pojedyncze, struktury wielokomórkowe i uwolnione ze sporodermi ELS, które jednak po pasażu na pożywkę regeneracyjną nie regenerowały zielonych roślin (**Fig.5**).

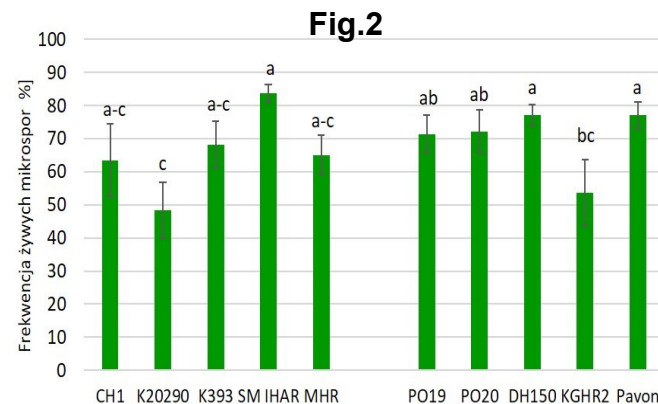


Fig.3

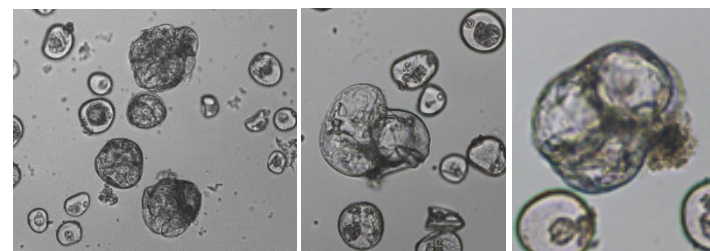


Fig.4

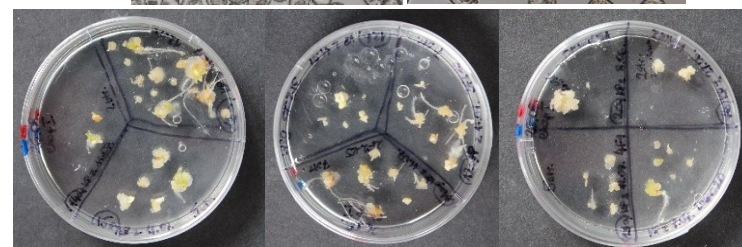
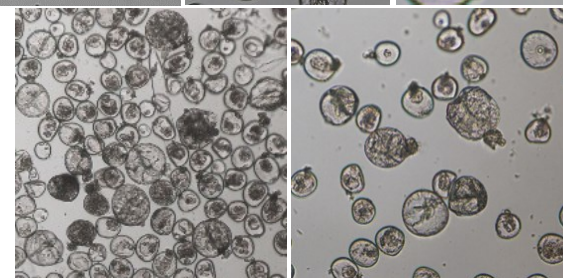


Fig.5

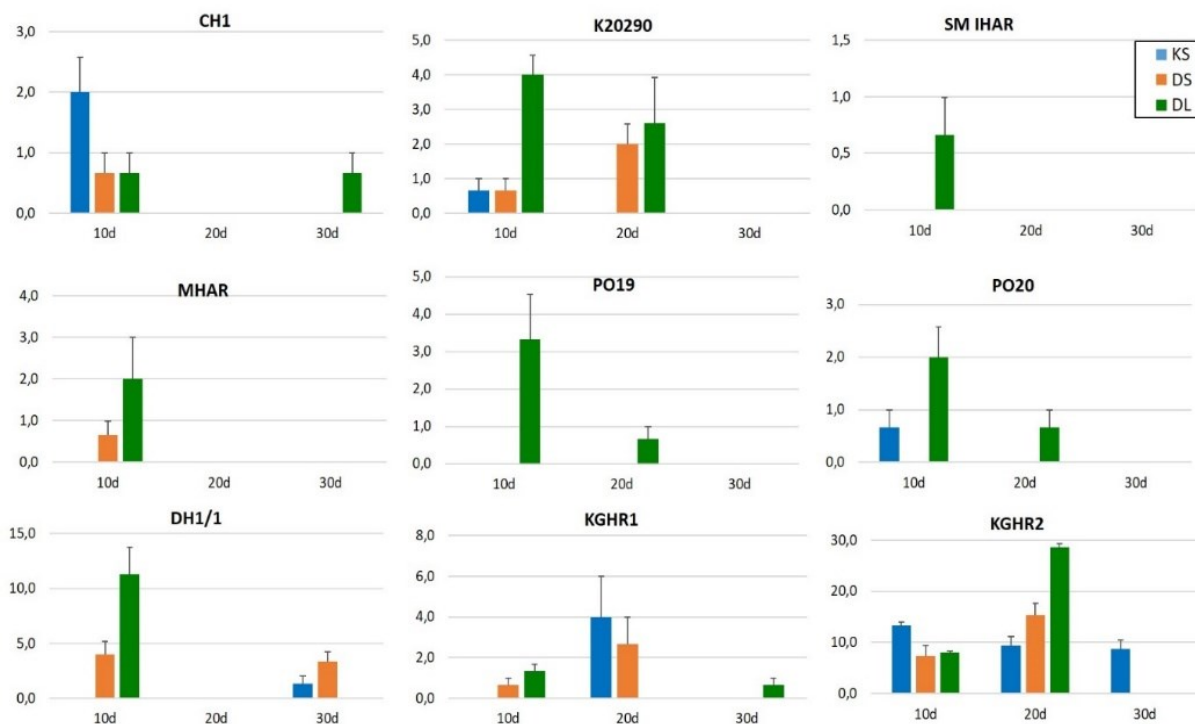
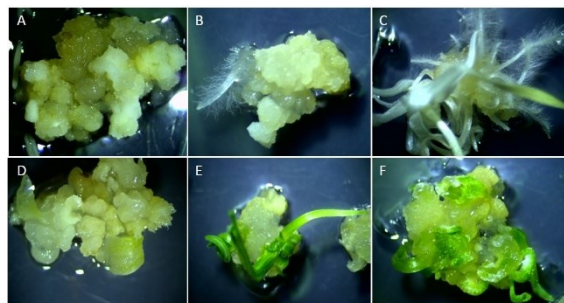
Wyniki:

Zadanie badawcze 1

Kultury pylnikowe (KP, metodyka KGHR UP)

1. Efektywność EM dla linii mieszańcowych wynosiła od 0 do 4 ELS/100P, dla linii modelowych od 0 do 28 ELS/100P. W zestawieniu (Fig. 6) pominięto linię K393, dla której nie uzyskano ELS.
2. Najwyższą efektywność indukcji uzyskano na płynnej pożywce C17_{ind} zawierającej 50 g/l Ficollu, 1 mg/l 2,4-D i 1 mg/l Dikamby.
3. Regenerację roślin zielonych uzyskano dla dwóch linii mieszańcowych (K20290 i SM IHAR) i trzech linii modelowych (DH1/1, KGHR1, KGHR2) po traktowaniu kłosów niską temperaturą (NT) przez okres od 10 do 20 dni. Efektywność regeneracji wyniosła od 0 do 2 ZR/100P dla linii mieszańcowych i od 0 do 4 ZR/100P dla linii modelowych.

Fig.6



Wyniki

Zadanie badawcze 2.

Kultury izolowanych mikrospor (KIM, metodyka IFR PAN):

1. **Żywotność mikrospor** wynosiła średnio 74%, tylko po traktowaniu NT była istotnie niższa (54%; **Fig. 7**).

2. W KIM traktowania **NT** i **NT+WT** były mało skuteczne. Obserwowano pojedyncze embriogenne mikrospory obumierające po ok. 14 dniach kultury. Wyższą efektywność EM uzyskano po traktowaniu **NT+MAN+WT** (liczne struktury wielokomórkowe, pojedyncze ELS i kalusy). Potencjalnie najbardziej efektywne okazało się traktowanie **NT+MAN0.7**, które pozwoliło na zachowanie wysokiej żywotności zawiesin komórkowych (ok. 90%) przy wysokiej frekwencji embriogennych mikrospor (**Fig. 8**).

3. Ze względu na zaburzenia na dalszych etapach rozwoju i liczne endogenne zakażenia grzybowe i bakteryjne nie uzyskano regeneracji roślin zielonych.

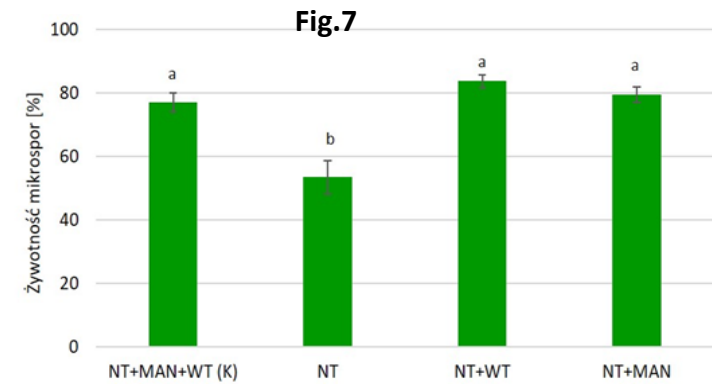
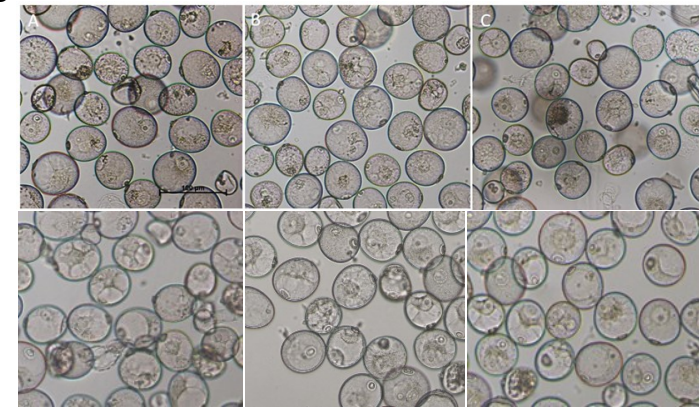


Fig.8

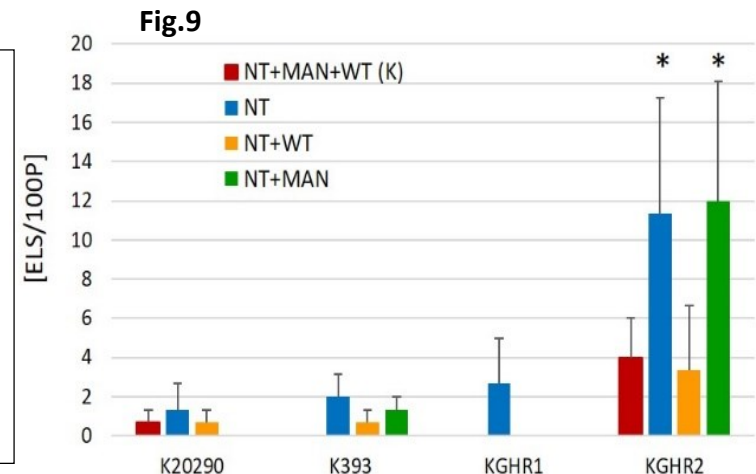


Kultury pylnikowe (KP, metodyka KHGR UP)

1. Zróżnicowane traktowania nie wpłynęły istotnie na efektywność EM w KP linii mieszańcowych. Uzyskano od 0-2 ELS/100P (**Fig.9**).

U linii modelowych, najwyższą efektywność uzyskano po traktowaniu **NT+MAN** (12 ELS/100P) dla linii KGHR2.

2. Regenerację roślin zielonych uzyskano dla linii K29290, K393 i KGHR1 po traktowaniu **NT**, a dla linii KGHR2 po traktowaniu **NT** i **NT+MAN**. Efektywność regeneracji wyniosła średnio od 0,7 ZR/100P (NT) do 1,3 ZR/100P (NT+MAN).



Zadanie badawcze 2. Kultury izolowanych mikrospor (KIM, metodyka IFR PAN)

1. Żywotność mikrospor wynosiła od 51 do 94% (Fig.10) i była najwyższa po traktowaniu 100 $\mu\text{mol/l}$ SS oraz 0,3 mmol/l GSH (odpowiednio 89% i 83%).

2. Traktowanie NT+MAN poprzedzone aplikacją 50 $\mu\text{mol/l}$ SS (NT/SS+MAN) pozwoliło na uzyskanie wysokiej frekwencji embriogennych mikrospor u linii K20290, PO20, DH150, słabszą efektywność indukcji EM uzyskano dla linii SM IHAR (Fig. 11). Dalszy rozwój został jednak zahamowany na etapie struktur wielokomórkowych uwolnionych ze sporodermy (ELS; Fig.12). Regenerację roślin zielonych uzyskano dla linii PO20 (0,2 ZR/kłós).

3. Pozostałe modyfikacje (NT/SS+GSH i NT/SS+ H_3BO_3) pomimo korzystnego wpływu na żywotność mikrospor nie wpłynęły istotnie na końcową efektywność indukcji EM.

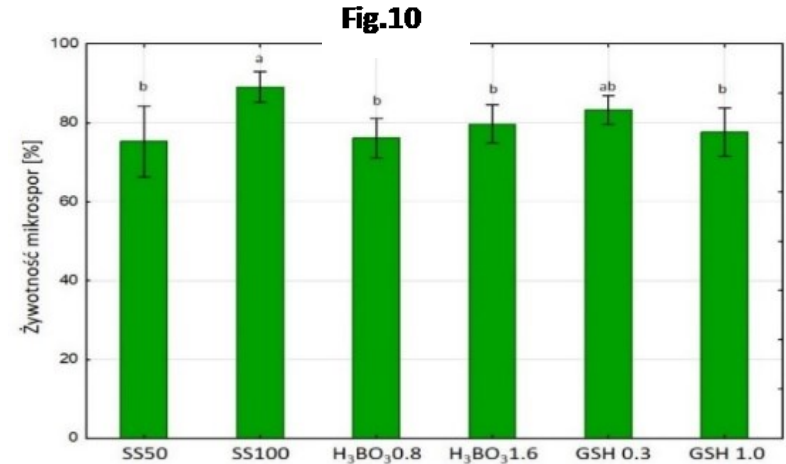


Fig.11

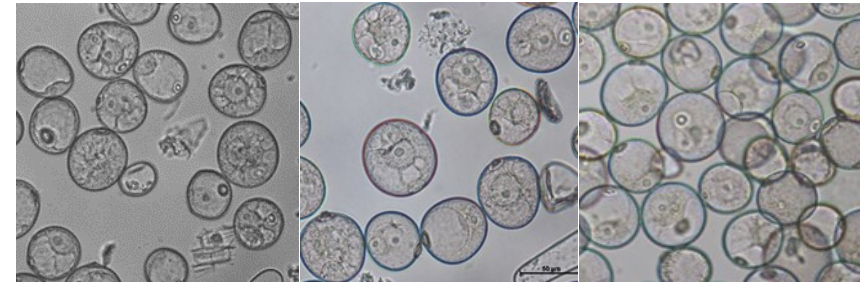
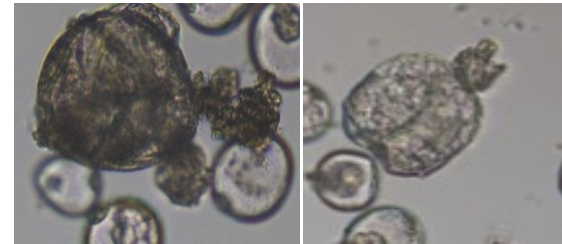


Fig.12



Wyniki

Zadanie badawcze 2. Wpływ traktowania indukującego proces EM na równowagę jonową i oksydo-redukcyjną w pylnikach pszenicy zwyczajnej o zróżnicowanej podatności na indukcję EM (metodyka IFR PAN)

1. Wykazano istotne zmiany zachodzące pod wpływem traktowania indukującego EM (NT, a zwłaszcza NT/SS+MAN) we wszystkich analizowanych parametrach.

2. Wszystkie analizy wykazały również istotne zróżnicowanie reakcji pomiędzy badanymi liniami o różnej podatności na indukcję EM. Obserwowano istotnie różną amplitudę (rzadziej kierunek) zmian zawartości makro- (Na, K, Ca, Mg) i mikroelementów (Zn, Fe, Mn, Cu i Mo; Fig.13), względnej akumulacji reaktywnych form tlenu (RFT; Fig.14) i nadtlenku wodoru (H₂O₂; Fig.15).

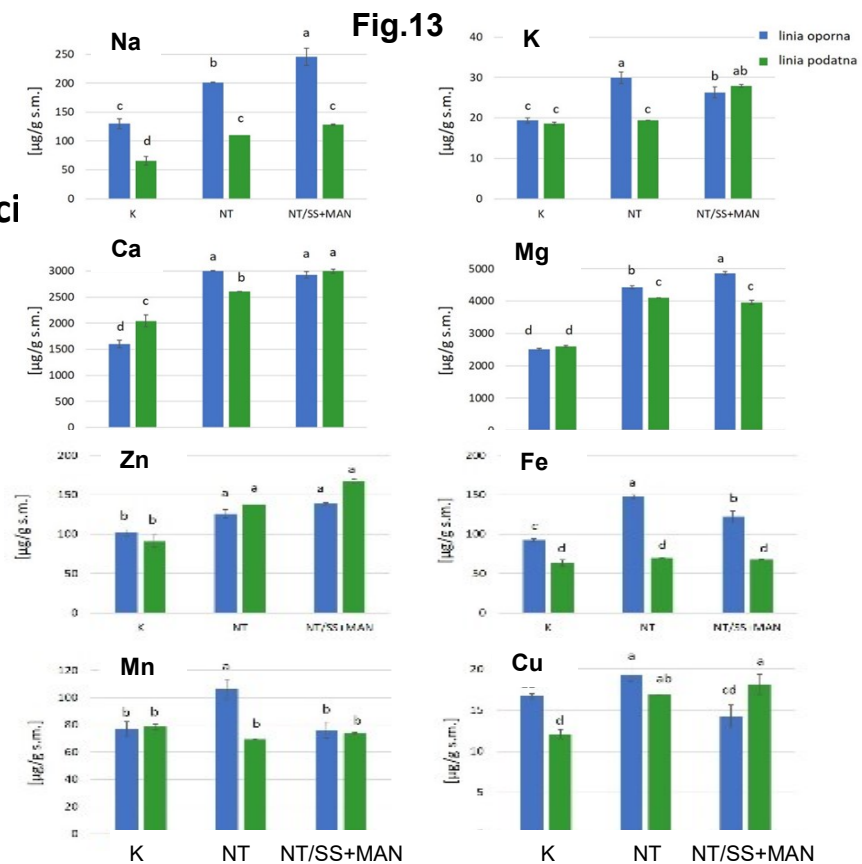


Fig. 14.

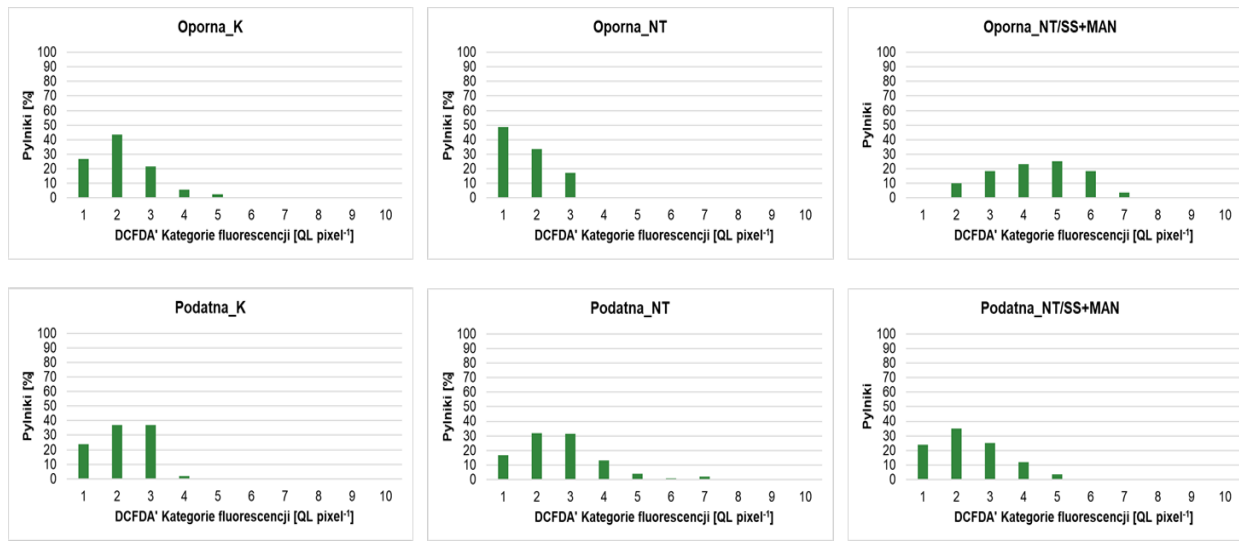
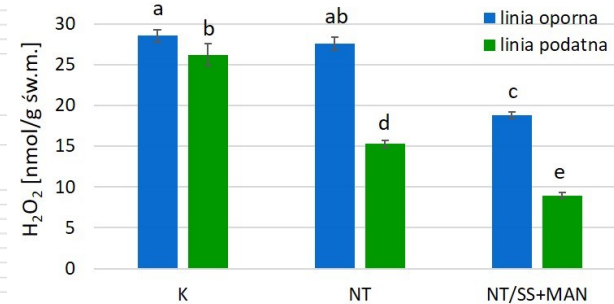


Fig. 15.



3. Istotnie różnicowany był również poziom całkowitej nieenzymatycznej aktywności antyoksydacyjnej (AA; Fig.16) oraz poziom i zmiany zawartości najważniejszych antyoksydantów drobnocząsteczkowych (askorbinianu i glutationu); zarówno formy zredukowanej (ASA, GSH; Fig. 17A, C) jak i utlenionej (DHA, GSSG, Fig.17B, D).

Fig.16

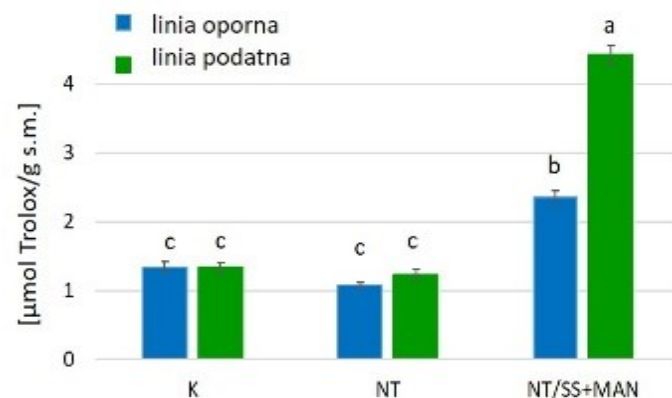
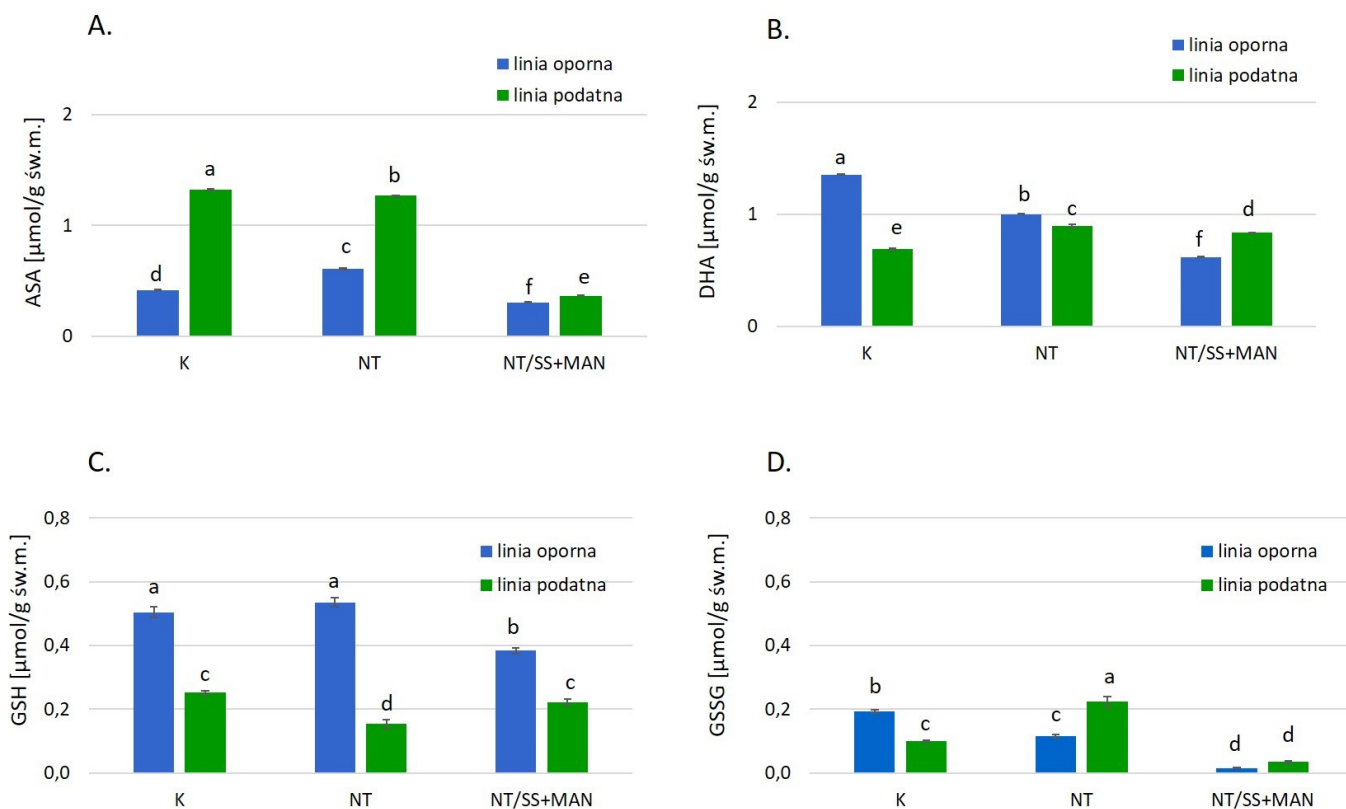


Fig.17



Podsumowanie i Wnioski

1. Przeprowadzone w roku 2022 badania pozwoliły na wprowadzenie modyfikacji proceduralnych i wybranie potencjalnie najbardziej efektywnej kombinacji czynników stresowych pozwalającej na zachowanie wysokiej żywotności przy równoczesnej efektywnej zmianie kierunku rozwoju mikrospor badanych genotypów pszenicy. Ze względu na zaburzenia mające miejsce w kolejnych etapach rozwoju niezbędna jest dalsza optymalizacja procedury indukcji EM, jednak podstawowy warunek jakim było uzyskanie dużej liczby embriogennych mikrospor w dniu izolacji został spełniony.
2. Wykazano, że przedłużeniu okresu traktowania wstępnego kłosów niską temperaturą ponad 21 dni towarzyszy nagromadzenie niekorzystnych czynników blokujących indukcję EM, a stymulujących rozwój endogennych mikroorganizmów (bakterii i grzybów).
3. Wyniki badań potwierdzają hipotezę, iż linie pszenicy ozimej bardziej odporne na indukcję EM linii charakteryzuje niższa tolerancja na stres indukujący zmianę kierunku rozwoju mikrospor.

Kolejnym celem prac będzie opracowanie składu pożywek hodowlanych, niezbędnych dla prawidłowego rozwoju zaindukowanych ELS. Zaplanowane na rok 2023 analizy profilu hormonalnego i epigenetycznego powinny pozwolić na identyfikację przyczyn zaburzeń obserwowanych na dalszych etapach rozwoju embriogennych mikrospor, dobór odpowiedniej kombinacji egzogennych substancji hormonalnych oraz zdecydować o potencjalnym zastosowaniu czynników modyfikujących epigenom.