

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin  
Państwowy Instytut Badawczy w Radzikowie

Joanna Machczyńska

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Uwarunkowanie zmienności epigenetycznej i genetycznej indukowanej  
w kulturach *in vitro* u pszenżyta  
(x *Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus)**

**Promotor: dr hab. Piotr Tomasz Bednarek**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB  
Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

**Promotor pomocniczy: dr inż. Renata Orłowska**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin – PIB  
Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

**Recenzenci: prof. dr hab. Iwona Szarejko**

Uniwersytet Śląski w Katowicach  
Wydział Biologii i Ochrony Środowiska

**prof. dr hab. inż. Dariusz Grzebelus**

Uniwersytet Rolniczy w Krakowie  
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa

Radzików 2016

## **SPIS TREŚCI**

WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	3
WPROWADZENIE .....	3
HIPOTEZA NAUKOWA .....	5
CELE BADAŃ.....	5
STRUKTURA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ .....	6
WYNIKI BADAŃ.....	6
WNIOSKI.....	10
PODSUMOWANIE .....	11
SPIS LITERATURY .....	11

## WYKAZ PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1. Machczyńska Joanna, Orłowska Renata, Zimny Janusz, Bednarek Piotr Tomasz (2014a) Extended metAFLP approach in studies of tissue culture induced variation (TCIV) in triticale. *Molecular Breeding*: 34: 845-854 doi:10.1007/s11032-014-0079-2
2. Machczyńska Joanna, Zimny Janusz, Bednarek Piotr Tomasz (2015) Tissue culture -induced genetic and epigenetic variation in triticale (*x Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. *Plant Molecular Biology* 89: 279-292 doi:10.1007/s11103-015-0368-0
3. Machczyńska Joanna, Orłowska Renata, Mańkowski Dariusz Robert, Zimny Janusz, Bednarek Piotr Tomasz (2014b) DNA methylation changes in triticale due to *in vitro* culture plant regeneration and consecutive reproduction. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*: 119: 289-299 doi:10.1007/s11240-014-0533-1

## WPROWADZENIE

Regeneracja roślin w kulturach *in vitro* umożliwia uzyskanie roślin haploidalnych i podwojonych haploidów. Dane literaturowe wskazują, że otrzymywanie roślin w kulturach *in vitro* indukuje zmienność, która może być obserwowana u regenerantów (zmienność indukowana w kulturach *in vitro*) (Kaepler i in. 2000) oraz u potomstwa generatywnego regenerantów (zmienność somaklonalna) (Linacero i Vazquez 1992).

Zmiany obserwowane podczas regeneracji roślin w kulturach *in vitro* mogą być spowodowane m.in. zmiennością swoistą eksplantatu lub wpływem manipulacji związanych z kulturami tkankowymi. Wpływ kultur tkankowych na poziom indukowanych zmian może zależeć od m.in. genotypu i stabilności genomu roślin donorowych (Snape i in. 1988; Zhang i in. 2010), eksplantatu (Skirvin i in. 1994), systemu regeneracji roślin (Devaux i in. 1993), składu pożywek (Bouman i De Klerk 2001), czasu trwania kultury (Smykal i in. 2007), stresów abiotycznych (Guzy-Wróbelska i in. 2013), zaburzeń w procesach komórkowych (Larkin i Scowcroft 1981), migracji elementów mobilnych czy zmienności w sekwencjach powtórzonych tandemowo (Bzymek i Lovett 2001; Ngezahayo i in. 2009). Zmienność indukowana w kulturach *in vitro* oraz zmienność somaklonalna może przejawiać się na poziomie np. morfologicznym (Oleszczuk i in. 2011), biochemicznym (Franck i in. 2001), liczby i struktury chromosomów (Lapitan i in. 1984), sekwencji DNA (Jiang i in. 2011) czy zmian wzorów metylacji DNA (Jaligot i in. 2011).

Manipulacje stosowane w celu regeneracji roślin w kulturach tkankowych mogą być źródłem zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* i zmienności somaklonalnej. Dotychczasowe badania na różnych gatunkach roślin potwierdziły występowanie zmienności sekwencyjnej i wzorów metylacji DNA u regenerantów, jednakże brak było takich analiz dla pszenżyta, syntetycznego gatunku, który powstał niedawno i cieszy się zainteresowaniem hodowców roślin. Pszenżyto ze względu na swoją niestabilność genomową (Bento i in. 2008), sposób wyprowadzenia (Müntzing 1974, 1979) i znaczenie gospodarcze (Wolski i in. 2000) jest ciekawym obiektem badawczym do oceny zmian genetycznych i metylacyjnych, tak więc ten gatunek może przyczynić się np. do wyjaśnienia zmienności występującej podczas regeneracji roślin w kulturach *in vitro*.

Dotychczasowe badania zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* i zmienności somaklonalnej prowadzono z wykorzystaniem różnych technik analitycznych (Rival i in. 2013; Teyssier i in. 2013) i molekularnych (Linacero i in. 2000; Jaligot i in. 2002; Smykal i in. 2007; Perrini i in. 2009; Zhang i in. 2010; Baránek i Ondrusiková 2012). Jednak ocena zmian indukowanych w kulturach *in vitro* wymaga opracowania takich narzędzi molekularnych, które pozwoliłyby na ilościową ocenę tych zmian. Najczęściej stosowaną techniką do analizy zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* (ang. *tissue culture – induced variation* (TCIV)) jest metoda AFLP z wykorzystaniem endonukleaz wrażliwych na metylację (ang. *methylation sensitive amplified polymorphism* (MSAP)). Uzyskane tą metodą wyniki mogą być niedoszacowane, gdyż enzymy te np. nie przecinają DNA, gdy występuje metylacja <sup>m</sup>C<sup>m</sup>CGG i <sup>m</sup>CCGG w podwójnej nici (Cervera i in. 2002). Ponadto, nie ma jednego powszechnie przyjętego sposobu obliczania ilościowych charakterystyk zmienności na podstawie interpretacji wzorów prążkowych (Schulz i in. 2013). Dlatego w niniejszej rozprawie doktorskiej rozwinięto metodę metAFLP umożliwiającą jakościową i ilościową ocenę zmienności genetycznej i zmian wzorów metylacji w jednym doświadczeniu, bazując na analizie profili molekularnych rośliny donorowej i jej regenerantów (Machczyńska i in. 2014a).

Wykorzystanie metody metAFLP pozwoliło na szczegółową charakterystykę zmian powodowanych wpływem kultur *in vitro*, pod warunkiem zastosowania odpowiedniego modelu badawczego, który powinien niwelować potencjalne źródła zmienności, które mogą zniekształcać ocenę poziomu zmian indukowanych w kulturach *in vitro*. Przede wszystkim należy dążyć do ograniczenia zmienności swoistej. By to osiągnąć w badaniach będących podstawą rozprawy doktorskiej wykorzystano wyrównane genetycznie rośliny donorowe, będące podwojonymi haploidami. Taki materiał o ustabilizowanym genomie był źródłem eksplantatów do wyprowadzenia regenerantów w kulturach samoistnie uwalniających się

mikrospor, kulturach pylnikowych i w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych, a następnie potomstwa generatywnego regenerantów. Metoda metAFLP umożliwiła identyfikację zmian wzorów metylacji jedynie w miejscach restrykcji enzymów, dlatego w pracy zastosowano technikę RP-HPLC (ang. *reverse phase-high performance liquid chromatography*) do analizy poziomu metylowanej cytozyny w całym genomie. Ponadto, poprzez wykorzystanie techniki RP-HPLC możliwa była kontrola czy zmiany te mogą być przenoszone do potomstwa generatywnego regenerantów.

## **HIPOTEZA NAUKOWA**

1. Istnieje możliwość opracowania rozszerzonego wariantu techniki metAFLP, która pozwala na ilościową ocenę zmian indukowanych w kulturach *in vitro* oraz charakterystyk niepodlegających zmianom w wyniku regeneracji roślin w kulturach tkankowych.
2. Regeneracja roślin w kulturach *in vitro* prowadzi do stresu abiotycznego. Stres ten indukuje zmienność u regenerantów pszenżyta, która może być dziedziczona u potomstwa generatywnego tych regenerantów.
3. Poziom zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* u pszenżyta zależy od genotypu roślin donorowych i systemu regeneracji roślin.

## **CELE BADAŃ**

1. Opracowanie rozszerzonego wariantu metody metAFLP do ilościowej oceny zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* oraz dodatkowych charakterystyk opisujących rośliny uzyskane w kulturach tkankowych;
2. Jakościowa i ilościowa ocena zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* pszenżyta z wykorzystaniem rozszerzonego wariantu metody metAFLP;
3. Ocena wpływu genotypu roślin donorowych i systemu regeneracji roślin na poziom zmian indukowanych podczas otrzymywania roślin w kulturach *in vitro*;
4. Ocena całkowitej metylacji DNA genomu roślin donorowych, regenerantów i ich trzech pokoleń generatywnych za pomocą RP-HPLC;
5. Porównanie wyników uzyskanych metodą metAFLP i RP-HPLC.

## **STRUKTURA ROZPRAWY DOKTORSKIEJ**

Do omówienia literatury dotyczącej realizowanego tematu, potwierdzenia postawionych hipotez i osiągnięcia wyznaczonych celów Autorka przedstawiła pracę w dziesięciu rozdziałach.

W pierwszym rozdziale przedstawiono wykaz publikacji wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Drugi rozdział obejmował streszczenie rozprawy w języku polskim i angielskim.

W trzecim rozdziale opisano zagadnienia dotyczące otrzymywania roślin w kulturach *in vitro*, czynników wpływających na poziom zmian indukowanych w wyniku manipulacji stosowanych w kulturach tkankowych, a także przejawów zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* na poziomie zmian w morfologii, biochemii, liczby i struktury chromosomów i metylacji DNA. Omówiono również techniki stosowane do badań nad zmiennością indukowaną w kulturach *in vitro* u regenerantów i zmiennością somaklonalną u generatywnego potomstwa regenerantów. Następnie, na podstawie dostępnej literatury, opisano wyniki dotyczące zmienności obserwowanej u regenerantów pszenżyta i ich potomstwa generatywnego.

Czwarty rozdział zawierał cel badań i hipotezę naukową.

W piątym rozdziale uzasadniono wybór materiału roślinnego i metod stosowanych do badań.

Szósty rozdział to wyniki omówione w publikacjach składających się na niniejszą rozprawę doktorską, a w siódmym podsumowano uzyskane rezultaty dla wszystkich prac wchodzących w skład rozprawy doktorskiej.

Efekty dysertacji doktorskiej były przedstawione w rozdziale pt.: Obserwacje i wnioski.

Rozdział dziewiąty zawierał spis literatury, a w ostatnim załączono publikacje naukowe składające się na rozprawę doktorską.

## **WYNIKI BADAŃ**

W publikacji Machczyńskiej i in. (2014a) opracowano rozszerzony wariant metody metAFLP umożliwiający ocenę poziomu zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* (i licznych charakterystyk opisujących brak zmian), do której dochodzi podczas

otrzymywania roślin w kulturach *in vitro*. Metoda metAFLP bazuje na interpretacji wzorów prążkowych powielanych na DNA roślin donorowych i ich regenerantów z wykorzystaniem dwóch par endonukleaz restrykcji *Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*. Wzory te konwertowano do czterocyfrowego kodu, w którym pierwsza i trzecia pozycja odzwierciedlały obecność lub brak prążka u rośliny donorowej, a druga i czwarta u regeneranta. Pierwsza i druga pozycja to profile powielone na bazie produktów cięcia genomowego DNA restryktazami *Acc65I/MseI* natomiast trzecia i czwarta odpowiada profilom opartym o endonukleazy *KpnI/MseI*. Każdy z przedstawionych czterocyfrowych kodów miał własną interpretację genetyczną odzwierciedlającą różne typy zdarzeń opisanych w rozprawie doktorskiej. Ilościową ocenę poszczególnych typów zdarzeń wykonano na podstawie zerojedynkowych kodów (Tab. 1).

Tabela 1. Zestawienie wzorów do wyliczania różnych typów zdarzeń charakteryzujących regeneranty otrzymane w kulturach *in vitro* na bazie 4-cyfrowego kodu

Skrót	Wzór	Opis
<b>SE</b>	$\sum(0001)+\sum(0010)+\sum(0101)+\sum(0110)+\sum(1001)+\sum(1010)+\sum(1110)+\sum(1101)$	Zdarzenie sekwencyjne
<b>DME</b>	$\sum(0111)+\sum(0110)$	Zdarzenie demetylacyjne
<b>DNME</b>	$\sum(1011)+\sum(1001)$	Zdarzenie metylacja <i>de novo</i>
<b>CE</b>	$\sum(0100)+\sum(1000)$	Zdarzenie złożone
<b>SNMS</b>	$\sum(1100)+\sum(1111)+\sum(1101)$	Niemetylowane miejsca restrykcji u rośliny donorowej i jej regeneranta
<b>SMS</b>	$\sum(0011)+\sum(1100)$	Miejsca restrykcji modyfikowane pod wpływem metylacji DNA u rośliny donorowej i jej regeneranta
<b>TNTCIE</b>	SE +DME+DNME+CE	Całkowita liczba zdarzeń indukowanych podczas regeneracji w kulturach <i>in vitro</i>

Dla każdego typu zdarzeń obliczono procentowy udział poszczególnych typów zmienności jak i pozostałych charakterystyk opisujących regeneranty otrzymane w kulturach tkankowych (Tab. 2).

Tabela 2. Wzory użyte do procentowych wyliczeń różnych typów zmienności i dodatkowych charakterystyk opisujących rośliny uzyskane w kulturach *in vitro*

Skrót	Wzór	Opis
<b>Mianownik1</b>	SE+DME+DNME+CE+SMS+SNMS+0000	Służył do procentowych wyliczeń zmienności SV, DMV, DNMV, CV, TTCIV oraz charakterystyk SNMS, SMS
<b>SV</b>	$100*SE/Mianownik1$	Zmienność sekwencyjna
<b>DMV</b>	$100*DME/Mianownik1$	Demetylacja

<b>DNMV</b>	100*DNME/Mianownik1	Metylacja <i>de novo</i>
<b>CV</b>	100*CE/Mianownik1	Zmienność złożona
<b>TTCIV</b>	100*TTCIE/Mianownik1	Całkowita zmienność indukowana w kulturach <i>in vitro</i>
<b>SNMS</b>	100*SNMS/Mianownik1	Niemetylowane miejsca restrykcji u rośliny donorowej i jej regeneranta
<b>SMS</b>	100*SMS/Mianownik1	Miejsca restrykcji modyfikowane pod wpływem metylacji DNA u rośliny donorowej i jej regeneranta
<b>TNNMS</b>	DME+SNMS	Liczba niemetylowanych miejsc restrykcji u regeneranta
<b>TNMS</b>	DNME+SMS	Liczba metylowanych miejsc restrykcji u regeneranta
<b>Mianownik2</b>	TNMS+TNNMS	Służył do procentowych wyliczeń GM i GNM
<b>GM</b>	100*TNMS/Mianownik2	Globalna genomowa metylacja
<b>GNM</b>	100*TNNMS/Mianownik2	Globalny genomowy brak metylacji
<b>SUTCIV</b>	100 – TCIV	Liczba miejsc restrykcji nie będących pod wpływem działania kultur <i>in vitro</i>
<b>SAM</b>	TTCIV – CSV	Liczba miejsc restrykcji modyfikowanych pod wpływem metylacji

W rozszerzonym wariancie metAFLP opracowano model teoretyczny zmienności złożonej, określono jaki wkład do zmienności złożonej ma zmienność sekwencyjna, metylacja *de novo* oraz demetylacja. Uzyskane dane pozwoliły na ponowne oszacowanie tych typów zmienności i wyeliminowanie zmienności złożonej jako odrębnego elementu modelu.

Ocenę zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* przeprowadzono dla regenerantów (Machczyńska i in. 2015) otrzymanych z czterech genotypów roślin donorowych, będących podwojonymi haploidami, uzyskanych w kulturach izolowanych mikrospor (Oleszczuk i in. 2004). Z czterech genotypów roślin donorowych otrzymano 53 klony, które analizowano za pomocą techniki metAFLP. Zaobserwowano wystąpienie zróżnicowania na poziomie DNA klonów roślin donorowych dla wybranych genotypów. Dlatego klony danego genotypu, u których wykryto polimorfizm w jakiegokolwiek z platform metAFLP uwidoczniony na poziomie analizy skupień wykluczono z dalszych analiz. Cztery genotypy roślin donorowych oraz ich regeneranty otrzymane na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych i w kulturach samoistnie uwalniających się mikrospor, a także na drodze embriogenezy somatycznej w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych utworzyły cztery zestawy roślin (S<sup>1</sup>, S<sup>2</sup>, S<sup>3</sup>, S<sup>4</sup>). Podwojone haploidy wyprowadzone poprzez



androgenezę, jak również homozygotyczne rośliny zregenerowane na drodze embriogenezy somatycznej, nie wykazywały różnic morfologicznych w stosunku do roślin donorowych.

Regeneranty otrzymane na drodze androgenezy i embriogenezy somatycznej analizowano za pomocą metAFLP, a średnie wyniki dotyczące poszczególnych typów zmienności i pozostałych charakterystyk metAFLP dla wszystkich regenerantów otrzymanych z czterech genotypów roślin donorowych przedstawiono w Tabeli 3.

Tabela 3. Średnie ilościowe wartości charakterystyk metAFLP dla wszystkich regenerantów bez podziału na system regeneracji roślin i genotyp roślin donorowych wraz z odchyleniem standardowym ( $\pm$ )

<b>Typy charakterystyk metody metAFLP</b>	<b>Średnie wyniki dla regenerantów (%)</b>
Zmienność sekwencyjna (SV)	19,16 $\pm$ 5,06
Demetylacja (DMV)	5,48 $\pm$ 0,82
Metylacja <i>de novo</i> (DNMV)	4,48 $\pm$ 1,26
Całkowita zmienność indukowana w kulturach <i>in vitro</i> (TTCIV)	29,12 $\pm$ 6,3
Globalna genomowa metylacja (GM)	12,14 $\pm$ 2,37
Liczba miejsc restrykcji modyfikowanych pod wpływem metylacji (SAM)	10,56 $\pm$ 2,32
Miejsca restrykcji modyfikowane pod wpływem metylacji u rośliny donorowej i jej regeneranta (SMS)	4,35 $\pm$ 1,05
Niemetylowane miejsca restrykcji u rośliny donorowej i jej regeneranta (SNMS)	61,12 $\pm$ 5,62

Analiza wariancji regenerantów otrzymanych na drodze androgenezy i embriogenezy somatycznej nie ujawniła różnic między systemami regeneracji roślin, jednakże różnice między systemami regeneracji roślin obserwowano w obrębie poszczególnych zestawów roślin (donor-regenerant) i wybranych typów charakterystyk metAFLP (Machczyńska i in. 2015).

Analiza wariancji całkowitej zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* ujawniła występowanie różnic pomiędzy zestawami roślin (Machczyńska i in. 2015).

Analiza wariancji zestawów z uwzględnieniem poszczególnych typów charakterystyk metody metAFLP również wykazała zróżnicowanie poszczególnych zestawów roślin (Machczyńska i in. 2015).

Analiza wariacji poszczególnych typów charakterystyk metAFLP ujawniła różnice między nimi (Machczyńska i in. 2015).

Ilościowa ocena całkowitej metylacji DNA genomu roślin donorowych, regenerantów i ich pierwszego ( $P^1$ ), drugiego ( $P^2$ ) i trzeciego pokolenia generatywnego ( $P^3$ ) wykonana techniką RP-HPLC wykazała demetylację genomu u regenerantów oraz pierwszego i częściowo drugiego pokolenia generatywnego regenerantów. Dopiero od  $P^2/P^3$  obserwowano wzrost poziomu metylowanej cytozyny. Na podstawie analizy wariacji stwierdzono wpływ genotypu i systemu regeneracji roślin na fluktuacje w poziomie globalnej metylacji DNA (Machczyńska i in. 2014b).

Analiza współczynników korelacji Pearsona dotycząca porównania wyników genomowej metylacji DNA uzyskanych za pomocą metAFLP oraz analogicznych wyników uzyskanych techniką RP-HPLC ujawniła słabą korelację danych (Machczyńska i in. 2015).

## WNIOSKI

1. Regeneracja roślin na drodze androgenezy i embriogenezy somatycznej umożliwiła uzyskanie wyrównanych morfologicznie materiałów roślinnych do realizacji badań prowadzonych w ramach pracy doktorskiej.
2. Opracowanie rozszerzonego modelu teoretycznego metody metAFLP umożliwiło rozdzielenie zmienności złożonej na zmienność sekwencyjną, demetylacyjną i metylację *de novo*, a tym samym na dokładniejsze szacowanie wymienionych wyżej zmienności w obrębie badanych materiałów roślinnych.
3. Rozszerzony wariant metody metAFLP umożliwił szczegółową charakterystykę regenerantów poprzez wprowadzenie dodatkowych charakterystyk jak genomowa metylacja DNA, miejsca restrykcji modyfikowane pod wpływem metylacji DNA, miejsca restrykcji modyfikowane pod wpływem metylacji DNA u rośliny donorowej i jej regeneranta, niemetylowane miejsca restrykcji u rośliny donorowej i jej regeneranta.
4. Wybrane charakterystyki metAFLP odzwierciedlają różne aspekty zjawisk zachodzących podczas regeneracji w kulturach *in vitro*.
5. Systemy regeneracji roślin i genotyp roślin donorowych wpływają na poziom zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* u pszenżyta.
6. Uzyskane wyniki dotyczące zmienności metylacyjnej sugerują wysoką podatność genomu pszenżyta na stres indukowany podczas regeneracji w kulturach tkankowych, natomiast obecność zmienności sekwencyjnej może odzwierciedlać aktywację elementów mobilnych w kulturach *in vitro*.

7. Rezultaty uzyskane z analizy RP-HPLC świadczą to o tym, że stres abiotyczny jaki stwarzają kultury *in vitro* uwidaczniający się na poziomie zmian metylacji DNA ma wpływ na kolejne pokolenia generatywne regenerantów pszenżyta.
8. Zbieżność wyników uzyskanych z analizy RP-HPLC z wynikami metAFLP świadczy o tym, że obie metody opisują podobne zjawiska zachodzące w kulturach *in vitro* na poziomie metylacji DNA.
9. Słaba korelacja wyników dotyczących globalnej metylacji DNA analizowanej za pomocą metAFLP i RP-HPLC świadczy o tym, że metoda metAFLP odzwierciedla zmiany w określonych obszarach genomu i nie identyfikuje całościowych zmian obserwowanych przy użyciu metody RP-HPLC.
10. Brak zmian morfologicznych u regenerantów i ich generatywnego potomstwa wskazuje, że identyfikowana za pomocą metAFLP i RP-HPLC zmienność sekwencyjna i metylacyjna nie zaburzała w obserwowalny sposób prawidłowego rozwoju i funkcjonowania roślin.

## **PODSUMOWANIE**

Uzyskane dane pokazują, że otrzymywanie roślin w kulturach *in vitro* u pszenżyta indukuje szereg zmian sekwencyjnych i metylacyjnych u regenerantów, które mogą wpływać na ich kolejne pokolenia generatywne. Należy podkreślić, że brak silnej korelacji pomiędzy metAFLP i RP-HPLC wskazuje na to, iż są one metodami wzajemnie się uzupełniającymi i wskazane jest ich równoległe stosowanie, aby lepiej rozumieć zachodzące zmiany. Uzyskane wyniki niosą wartość poznawczą i pośrednio mogą odzwierciedlać niestabilność genomu pszenżyta. Można również oczekiwać, że obserwowany wysoki poziom zmienności u regenerantów oraz oddziaływanie kultur *in vitro* na pokolenia generatywne ma związek z problemami wyrównania niektórych odmian pszenżyta wyprowadzonych z podwojonych haploidów nawet po wielu cyklach chowu wsobnego.

## **SPIS LITERATURY**

- Baránek M, Ondrusiková E (2012) Acta Hort 961, 73-80. doi: 10.17660/ActaHortic.2012.961.6
- Bento M, Pereira HS, Rocheta M, Gustafson P, Viegas W, Silva M (2008) PLoS ONE 3, e1402. doi: 10.1371/journal.pone.0001402
- Bouman H, De Klerk GJ (2001) Theor Appl Genet 102, 111-117. doi: 10.1007/s001220051625
- Bzymek M, Lovett ST (2001) Proc Natl Acad Sci USA 98, 8319-8325. doi: 10.1073/pnas.111008398

- Cervera MT, Ruiz-García L, Martínez-Zapater J (2002) *Mol Gen Genet* 268, 543-552. doi: 10.1007/s00438-002-0772-4
- Devaux P, Kilian A, Kleinhofs A (1993) *Mol Gen Genet* 241, 674-679. doi: 10.1007/BF00279910
- Franck T, Gaspar T, Kevers C, Penel C, Dommes J, Hausman JF (2001) *Plant Sci* 160, 1145-1151. doi: 10.1016/S0168-9452(01)00362-4
- Guzy-Wróbelska J, Filek M, Kaliciak A, Szarejko I, Macháčková I, Krekule J, Barciszewska M (2013) *Acta Physiol Plant* 35, 817-827. doi: 10.1007/s11738-012-1126-4
- Jaligot E, Adler S, Debladis É, Beulé T, Richaud F, Ilbert P, Finnegan EJ, Rival A (2011) *Ann Bot* 108, 1453-1462. doi: 10.1093/aob/mcq266
- Jaligot E, Beulé T, Rival A (2002) *Theor Appl Genet* 104, 1263-1269. doi: 10.1007/s00122-002-0906-4
- Jiang C, Mithani A, Gan X, Belfield EJ, Klingler John P, Zhu J-K, Ragoussis J, Mott R, Harberd Nicholas P (2011) *Curr Biol* 21, 1385-1390. doi: 10.1016/j.cub.2011.07.002
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) *Plant Mol Biol* 43, 179-88. doi: 10.1023/A:1006423110134
- Lapitan NL, Sears RG, Gill BS (1984) *Theor Appl Genet* 68, 547-54. doi: 10.1007/bf00285012
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) *Theor Appl Genet* 60, 197-214. doi: 10.1007/BF02342540
- Linacero R, Freitas Alves E, Vazquez AM (2000) *Theor Appl Genet* 100, 506-511. doi: 10.1007/s001220050066
- Linacero R, Vazquez AM (1992) *Mutat Res* 302, 201-205. doi: 10.1016/0165-7992(93)90105-5
- Machczyńska J, Zimny J, Bednarek P (2015) *Plant Mol Biol* 89, 279-292. doi: 10.1007/s11103-015-0368-0
- Machczyńska J, Orłowska R, Zimny J, Bednarek P (2014a) *Mol Breed* 34, 845-854. doi: 10.1007/s11032-014-0079-2
- Machczyńska J, Orłowska R, Mańkowski DR, Zimny J, Bednarek P (2014b) *Plant Cell Tiss Organ Cult* 119, 289-299. doi: 10.1007/s11240-014-0533-1
- Müntzing A (1979) Supplement X to J of Plant Breed. Verlag Paul Parey, Berlin und Hamburg: 103
- Müntzing A (1974) Proc. Int. Symp. "Triticale", El Batan, Mexico, 1-3 October 1973, Int. Develop. Res. Centre Monogr., Ottawa, Canada: 13-30
- Ngezahayo F, Xu C, Wang H, Jiang L, Pang J, Liu B (2009) *BMC Plant Biol* 9, doi: 10.1186/1471-2229-9-91
- Oleszczuk S, Rabiza-Swider J, Zimny J, Lukaszewski A (2011) *Plant Cell Rep* 30, 575-586. doi: 10.1007/s00299-010-0971-0
- Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J (2004) *Plant Cell Rep* 22, 885-893. doi: 10.1007/s00299-004-0796-9

- Perrini R, Alba V, Ruta C, Morone-Fortunato I, Blanco A, Montemurro C (2009) *Cell Mol Biol Lett* 14, 377. doi: 10.2478/s11658-009-0007-3
- Rival A, Ilbert P, Labeyrie A, Torres E, Doubeau S, Personne A, Dussert S, Beulé T, Durand-Gasselín T, Tregear J, Jaligot E (2013) *Plant Cell Rep* 32, 359-368. doi: 10.1007/s00299-012-1369-y
- Schulz B, Eckstein RL, Durka W (2013) *Mol Ecol Resour* 13, 642-653. doi: 10.1111/1755-0998.12100
- Skirvin RM, McPheeters KD, Norton M (1994) *Hort Sci* 29, 1232-1237.
- Smykal P, Valledor L, Rodríguez R, Griga M (2007) *Plant Cell Rep* 26, 1985-98. doi: 10.1007/s00299-007-0413-9
- Snape JW, Sitch LA, Simpson E, Parker BB (1988) *Theor Appl Genet* 75, 509-513. doi: 10.1007/BF00276758
- Teyssier C, Maury S, Beaufour M, Grondin C, Delaunay A, Le Metté C, Ader K, Cadene M, Label P, Lelu-Walter M-A (2013) *Physiol Plant* 271-91. doi: 10.1111/ppl.12081
- Wolski T, Pojmaj MS, Banaszak Z, Czerwińska E, Bogacki J, Marciniak K, Szólkowski A (2000) *Biul IHAR* 214, 95-104.
- Zhang M, Wang H, Dong Z, Qi B, Xu K, Liu B (2010) *Plant Cell Rep* 29, 51-59. doi: 10.1007/s00299-009-0797-9