



# Badanie reakcji mikrospor żyta na stres i warunki kultury in vitro

## Temat 85

Zakład Biotechnologii i Cytogenetyki Roślin IHAR-PIB

kierownik zadania: Prof. dr hab. Janusz Zimny - IHAR – PIB e-mail [j.zimny@ihar.edu.pl](mailto:j.zimny@ihar.edu.pl)

wykonawcy zadania:

Dr Sylwia Oleszczuk	adiunkt	IHAR – PIB
Dr Katarzyna Makowska	adiunkt	IHAR – PIB (obecnie Heinrich-Heine- Universität w Dusseldorfie, Plant Genome Engeneering Centre)
Dr Andrzej Czaplicki	adiunkt	IHAR – PIB

Projekt był realizowany w latach 2016-2020

# Cele

1. Hipoteza: Rodzaj stresu jest czynnikiem kluczowym, decydującym o rozwoju sporofitu z komórek szlaku gametofitowego.  
Celem badań było określenie wpływu stosowanego stresu na reakcję androgeniczną mikrospor żyta. Zakładano zbadanie reakcji mikrospor żyta pod wpływem następujących czynników: chłód, stres cieplny, „głodzenie” mikrospor, oraz kombinacji niektórych stresów.
2. Hipoteza: Liczba zielonych regenerantów zależy od genotypu i warunków kultury mikrospor.  
Celem prac było zbadanie interakcji pomiędzy genotypem i pożywką oraz wskazanie warunków wskaśrodkowych sprzyjających podziałom mikrospory żyta. Poszukiwano czynników chemicznych, fizycznych, ale również organicznych (kultury „niańki”) zwiększających liczbę zielonych regenerantów i ograniczających zjawisko albinizmu.
3. Hipoteza: Efektywność regeneracji podwojonych haploidów zależy od zastosowanych inhibitorów podziałów mitotycznych.  
Celem badań było określenie wpływu substancji chemicznych działających podobnie jak kolchicina, ale bardziej przyjaznych dla środowiska na proces podwajania liczby chromosomów i uzyskiwania płodnych linii homozygotycznych.

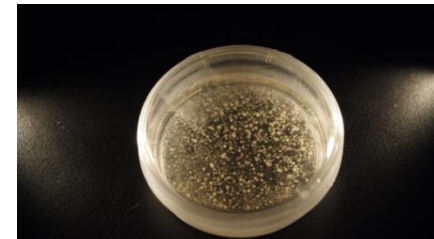
# Materiały



- Linie wykorzystane w badaniach pochodziły z Hodowli Roślin Danko Sp. z o.o i Poznańskiej Hodowli Roślin Sp. z o.o.

## Metody

- Doświadczenia prowadzono z wykorzystaniem kultur pylnikowych (KP) oraz kultur izolowanych mikrospor (KM)
- Badania prowadzono na pożywkach indukujących 190-2 lub KBP z modyfikacjami jak dodanie gumy arabskiej, trichostatyny lub tiosiarczanu srebra
- Stosowano kilkanaście rodzajów stresu w celu zmiany szlaku rozwojowego mikrospor
- Zastosowano różne substancje antymitotyczne w celu zoptymalizowania metody podwajania liczby chromosomów
- Zastosowano namioty z oświetleniem o różnej długości fali świetlnej w celu zbadania wpływu światła na indukcję androgenezy i regenerację roślin



# Rezultaty

## Analiza wpływu różnych czynników stresowych na indukcję androgenozy

- W ciągu czterech lat badań przetestowano kilkanaście kombinacji stresowych i kilkadziesiąt genotypów. W poprzednim roku zbadano stresse najbardziej wydajne w poprzednich doświadczeniach (tab.1). Odnotowano duże różnice w reakcji androgenicznej w obrębie poszczególnych genotypów w zależności od zastosowanego stresu. Uzyskane dane wskazują, że najbardziej uniwersalne są stresse B i D (tab.2 wyniki z 2019 roku). Wyraźnie istotnym czynnikiem indukowania androgenozy jest przedłużony okres chłodzenia kłosów.

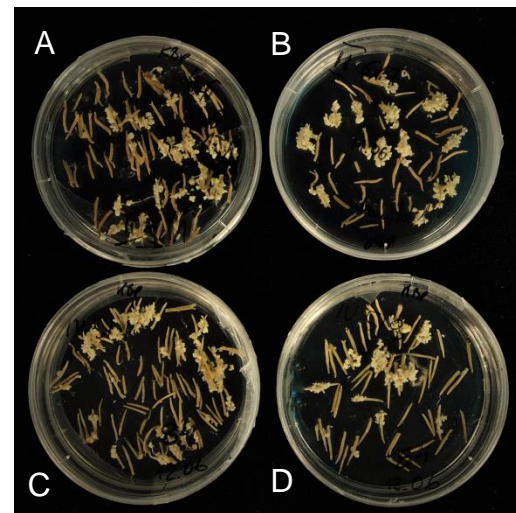
Tabela. 1

Kombinacje stresów stosowanych a badaniach	
<b>A</b>	Kłosa w H <sub>2</sub> O 4°C / 7 dni → pylniki w mannitolu 4°C / 7 dni
<b>B</b>	Kłosa w H <sub>2</sub> O 4°C / 14 dni → pylniki w mannitolu 4°C / 7 dni
<b>C</b>	Kłosa w H <sub>2</sub> O 4°C / 14 dni
<b>D</b>	Kłosa w H <sub>2</sub> O 4°C / 21 dni

Tabela. 2

Symbol rodzaju czynnika stresowego / genotyp	Zregenerowane zielone rośliny														
	10.1 p	10.4 p	8	3	4	5	51	47	1.3K	9K	5/3 5F	3.1K	5K	D 1	D 2
<b>A</b>	23	3	35	0	0	0	31	K	0	0	0	0	0	0	0
<b>B</b>	157	0	36	39	98	156	35	0	6	K	10	K	4	K	0
<b>C</b>	12	6	15	0	9	0	0	0	0	0	0	0	0	K	0
<b>D</b>	55	28	23	45	13	53	0	K	0	K	0	K	K	K	0

Fot. 1: Porównanie reakcji pylników genotypu „5” po zastosowaniu 4 stresów



**Wnioski:** Różna reakcja na zastosowane stresse stwarza konieczność zbadania i dostosowania stresu do konkretnego genotypu.

Najbardziej uniwersalnym typem stresu jest chłodzenie pędów z kłosami w połączeniu z prekulturą pylników w roztworze mannitolu.

# Rezultaty

## Zbadanie wpływu czynników stresowych i składu pożywek na zjawisko albinizmu regenerantów.

Poziom regeneracji wahał się w granicach od 0 do 11 roślin (zielone + albinotyczne) w przeliczeniu na 100 wyłożonych pylników, w zależności od genotypu, rodzaju prekultury i stosowanej pożywki indukującej. Wytypowano genotypy o wysokim potencjale regeneracyjnym (linia 5, linia 10.1P i linia 4) (Tabela 3). Poziom albinizmu wahał się w granicach od 0 do 90%, w zależności od genotypu, rodzaju zastosowanego stresu i pożywki. Najwyższy odsetek roślin bezchlorofilowych, otrzymano dla stresu D dla linii 8 i 4. Stres B okazał się korzystny dla linii 8 w kombinacji z pożywką KBP, a stres D dla linii 3, w kombinacji z pożywką 190. Zastosowanie pożywki KBP nie wpłynęło na zredukowanie zjawiska albinizmu.

Tab. 3. Parametry dotyczące regeneracji roślin dla 5 genotypów żyta w zależności od rodzaju stresu i stosowanej pożywki

pożywka -		190-2					KBP				
parametry androgenyzy	rodzaj stresu*	Linia 8	Linia 5	Linia 10.1P	Linia 3	Linia 4	linia 8	Linia 5	Linia 10.1P	Linia 3	Linia 4
TP / 100 P	B	0,06	9,49	8,41	2,22	7,64	2,53	9,65	7,82	3,78	5,48
	D	4,28	7,28	6,04	3,16	0,89	3,39	11,11	3,07	2,94	6,22
GP / 100 P	B	0,06	3,43	1,74	1,33	3,89	2,16	4,44	4,21	1,56	3,11
	D	0,44	1,73	1,22	2,65	0,3	0,83	2,14	0,81	1,11	0,67
Albinizm %	B	0	63,83	79,3	40	49,09	14,63	53,93	46,08	58,82	43,24
	D	89,61	76,27	79,75	16,22	66,67	75,41	80,77	73,49	62,16	89,29

\* Rodzaj stresu: B- Kłosa w H<sub>2</sub>O 4°C / 14 dni → pylniki w mannitolu 4°C / 7 dn;i D- Kłosa w H<sub>2</sub>O 4°C / 21 dni

**Wnioski:** Genotyp roślin donorowych w danych warunkach kultury ma wpływ na poziom albinizmu wśród regenerantów.

- Zastosowanie stresu polegającego na chłodzeniu pędów z kłosami przez 21 dni może w przypadku niektórych genotypów obniżyć liczbę regenerujących roślin bezchlorofilowych.
- Rodzaj zaproponowanych pożywek indukujących nie wpływał na poziom albinizmu w kulturach *in vitro*, jednakże w zasadniczy sposób podnosił ogólną efektywność regeneracji roślin.



# Rezultaty

Zbadanie interakcji pomiędzy genotypem i pożywką, wskazanie warunków środowiskowych sprzyjających podziałom mikrospor żyta - pożywki

Zastosowano 2 pożywki 190-2 i KBP. Dodanie gumy arabskiej do pożywki podnosiło liczbę zregenerowanych roślin. Wzbogacenie pożywki indukującej o tiosiarczan srebra (STS) lub trichostatynę A (TSA) nie wpływało na wydajność indukowania androgenyzy i poziom albinizmu w kulturach *in vitro*. Zastosowanie pożywki KBP nie zwiększyło wydajności regeneracji roślin w stosunku do pożywki 190-2



## Wpływ światła monochromatycznego na indukowanie androgenyzy

Tabela 4. Wpływ barwy światła na indukowanie androgenyzy u 5 genotypów żyta

Genotyp	8				5				7				B20				B14			
% kłosów które zareagowały	66,67	92,00	96,00	59,09	75,00	94,12	76,92	78,57	36,36	62,50	38,89	35,71	76,92	71,43	66,67	66,67	71,43	50,00	58,82	57,14
% pylników, które zareagowały	6,59	8,69	9,73	5,06	11,96	7,76	10,46	9,90	6,73	9,88	5,48	6,90	6,97	12,52	9,17	10,00	6,38	7,58	7,53	10,98

suma dla wszystkich 5 genotypów				
% kłosów, które zareagowały	66,67	76,14	69,41	59,04
% pylników, które zareagowały	7,70	9,14	8,42	8,40

Zastosowane trzy kolory światła monochromatycznego okazały się być skuteczne w indukowaniu androgenyzy z mikrospor. Indukowanie androgenyzy w ciemności jest mniej efektywne niż w obecności jednej z zastosowanych barw światła

Tabela 5. Wpływ barwy światła na regenerację roślin u 5 genotypów żyta

Genotyp	8				5				7				B20				B14			
% roślin regenerujących/szalka	2,19	2,11	1,74	1,46	4,12	3,61	3,79	2,61	0,20	1,29	0,69	0,56	2,78	6,25	4,80	2,77	3,57	4,77	6,09	4,46



średnia dla wszystkich 5 genotypów				
% roślin regenerujących/szalka	3,01	3,61	3,42	2,37

Wnioski: Wyniki badań wskazują na pozytywne oddziaływanie na regenerację roślin światła monochromatycznego w porównaniu do światła białego

# Rezultaty

## Morfologiczna i cytometryczna ocena poziomu płodności otrzymanych regenerantów.

Tabela 6. Poziom ploidalności roślin ze spontanicznie podwojoną liczbą chromosomów

poziom ploidalności	Genotyp		
	NS 10/4	NS 10/1	S01715/14b
haploidy	1(4,2%)	9 (11,8%)	9(56,2%)
diploidy	21 (87,5%)	66 (86,7%)	7(43,75%)
triploidy	1(4,1%)	1(2,3%)	0

Spowolniony wzrost i niski wigor dotyczył 5% ocenianych linii. Obserwowano rozpiętość w liczbie wytworzonych pędów (od 1 do 13, ale najczęściej było od 4 do 8), długości źdźbła (od 40 cm do 85 cm) oraz długości kłosów (od 5 do 11 cm). Kłosa różniły się kształtem, zbitością i ustawieniem w stosunku do źdźbła. Wszystkie rośliny wykłosiły się i wykazały częściową płodność. Efektywność zawiązywania ziarniaków wynosiła 20-70%. Liczba nasion w kłosie była wyższa na skutek wolnego przypylecia, a ziarniaki były większe i lepiej wypełnione.



## Ocena wpływu herbicydów antymitotycznych na podwajanie liczby chromosomów w kulturach *in vitro*

Tabela 7. Poziom ploidalności roślin (%) uzyskanych na skutek zastosowania różnych stężeń 2,4-D w pożywce indukującej

genotyp	stężenie 2,4-D w mg/L							
	0		0,5		2		4	
	DH	H	DH	H	DH	H	H	DH
<b>8</b>	67,9	32,1	72,5	27,5	65,6	34,4	67,2	37,8
<b>R</b>	63,2	36,8	68,8	31,2	75,7	24,3	68,8	31,2

Tabela 8. Poziom ploidalności roślin uzyskanych ze struktur androgenicznych genotypu 8 poddanych działaniu APM

APM			
50 $\mu$ M 48h		100 $\mu$ M 48h	
H %	DH %	H %	DH %
41,7	58,3	25,9	74,1



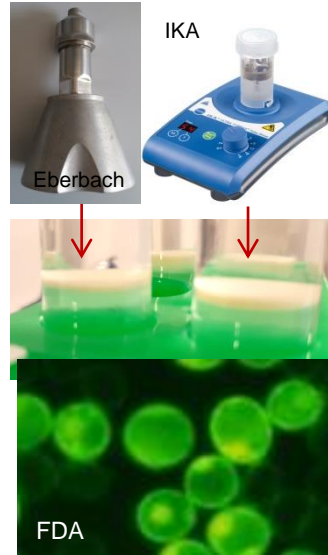
Wnioski: Zastosowane herbicydów : oryzaliny (5  $\mu$ M), trifluraliny(10 $\mu$ M) APM (50 i 100  $\mu$ M) oraz 2,4-D (tab. 7) w badanych reżimach czasowych na różnych etapach kultur *in vitro* nie zwiększało efektywności podwajania liczby chromosomów u regenerantów w stosunku do kontroli.



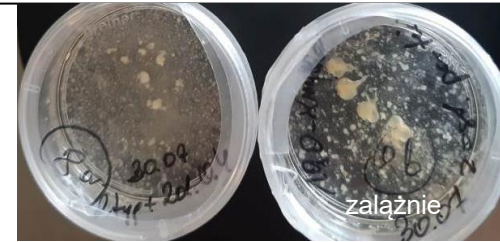
# Rezultaty

## Badania nad określeniem warunków indukowania podziałów komórkowych i rozwoju zarodków w kulturach izolowanych mikrospor (KIM) żyta.

Metoda izolacji przy pomocy plastikowych probówek homogenizacyjnych (IKA) rozbijających pylniki, umożliwiła wyizolowanie o ok. 40% mikrospor więcej (416 660- 691 667/kłós) w porównaniu do metalowego blendera (Eberbach) (250000-428000/kłós) uwalniającego mikrospory na skutek mechanicznego cięcia kłosów. Izolacja w probówkach IKA zmniejsza liczbę zakażeń w kulturze chociaż jest bardziej pracochłonna. Rodzaj zastosowanej metody izolacji nie miał wpływu na żywotność mikrospor.



Zastosowanie kultury „niałki” w formie załączni nie zwiększa efektywności indukcji androgenozy, ale przyspiesza ten proces



Zastosowanie na ścięte pędy z kłosami stresu obniżonej temperatury (4°C/2 tyg.) w połączeniu z inkubacją pylników w 4°C/4dni w roztworze mannitolu zwiększa efektywność indukcji embriogenezy w KIM prawie 3 krotnie (0,015% vs 0,45%) oraz efektywność regeneracji roślin dwukrotnie (9% vs 18%)

### Poszczególne etapy kultury na pożywce KBP w KIM żyta



Analizowane parametry: żywotność mikrospor (FDA), efektywność indukcji embriogenezy ( liczba struktur zarodkopodobnych/ liczba mikrospor w kulturze ) efektywność regeneracji (liczba struktur zarodkopodobnych przeniesionych na pożywkę regeneracyjną/liczba uzyskanych roślin )



# konkretne osiągnięcia projektu

1. Wyselekcjonowano linie o niespotykanej dotąd efektywności regeneracji podwojonych haploidów żyta. Linie te zostały przekazane hodowcom.
2. Ustalono optymalny dla żyta rodzaj stresu indukujący podziały mikrospor i regenerację podwojonych haploidów. Kłosa chłodzone w temp. 4°C przez 14 dni + pylniki w roztworze mannitolu w temp. 4°C przez 7 dni
3. Wyniki projektu są wdrażane w spółkach hodowlanych i stały się podstawą do przygotowania kolejnego projektu: „Przeniesienie zdolności do androgenezy z linii modelowych do linii hodowlanych żyta w oparciu o opracowane markery molekularne tej cechy”, który będzie realizowany od stycznia 2021 roku.
4. Dzięki odkryciu modelowego genotypu żyta dalsze badania nad kulturami *in vitro* będą mogły być prowadzone z pozytywnym skutkiem i dawać powtarzalne wyniki. W wyniku prowadzonych prac udało się wyselekcjonować takie modelowe genotypy żyta, które w sposób powtarzalny pozwalają na testowanie czynników determinujących androgenezę.
5. Opanowano metodę kultury izolowanych mikrospor żyta i zbadano czynniki sprzyjające tej kulturze.
6. Stwierdzono pozytywny wpływ światła monochromatycznego na kulturę pylnikowe żyta

# Wykaz publikacji wyników projektu

## doniesienia konferencyjne

Zimny J., Oleszczuk S., Makowska K., Androgeniza dla hodowli mieszańcowej żyta. XIII Ogólnopolska Konferencja Naukowa - Nauka Dla Hodowli i Nasiennictwa Roślin Uprawnych - Zakopane 30.01-3.02.2017r. Wykład.

Zimny J., Makowska K., Zimny A., Czaplicki A., Oleszczuk S. Highly efficient rye androgenesis – impact of genotype and various stress factors. 8th International 2017/13th Gatersleben Research Conference. EUCARPIA Cereals Section. Wykład

Zimny J., Makowska K., Zimny A., Czaplicki A., Oleszczuk S. 2017. Effect of stress factors and media composition on the appearance of albinism within androgenic rye regenerants. 2017/13th Gatersleben Research Conference. EUCARPIA Cereals Section

Zimny J., Indukowana embriogeneza u żyta – podsumowanie 35 lat badań, Induced rye embryogenesis - a summary of 35 years of research. XV Ogólnopolska Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin. Rogów. 2018. Wykład.

Zimny J., Makowska K., Zimny A., Czaplicki A., Sowa S., Oleszczuk S. Considerable progress in the induction of efficient rye androgenesis". Plant Genetics & Breeding Technologies IV: July 12-13, 2018 w Wiedniu.

Wykład.

Zimny J., Makowska K., Zimny A., Czaplicki A., Oleszczuk S. Czy możemy wpływać na pojawianie się albinotycznych regenerantów w trakcie androgenizacji żyta (*Secale cereale* L. 2019 XI Konferencja "Kultury in vitro w biotechnologii i fizjologii roślin. Kraków. Wykład

Zimny J., Oleszczuk S., Zimny A., Czaplicki A., Sowa S. Stress factors influencing androgenesis of rye.. 4th Edition of Global Conference on Plant Science and Molecular Biology, September 19-21, 2019 Londyn. Wykład

## publikacje

Zimny J., Michalski K. 2019. The development of rye (*Secale cereale* L.) in vitro culture techniques for biotechnology and crop improvement. ABC, Series Botanica 61/1: 7–15, 2019. DOI: 10.24425/abcsb.2019.127735 IF. 0,66, 40pkt MNiSW

Orłowska, R., Pachota, K.A., Machczyńska, J., Niedziela, A., Makowska, K., Zimny, J., Bednarek, P.T 2020 Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. Electronic Journal of Biotechnology 43, pp. 8-15  
<https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.11.001>

Zimny J., Oleszczuk S., Makowska K. 2021. Highly efficient androgenesis of Rye. W przygotowaniu.