

EWA DUBAS**KAMIL ZIELIŃSKI****MONIKA KRZEWSKA****IWONA ŻUR****ANNA NOWICKA****KATARZYNA JUZOŃ**Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* PAN w KrakowieKierownik Tematu: dr hab. Ewa Dubas Instytut Fizjologii Roślin im. *Franciszka Górskiego* PAN

w Krakowie, ul. Niezapominajek 21, 30-239 Kraków, tel. 12 4253301 wew. 39; sekretariat IFR PAN

tel. 12 4251833 wew. 102, e-mail: e.dubas@ifr-pan.edu.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.15.2018, Zadanie 84.

Identyfikacja czynników determinujących efektywność otrzymywania podwojonych haploidów żyta (*Secale cereale* L.) metodami androgenezy i krzyżowań oddalonych

Identification of factors determining the efficiency of doubled haploids production in rye (*Secale cereale* L.) through androgenesis and distant crosses

Słowa kluczowe: androgeneza, glutation, haploidy, krzyżowania oddalone, programowana śmierć komórki, żyto

Celem nadrzędnym proponowanego projektu było określenie przyczyn braku podatności oraz identyfikacja czynników warunkujących przełamanie barier haploidyacji żyta z wykorzystaniem dwóch metod: androgenezy w kulturach pylników i izolowanych mikrospor oraz krzyżowań oddalonych żyta z kukurydzą (*Secale cereale* L. ssp. *cereale* × *Zea mays* L.). Celami pośrednimi były: (1) wybór optymalnej metody indukcji haploidalnych zarodków żyta (androgenezy i/lub krzyżowań oddalonych), (2) ustalenie optymalnych warunków kiełkowania i regeneracji zarodków/kalusów dla uzyskania na drodze androgenezy i/lub krzyżowań oddalonych roślin diploidalnych (DH) żyta, (3) identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną produkcję DH żyta.

Wyznaczone cele realizowane były etapami:

- Temat badawczy 2015–2018: Ocena efektywności haploidyzacji żyta metodami androgenezy w kulturach pylników i izolowanych mikrospor oraz krzyżowań oddalonych z kukurydzą.
- Temat badawczy 2015–2016: Określenie odpowiedniej fazy rozwoju gametofitu oraz optymalizacja warunków indukcji haploidalnych zarodków żyta w wybranej w Zb1 metodzie.
- Temat badawczy 2016–2017: Optymalizacja warunków kiełkowania i regeneracji zarodków/kalusów dla uzyskania roślin diploidalnych (DH) żyta.
- Temat badawczy 2017–2018: Identyfikacja fizjologicznego podłoża warunkującego efektywną produkcję DH żyta.

Przeprowadzone badania nad haploidyzacją genomu wykonano na mieszańcach pokolenia F₁ (samopylnego oraz obcopylnego) żyta ozimego (*Secale cereale* L, ssp. *cereale*) udostępnionych przez polskie spółki hodowli roślin. Testowano metody: androgenezy w kulturach pylników i izolowanych mikrospor oraz krzyżowań oddalonych żyta z kukurydzą.

Scharakteryzowano testowane techniki haploidyzacji w indukcji zarodków (kultury pylnikowe, izolowanych mikrospor oraz krzyżowań oddalonych z kukurydzą) i wybrano najbardziej efektywną metodę. Na tej podstawie dokonano selekcji genotypów skrajnie zróżnicowanych pod względem podatności na haploidyzację, które wykorzystano następnie, jako obiekty modelowe w badaniu fizjologicznego podłoża indukcji i regeneracji DH żyta na dalszych etapach projektu. W ramach zadań badawczych określono: (1) optymalną fazę rozwoju gametofitu żeńskiego do indukcji haploidalnych zarodków żyta w metodzie krzyżowań oddalonych. Wykazano, że na efektywność metody krzyżowania oddalonego u żyta ma wpływ przede wszystkim genotyp, okres pomiędzy kastrowaniem a zapyłaniem (4 lub 6 dni) oraz rodzaj stosowanej auksyny (Marcinińska i in., 2018); (2) optymalną fazę rozwoju gametofitu męskiego do indukcji haploidalnych zarodków żyta w androgenezie. Wykazano wpływ genotypu roślin macierzystych i rodzaju wstępnego traktowania kłosów na żywotność oraz na średnią ilość poszczególnych typów komórek, będących w optymalnym stadium do zainicjowania androgenezy (w stadium jednojądrowym) oraz komórek inicjujących rozwój sporofitowy (po symetrycznym podziale) w dniu izolacji z kłosów; (3) warunki kiełkowania i regeneracji zarodków/kalusów dla uzyskania roślin diploidalnych (DH) żyta. Wykazano wpływ zastosowanej pożywki indukcyjnej i regeneracyjnej na efektywność androgenezy; (4) zidentyfikowano fizjologiczne podłoże warunkujące efektywną produkcję DH żyta. Wykazano, że na podatność na indukcję androgenezy ma wpływ endogenne stężenie glutationu w tkance wegetatywnej liścia flagowego i w pylnikach. Przedstawiono, na podstawie analizy aktywności enzymów szlaku glutationowego, jak aktywowany jest system antyoksydacyjny w pylnikach wyizolowanych z kłosów poddanych traktowaniu wstępnemu w odniesieniu do efektywności indukcji androgenezy i regeneracji.

Czynnikami, które bardzo często decydowały o przebiegu kultury w przedstawianych doświadczeniach były (1) genotyp rośliny macierzystej, (2) interakcja pomiędzy genotypem i traktowaniem wstępnym kłosów oraz (3) interakcja pomiędzy genotypem,

traktowaniem wstępnym kłosów oraz rodzajem zastosowanej pożywki indukcyjnej i regeneracyjnej. Wykazano, że genotypowe uwarunkowanie podatności na androgenezę zależy od wydajności system antyoksydacyjnego, w tym endogennego stężenia glutationu oraz aktywności badanych enzymów metabolizujących ten niskocząsteczkowy antyoksydant (Zieliński i in., 2017, 2018 a,b).

Zastosowane modyfikacje traktowania wstępnego kłosów (niska temperatura, stres osmotyczny, łagodzenie stresu oksydacyjnego łącznie z chemiczną modyfikacją aktywności enzymu metabolizującego glutation) podtrzymywały żywotność komórek oraz chroniły DNA jądrowe w mikrosporach przed fragmentacją (Zieliński i in., 2017, 2018c). Dodatkowo, optymalizacja składu pożywek na etapie indukcji (glutamina, arabinogalaktany, związki miedzi, węgiel aktywowany, phytigel) i regeneracji (arabinogalaktany, związki miedzi) istotnie wpłynęła na indukcję procesu androgenyzy oraz regenerację roślin DH żyta z uzyskanych struktur androgenicznych. Zaproponowane w projekcie warunki kultury *in vitro* (w kulturach pylników oraz izolowanych mikrospor) poskutkowały przełamaniem oporności/podniesieniem efektywności parametrów indukcji AS/SP i regeneracji R_{Total} u wszystkich linii. W przypadku kultur zawieszinowych mikrospor, istotnym okazało się zastosowanie inhibitorów PCD *in vitro*, co pozwoliło na przełamanie oporności u linii opornych i kilkukrotne podniesienie efektywności procesu indukcji androgenyzy u linii podatnej.

Analiza cytologiczna oraz molekularna, uzyskanych w kulturach pylników i izolowanych mikrospor zarodków, pozwoliła na częściowe znalezienie przyczyny niskiej efektywności procesu androgenyzy. Zilustrowano, że przyczyną nieprawidłowości rozwoju zarodków androgenicznych u żyta jest nie tylko fragmentacja DNA, ale także aktywność proteolityczna enzymów PCD, w tym kaspazy 1.

LITERATURA

- Marcińska I., Czyczyło-Mysza I., Skrzypek E., Warchoł M., Zieliński K., Dubas E. 2018. Obtaining of winter rye (*Secale cereale* L. *ssp. cereale*) haploid embryos through hybridization with maize (*Zea mays* L.). Cereal Research Communications 46 (3) DOI: 10.1556/0806.46.2018.029.
- Zieliński K., Nowicka A., Żur I., Krzewska M., Dubas E. 2017. Programowana śmierć komórki samobójczym zagrożeniem dla indukcji androgenyzy u żyta (*Secale cereale* L.). III Ogólnopolska konferencja doktorantów nauk o życiu BIOOPEN, Łódź, 11–12 maj 2017: 63 s.
- Zieliński K., Fodor J., Krzewska M., Nowicka A., Żur I., Dubas E. 2018 a. Glutationowa równowaga w indukcji androgenyzy u żyta (*Secale cereale* L.). IV Ogólnopolska konferencja doktorantów nauk o życiu BIOOPEN, Łódź, 24–25 maja 2018, p.: 85.
- Zieliński K., Krzewska M., Nowicka A., Żur I., Fodor J., Dubas E. 2018 b. Redox regulation of androgenesis in rye (*Secale cereale* L.). 11th International Conference ‘Plant Functioning Under Environmental Stress’, Krakow, 12–15 September 2018: 82 p.
- Zieliński K., Krzewska M., Nowicka A., Juzoń K., Żur I., Dubas E. 2018 c. Programmed cell death (PCD) and androgenesis induction in rye (*Secale cereale* L.). 11th International Conference ‘Plant Functioning Under Environmental Stress’, Krakow, 12–15 September 2018: 3.

