

## Zadanie 4

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

## Sprawozdanie merytoryczne 2024



Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego*  
PAN w Krakowie (IFR PAN)

Prof. dr hab. **Iwona Żur** ([i.zur@ifr-pan.edu.pl](mailto:i.zur@ifr-pan.edu.pl))

Dr hab. Ewa Dubas, prof. IFR PAN

Dr hab. Piotr Waligórski

Dr Przemysław Kopec

Dr Monika Krzewska



Katedra Genetyki i Hodowli Roślin  
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu (KGHR UP)

Dr hab. **Dorota Weigt**

Dr hab. Łukasz Wolko, prof. UP

Dr Sylwia Mikołajczyk

Mgr Katarzyna Szewczyk

## Tematy badawcze realizowane w roku 2024

### **T1: Zmiana poziomu metylacji/acetylacji genomu jako czynnik modyfikujący efektywność indukcji procesu EM pszenicy zwyczajnej**

Celem badań było określenie wpływu inhibitorów metylacji DNA i deacetylacji histonów na indukcję EM i regenerację roślin, a także monitorowanie zmian epigenetycznych zachodzących po aplikacji związków demetylujących/acetylujących. Zmiany epigenetyczne oszacowano poprzez ocenę efektywności EM w kulturach pylnikowych, jak również przez analizę ogólnego poziomu metylacji DNA i histonów. Porównano wzór metylacji miejsc promotorowych wybranych genów wpływających na indukcję EM w genotypach podatnych i opornych. Wykonano też analizę ekspresji genu *Ta-MET1*, który koduje enzym metyl-transferazę biorący udział w procesie metylacji DNA.

### **T2: Identyfikacja białek regulujących proces EM i regenerację roślin w kulturach *in vitro* pszenicy zwyczajnej (zadanie 1)**

Celem zadania było określenie wpływu wybranych substancji uczestniczących w regulacji rozwoju ELS na efektywność indukcji EM i regenerację roślin w kulturach *in vitro* pszenicy zwyczajnej. W badaniach testowano modyfikacje składu pożywki indukcyjnej poprzez dodatek substancji podtrzymujących żywotność komórek, stymulujących podziały komórkowe i różnicowanie oraz warunkujących prawidłową biogenezę chloroplastów i biosyntezę barwników chlorofilowych.

# Materiały i Metody

## Temat badawczy 1. Zmiana poziomu metylacji/acetylacji genomu jako czynnika modyfikującego efektywność indukcji procesu EM pszenicy zwyczajnej

**Materiał roślinny:** 2 linie pszenicy ozimej: mieszańcowa F<sub>1</sub> (**K20290**) i linia modelowa (**DH1/2**)

**Traktowanie wstępne:** kłosa 10-20 dni w 4 °C → izolacja pylników → inkubacja w pożywce ½ MS + **5 μmol/l** lub **7,5 μmol/l 5-azacytydyna (AZC)** lub **trichostatyna (TSA)**

### **Kultury pylnikowe**

**Indukcja:** płynna pożywka C17+90 g/l maltozy+50g/l Ficall 400+1 mg/l 2,4-D+i 1 mg/l Dikamba; 28 °C, ciemność

**Regeneracja:** pożywka MS +0,5 mg/l NAA+0,5 mg/l kinetyna; 24 °C, 16h/8 h (dzień/noc)

### **Analizy:**

- Efektywność indukcji EM (**ELS/100P**) i regeneracji roślin zielonych (**ZR/100P**)
- Analiza ogólnego poziomu metylacji DNA w pylnikach po inkubacji z AZA (HPLC)
- Analiza **ogólnego poziomu acetylacji histonów** w pylnikach po traktowaniu TSA (pomiar aktywności acetylotransferazy histonowej met. kolorymetryczną )
- Analiza **szczegółowego poziomu metylacji DNA** dla wybranych genów regulujących poziom metylacji i EM (TaHAG3, TaHAM, TaHAC1, TAHAC4, TaMET1) (PCR, sekwencjonowanie met. Sangera)
- Analiza poziomu ekspresji metylotransferazy DNA (Ta-MET1) w pylnikach po inkubacji z AZA (RT-PCR)

# Materiały i Metody

**Temat badawczy 2.** Identyfikacja białek regulujących proces EM i regenerację roślin w kulturach *in vitro* pszenicy zwyczajnej (zadanie 1)

**Materiał roślinny:** 4 linie pszenicy ozimej:

2 linie mieszańcowe F<sub>1</sub> (**K393**, **K20290**) i 2 linie modelowe (**PO19**, **PO20**)

**Kultury izolowanych mikrospor (KIM) i kultury pylnikowe (KP)**

**Traktowanie wstępne (NT+SeS+0.7M MAN):**

1. kłosa 7-14 dni w 4°C + 3 dni w 50 µM selenianu sodu w 4°C + 4 dni w 0,7 M mannitol w 20°C (KIM, KP)
2. kłosa 7-14 dni w 4°C + 3 dni w 50 µM selenianu sodu w 4°C + 4 dni w 0,7 M mannitol w 4°C (KIM, KP)
3. kłosa 7-14 dni w 4°C + 3 dni w 50 µM selenianu sodu w 4°C – izolacja pylników - 4 dni w 0,7 M mannitol w 4°C (KIM)

**Modyfikacje pożywki indukcyjnej:**

**mKBP1:** 1 mg/l tidiazuron (TDZ) (KIM) oraz 4 mg/l TDZ (KP)

**mKBP2** (kontrola) : 1 mg/l TDZ + 0,5 mg/l *trans* Zeatyna (*tZ*) (KIM) oraz 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l Dikamba i 4 mg/l *tZ* (KP)

**mKBP2 suplementowano dodatkowo:**

**mKBP3 i mKBP4:** 5 µmol/l i 10 µmol/l kwas 2-indol-3-yl-4-oxo-4-fenylomasłowy (**PEO-IAA**; antyauksyna)

**mKBP5 i mKBP6:** 50 µmol/l i 100 µmol/l melatonina (**MEL**)

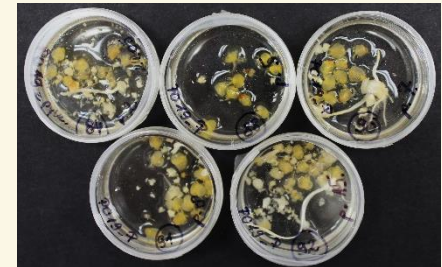
**mKBP7 i mKBP8:** 1 µmol/l i 2 µmol/l fitosulfokina α (**PSK-α**)

**mKBP9 i mKBP10:** 1 µmol/l i 2 µmol/l fluorek fenylometylosulfonylu (**PMSF**, inhibitor proteaz)

**mKBP11 i mKBP12:** 0,5 µmol/l i 1 µmol/l **E64** (inhibitor proteaz)

**mKBP13 i mKBP14:** 10 µmol/l i 60 µmol/l kwas γ-aminomasłowy (**GABA**)

**mKBP15:** 0,05% dimetylosulfotlenek (**DMSO**)



# Wyniki

## Temat badawczy 1. Efektywność indukcji EM i regeneracji roślin

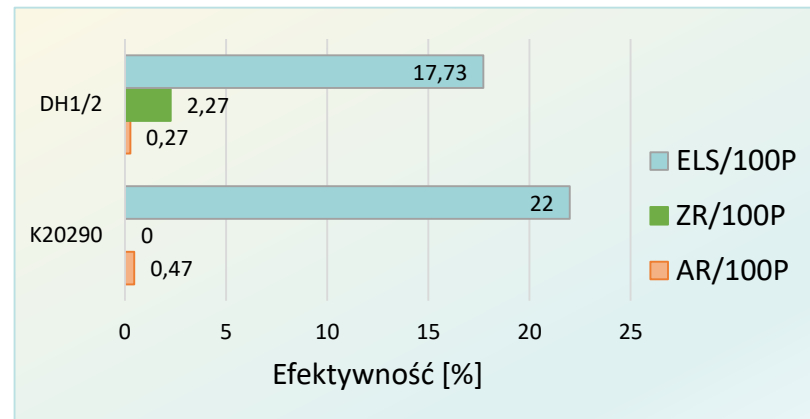
Efektywność indukcji EM wyniosła średnio 17,7 ELS i 22 ELS na 100 wyłożonych pylników, odpowiednio dla linii DH1/2 i K20290 (Ryc.1). Linia DH1/2 regenerowała średnio 2,3 ZR/100P. Linia oporna nie regenerowała roślin zielonych, uzyskano jedynie pojedyncze rośliny albinotyczne (0,5 AR/100P).

Dla linii DH1/2, najwyższą efektywność indukcji EM (40 ELS/100P) i regeneracji roślin zielonych (8 ZR/100P) uzyskano po inkubacji w pożywce bez dodatku inhibitorów metylacji DNA i deacetylacji histonów. Dla linii K20290, najwyższą efektywność indukcji EM (44 ELS/100P) uzyskano po dodatkowej stymulacji inhibitorem metylacji (5,0  $\mu\text{mol/l}$  AZC). Niestety, stymulujący wpływ AZC ograniczony był do indukcji EM, zregenerowały jedynie pojedyncze rośliny albinotyczne.

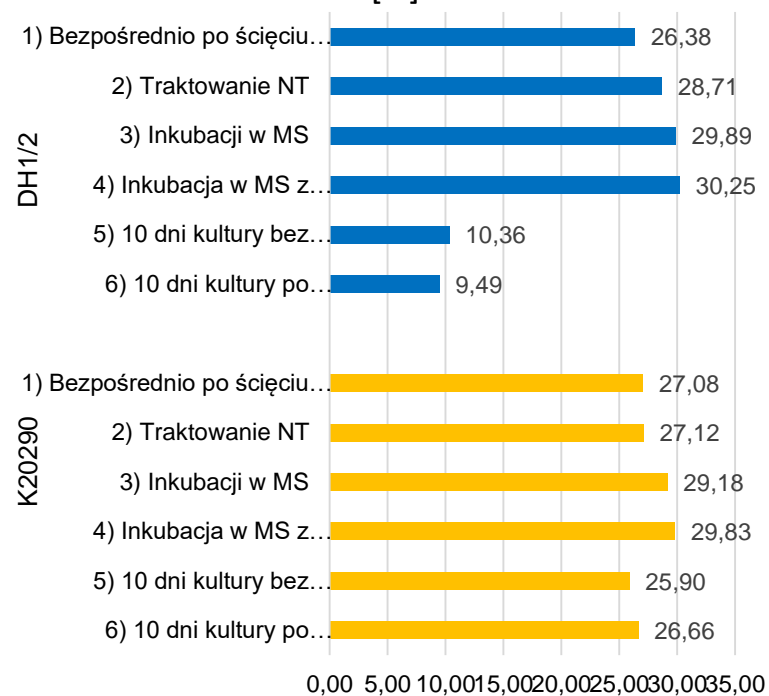
## Temat badawczy 1. Analiza ogólnego poziomu metylacji DNA.

Wykazano, iż zawartość cytydyny metylowanej zmienia się w trakcie procedury indukcji EM. Poziom metylacji DNA w pylnikach bezpośrednio po ścięciu kłosów był podobny u obu linii i wynosił 26-27% (Ryc. 2). Po traktowaniu niską temperaturą, parametr ten nieznacznie wzrastał, ale tylko u podatnej linii DH1/2. Dalszy wzrost ogólnego poziomu metylacji obserwowano u obu linii po inkubacji pylników w MS. Po 10 dniach kultury *in vitro* obserwowano znaczne obniżenie poziomu metylacji DNA, przy czym poziom metylacji cytozyny był trzykrotnie niższy w DNA izolowanym z pylników linii podatnej w porównaniu do odpornej.

Ryc.1. Efektywność indukcji EM [ELS/100P] i regeneracji roślin [ZR/100P, AR/100P]



Ryc.2. Udział cytydyny metylowanej w całkowitej [%]



### Temat badawczy 1. Analiza ogólnego poziomu acetylacji histonów

Analiza Western Blot potwierdziła obecność białek histonowych o masie 14-20,1 kDa. Wykazano znaczne zróżnicowanie w stężeniu białek, które wahało się od 0,7 mg/ml do 21,5 mg/ml. W chwili obecnej trwają analizy aktywności acetyltransferazy histonowej (HATs) w przygotowanym ekstrakcie białkowym.

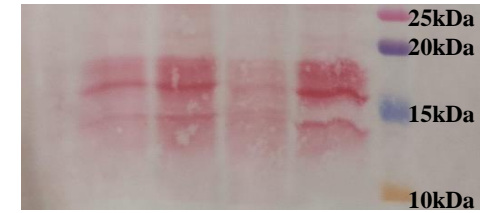
### Temat badawczy 1. Analiza szczegółowego poziomu metylacji DNA

Zaprojektowano po 6 par starterów PCR komplementarnych do sekwencji promotorowych 5 genów regulujących poziom metylacji (TaHAG3; TaHAM; TaHAC1; TaHAC4; TaMET1). Dobrano optymalne warunki PCR i startery specyficzne dla każdego z genów oraz zsekwencjonowano miejsca promotorowe. W celu określenia miejsc metylacji cytozyny, w wyizolowanym DNA wykonano selektywną deaminację cytozyny do uracylu, który podczas amplifikacji PCR jest konwertowany do tyminy. W chwili obecnej trwają prace mające na celu amplifikację konwertowanego DNA, zsekwencjonowanie otrzymanych produktów i analizę porównawczą sekwencji DNA niekonwertowanego z konwertowanym.

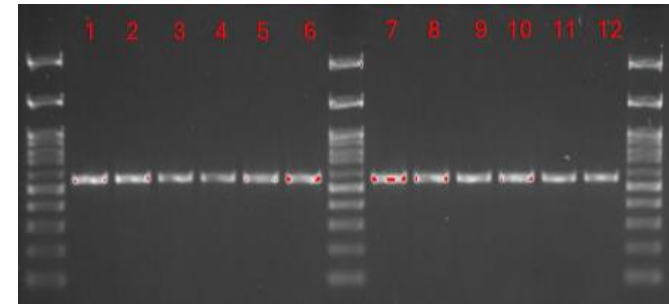
### Temat badawczy 1. Analiza poziomu ekspresji metylotransferazy DNA (Ta-MET1)

Analizę poziomu Ta-MET1 wykonano na 6 kolejnych etapach procedury indukcji EM. Wyizolowano RNA i wykonano konwersję do cDNA. Zaprojektowano 3 pary starterów do RT-PCR komplementarnych do sekwencji genu TaMET1 i specyficznych dla subgenomu A, B oraz D. Przeprowadzono walidację PCR w gradiencie temperaturowym dla badanych amplikonów oraz genów referencyjnych. Trwają prace mające na celu wykonanie RT-PCR i porównanie specyficznych produktów amplifikacji.

Ryc.3. Białka histonowe o masie cząsteczkowej 14-20,1 kDa

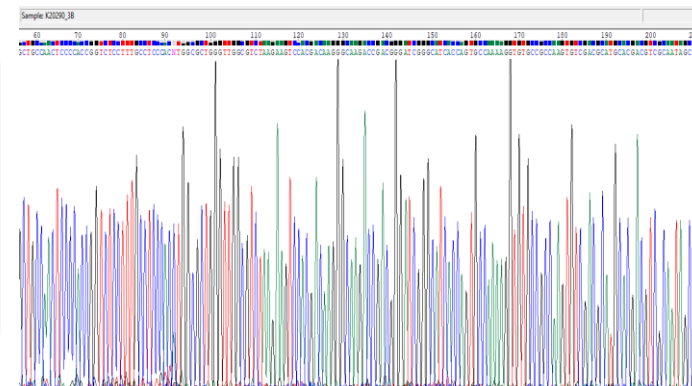


Ryc. 4. Markery otrzymane po amplifikacji miejsca promotorowego genu 1\_2ATaHAG3 przygotowane do sekwencjonowania.



1-6 – linia K20290; 8-12 – linia DH1/2

Ryc. 5. Przykładowy odczyt sekwencji DNA niekonwertowanego (metoda Sanger).



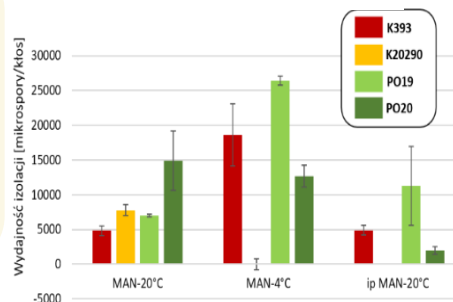
1. Zawiesiny mikrospor uzyskane wg. wstępnie stosowanej procedury charakteryzowała niska wydajność izolacji (Ryc.6A) i żywotność mikrospor (Ryc.6B) oraz niska efektywność EM (0-40 ELS/ 100 000 ( $10^5$ ) mikrospor). Rośliny zielone uzyskano tylko u linii PO19 na pożywce mKBP15 z 0,05% DMSO (1,1 ZR/  $10^5$  mikrospor; Ryc. 7).

**Ryc.7.** Efektywność EM w KIM zakładanych wg. wstępnej procedury indukcji EM (NT+SeS+MAN 20°C)

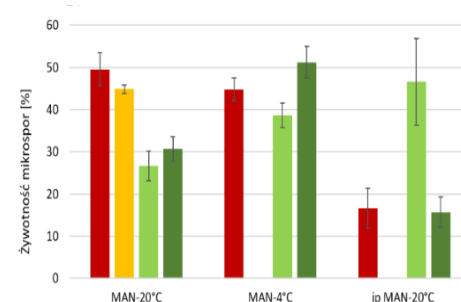
Linia	Indukcja (0d)	Indukcja (21d)	Indukcja (42d)	Regeneracja	Efektywność EM
K393					mKBP2: 11 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 4,8 AR/ $10^5$ mks mKBP4: 1 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks mKBP5: 3,3 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks
K20290					mKBP5: 10 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks mKBP12: 1 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks mKBP13: 3,3 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks mKBP14: 3,3 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks
PO19					mKBP5: 8 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks mKBP7: 12,6 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks mKBP8: 22,9 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks mKBP15: 40 ELS/ $10^5$ mks; 1,1 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks
PO20					mKBP3: 9 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks mKBP4: 9 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks mKBP15: 9 ELS/ $10^5$ mks; 0 ZR/ $10^5$ mks; 0 AR/ $10^5$ mks

2. Obniżenie temp. z 20°C do 4°C w trakcie traktowania manniolem podniosło wydajność izolacji (Fig.6A) ale nie poprawiło żywotności mikrospor (Fig.6B) ani efektywności EM.  
3. Wyraźny wzrost efektywności EM uzyskano poprzez traktowanie manniolem uprzednio wyizolowanych pylników (Ryc.8). Poprawę indukcji uzyskano na pożywce kontrolnej mKBP2. Dla odpornej linii K393 uzyskano również wzrost efektywności regeneracji roślin zielonych

**Ryc.6a.** Wydajność izolacji



**Ryc.6b.** Żywotność mikrospor [%]



**Ryc.8.** Efektywność EM w KIM zakładanych wg. zmodyfikowanej procedury (NT+SeS → izolacja pylników → MAN 20°C)

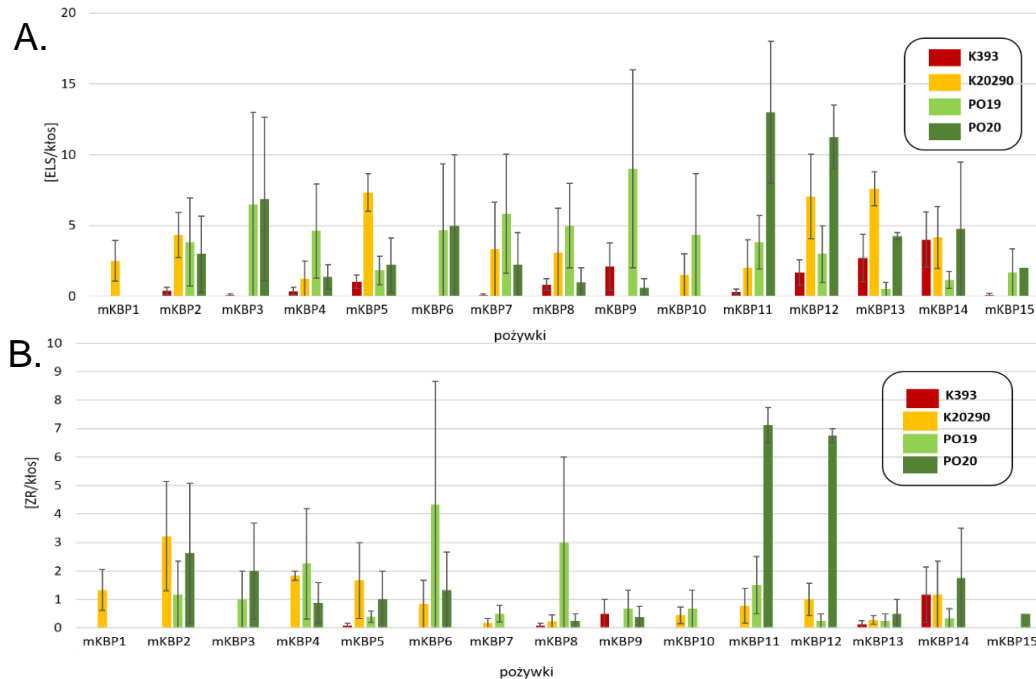
Linia	Indukcja (0d)	Indukcja (21 d)	Indukcja (42d)	Regeneracja	Efektywność EM
K393					mKBP2: 15 ELS/ $10^5$ mks 4,1 ZR/ $10^5$ mks 1,4 AR/ $10^5$ mks
					mKBP5: 4,1 ELS/ $10^5$ mks 1,4 ZR/ $10^5$ mks 0 AR/ $10^5$ mks
PO19					mKBP2: 62,9 ELS/ $10^5$ mks 0 ZR/ $10^5$ mks 0 AR/ $10^5$ mks
					mKBP5: 11,3 ELS/ $10^5$ mks 0 ZR/ $10^5$ mks 0 AR/ $10^5$ mks
PO20					mKBP2: 10 ELS/ $10^5$ mks 0 ZR/ $10^5$ mks 0 AR/ $10^5$ mks
					mKBP5: 10 ELS/ $10^5$ mks 0 ZR/ $10^5$ mks 0 AR/ $10^5$ mks

## Temat badawczy 2. Kultury pylnikowe

W kulturach pylnikowych zakładanych wg. wstępnie stosowanej procedury uzyskano średnio od 0 do 13 ELS/kłós (Ryc. 9A). W kulturach linii K393 i K20290 najwyższą efektywność indukcji EM uzyskano na pożywkach mKBP13 i mKBP14 zawierających 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l Dikamba, 4 mg/l tZ oraz odpowiednio 10 i 60  $\mu\text{mol/l}$  GABA. Dla obu bardziej podatnych linii PO19 i PO20 zaobserwowano korzystny wpływ antyauksyny (5  $\mu\text{mol/l}$  PEO-IAA; mKBP3) oraz inhibitorów proteaz – 1  $\mu\text{mol/l}$  PMSF dla PO19 (mKBP9) i 0,5 – 1  $\mu\text{mol/l}$  E64 (mKBP11, mKBP12) dla PO20. Efektywność regeneracji roślin zielonych wyniosła od 0 do 7,1 ZR/kłós (Ryc. 9B), nie wykazano wpływu rodzaju pożywki indukcyjnej.

Obniżenie temperatury (z 20°C do 4°C) w trakcie traktowania kłósów mannitolem stymulowało rozwój ELS i regenerację roślin zielonych. Uzyskano od 5 do 24 ELS/kłós oraz od 2 do 13 ZR/kłós. W przypadku linii opornych K3939 i K20290, najlepsze rezultaty osiągnięto przy zastosowaniu 60  $\mu\text{mol/l}$  GABA (mKBP14). Dla linii bardziej podatnych najlepsze wyniki uzyskano pod wpływem 100  $\mu\text{mol/l}$  MEL (mKBP6) dla PO19 i 0,5  $\mu\text{mol/l}$  E64 (mKBP11) dla PO20 (Ryc. 10).

**Ryc.9.** Efektywność indukcji EM (A) i regeneracji roślin zielonych (B) w KP zakładanych wg. zmodyfikowanej procedury (NT+SeS → izolacja pylników → MAN 20°C)



**Ryc.10.** Efektywność EM w KP wg. zmodyfikowanej procedury (NT+SeS → izolacja pylników → MAN 20°C)

Linia	Indukcja	Regeneracja	Indukcja	Regeneracja
K393				
	mKBP9 10,5 ELS/kłós; 3 ZR/kłós; 0 AR/kłós		mKBP14 12 ELS/kłós; 6 ZR/kłós; 0 AR/kłós	
K20290				
	mKBP2 7,5 ELS/kłós; 7 ZR/kłós; 0,5 AR/kłós		mKBP14 7,5 ELS/kłós; 3,5 ZR/kłós; 0,5 AR/kłós	
PO19				
	mKBP4 14,5 ELS/kłós; 8 ZR/kłós; 1 AR/kłós		mKBP6 14 ELS/kłós; 13 ZR/kłós; 0,5 AR/kłós	
PO20				
	mKBP3 24 ELS/kłós; 7 ZR/kłós; 0 AR/kłós		mKBP11 8 ELS/kłós; 7,8 ZR/kłós; 0 AR/kłós	



## Podsumowanie

1. Uzyskano poprawę efektywności EM: (1) w kulturach izolowanych mikrospor poprzez wprowadzenie traktowania mannitolem izolowanych pylników (4 dni w 20°C); (2) w kulturach pylnikowych poprzez zastosowanie niskiej temperatury (4°C) w trakcie traktowania kłosów mannitolem i modyfikację składu hormonalnego pożywki (1 mg/l 2,4-D + 1 mg/l Dikamba + 4 mg/l tZ). Wykazano możliwość dalszej optymalizacji procedury indukcji EM u pszenicy ozimej. W zależności od zastosowanej metody kultury *in vitro*, procedury wstępnego traktowania kłosów i cech genotypowych roślin macierzystych korzystny wpływ na przebieg EM wykazały: GABA, MEL, PSK- $\alpha$  i DMSO.
2. Potwierdzono pozytywny wpływ inhibitora metylacji (5,0  $\mu\text{mol/l}$  AZC) na efektywność indukcji EM u odpornej linii mieszańcowej K20290. Niestety, nie uzyskano regeneracji roślin zielonych.
3. Wykazano, iż poziom metylacji DNA ulegał istotnym zmianom w trakcie indukcji procesu EM. Po początkowym wzroście, poziom metylacji cytozyny spadł po 10 dniach kultury *in vitro* izolowanych pylników i był 3-krotnie niższy w DNA izolowanym z pylników linii podatnej DH1/2 w porównaniu do linii odpornej K20290.
4. Trwają analizy ogólnego poziomu acetylacji histonów, szczegółowego poziomu metylacji DNA i poziomu ekspresji metylotransferazy DNA. Ich podsumowanie pozwoli na wyciągnięcie bardziej szczegółowych wniosków. Zakończenie analiz przewidziane jest na koniec roku 2024.

# Miernik zadania – stopień realizacji

lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
<b>temat badawczy 1</b>				
	Analiza wpływu inhibitorów <u>metylacji</u> na efektywność EM	8	8	0,83
	Analiza ogólnego poziomu <u>metylacji</u> DNA/ <u>acetylacji</u> histonów	24	0,8x24	
	Analiza szczegółowego poziomu <u>metylacji</u> DNA	12	0,8x12	
	Analiza poziomu ekspresji Ta-MET1 (DNA METHYLTRANSFERASE)	12	0,8x12	
<b>temat badawczy 2</b>				
	8 modyfikacji pożywki indukcyjnej x 2 stężenia aplikowanych substancji x 4 linie pszenicy ozimej	64	64	1,00
<b>ŚREDNIA</b>				0,92
<b>% REALIZACJI ZADANIA</b>				92%

## Doniesienia konferencyjne:

1. XXXV Konferencja Embriologicznej Rośliny- Zwierzęta- Człowiek, 20-23.05.2024, Katowice (poster)
2. XVI Ogólnopolska Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin PTB pt. „Biotechnologia i Kultury In Vitro Roślin w Badaniach Podstawowych i Aplikacyjnych”, 23-25.09.2024, Kraków (prezentacja ustna, poster)

## Publikacja:

1. Dubas i wsp. “New prospects for improving microspore embryogenesis induction in highly recalcitrant winter wheat lines” Plants 13;363. <https://doi.org/10.3390/plants13030363>