

Zadanie 4

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

Sprawozdanie merytoryczne 2025



Instytut Fizjologii Roślin *im. Franciszka Górskiego*
PAN w Krakowie

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

Dr hab. Ewa Dubas, prof. IFR PAN

Dr Przemysław Kopec

Dr Monika Krzewska



Katedra Genetyki i Hodowli Roślin
Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu

Dr hab. **Dorota Weigt**, prof. UP

Prof. dr hab. Idzi Siatkowski

Dr hab. Łukasz Wolko, prof. UP

Dr Sylwia Mikołajczyk

Mgr Katarzyna Szewczyk

Tematy badawcze realizowane w roku 2025

Temat bad.1: Identyfikacja białek regulujących proces embriogenezy mikrospor (EM) i regenerację roślin w kulturach *in vitro* pszenicy zwyczajnej.

Celem tematu badawczego 1 było określenie poziomu akumulacji białek: DEHYDROGENAZY (DHRS1), S-TRANSFERAZY GLUTATIONU (GST), PEROKSYDAZY GLUTATIONOWEJ (GPX), SELENIUM BINDING PROTEIN (SELENBP56), OXYGEN-EVOLVING COMPLEX(OEC) i SYNTAZY KATALAZY (CalS12) zidentyfikowanych na podstawie wcześniejszych badań własnych oraz danych literaturowych, jako zaangażowane w regulację procesu EM. Porównanie poziomu tych białek na kolejnych etapach indukcji procesu EM u linii hodowlanych pszenicy ozimej pozwoliło na identyfikację mechanizmów istotnych dla prawidłowego przebiegu odróżnicowania i zmiany kierunku rozwoju mikrospor.

Temat bad.2: Identyfikacja genów markerowych determinujących efektywność indukcji EM pszenicy zwyczajnej.

Celem tematu badawczego 2 była identyfikacja genów markerowych EM, wybranych na podstawie danych literaturowych oraz wyników własnych, lokalizacja ortologów tych genów w genomie pszenicy zwyczajnej, a następnie określenie poziomu ich ekspresji w pylnikach pszenicy ozimej pobieranych na kolejnych etapach kultur pylnikowych. Porównanie poziomu ekspresji tych genów w pylnikach genotypów podatnych oraz opornych, a następnie korelacja pozyskanych wyników z efektywnością indukcji EM i zdolnością do regeneracji roślin zielonych pozwoli na wskazanie genów markerowych istotnych dla prawidłowego przebiegu odróżnicowania i zmiany kierunku rozwoju mikrospor.

Materiały i Metody

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

Materiał roślinny: 2 linie pszenicy ozimej:
linia mieszańcowa F₁ **K393**, linia modelowa **PO19**

Kultury pylnikowe (KP)

1. Traktowanie wstępne (NT+SeS+0.7M MAN):

Ścięte kłosa umieszczano w wodzie w 4°C (NT) na 4-14 dni a następnie przenoszono do roztworu 50 µM selenianu sodu (SeS) na 3 dni w 4°C. Po dezynfekcji, z kłosów izolowano pylniki i umieszczano w 0,7 M mannitolu (MAN) w 20°C na 4 dni.

2. Indukcja

Pylniki przenoszono do pożywki C17 zawierającej 90 g/l maltozy, 100 g/l Ficollu 400, 1 mg/l 2,4-D, 1 mg/l Dikamby (DIC) i 4 mg/l trans Zeatyny. Kultury umieszczano w ciemności, w 25°C.

3. Regeneracja

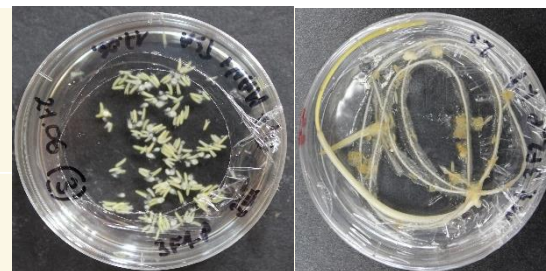
Struktury zarodkopodobne (ELS) o rozmiarach > 1 mm pasażowano na pożywki regeneracyjne: KBP4P (2 tyg.), a następnie K4NB (Kumlehn i wsp. 2006) i umieszczano w 26°C na świetle o natężeniu 30 µmol·m⁻²·s⁻¹ przez pierwszy tydzień, a następnie 80–100 µmol·m⁻²·s⁻¹, przy fotoperiodzie 16/8 h (dzień/noc).

Pobieranie prób materiału roślinnego (pylniki)

Pylniki do analiz pobierano na kolejnych etapach indukcji, z kłosów: świeżo ściętych (kontrola, K), po traktowaniu NT, po traktowaniu NT+SeS, po traktowaniu NT+SeS+MAN.

Analiza białek

Poziom białek analizowano metodą Western blot po uprzedniej ekstrakcji w buforze potasowo-fosforanowym (0.1 M KH₂PO₄/Na₂HPO₄) o pH=7,5 zawierającym 3mM EDTA.



Materiały i Metody

Temat badawczy 2: Identyfikacja genów markerowych determinujących efektywność indukcji EM pszenicy zwyczajnej.

Materiał roślinny: 4 linie pszenicy ozimej:

oporne - linie mieszańcowe F₁ **K20290** i **K393**, **podatne**: linie **DH1/2** i **PO19**

- **Traktowanie wstępne inhibitorami metylacji/acetylacji (IM: MS+AZC; MS+TSA):** kłosa 10-20 dni w 4 °C → izolacja pylników → inkubacja w pożywce ½ MS z dodatkiem **5-azacytydyny (AZC)** lub **trichostatyny (TSA)** w stężeniach **5,0 μmol·dm⁻³ przez 2 dni** oraz **2,5 μmol·dm⁻³ przez 7 dni**;
- **Traktowanie wstępne (SeS+MAN):** źdźbła 10-20 dni w 4 °C → traktowanie roztworem **50 μmol·dm⁻³ selenianu sodu (NT+SeS)** przez 3 dni w 4°C → izolacja pylników → inkubacja w **0,7 μmol·dm⁻³ mannitolu (SeS+MAN)** przez 4 dni w 20°C lub w 4°C.

Kultury pylnikowe

Indukcja: płynna pożywka C17 + 90 g/l maltozy + 50g/l Ficoll 400 + 1 mg/l 2,4-D+ 1 mg/l Dikamby; 28 °C, ciemność.

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

Pobieranie prób z materiału roślinnego do badań ekspresji genów:

Pylniki pobierano w 4 punktach czasowych doświadczenia prowadzonego w kulturach *in vitro* (po traktowaniu TSA 5,0 μmol·dm⁻³ przez 2 dni): **(1) ze świeżo ściętych kłosów; (2) po traktowaniu NT; (3) traktowane NT+1/2 MS+IM; (4) po 10 dniach kultury ½ MS+IM.**

Analizy:

- Efektywność indukcji EM i tworzenia struktur embriogennych (**SE/100P**);
- Efektywność regeneracji roślin zielonych (**ZR/100P**);
- Frekwencja roślin zielonych (**FZR**) wśród wszystkich zregenerowanych roślin [%];
- **Analiza poziomu ekspresji** wybranych genów regulujących EM (TaHAG3, TaHAM, TaHAC1, TAHAC4, TaMET1) w pylnikach po inkubacji z TSA. Analizy wykonywano metodą: RT-PCR; RT-qPCR.

1. Rośliny macierzyste rosnące w warunkach polowych

Analizy Western blot

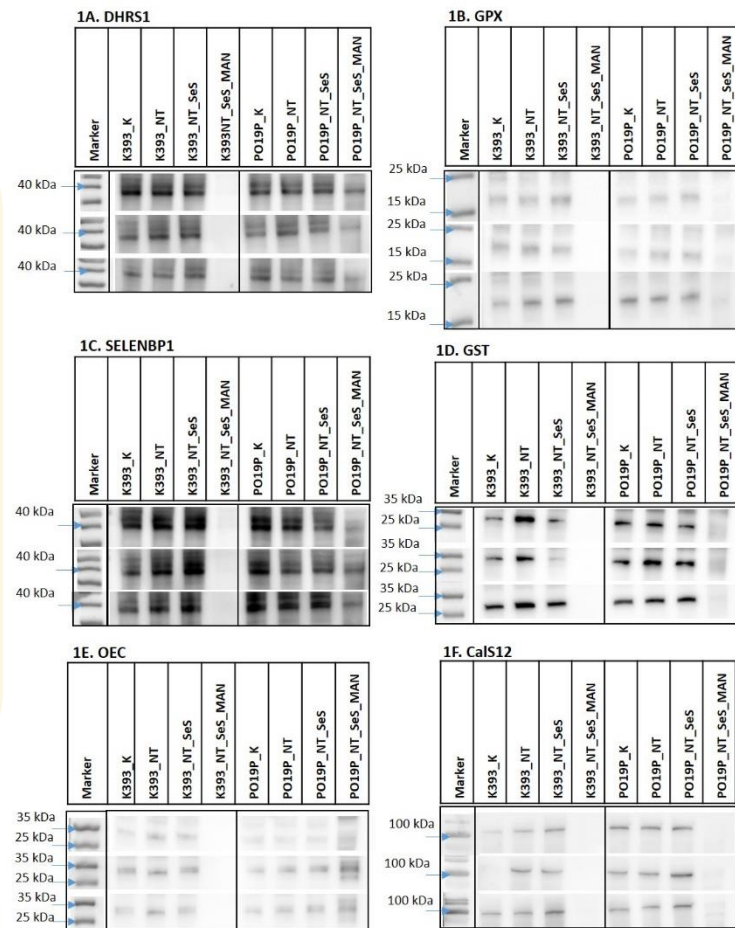
U obu linii poziom **DHRS1**, **GPX** oraz białka związanego z przeciwciałem **Anti-CalS12** były stabilne w trakcie traktowań NT i NT+SeS i wyraźnie spadły po traktowaniu mannitolem (NT+SeS+MAN) (Ryc.1A, B, F).

Poziom **SELENBP1** u K393 pozostawał nie zmieniony po traktowaniu NT, wzrósł po NT+SeS i drastycznie spadł po NT+SeS+MAN (Ryc. 1C). U PO19 poziom tego białka spadł po traktowaniach NT i NT+SeS+MAN. Poziom **GST1** u K393 wzrósł po traktowaniu NT, a następnie spadł po NT+SeS i NT+SeS+MAN (Ryc.1D). U PO19 poziom GST1 był stabilny po traktowaniach NT i NT+SeS, poczym spadł po NT+SeS+MAN. Poziom **OEC** u K393 spadł na ostatnim etapie indukcji EM, po traktowaniu mannitolem (NT+SeS+MAN). U PO19 poziom OEC nie uległ zmianie w trakcie całego procesu indukcji EM (Ryc.1E).

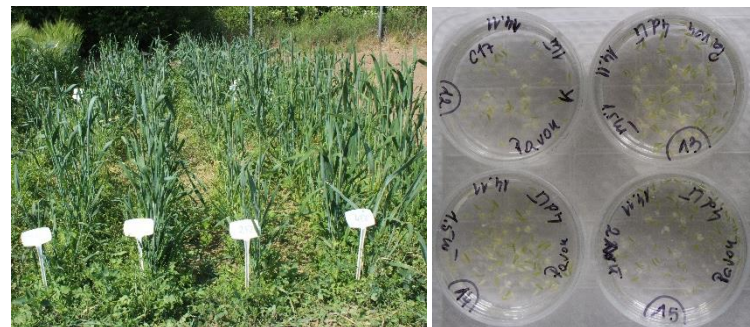
Kultury *in vitro*

Najwyższą efektywność indukcji EM (1-6,3 ELS/kłós dla K393 (śr. 3,8 ELS/kłós) oraz 1,7-2 ELS/kłós dla PO19 (śr. 1,8 ELS/kłós)) uzyskano w kulturach pylników pobieranych z kłosów kontrolnych. Dla K393, ELS uzyskano również w pojedynczych przypadkach po traktowaniu NT (1,7 ELS/kłós) i NT+SeS (2,3 ELS/kłós).

Efektywność regeneracji roślin zielonych (ZR) w kulturach pylników pobieranych z kłosów świeżo ściętych wynosiła 0,3-3,3 ZR/kłós (śr. 1,9 ZR/kłós) dla K393 oraz 0-0,5 ZR/kłós (śr. 0,2 ZR/kłós) dla PO19. Efektywność regeneracji po traktowaniu NT wyniosła 0,7 ZR/kłós. Nie uzyskano regeneracji po traktowaniu NT+SeS.



Ryc.1. Poziom analizowanych białek w pylnikach 2 linii pszenicy ozimej (K393, PO19) w trakcie indukcji EM (warunki polowe)



2. Rośliny macierzyste rosnące w warunkach szklarniowych

Analizy Western blot

Poziom **DHRS1** u K393 wzrósł po traktowaniu NT i NT+SeS, po czym spadł po NT+SeS+MAN (Ryc.2A). U PO19, poziom DHRS1 pozostawał stabilny w trakcie traktowań NT i NT+SeS, po czym spadł po traktowaniu NT+SeS+MAN.

Poziom **GPX** u K393 spadł po traktowaniu NT, wzrósł po traktowaniu NT+SeS po czym ponownie spadł po NT+SeS+MAN (Ryc.2B). U PO19 poziom GPX nie uległ zmianie po traktowaniu NT, wzrósł po traktowaniu NT+SeS i bardzo wyraźnie spadł po NT+SeS+MAN.

Poziom **SELENBP1** u K393 nie uległ zmianie po traktowaniu NT, wzrósł po traktowaniu NT+SeS i bardzo wyraźnie spadł po traktowaniu NT+SeS+MAN (Ryc.2C). U PO19 poziom SELENBP1 był stabilny do momentu traktowania NT+SeS+MAN, które wywołało wyraźny spadek zawartości tego białka.

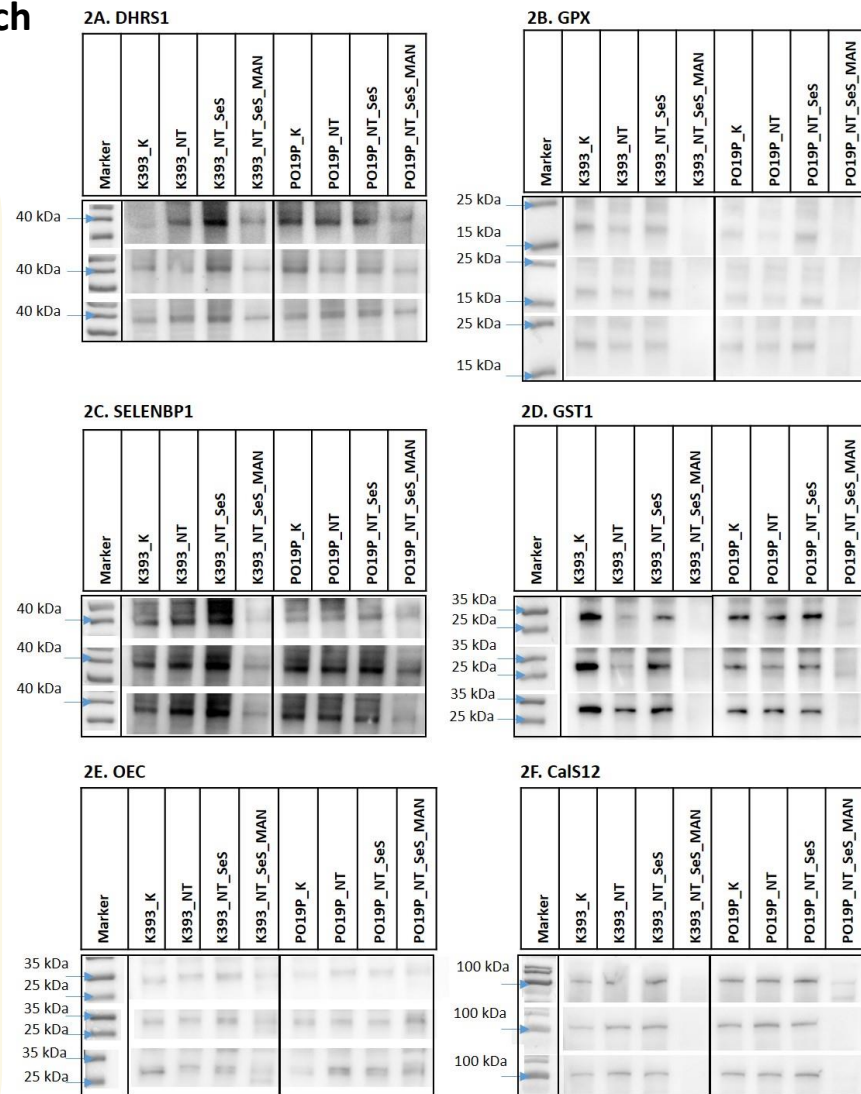
Wysoki poziom **GST1** u K393 spadł wyraźnie po traktowaniu NT, wzrósł po NT+SeS i znacząco spadł po NT+SeS+MAN (Ryc. 2D). U PO19 poziom GST1 pozostawał nie zmieniony do traktowania mannitolem (NT+SeS+MAN), które znacząco obniżyło zawartość tego białka.

U obu linii, zawartość OEC nie uległa istotnym zmianom w trakcie indukcji procesu EM (Ryc. 2E).

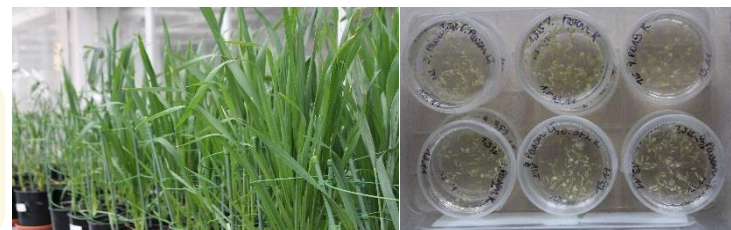
U obu linii, poziom białka będącego produktem reakcji z przeciwciałem **Anti-Cals12** nie uległ zmianom do etapu traktowania mannitolem (NT+SeS+MAN), które znacząco obniżyło zawartość tego białka (Ryc. 2F)

Kultury *in vitro*

Eksperyment w toku. Efektywność EM zostanie oszacowana po ok. 6-8 tyg. od momentu założenia kultur (pod koniec grudnia 2026)



Ryc.2. Poziom analizowanych białek w pylnikach 2 linii pszenicy ozimej (K393, PO19) w trakcie indukcji EM (warunki szklarniowe)



Temat badawczy 2. Identyfikacja genów markerowych determinujących efektywność indukcji EM pszenicy zwyczajnej

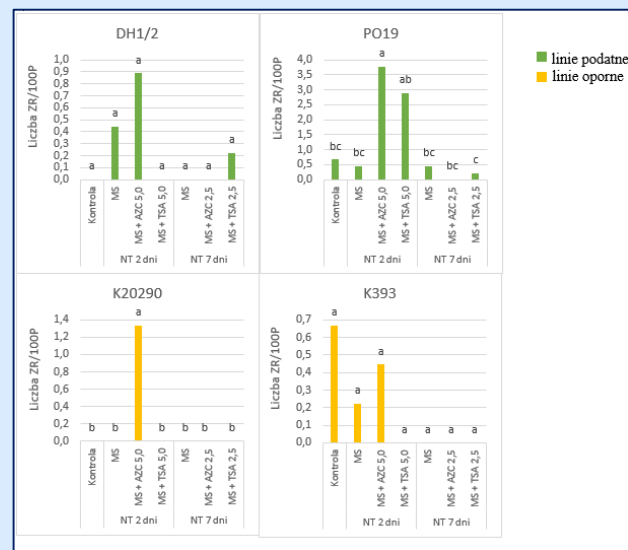
Kultury *in vitro*

Modyfikacje epigenetyczne silnie wpływały na przebieg ME, a inhibitory metylacji DNA (AZC) oraz deacetylacji histonów (TSA) wyraźnie zwiększały liczbę SE, jednak ich działanie różniło się w zależności od genotypu rośliny macierzystej i parametrów traktowania:

- AZC zwiększała indukcję SE i regenerację ZR, zwłaszcza po krótkotrwałym traktowaniu niską temperaturą (2-dni, 5,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (Ryc. 3, 4). Jednocześnie wyraźnie podnosiła FZR wśród wszystkich regenerantów, ograniczając udział form albinotycznych. Oznacza to, że przy odpowiednio dobranych warunkach AZC może wspierać zarówno proces indukcji ME, jak i jakość regeneracji, choć efekty te pozostają zależne od genotypu.
- TSA zwiększała liczbę SE, przy czym jej działanie zależało zarówno od długości traktowania niską temperaturą, jak i od genotypu — po krótkim traktowaniu NT (2 dni) najsilniej stymulowała linie podatne, natomiast po wydłużonym NT (7 dni) poprawiała reakcję linii opornych (Ryc. 3, 4). Jednocześnie TSA nie wspierała regeneracji roślin zielonych (ZR) i w większości przypadków prowadziła do wysokiego udziału form albinotycznych, co ogranicza jej użyteczność w etapach regeneracyjnych mimo korzystnego wpływu na samą indukcję ME.

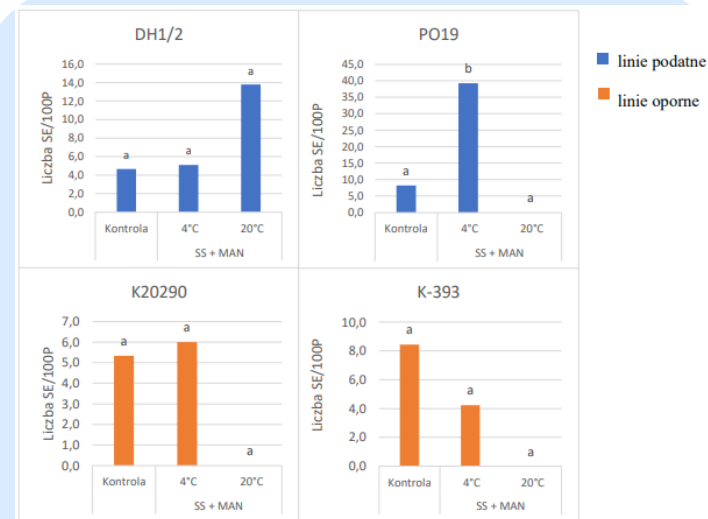


Ryc.3. Wpływ IM (AZC; TSA) i ich stężenia (0; 2,5 i 5,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) na efektywność tworzenia struktur embriogennych (SE) w kulturach pylnikowych badanych linii pszenicy ozimej: DH1/2; PO19; K20290; K393. NT – traktowanie niską temperaturą.



Ryc.4. Wpływ IM (AZC; TSA) i ich stężenia (0; 2,5 i 5,0 $\mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) na efektywność regeneracji zielonych roślin (ZR) w kulturach pylnikowych badanych linii pszenicy ozimej: DH1/2; PO19; K20290; K393. NT – traktowanie niską temperaturą

- Efekt traktowania selenianem sodu (SeS) w połączeniu z mannitolem (MAN) był silnie uwarunkowany genotypowo. Traktowanie SeS + MAN w 4°C istotnie zwiększyło liczbę SE w kulturach pylnikowych linii PO19, podczas gdy efektywność indukcji EM dla pozostałych linii była niska (Ryc.5). Traktowanie SeS+MAN w 20°C zainicjowało proces EM wyłącznie w kulturach pylnikowych linii DH1/2.
- Regeneracja ZR zachodziła tylko w kulturach pylnikowych linii podatnych, głównie u DH1/2 (Ryc.6). Traktowanie SeS + MAN obniżało FZR u linii PO19 i K393, co wskazuje, że mimo korzystnego działania w zakresie indukcji EM u wybranych linii, traktowanie to może niekorzystnie wpływać na regenerację roślin, zwłaszcza w materiale o słabszej odpowiedzi embriogenicznej.
- Tendencja do regeneracji roślin albinotycznych była warunkowana genotypowo. Dla linii DH1/2 otrzymano 100% ZR bez względu na zastosowane traktowania, podczas gdy linie PO19, K20290 i K-393 wykazywały tendencję do tworzenia form albinotycznych, szczególnie po dłuższej ekspozycji na NT+TSA lub SS+MAN.



Ryc.5. Wpływ selenianu sodu (SeS) i mannitolu (MAN) na efektywność tworzenia struktur embriogennych (SE) w kulturach pylnikowych badanych linii pszenicy ozimej: DH1/2; PO19; K20290; K393.



Ryc.6. Wpływ selenianu sodu (SeS) i mannitolu (MAN) na efektywność regeneracji zielonych roślin (ZR) w kulturach pylnikowych badanych linii pszenicy ozimej: DH1/2; PO19; K20290; K393.

Podsumowanie i Wnioski

Temat bad. 1.

Większość zastosowanych przeciwciał (za wyjątkiem Anti-CalS12) wykazała się specyficznością w stosunku do znakowanych białek.

Wykazano istotny wpływ cech genotypowych oraz warunków wzrostu roślin macierzystych na poziom analizowanych białek i profil zachodzących zmian. **Rośliny rosnące w warunkach polowych charakteryzowały się wyższą tolerancją na stres o umiarkowanej intensywności, związany z indukcją procesu EM.**

U obu badanych linii zaobserwowano **niezwykle silny wpływ $0,7 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ mannitolu**, którego efektem był wyraźny spadek ogólnej zawartości białka i wszystkich analizowanych enzymów, co sugeruje indukcję procesu autofagii. Uzyskane wyniki sugerują, iż **DHRS1** i **SELENEBP1** mogą odgrywać rolę, w indukowanym pod wpływem selenu, **wzroście tolerancji** roślin na stres. Równocześnie **SELENEBP1** i **GST1** mogą służyć jako **potencjalne markery poziomu tolerancji na stres** związany z indukcją procesu EM.

Temat bad. 2.

Uzyskane wyniki potwierdzają, że efektywność EM silnie zależy od genotypu i wymaga dostosowania procedury indukcji EM do konkretnego materiału roślinnego.

Do najbardziej obiecujących traktowań mogących mieć praktyczne zastosowanie w technologii podwojonych haploidów (DH), należą:

- **krótkotrwałe traktowanie niską temperaturą (2 dni) połączone z aplikacją AZC ($5,0 \text{ } \mu\text{mol} \cdot \text{dm}^{-3}$)** - zwiększa efektywność indukcji SE i regeneracji ZR większości badanych linii podatnych i opornych
- wydłużone **traktowanie niską temperaturą NT (7 dni) połączone z aplikacją TSA** - dłuższa ekspozycja na NT wpływa korzystnie na genotypy odporne
- traktowanie **SeS + MAN w 4°C** - dla wybranych genotypów (raczej podatnych na EM).

Przy odpowiednio dobranych warunkach AZC może wspierać zarówno proces indukcji ME, jak i wpływać korzystnie na FRZ, ograniczając liczbę regenerowanych roślin albinotycznych.

Trwają analizy poziomu ekspresji genów zaangażowanych w EM. Ich podsumowanie pozwoli na wyciągnięcie bardziej szczegółowych wniosków. Zakończenie analiz przewidziane jest na koniec roku 2025.

Miernik zadania – stopień realizacji

lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
	Kultury pylnikowe: 2 linie × 4 obiekty: (1) pylniki pobierane ze świeżo ściętych kłosów, (2-4) pylniki pobierane z kłosów po traktowaniu: - niską temperaturą, - niską temperaturą i selenianem sodu, - niską temperaturą, selenianem sodu i mannitolem) × 3 powtórzenia biologiczne Analizy proteomiczne: 2 linie × 4 obiekty: pylniki pobierane: - ze świeżo ściętych kłosów, - z kłosów po traktowaniu niską temperaturą, - z kłosów po traktowaniu niską temperaturą i selenianem sodu, - z kłosów po traktowaniu niską temperaturą, selenianem sodu i mannitolem × 6 białek × 2 powtórzenia biologiczne	24	24	1,00
		96	96	
temat badawczy 2				
	<i>Analiza wpływu inhibitorów metylacji na efektywność EM: 4 linie × 2 inhibitory metylacji (IM: AZC; TSA) × 3 traktowania: (1) kontrola; (2) IM o stężeniu 2,5 μmol·dm⁻³ przez 7 dni; (3) IM o stężeniu 5,0 μmol·dm⁻³ przez 2 dni)</i>	16	16	
	<i>Analiza wpływu selenianu sodu i mannitolu na efektywność EM: 4 linie × 2 traktowania: (1) kontrola; (2) traktowanie niską temperaturą, selenianem sodu i mannitolem (NT+SeS+MAN)</i>	8	8	0,83
	<i>Analizy poziomu ekspresji genów metodą RT-PCR: 4 linie × 11 genów (9 + 2 geny referencyjne)</i>	44	22	
			ŚREDNIA	0,92
			% REALIZACJ I ZADANIA	92%

Doniesienie konferencyjne: Szewczyk i wsp. Epigenetic regulation of microspore embryogenic potential in contrasting winter wheat genotypes: a multi-level molecular analysis. CBB 8th Conference on Cereal Biotechnology and Breeding 11–13 November 2025, Budapest, Hungary. Book of Abstracts CBB8, str.70-71

Publikacja: Springer i wsp. 2025. Induction of microspore embryogenesis in bread wheat by mannitol pre-treatment is associated with the disruption of endogenous hormone balance and substantial accumulation of auxins. BMC Plant Biol 25, 370 (2025). <https://doi.org/10.1186/s12870-025-06389-x>.