

PIOTR T. BEDNAREK**RENATA ORŁOWSKA**

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy Instytut Badawczy, Radzików

Kierownik Tematu: prof. dr hab. Piotr T. Bednarek Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin — Państwowy

Instytut Badawczy, Radzików, Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin, 05-870 Błonie, tel. 601827259,

22 7334533, e-mail: p.bednarek@ihar.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.802.19.2018, Zadanie 12.

Analiza zmienności somaklonalnej indukowanej w kulturach *in vitro* u roślin zbożowych

Analysis of somaclonal variation induced in cereals tissue cultures

Słowa kluczowe: AgNO₃, androgeniza, CuSO₄, metoda Taguchiego, optymalizacja, somatyczna embriogeneza, zbożowe kultury tkankowe

Prace w prezentowanym zadaniu w 2018 roku realizowano w trzech tematach badawczych z następującymi celami:

- uzyskanie regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta z roślin donorowych w kulturach niedojrzałych zarodków zygocytynych oraz w kulturach pylnikowych według parametrów prowadzenia kultur *in vitro* uzyskanych w procesie optymalizacji,
- uzyskanie genomowego DNA z regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta oraz wykonanie analiz techniką metAFLP na pozyskanym DNA,
- przygotowanie matryc zerojedynkowych z autoradiogramów otrzymanych z analizy techniką metAFLP dla DNA regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta. Określenie zmienności genetycznej i metylacyjnej indukowanej *in vitro* u regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8), pszenicy (genotyp P2/9, Svilena) i pszenżyta (genotyp 28/2) z doświadczenia weryfikującego proces optymalizacji.

MATERIAŁY I METODY

Regeneranty zostały wyprowadzone z roślin donorowych (Dopt), które otrzymano w ubiegłym roku (2017) trwania projektu. Embriogeneza somatyczna była prowadzona z 36 sztuk roślin donorowych (po 12 roślin z każdego gatunku: jęczmień genotyp-2dh/8,

pszenica genotyp-P2/9 i pszenżyto genotyp-28/2). Do etapu indukcji zastosowano pożywkę MS (Murashige i Skoog, 1962) z dodatkiem 2mg/l 2,4D dla wszystkich gatunków. Każda pożywka indukująca została wykonana w czterech różnych wariantach (tab. 1) ze względu na dodatek CuSO₄, AgNO₃ oraz różny czas utrzymania zarodków na tej pożywce, wg warunków zoptymalizowanych metodą Taguchiego.

Tabela 1

Zestawienie warunków zoptymalizowanych wg metody Taguchiego — doświadczenie weryfikujące. M10 — warunki kontrolne, M11 — warunki zoptymalizowane w kierunku uzyskania maksymalnej liczby zielonych regenerantów na 100 wyłożonych pylników, M12 — warunki zoptymalizowane w kierunku maksymalnej całkowitej zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* (TTCIV — Total Tissue Culture Induced Variation), M13 — warunki zoptymalizowane w kierunku minimalnej TTCIV

Gatunek	Somatyczna embriogeneza			Androgeneza		
	CuSO ₄ (μM)	AgNO ₃ (μM)	Czas (dni)	CuSO ₄ (μM)	AgNO ₃ (μM)	Czas (dni)
Jęczmień						
M10 kontrola	0,1	0	21	0,1	0	21
M11 MAX Z REG/100Pyl	-	-	-	10	30	21
M12 MAX TTCIV	10	60	28	10	60	21
M13 MIN TTCIV	2,76	30	34	2,95	15	28
Pszenica						
M10 kontrola	0,1	0	28	0,1	0	35
M11 MAX Z REG/100Pyl	-	-	-	0,1	60	37
M12 MAX TTCIV	10	60	28	0,1	60	37
M13 MIN TTCIV	1	0	42	10	25	35
Pszenżyto						
10M kontrola	0,1	0	28	0,1	0	35
M11 MAX Z REG/100Pyl	-	-	-	10	0	49
M12 MAX TTCIV	0	60	42	0,1	60	49
M13 MIN TTCIV	10	30	42	10	0	23

Do regeneracji zastosowano pożywkę K4 (Kumlehn i in., 2006) z 1mM BAP dla jęczmienia oraz 190-2 (R1) (Zhuang i Xu, 1983) uzupełniona regulatorami wzrostu (Pauk et al. 1991), 0,5mg/l NAA i 0,5mg/l kinetyną dla pszenicy i pszenżyta. Zregenerowane, zielone rośliny przeniesiono do kolb na pożywkę ukorzeniającą jednakową dla wszystkich gatunków: 190-2 (N₆J) z 2 mg/l IAA.

Androgeneza była prowadzona z 48 roślin donorowych (po 12 roślin jęczmienia genotyp-2dh/8 i pszenicy odmiana Svilena oraz 24 rośliny pszenżyta genotyp-28/2). Kłosa chodzono w 4°C przez 3–4 tygodnie w zależności od gatunku w ciemności. Pylniki wyłożono na następujące pożywki indukujące: N6 (Chu 1987), (makro i mikroelementy (Li i in. 1988) z dodatkiem 80 g/l maltozy oraz z dodatkiem 2 mg/l 2,4D, 0,5 mg/l NAA i 0,5 mg/l kinetyny dla jęczmienia, C17 z 2 mg/l 2,4D dla pszenicy oraz 190-2 (SM) (Zhuang i Xu, 1983) uzupełniona 90 g/l maltozy, 438mg/l glutaminy, 2 mg/l 2,4-D oraz 0,5 mg/l kinetyny dla pszenżyta. Każda pożywka indukująca została wykonana w czterech różnych wariantach (tab. 1) z uwzględnieniem odpowiedniej ilości CuSO₄, AgNO₃ oraz różnego czasu utrzymania pylników na tej pożywce. Regenerację regenerantów prowadzono na pożywkach: K4 (z 0,225 mg/l BAP dla jęczmienia

(Kumlehn i in., 2006) i 190-2 (R1) (Zhuang i Xu, 1983) uzupełniona regulatorami wzrostu (Pauk i in., 1991), 0,5 mg/l NAA i 0,5mg/l kinetyną dla pszenicy i pszenżyta. Zielone regeneranty ukorzeniano w kolbach na pożywce 190-2 (N₆J) z 2 mg/l IAA jednakowej dla wszystkich gatunków.

Efektywność pozyskiwania podwojonych haploidów (DH) określono jako ilość regenerantów o podwojonym garniturze chromosomowym (DH) do wszystkich zielonych regenerantów (DH + H — zielone regeneranty haploidalne) i wyrażono w procentach.

W celu porównania wyników z różnych wariantów doświadczeń obliczenia wykonywano na liczbie zielonych regenerantów przypadających na 100 wyłożonych pylników. W oparciu o uzyskane wyniki przeprowadzono testy *F* analizy wariancji (ANOVA) wraz z grupowaniem średnich za pomocą procedury Tukeya przy założonym poziomie istotności $\alpha = 0,05$.

Z siewek regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8), pszenicy (genotyp P2/9, Svilena) i pszenżyta (genotyp 28/2) wykonano ekstrakcję DNA (Qiagen). Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie a czystość oraz integralność preparatów zweryfikowano w żelu agarozowym. Tak pozyskane DNA przygotowano do techniki metAFLP i wykończono analizy tą techniką z 8 parami selektywnych starterów. Z uzyskanych elektroforegramów policzono prążki DNA i przygotowano dane do szacowania zmienności genetycznej i metylacyjnej w badanym materiale roślinnym.

Policzono wszystkie uzyskane fragmenty DNA dla regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8), pszenicy (genotyp P2/9, Svilena) oraz pszenżyta (genotyp 28/2) otrzymane w różnych warunkach kultur *in vitro* na drodze somatycznej embriogenezy i andro-genezy. Z policzonych prążków DNA utworzono matryce zerojedynkowe dla DNA ciętego enzymami *Acc65I/MseI* oraz *KpnI/MseI*. Zastosowane w technice metAFLP enzymy będące izoschizomerami pozwoliły na określenie zmian indukowanych w kulturze *in vitro* na poziomie DNA (Machczyńska, 2014). W oparciu o przedstawiony system wyliczeń, przy użyciu specjalnie stworzonego arkusza kalkulacyjnego zostały wyliczone ilości poszczególnych zmian powstałych pod wpływem działania kultury tkankowej: TTCIV — całkowita zmienność indukowana w kulturach *in vitro* (SV+DMV+DNMV); SV — zmienność sekwencyjna; DMV — demetylacja; DNMV — metylacja *de novo*. Określono także zmianę metylacji \bar{X}_{met} jako różnicę metylacji *de novo* i demetylacji genomu: $\bar{X}_{met} = \text{metylacja } de\ novo - \text{demetylacja}$.

W oparciu o uzyskane wyniki uzyskane dla różnych charakterystyk metAFLP przeprowadzono testy *F* analizy wariancji (ANOVA) wraz z grupowaniem średnich za pomocą testu Tukeya (poziomie istotności $\alpha=0,05$). Przetestowano czy występują różnice między: wariantami doświadczenia M10, M12, M13 w obrębie TTCIV; typami zmienności SV, DMV i DNMV w obrębie TTCIV; zmiennością sekwencyjną (SV) a zmianą metylacji (\bar{X}_{met}); wariantami doświadczenia M10, M12, M13 w obrębie poszczególnych typów zmienności SV, DMV i DNMV. Testowano korelację między zmiennością sekwencyjną (SV) a zmianą metylacji \bar{X}_{met} . W tym celu wykonano analizę korelacji określając współczynnik korelacji liniowej Pearsona *r*. Wszystkie obliczenia statystyczne wykonano w programie XLSTAT2018.Ink.

WYNIKI

Aby otrzymać zaplanowane ilości regenerantów wyłożono na pożywki indukujące od 786 do 1639 zarodków oraz od 2153 do 17152 pylników z roślin donorowych jęczmienia, pszenicy i pszenżyta. Proces somatycznej embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych badanych gatunków zbóż pozwolił na otrzymanie w sumie 90 regenerantów po 30 roślin dla każdego gatunku.

Proces androgenyzy w kulturach pylnikowych skutkowało uzyskaniem od 13 do 79 zielonych regenerantów w zależności od badanego gatunku i wariantu doświadczenia. Wśród uzyskiwanych regenerantów obserwowano rośliny albinotyczne. Efektywność spontanicznego podwojenia wynosiła od 15 do 55% w zależności od gatunku.

Dla wszystkich badanych gatunków zbóż określono ilość zregenerowanych zielonych roślin przypadających na 100 wyłożonych pylników w warunkach mających na celu maksymalizację produkcji zielonych regenerantów w kulturach pylnikowych (M11) wariant doświadczenia w warunkach zoptymalizowanych i w warunkach kontrolnych (M10) (tab. 2).

Tabela 2

Zestawienie ilości zielonych oraz albinotycznych regenerantów w przeliczeniu na 100 wyłożonych pylników dla jęczmienia, pszenicy oraz pszenżyta uzyskanych w doświadczeniu weryfikującym warunki zoptymalizowane według metody Taguchiego. M10 — warunki kontrolne, M11 — warunki zoptymalizowane. Wartości w tabeli oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie ($\alpha = 0,05$) według grupowania testem Tukeya. *F*-wartość statystyki ANOVA, *p*-prawdopodobieństwo

Zregenerowane rośliny	Wariant doświadczenia	Gatunek		
		jęczmień	pszenica	pszenżyto
Zielone regeneranty	M10	0,95 ^a	4,95 ^a	0,55 ^b
	M11	1,97 ^a	7,99 ^a	1,61 ^a
	<i>F</i>	2,256	0,814	12,716
	<i>p</i>	0,142	0,375	0,001
Albinotyczne regeneranty	M10	6,45 ^a	2,21 ^a	1,05 ^a
	M11	9,10 ^a	3,67 ^a	0,92 ^a
	<i>F</i>	1,357	0,455	0,226
	<i>p</i>	0,251	0,505	0,636

Analiza ilości uzyskanych zielonych i albinotycznych regenerantów w warunkach kontrolnych (M10) i zoptymalizowanych (M11) wykazała, obniżenie ilości regenerantów albinotycznych w stosunku do regenerantów zielonych u jęczmienia i pszenżyta, zaś u pszenicy ten stosunek nie uległ zmianie.

Warianty doświadczenia M10, M12 i M13 dostarczyły regenerantów, do badań mających na celu optymalizację w kierunku maksymalizacji (M12) lub minimalizacji (M13) całkowitej zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* (TTCIV). Uzyskano w sumie 185 roślin.

Analizy molekularne obejmowały ekstrakcję genomowego DNA z regenerantów uzyskanych w warunkach zoptymalizowanych metodą Taguchiego. Jakość DNA wyizolowanego z liści regenerantów sprawdzono w żelu agarozowym, po czym przygotowano do techniki metAFLP. Wykonano rozdziały metAFLP dla 185

regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta oraz dla odpowiadających im roślin donorowych (9 roślin jęczmienia, 7-pszenica, 10-pszenżyto). W sumie amplifikowano 502 fragmenty dla roślin jęczmienia, 693 dla pszenicy i 666 dla pszenżyta dla DNA ciętego obydwoma zestawami enzymów restrykcyjnych (*Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*). Średnio dla każdego gatunku identyfikowano 31, 43 i 42 fragmenty DNA przypadające na parę starterów.

W eksperymencie weryfikującym ANOVA wykazała istotne różnice między poszczególnymi wariantami doświadczenia weryfikacyjnego dla TTCIV tylko w przypadku regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy. Zgodnie z grupowaniem Tukeya warunki zoptymalizowane w kierunku najwyższej (M12) i najniższej wartości TTCIV (M13) różniły się istotnie od siebie ($F = 10,379$; $p = 0,000$).

Wykazano istotne różnice między typami zmienności wchodzącymi w skład TTCIV poza regenerantami pszenicy uzyskanymi na drodze somatycznej embriogenezy. Dominującym typem zmienności była zmienność sekwencyjna, zaś wśród zmian dotyczących metylacji przeważała demetylacja poza regenerantami jęczmienia uzyskanymi na drodze androgeny gdzie wyższa była metylacja *de novo*.

Dla wszystkich badanych grup regenerantów istotna była różnica między zmiennością sekwencyjną a wartością zmiany metylacji. Test Pearsona wykazał dla wszystkich materiałów roślinnych ujemną korelację zmienności sekwencyjnej i zmian metylacji. Wzrost wartości zmienności sekwencyjnej wiązał się z obniżeniem wartości \bar{X}_{met} .

Analiza wariancji wykonana dla wariantów doświadczenia M10, M12 i M13 dla typów zmienności u poszczególnych gatunków nie wykazała różnic dla regenerantów jęczmienia wyprowadzonych na drodze androgeny oraz dla regenerantów pszenicy i pszenżyta uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy. Dla pozostałych grup regenerantów obserwowano zróżnicowanie między wariantami doświadczenia.

WNIOSKI I PODSUMOWANIA

1. Zastosowanie metody Taguchiego pozwoliło na wytypowanie warunków zoptymalizowanych w kierunku produkcji maksymalnej ilości zielonych regenerantów.
2. W warunkach zoptymalizowanych obserwowano obniżenie ilości roślin albinotycznych w stosunku do zielonych regenerantów u jęczmienia i pszenżyta.
3. Podjęte prace pozwoliły na przygotowanie preparatów DNA z badanych gatunków zbóż do analiz molekularnych.
4. Wykonane prace pozwoliły na uzyskanie elektroforegramów do określenia ilościowych charakterystyk metAFLP dotyczących zmienności indukowanej w trakcie pozyskiwania regenerantów na etapie weryfikacji warunków zoptymalizowanych na podstawie metody Taguchiego.
5. Zastosowanie metody Taguchiego do procesu optymalizacji pozwoliło ograniczyć ilość powtórzeń w przypadku testowania kilku czynników jednocześnie.

6. Zaproponowana metoda pozwoliła na opracowanie takich warunków prowadzenia kultur *in vitro*, które umożliwiają uzyskanie regenerantów, zarówno o najwyższym, jak i najniższym poziomie zmienności indukowanej w kulturach.
7. Zastosowane podejście na poziomie TTCV dało wynik pozytywny w przypadku regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy, nie oznacza to jednak, że metoda nie pozwoliła na optymalizację warunków regeneracji.
8. Analiza statystyczna wykonana dla regenerantów M10, M11 i M12 u jęczmienia uzyskanego na drodze somatycznej embriogenezy oraz pszenicy i pszenżyta uzyskanych na drodze androgenozy wykazała, że różnice pomiędzy M10, M11 i M12 występują na poziomie typów zmienności, co świadczy o tym, że metoda Taguchiego umożliwia optymalizację warunków uzyskania regenerantów dla tych gatunków zbóż w ww. typach kultur *in vitro*.
9. Stwierdzono, że zarówno w przypadku somatycznej embriogenezy jak i androgenozy u wszystkich gatunków wzrost zmian sekwencyjnych jest ujemnie skorelowany z demetylacją genomu.
10. Uzyskane dane pokazują, że bazowanie na TTCV, jako wskaźniku zmienności bez analizy poszczególnych charakterystyk jakościowych metAFLP (SV, DMN, DNMN) może dawać mylące wyniki.

LITERATURA

- Kumlehn J., Serazetdinova L., Hensel G., Becker D., Lörz H. 2006. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens* Plant Biotechnol. J. 4: 251 — 261.
- Murashige T., Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture Physiologia Plantarum 15: 473 — 497.
- Pauk J., Manninen O., Mattila I., Salo Y., Pulli S. 1991. Androgenesis in hexaploid spring wheat F2 populations and their parents using a multiple-step regeneration system Plant Breeding 107: 18 — 27.
- Zhuang J. J., Xu J. 1983. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu H., Vega M.R. (eds) Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press, Beijing.