

Molekularne aspekty procesu embriogenezy w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy (*Triticum aestivum*)

Okres realizacji: 1 stycznia – 31 grudnia 2022
(pierwszy rok realizacji projektu)

Kierownik projektu: dr Monika Gajeka (monika.gajeka@us.edu.pl)

Wykonawcy: prof. dr hab. Iwona Szrejko

Dr Beata Chmielewska

Justyna Zbieszczak

Realizowany temat badawczy:

Lp.	Nazwa tematu badawczego	Termin rozpoczęcia – zakończenia realizacji tematu badawczego w miesiącach od rozpoczęcia realizacji zadania	Przewidywane koszty realizacji tematu badawczego
1	Określenie wpływu czynników zewnętrznych na żywotność izolowanych mikrospor i inicjację embriogenezy mikrospor dwóch odmian pszenicy jarej i dwóch odmian pszenicy ozimej	1-12	145 000
Razem			145 000 zł

Cele projektu w roku 2022:

Lp.	Cel (zgodnie ze szczegółowym opisem na dany rok)	Czy cel został zrealizowany (tak/nie/częściowo)
1.	Opracowanie efektywnego protokołu izolacji mikrospor pszenicy	Tak
2.	Opracowanie efektywnego protokołu dla indukcji procesu embriogenezy w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy	Tak
3.	Opracowanie warunków wernalizacji i prowadzenia roślin pszenicy ozimej	Tak

Materiał i metody

Materiał:

Kłosa pszenicy zawierające mikrospory w stadium średnio-późnym do późnego odmian:

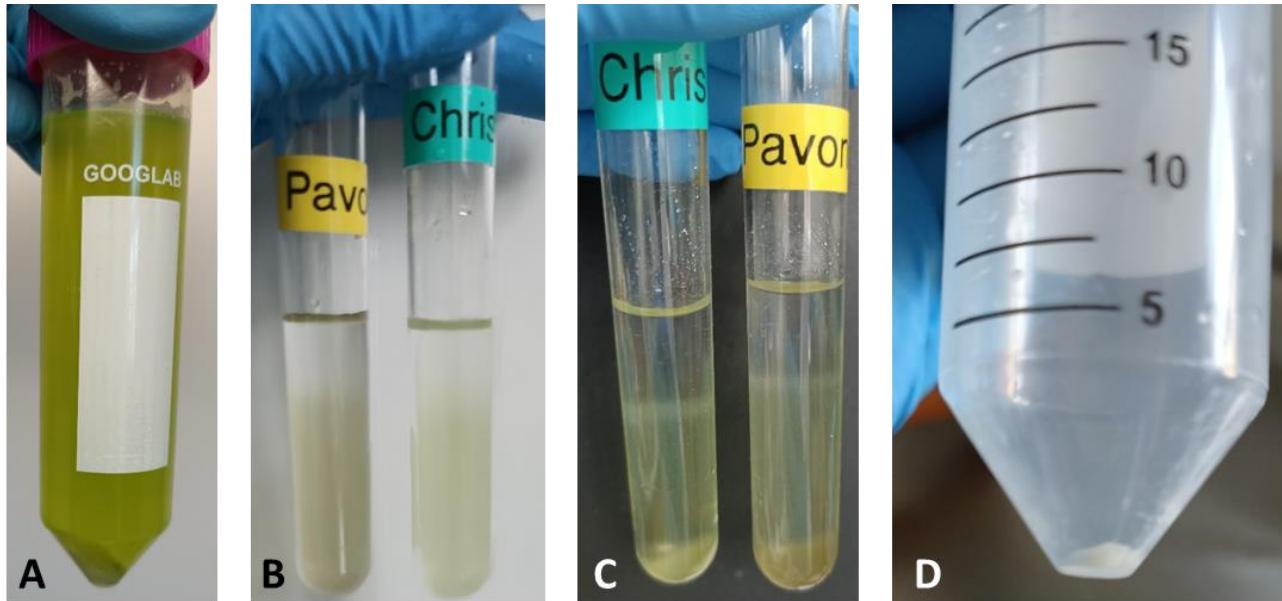
'Pavon' i 'Chris' (Pszenica jara)

'Ninka' i 'Ślązaczka' (Pszenica ozima)

Metody:

1. Opracowanie izolacji mikrospor pszenicy jarej: blendowanie, wirowanie (czas, prędkość), wirowanie w gradiencie stężeń, sterylizacja w podchlorynie sodu,
2. Indukcja zarodków w pożywce MMS4 (Kasha i in., 2003), NBP-99 (Zheng i in., 2003) oraz NBP-99+ (Wang i in., 2019)
3. Wpływ ko-kultury zalażni
4. Opracowanie sposobu wernalizacji i prowadzenia form ozimych
5. Indukcja embriogenezy o form ozimych

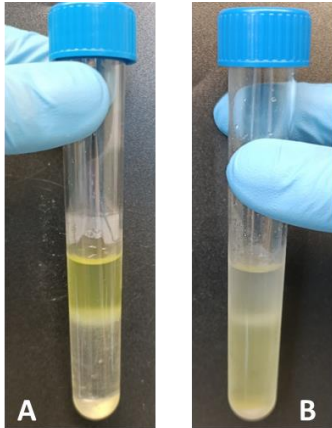
Optymalizowane etapy izolacji mikrospor pszenicy jarej



- A) Osad mikrospor utworzony po wirowaniu przy $200\times g$ przez 5 minut.
- B) Gradient stężeń mannitol-maltoza, gdzie mikrospory zawieszono w 0,55 maltozie, na powierzchnię której naniesiono 2 ml 0,4 M mannitolu.
- C) Pierścień żywotnych mikrospor utworzony po wirowaniu przy $100\times g$ przez 5 minut.
- D) Osad żywotnych mikrospor zebranych po wirowaniu przy $200\times g$ przez 5 minut.

Uzyskano mikrospory izolowane z kwiatów do indukcji embriogenezy

Pierścień mikrospor otrzymany na styku faz po wirowaniu w gradiencie stężeń

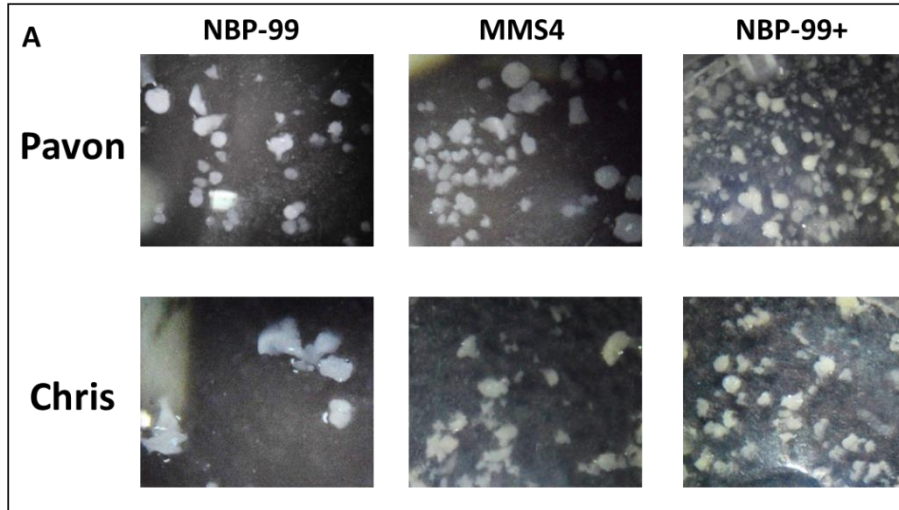


- A) Mikrospory zawieszono w 2 ml 0,4 M mannitolu, który nałożono na 5 ml 0,55 M maltozy.
- B) Mikrospory zawieszono w 5 ml 0,55 M maltozy, a na powierzchnię nałożono 2 ml 0,4 M mannitolu.

Wirowanie w gradiencie stężeń w wariancie B umożliwia uzyskanie czystej homogennej zawiesiny mikrospor bez zabrudzeń pochodzenia somatycznego

Żywotne mikrospory uzyskano po sterylizacji kłosów przez 20 minut w 1,5% podchlorynie sodu

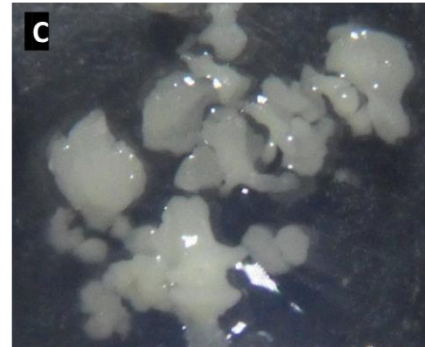
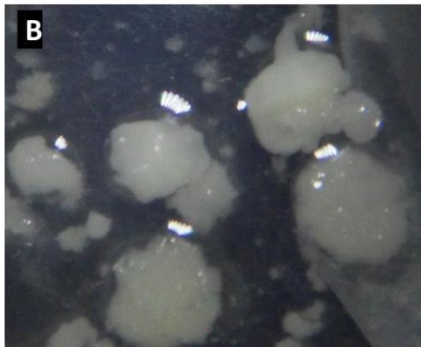
Indukcja zarodków w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy



A) Porównanie indukcji embriogenezy mikrospor dla dwóch odmian jarych przy zastosowaniu trzech pożywek indukcyjnych NBP-99, MMS4, NBP-99+.

B) Androgeniczne zarodki odmiany 'Pavon'.

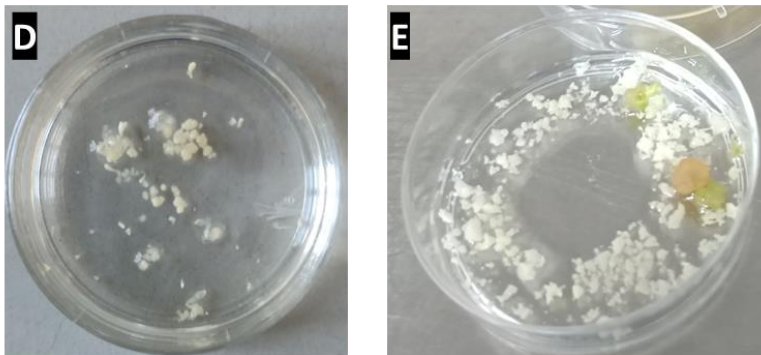
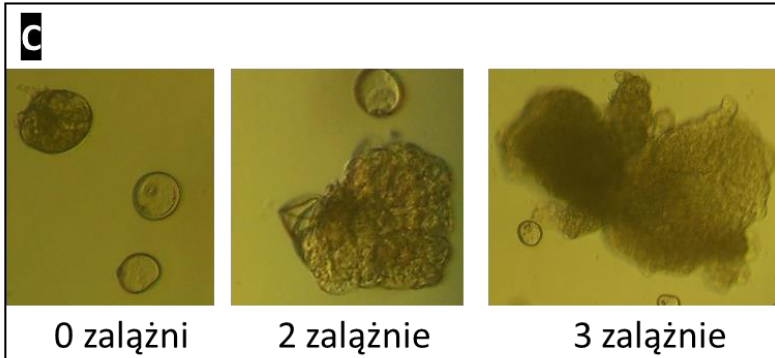
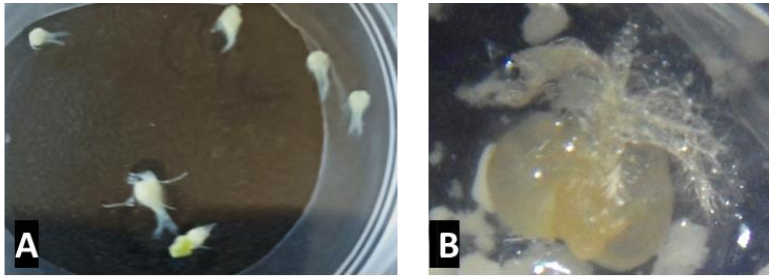
C) Androgeniczne zarodki odmiany 'Chris'.



Indukcja embriogenezy była możliwa z wykorzystaniem wszystkich pożywek

Najefektywniejszą pożywką do indukcji embriogenezy jest pożywka NBP-99+ zawierająca Larcoll, TSA

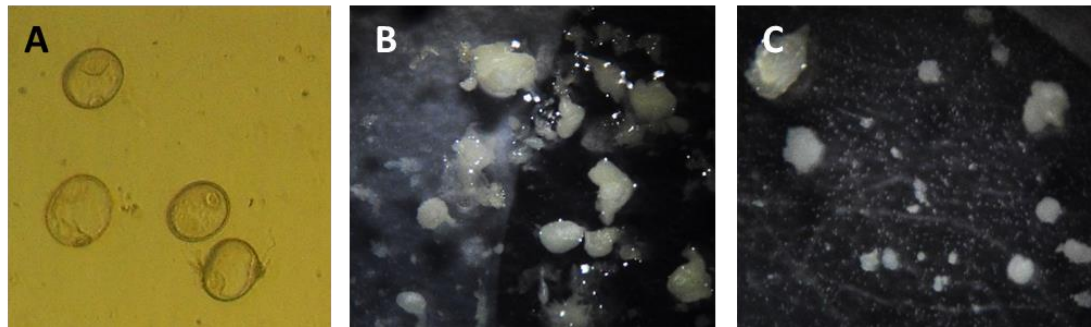
Ko-kultura zalążni jest niezbędna do indukcji embriogenezy mikrospor



- A) Izolowane zalążnie przed wyłożeniem do kultury mikrospor.
- B) Zalążnie po 21 dniach ko-kultury z izolowanymi mikrosporami.
- C) Porównanie struktur wielokomórkowych po 21 dniach kultury przy braku zalążni, przy ko-kulturze 2 i 3 zalążni na 1 ml pożywki.
- D) Uzyskane struktury po 35 dniach bez ko-kultury zalążni.
- E) Uzyskane zarodki po 35 dniach przy ko-kulturze 3 zalążni na 1 ml pożywki.

Ko-kultura zalążni jest niezbędna do indukcji i tworzenia się androgenicznych zarodków

Embriogeneza mikrospor form ozimych



- A) Mikrospory form ozimych, wskazujących na prawidłową wernalizację
- B) Androgeniczne zarodki powstałe w kulturze izolowanych mikrospor odmiany 'Ninka'
- C) Androgeniczne zarodki powstałe w kulturze izolowanych mikrospor odmiany 'Ślązaczka'

Indukcja zarodków w kulturze izolowanych mikrospor jest możliwa z zastosowaniem opracowanego protokołu

Wnioski

1. Izolację mikrospor za pomocą blendera jest możliwa tylko poprzez wykorzystanie kwiatków do izolacji
2. Do izolacji należy wykorzystać 0,4 M mannitol oraz 0,55 M maltoza
3. Wirowanie w gradiencie stężeń musi być wykonane z maltozą firmy Sigma
4. Gradient stężeń musi zostać wykonany precyzyjnie, w przeciwnym wypadku nie uzyska się pierścienia mikrospor na styku faz
5. Zawieszenie mikrospor w maltozie i nałożenie warstwy mannitolu pozwala na bezpośrednie uzyskanie czystej zawiesiny mikrospor bez zanieczyszczeń tkankami somatycznymi. Stosowanie takiego gradientu stężeń nie wymaga dodatkowych wirowań w celu oczyszczenia mikrospor
6. Indukcja embriogenezy zachodziła najefektywniej w pożywce NBP+ (Wang i in. 2019), w której jako źródło węgla stosuje się maltozę firmy Sigma
7. Efektywność embriogenezy mikrospor zwiększa ko-kultura mikrospor z załącznikami odmiany Pavon lub Chris
8. Wernalizacji mogą zostać poddane siewki pszenicy ozimej przez 8 tygodni w 6°C