



UNIWERSYTET ŚLĄSKI  
INSTYTUT BIOLOGII, BIOTECHNOLOGII  
I OCHRONY ŚRODOWISKA

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

Okres realizacji: 1 stycznia – 31 grudnia 2023  
(drugi rok realizacji projektu)

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

Wykonawcy: prof. dr hab. Iwona Szarejko

Dr Beata Chmielewska

Justyna Zbieszczak

# Realizowany temat badawczy:

Określenie czynników warunkujących optymalny rozwój zarodków indukowanych w kulturze *in vitro* dwóch odmian pszenicy jarej i dwóch odmian pszenicy ozimej  
Realizacja: styczeń-grudzień 2023

## Cele projektu w roku 2023:

Cel:	Osiągnięto cel:
1. Opracowanie protokołu regeneracji roślin pszenicy w kulturze izolowanych mikrospor	Tak
2. Określenie traktowania wstępnego warunkującego najwyższą efektywność regeneracji roślin w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy	Tak
3. Określenie efektywności regeneracji roślin dla 4 genotypów pszenicy pochodzących z materiałów mieszańcowych uzyskanych od firm hodowli roślin	Tak

# Materiał i metody

## Materiał:

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

- 'Pavon' i 'Chris' (Pszenica jara)
- 'Styłowa' i 'Zośka' (Pszenica ozima)
- Materiały mieszańcowe

## Metody:

1. Wybranie pożywki umożliwiającej efektywną regenerację roślin pszenicy w kulturze izolowanych mikrospor
2. Wybranie traktowania wstępnego:
  - a. Traktowanie wstępne źdźbeł w 4 °C przez 21-28 dni
  - b. Traktowanie wstępne źdźbeł w 4 °C przez maksymalnie 7 dni w 0,01% 2-hydroxynicotinic acid (2-HNA) (Zheng i in. 2003),
  - c. Traktowanie wstępne mikrospor izolowanych ze świeżo zebranych kłosów w roztworze A (Zheng i in. 2001)
3. Sprawdzenie efektywności regeneracji roślin w kulturze izolowanych mikrospor materiałów pochodzących ze spółek hodowli roślin

# Izolacja mikrospor i indukcja kultury

Sterylizacja  
kłosów



(1,5% sodium hypochlorite for 20 mins)

Zebranie  
kłosów



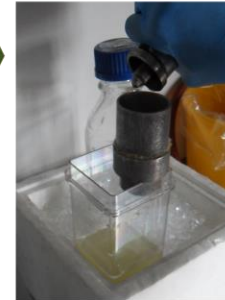
Izolacja  
załączni



Mechaniczne  
uwolnienie  
mikrospor



Oczyszczanie  
mikrospor



Zbiór  
mikrospor



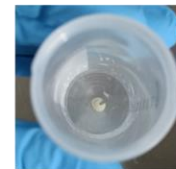
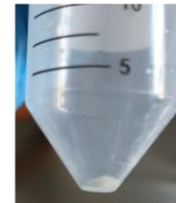
Zarodki po 35.  
dniach kultury



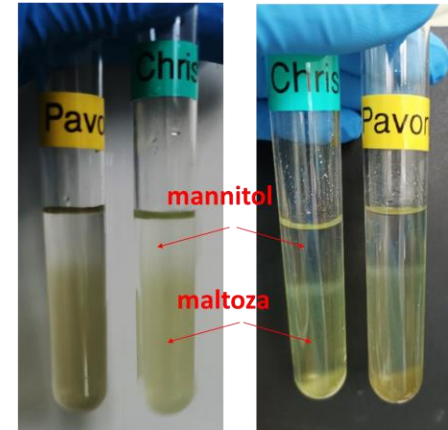
Kultura *in vitro*



Zebranie żywotnych  
mikrospor

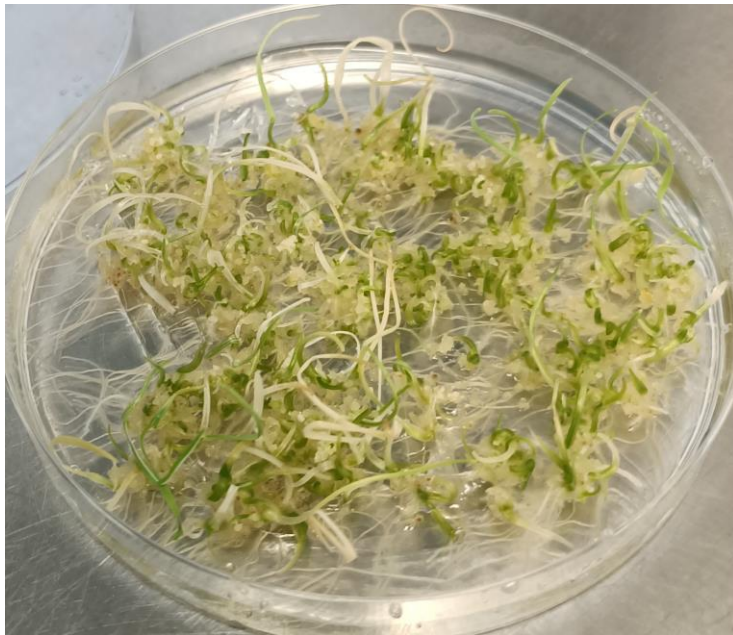


Wirowanie w gradiencie  
steżeń



# Wybranie pożywki umożliwiającej efektywną regenerację roślin pszenicy w kulturze izolowanych mikrospor

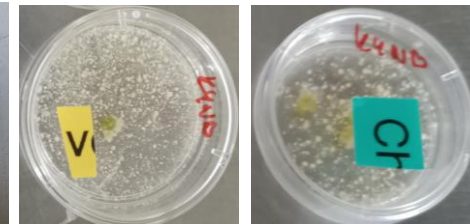
- **Pożywka B5-5** (Wang i in. 2019)
- **Pożywka K4NB** (Gajecka i in. 2021 za Kumlehn i in. 2006) używana rutynowo dla jęczmienia



Regeneracja  
na pożywce B5-5



Regeneracja  
na pożywce K4NB



Szalki indukcyjne  
zawierające zarodki  
w odpowiednim stadium  
do regeneracji

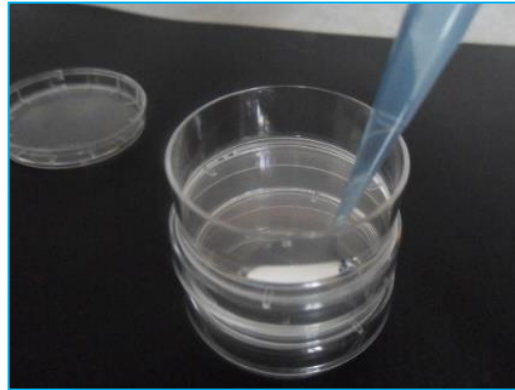
Regeneracja roślin w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy była możliwa i efektywna na pożywce K4NB zarówno dla form jarych jak i ozimych



# Wpływ traktowania wstępnego na indukcję zarodków w kulturze izolowanych mikrospor



Traktowanie wstępne źdźbeł w wodzie w 4°C przez 21-28 dni

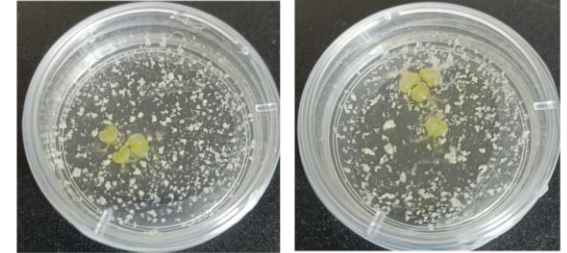


Traktowanie wstępne mikrospor izolowanych ze świeżo zebranych kłosów w Roztworze A przez 48 h w 28°C (Zheng i in., 2001)

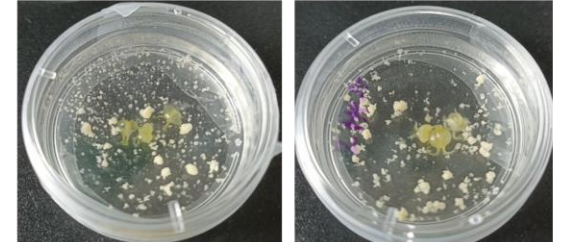
Traktowanie wstępne źdźbeł w 0.01% kwasie 2-hydroksynikotynowym, 1  $\mu$ M BAP; 10  $\mu$ M 2,4-D przez 7 dni w 4°C; (Zheng i in., 2003)

cv. Pavon    cv. Chris

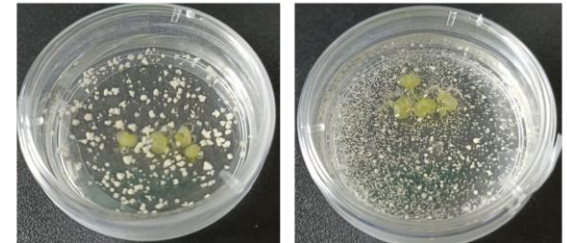
Żdźbła,  
Woda



Żdźbła,  
2-HNA



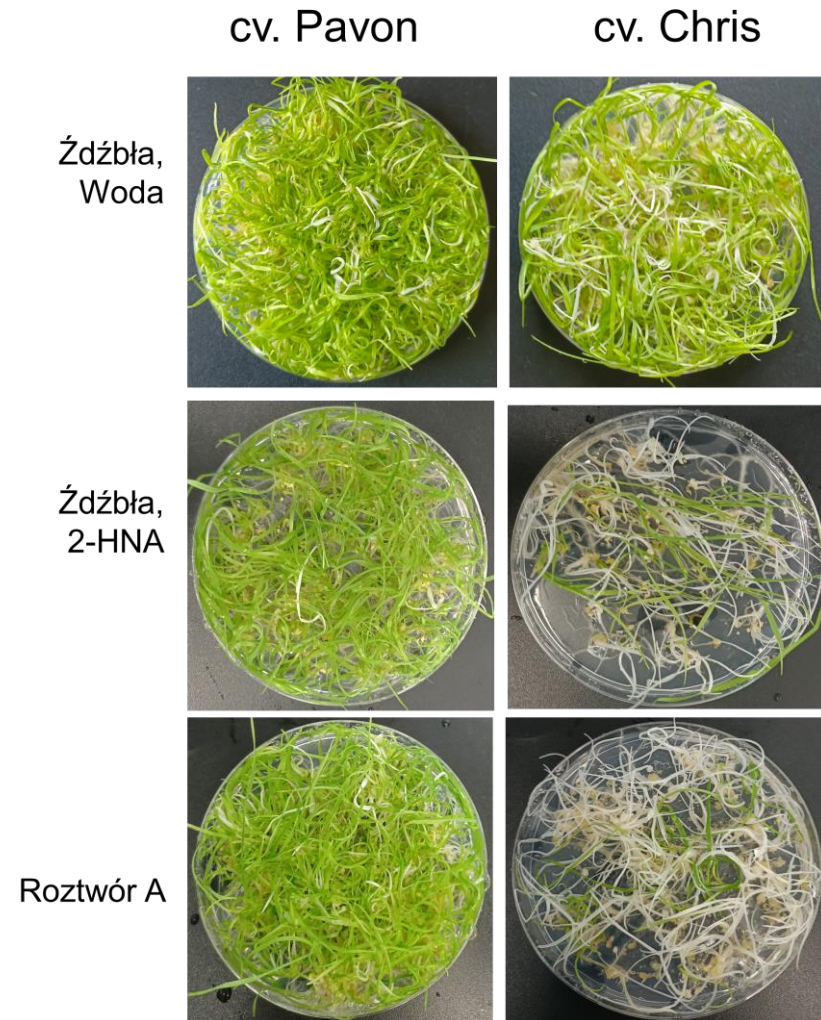
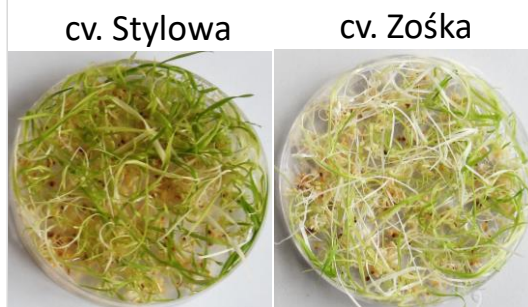
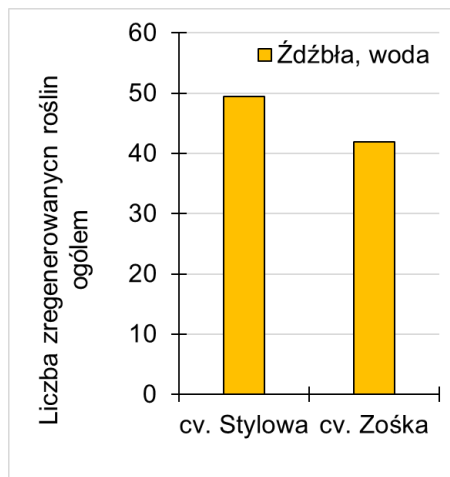
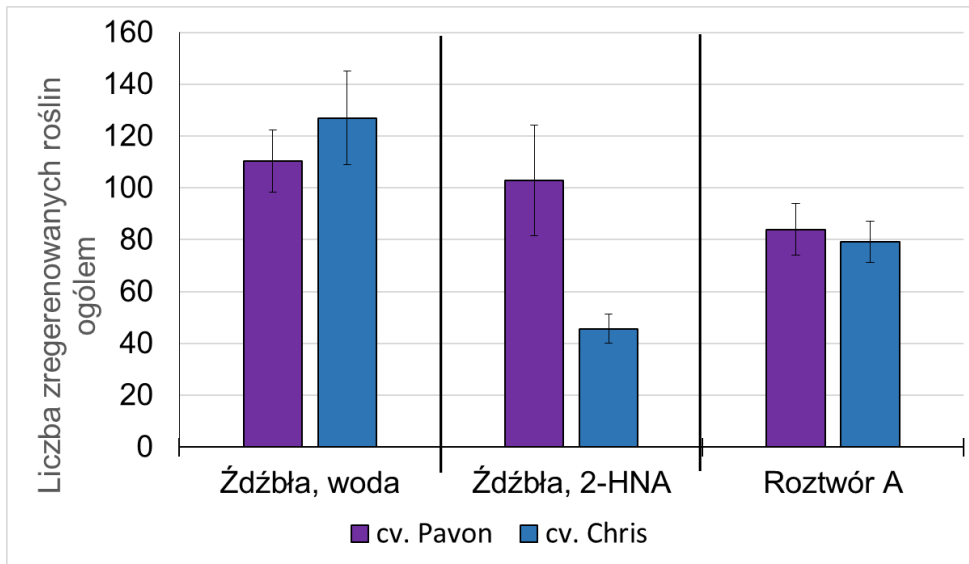
Roztwór A



Indukcja embriogenezy dla form jarych była możliwa z wykorzystaniem wszystkich traktowań wstępnych.

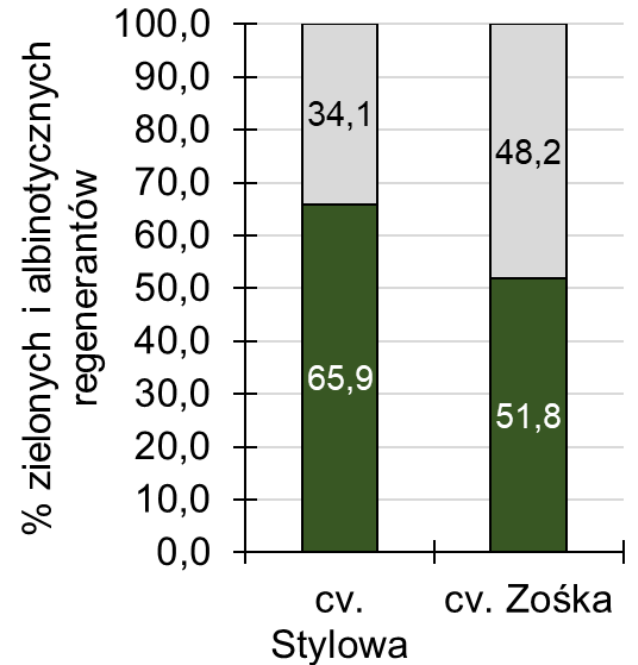
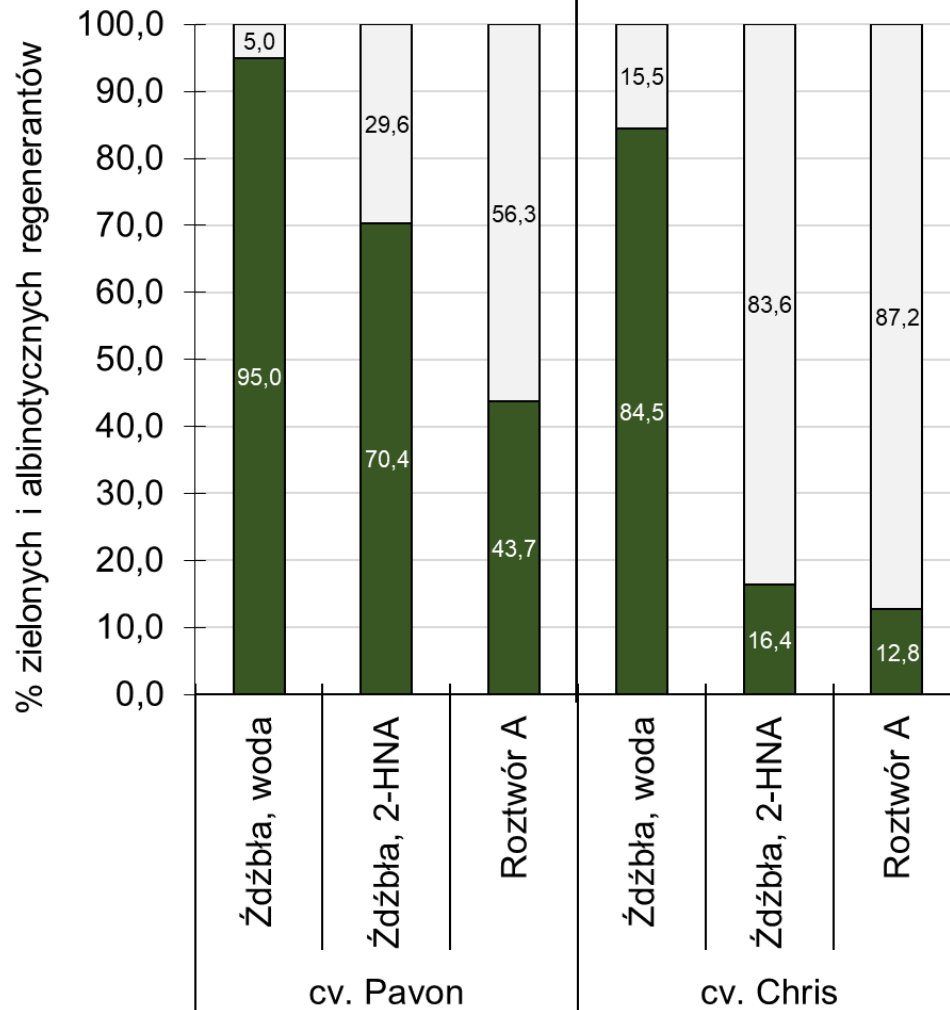
Dla form ozimych skuteczne było tylko traktowanie wstępne przez 28 dni w 4°C

# Określenie efektywności regeneracji roślin w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy



Najefektywniejszym traktowaniem wstępnym jest przechłodzenie źdźbeł w 4 °C przez 21-28 dni

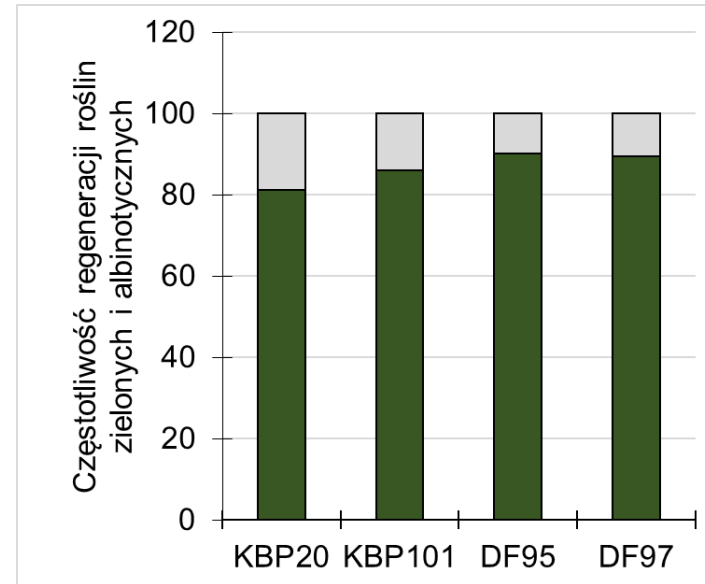
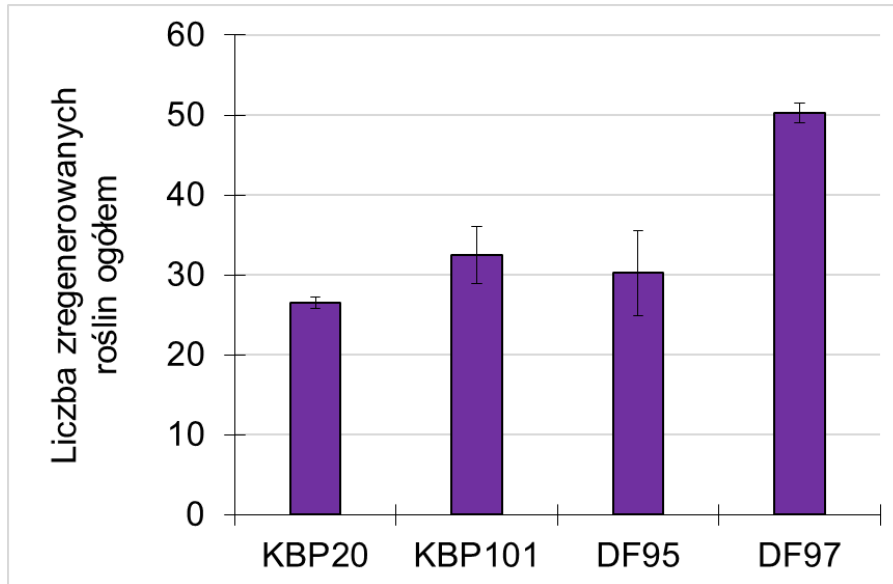
# Określenie częstotliwości regeneracji roślin zielonych w kulturze izolowanych mikrospor pszenicy



Najefektywniejszym traktowaniem wstępnym jest przechłodzenie źdźbeł w 4°C przez 21-28 dni



# Określenie efektywności regeneracji roślin dla 4 genotypów pszenicy pochodzących z materiałów mieszańcowych uzyskanych od firm hodowli roślin



Przykładowe szalki regeneracyjne

Opracowany protokół może zostać wykorzystany do regeneracji roślin z różnych genotypów pszenicy jarej i ozimej

# Prezentacja wyników

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja <sup>3</sup>	liczba prezentacji podana w opisie zadania	liczba prezentacji zrealizowana
1.	<u>11. Konferencja PTBER, Poznań, 19–22 września 2023 r.</u>	poster	1	1
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	publikacja <sup>4</sup>	Liczba publikacji podana w opisie zadania	Liczba publikacji zrealizowana
1.	<u>Genetic and epigenetic changes associated with microspore embryogenesis</u>	Publikacja przeglądowa	1	W trakcie

## 11. Konferencja PTBER, Poznań, 19–22 września 2023 r.

Strony 6-8 sprawozdania

**ISOLATED MICROSPORE CULTURE OF SPRING AND WINTER WHEAT AS AN EFFECTIVE SOURCE OF HOMOZYGOUS LINES**

Monika Gajęcka, Beata Chmielewska, Justyna Zbieszczyk and Iwona Szarejko  
 Institute of Biology, Biotechnology and Environmental Protection, Faculty of Natural Sciences,  
 University of Silesia in Katowice, Jagiellońska 28, 40-032 Katowice, Poland  
 monika.gajęcka@us.edu.pl

**BACKGROUND**

Doubled haploid is a powerful tool to produce fully homozygous lines required in basic research and breeding programs. Androgenesis is the most effective and time-saving method of doubled haploid (DH) plants production. Androgenesis through anther or isolated microspore culture is a process of plant development from immature male gametophytes – microspores, which, due to stress pre-treatment change their developmental pathway from gametophytic into sporophytic one. Due to its origin from haploid cell and nuclear fusion that occurs during the early stage of androgenesis, DH plants regenerated from the in vitro culture are fully homozygous which omits the use of chromosome doubling agents that is required in progenies or wide hybridization – other methods of doubled haploid plants production [1]. The most effective technique of androgenesis in isolated microspore culture when embryos develop from microspores previously mechanically released from spikes, spindles, or florets, followed by purification from somatic tissues by filtration and separation of viable microspores. Their resulting in a homogeneous suspension of microspores, which develop synchronously into embryos (microspore embryogenesis) in a liquid medium. There are some published protocols for isolated microspore culture in wheat [2,3], however there are still difficulties in culturing isolated microspore cultures in breeding programmes and that is the necessity of developing a reliable and effective protocol for spring and winter wheat genotypes. Many factors affect the effectiveness of isolated microspore cultures, including conditions of donor plant growth, stress applied to change the developmental fate of microspores, isolation and centrifugation of isolated microspores, media compositions, and conditions of in vitro culture [4]. This study aimed to optimize a protocol for the induction of embryos and regeneration of plants in isolated microspore cultures of spring and winter wheat.

**MATERIAL AND METHODS**

**ISOLATED MICROSPORE CULTURE OF WHEAT**

- Two spring (highly responsive 'Pavon', medium responsive 'Chris') and two winter ('Miska' and 'Szpakowka' of unknown capacity) cultivars of common wheat were tested.
- Spikes containing microspores at mid to late uninucleate stage of development were collected.
- Five spikes were collected to perform one isolation.

Fig. 1. Types of pre-treatment tested in order to increase effectiveness of microspore embryogenesis.

Fig. 2. Production of microspore-derived embryos in isolated microspore culture of wheat.

**RESULTS AND CONCLUSIONS**

- Chary co-culture is required for induction of microspore-derived embryos (Fig. 3)
- Tiller pre-treatment for 21-28 days allows producing a high number of green plants – from 50 to over 100 plants per 100 000 plated microspores in two spring wheat cultivars 'Pavon' and 'Chris' (Fig. 4)
- Pre-treatment of isolated microspores with Soluton A and tillers with 2-HNA resulted in a lower number of regenerated plants in total as well as the regeneration of more than 80% of albino plants (Fig. 4; Fig. 6)
- Induction of microspore embryogenesis and regeneration of plants of winter type wheat is possible using cold pre-treatment of tillers in water for 28 days.

**CONCLUSION:**

We developed a highly effective protocol of microspores isolation, induction, and plant regeneration of spring and winter cultivars that can be utilized for developing of homozygous plant population for breeding and research purposes.

Fig. 3. Influence of chary co-culture on induction of microspore embryogenesis.

Fig. 4. Number of regenerated green and albino plants.

Fig. 5. Isolation of microspore embryos in winter type wheat.

Fig. 6. Regeneration of wheat plants in isolated microspore culture after different pre-treatments utilized to induce microspore embryogenesis.

References:  
 1. J. P. G. de Souza, R. C. de Souza, 2011, 20:429-437.  
 2. M. J. P. de Souza, R. C. de Souza, 2009, 27: 411-418.  
 3. B. A. G. de Souza, R. C. de Souza, 2009, 27: 411-418.  
 4. J. P. G. de Souza, R. C. de Souza, 2009, 27: 411-418.  
 5. J. P. G. de Souza, R. C. de Souza, 2009, 27: 411-418.  
 6. J. P. G. de Souza, R. C. de Souza, 2009, 27: 411-418.

This study was fully supported by the Polish Ministry of Agriculture and Rural Development grant no. DHR/LN.802.15.2023 (Task no. 6)