

Sposób izolacji i inicjacji kultury *in vitro* mikrospor z wykorzystaniem stadium wczesno-średniego do średniego u jęczmienia jarego.

Przedmiotem wynalazku jest sposób izolacji i inicjacji kultury *in vitro* mikrospor z wykorzystaniem stadium wczesno-średniego do średniego u jęczmienia jarego, w szczególności w celu efektywniejszej produkcji linii DH z genotypów/odmian wykazujących w standardowej metodzie wysoki poziom regeneracji roślin albinotycznych.

Androgeneza jest to proces powstawiania roślin z gametofitu męskiego. W procesie tym mikrospory, które w warunkach naturalnych rozwijają się w ziarno pyłku, ulegają przeprogramowaniu i inicjowany jest ich rozwój sporofityczny. Istotne w indukcji procesu androgenezy jest zastosowanie traktowania wstępnego, czyli stresu, który zainicjuje przeprogramowanie. Najczęściej wykorzystywanym stresem jest przechłodzenie lub niedobór substancji odżywczych. Ważne jest aby czynnik stresowy aplikowany był w odpowiednim stadium rozwojowym mikrospor, tak aby dotychczasowy program rozwojowy został zatrzymany i zainicjowany został rozwój sporofityczny. Badania u zbóż wykazały, że najefektywniejszym stadium rozwojowym mikrospory do inicjacji androgenezy jest stadium średnio-późne do późnego (Hoekstra *i in.*, 1992; Li i Devaux, 2005).

Jednym z kluczowych czynników obniżających znacząco efektywność procesu androgenezy jest regeneracja roślin albinotycznych, które pozbawione są chlorofilu w tkankach normalnie zielonych. Wiele prac dotyczących androgenezy skupiało się na udoskonaleniu protokołu inicjacji i prowadzenia kultur *in vitro* w celu poprawy efektywności regeneracji roślin zielonych poprzez modyfikację traktowania wstępnego czy też pożywek. Jednakże, odpowiedź genotypów na te modyfikacje były zróżnicowane a poprawa efektywności wynikała ze zwiększenia liczby zielonych roślinek poprzez ogólne poprawienie regeneracji a rośliny albinotyczne nadal stanowiły większość uzyskanych roślinek (Broughton, 2011; Castillo *i in.*, 2014; Echávarri i Cistué, 2016). Wykazano, że wśród czynników wpływających pozytywnie na regenerację roślin zielonych jest pozycja źdźbła w roślinie pobieranego do inicjacji kultury *in vitro* (Jacquard *i in.*, 2006). Jednak badań tych nie kontynuowano, ani nie zaproponowano jako rozwiązania problemu albinizmu. Jak do tej pory nie zaproponowano rozwiązania, które niezależnie od genotypu zwiększy efektywność

regeneracji roślin zielonych. Wykazano, że regeneracja roślin albinotycznych zależna od genotypu związana jest z różnicowaniem amyloplastów podczas rozwoju ziaren pyłku *in vivo*. U odmian, które regenerują w przewodzie rośliny albinotyczne różnicowanie amyloplastów zachodzi wcześniej i w stadium wczesno-średnim aktywowane są geny kodujące enzymy syntezy skrobi a w mikrosporach w stadium średnio-późnym obecne są już amyloplasty. U odmian, które w kulturze izolowanych mikrospor w przewodzie regenerują rośliny zielone, aktywacja genów syntezy skrobi następuje w stadium średnio-późnym a amyloplasty obecne są dopiero w stadium dwujądrowym niedojrzałego pyłku. Skorelowanie częstotliwości regeneracji roślinek albinotycznych z obecnością amyloplastów w stadium średnio-późnym wskazało przyczynę regeneracji tych roślinek zależnej od genotypu.

Celem wynalazku jest sposób izolacji i inicjacji kultury *in vitro* mikrospor z wykorzystaniem stadium wczesno-średniego do średniego u jęczmienia jarego w celu efektywniejszej produkcji linii DH z genotypów/odmian wykazujących w standardowej metodzie wysoki poziom regeneracji roślin albinotycznych.

Sposób izolacji i inicjacji kultury *in vitro* mikrospor z wykorzystaniem stadium wczesno-średniego do średniego jęczmienia jarego według wynalazku polega na tym, że ścina się źdźbła zawierające mikrospory we wczesno-średnim do średniego stadium rozwojowym i umieszcza się w wodzie, a następnie przechowuje w temperaturze 4°C do czasu izolacji kłosów. Źdźbła sterylizuje się powierzchniowo 70-100% etanolem, a następnie wyciąga się kłosy i za pomocą sterylnej pęsety usuwa się ości. Kłosy wyklada się i przechowuje zapewniając im odpowiednią wilgotność. Tak przygotowane kłosy poddaje się kontrolowanemu przechłodzeniu. Przechłodzone kłosy tną się na ok. 1 cm fragmenty i umieszcza w schłodzonej komorze blendera. Kłosy blenduje się dwukrotnie w 0,4 M mannitolu przy wolnych obrotach. Zblendowane kłosy przepuszcza się przez 100 µm sterylny filtr do pojemnika znajdującego się na lodzie. Resztki kłosów zbiera się z filtra i blenduje dwukrotnie w 0,4 M mannitolu w celu uwolnienia jak największej liczby mikrospor i ponownie filtruje przez 100 µm filtr. Zawiesinę mikrospor przelewa się do probówki i wiruje przy 120-130×g przez 8-10 min w temperaturze 4°C następnie usuwa się supernatant a osad mikrospor zawiesza się w 0,55 M maltozie. Zawiesinę przenosi się do nowej sterylnej probówki i na powierzchnię nanosi się 0,4 M mannitol i wiruje w gradiencie stężeń przy 100-110×g przez 8-10 min w temperaturze 4°C w celu oddzielenia mikrospor żywotnych, znajdujących się na

granicy faz, od nieżywotnych znajdujących się w pelecie. Mikrospory znajdujące się na granicy faz w pierścieniu zbiera się i wiruje w celu ich osadzenia przy 120-130×g przez 8-10 min w temperaturze 4°C. Następnie osusza się osad mikrospor, a mikrospory zawiesza się w pożywce indukującej KBP zmodyfikowanej poprzez dodanie hydrolizatu kazeiny i kwasów organicznych do gęstości 100 000-150 000 mikrospor na 1ml pożywki wyłożone na szalkę. Kulturę *in vitro* na zmodyfikowanej pożywce KBP prowadzi się przez 7 dni w temperaturze 25°C w ciemności. Po tym czasie dodaje się świeżej pożywki KBP i kulturę kontynuuje się przez 2 tygodnie w tych samych warunkach z wytrząsaniem przy 100 rpm. Następnie usuwa się pożywkę KBP, a utworzone struktury wielokomórkowe przenosi się na pożywkę różnicującą KBPD na filtry bibułowe. Kulturę prowadzi się w temperaturze 25°C w ciemności przez 2 tygodnie. Po tym czasie struktury wielokomórkowe przenosi się na pożywkę regenerującą K4NB, a kulturę prowadzi się w tych samych warunkach przez 5 dni i następnie przenosi na światło przy 16 h fotoperiodzie w temperaturze 24°C. Z kultury zregenerowane zielone rośliny przekłada się na świeżą pożywkę K4NB celem ich wzrostu i gdy korzeń jest rozwinięty rośliny przenosi się do ziemi.

Metoda ta umożliwia efektywną produkcję linii DH z genotypów, które w kulturze *in vitro* inicjowanej według standardowej metody regenerują w przewodzie rośliny albinotyczne. Poprzez wykorzystanie wcześniejszego stadium rozwojowego mikrospor możliwa jest produkcja linii DH z genotypów, dla których w związku z regeneracją roślin albinotycznych nie było to możliwe. Modyfikacja ta zwiększa możliwości wykorzystania odmian/genotypów w procesach hodowlanych a co za tym idzie, konkurencyjność procesów hodowlanych.

Przedmiot wynalazku przedstawiono na rysunku, na którym Fig. 1. przedstawia przygotowanie materiału do prowadzenia kultury *in vitro* izolowanych mikrospor, gdzie (a) Rośliny donorowe wzrastające w fitotronie (b) Cechy morfologiczne kłosa powiązane ze stadium rozwojowym mikrospor; 1 – odległość między liściem flagowym i pierwszym liściem źdźbła; 2 – odległość między nasadą kłosa a międzywęźlem. (c) Mikrospora w stadium wczesno-średnim barwiona acetokarminem. (d) Mikrospora w stadium późnym wybarwiona acetokarminem (e) Traktowanie wstępne kłosów w 4°C, Fig. 2. - Izolacja mikrospor i prowadzenie kultury *in vitro*, gdzie (a) Cięcie kłosów na mniejsze fragmenty. (b) Umieszczanie fragmentów kłosów w komorze blendera. (c) Dodawanie mannitolu do komory blendera. (d) Mechaniczne uwalnianie mikrospor za

pomocą blendera. (e) Filtrowanie zawiesiny przez 100 μm filtr do pudełka znajdującego się na lodzie. (f) Osad mikrospor po wirowaniu przez 10 min przy 110 \times g. (g) Utworzony gradient stężeń mannitol-maltoza, w której zawieszono mikrospory. (h) Pierścień żywotnych mikrospor utworzony na styku faz mannitol-maltoza po wirowaniu przez 10 min przy 110 \times g. (i) Usuwanie mannitolu za pomocą tipsa, tak by pozostał suchy osad mikrospor. (j) Inicjacja kultury *in vitro* w objętości 1 ml pożywki indukującej. (k) prowadzenie kultury izolowanych w pożywce indukującej. (l) Prowadzenie kultury na pożywce różnicującej na bibule. (m) Regenerujące androgeniczne roślinki, Fig. 3. - Porównanie odpowiedzi androgenicznej w kulturze izolowanych mikrospor inicjowanej ze stadium wczesno-średniego (EM) i średnio-późnego do późnego (ML), gdzie (a) Regeneracja ogółem roślinek i procentowy udział zielonych i albinotycznych regenerantów w kulturze izolowanych mikrospor odmian 'Jersey', 'Justina' i 'Mercada'. Wykres przedstawia średnie wartości obliczone na podstawie trzech niezależnych powtórzeń biologicznych wraz z odchyleniem standardowym. (b) Przykładowa szalka regeneracyjna odmian 'Justina' i 'Mercada' po 28 dniach na pożywce regeneracyjnej.

Przykład I. Żdźbła zawierające mikrospory we wczesno-średnim do średniego stadium rozwojowym i umieszcza się w wodzie, a następnie przechowuje w temperaturze 4°C do czasu izolacji kłosów. Żdźbła sterylizuje się powierzchniowo 70% etanolem, następnie wyciąga się kłosa i za pomocą sterylnej pęsety usuwa się ości. Kłosa wyklada się i przechowuje zapewniając im odpowiednią wilgotność. Tak przygotowane kłosa poddaje się kontrolowanemu przechłodzeniu przez okres 14-21 dni w temperaturze 4°C. Przechłodzone kłosa tną się na ok. 1 cm fragmenty i umieszcza w schłodzonej komorze blendera. Kłosa blenduje się dwukrotnie w 20 ml 0,4 M mannitolu przy wolnych obrotach (poziom 3-4) przez 30-40 sekund. Zblendowane kłosa przepuszcza się przez 100 μm sterylny filtr do pojemnika znajdującego się na lodzie. Resztki kłosów zbiera się z filtra i blenduje ponownie w 10-15 ml 0,4 M mannitolu dwukrotnie w celu uwolnienia jak największej liczby mikrospor i ponownie filtruje przez 100 μm filtr. Zawiesinę mikrospor przelewa się do próbki i wiruje przy 120-130 \times g przez 8-10 min w temperaturze 4°C następnie usuwa się supernatant a osad mikrospor zawieszono w 5 ml 0,55 M maltozy. Zawiesinę przenosi się do nowej sterylnej próbki i na powierzchnię nanosi się 1-2 ml 0,4 M mannitolu i wiruje w

gradientcie stężeń przy 100-110×g przez 8-10 min w temperaturze 4°C w celu oddzielenia mikrospor żywotnych znajdujących się na granicy faz od nieżywotnych znajdujących się w pelecie. Mikrospory znajdujące się w pierścieniu na granicy faz zbiera się i wiruje w celu ich osadzenia przy 120-130×g przez 8-10 min w temperaturze 4°C. Następnie osusza się osad mikrospor, a mikrospory zawiesza się w pożywce indukującej KBP zmodyfikowanej poprzez dodanie hydrolizatu kazeiny i kwasów organicznych do gęstości 100 000-150 000 mikrospor/ 1ml pożywki wyłożone na 1 szalkę. Kulturę *in vitro* na zmodyfikowanej pożywce KBP prowadzi się przez 7 dni w temperaturze 25°C w ciemności. Po tym czasie dodaje się 1 ml świeżej pożywki KBP i kulturę kontynuuje się przez 2 tygodnie w tych samych warunkach z wytrząsaniem przy 90-120 rpm. Następnie usuwa się pożywkę KBP, a utworzone struktury wielokomórkowe przenosi się na pożywkę różnicującą KBPD na filtry bibułowe. Kulturę prowadzi się w temperaturze 25°C w ciemności przez 2 tygodnie. Po tym czasie struktury wielokomórkowe przenosi się na pożywkę regenerującą K4NB, a kulturę prowadzi się w tych samych warunkach przez 5 dni i następnie przenosi na światło przy 16 h fotoperiodzie w temperaturze 24°C. Zielone rośliny przekłada się na świeżą pożywkę K4NB celem ich wzrostu i gdy korzeń jest rozwinięty rośliny przenosi się do ziemi.

Wykazano, że niezależnie od stadium wykorzystanego do indukcji kultury izolowanych mikrospor poziom regeneracji roślin u dwóch odmian pozostał na podobnym poziomie. U jednej odmiany zaobserwowano ok. 30% obniżenie poziomu regeneracji w kulturze inicjowanej ze stadium EM (Figura 3). Dodatkowo, u odmiany, która w standardowej metodzie regeneruje w przewodzie rośliny zielone, nie zaobserwowano różnic w liczbie zregenerowanych roślin zielonych w kulturze indukowanej z wykorzystaniem stadium EM lub ML. U odmiany tej zielone regeneranty stanowił ponad 90% niezależnie od wykorzystanego stadium rozwojowego mikrospory. Odmiennie, u odmian, które w kulturze izolowanych mikrospor indukowanej w stadium ML regenerowały ok. 90% roślinek albinotycznych, przy indukcji kultury ze wcześniejszego stadium EM nastąpił wzrost regeneracji roślin zielonych (Figura 3). W kulturze *in vitro* inicjowanej z mikrospor w stadium EM uzyskano średnio 40 zielonych regenerantów w przeliczeniu na 100 000 mikrospor, co stanowiło 73% ogółu regenerantów jednej z odmiany. Z kolei dla drugiej odmiany, zielone roślinki obejmowały 93% regenerantów, co pozwoliło na uzyskanie średnio 55

zielonych roślinek w przeliczeniu na 100 000 mikrospor. Udział zielonych regenerantów po indukcji kultury z wykorzystaniem stadium EM wzrósł około 4-krotnie i ponad 10-krotnie u odmian, które w standardowej metodzie regenerują w przewodzie rośliny albinotyczne. Wykorzystanie wcześniejszego stadium do indukcji kultury izolowanych mikrospor wydaje się być kluczowym czynnikiem zwiększającym regenerację roślin zielonych u odmian, które w standardowym protokole produkują w przewodzie rośliny albinotyczne.

Tabela 1. Skład pożywki indukującej, różnicującej i regenerującej (Coronado i in., 2005; Kumlehn i in., 2006)

Koncentracja [mg/L]	KBP (Kumlehn's Barley Pollen)	KBPD (Kumlehn's Barley Pollen Differentiation)	K4NB
Makroelementy (K-makro)			
KNO ₃	2020	2020	3640
NH ₄ NO ₃	80	80	320
KH ₂ PO ₄	340	340	340
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246	246	246
CaCl ₂ ·2H ₂ O	441	441	441
Mikroelementy (K-mikro)			
NaFeEDTA	27,5	27,5	20,6
MnSO ₄ ·H ₂ O	8,4	8,4	8,4
H ₃ BO ₃	3,1	3,1	3,1
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	7,2	7,2	7,2
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,024	0,024	0,024
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	1,25
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,12	0,12	0,12
KI	0,17	0,17	0,17
Witaminy B5 (Duchefa; nr kat. G0415)			
Kwas nikotynowy	-	-	1
Pirydoksyna-HCl	-	-	1
Tiamina-HCl	-	-	10
Mio-inozytol	-	-	100
Witaminy Kao i Michayluk (Sigma; nr kat.K-3129)			
Retinol	0,01	0,01	-
Tiamina-HCl	1	1	-
Kwas nikotynowy	1	1	-
Ryboflawina	0,2	0,2	-
Pantotenian wapnia	1	1	-
Kwas foliowy	0,4	0,4	-

Pirydoksyna- HCl	1	1	-
Kobalamina	0,02	0,02	-
Kwas askorbinowy	2	2	-
Kalcyferol	0,01	0,01	-
Biotyna	0,01	0,01	-
Chlorek choliny	1	1	-
Kwas p-aminobenzoesowy	0,02	0,02	-
Mio-inozytol	100	100	-
Hydrolizat kazeiny	250	-	-
Kwasy organiczne			
Kwas cytrynowy	40	-	-
Kwas fumarowy	40	-	-
Kwas pirogronowy	20	-	-
Glutamina	439,3	439,3	146,4
BAP	0,9	0,224	0,224
Maltoza	90000	90000	36000
Phytigel	-	8000	6000
Cefotaxime	250	-	-
pH	5,9	5,9	5,8

RZECZNIK PATENTOWY
Uniwersytetu Śląskiego


mgr inż. Joanna Kulińska

Literatura

- Broughton S (2011) *The application of n -butanol improves embryo and green plant production in anther culture of Australian wheat (Triticum aestivum L .) genotypes.* *Crop Pasture Sci* 62:813–822. doi: 10.1071/CP11204
- Castillo AM, Nielsen NH, Jensen A, Vallés MP (2014) *Effects of n-butanol on barley microspore embryogenesis.* *Plant Cell Tissue Organ Cult* 117:411–418. doi: 10.1007/s11240-014-0451-2
- Coronado MJ, Hensel G, Broeders S, et al (2005) *Immature pollen-derived doubled haploid formation in barley cv. Golden Promise as a tool for transgene recombination.* *Acta Physiol Plant* 27:591–599. doi: 10.1007/s11738-005-0063-x
- Echávarri B, Cistué L (2016) *Enhancement in androgenesis efficiency in barley (Hordeum vulgare) and bread wheat (Triticum aestivum L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium.* *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 125:11–22. doi: 10.1007/S11240-015-0923-Z
- Hoekstra S, van Zijderveld MH, Louwerse JD, et al (1992) *Anther and microspore culture of Hordeum vulgare L. cv. Igri.* *Plant Sci* 86:89–96. doi: 10.1016/0168-9452(92)90182-L
- Jacquard C, Asakaviciute R, Hamalian A. M, et al (2006) *Barley anther culture: Effects of annual cycle and spike position on microspore embryogenesis and albinism.* *Plant Cell Rep* 25:375–381. doi: 10.1007/s00299-005-0070-9
- Kumlehn J, Serazetdinova L, Hensel G, et al (2006) *Genetic transformation of barley (Hordeum vulgare L.) via infection of androgenetic pollen cultures with Agrobacterium tumefaciens.* *Plant Biotechnol J* 4:251–261. doi: 10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x
- Li H, Devaux P (2005) *Isolated microspore culture overperforms anther culture for green plant regeneration in barley (Hordeum vulgare L.).* *Acta Physiol Plant* 27:611–619. doi: 10.1007/s11738-005-0065-8