

Gatunek rośliny której dotyczy sprawozdanie: *Lupinus angustifolius* L.

Autor/autorzy: RENATA GALEK¹, BARTOSZ KOZAK¹, DARIUSZ ZALEWSKI¹, ADELA ADAMUS², AGNIESZKA KIEŁKOWSKA²

Afiliacja: ¹Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa ²Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, Zakład Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa

Adres korespondencyjny, adres e-mail i nr telefonu Kierownika Tematu:

Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu, Katedra Genetyki, Hodowli Roślin i Nasiennictwa, Zakład Genetyki i Biotechnologii Roślin, pl. Grunwaldzki 24a, 50-363 Wrocław, e-mail: renata.galek@upwr.edu.pl, tel. 713201815 lub 713201826

Informacja o dotacji:

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji na podstawie § 9 ust. 1 i ust. 6 do rozporządzenia Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi z dnia 29 lipca 2015 r. w sprawie stawek dotacji przedmiotowych dla różnych podmiotów wykonujących zadania na rzecz rolnictwa (Dz. U. z 2017 r., poz. 1170 z późn. zm.) znak sprawy HOR.hn.802.10.2019, Zadanie nr 108

Tytuł zadania w języku polskim: Badania nad gametyczną embriogenezą u *Lupinus angustifolius* L. - indukcja haploidów i analiza genetycznego podłoża tego procesu

Tytuł zadania w języku angielskim: Research on gametic embryogenesis in *Lupinus angustifolius* L. - haploid induction and analysis of the genetic basis of this process

Słowa kluczowe: androgeniza, gynogeneza, haploidy, identyfikacja haploidów, krzyżowanie oddalone, łubin wąskolistny

Cele badań

1. Analiza wpływu pyłku obcego gatunku oraz indukcji gynogenezy na rozwój komórek woreczka zalążkowego - zrealizowano
2. Charakterystyka procesu androgenyzy u wybranych genotypów <i>L. angustifolius</i> - zrealizowano
3. Analiza zmian ekspresji genów odpowiedzialnych za morfogenezę w trakcie proliferacji kalusa - zrealizowano

1. Analiza wpływu pyłku obcego gatunku oraz indukcji gynogenezy na rozwój komórek woreczka zalążkowego

Materiałem badawczym były zebrane i utrwalone słupki po wykonaniu przepylecia wybranych genotypów *L. angustifolius* z wybranymi donorami pyłku *L. mutabilis* oraz *L. luteus*. Do obserwacji zalążków po 48, 96 oraz 168 h od momentu przepylecia przygotowano preparaty po zastosowaniu metody parafinowej (Filutowicz i Kuźdowicz 1951). Obserwacje mikroskopowe wykonano przy użyciu mikroskopu NIKONEclipse 400.

Do badań nad optymalizacją doboru pożywki były analizowane zalążki 4 genotypów łąbinu wąskolistnego (Karo, Emir, Graf oraz LAE) zarówno do indukcji zalążków na drodze gynogenezy jak i krzyżowania oddalonego. Zalążki nie poddane traktowaniu obcym pyłkiem (gynogeneza) oraz po traktowaniu obcym pyłkiem – *L. mutabilis* oraz *L. luteus* sukcesywnie izolowano do kultur *in vitro*. W przypadku wykorzystania krzyżowania oddalonego starano się jak najdłużej utrzymać strąki na roślinie. Po 2 – 3 dniach od naniesienia pyłku na znamiona wykonywano oprysk 2,4D. Zawiązane strąki pobierano sukcesywnie po 7-14 dniach od momentu przepylenia. Dezynfekcję powierzchniową przeprowadzano dwufazowo: sublimatem (0,1%) oraz po wypłukaniu w sterylnej wodzie strąki zanurzono w H₂O₂ (7%). Słupki zawierające zalążki do indukcji gynogenezy odkazano w H₂O₂ (7%). Zastosowano pożywki podstawowe B5 lub MS z modyfikacjami. Łącznie przetestowano 9 zasadniczych wariantów pożywek dla krzyżowania oddalonego oraz 15 dla indukcji gynogenezy, z uwzględnieniem hodowli pulsacyjnej (przemienne pasażę na pożywkę z regulatorami i następnie bez).

Wykorzystanie krzyżowania oddalonych gatunków nie tylko dla pozyskiwania nowej zmienności genetycznej w postaci mieszańców, ale i indukcji haploidów (metoda bulbosowa, indukowana partogeneza (za pomocą pyłku obcego gatunku) wymaga poznania możliwości zapylenia czy zapłodnienia (metoda bulbosowa), a potem eliminacji chromosomów, co jest istotne z uwagi na często występujące bariery krzyżowalności pre- i post zygotyczne (Buschman-Loock i in. 1992; Faluyi i Williams 1980; Galek 2010; Przyborowski i in. 1996; Przyborowski 2003; Williams i in. 1980) . W ramach realizowanego projektu w roku 2018 oceniono zachowanie się pyłku oddalonych gatunków - *L. luteus* i *L. mutabilis* na znamieniu czterech różnych genotypów *L. angustifolius* pod kątem możliwości indukcji haploidów. Stwierdzono, że pyłek kiełkował stosunkowo intensywnie bez względu na rodzaj zapylacza, za to docieranie łagiewki pyłkowej do zalążków było najskuteczniejsze, gdzie do zapylenia użyto pyłku *L. luteus* 500. Również obserwowano największą skuteczność indukcji rozwoju kalusa przy użyciu pyłku *L. luteus* - 500. Wykorzystanie krzyżowania oddalonego odniosło zdecydowanie pozytywny wpływ na rozwój tkanki kalusowej (3 typy morfologiczne) z zalążków, w tym haploidalnej. Obie zastosowane w roku 2018 pożywki różnicowały efektywność (%) regeneracji tkanki kalusowej w zależności od obiektu (30-98%). Jednolity kalus haploidalny uzyskano po zastosowaniu pyłku *L. luteus* 500 oraz *L. mutabilis* LM.13. Analiza rozwoju woreczka zalążkowego przeprowadzona w roku 2019 oraz 2020 dla analizowanych układów krzyżowania *L. angustifolius* (4 genotypy) po przepyleniu *L. mutabilis* (1 genotyp) oraz *L. luteus* (dwa genotypy) pokazała inny przebieg w porównaniu do procesu samozapylenia, gdzie obserwowano zapłodnienie w okresie pełni pylenia, rozwój zarodka kilkukomórkowego w ciągu tygodnia oraz w stadium globularnym z wykształconym suspensorem po dwóch tygodniach. Po 48 h od przepylenia pyłkiem obcego gatunku odnotowywano obecność struktur kilkukomórkowych. Po 96 h można było zaobserwować kilkunastokomórkowe struktury, w tym widoczne struktury o dużych jadrach komórkowych czy drobniejsze, uorganizowane a po 168 h zdecydowanie bardziej rozbudowane. Ich położenie może wskazywać, że mamy do czynienia z partenogenezą. Odnotowywano też degenerujące woreczki zalążkowe w zalążku. Sam proces embriogenezy u łąbinu w początkowym jego okresie jest nietypowy i trudno dokonać klasyfikacji w konkretnym systemie embriogenezy, co jest związane z asynchronicznymi podziałami zarodka (Jaranowski 1962; Davies i Williams 1985). Zasadniczo odpowiada typowi Caryophyllad, odmianie *Medicago*. Jaranowski stwierdził (1962), iż w warunkach szklarniowych u *L. albus* zapłodnienie

następuje po 20 - 24h. Davies i Williams (1985) badali przebieg powstawania zarodków również u *L. mutabilis*, u którego przebieg embriogenezy zarodka był szybszy niż u *L. albus*. Przy krzyżowaniach bardzo istotnym elementem technicznym jest właściwy moment dokonania zapylenia. Przeprowadzona analiza w pierwszej części zadania pokazała, że w czasie pełni pylenia dochodzi do zapłodnienia a potem do dwóch tygodniu rozwoju zarodków w stadium globularnym, co potwierdzają wyniki uzyskane przez Wilson i wsp. (2008) przy realizacji krzyżowań z *L. angustifolius*. Wilson i wsp. również wykazali, że u *L. albus* oraz *L. mutabilis* proces przebiegu osadzania się pyłku, jego kiełkowania oraz docierania do zalążka w procesie samozapylenia w porównaniu do takich gatunków, jak *L. angustifolius*, *L. luteus* jest wolniejszy.

Przyjęta w niniejszym projekcie procedura pobierania zalążków ze strąków po maksymalnie możliwym czasie pozostawienia ich na roślinie (7-10-14 dni, potem strąki zaczynają opadać) wydaje się być słuszna, w kontekście otrzymanych kalusów w warunkach *in vitro*. Problemem do rozwiązania pozostaje odpowiedni dobór pożywki nieodzowny do konwersji szlaku komórek w kierunku morfo i organogenezy. Wyniki uzyskane przez Nadolską-Orczyk (1992) nad somatyczną embriogenezą potwierdzają konieczność prowadzenia wieloetapowej kultury w kontekście uzyskanych wyników w roku 2019. Potwierdziły to wyniki otrzymane w roku 2020, gdzie po zastosowaniu pulsacyjnej hodowli otrzymano zadawalający efekt, jeśli chodzi o regenerację tkanki kalusowej. Niestety nie udało się przekierować komórek na drogę różnicowania się i nie otrzymano roślin. Udało się ustabilizować tkanki kalusowe dla odmiany Emir. Zastosowanie prowadzenia hodowli pulsacyjnej odniosło pozytywny efekt w utrzymaniu w dobrej kondycji uzyskanych kalusów, zwłaszcza przy wykorzystaniu: B5+ 1NAA+ 2BA , B5 + 0,2 2,4D, B5+ 0,1 NAA+2BA +1mg TDZ naprzemiennie z B5.

Kluczową rolę w procesie gynogenezy mogą odgrywać zawarte w podłożu regulatory wzrostu, tak jak to miało miejsce, np. w przypadku *Psoralea corylifolia* L. MS (Chand i Sahrawat 2007) oraz przy prowadzeniu niniejszych badań nad *Lupinus angustifolius* L., gdzie po zmianie podłoża w 2019 w stosunku do 2018 roku uzyskano znacząco lepsze rezultaty. W roku 2020, gdzie materiał pochodził z pola do założenia doświadczenia, udało się zaindukować tworzenie kalusa, ale tempo zmian było dużo wolniejsze, a zalążki wyraźnie wykazywały się słabszą zdolnością do tworzenia tkanki kalusowej. Jak do tej pory u łubinu nie prowadzono badań nad skutecznością procesu gynogenezy. Natomiast proces gynogenezy wykorzystano skutecznie do indukcji haploidów u *Psoralea corylifolia* L. innego przedstawiciela z rodziny bobowatych. W obu doświadczeniach używano regulatorów wzrostu takich jak: 2,4-D, NAA, BA, GA3 – tylko nieco w innych połączeniach, oraz takich samych cukrów: sacharoza i maltoza. Różne było podłoże podstawowe, w przypadku *Psoralea corylifolia* L. używano pożywki MS (Chand i Sahrawat 2007) a w naszych badaniach głównie B5 oraz MS z modyfikacjami. W doświadczeniu *Psoralea corylifolia* L. najlepsze efekty zaobserwowano na pożywce MS, która zawierała dodatek NAA, 2,4-D oraz BA, najslabsze wyniki uzyskano natomiast na pożywce MS z 2,4-D i BA. Można wnioskować, że dodatek NAA spowodował lepszą indukcję kalusa niż jego brak (Chand i Sahrawat, 2007). W doświadczeniu stwierdzono również, że dodanie BA i/lub ABA do pożywek, które zawierają niskie stężenie auksyn czyli NAA bądź 2,4-D sprzyja dojrzewaniu zarodków, przechodzą one bowiem ze stadium kulistego do liścienia (Chand i Sahrawat 2007). Zauważono także zależność między dodatkiem GA3, a zwiększającą się częstotliwością kiełkowania zarodków, natomiast nie zaobserwowano tego w przypadku analizowanych obiektów łubinu wąskolistnego w niniejszym doświadczeniu. Podobne działanie do GA3 miał wzmóc dodatek maltozy, ale tak jak w

poprzednim przypadku zależność ta nie została potwierdzona na przykładzie analizowanych genotypów łubinu.

Sam proces gynogenezy w przypadku łubinu wąskolistnego nie przyniósł jeszcze oczekiwanych wyników w postaci haploidalnych roślin. Gynogeneza może być przydatna do produkcji roślin haploidalnych u takich gatunków, u których nie sprawdza się androgeniza.

Zarówno materiał biologiczny w postaci kalusa wyprowadzony na drodze krzyżowania oddalonego jak i gynogenezy wymaga szeregu pasaży, zwłaszcza częstych w pierwszych 4 tygodniach. W obu technikach w zależności od roku badań podjęcie rozwoju tkanki kalusowej miało miejsce od dwóch do czterech tygodni, w kolejnych obserwacjach prowadzonych co tydzień kolejnych zalążków ze zmianami nie przybywało. Zmiany częste podłoży są konieczne, ponieważ zaobserwowano szybkie przechodzenie komórek na szlak apoptozy i nie zawsze dawało się ten proces zahamować czy całkowicie odwrócić. Wykorzystanie pyłku obcego gatunku jest efektywniejsze w indukcji i rozwoju kalusa w porównaniu do wykorzystania samych zalążków – gynogeneza. Analiza ekspresji genów z kalusa otrzymanego z krzyżowania oddalonego (Zadanie 3) niestety pokazała stosunkowo niską ekspresję genów odpowiedzialnych za embriogenezę, a dodatek regulatorów inhibował jej poziom. Indukcja haploidów u łubinu jest sprawą na pewno niełatwą, ale uzyskane wyniki zaczynają ukierunkowywać zakres i etapy dalszych w przyszłości badań.

- Buschman-Loock A., Dambroth M., Menge-Hartmann U. (1992). Historical observation on interspecific crosses in the genus *Lupinus*. *Plant Breeding* 109: 82-95.
- Chand S., Sahrawat A.K. (2007). Embryogenesis and plant regeneration from unpollinated ovary culture of *Psoralea corylifolia*. *Biologia Plantarum* 51 (2): 223-228.
- Davies S., Williams W. (1985). The rate of morphogenesis of embryos and seeds in four species of grain legumes. *Annals of Botany*, vol. 56, (4): 429-435.
- Faluyi M.A., Williams W. (1981). Studies on the breeding system in lupin species a) self and cross compatibility in the three European lupin species b) percentage of out-crossing in *Lupinus albus*. *Z. Pflanzenzüchtung*: 233-239.
- Filutowicz A., Kuźdowicz A. (1951). Mikrotechnika roślinna. PWRiL, Warszawa.
- Galek R. (2010). Studies on the variability of some morphological and functional characters of *Lupinus* with particular consideration intra and interspecific hybrids. Monografie (Poland).
- Jaranowski J. 1962. Fertilization and embryo development in the genus *Lupinus* Tourn. Part II. Fertilization and embryo development following reciprocal specie hybridization. *Gen. Pol.* 3: 333-363.
- Nadolska-Orczyk A. (1992). Somatic embryogenesis of agriculturally important lupin species (*Lupinus angustifolius*, *L. albus*, *L. mutabilis*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* Kluwer Academic Publishers. Printed in the Netherlands. 28: 19-25'
- Przyborowski A.J., Samborska – Ciana, Wiwart M. (1996). Intra- and interspecific pollination between *Lupinus albus* L., *Lupinus mutabilis* Sweet. and *Lupinus angustifolius* L. *J. Appl. Genet.* 37(3): 261-275.
- Przyborowski J.A. (2003). Pre- i postzygotyczne bariery przy krzyżowaniu wybranych gatunków z rodzaju *Lupinus*. *Rozprawy i Monografie.* 78: 1-53.
- Williams W., Akhtar M.A., Faluyi M. (1980). Cross compatibility between European and American Lupin species. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 81: 225-232.
- Wilson, J. G., Clements, J. C., Quealy, J., Yang, H. (2008). Development of an interspecific

hybridisation protocol for *Lupinus*. In *Lupins for health and wealth proceedings of the 12th International Lupin Conference*:14-18.

2. Charakterystyka procesu androgenezy u wybranych genotypów *L. angustifolius*

Materiałem roślinnym do badań nad indukcją androgenezy były dwie odmiany *L. angustifolius*: Karo (lata 2018-2019) i Graf (lata 2018-2020). Nasiona obu odmian wysiewano systematycznie w okresie od kwietnia do sierpnia, co 2-3 tygodnie bezpośrednio do gruntu. Odkazane pąki rozgniatano w sterylnych warunkach w niewielkiej ilości płynnej pożywki, a następnie przesączano przez nylonowy filtr o wielkości oczek 44 μm i trzykrotnie oczyszczano przez wirowanie. Analizy mikroskopowe wykonano (żywołność, obs. kultury) przy wykorzystaniu mikroskopu odwróconego pola. W pąkach oceniono stadium rozwoju pyłku i jego barwność poprzez obserwację preparatów rozgniotowych i obserwacje w mikroskopie fluorescencyjnym.

W pierwszym roku badań (2018) w celu ustalenia optymalnego stadium rozwojowego mikrospor z kwiatostanów obydwu obiektów pobrano pąki kwiatowe o różnej długości w celu wytypowania takich, w których występują mikrospory. Zebrane wyniki dotyczące analizy mikrosporogenezy wskazują że u łubinu wąskolistnego czynnikiem bardziej skorelowanym ze stadium rozwojowym mikrospory jest barwa pylnika, nie jak u innych gatunków, u których indukowano androgenezę - wielkość pąka kwiatowego (Dujis i in. 1992). Ponadto badania wykazały, że rozwój mikrospor w indywidualnym pąku jest niesynchroniczny. W pylnikach pobranych z indywidualnego pąka obserwowano różne stadia rozwojowe np. tetrady, mikrospory i dojrzałe ziarna pyłku. Badania dotyczące wpływu szoku termicznego aplikowanego zarówno na kwiatostany (1 lub 3 dni w temperaturze 4°C) jak i mikrospory w kulturze (32°C lub 4°C na 1 lub 3 dni) wykazały, że pomimo zastosowania zróżnicowanych kombinacji doświadczenia (szoki temperaturowe, pożywki) w większości kultur obserwowano brak rozwoju mikrospor. Kalus uzyskano u odm Graf w kombinacji bez traktowania wstępnego kwiatostanów, gdzie kultura prowadzona była w pożywce MS i umieszczona na 3 dni w 4°C.

Dane literaturowe wskazują, że jedną z przyczyn trudności w indukcji androgenezy u strączkowych może być bardzo gruba egzyna, uniemożliwiająca dalszy rozwój mikrospory (Bayliss i in. 2004). W roku **2019** przeprowadzono wstępne badania dotyczące osłabienia egzyny mikrospor poprzez trawienie enzymatyczne mieszaninami zawierającymi enzymy trawiące hemicelulozę i pektyny. Zastosowane mieszaniny w znacznym stopniu wpłynęły na zwiększenie liczby komórek splazmolizowanych (ok. 50%), w porównaniu z kontrolą (30%). Analizowano również wpływ składu pożywki (trichostatyna A, 2,4-D, kinetyna) oraz temperatury na indukcję androgenezy. W niniejszych badaniach zastosowanie 0,1 μM trichostatyny nie przyniosło pożądanego efektu. Podziały odnotowano najliczniej (0,9%) na pożywce 190/2 (1 mg/l 2,4D i 1 mg/l kinetyny) prowadzonej w stałej temperaturze 26°C. Wynik ten potwierdza wcześniejsze obserwacje u łubinu, gdyż na pożywce zawierającej 2,4-D i kinetynę obserwowano wytwarzanie nielicznych struktur prozarodkowych (proembryo) (Simioniuc i in. 2010). Zastosowanie długotrwałego szoku termicznego (4°C/14 dni), na mikrospory w kulturze nie przyniosło pożądanego efektów, gdyż większość mikrospor nie wykazywała zmian morfologicznych nawet do 28 dnia kultury. Traktowanie mikrospor niską temperaturą najprawdopodobniej nie wpływa negatywnie na

żywołność, gdyż jak pokazały nasze wyniki, spadek ten obserwowano również w nietraktowanej szokiem termicznym kontroli. Literatura z zakresu haploidyacji roślin jasno wskazuje, że w prawidłowej kulturze, w tym czasie obserwuje się już występowanie wielokomórkowych agregatów (Custers 2003), czego w przeprowadzonym doświadczeniu praktycznie nie obserwowano. Analiza żywołności mikrospor w kulturze wykazała bardzo niski odsetek żywych komórek nieprzekraczającą 14% w pierwszej dobie kultury, a wynoszącą poniżej 7% w siódmej dobie kultury. Co nasuwa wniosek, że być może jedną z przyczyn oporności łubinu na indukcję androgeny w kulturach mikrospor jest ich niska żywołność, której konsekwencją jest obserwowany bardzo niski odsetek podziałów. Przeprowadzona analizę histologiczną tkanki kalusowej uzyskanej z doświadczenia w roku 2018 ujawniła różnice na poziomie morfologii komórek oraz elementów wiązek przewodzących między kalusem żywym i zamierającym.

Artykuły dotyczące analizy żywołności pyłku u łubinu wąskolistnego i innych przedstawicieli gatunku (Conterato i in. 2006, Clements i in. 2012) wskazują na przydatność do tego celu acetokarminu oraz barwnika Aleksandra. Badania te były jednak prowadzone na pyłku pobranym z otwartych kwiatów, a więc pyłku dojrzałym. Analiza danych literaturowych z zakresu indukcji androgeny w kulturach mikrospor u *Lupinus* spp. (Ormerod i Caligari 1994; Bayliss i in. 2004; Croser i in. 2006; Simioniuc i in. 2010) wskazała, że żywołność mikrospor w tych pracach nie była monitorowana. W związku z powyższym brak jest doniesień o metodach oceny żywołności pyłku u łubinu wąskolistnego szczególnie na wczesnych etapach jego rozwoju t.j podczas mikrogametogenezy. W celu opracowania takiej metody w roku 2020 z pąków kwiatowych z dwóch grup wielkości, które odpowiadały stadium rozwoju pyłku (t.j. 4-6 mm przewaga mikrospor, 8-10 mm przewaga dojrzałego pyłku) wykonano preparaty rozgniotowe, które barwiono pięcioma różnicowanymi barwnikami (acetokarmin, barwnik Alexandra, FDA), tetrazolina i błękit Evansa). Badania wykazały, że mikrospory łubinu przed ich przekształceniem się w dojrzały pyłek charakteryzują się etapem braku barwliwości przy użyciu tradycyjnych barwników oceny żywołności pyłku. Wyjątek stanowił barwnik fluorescencyjny FDA, po zastosowaniu, którego można było dokonać właściwego rozróżnienia. Natomiast w przypadku komórek pobranych z pylników znajdujących się w pąkach z drugiej klasy wielkości wszystkie zastosowane barwniki umożliwiały rozróżnienie pyłku żywego i martwego. Na podstawie tych wyników do dalszych badań żywołności mikrospor wytypowano FDA. Analiza żywołności mikrospor badanej odmiany łubinu barwnikiem FDA wykazała zaskakująco niską ich żywołność, która po izolacji i umieszczeniu w pożywce wynosiła kilka do kilkunastu %. W porównaniu do żywołności mikrospor innych gat. są to wartości dość niskie, np. u kapusty żywołność mikrospor po izolacji wynosiła 45-48% (Winarto i Teixeira da Silva 2011), 30-60% u kalafiora (Bhatia i in. 2016), czy 20-60% u pszenżyta (Žur i in. 2018). W roku 2019 po raz pierwszy przeprowadzono obserwacje żywołności mikrospor w kulturze. Uzyskane wyniki wskazały bardzo niski odsetek żywoży mikrospor (poniżej 10%), już dobę po ich izolacji i zawieszeniu w pożywkach indukujących androgenę. Postawiono więc hipotezę, że potencjalną przyczyną niskiej żywołności może być stres związany z odkażaniem materiału roślinnego. W związku z tym w bieżącym roku założono doświadczenia, w których część pąków przeznaczonych do założenia kultury została odkażana wg standardowej procedury stosowanej dotychczas t.j pąki otwierano poprzez odchylenie okwiatu, ze względu na konieczność oceny stadium rozwoju pylników i w takiej formie poddawano procedurze odkażania. Druga część pąków pozostała poddana odkażaniu w formie nienaruszonej. Uzyskane wyniki wskazały, że otwieranie pąków podczas odkażania wpływa negatywnie na kondycję mikrospor,

gdyż żywotność w pierwszej dobie kultury była ponad trzykrotnie niższa w porównaniu do żywotności mikrospor izolowanych z pąków nienaruszonych. W związku z tym tegoroczne badania skupione były na dalszych poszukiwaniach odpowiedniego sposobu prowadzenia kultury umożliwiającego indukcję podziałów mikrospor. Analizowano wpływ pożywki dwuwarstwowej na rozwój mikrospor uwolnionych z pylników jak i całych pylników. System pożywki dwuwarstwowej nie był do tej pory testowany do indukcji androgenezy u łubinu. Obecność węgla aktywowanego w dolnej warstwie pożywki dwuwarstwowej nie wpłynęła znacząco na mikrospory w kulturze. Uzyskane wyniki wskazują, że mikrospory prowadzone w systemie dwuwarstwowym w pierwszej dobie kultury zachowują żywotność na poziomie ok. 11-16% w zależności od pożywki, co nie różni się znacznie od wyników uzyskanych w roku 2019 w klasycznej kulturze zawieszinowej. Obserwacje kultury wykazały, że większość mikrospor, niezależnie od zastosowanej pożywki nie wykazywała zmian morfologicznych nawet do 21 dnia kultury. Odnotowano pojedyncze podziały komórkowe, które tylko w jednym przypadku postępowały dalej doprowadzając do otrzymania kalusa. Kultura całych pylników w systemie dwuwarstwowym zaowocowała otrzymaniem kalusa. Rozwój kalusa obserwowano po zastosowaniu obu badanych pożywek. Otrzymane wyniki wskazują, że powodem braku pozytywnej odpowiedzi androgenicznej u łubinu wąskolistnego może być niska żywotność mikrospor od samego początku założonej kultury. Należy szukać czynników, które na etapie stresów odkażania, izolacji i tworzenia kultury nie wpłyną negatywnie na izolowane mikrospory i pozwolą zachować ich żywotność. Otrzymane wyniki potwierdzają doniesienia literaturowe, że indukcja androgenezy u łubinu wąskolistnego w kulturach mikrospor jest niezwykle trudna. Problem ten nie dotyczy jednak tylko tego gatunku, ale całej rodziny. Pomimo licznych prób, wyniki wskazują na otrzymanie pojedynczych agregatów lub prozarodków u gatunków z rodziny *Fabaceae* (Ormerod i Caligari 1994; Bayliss i in. 2004; Crosser i in. 2006). Jedynie Ochatt i wsp. (2009) donosi o otrzymaniu 3 roślin z 23 badanych gatunków w rodzinie *Fabaceae* tj. u *Pisum sativum*, *Lathyrus sativus* i *Medicago truncatula*.

- Bayliss K.L., Wroth J.M., Cowling W.A. (2004) Pro-embryos of *Lupinus* spp. produced from isolated microspore culture. *Aust J Agric Res* 55:589–593.
- Bhatia R., Dey S.S., Sood S. (2016). Optimizing protocol for efficient microspore embryogenesis and doubled haploid development in different maturity groups of cauliflower (*B. oleracea* var. *botrytis* L.) in India. *Euphytica* 212, 439–454.
- Clements J.C., Wilson J., Sweetingham M.W., Quealy J., Francis G. (2012). Male sterility in three crop *Lupinus* species. *Plant breeding* 131:155-163.
- Conterato I.F., Schifino-Wittmann M.T. (2006). New chromosome numbers, meiotic behaviour and pollen fertility in American taxa of *Lupinus* (*Leguminosae*): contributions to taxonomic and evolutionary studies. *Bot J Linn Soc* 150:229–240.
- Croser J.S., Lulsdorf M.M., Davies P.A., Clarke H.J., Bayliss K.L., Mallikarjuna N., Siddique K.H.M. (2006). Toward doubled haploid production in *Fabaceae*: progress, constraints, and opportunities. *Critical Reviews in Plant Sciences* 25/2:139-157.
- Custers, J. B. M. (2003). Microspore culture in rapeseed (*Brassica napus* L.). In: Maluszynski M., Kasha K.J., Forster B.P., Szarejko I. (eds) *Doubled haploid production in crop plants*. Springer, Dordrecht, 2003: 185-193. 27.
- Duijs J.M.G.J., Voorrips R.E., Visser D., Custers, J.B.M. (1992). Microspore culture is successful

- in most crop types of *Brassica oleracea* L. *Euphytica* 60:45–55.
- Ochatt S., Pech C., Grewal R., Conreux C., Lulsdorf M., Jacas L. (2009). Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (*Fabaceae*). *J Plant Physiol* 166:1314–1328.
- Ormerod A.J., Caligari P.D.S. (1994). Anther and microspore culture of *Lupinus albus* in liquid culture medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 36: 227–236.
- Simioniuc D., Burlacu-Arsene M.C., Morariu A., Lipşa F.D. (2010). Induction of the embryogenesis process in anther and microspores cultures at the *Lupinus albus* species. *Lucrări Ştiinţifice ser Agronomie* 53 (1): 60–63
- Winarto B., Teixeira da Silva J.A. (2011). Microspore culture protocol for Indonesian *Brassica oleracea*. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 107: 305–315.

3. Charakterystyka genów morfogennych w kalusach *L.angustifolius*

W roku 2018 do testowania markerów SNP wykorzystano 20 rekombinowanych linii wsobnych – RIL powstałych przez skrzyżowanie odmiany ‘Emir’ oraz linii LAE-1. Zastosowano genotypowanie markerami SNP techniką KASP (Kompetitive allele specific PCR). W kolejnym roku 2019 wykonano analizę porównawczą ekspresji (transkryptomów) techniką RNAseq dla kalusa ‘Graf’. W roku 2020 badano zmiany ekspresji kluczowych genów morfogennych na różnych pożywkach na których inkubowane były eksplantaty kalusów ‘Graf’ oraz ‘Emir’.

Pierwszym etapem prac realizowanym w roku 2018 było opracowanie zestawu markerów SNP, który pozwoliłby w jednoznaczny sposób identyfikować rośliny haploidalne. W tym celu przetestowano 80 markerów SNP, które wykazywały wysoką heterozygotyczność w kolekcji łubinu wąskolistnego KGHRiN. Następnie przetestowano wybrane markery na 20 liniach RILs. Otrzymane wyniki pozwoliły na ocenę stopnia homozygotyczności wybranych linii. Na 20 analizowanych linii 18 wykazało pełną homozygotyczność w 80 badanych loci. Dwie analizowane linie wykazały heterozygotyczność w trzech (linia EL/02/1/53) oraz pięciu (linia EL/02/1/7) analizowanych loci. Dalsze analizy bioinformatyczne pozwoliły na wytypowanie 46 z wstępnie wybranych 80 markerów w taki sposób aby lokalizowały się w odpowiednich fragmentach chromosomów. Najwięcej markerów zlokalizowanych było na chromosomie NLL-16 – 9 markerów. Na ośmiu chromosomach zlokalizowano po jednym markerze (NLL-01, NLL-02, NLL-03, NLL-04, NLL-07, NLL-09, NLL-10, NLL-18). Kolejnym krokiem było zaprojektowanie sond FISH, które obejmowały swoją sekwencją pozycje wytypowanych markerów SNP. Ostatnim etapem prac w roku 2018 była izolacja całkowitego RNA z kalusa odmiany Graf pochodzącego z mikrospor oraz generowanych z tkanek somatycznych (kontrola) metodą *in vitro*. W roku 2019 wykonano sekwencjonowanie transkryptomów wyizolowanych w poprzednim roku techniką RNAseq na platformie HiSeq PE150. Następnie wykorzystując potoki analityczne i narzędzia bioinformatyczne przeprowadzono ekspresję porównawczą, w celu wskazania genów różniących transkrypty kalusa pochodzącego z mikrospor i kalusa z tkanek somatycznych. Uzyskane wyniki sekwencjonowania transkryptomu wskazują na ekspresję genów wskazywanych w literaturze, jako związane z procesem somatycznej embriogenezy (Ouakfaoui i in. 2010; Magnani i in. 2017). Uzyskane wyniki wskazują, iż w tkankach kalusa uzyskanego z mikrospor z czterech głównych czynników transkrypcyjnych regulujących proces somatycznej embriogenezy określanych wspólnie

mianem LAFL (Jia i in. 2014) ekspresji ulega jedynie LEC1. Jest to także jedyny gen z opisywanych w literaturze, jako zaangażowany w procesy somatycznej embriogenezy, u którego stwierdzono istotną różnicę między kalusem kontrolnym a kalusem pochodzącym z kultur mikrospor. Pozostałe czynniki transkrypcyjne z grupy LAFL (LEC2, FUSCA3, ABI3) nie miały ekspresji w badanym materiale. Jednakże stwierdzono ekspresję dla genu AGL15, który jest bezpośrednio kontrolowany przez LEC2 (Braybrook i Harada 2008). Wynik ten może sugerować, iż w badanych tkankach na wcześniejszym etapie (kilka lub kilkadziesiąt godzin) przed pobraniem materiału do izolacji RNA geny LEC2 oraz potencjalnie pozostałe geny z grupy LAFL wykazywały ekspresję. Uzyskane wyniki analizy ekspresji różnicowej (DE) wykazały różny poziom ekspresji w analizowanym materiale jedynie dla 407 genów. W porównaniu do wyników podobnych eksperymentów u innych roślin (Yang i in. 2012; Elbl i in. 2015; Wu i in. 2015) uzyskana liczba genów z istotnie statystycznie różną ekspresją jest bardzo mała. Wskazuje to na bardzo podobny poziom ekspresji genów w badanym materiale. Podobne wnioski można wyciągnąć analizując współczynniki korelacji pomiędzy badanymi próbkami. Tak wysokie podobieństwo ekspresji genów pomiędzy kalusem z mikrospor, a kontrolą (kalusem uzyskanym klasycznie) wskazuje, iż na wczesnych etapach rozwoju kalus uzyskany z mikrospor nie różni się od kalusa uzyskanego klasycznie. Uzyskane wyniki wskazują, iż konieczne jest dokładniejsze zbadanie w kilku punktach czasowych kalusa uzyskanego z mikrospor. We wczesnym etapie kalus ten nie wykazuje istotnych różnic w stosunku do kalusa kontrolnego. Możemy zaobserwować w nim ekspresję genów inicjujących organogenezę np. genów STM, ANT, AS1, KAN2 (Magnani i in. 2017) na poziomie zbliżonym do kalusa kontrolnego. Obserwowane na późniejszym etapie zamieranie musi być spowodowane włączeniem jakiegoś nieznanego do tej pory mechanizmu hamującego ekspresję genów związanych z embrio i morfogenezą i prowadzącego do śmierci komórek. W przyszłości powinna zostać także zbadana dynamika zmian ekspresji genów związanych z embriogenezą takich jak LEC1, BBM, AS1, KAN2 w czasie proliferacji kalusa z mikrospor. Analizy takie powinny pomóc we wskazaniu punktu czasowego w którym ekspresja zaczyna spadać i jakieś nieznane mechanizmy komórkowe uruchamiają procesy związane z śmiercią komórkową. Przeprowadzone analizy GO wskazały łącznie 8 numerów GO nadreprezentowanych w zbiorze genów z różną ekspresją w tkankach kalusa z mikrospor i tkankach kontrolnych. Na temat żadnego z zidentyfikowanych numerów GO w literaturze nie ma doniesień, aby był związany z procesami somatycznej embriogenezy, organogenezy lub procesami zamierania komórek. Na podstawie wyników RNAseq oraz danych literaturowych w roku 2020 wybranych zostało 14 ortologów genów kluczowych w procesie morfogenezy. Zbadany został wpływ składu pożywki na poziome ekspresji tych genów u dwóch kalusów łubinu wąskolistnego. Pierwszy kalus został otrzymany w wyniku krzyżowania oddalonego (odmiana Emir), a drugi w wyniku androgenezy (Graf). Ekspresja genów zaangażowanych w procesy embriogenezy została dotychczas dość dobrze poznana u roślin modelowych (Hecht i in. 2001). Brak jest jednak doniesień na temat ekspresji genów z tej grupy w kalusach, a także wpływu składników pożywki i wieku eksplantatów. W związku z tym zaproponowane badania są pierwszym tego typu opracowaniem określającym wpływ wieku eksplantatów oraz składu pożywki. Większość opracowań skupia się na zmianach i wzajemnych interakcjach poszczególnych genów w trakcie procesu somatycznej embriogenezy (Yang i Zhang 2010). Dość dobrze poznany został indukujący wpływ roślinnych hormonów wzrostu takich jak auksyny czy kwas abscysynowy na ekspresję kluczowych genów - inicjatorów procesu somatycznej embriogenezy: ANT, STM, AGL15, SERK,

LEC czy LEA (Chugh i Khurana 2002). Brak jest jednak opracowań na temat wpływu składu pożywki (np. stężenie regulatorów) na poziom ekspresji tych genów. Niewiele prac było dotąd prowadzonych na tkankach kalusa. Prace prowadzone na tkankach kalusa dobrze proliferującej linii kukurydzy Hi II prowadzone techniką mikromacieżową wykazały zmiany w ekspresji ponad 12 000 genów. W procesie inicjacji somatycznej embriogenezy zmianę ekspresji wykazało ponad 1 000 genów, w tym największą pulę stanowiły geny o nieznannej funkcji, a także geny scharakteryzowane jako związane z podstawowym metabolizmem (Che i in. 2006). Wyniki te nie odnoszą się jednak do składów pożywek czy stężenia zastosowanych regulatorów wzrostu na poziom ekspresji badanych genów. W naszych dotychczasowych badaniach nie udało się zainicjować z sukcesem procesu embriogenezy i tworzenia zarodków haploidalnych. Uzyskane wyniki wskazują, iż istnieją przeszkody uniemożliwiające przejście kalusa z proliferacji w proces embriogenezy. Wszystkie badane geny, kluczowe dla inicjacji procesu somatycznej embriogenezy, wykazały spadek ekspresji po dłuższej inkubacji kalusów (Emir, Graf) na zastosowanych pożywkach. Wyniki te sugerują, iż w zastosowanych pożywkach obecne były jakieś składniki, które inhibowały ekspresję tychże genów. Inną możliwą przyczyną może być niewłaściwy dobór regulatorów wzrostu lub ich niewłaściwe stężenie. Takie wyniki niestety nie pozwalają na wybór lub choćby wskazanie kierunku, w którym można byłoby udoskonalać wykorzystane pożywki. Nie mniej jednak, na podstawie uzyskanych wyników udało się pogrupować badane geny w dwie grupy. Ekspresja genów w każdej z grup jest ze sobą skorelowana. Ponieważ geny w każdej grupie reagują podobnie na badane pożywki w dalszych badaniach przesiewowych możliwe będzie przeanalizowanie przedstawicieli każdej z grup. Dzięki temu możliwe będzie przetestowanie większej ilości wariantów pożywek, co z kolei podniesie szanse na opracowanie w przyszłości pożywki, która nie będzie wpływała hamująco na ekspresję genów związanych z inicjacją procesu embriogenezy.

- Braybrook S. A., Harada, J. J. (2008). LECs go crazy in embryo development. *Trends in plant science*, 13(12), 624-630.
- Chugh A., Khurana P. (2002). Gene expression during somatic embryogenesis. *Curr Sci*, 83(6), 715-730.
- Elbl P., Lira B. S., Andrade S. C. S., Jo, L., dos Santos A. L. W., Coutinho L. L., Rossi, M. (2015). Comparative transcriptome analysis of early somatic embryo formation and seed development in Brazilian pine, *Araucaria angustifolia* (Bertol.) Kuntze. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 120(3), 903-915.
- El Ouakfaoui S., Schnell J., Abdeen A., Colville A., Labbé H., Han, S. Miki, B. (2010). Control of somatic embryogenesis and embryo development by AP2 transcription factors. *Plant molecular biology*, 74(4-5), 313-326.
- Hecht V., Vielle-Calzada J. P., Hartog M. V., Schmidt E. D., Boutilier K., Grossniklaus, U., de Vries S. C. (2001). The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology*, 127(3), 803-816.
- Jia H., Suzuki, M., McCarty D. R. (2014). Regulation of the seed to seedling developmental phase transition by the LAFL and VAL transcription factor networks. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, 3(1), 135-145.
- Magnani E., Jiménez-Gómez J. M., Soubigou-Taconnat L., Lepiniec L., Fiume E. (2017). Profiling

the onset of somatic embryogenesis in Arabidopsis. *BMC genomics*, 18(1), 1-12.

Wu X. M., Kou, S. J., Liu Y. L., Fang Y. N., Xu Q., Guo W. W. (2015). Genomewide analysis of small RNA s in nonembryogenic and embryogenic tissues of citrus: micro RNA-and si RNA-mediated transcript cleavage involved in somatic embryogenesis. *Plant Biotechnology Journal*, 13(3), 383-394.

Yang X., Zhang X., Yuan D., Jin F., Zhang Y., Xu J. (2012). Transcript profiling reveals complex auxin signalling pathway and transcription regulation involved in dedifferentiation and redifferentiation during somatic embryogenesis in cotton. *BMC plant biology*, 12(1), 110.

Yang X., Zhang X. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Science*, 29(1), 36-57.