



Fundusze Europejskie  
dla Rozwoju Społecznego

Dofinansowane przez  
Unię Europejską



## **Materiały dydaktyczne**

z kursu realizowanego w ramach projektu „Najlepsi z natury! Podnoszenie kompetencji osób dorosłych przez UPP”, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027, na podstawie umowy nr FERS.01.05-IP.08-0469/23

### **Prowadząca: dr hab. Dorota Weigt**

Forma realizacji: Wykład z elementami prezentacji multimedialnej

### **Tytuł wykładu: Haploidy roślin uprawnych (część 2)**

### **Embriogeneza mikrospor - podstawy teoretyczne i praktyka laboratoryjna**

#### **Cel wykładu:**

Celem wykładu było przekazanie uczestnikom aktualnej wiedzy oraz praktycznych aspektów związanych z technologią pozyskiwania haploidów i podwojonych haploidów (DH) u roślin uprawnych. Szczególny nacisk położono na mechanizmy embriogenezy mikrospor jako jedną z kluczowych metod androgenezy in vitro. W trakcie wykładu omówiono czynniki biologiczne i środowiskowe wpływające na efektywność procesu, problematykę albinizmu oraz ryzyka związane z podwajaniem liczby chromosomów. Przedstawiono również najnowsze kierunki badań, w tym zastosowanie inżynierii genetycznej – zwłaszcza modyfikacji białka centromerowego CENH3 – w kontekście indukowanej haploidyzacji. Wykład miał na celu zwiększenie kompetencji uczestników w zakresie biotechnologicznych metod przyspieszania postępu hodowlanego.

#### **Zakres merytoryczny wykładu:**

##### **1. Wprowadzenie: podstawy teoretyczne rozmnażania roślin**

Wykład rozpoczęto przeglądem typów rozmnażania płciowego i bezpłciowego w kontekście znanych metod haploidyzacji (androgeneza, gynogeneza, partenogeneza, krzyżowanie oddalone, haploidyzacja indukowana genetycznie). Omówiono przebieg rozwoju zarodka roślin jedno i dwuliściennych oraz zróżnicowanie genetyczne tkanek w nasionach (zarodek, bielmo, okrywa nasienna) wynikające z procesu podwójnego zapłodnienia. Ponadto przedstawiono charakterystykę i rolę haploidów w badaniach naukowych i hodowli roślin — ich znaczenie w przyspieszeniu procesu tworzenia linii homozygotycznych i strategii ich pozyskiwania.

## **2. Embriogeneza mikrospor**

Omówiono mechanizm przekształcania mikrospor w zarodki bez udziału zapłodnienia. Szczegółowo przedstawiono przebieg tego procesu polegającego na przekształceniu niedojrzałych mikrospor – męskich komórek rozrodczych – w zarodki zdolne do rozwoju całych roślin, bez udziału zapłodnienia dzięki reprogramowaniu szlaku rozwojowego z gametofitycznego na sporofityczny. Zmiana ta zachodzi pod wpływem czynników stresu i inicjuje symetryczne podziały prowadzące do powstania struktur zarodkowych.

## **3. Czynniki wpływające na efektywność embriogenezy mikrospor**

Wykład obejmował przegląd czynników biologicznych i środowiskowych wpływających na efektywność embriogenezy mikrospor. Podkreślono znaczenie odpowiedniego stadium rozwojowego mikrospor w momencie izolacji, wskazując, że najwyższą efektywność uzyskuje się w stadium średnio lub późno jednojądrowym. Przedstawiono wpływ warunków wzrostu roślin donorowych (m.in. temperatura, światło, skład podłoża) oraz różnorodnych traktowań wstępnych, takich jak stropy abiotyczne: niska lub wysoka temperatura, stres suszy, głodzenie osmotyczne, a także stosowanie antyoksydantów i inhibitorów metylacji DNA. Omówiono również rolę pożywek indukcyjnych, ich składu chemicznego (regulatory wzrostu, dodatki takie jak DMSO, mannitol, n-butanol, zearalenon, związki miedzi, kofeina, ), a także znaczenie obecności załączni w efektywnej indukcji procesu. Zwrócono uwagę na silny wpływ genotypu roślin donorowych, w tym specyficznych alleli oraz czynników epigenetycznych, które mogą zwiększać lub ograniczać wydajność procesu androgenozy.

## **4. Genotyp jako kluczowy czynnik biologiczny**

Podczas wykładu omówiono rolę genotypu rośliny donorowej jako jednego z głównych czynników determinujących powodzenie procesu embriogenezy mikrospor. Zwrócono uwagę, że skuteczność indukcji, jakość powstałych zarodków oraz efektywność regeneracji roślin są silnie zależne od uwarunkowań genetycznych i epigenetycznych. Przedstawiono grupę tzw. genów embriogenicznych, takich jak BABY BOOM (BBM), LEAFY COTYLEDON (LEC1, LEC2), WUSCHEL (WOX), AGP, SERK (Somatic Embryogenesis Receptor-like Kinase) oraz geny z rodziny AP2/ERF, których ekspresja

warunkuje zdolność mikrospor do przeprogramowania i przejścia na ścieżkę rozwoju sporofitycznego.

Omówiono również czynniki epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, modyfikacje histonów i poziom aktywności małych RNA. Przedstawiono działanie substancji modulujących te procesy, w tym inhibitorów metylacji DNA (np. 5-azacytydyna) oraz inhibitorów deacetylaz histonowych (np. trichostatyna A), jako środków wspomagających indukcję embriogenezy. Podkreślono znaczenie interakcji genotypowo-środowiskowych, które wpływają na ekspresję wspomnianych szlaków molekularnych i mogą stanowić krytyczny element decydujący o powodzeniu całego procesu.

### **5. Podwajanie liczby chromosomów:**

W ramach wykładu omówiono znaczenie etapu podwajania liczby chromosomów w procesie tworzenia linii podwojonych haploidów (DH). Przedstawiono metody chemicznej indukcji podwojenia z zastosowaniem związków takich jak kolchicina, oryzalina, trifluralina czy amitryna, które zakłócają formowanie wrzeciona kariokinetycznego, prowadząc do endomitozy. Zwrócono uwagę na potencjalne trudności związane z tym etapem – w tym zamieranie regenerantów oraz częste pojawianie się mutacji w traktowanych tkankach, zwłaszcza przy nadmiernym stężeniu mutagenu. Podkreślono również znaczenie optymalizacji warunków aplikacji (czas, stężenie, metoda) w celu uzyskania żywotnych i płodnych roślin DH.

### **6. Problematyka regeneracji albinosów**

Podczas wykładu zwrócono także uwagę na zjawisko albinizmu, będące jednym z głównych ograniczeń w procesie regeneracji roślin pszenicy w kulturach mikrospor. Albinosy, czyli rośliny pozbawione chlorofilu, stanowią istotny odsetek regenerantów i są niezdolne do przeżycia poza warunkami *in vitro*. Wykład obejmował przegląd przyczyn tego zjawiska, w tym zakłócenia w ekspresji genów plastydowych i jądrowych, stres oksydacyjny oraz niedostateczne dostosowanie warunków hodowli (np. światło, skład pożywki). Omówiono również aktualne kierunki badań nad ograniczaniem albinizmu, w tym dobór odpowiednich genotypów, stosowanie antyoksydantów, poprawę warunków wzrostu oraz modyfikacje protokołów regeneracji. Podkreślono, że problem ten ma znaczący wpływ na praktyczną wartość technologii DH w pszenicy i stanowi przedmiot intensywnych prac badawczych.

### **7. Najnowsze metody pozyskiwania haploidów**

W końcowej części wykładu przedstawiono najnowsze kierunki badań nad indukowaniem haploidów z wykorzystaniem narzędzi inżynierii genetycznej. Omówiono mechanizm haploidyzacji indukowanej przez modyfikacje białek centromerowych, w szczególności CENH3 – kluczowego składnika kinetochoru. Przedstawiono wyniki badań, w których

zastąpienie natywnej wersji CENH3 wersją zmodyfikowaną lub jej osłabienie prowadziło do eliminacji chromosomów jednego z rodziców po zapłodnieniu, czego skutkiem były zarodki haploidalne. Wskazano również na inne podejścia, takie jak celowane mutacje genów biorących udział w formowaniu wrzeciona kariokinetycznego lub fuzji jąder, a także zastosowanie CRISPR/Cas9 do wywoływania kontrolowanego zaburzenia segregacji chromosomów. Podkreślono potencjał tych metod jako alternatywy dla klasycznych technik *in vitro*, zwłaszcza w gatunkach trudnych w androgenizie, oraz ich znaczenie dla przyspieszenia postępu hodowlanego.

## **Podsumowanie:**

Wykład poświęcony był nowoczesnym metodom pozyskiwania haploidów i linii podwojonych haploidów (DH) w roślinach uprawnych, ze szczególnym uwzględnieniem embriogenezy mikrospor jako jednej z najefektywniejszych strategii androgenyzy *in vitro*. Omówiono szerokie spektrum zagadnień – od podstaw biologii rozrodu roślin, przez szczegółowy przebieg procesu embriogenezy, aż po czynniki warunkujące jego efektywność: warunki środowiskowe, stadium rozwojowe mikrospor, traktowania stresowe, skład pożywek oraz genotyp rośliny donorowej. Szczególną uwagę poświęcono również wyzwaniom praktycznym, takim jak wysoka częstotliwość regeneracji roślin albinoidalnych w przypadku pszenicy, oraz nowatorskim podejściom biotechnologicznym, takim jak edycja białka centromerowego CENH3. Podkreślono znaczenie integracji wiedzy genetycznej, epigenetycznej i fizjologicznej w doskonaleniu istniejących protokołów androgenyzy oraz rozwijaniu nowych strategii indukcji haploidów w trudnych taksonomicznie gatunkach roślin.

## **Literatura:**

Eliby, S., Bekkuzhina, S., Kishchenko, O., Iskakova, G., Kylyshbayeva, G., Jatayev, S., Soole, K., Langridge, P., Borisjuk, N., & Shavrukov, Y. (2022). Developments and prospects for doubled haploid wheat. *Biotechnology Advances*, 60, 108007. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2022.108007>

Kanaoka, Y., Kuniyoshi, D., Inada, E., Koide, Y., Okamoto, Y., Yasui, H., & Kishima, Y. (2018). Anther culture in rice proportionally rescues microspores according to gametophytic gene effect and enhances genetic study of hybrid sterility. *Plant Methods*, 14(1), Article 102. <https://doi.org/10.1186/s13007-018-0370-z>

Bilgin, O., Sarier, S. Y., Başer, İ., & Balkan, A. (2022). Enhancement of androgenesis and plant regeneration from wheat anther culture by seed pre-sowing gamma irradiation. *Journal of Tekirdag Agricultural Faculty*, 19, 354–365. <https://doi.org/10.33462/JOTAF.993270>

Zambriborshch, I., Shestopal, O., Traskovetskaya, V., Vasiliev, O., Halaiev, O., Halaieva, M., Afinogenov, O., & Chekalova, M. (2024). Obtaining dihaploid lines of winter bread wheat with

complex resistance to rust and common bunt by anther culture in vitro. *Cereal Research Communications*, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s42976-023-00466-3>

Kanbar, O. Z., Lantos, C., Chege, P. K., Kiss, E., & Pauk, J. (2020). Generation of doubled haploid lines from winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding material using in vitro anther culture. *Czech Journal of Genetics and Plant Breeding*, 56, 150–158. <https://doi.org/10.17221/113/2019-CJGPB>

Kanbar, O. Z., Lantos, C., Kiss, E., & Pauk, J. (2021). Efficient in vitro anther culture for androgenic plant production in F3–6 winter wheat (*Triticum aestivum* L.) bulk combinations. *Indian Journal of Biotechnology*, 20, 284–293.

Islam, S. S. M. (2010). The role of drought stress on anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 20, 55–61. <https://doi.org/10.3329/PTCB.V20I1.5965>

Dubas, E., Krzewska, M., Surówka, E., Kopeć, P., Springer, A., Janowiak, F., Weigt, D., Mikołajczyk, S. K., Telk, A., & Żur, I. (2024). Nowe perspektywy poprawy indukcji embriogenezy mikrospor w wysoce opornych liniach pszenicy ozimej. *Plants*, 13, 363. <https://doi.org/10.3390/plants13030363>

Dubas, E., Castillo, A. M., Żur, I., et al. (2021). Microtubule organization changes severely after mannitol and n-butanol treatments inducing microspore embryogenesis in bread wheat. *BMC Plant Biology*, 21, 586. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03173-0>

Weigt, D., Siatkowski, I., Magaj, M., Tomkowiak, A., & Nawracała, J. (2020). Impact of ionic liquids on induction of wheat microspore embryogenesis and plant regeneration. *Agronomy*, 10(6), 839. <https://doi.org/10.3390/agronomy10060839>

Žukauskaitė, A., Saiz-Fernández, I., Bielešová, K., Iškauskienė, M., Zhang, C., Smýkalová, I., ... & Doležal, K. (2023). New PEO-IAA-inspired anti-auxins: Synthesis, biological activity, and possible application in hemp (*Cannabis sativa* L.) micropropagation. *Journal of Plant Growth Regulation*, 42(12), 7547–7563.

Castillo, A. M., Sánchez-Díaz, R. A., & Vallés, M. P. (2015). Effect of ovary induction on bread wheat anther culture: Ovary genotype and developmental stage, and candidate gene association. *Frontiers in Plant Science*, 6, 402. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00402>

Dermaïl, A., Mitchell, M., Foster, T., Fakude, M., Chen, Y.-R., Suriharn, K., Frei, U. K., & Lübberstedt, T. (2024). Haploid identification in maize. *Frontiers in Plant Science*, 15, 1378421. <https://doi.org/10.3389/fpls.2024.1378421>

Bryxová, P., Fernández-Cusimamani, E., & Klíma, M. (2025). Current insights into various in vitro dihaploidization techniques used in Brassica oil crops. *Agronomy*, 15, 179. <https://doi.org/10.3390/agronomy15010179>

Shrestha, S., Koo, D.-H., Evers, B., Wu, S., Walkowiak, S., Hucl, P., Pozniak, C., Fritz, A., & Poland, J. (2023). Wheat doubled haploids have a marked prevalence of chromosomal aberrations. *The Plant Genome*, 16, e20309. <https://doi.org/10.1002/tpg2.20309>

Shim, Y.-S., Kasha, K. J., Simion, E., & Letarte, J. (2006). The relationship between induction of embryogenesis and chromosome doubling in microspore cultures. *Plant Cell Reports*, 25(8), 784–792. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0123-4>

Wang, S., Jin, W., & Wang, K. (2019). Centromere histone H3- and phospholipase-mediated haploid induction in plants. *Plant Methods*, 15, 42. <https://doi.org/10.1186/s13007-019-0429-5>

Gajecka, M., Marzec, M., Chmielewska, B., et al. (2021). Zmiany w biogenezie plastydów prowadzące do powstawania regenerantów albinosów w kulturze mikrospor jęczmienia. *BMC Plant Biology*, 21, 22. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-02755-z>

Żur, I., Gajecka, M., Dubas, E., Krzewska, M., & Szarejko, I. (2015). Identification of QTLs associated with albino plant formation and some new facts concerning green versus albino ratio determinants in triticale (*×Triticosecale* Wittm.) anther culture. *Euphytica*. <https://doi.org/10.1007/s10681-015-1509-x>

Canonge, J., Roby, C., Hamon, C., Potin, P., Pfannschmidt, T., & Philippot, M. (2021). Occurrence of albinism during wheat androgenesis is correlated with repression of the key genes required for proper chloroplast biogenesis. *Planta*, 254(6), 123. <https://doi.org/10.1007/s00425-021-03773-3>