



Dyscyplina naukowa: Nauki biologiczne

mgr inż. Katarzyna Anna Pachota

Rozprawa doktorska pt.:

Zmienność roślin z rodziny *Poaceae* jako efekt modyfikacji warunków regeneracji w kulturach *in vitro*

Variation in Poaceae plants due to modification of regeneration conditions in tissue culture

(Monotematyczny cykl publikacji naukowych)

Praca doktorska wykonana w Instytucie Hodowli i Aklimatyzacji Roślin-Państwowym Instytucie Badawczym w Radzikowie

Promotor: **prof. dr hab. Piotr Bednarek**

Promotor pomocniczy: **dr hab. inż. Renata Orłowska**

Lublin 2023

Składam serdeczne podziękowania

Panu Prof. dr hab. Piotrowi Tomaszowi Bednarkowi
za zaproponowanie interesującego tematu
i wiele cennych wskazówek podczas jego opracowania,
za cierpliwość i zaangażowanie podczas pisania pracy

Pani dr hab. inż. Renacie Orłowskiej
dziękuję za nieocenioną pomoc, zaufanie,
wrozumiałość oraz wsparcie.
Bez Pani pomocy niniejsza praca nie mogłaby powstać

Panu prof. dr hab. Januszowi Zimmemu za czas
poświęcony na niezwykle dociekliwe
przeczytanie pracy doktorskiej i wiele cennych
uwag, które uporządkowały tekst

Pracę tę dedykuję
Mężowi i córce

Oświadczenie promotora rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data Podpis promotora

Oświadczenie promotora pomocniczego rozprawy doktorskiej

Oświadczam, że niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana pod moim kierunkiem i stwierdzam, że spełnia ona warunki do przedstawienia jej w postępowaniu o nadanie stopnia naukowego.

Data Podpis promotora pomocniczego

Oświadczenie autora rozprawy doktorskiej

Świadom/a odpowiedzialności prawnej oświadczam, że:

- niniejsza rozprawa doktorska została przygotowana przez mnie samodzielnie pod kierunkiem Promotora/~~Promoterów~~/Promotora pomocniczego* i nie zawiera treści uzyskanych w sposób niezgodny z obowiązującymi przepisami.
- przedstawiona rozprawa doktorska nie była wcześniej przedmiotem procedur związanych z uzyskaniem stopnia naukowego.
- niniejsza wersja rozprawy doktorskiej jest tożsama z załączoną na płycie CD/pendrive wersją elektroniczną.

Data Podpis autora

* niepotrzebne skreślić

SPIS TREŚCI

WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ	5
STRESZCZENIE	6
SUMMARY	8
1. PRZEGLĄD LITERATURY	10
1.1. WPROWADZENIE	10
1.2. WYKORZYSTANIE I ZNACZENIE PSZENŻYTA	11
1.3. ZRÓŻNICOWANIE PSZENŻYTA	12
1.4. OGRANICZENIA HODOWLI PSZENŻYTA	14
1.5. REGENERACJA ROŚLIN W KULTURACH <i>IN VITRO</i>	16
1.6. ZMIENNOŚĆ ZWIĄZANA Z UZYSKIWIANIEM ROŚLIN NA DRODZE KULTUR TKANKOWYCH	20
1.6.1. <i>Biochemiczne aspekty zmienności wywołanej kulturą in vitro</i>	24
1.6.2. <i>Molekularne źródła zmienności (epi)genetycznej wywołanej kulturą in vitro</i>	24
1.7. METODY BADANIA ZMIENNOŚCI WYWOŁANEJ KULTURĄ <i>IN VITRO</i>	25
1.8. BIOLOGICZNO-MOLEKULARNY SYSTEM BADANIA ZMIENNOŚCI WYWOŁANEJ KULTURĄ <i>IN VITRO</i>	29
2. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL PRACY	32
3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE	34
4. PREZENTACJA WYBRANYCH WYNIKÓW BADAŃ ORAZ ICH DYSKUSJA	38
5. PODSUMOWANIA I WNIOSKI	59
6. BIBLIOGRAFIA	61
7. OŚWIADCZENIA O PROCENTOWYM UDZIALE AUTORÓW W OPRACOWANIU PUBLIKACJI	83
8. ZAŁĄCZNIKI	85

WYKAZ PUBLIKACJI NAUKOWYCH SKŁADAJĄCYCH SIĘ NA ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

P1. Orłowska R., Pachota K.A., Machczyńska J., Niedziela A., Makowska K., Zimny J., Bednarek P.T.* (2020) Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. *Electronic Journal of Biotechnology*, 43: 8-15, doi:10.1016/j.ejbt.2019.11.001.

[IF₂₀₂₁=2,826; MEiN₂₀₂₁=70]

P2. Pachota K.A., Orłowska, R.,* Bednarek, P.T. (2022) Medium composition affects the tissue culture-induced variation in triticales regenerants *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151: 35-46, doi:10.1007/s11240-022-02327-z

[IF₂₀₂₁=2,726; MEiN₂₀₂₁=100]

P3. Pachota K.A., Orłowska R.* (2022) Effect of copper and silver ions on sequence and DNA methylation changes in triticales regenerants gained *via* somatic embryogenesis. *Journal of Applied Genetics*, 63: 663-675, doi:10.1007/s13353-022-00717-9

[IF₂₀₂₁=2,653; MEiN₂₀₂₁=140]

P4. Pachota K.A.* (2022) Comparison of tissue culture-induced variation in triticales regenerants obtained by androgenesis and somatic embryogenesis. *Cereal Research Communications*, doi:10.1007/s42976-022-00300-2

[IF₂₀₂₁=1,240; MEiN₂₀₂₁=20]

Suma punktów za publikacje wchodzące w skład dysertacji według komunikatu MEiN obowiązującego w roku wydania pracy: **330**

Współczynnik Journal Impact Factor (IF) dla publikacji wchodzących w skład dysertacji przyjęto według obowiązującej punktacji w roku opublikowania publikacji: **9,445**

Liczba cytowań (bez autocytowań) wg Scopus na dzień 1.03.2023 r. wynosi 37, h-index-3

STRESZCZENIE

Pszenżyto jest ważnym gatunkiem rolniczym wykorzystywanym głównie na cele paszowe, a ostatnio także na cele konsumpcyjne (piekarnictwo). Gatunek ten powstał w wyniku krzyżowań międzygatunkowych pszenicy i żyta. W zależności od ploidalności wyróżnia się formy di-, tetra-, heksa- i oktaploidalne. Ze względu na ograniczoną ilość form rodzicielskich, pszenżyto cechuje brak występowania odrębnych pul genowych, a różnice pomiędzy materiałami są podyktowane warunkami siedliska, presją hodowlaną lub tym czy odmiana jest jara czy ozima. Głównym ograniczeniem w hodowli gatunku jest niewielkie zróżnicowanie genetyczne. Stąd, istnieje potrzeba jego rozszerzenia. Jedną z możliwości jest ponowne odtworzenie gatunku, lub wykorzystanie metody mutagenyzy albo pośrednio poprzez wykorzystanie technologii kultur *in vitro*. Ostatnia metoda pozwala na wprowadzanie zmian, mogących indukować (epi)mutacje i tym samym zwiększać zróżnicowanie genetyczne. Wykorzystanie kultur *in vitro*, a szczególnie androgenyzy, wiąże się z problemem uzyskania dużej liczby zielonych regenerantów.

Celem prezentowanych badań, było między innymi zwiększenie wydajności regeneracji zielonych roślin u pszenżyta, pszenicy i jęczmienia optymalizując skład jonów miedzi (II) oraz srebra (I) w pożywce indukującej oraz czas trwania kultury *in vitro*. Uzyskane wyniki pokazały, że modyfikując skład pożywki (zmieniając stężenie jonów miedzi) można zwiększyć wydajność androgenyzy u pszenżyta. Innym aspektem niniejszej pracy było sprawdzenie jak skład pożywki indukującej (stężenia jonów Cu^{2+} i Ag^+) oraz czas trwania kultury tkankowej wpływają na zmienność sekwencyjną oraz zmienność wzorów metylacji DNA identyfikowanych u regenerantów wyprowadzonych na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych oraz wyprowadzonych na drodze somatycznej embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych u pszenżyta. Zmienność wzorów metylacji szacowano w określonych sekwencjach nukleotydów DNA (tzw. konteksty sekwencji), odzwierciedlających symetryczną (CG i CHG) oraz asymetryczną (CHH) metylację cytozyny (H oznacza A, C, T). W tym celu, wykorzystano metodę metAFLP ilościowo szacującą zmiany genetyczne oraz zmiany wzorów metylacji DNA indukowane u regenerantów w odniesieniu do rośliny będącej źródłem eksplantatów. Stwierdzono, że w przypadku regeneracji na drodze androgenyzy, wyższym stężeniom jonów miedzi w pożywce towarzyszył niższy poziom zmienności wywołanej kulturą *in vitro*. Podobne badania dotyczące regenerantów uzyskanych z niedojrzałych zarodków zygotycznych wykazały, że najwyższy poziom zmienności wywołanej kulturą *in vitro*

obserwowano w obecności najniższego stężenia jonów miedzi. Badanie porównawcze obu metod regeneracji uwzględniające zmienność sekwencyjną w zależności od poziomu Cu^{2+} w różnych kontekstach sekwencji pokazało, że w CG i CHH różnica między regenerantami uzyskanymi na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy dotyczyła tylko poziomu zmienności sekwencyjnej. Natomiast odnotowano różnice między regenerantami uzyskanymi na drodze somatycznej embriogenezy i androgenezy w poziomie demetylacji w kontekście CG oraz metylacji *de novo* DNA w kontekście CHH wraz ze zmianą stężenia jonów miedzi.

Niniejsza praca pokazała, że optymalizacja warunków kultur *in vitro* może zwiększyć wydajność regeneracji zielonych roślin u niektórych gatunków zbóż, możliwym jest również wpływanie na poziom zmienności wywołanej kulturą *in vitro* u regenerantów, co może być wykorzystane do wzbogacenia puli genowej gatunku. Stwierdzono również, że u regenerantów uzyskiwanych poprzez dwa rodzaje kultur *in vitro* (androgeneza vs embriogeneza somatyczna) poziom demetylacji oraz metylacji *de novo* był zależny od składu pożywki indukującej oraz częściowo od czasu trwania kultury *in vitro*.

SUMMARY

Triticale is a vital crop mainly used as a feed grain and, more recently, as a food ingredient (in baking). The species originated from interspecific crosses between wheat and rye. Depending on ploidy, di-, tetra-, hexa-, and octoploid forms are distinguished. Due to the limited number of parental forms, triticale is characterized by the absence of distinct gene pools. Differences between materials are dictated by habitat conditions, breeding pressure, or variety type (spring, winter). The main limitation in breeding the species is the low genetic diversity. Hence, there is a need to expand it. One possibility is to re-create the species, use the mutagenesis method, or indirectly through *in vitro* culture technology. The last method allows the introduction of changes that can induce (epi)mutations and thus increase genetic diversity. The use of *in vitro* cultures, particularly androgenesis, is associated with the problem of obtaining a large number of green regenerants.

The aim of the present study, among others, was to increase the efficiency of green regeneration in triticale, wheat, and barley by optimizing the composition of copper (II) and silver (I) ions in the induction medium and the duration of the *in vitro* culture. The results showed that by modifying the composition of the medium (changing the concentration of copper ions), the efficiency of androgenesis could be increased in triticale. Another goal of the present study was to see how the composition of the induction medium (Cu^{2+} and Ag^+ ion concentrations) and the duration of tissue culture affect the sequence variation and the variation of DNA methylation patterns identified in regenerants derived by androgenesis in anther cultures and those derived by somatic embryogenesis in cultures of immature zygotic embryos in triticale. The variation in methylation patterns was estimated at specific DNA nucleotide sequences (so-called sequence contexts), reflecting symmetric (CG and CHG) and asymmetric (CHH) cytosine methylation (H stands for A, C, T). The metAFLP method was used to quantitatively estimate genetic changes and alternations in DNA methylation patterns induced in regenerants concerning the explant source plant. In the case of regeneration by androgenesis, higher copper ion concentrations in the medium were accompanied by lower levels of *in vitro* culture-induced variation. A similar study on regenerants obtained from immature zygotic embryos showed that the highest level of *in vitro* culture-induced variation was observed in the lowest concentration of copper ions. A comparative study of the two regeneration methods considering sequence variation with Cu^{2+} levels in different contexts showed that in CG and CHH, the difference

between regenerants obtained by androgenesis and somatic embryogenesis concerned only the level of sequence variation. In contrast, differences were noted between regenerants obtained by somatic embryogenesis and androgenesis in the level of demethylation in the context of CG and *de novo* DNA methylation in the context of CHH, together with a change in copper ion concentration.

The present work has shown that optimizing *in vitro* culture conditions can increase the efficiency of green plant regeneration in some cereal species. It is also possible to influence the level of *in vitro* culture-induced variation in regenerants, which can be used to enrich the gene pool of the species. It was also found that in regenerants obtained through two types of *in vitro* culture (androgenesis vs. somatic embryogenesis), the level of demethylation and *de novo* methylation depended on the composition of the inducing medium and partly on the duration of the *in vitro* culture.

1. PRZEGLĄD LITERATURY

1.1. Wprowadzenie

Wysokie wymagania glebowe pszenicy w przeciwieństwie do żyta sprawiły, że w drugiej połowie XIX wieku wzrosło zainteresowanie międzygatunkowymi krzyżowaniami tych zbóż. Celem prac było uzyskanie takich gatunków, które charakteryzowałyby się np., zaletami pszenicy uprawianej na lekkich glebach żyrnych i w klimacie ostrzejszym niż preferowany dla pszenicy. Możliwość uzyskania hybryd pszenicy (*Triticum ssp.*) i żyta (*Secale cereale* L.) sugerował A. S. Wilsona w Szkocji w 1875 roku. Jednak dopiero w 1888 r. niemiecki hodowca Rimpau skrzyżował pszenicę (*Triticum aestivum* L.) i żyto (*Secale cereale* L.). Z uzyskanych nasion trzy były haploidami, a 12 wykazywało cechy amfidiploidów [1]. Natomiast intensywne prace selekcyjne nad nowym gatunkiem uprawnym zwanym pszenżytem (\times *Triticosecale* Wittm. ex A. Camus (synonim: \times *Triticale* Tscherm.-Seys. ex Müntzing), rodzina *Poaceae*, podrodzina *Pooideae*, plemię *Triticeae*) rozpoczęły się w latach 30-tych XX wieku.

W zależności od ploidalności pszenicy wykorzystanej do krzyżowań wyróżnia się tetra-, hekso-, okto-, i dekaploidalne pszenżyto pierwotne. Formy pierwotne *Triticale* uzyskano przez krzyżowanie pszenic tetraploidalnych (*T. durum*, *T. turgidum*, *T. dicoccum*, *T. timopheevi*) z żytem (*S. cereale*) [2, 3]. Natomiast formy wtórne *Triticale* uzyskano przez krzyżowanie oktaploidalnych form *Triticale* z heksaploidalnymi [4]. I tak, formy tetraploidalne powstały w wyniku krzyżowania pszenicy diploidalnej *T. monococcum* L. var. *macedonicum* ($2n = 2x = 14$) z żytem diploidalnym ‘Dańkowskie Złote’ ($2n = 2x = 14$) [5, 6]. Takie pszenżyta w postaci diploidalnej posiadają 14 chromosomów, a genom można zapisać w postaci wzoru: $2n = 14 = AARR$, gdzie A – to genom pochodzący od pszenicy, a R genom żytni (*S. cereale* L.). Formy heksaploidalne powstały z krzyżowania pszenicy tetraploidalnej (*T. durum* i *T. turgidum* L.) oraz żyta (*S. cereale* L. lub np., *S. montanum*). Ich genom w postaci diploidalnej opisuje wzór: $2n = 42 = AABBRR$, gdzie A i B odpowiada genomowi pszenicy, a R żyta. Kolejną formą pszenżyta o wzorze $2n = 56 = AABBDDRR$ są formy oktaploidalne, będące międzygatunkową krzyżówką heksaploidalnej pszenicy *T. aestivum* ($2n = 6x = 42$) i żyta (*S. cereale* L.: $2n = 2x = 14$) [7, 8]. Natomiast krzyżowanie pszenicy heksaploidalnej ($2n = 6x = 42$) z żytem tetraploidalnym ($2n = 4x = 28$), celem uzyskania pszenżyta dekaploidalnego ($2n = 10x = 70$) nie dały pozytywnych wyników. Takie mieszańce

cechowały się słabym wigorem, były niepłodne i niestabilne cytogenetycznie [9]. Chociaż pszenżyto oktoploidalne zostało opracowane i zbadane jako pierwsze [10] nie zostało przyjęte w hodowli ze względu na mniejsze znaczenie praktyczne niż pszenżyta heksaploidalne [11].

W latach 50., uwagę hodowców zwróciło pszenżyto heksaploidalne [10, 12, 13]. Intensywne prace hodowlane i badawcze realizowano do lat 90. XX wieku. Niewątpliwą zaletą pszenżyta heksaploidalnego okazały się liczne cechy żyta jak np., silnie rozwinięty system korzeniowy [14], niskie wymagania glebowe, odporność na suszę, zimotrwałość [15-17], a także odporność na choroby grzybowe oraz szkodniki [18, 19]. Bez wątpienia, uzyskanie heksaploidalnego ozimego pszenżyta wtórnego (będącego wynikiem koniugacji chromosomów genomu A i B o różnej ploidalności, co prowadzi do zwiększenia zmienności genetycznej [20]) wyhodowanego na Węgrzech w 1968 r. [12]), a następnie jarego w 1970 w Kanadzie [2] pozwoliło hodowcom uzyskać wyniki bliskie oczekiwaniom. W Polsce prace nad pszenżytym wtórnym były realizowane przez Akademię Rolniczą w Lublinie, Stacje Hodowli Roślin w Laskach i w Choryni oraz w Zakładzie Doświadczalnym IHAR "Małyszyn" w Gorzowie Wielkopolskim. Jednak pierwszą zarejestrowaną odmianę pszenżyta, „Lasko”, uzyskano w Poznańskiej Hodowli Roślin w roku 1982 [21].

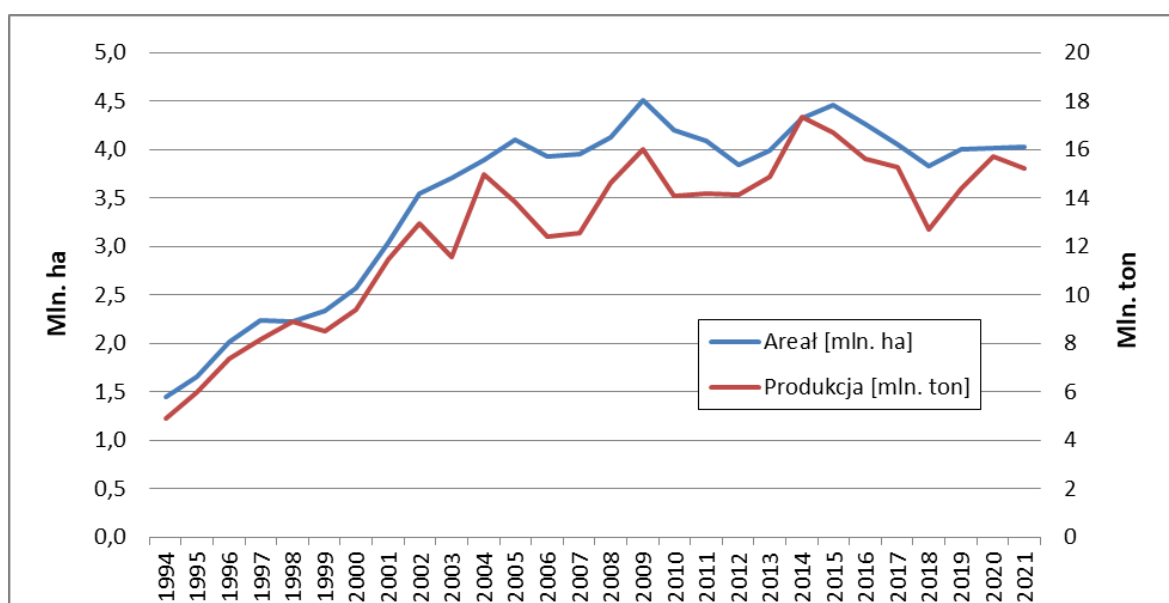
Pszenżyto wtórne charakteryzuje się większą stabilnością meiotyczną niż pszenżyto pierwotne chociaż opisano pewne różnice w ilości uniwalentów pomiędzy formami pszenżyta 6x z cytoplazmą heksaploidalnych i tetraploidalnych pszenic [22]. Ponadto, pszenżyto wtórne pozwala uzyskać substytucje chromosomów genomu D w miejsce chromosomów żytnich. Należy jednak podkreślić fakt, że nawet w przypadku pszenżyta wtórnego zmienność genetyczna gatunku jest bardzo ograniczona, a jej zwiększenie jest priorytetem hodowli [23].

1.2. Wykorzystanie i znaczenie pszenżyta

Pszenżyto wykorzystywane jest głównie jako pasza dla zwierząt hodowlanych, szczególnie w żywieniu drobiu [24]. Z powodzeniem stosuje się je w przemyśle gorzelniczym i piwowarskim [25, 26], a także w piekarnictwie, np. do produkcji krakersów [27, 28]. Ponadto, może być również wykorzystywane do produkcji bioetanolu [29] i biogazu [30]. Dodatkowo wykazano, że pszenżyto produkuje wyższą biomasę

w porównaniu z pszenicą, jęczmieniem i żytem [30]. Udokumentowane są również odmiany przeznaczone na potrzeby piekarnictwa do wypieku chleba [31].

W ciągu 45 lat odnotowano wzrost powierzchni upraw z 467 ha w 1975 r. do 3,8 mln ha powierzchni na świecie w 2020r. [32]. Ponadto poczynając od 1994 do 2014 r. obserwowano także wzrost produkcji pszenżyta na świecie z pewną stabilizacją w ciągu ostatnich 8 lat (Ryc. 1). Ze względu na przystosowanie do różnych warunków środowiskowych, pszenżyto jest alternatywną uprawą, która na glebach słabej jakości radzi sobie lepiej niż pszenica [33] i w porównaniu z innymi zbożami, wykazuje lepszą odporność na choroby grzybowe [34].



Rycina 1. Wzrost produkcji pszenżyta na świecie w latach 1994-2020 (FAO 2022).

1.3. Zróżnicowanie pszenżyta

Sposób uzyskania pszenżyta na drodze krzyżowań międzygatunkowych, a co za tym idzie ograniczona do form rodzicielskich zmienność genetyczna sprawia, że gatunek ten cechuje relatywnie niewielkie zróżnicowanie. Badania cech morfologicznych, fizjologicznych, składowych plonu oraz zawartości białka wykonane na 1006 genotypach heksaploidalnego pszenżyta ozimego, pochodzących z różnych źródeł za pomocą analizy czynnikowej, wykazały występowanie kilku odrębnych grup. W analizie tej pierwsze trzy składowe główne, w zależności od badanej cechy, tłumaczyły od 63 do 80% całkowitej wariancji pomiędzy grupami [35]. Cechy morfologiczne były również wykorzystane we wcześniejszych badaniach nad różnicowaniem genotypów pszenżyta [36-38], jednak ze względu na ograniczoną liczbę cech dostępnych do analizy oraz ich zależność od

czynników środowiskowych badania takie mają obecnie marginalne znaczenie [39] i do tego typu badań zaczęto stosować także markery DNA [40].

Występowanie struktury genetycznej populacji potwierdziły badania molekularne, wykonane za pomocą 57 markerów SSR (ang. Simple Sequence Repeat; sekwencje mikrosatelitarne) [41] z wykorzystaniem 80 heksaploidalnych europejskich form pszenżyta ozimego. Badania te wykazały, że zmienność wahała się w przedziale 0.07 – 0.86. Analiza skupień ujawniła, że materiały pszenżytnie tworzyły kilka grup skupień, przy czym skupienia odzwierciedlały np., rodowód badanych materiałów. Stwierdzono jednak, że w obrębie poszczególnych skupień występowały formy, które ze względu na rodowód czy pokrewieństwo nie powinny występować w danej grupie. Autorzy pracy zasugerowali, że takie grupowanie mogło być wynikiem wymiany materiałów roślinnych między hodowcami. Analogiczne prace wykonane na 232 formach hodowlanych pszenżyta pochodzących z polskich hodowli ujawniły obecność słabej struktury genetycznej. Analiza Bayesianowska wykonana z wykorzystaniem markerów hybrydacyjnych typu DArT (ang. Diversity Arrays Technology) wykazała obecność trzech grup, natomiast analiza wariancji molekularnej ujawniła, że aż 86% wytłumaczonej wariancji to wynik zmienności w obrębie, a 14% to wariancja pomiędzy grupami [23]. Markery DArT zastosowano również do analizy zróżnicowania zmienności genetycznej innych 144 form pszenżyta. Analiza skupień ujawniła, że badane formy wykazywały 60% podobieństwo, przy czym dwa główne skupienia odzwierciedlały siedliska ich wzrostu [42]. Wystąpienie struktury genetycznej natomiast obserwowano w badaniach materiałów pochodzących z Brazylii uzyskanych z dwóch hodowli. Analiza 54 genotypów za pomocą markerów SSR z wykorzystaniem analizy skupień wykazała obecność siedmiu grup [43]. Tak duże zróżnicowanie wydaje się jednak zaskakujące w kontekście badań wykonanych na 80 heksaploidalnych genotypach reprezentujących światową kolekcję gatunku, gdzie stwierdzono tylko pięć grup skupień [44], czy też badań 161 linii pszenżyta pochodzących z całego świata [45]. W ostatnim przypadku markery DArT i analiza PCoA (ang. Principal Co-ordinate Analysis) ujawniły obecność dwóch grup. Pierwsza była reprezentowana przez formy jare a druga przez ozime. Przy czym formy jare cechowało relatywnie większe zróżnicowanie niż ozime, a dwie pierwsze składowe główne tłumaczyły 33,4% wariancji między grupami. Należy zaznaczyć, że nie zawsze wykorzystanie markerów DNA do różnicowania genotypów pszenżyta okazuje się skuteczną metodą. Przykładem mogą być markery GBS (ang. Genotyping By Sequencing). Okazało się, że ich wykorzystanie

w odniesieniu do 121 odmian pszenżyta pochodzących z państw europejskich nie wykazało obecności silnej struktury genetycznej, którą można by powiązać z pochodzeniem badanych materiałów [46]. Podobny wynik uzyskano za pomocą markerów SSR badając 128 europejskich odmian pszenżyta ozimego [47], gdzie pierwsze dwie osie główne tłumaczyły ok 22,4% wariacji pomiędzy materiałami z różnych państw, jednak nie obserwowano wyraźnych cech strukturyzacji badanej populacji chociaż analiza wariacji molekularnej pokazała, że 14% wariacji wynikało z różnic pomiędzy materiałami w zależności od państwa pochodzenia.

Podsumowując, wydaje się uzasadniona opinia, że dostępne obecnie heksaploidalne pszenżyta raczej nie wykazują silnej struktury genetycznej chociaż cechują się zróżnicowaniem genetycznym. Tworzenie się struktury genetycznej wynika głównie z tego czy mamy do czynienia z pulą form ozimych lub jarych, ewentualnie jest warunkowana krajem pochodzenia czy siedliskiem. Natomiast identyfikacja struktury genetycznej zależy prawdopodobnie od rodzaju markerów użytych do badań.

1.4. Ograniczenia hodowli pszenżyta

Podstawowe ograniczenia postępu biologicznego hodowli pszenżyta wynikają między innymi ze spadku odporności na patogeny, z trudności w hodowli heterozyjnej czy z ograniczonej zmienności genetycznej gatunku.

Pszenżyto jest gatunkiem, które przez wiele lat pozostawał niewrażliwy na choroby zbóż. Jednak wraz ze wzrostem areалу pszenżyta, istniejące patogeny dostosowały się, a także pojawiły się nowe, szczególnie grzyby, które porażają pszenżyto. Wśród tych patogenów największe znaczenie ma mączniak prawdziwy (*Blumeria graminis* DC.; synonim *Erysiphe graminis*), na który pszenżyto było odporne przez ponad 130 lat [48]. Z uwagi na to, że Polska jest wiodącym producentem pszenżyta, dla polskiej hodowli i postępu biologicznego niezwykle ważne jest wprowadzanie odmian odpornych na patogeny. Dotychczas prowadzone badania hodowlane pozwoliły na zwiększenie odporności pszenżyta na mączniaka prawdziwego, rdzę brunatną i żółtą co ma swoje odzwierciedlenie w odmianach wprowadzanych w 2021 roku do Krajowego rejestru odmian [49]. Proces uzyskiwania nowych odmian pszenżyta odpornych na patogeny jest w ostatnich latach bardzo intensywnie wspomagany przez nowoczesne narzędzia genetyki molekularnej takie jak systemy markerowe AFLP (ang. Amplified Fragment Length Polymorphism), SSR, RAPD (ang. Random Amplified Polymorphic DNA), RFLP (ang.

Restriction Fragment Length Polymorphism), STS (ang. Sequence-Tagged Sites) i SCAR (ang. Sequence Characterized Amplified Region) wykorzystywane w badaniach genów odporności np. na mączniaka prawdziwego zbóż *B. graminis* [50-55].

Formy uprawne pszenżyta charakteryzują się ograniczonym poziomem zmienności co jest konsekwencją stosunkowo wąskiej puli genetycznej na etapie tworzenia pszenżyta oraz ograniczonej liczby dostępnych dla hodowców genotypów tego gatunku. Stąd też, istnieje potrzeba poszerzenia zmienności genetycznej pszenżyta poprzez ponowne jego uzyskanie na bazie większej puli genotypów wyjściowych.

Zwiększenie potencjału pszenżyta wiąże się także z hodowlą heterozyjną, która wykorzystuje zjawisko bujności mieszańców pokolenia F1. Na całym świecie hodowla heterozyjna pszenżyta bazuje przede wszystkim na cytoplazmatycznej męskiej sterylności (CMS) typu *Triticum timopheevi* (Tt) [56, 57]. Podstawowym problemem hodowli jest uzyskanie linii matecznych, które zachowują sterylność pyłku [58]. Obecnie opracowywany jest alternatywny system bazujący na CMS Pampa [58]. Jednak do jego praktycznego wykorzystania, mimo wielu zalet (np. stabilność linii matecznych) wciąż nie dochodzi, gdyż uzyskiwane plony są niedostateczne w stosunku do wzorca [59].

Mimo ciągłego postępu w hodowli heterozyjnej nadal pozostają ograniczenia, które dotyczą, niskiej zmienności genetycznej materiałów do krzyżowań. Rozwiązaniem wydaje się ponowne odtworzenie gatunku i tym samym zwiększenie wyjściowej puli genetycznej. Można również wykorzystać np., metody mutagenyzy czy też potencjał jaki niosą ze sobą kultury tkankowe z regeneracją roślin na drodze androgenyzy [60-62].

1.5. Regeneracja roślin w kulturach *in vitro*

Początki technologii kultur *in vitro* sięgają XIX wieku, kiedy to pojawiła się teoria komórkowej budowy organizmów Schleidena (w 1838r) i Schwanna (w 1839) mówiąca, że żywe organizmy są zbudowane z komórek. Prace te dały podwaliny austriackiemu uczonemu, Haberlandtowi do ogłoszenia w 1902 roku teorii totipotencji komórek mówiącej, że każda żywa komórka roślinna hodowana w odpowiednich warunkach może zainicjować regenerację dowolnej tkanki, organu czy też całej rośliny.

W trakcie embriogenezy z pojedynczej komórki formuje się zarodek, z którego rozwija się roślina. W warunkach *in vivo* pierwotną komórką jest diploidalna zygota, która powstała w wyniku połączenia się dwóch gamet w procesie zapłodnienia. Taką embriogenezę nazywamy zygotyczną, a zarodki zygotycznymi, jej odpowiednikiem w warunkach *in vitro* jest embriogeneza somatyczna (SE), gdzie rozwój zarodka odbywa się z komórki somatycznej, z pominięciem procesu zapłodnienia, a powstający zarodek nazywa się somatycznym. Somatyczną embriogenezę po raz pierwszy opisano w 1958 u marchwi [63, 64], natomiast wstępne próby SE u pszenżyta [65, 13, 66] skutkowały uzyskaniem roślin, które charakteryzowały się niestabilnością kariotypu. Udaną próbę uzyskania regenerantów drogą SE u pszenżyta podjęli Eapen i Rao [67], gdzie eksplantatem były niedojrzałe kwiatostany, zaś Stolarz i Zimny, oraz wsp. [68, 69] uzyskali rośliny poprzez kalus uzyskany w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych. W przypadku somatycznej embriogenezy najistotniejszym momentem jest ustanowienie embriogenicznej kompetencji komórek znajdujących się w eksplantacie oraz tworzenie się osi apikalno-bazalnej struktury zarodka [70]. Uzyskiwanie zarodków somatycznych może odbywać się w dwojaki sposób: bezpośrednio z tkanek eksplantatu, mogą nimi być fragmenty blaszki liściowej jak u kupkówki pospolitej (*Dactylis glomerata*) [71] oraz pośrednio przez kalus [72]. Kultury prowadzone na pożywcze indukującej w obecności auksyn (2,4-D: kwas 2,4 dichlorofenoksyoctowy; Dicamba: kwas 2-metoksy-3,6-dichlorobenzoesowy) ulegają licznym podziałom, co w konsekwencji prowadzi do wytworzenia się kalusa, czyli tkanki niejednorodnej pod względem histologicznym [73].

Szczególnym przypadkiem embriogenezy jest androgeneza (A). Androgeneza to proces, w którym struktury zarodkopodobne i zarodki, a następnie rośliny haploidalne lub rośliny będące podwojonymi haploidami (ang. doubled haploid: DH) powstają z mikrospor w kulturach pylników [74] lub izolowanych mikrospor [61]. Warunki kultury *in vitro* muszą być tak dobrane aby mikrospory uległy przeprogramowaniu ze szlaku

gametofitowego, pierwotnie realizowanego, na szlak sporofitowy prowadzący do powstania androgenicznych zarodków [75-77]. Zainicjowanie przeprogramowania mikrospor odbywa się poprzez zastosowanie jednego lub kilku czynników stresowych takich jak szok temperaturowy lub osmotyczny, stosowanie regulatorów wzrostu czy modyfikacja źródła węgla [78-83]. Wykorzystując proces androgenezy można uzyskać rośliny homozygotyczne w znacznie krótszym czasie niż stosując chów wsobny [84, 85]. Mimo oczywistych zalet procesu androgenezy, należy wymienić występowanie szeregu problemów, jak niską efektywność regeneracji zielonych roślin, która w dużej mierze jest spowodowana występowaniem roślin albinotycznych [86] czy występowanie zmienności (epi)genetycznej identyfikowanej na poziomie regenerantów [87].

Rośliny homozygotyczne można również wyprowadzić wykorzystując gynogenezę gdzie następuje rozwój rośliny haploidalnej z gametofitu żeńskiego (woreczka zalążkowego lub niezapylonych zalążków [88, 89]. Inną opcją jest technika eliminacji chromosomów jednego z rodziców w krzyżowaniach oddalonych (metoda krzyżowania z *Hordeum bulbosum*) [90].

Wśród czynników wpływających na regenerację roślin metodami kultur *in vitro* należy wymienić takie, które są związane z rośliną będącą dawcą eksplantatu, a więc rośliną donorową (mateczną), będą to: gatunek [91, 92, 86, 93-95], genotyp [96, 97], stan fizjologiczny [98], wiek [99], stadium rozwojowe rośliny donorowej [100, 101] oraz źródło eksplantatu [102-104]. Drugą grupę czynników stanowią te, które są związane ze środowiskiem zewnętrznym, a więc z warunkami prowadzenia kultury tkankowej i należą do nich: skład pożywki [105], czas trwania kultury *in vitro* [106] i ilość pasaży [107], temperatura [108], oświetlenie [109], a także szczególnie w przypadku androgenezy rodzaj stresu abiotycznego [110], który inicjuje proces przeprogramowania niedojrzałych mikrospor z rozwoju gametofitowego na sporofitowy [111].

Dla wielu roślin uzyskanie regenerantów na drodze somatycznej embriogenezy jest procesem dość łatwym. Gatunkiem, który dobrze poddaje się procesowi SE jest np. marchew [112, 113] czy też inne modelowe rośliny jak lucerna [114], kukurydza [115] czy ryż [116]. Od czasu pierwszych badań poświęconych SE u marchwi stale rosła liczba roślin wyższych, z których uzyskiwano zarodki somatyczne i regenerowano rośliny. Zjawisko SE udokumentowano u co najmniej 200 gatunków roślin okrytozalążkowych [117]. U niektórych gatunków jednak z większą trudnością dochodzi do zainicjowania

powstawania struktur embriogenicznych, zarodków somatycznych oraz do regeneracji roślin [118].

Proces androgenezy w kulturach *in vitro* jest zależny od gatunku i nie wszystkie gatunki w równym stopniu reagują na jego indukcję, np. gatunki, uważane za modelowe w badaniu tego procesu, reagują dość dobrze. Tak jest w przypadku niektórych linii rzepaku (*Brassica napus* L.) [91], tytoniu (*Nicotiana tabacum* L.) [95] czy jęczmienia (*Hordeum vulgare* L.) [86]. Inne gatunki, uznane za odporne, prezentują niską lub bardzo niską odpowiedź androgeniczną, a w innych przypadkach protokół pozwalający na efektywne regenerowanie roślin na drodze androgenezy wciąż czeka na opracowanie, jak w przypadku gatunków ważnych ze względów rolniczych, takich jak choćby groch [92, 93] czy pomidor (*Solanum lycopersicum* L.) [94]. Odpowiedź androgeniczna wielu innych gatunków znajduje się pomiędzy tymi dwoma skrajnymi efektywnościami regeneracji na drodze androgenezy. U gatunków tych można zaindukować proces embriogenezy z mikrospor, ale nie ma jeszcze opracowanych wydajnych protokołów regeneracji; tu dobrym przykładem są rośliny drzewiaste [119-121].

Dotychczas przeanalizowano wiele składników pożywek do kultur *in vitro*. Należy wyróżnić związki organiczne, do których zalicza się przede wszystkim cukry (źródło węgla), witaminy, aminokwasy oraz regulatory wzrostu i rozwoju (fitohormony, hormony roślinne) oraz mikro- i makroelementy [122]. W kulturach *in vitro* stosuje się auksyny naturalne (kwas indolilo-3-octowy: IAA czy kwas indolilo-3-masłowy: IBA) oraz auksyny syntetyczne (kwas naftylo-1-octowy: NAA), 2,4D, Dicamba i kwas 4-amino-3,5,6-trichloropikolinowy: Picloram). Zastosowanie mają również cytokininy naturalne (zeatyna) i syntetyczne (N-6-furfuryladenina: kinetyna, 6-benzyloadeninopuryna: BA, 6-benzyloaminopuryna: BAP) oraz gibereliny (kwas giberelinowy: GA₃) czy też inhibitory wzrostu takie jak np. kwas abscysynowy (ABA). Liczne badania dotyczące wpływu fitohormonów na powstawanie roślin w kulturach *in vitro* wskazują, że prawidłowy dobór stężeń fitohormonów i auksyn jest niezbędny by regeneracja roślin mogła mieć miejsce.

Wśród mikroelementów na uwagę zasługują takie jak miedź i srebro, które wydają się pozytywnie wpływać na przebieg somatycznej embriogenezy i androgenezy. Jony miedzi z powodzeniem stosuje się w kulturach *in vitro* do poprawy wydajności regeneracji zielonych roślin zarówno w somatycznej embriogenezie jak i androgenezie [123]. Stwierdzono pozytywny wpływ siarczanu miedzi (CuSO₄) w ilości 0,025 mg l⁻¹ na produkcję i regenerację kalusa uzyskanego w kulturach dojrzałych zarodków

zygotycznych u pszenicy [124]. Z kolei u pszenżyta stężenie CuSO_4 wynoszące optymalnie $10 \mu\text{M}$, przy badanym zakresie $0,1-100 \mu\text{M}$, znacząco poprawiło regenerację pędów [125]. W przypadku somatycznej embriogenezy mikrospor jęczmienia pozytywne efekty regeneracji roślin zanotowano przy stężeniu $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 , gdzie obserwowano wzrost ilości zielonych zregenerowanych roślin z $1,4\%$ (bez CuSO_4) do $20,1\%$ (z CuSO_4) [126]. Stwierdzono, że wysokie stężenie CuSO_4 ma działanie toksyczne na powstawanie embriogennych kalusów u pszenicy, ponieważ dodatek 50 i $100 \mu\text{M}$ CuSO_4 hamował ich tworzenie, negatywnie wpływał na regenerację pędów i zwiększał odsetek roślin albinotycznych [127]. Z kolei w przypadku androgenozy u jęczmienia najlepsze wyniki osiągnięto przy stężeniu $10 \mu\text{M}$ (100- krotnie wyższej niż kontrola) [128]. Azotan srebra (AgNO_3) wykazuje pozytywne działanie na embriogenezę somatyczną [129]. Wpływ egzogennych jonów w postaci srebra w pożywkach w kulturach *in vitro* reguluje aktywność etylenu, który stanowi naturalny hormon roślinny odpowiadający między innymi za organogenezę bezpośrednią i pośrednią, embriogenezę somatyczną, ukorzenianie mikropędów *in vitro*, wzrost i kwitnienie roślin, starzenie się kwiatów, dojrzewanie owoców i kiełkowanie nasion [130, 131]. Zastosowanie azotanu srebra do indukowania somatycznej embriogenezy poprawiło regenerację roślin u jęczmienia (*H. vulgare* L.) [132], pszenicy (*T. aestivum* L.) [133], kukurydzy (*Zea mays* L.) [134] i ryżu (*Oryza sativa* L.) [135]. W przypadku androgenozy u pszenicy wykazano pozytywne działanie azotanu srebra dodawanego w ilości 50 mg l^{-1} w połączeniu z regulatorami wzrostu roślin takimi jak IAA ($1,0 \text{ mg l}^{-1}$) i kinetyna ($0,5 \text{ mg l}^{-1}$). W przypadku tych kultur zaobserwowano zwiększenie indukcji zielonych roślin oraz mniejszą ilość roślin albinotycznych [136].

Czas prowadzenia kultur *in vitro* oraz liczba pasaży skutkują utratą potencjału regeneracyjnego, jak dowiedziono w pracach nad fiołkiem afrykańskim (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl) [137] czy u bananowca (*Musa* L.), gdzie obserwowano spadek tempa uzyskiwania nowych roślin [138]. Temperatura to istotny czynnik wpływający na regenerację zielonych roślin u pszenżyta. Wykazano, że u tego gatunku warunki wzrostu roślin wyjściowych w tym środowisko fizyczne (natężenie światła, fotoperiod, i temperatura) mają istotny wpływ na odpowiedź kultury pylnikowej [139]. Wykazano, że niższa temperatura sprzyjała regeneracji roślin albinotycznych oraz zielonych [140].

1.6. Zmienność związana z uzyskiwaniem roślin na drodze kultur tkankowych

Ze względu na warunki regeneracji roślin metodami kultur *in vitro* taki sposób uzyskiwania roślin może być źródłem zmienności ujawniającej się u regenerantów, zmiany te określa się terminem „zmienność wywołana kulturą *in vitro*” [141] (ang. tissue culture-induced variation: TCIV) lub „zmienność somaklonalna” [142]. O ile TCIV opisuje zmiany obserwowane u regenerantów bez analizy ich dziedziczenia w cyklu generatywnym [141], to zmienność somaklonalna nie wyklucza z obserwacji zmian dziedziczonych w cyklu generatywnym.

Przez długi czas uważano, że kultury *in vitro* nie indukują zmienności, a różnice ujawniane między regenerantami, to wynik zmienności swoistej (ang. pre-existing variation) występującej w komórkach eksplantatu [143]. Prowadziło to do bagatelizowania zjawiska [144] czy też wręcz do kwestionowania jego występowania. Badanie tej zmienności przy pomocy ilościowego real-time PCR, wykazało, że poziom zmienności swoistej jest niski w porównaniu z mutacjami jakie identyfikowano w komórkach fiołka afrykańskiego (*Saintpaulia*) uzyskiwanego poprzez kultury tkankowe [145]. Uzyskane wyniki jednoznacznie wskazały na pochodzenie mutacji oraz potwierdziły, że zmienność somaklonalna jest spowodowana głównie przez generowane od nowa mutacje powstające podczas utrzymywania kultury *in vitro*. Mając na uwadze fakt, że zmienność swoista, mimo tego, że niższa niż zmienność wywołana kulturą tkankową, może zaburzać ilościową charakterystykę zmienności u regenerantów, należy ją uwzględniać w badaniach [87, 146] oraz kontrolować jej poziom lub usuwać jej źródła. Rozwiązaniem jest stosowanie roślin homozygotycznych jako źródła eksplantatów [141, 147].

TCIV jest zależna od działania stresów [148], genotypu [149], źródła eksplantatu [150], sposobu regeneracji [151], składu pożywki (uwzględniając: regulatory wzrostu [152]), czasu trwania kultury i liczby pasaży [153].

Uzyskiwanie roślin poprzez kultury tkankowe wymaga warunków sprzyjających regeneracji (stresy abiotyczne: np., temperatura, oświetlenie, ciśnienie osmotyczne). Działanie tych stresów może przejawiać się na poziomie zmienności somaklonalnej [154]. Wpływ stresu cieplnego odnotowano w roślinach fasoli (*Vigna aconitifolia* (Jacq.) Marechal), gdzie analiza wykonana techniką RAPD wykazała obecność nowego fragmentu DNA u regenerantów uzyskanych w temperaturze 47°C, wskazując na mutagenne

działanie szoku termicznego w kalusie oraz u zregenerowanych roślin [155]. Stres wywołany silnym oświetleniem zastosowanym podczas utrzymania kultury tkankowej może prowadzić do produkcji wolnych rodników (ang. reactive oxygen species: ROS) [156] zaś te, mogą bezpośrednio wpływać na cykl komórkowy i powodować uszkodzenia białek enzymatycznych, błon komórkowych oraz DNA [157] i być podłożem zmienności somaklonalnej [158]. Ponadto, silne oświetlenie podczas inkubacji eksplantatów może prowadzić do podwyższenia temperatury w zamkniętych szalkach lub innych naczyniach hodowlanych i powodować stres cieplny [157]. Do wywołania stresu osmotycznego wykorzystywany jest np., glikol polietylenowy, takie warunki mogą prowadzić do pojawienia się zmienności, co obserwowano u regenerantów ryżu uzyskiwanych w kulturach pylnikowych [159].

Wśród czynników wpływających na zmienność obserwowaną u regenerantów, genotyp jest prawdopodobnie najważniejszą jej determinantą. Wpływ tego czynnika może wiązać się z różną wrażliwością poszczególnych genotypów na stres. W badaniach poświęconych regenerantom świerka czarnego (*Picea mariana* P. Mill.) i białego (*P. glauca* (MOENCH) VOSS) obserwowano różne warianty fenotypowe, które były związane z genotypem, z którego pobierano eksplantaty i uzyskiwano rośliny na drodze somatycznej embriogenezy [160]. Podobnie w kulturach kalusowych truskawki (*Fragaria* × *Ananassa*) genotyp i rodzaj eksplantatu silnie wpływały na występowanie zmienności somaklonalnej [161]. Badania realizowane na regenerantach żyta (*S. cereale* L.), dostarczają dalszych dowodów na to, że charakter zmienności, tym razem odnoszącej się do zmian w strukturze chromosomów, obserwowanych u regenerowanych roślin, jest zależny od genotypu, i że oprócz ilościowej i strukturalnej zmienności chromosomowej, przesunięcia w częstotliwości występowania chiazm i ich dystrybucji (zmiany w rekombinacji genetycznej), mogą wystąpić w wyniku zmienności somaklonalnej [162].

Eksplantaty wykorzystywane do założenia kultur *in vitro* zazwyczaj składają się z komórek, które są zróżnicowane pod względem fazy rozwojowej, wieku, poziomu mutacji genetycznych albo też ploidalności. Wykorzystanie jako eksplantatów tkanek niezróżnicowanych lub tkanek merystematycznych sprzyja zachowaniu jednorodności morfologicznej lub genetycznej między regenerantami, natomiast wykorzystanie wysoko zróżnicowanych tkanek (łodygi, liście, korzenie) prowadzi do większego zróżnicowania [163]. Tak więc, różne eksplantaty wybrane do założenia kultury tkankowej mogą wpływać na charakter i częstotliwość występowania zmian somaklonalnych [164].

Przygotowanie eksplantatów do kultury *in vitro* oraz utrzymywanie kultury tkankowej narażają eksplantaty na stres oksydacyjny [165, 166]. Regeneracja roślin przebiegająca z fazą kalusa także wywołuje stres [167]. Wykazano, że zmienność somaklonalna częściej pojawia się u regenerantów, które są uzyskiwane z fazą kalusa. Etap ten jest także uważany za wpływający na zmiany w metylacji DNA [168].

Kolejnym czynnikiem wpływającym na powstawanie zmienności somaklonalnej jest czas utrzymywania roślinnej kultury tkankowej oraz liczba pasaży [169, 170]. Po ósmym pasażu kultury *in vitro* bananowca (*Musa L.*) wzrosła ilość wariantów somaklonalnych (zmiany w morfologii roślin) [138]. Powtarzające się pasáže zwiększają możliwość mutacji, jak dowiedziono w pracach nad fiołkiem afrykańskim (*Saintpaulia ionantha* H. Wendl), gdzie obserwowano duże zróżnicowanie, zarówno jakościowe, jak i ilościowe, potencjału morfogenetycznego odmian rozmnażanych *in vitro* [137]. Przypuszcza się, że zmienność wywołana kulturą *in vitro* jest bardziej wynikiem stopniowej akumulacji mutacji w czasie niż wzrostu tempa mutacji w starzejącej się kulturze tkankowej [171]. Sposobem na ograniczenie ilości regenerantów charakteryzujących się wyższym poziomem zmienności wywołanej kulturą *in vitro* w stosunku do roślin donorowych jest zmniejszenie liczby pasaży a tym samym czasu trwania kultury tkankowej. Taki zabieg, skrócenia utrzymywania kultur do czterech miesięcy, zastosowano w kulturach zawieszinowych kawy, gdzie po dokonaniu oceny ploidalności w agregatach komórek embriogenicznych odnotowano niestabilność ploidalności [172]. Ponadto wraz z czasem trwania kultury tkankowej może dochodzić do zmian w metylacji DNA, co zostało zaobserwowane u palmy olejowej (*Elaeis guineensis* Jacq.), gdzie wzrost metylacji powodował modulację ekspresji zdolności embriogenicznych palmy olejowej podczas kultury tkankowej [173].

Innym czynnikiem wpływającym na powstanie TCIV może być skład pożywek stosowanych w kulturach *in vitro*. Substancje dodawane do pożywek można podzielić na organiczne, do których zalicza się przede wszystkim cukry (źródło węgla), witaminy, aminokwasy oraz regulatory wzrostu i rozwoju, i mineralne (makro- i mikroelementy). Wśród regulatorów wzrostu należy zwrócić uwagę na fitohormony. To właśnie hormony roślinne uważane są za jedną z głównych przyczyn powstawania zmienności somaklonalnej, poprzez zwiększenie tempa namnażania komórek i indukowanie powstawania pędów [174]. Do przygotowania pożywek do kultur *in vitro* stosuje się auksyny naturalne, takie jak np. IAA czy IBA oraz auksyny syntetyczne, takie jak NAA,

2,4D, Dicamba i Picloram. Stosuje się także cytokininy naturalne (zeatynę) i syntetyczne (kinetyna, BA, BAP) oraz gibereliny (GA_3) czy też inhibitory wzrostu takie jak np. ABA. Liczne badania dotyczące wpływu fitohormonów na powstawanie roślin w kulturach *in vitro* wskazują, że niezbalansowany stosunek fitohormonów w pożywkach do kultur może prowadzić do zmiany ploidalności u roślin [175, 176]. Analiza cytologiczna roślin grochu (*Pisum sativum* L.) uzyskanych drogą kultur *in vitro* ujawniła zależności między częstością pojawiania się aneuploidów, a podwyższonym stężeniem fitohormonów. Szczególna kombinacja fitohormonów (NAA i IBA) skutkowała częstszym pojawianiem się triploidów, tetraploidów, oktaploidów, aneuploidów oraz roślin z wyższą ploidalnością. Oprócz zmian w ploidalności odnotowano dodatnią korelację między stężeniem podawanych fitohormonów, a zmianami w strukturze chromosomów (fragmentacja chromosomów, chromosomy koliste, mostki anafazowe) [177]. Nieco inny rodzaj zmienności może powodować IAA i inozytol, dodawane do pożywek do kultur *in vitro*; obserwowano między innymi rearanżacje DNA i zmiany metylacji w kulturach kalusa marchwi (*D. carota* L.) [178]. Jak wspomniano fitohormony mogą wpływać na poziom zmian dotyczących metylacji DNA u regenerowanych roślin, zmieniając tempo zmian metylacyjnych. W pracy poświęconej badaniu zmienności somaklonalnej u roślin bananowca, uzyskanych na drodze kultur tkankowych, wykazano, że dodatek syntetycznej auksyny 2,4-D do pożywki prowadził do wysokiego poziomu zdarzeń metylacyjnych, co w dużej mierze skutkowało zmianami fenotypowymi w zregenerowanych roślinach [152]. Najczęściej za zmienność wywołaną kulturą *in vitro* mogą odpowiadać takie fitohormony jak: 2,4-D, NAA i BAP [152, 179, 153]. Stwierdzono, że dodatek do pożywki syntetycznej auksyny 2,4-D powodował pęknięcia chromosomów oraz zwiększał częstości pojawiania się wymiany chromatyd siostrzanych (ang. Sister Chromatid Exchange: SCE) [180]. Podobnie wysokie stężenie 2,4-D użyte do indukcji kalusa embriogenicznego u żyta miało silny wpływ na zmiany genetyczne, a w konsekwencji zmiany morfologiczne. Istotnym elementem pożywek są jony metali. Ich rola była omawiana już wcześniej [181]. Wystarczy nadmienić, że są one często kofaktorami reakcji enzymatycznych i tym samym mogą wpływać na procesy biochemiczne [182]. Niektóre z jonów mogą również uczestniczyć w procesach oksydacyjnych, co też może mieć wpływ na zmienność somaklonalną [183, 166].

1.6.1. Biochemiczne aspekty zmienności wywołanej kulturą *in vitro*

Stres, jakiemu poddawane są rośliny w kulturze tkankowej, może prowadzić do zaburzeń funkcjonowania cykli i szlaków komórkowych i w konsekwencji do zmienności wywołanej kulturą *in vitro* [142]. Badania zmienności wywołanej kulturą *in vitro* wykazały, że zaburzenia w procesie glikolizy, cyklu Krebsa, cyklu Yang'a [184] oraz szlaku transsulfuracji prowadzącego do syntezy glutationu [185] są powiązane ze zmiennością u regenerantów wyprowadzanych na drodze androgenyzy u jęczmienia [186] i pszenżyta [187]. Wykazano również, że zaburzenia te wpływają na wydajność regeneracji zielonych roślin [185]. Stwierdzono, że zaburzenia biochemiczne są powiązane ze zmiennością sekwencyjną oraz zmianami epigenetycznymi u pszenżyta [181]. Rolę metylacji DNA zdają się potwierdzać wcześniejsze wyniki [188].

1.6.2. Molekularne źródła zmienności (epi)genetycznej wywołanej kulturą *in vitro*

Na zmienność sekwencyjną mogą mieć wpływ takie zjawiska jak mutacje punktowe [189], delecje i insercje [190, 191], migracja elementów mobilnych [192] czy też występowanie rearanżacji chromosomowych [193] bądź poliploidyżacja genomów [194]. Występowanie mutacji punktowych będących wynikiem regeneracji roślin metodami kultur *in vitro* opisano w przypadku wielu gatunków roślin, ryżu (*O. sativa* L.) [195], banana (*Musa* spp., Cavendish sub-group AAA) [196], *Arabidopsis* [197] czy kakaowca (*Theobroma cacao* L.) [198]. Uważa się, że mutacje DNA powstają np., w wyniku modyfikacji DNA czy działania procesów oksydacyjnych [199]. Delecje i insercje mogą być skutkiem zjawiska zwanego poślizgiem polimerazy DNA (ang. polymerase slippage). Poślizg polimerazy prowadzi do błędów w replikacji obszarów mikrosatelitarnych skutkujących insercjami [200], rzadziej delecjami [201], jednej lub kilku powtórzonych jednostek. Badania molekularnych podstaw niestabilności sekwencji mikrosatelitarnych w kulturach *in vitro* sorga (*Sorghum bicolor* L.) wykazały ich związek z obniżoną ekspresją genu „mismatch” *MLH3* [200]. Phillips i wsp. [202] stwierdzili, iż zwiększona liczba kopii sekwencji powtórzonych tandemowo w genomie roślin pochodzących z kultur tkankowych jest powodowana rekombinacją mitotyczną wynikającą z nierównomiernego *crossing over* między chromatydami siostrzanymi. Ponadto, na pojawianie się zmian o naturze genetycznej i epigenetycznej u roślin uzyskiwanych w kulturach *in vitro* [202], ma wpływ poprawne funkcjonowanie mechanizmów naprawy DNA takich jak, naprawa

przez wycinanie zasad (ang. Base Excision Repair: BER) lub nukleotydów (ang. Nucleotide Excision Repair: NER), naprawa błędnie sparowanych nukleotydów, (ang. Mismatch Repair: MMR), homologiczna (ang. Homologous Recombination Repair: HRR) i niehomologiczna rekombinacja (ang. Non Homologous End Joining: NHEJ). Przyczyn tego typu zmian, indukowanych przez hodowlę tkankową, można również upatrywać w zaburzeniu ekspresji genów kodujących enzymy mechanizmów naprawczych, co obserwowano u ryżu [203]. Źródłem zmienności somaklonalnej mogą być zmiany związane z zaburzeniami w liczbie i strukturze chromosomów [204], czego przykładem mogą być np. rearanżacje chromosomów [142]. Takie zmiany opisano między innymi u pszenżyta [205], które ze względu na swoje pochodzenie (mieszaniec zbóż, uzyskany sztucznie, niestabilizowany genom) wydaje się być szczególnie podatne na działanie kultur *in vitro*.

W literaturze fachowej do źródeł zmienności wywołanej kulturą *in vitro* zalicza się zmienność wzorów metylacji [206, 147]. Stwierdzono, że w zależności od gatunku poziom metylacji DNA u regenerantów może wzrastać lub maleć w odniesieniu do rośliny będącej źródłem eksplantatu. I tak metylacja DNA regenerantów wzrasta u jęczmienia [87], natomiast maleje u pszenżyta [207]. Przyczyny takiego zróżnicowania nie są oczywiste. Możliwe, że są one powiązane z różnicami w stabilności genomów tych gatunków.

1.7. Metody badania zmienności wywołanej kulturą *in vitro*

Początkowo występowanie zmienności wywołanej kulturą *in vitro* badano na poziomie morfologicznym [208]. Jednak tego typu zmiany zwykle są relatywnie rzadkie. Większe możliwości dawały techniki wykorzystujące elektroforezę białek [209]. Badania regenerantów pszenicy wyprowadzonych z niedojrzałych zarodków zygotycznych [210] i ich potomstwa [211] wykazały zróżnicowanie prążków we frakcji białek gliadynowych obecnych w materiale donorowym. Wraz z rozwojem technik molekularnych podejmowano próby ich wykorzystania do badania tej zmienności. Wykorzystanie RFLP, metody polegającej na trawieniu DNA endonukleazami restrykcyjnymi i rozdziale elektroforetycznym uzyskanych produktów w żelu agarozowym [212], ujawniło pojawianie się dodatkowych prążków u regenerantów soi (*Glycine max* (L.) Merrill), w stosunku do źródła eksplantatu [213]. Natomiast u regenerantów palmy olejowej (*E. guineensis* Jacq.) o nietypowych fenotypach stwierdzono zmniejszenie poziomu metylacji DNA [214]. Technika ta okazała się jednak zbyt mało precyzyjna gdyż nie zawsze była skuteczna w identyfikowaniu zmienności jak to miało miejsce w przypadku

regenerantów kostrzewy łąkowej (*Festuca pratensis* Huds.) wyprowadzonych w kulturach zawieszin i protoplastów [215]. Pewien postęp zanotowano wraz z wprowadzeniem RAPD. Metoda ta bazuje na powielaniu fragmentów DNA za pomocą łańcuchowej reakcji polimerazy DNA (PCR) [216]. Zastosowanie tej metody pozwoliło na identyfikację zróżnicowanego poziomu zmienności poczynając od jej braku u regenerantów [217-220], poprzez identyfikację na poziomie poniżej 5% [221-223], kończąc na poziomie, który zależał od stosowanych pożywek [224] i genotypu [225]. W badaniach nad ananasek (*Ananas comosus*) technika RAPD pozwoliła na wykrycie 18 polimorficznych fragmentów (z 420 identyfikowanych prążków) [226]. Analiza zmienności regenerantów ryżu wyprowadzonych z tarczki zarodkowej [227] pokazała, że poziom zmienności u regenerantów był zależny od wieku kultury. U regenerantów wyprowadzonych z dwuletniego kalusa obserwowano zmienność na poziomie 9%. Obserwowano zarówno pojawianie się jak i znikanie niektórych prążków. Sekwencjonowanie wybranych polimorficznych fragmentów RAPD pokazało, że zdecydowana większość zmian to mutacje punktowe, głównie substytucje [195]. Badania Linacero i wsp. [228] pozwoliły na wykrycie wysokiego poziomu zmienności w obszarach zwanych „hot spotami” (wysoko zmienne regiony DNA) u regenerantów żyta. Występowanie rejonów genomu o podwyższonej podatności na mutacje powiązано z demetylacją DNA tych obszarów [229].

W latach 90. XX wieku opracowano technikę zwaną SCAR (ang. Sequence Characterized Amplified Region) [230] W znacznej mierze jest ona podobna do RAPD jednak pozwala na powielanie bardziej specyficznych sekwencji DNA. Osiągnięto to poprzez zamianę losowej sekwencji markera RAPD na starter ukierunkowany na znane sekwencje genomu. Wykorzystanie tej metody przyczyniło się do wykrycia u regenerantów kukurydzy zmian w sekwencjach niekodujących. Zmiany te wiążano z migracją transpozonów należących do rodziny MITE (ang. Miniature Inverted Transposable Element). Stwierdzono również obecność mikrodelecji i zmian w mitochondrialnym DNA [231]. Do identyfikacji zmienności wywołanej kulturą *in vitro* przyczyniła się również technika powielenia fragmentów powtarzających się (SSR), w przypadku mangabeiry (*Hancornia speciosa* Gomes) [232] i jatrofy przeczyszczającej (*Jatropha curcas* L.) [233]. W przypadku tkanki kalusowej oraz regenerantów sorga zmienność identyfikowana za pomocą markerów SSR wynosiła 20,7% oraz 6,6% [200]. Natomiast badania wykonane na kiwi (*Actinidias deliciosa*) u roślin wyprowadzonych

in vivo i *in vitro*, pozwoliły na różnicowanie obu pul roślin czego nie udało się osiągnąć stosując markery RAPD [201].

Wariantem techniki SSR jest metoda ISSR (ang. Inter Simple Sequence Repeat). Odpowiednio dobrane startery pozwalają na powielanie obszarów genomu pomiędzy dwoma sekwencjami mikrosatelitarnymi [13]. Metoda ta pokazała, że zmienność wywołana kulturą *in vitro* występuje również i w takich obszarach genomu. Rostiana i wsp. [234] wykazali powstawanie lub utratę fragmentów DNA u regenerantów chrzanzu pospolitego (*Armoracia rusticana* G. Gaertn.). Jednakże, technika ISSR okazała się nieskuteczna w badaniach regenerantów gerbery (*Gerbera jamesonii* Bolus) wyprowadzanych z różnych części rośliny [235].

Z historycznego punktu widzenia na uwagę zasługują również techniki REMAP (ang. Retrotransposon Microsatellite Amplified Polymorphism) i IRAP (ang. Inter Retrotransposon Amplified Polymorphism). Zostały one opracowane do badania zmienności w obrębie obszarów powtarzalnych sekwencji mobilnych. Technika REMAP bada polimorfizm między sekwencjami LTR (długie terminalne sekwencje powtórzone, ang. Long Terminal Repeat) a sekwencjami mikrosatelitarnymi. Metoda IRAP służy do powielania fragmentów pomiędzy długimi terminalnymi sekwencjami powtórzonymi [236]. Jednakże żadna z tych metod nie pozwoliła na identyfikację zmienności sekwencji mobilnych między regenerantami chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.) [237] czy ewentualnych zmian indukowanych długoterminowymi kulturami grochu [238].

Opracowanie technik markerów DNA łączących w sobie zalety RFLP i PCR a mianowicie metody AFLP [239] czy szeregu jej wariantów takich jak SAMPL (ang. Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci), [240], MSAP (ang. Methylation Sensitive Amplification Polymorphism) [241], SSAP (ang. Sequence Specific Amplified Polymorphism) [242] i metAFLP (methylation-sensitive AFLP) [87] stworzyło nowe możliwości badawcze. Markery AFLP pozwoliły na wykrycie zmienności indukowanej u regenerantów wyprowadzonych z kultur *in vitro* u kocanki włoskiej (*Helichrysum italicum* (Roth) G.) [243]. Stwierdzono, że u 97,7% regenerantów występowały różnice w polimorfizmie powielanych fragmentów w odniesieniu do co najmniej jednego fragmentu, natomiast 99,3% fragmentów AFLP było monomorficznych (Perrini i in. 2009). Technika AFLP ujawniła również obecność „hot spot’ów” u regenerantów żyta wyprowadzonych na drodze embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych. Poziom zmienności w tych obszarach sięgał 8,8% [244].

Technika SAMPL służy do badania zmienności powiązanej z sekwencjami mikrosatelitarnymi i jest połączeniem metod AFLP i SSR [245]. W tym przypadku jeden z selektywnych starterów jest komplementarny do sekwencji mikrosatelitarnej, a drugi do sekwencji adaptora metody AFLP [246]. Mimo wydawałoby się dużej czułości metody, zdolnej do powielania wielu fragmentów genomu jednocześnie, jej zastosowanie u regenerantów banana (*Musa*) nie przyniosło żadnych rezultatów [247]. Kolejny wariant AFLP, a mianowicie SSAP, ukierunkowany na sekwencje retrotranspozonowe okazał się wydajniejszy niż SAMPL. Metoda wykazała 19,7% zmienności u regenerantów jęczmienia wyprowadzonych w pośredniej regeneracji w kulturach kwiatostanów [248]. Jednakże, dopiero wprowadzenie wariantów AFLP wykorzystujących endonukleazy restrykcji różniące się wrażliwością na metylację DNA przyniosło przełom w badaniach nad zmiennością wywołaną kulturą *in vitro*. Przykładem takiej metody jest wprowadzona przez Reyna-Lopez i wsp. [249] technika MSAP. Metoda ta wykorzystuje endonukleazy HpaII i MspI. Enzymy te rozpoznają te same sekwencje DNA jednak w zależności od ich metylacji wykazują różne zdolności do ich hydrolizowania [250]. Porównanie profili MSAP pozwala na określenie jaki rodzaj metylacji DNA ma miejsce. Analiza wzorów metylacji regenerantów trzciny cukrowej (*Saccharum officinarum* L.) [251], topoli czarnej (*Populus nigra*) [252] czy chmielu zwyczajnego (*Humulus lupulus* L.) [253] wykazała, że zmiany takie rzeczywiście mają miejsce i dotyczą demetylacji DNA. Porównanie zmienności dwóch odmian winorośli (*Vitis vinifera* L.) i ich regenerantów wyprowadzonych z zarodków somatycznych pokazało wzrost poziomu metylacji wewnętrznej cytozyny w miejscu restrykcji u regenerantów odmiany Syrah (11,2%) i Chardonnay (13,9%), w odniesieniu do roślin donorowych (10,1% i 12,3% dla odmiany Syrah i Chardonnay) [254]. Metoda MSAP okazała się również skuteczna w badaniach u kawy arabskiej (*Coffea arabica*) [221] i ziemniaka [255]. Jej zastosowanie wykazało, że poziom zmienności metylacyjnej dochodził do 0,18% i do 8,5% odpowiednio dla obu gatunków. Podobne badania eleuterokoka kolczastego (*Eleuterococcus senticosus*) wykazały, że poziom zmienności wywołanej kulturą *in vitro* wynosił 11% w embriogenicznym i 17% w nieembriogenicznym kalusie [256]. Należy podkreślić, iż mimo dużej czułości i zdolności metody do identyfikacji zmienności wywołanej kulturą *in vitro* nie mogła ona identyfikować zmian związanych ze zmiennością sekwencyjną. Problem ten został rozwiązany wraz z wprowadzeniem techniki metAFLP.

Metoda metAFLP okazała się pomocna w analizie zmienności wywołanej kulturą *in vitro* u jęczmienia [257], pszenżyta [258] czy goryczki (*Gentiana pannonica* Scop) [259]. W przypadku wszystkich wymienionych gatunków stwierdzono, że kultury *in vitro* indukują zarówno zmienność sekwencyjną jak i metylacyjną. W przypadku pszenżyta [258] jak i jęczmienia [260, 186] wykazano, że zmienność we wzorach metylacji dotyczy głównie sekwencji symetrycznych natomiast obszary asymetryczne podlegają takim zmianom w mniejszym stopniu [261, 258]. Na uwagę zasługują również różnice w poziomie zmienności sekwencyjnej i metylacyjnej jęczmienia i pszenżyta. I tak u jęczmienia przeważają zmiany metylacji DNA natomiast u pszenżyta dominują zmiany sekwencyjne. Co ciekawe, u pszenżyta poziom metylacji DNA regenerantów maleje w stosunku do źródła eksplantatu a u jęczmienia rośnie. Warto również podkreślić, że połączenie metAFLP, metod badania metabolomu za pomocą spektroskopii fourierowskiej w podczerwieni (FTIR) (ang. Fourier Transform Infrared (FTIR) spectroscopy) [262] oraz modelowania równań strukturalnych (ang. Structural Equation Modeling: SEM), zastosowane do jęczmienia [186] i pszenżyta [187] pozwala na modelowanie zjawisk zachodzących podczas regeneracji roślin w kulturach *in vitro*. Wydaje się więc, że metoda metAFLP jest jedną z bardziej obiecujących metod jeśli mowa o badaniu zarówno zmienności wywołanej kulturą *in vitro* jak i zjawisk z nią powiązanych.

1.8. Biologiczno-molekularny system badania zmienności wywołanej kulturą *in vitro*

Ze względu na złożoność zmienności wywołanej kulturą *in vitro*, jej liczne źródła i zróżnicowane przyczyny powstawania oraz czynniki niezwiązane z nią, a mogące wpływać na poziom identyfikowanej zmienności, badanie zjawiska wymaga specjalnie do tego celu dedykowanego systemu biologicznego, molekularnego oraz analizy statystycznej wyników.

Po raz pierwszy system biologiczny umożliwiający ilościową ocenę zmienności wywołanej kulturą *in vitro* opisano w 2007r. [87]. Celem minimalizacji zmienności swoistej przyjęto, że źródłem eksplantatu powinna być wyrównana pod względem genetycznym i epigenetycznym roślina będąca potomstwem generatywnym rośliny DH wyprowadzonej na drodze androgenezy. Roślina ta, źródło eksplantatu, służy do wyprowadzania regenerantów w zróżnicowanych warunkach eksperymentalnych. Roślina donorowa oraz jej regeneranty stanowią kluczowy element systemu biologicznego.

Wykorzystanie zróżnicowanych warunków eksperymentalnych umożliwia analizę ich wpływu na poziom zmienności (epi)genetycznej regenerantów.

Oprócz systemu biologicznego konieczne jest wykorzystanie odpowiedniego systemu markerowego, który pozwala na jednoczesną analizę zmian sekwencyjnych i zmian wzorów metylacji DNA oraz ilościową ocenę takich zmian w odniesieniu do źródła eksplantatu. Takie możliwości stwarza między innymi technika metAFLP [141]. MetAFLP umożliwia ilościową ocenę zmian w genomowym DNA, odpowiadającym zarówno zmienności sekwencyjnej (zmienność sekwencyjna: SV) jak i metylacyjnej (obniżenie poziomu metylacji DNA-demetylacja: DMV; wprowadzenie metylacji do DNA -metylacja DNA *de novo*: DNMV). które następnie szacuje się ilościowo. Te identyfikowane zmiany w DNA (SV, DMV, DNMV) są składowymi zmienności wywołanej kulturą *in vitro* (TCIV). Identyfikacja takich zmian jest możliwa dzięki wykorzystaniu różnych właściwości endonukleaz KpnI i Acc65I będących izoschizomerami względem metylacji DNA. Ponadto, metoda pozwala na badanie metylacji symetrycznej typu CHG i CG oraz asymetrycznej typu CHH (gdzie H=A, C, T), takie właściwości metAFLP mogą być wykorzystane do badania (epi)genetycznych podstaw zjawiska. Wykorzystując selektywne startery, które na 3'-końcach mają sekwencje komplementarne względem symetrycznych lub asymetrycznych sekwencji DNA i porównując profile powielane za pomocą platformy KpnI/MseI i Acc65I/MseI dla rośliny będącej źródłem eksplantatu i jej regenerantów, identyfikuje się zdarzenia opisywane na poziomie markerów DNA. System ten został szczegółowo opisany w literaturze fachowej [141, 263], a jego skuteczność wykazano na przykładzie jęczmienia [257], pszenżyta [146], *Arabidopsis* [264], wiechliny rocznej (*Poa annua*) [265] czy *Polyscias filicifolia* [266]. Dopelnieniem systemu są liczne metody statystyczne takie jak np., ANOVA, która pozwala na oszacowanie różnic między badanymi grupami regenerantów.

Opisany system biologiczno-molekularny może być również wykorzystany do optymalizacji warunków regeneracji roślin [263]. Do tego celu może być wykorzystana m. in., metoda Taguchiego, bazująca na analizie regresyjnej. Metoda ta umożliwia identyfikację takich warunków eksperymentalnych, które pozwalają na ukierunkowanie zjawiska (regeneracji roślin) w pożądanym kierunku. Metoda Taguchiego, została pierwotnie opracowana dla procesów technologicznych dotyczących np. oczyszczania ścieków i bioremediacji [267] oraz fermentacji [268]. Jej wykorzystanie opisano także

w przypadku optymalizacji warunków PCR [269]. Oczywistą zaletą tej metody jest możliwość redukcji liczby eksperymentów do niezbędnego minimum. Stosując metodę planu kompletnego (sprawdza się wszystkie możliwe warianty eksperymentalne) dla trzech zmiennych na trzech poziomach, należałoby wykonać aż 27 doświadczeń, natomiast metoda Taguchiego umożliwia ich redukcję do dziewięciu. Uwzględniając pracochłonność kultur *in vitro* oraz problemy z wyprowadzaniem regenerantów, zastosowanie wariantu regresyjnego jest uzasadnione. W literaturze opisano możliwość optymalizacji kultur *in vitro* w kierunku zwiększenia lub zmniejszenia poziomu zmienności wywołanej kulturą *in vitro* u jęczmienia [263].

2. HIPOTEZA BADAWCZA I CEL PRACY

Biorąc pod uwagę sposób wyprowadzenia pszenżyta, jego niestabilność cytogenetyczną, znaczenie gospodarcze, łatwość regeneracji zarówno na drodze androgenezy jak i somatycznej embriogenezy, opisane liczne zmiany sekwencji i wzorów metylacji DNA powstające w kulturach *in vitro*, gatunek ten jest wyjątkowym obiektem badawczym, którego analiza umożliwi weryfikację wielu hipotez badawczych dotyczących kultur *in vitro*.

Hipotezy

1. Warunki kultur *in vitro*, a mianowicie m. in., stężenia jonów miedzi i srebra w pożywce indukującej oraz czas trwania kultur *in vitro* mogą wpływać na wydajność regeneracji zielonych roślin u jęczmienia, pszenżyta i pszenicy, a wydajność regeneracji można optymalizować poprzez dobór optymalnych stężeń jonów metali oraz czasu trwania kultur *in vitro* oraz stosując statystyczne metody optymalizacji warunków eksperymentalnych;
2. Warunki kultur *in vitro*, a mianowicie m. in., stężenia jonów miedzi i srebra w pożywce indukującej oraz czas trwania kultur *in vitro* mogą wpływać na poziom zmienności wywołanej kulturą *in vitro* u pszenżyta wyprowadzanego na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy;
3. Regeneracja roślin metodami kultur *in vitro* w zmiennych warunkach jonów miedzi i srebra oraz czasu trwania kultur będzie w różnym stopniu wpływać na poziom zmienności genetycznej oraz zmiany wzorów metylacji DNA w obrębie poszczególnych kontekstów sekwencyjnych (sekwencje symetryczne i asymetryczne);
4. Regeneracja roślin metodami kultur *in vitro* na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy, ze względu na źródło eksplantatu użytego do uzyskania regenerantów różni się poziomem identyfikowanej zmienności.

Cele badań

1. Optymalizacja warunków kultur *in vitro* uwzględniająca zróżnicowanie stężenia jonów miedzi i srebra w pożywce indukującej oraz zmienny czas trwania kultur, pozwalająca na zwiększenie wydajności regeneracji zielonych roślin na drodze androgenezy u jęczmienia, pszenżyta i pszenicy.
2. Ocena wpływu jonów miedzi i srebra oraz czasu inkubacji eksplantatów na pożywkach indukujących, na TCIV i jej składowe u regenerantów pszenżyta, uzyskanych na drodze androgenezy w kulturach pylnikowych.
3. Ocena wpływu jonów miedzi i srebra oraz czasu inkubacji eksplantatów na TCIV i jej składowe w regenerantach pszenżyta uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych.
4. Porównanie składowych TCIV uzyskanych metodą metAFLP dla regenerantów pszenżyta wyprowadzonych na drodze androgenezy i embriogenezy somatycznej z uwzględnieniem warunków kultur *in vitro*.

3. MATERIAŁY I METODY BADAWCZE

W publikacji P1 przedstawiono wyniki dla trzech gatunków zbóż (jęczmień jary (*H. vulgare* L., genotyp NAD2), pszenica ozima (*T. aestivum* L., Svilena) i pszenżyto ozime (\times *Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927, genotyp T26/2)) wyprowadzonych na drodze androgenezy z kultur pylnikowych.

Uzyskanie roślin donorowych

Rośliny wyjściowe jęczmienia, pszenicy i pszenżyta hodowano w komorze fitotronowej w kontrolowanych warunkach: 16h/8h i 16°C/12°C dzień/ noc. Pędy kłosonośne zbierano, gdy mikrospory znajdowały się w stadium średnio- i późno jednojądrowym a następnie kłosy przetrzymywano w ciemności, w temperaturze 4°C, odpowiednio przez 20, 21 i 22 dni. Po tym czasie kłosy ścinano i sterylizowano a następnie wyjmowano pylniki i wykładano na pożywki indukujące (ang. induction medium: IM) odpowiednie dla poszczególnych zbóż dla: jęczmienia-N6L [270] z 2 mg l⁻¹ 2,4-D, 0,5 mg l⁻¹ NAA i 0,5 mg l⁻¹ kinetyny; pszenicy-C17 [271] z 2 mg l⁻¹ 2,4-D, i 0,5 mg l⁻¹ kinetyny; pszenżyta-190-2 [272] z 2 mg l⁻¹ 2,4-D, i 0,5 mg l⁻¹ kinetyny. Pylniki na IM inkubowano w ciemności w temp. 26°C do momentu pojawienie się kalusa, struktur zarodkopodobnych oraz zarodków. Po 3-5 tygodniach inkubacji na IM kalusy, struktury zarodkopodobne oraz zarodki były przenoszone na pożywki regeneracyjne K4NB [273] z 0,225 mg l⁻¹ BAP dla jęczmienia oraz 190-2 [272] z 0,5 mg l⁻¹ NAA i 1,5 mg l⁻¹ kinetyny dla pszenicy i pszenżyta. Zregenerowane zielone rośliny były przenoszone do kolb na pożywkę ukorzeniającą N6I [270] suplementowaną 2 mg l⁻¹ IAA jednakową dla wszystkich gatunków. Regeneranty w stadium siewki przesadzano do palet wysiewnych, a potem do wiader, i uprawiano do dojrzałości w warunkach szklarniowych. Z regenerantów zebrano nasiona i wysiano. Kielkujące siewki (rośliny donorowe) będące generatywnym potomstwem regenerantów stanowiły źródło eksplantatów do uzyskania regenerantów w doświadczeniu optymalizującym gdzie ustalono warunki kultury *in vitro* optymalne do uzyskania zielonych regenerantów, zaś w drugim doświadczeniu (weryfikującym) zweryfikowano zoptymalizowane warunki regeneracji. Do doświadczenia weryfikującego proces optymalizacji przygotowano drugą partię roślin donorowych w taki sam sposób jak opisano powyżej.

Uzyskanie regenerantów na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych

W doświadczeniu optymalizującym warunki kultur *in vitro*, regeneranty uzyskiwano w kulturach pylnikowych, gdzie eksplantatem były pylniki z roślin donorowych. Protokół uzyskania regenerantów był taki sam jak w przypadku uzyskania roślin donorowych. Natomiast optymalizację oparto na metodzie regresyjnej Taguchiego, testując trzy czynniki, takie jak, stężenia CuSO_4 (0,1; 5 i 10 μM) i AgNO_3 (0; 10; 60 μM) w IM oraz czas inkubacji eksplantatów (21, 28 i 35 dni dla jęczmienia i 35, 42 i 49 dni dla pszenicy i pszenżyta) na IM (czas ten określono jako „czas trwania kultury tkankowej”). Dla trzech czynników i trzech poziomów stężeń i liczby dni zaprojektowano dziewięć wariantów doświadczenia (warianty nr. 1-9) różniących się stężeniami jonów Cu^{2+} i Ag^+ oraz czasem inkubacji pylników na IM (Tab. 1). Wariant nr 1 był kontrolą (CuSO_4 –0,1 μM , AgNO_3 –0 μM , czas 21 i 35 dni). Ocenę efektywności uzyskiwania zielonych regenerantów prowadzono poprzez ustalenie liczby zielonych roślin (ang. green plants: GP) oraz roślin albinotycznych (ang. albino plants: AP) w przeliczeniu na 100 wyłożonych pylników.

W doświadczeniu weryfikującym sprawdzono warunki, które udało się wytypować w pierwszym etapie doświadczenia. W tym celu ponownie uzyskano regeneranty jęczmienia, pszenicy i pszenżyta w warunkach kontrolnych (wariant nr 10); warunki identyczne jak w wariacie nr 1 oraz w warunkach wytypowanych w kierunku uzyskania najwyższej liczby zielonych regenerantów (warianty: (11B) dla jęczmienia, (11W) dla pszenicy i (11T) dla pszenżyta). Dla jęczmienia warunki te były następujące: (wariant nr 11B): 10 μM CuSO_4 , 30 μM AgNO_3 , 21 dni; dla pszenicy: (wariant nr 11W): 0,1 μM CuSO_4 , 60 μM AgNO_3 , 37 dni; zaś dla pszenżyta: (wariant nr 11T): 10 μM CuSO_4 , 0 μM AgNO_3 , 49 dni. Także w tym doświadczeniu oszacowano liczbę GP i AP w przeliczeniu na 100 wyłożonych pylników oraz podano poziom spontanicznego podwojenia dla wszystkich gatunków.

W publikacji **P2** zaprezentowano badania prowadzone na pszenżycie ozimym. Rośliny donorowe, podobnie jak i regeneranty do badań molekularnych, przygotowano tak jak w publikacji **P1**, stosując dziewięć wariantów doświadczenia (warianty nr. 1-9).

Genomowy DNA, uzyskany ze świeżych liści młodych siewek 24 roślin donorowych i 44 regenerantów, analizowano techniką metAFLP [87, 141]. Obrazy prążków DNA uzyskane z rozdzielania fragmentów DNA pochodzących z cięcia enzymami Acc65I i MseI oraz KpnI i MseI zostały przekształcone w matryce zero-jedynkowe. Obecność

prążka była kodowana jako "1", brak jako "0". Następnie matryce te zostały ze sobą zestawione. Zestawienie prążków DNA uzyskanych poprzez cięcie DNA enzymami Acc65I/MseI dostarcza informacji o zmianach w sekwencji i metylacji DNA (matryca A). Natomiast prążki uzyskane z rozdzielania fragmentów DNA trawionych przez endonukleazy restrykcji KpnI/MseI dostarczają jedynie informacji o zmianach w sekwencji DNA (matryca K). Zestawienie tych dwóch matryc pozwala na wirtualną ekstrakcję fragmentów DNA związanych tylko ze zmianami metylacji DNA (matryca M).

Ocenę przydatności systemu markerowego opartego na technice metAFLP do prowadzonych badań wykonano w programie GenAlex (dodatek do Excel) [274] określając procent polimorficznych loci (%P), heterozygotyczność (He) i indeks stopnia polimorfizmu (ang. Polymorphic Information Content: PIC). Identyfikację podobieństwa materiałów badawczych przeprowadzono stosując hierarchiczną analizę skupień metodą średnich połączeń UPGMA (ang. Unweight Pair Group Method with Arithmetic Mean) ze współczynnikiem podobieństwa Jacquarda opartą na danych sekwencyjnych (matryca K) oraz na danych dotyczących zmian we wzorach metylacji DNA (matryca M). Do analizy wykorzystano oprogramowanie XLSTAT [275].

Ponadto, zestawienie ze sobą matryc 0-1 pochodzących z cięcia DNA dwoma różnymi zestawami enzymów restrykcyjnych pozwoliło na ocenę jakościową i ilościową zmian takich jak demetylacja DNA (DMV), metylacja *de novo* DNA (DNMV) i zmienność sekwencyjna DNA (SV). Oszacowano także poziom zmienności wywołanej kulturą *in vitro* (TCIV), która jest sumą poszczególnych typów zmian (składowe zmienności) identyfikowanych u regenerantów. Ilościowa charakterystyka dotyczyła także zmian odnoszących się do poszczególnych sekwencji DNA takich jak CG, CHG i CHH. Do oszacowania różnic między średnimi wartościami dla składowych metAFLP (TCIV, SV, DMV, DNMV) w określonych kontekstach sekwencji (CHH, CG, CHG) i w poszczególnych warunkach regeneracji (wariantach nr. 1-9) zastosowano analizę wariancji (ANOVA) z testami post-hoc Gamesa-Howella i Tukeya.

W publikacji **P3** zamieszczono wyniki badań wykonane na pszenżycie ozimym. Rośliny donorowe wyprowadzono na drodze androgenyzy analogicznie jak opisano w publikacji **P1**. Regeneranty uzyskano na drodze somatycznej embriogenezy z niedojrzałych zarodków zygotycznych, testując dziewięć wariantów doświadczenia (warianty nr. 1-9).

Uzyskanie regenerantów na drodze somatycznej embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych

Z dwudziestu roślin donorowych uprawianych w warunkach kontrolowanych w fitotronie pobierano kłosa z niedojrzałymi ziarniakami w 12-16 dni po zapyleniu. Pobrane niedojrzałe ziarniaki z zarodkami w fazie koleoptylarnej sterylizowano, a następnie zarodki zygotyczne wyłożono na stałą pożywkę indukującą-MS [276] z dodatkiem 2 mg l^{-1} 2,4-D. Kultury utrzymywano w warunkach 16h/8h dzień/noc w temp. 26°C . Długość etapu indukcji (czas inkubacji) obejmował czas od umieszczenia zarodków na IM do pobrania kalusów i przeniesienia ich na pożywkę regeneracyjną. Wariant nr 1 był traktowany jako kontrola. Wytworzony kalus, struktury zarodkopodobne i zarodki były przenoszone na pożywkę regeneracyjną 190-2 (R1) [272] uzupełnioną regulatorami wzrostu [277], $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ NAA i $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ kinetyny. Kultury na pożywkach regeneracyjnych prowadzono w warunkach 16h/8h dzień/noc w temp. 26°C . Zregenerowane, rośliny przenoszono do kolb na pożywkę ukorzeniającą 190-2 (N6J) z 2 mg l^{-1} IAA a gdy osiągnęły wielkość ok. 10-12 cm zostały wysadzone do doniczek, aklimatyzowane, a następnie poddane jarowizacji. Po okresie aklimatyzacji rośliny przeniesiono do szklarni i uprawiano w standardowych warunkach szklarniowych do osiągnięcia dojrzałości i zbioru nasion. Dla różnych roślin donorowych uzyskano od 0 do 12 regenerantów w jednym wariantcie doświadczenia. Do analizy wybrano regeneranty z jednej rośliny donorowej; regeneranty te reprezentowały wszystkie testowane warunki kultury *in vitro* (warianty nr. 1-9). Testowano 45 roślin, po pięć regenerantów z każdego wariantu doświadczenia.

Do techniki metAFLP pozyskano DNA ze wszystkich uzyskanych roślin (20 roślin donorowych i 45 regenerantów). Analizy metAFLP wykonano zgodnie z uprzednio opublikowanymi protokołami [141, 263] a wykonane analizy były analogiczne do tych wykonanych w publikacji **P2**.

W publikacji **P4** wykorzystano wartości TCIV oraz jej składowych, SV, DMV, DNM wyrażone w procentach (%) dla regenerantów opisanych w **P2** i **P3**. Porównano na wykresach ilościowe składowe TCIV uzyskane techniką metAFLP dla regenerantów z kultur pylnikowych i kultur niedojrzałych zarodków zygotycznych, uwzględniając również konteksty metylacji (CG, CHG i CHH). Wykresy zostały wygenerowane przy użyciu oprogramowania SCImago Graphica Beta 1.0.17 (www.graphica.app)

4. PREZENTACJA WYBRANYCH WYNIKÓW BADAŃ ORAZ ICH DYSKUSJA

Postawione w niniejszej rozprawie doktorskiej cele badawcze zrealizowano w trzech etapach prac eksperymentalnych, których wyniki opisano w publikacjach **P1-P4**. W pierwszym etapie badań podjęto próbę optymalizacji warunków kultur *in vitro* bazując na zróżnicowanym stężeniu jonów miedzi i srebra w pożywce indukującej oraz zmiennym czasie trwania kultur u jęczmienia, pszenżyta i pszenicy w celu zwiększenia wydajności regeneracji zielonych roślin na drodze androgenezy (**P1**). W drugim etapie oceniono wpływ jonów miedzi i srebra oraz czasu inkubacji eksplantatów na pożywkach indukujących, na TCIV i jej składowe u regenerantów pszenżyta, uzyskanych na drodze, androgenezy w kulturach pylnikowych (**P2**) oraz somatycznej embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych (**P3**). Trzecim etapem prezentowanych badań było porównanie regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy w różnych warunkach kultur *in vitro* uwzględniając składowe TCIV uzyskane metodą metAFLP (**P4**). Poniżej przedstawiono opis uzyskanych wyników.

Zwiększenie efektywności uzyskiwania zielonych regenerantów (P1)

Kluczowym punktem badań opisanych w publikacji **P1** a także w publikacjach **P2** i **P3** było uzyskanie jednolitych pod względem morfologicznym i genetycznym roślin donorowych, które następnie były źródłem eksplantatów w doświadczeniu optymalizującym i weryfikującym. Uzyskano rośliny donorowe nie różniące się pod względem cech morfologicznych od roślin wyjściowych, z których zostały uzyskane. Rośliny donorowe będące generatywnym potomstwem regenerantów (DH) dzięki przejściu przez pojedynczy cykl samozapylenia są bardziej stabilne pod względem genetycznym jak i epigenetycznym w porównaniu z regenerantami [87].

Optymalizacja składu pożywek indukujących, wykonana w kierunku uzyskania największej liczby zielonych regenerantów, dla trzech gatunków zbóż wykazała, że zastosowane czynniki (CuSO_4 i AgNO_3 oraz czas inkubacji eksplantatów na IM) były istotne podczas uzyskiwania zielonych regenerantów, zaś różnice w ilości uzyskiwanych GP wynikały z różnych poziomów zastosowanych czynników, co zostało potwierdzone analizą wariancji (Tab. 1).

Tabela 1. Liczba zielonych regenerantów (GP) jęczmienia, pszenicy i pszenżyta uzyskanych w kulturach *in vitro* na 100 wyłożonych pylników na pożywki indukujące w doświadczeniu optymalizującym.

Warianty doświadczenia		Liczba GP			Warunki kultury <i>in vitro</i>		
		Jęczmień (J)	Pszenica (Psz)	Pszenżyto (Pż)	CuSO ₄ (μM)	AgNO ₃ (μM)	Czas (dni, J/Psz/Pż)
(1) (Kontrola)		0,64b ^{cf}	5,52 ^{ab}	0,91 ^b	0,1	0	21/35/35
(2)		0,67 ^{bc}	7,93 ^{ab}	0,87 ^b	0,1	10	28/42/42
(3)		1,09 ^{bc}	14,62 ^a	1,52 ^b	0,1	60	35/49/49
(4)		0,45 ^{bc}	14,07 ^{ab}	0,71 ^b	5	60	28/42/42
(5)		0,10 ^c	5,81 ^{ab}	2,38 ^{ab}	5	0	35/49/49
(6)		2,12 ^{ab}	4,33 ^b	1,17 ^b	5	10	21/35/35
(7)		2,91 ^a	4,44 ^{ab}	3,79 ^{ab}	10	10	35/49/49
(8)		1,77 ^{abc}	10,71 ^{ab}	4,24 ^{ab}	10	60	21/35/35
(9)		0,54b ^c	5,67 ^{ab}	6,06 ^a	10	0	28/42/42
ANOVA	F	5,415	2,921	3,193			
	<i>p</i>	0,0001	0,005	0,002			

[†]Wartości oznaczone różnymi literami (a-c) w obrębie jednej kolumny różnią się istotnie ($p < 0.05$); grupowanie wykonane testem post-hoc Tukeya.

Dla każdego badanego gatunku, w oparciu o metodę Taguchiego, określono poziom użytych czynników w pożywce indukującej, przy czym warunki te były różne między gatunkami. Ponadto, stosując metodę Taguchiego zredukowano liczbę doświadczeń niezbędnych do optymalizacji warunków regeneracji roślin w kulturach *in vitro* z 27 dla planu kompletnego, obejmującego wszystkie możliwe kombinacje zastosowanych czynników i ich poziomów, do dziewięciu.

Dla **jęczmienia** obserwowano pozytywny wpływ 10 μM CuSO₄ w IM i brak efektu AgNO₃ w stężeniu 10 μM na regenerację GP (wariant nr 7, Tab. 1). Wpływ uzupełnienia pożywek do kultur *in vitro* o CuSO₄ w szerokim zakresie stężeń (10-80 μM) był już wcześniej badany [126]. Chociaż liczba GP zaprezentowana w publikacji **P1** (0,1-2,91) była niższa niż w badaniu Jacquarda i wsp. [126] (0-106,6), to obserwowano poprawę liczebności zregenerowanych GP. Ponadto, ta rozbieżność w liczbie uzyskiwanych GP

może wynikać z użycia różnych genotypów, gdyż czynnik ten silnie determinuje wydajność regeneracji na drodze androgenezy [278]. Należy podkreślić, że stężenie CuSO_4 w pożywce nie może być zwiększane bez limitu; przy stężeniu $>80 \mu\text{M}$ embriogeneza mikrospor jest całkowicie hamowana [126]. Ponadto Makowska i wsp. odnotowali wzrost liczebności GP u jęczmienia uzyskany w kulturach izolowanych mikrospor w obecności $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 [279]. Dane te są zgodne z wynikami przedstawionymi w publikacji **P1**, co sugeruje, że stężenie $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 może korzystnie wpływać na poprawę wydajności regeneracji GP. Natomiast najwyższe stężenie AgNO_3 ($60 \mu\text{M}$) nie gwarantowało najwyższej wydajności uzyskiwania zielonych regenerantów (wariant nr 3). Co ciekawe, żadne ze stężeń AgNO_3 ($0-60 \mu\text{M}$; warianty nr. 1-3) w obecności najniższego stężenia CuSO_4 nie prowadziło do wzrostu liczby GP. Ponadto, genotyp jęczmienia opisany w publikacji **P1** wydaje się preferować pośredni czas inkubacji pylników na IM w porównaniu z kontrolą. Chociaż przyczyna tej obserwacji nie jest oczywista, prawdopodobnie bardzo krótki czas inkubacji pylników na IM nie jest wystarczający do regeneracji dużej liczby zielonych roślin, podczas gdy przedłużająca się inkubacja może prowadzić do hamowania regeneracji w wyniku gromadzenia się w IM substancji niesprzyjających kulturom pylnikowym jęczmienia.

Dla **pszenicy** najwyższą wydajność regeneracji GP obserwowano w obecności najniższego stężenia CuSO_4 ($0,1 \mu\text{M}$) i najwyższego AgNO_3 ($60 \mu\text{M}$), przy zastosowaniu wydłużonego czasu inkubacji pylników na IM (wariant nr 3). Podobną zależność zaobserwowano dla trzech z czterech badanych genotypów pszenicy przy wyższym stężeniu AgNO_3 ($15-30 \mu\text{M}$), gdzie obserwowano wyższą częstotliwość tworzenia zarodków w porównaniu z kontrolą [280]. Mając na uwadze pozytywny wpływ jonów Cu^{2+} na poprawę wydajności uzyskiwania regenerantów nie jest jasne, dlaczego pszenica preferuje raczej niskie niż wysokie stężenie CuSO_4 w pożywce indukującej. Możliwe, że kultury pylnikowe pszenicy, a w szczególności genotyp zastosowany w badaniach opisanych w publikacji **P1** (pszenica ozima Svilena), jest bardziej wrażliwy na toksyczność jonów Cu^{2+} . Tę ostatnią hipotezę mogą potwierdzać badania, w których obserwowano różne reakcje innych genotypów pszenicy na obecność jonów Cu^{2+} [281]. Podczas uzyskiwania regenerantów pszenicy pośrednia (i przedłużona) długość etapu inkubacji pylników na IM skutkowała wyższą efektywnością niż ta, zastosowana w próbie kontrolnej (wariant nr 1), podobnie jak w przypadku jęczmienia.

W przypadku **pszenżyta** poprawa wydajności regeneracji GP była obserwowana przy najwyższym stężeniu CuSO_4 ($10 \mu\text{M}$) i braku AgNO_3 w IM (wariant nr 9), natomiast średnie stężenie CuSO_4 i wysokie stężenie AgNO_3 redukowało liczbę GP (wariant nr 4), a długość czasu inkubacji eksplantatów na IM nie miał istotnego wpływu na produkcję GP. W pracy Purnhauser'a i Gyulai [282] wykazano, że najlepsza regeneracja pędów pszenżyta następuje w zakresie $0,1-1 \mu\text{M}$ CuSO_4 , natomiast przy zastosowaniu $10 \mu\text{M}$ CuSO_4 średnia liczba zregenerowanych pędów na kalus zmniejszyła się. W konsekwencji dalsze zwiększanie stężenia CuSO_4 (do $100 \mu\text{M}$) powodowało spadek liczby zregenerowanych pędów. Ponadto, wykazano, że szeroki zakres stężeń AgNO_3 ($1-100 \mu\text{M}$) poprawiał regenerację pędów u pszenżyta w porównaniu z kontrolą pozbawioną jonów Ag^+ i zawierającą niskie stężenie jonów Cu^{2+} . Jednak najbardziej wydajny proces powstawania pędów u pszenżyta obserwowano przy $1-10 \mu\text{M}$ AgNO_3 [282]. Na podstawie wyników zaprezentowanych w publikacji **P1** stwierdzono, że obecność AgNO_3 w IM tylko nieznacznie wpływała na regenerację zielonych roślin, przy wysokim stężeniu CuSO_4 (warianty nr. 7-8). Wyniki te sugerują, że przynajmniej przy wysokich stężeniach CuSO_4 , AgNO_3 ma ograniczony wpływ na regenerację zielonych roślin u pszenżyta. Najwyższą liczbę GP pszenżyta w doświadczeniu optymalizującym uzyskano przy pośrednim czasie inkubacji pylników na IM.

W oparciu o metodę Taguchiego wytypowano zoptymalizowane warunki do poprawy wydajności uzyskiwania zielonych regenerantów. Warunki zoptymalizowane nie zawsze były takie same jak stężenia CuSO_4 i AgNO_3 oraz czas inkubacji, oparte na tablicach ortogonalnych używanych w metodzie Taguchiego, i wykorzystane na etapie optymalizacji doświadczenia. Dla poszczególnych gatunków w warunkach zoptymalizowanych uzyskano następujące liczebności regenerantów na 100 wyłożonych pylników dla: jęczmienia $0,95 \text{ GP}/100\text{P}$ (kontrola-10) vs. $1,97 \text{ GP}/100\text{P}$ (warunki zoptymalizowane-11B); pszenicy $4,95 \text{ GP}/100\text{P}$ (kontrola-10) vs. $7,99 \text{ GP}/100\text{P}$ (warunki zoptymalizowane-11W); pszenżyta $0,55 \text{ GP}/100\text{P}$ (kontrola-10) vs. $1,61 \text{ GP}/100\text{P}$ (warunki zoptymalizowane-11T). W warunkach zoptymalizowanych przy użyciu metody Taguchiego, w kierunku uzyskania większej liczby zielonych regenerantów, otrzymano 2-3-krotnie wyższą liczbę GP w odniesieniu do kontroli, ale tylko w przypadku pszenżyta, ANOVA potwierdziła istotność różnicy między warunkami zoptymalizowanymi a kontrolą, tym samym potwierdzając skuteczność wykonanej optymalizacji. Doniesienia literaturowe również wskazują na różnice w liczbie uzyskanych zielonych regenerantów

w warunkach optymalnych i kontrolnych, przy czym ta różnica nie zawsze jest istotna [279]. Resumując, wykorzystanie metody Taguchiego w procesie optymalizacji warunków kultur *in vitro* okazało się przydatne i może być dobrą metodą w przypadku optymalizacji wielu czynników jednocześnie, przy ograniczonej dostępności materiału doświadczalnego.

W publikacji **P1** zaprezentowano wyniki dotyczące liczby roślin albinotycznych. Warunki zoptymalizowane w kierunku zwiększenia liczby GP, spowodowały zmniejszenie liczby albinotycznych regenerantów pochodzących z kultur pylnikowych jęczmienia i pszenżyta. Nie zauważono takiej prawidłowości w przypadku regenerantów pochodzących z kultur pylnikowych pszenicy. Dane dotyczące stosunku liczby regenerantów zielonych do albinotycznych przedstawiono jako stosunek GP do AP w warunkach kontrolnych oraz zoptymalizowanych dla: jęczmienia 1:6 (wariant nr 10) vs. 1:4 (wariant nr 11B); pszenicy 1:0,5 (wariant nr 10) vs. 1:0,5 (wariant nr 11W); pszenżyta 1:2 (wariant nr 10) vs. 1:0,5 (wariant nr 11T). Wyniki uzyskane dla jęczmienia i pszenżyta, można tłumaczyć działaniem siarczynu miedzi. Podobny wpływ CuSO_4 na uzyskiwanie zielonych regenerantów vs albinotycznych obserwowano gdy jony Cu^{2+} były dodawane do pożywki regeneracyjnej [125] oraz do wstępnego traktowania kłosów jęczmienia, z których następnie pobierano pylniki [128]. Także dla pszenicy obserwowano zwiększenie ilości GP i zmniejszenie AP [283], jednak wyniki zawarte w publikacji **P1** nie pozwoliły na stwierdzenie takiej zależności.

W wyniku wykonanych prac nie uzyskano natomiast poprawy spontanicznej diploidyacji genomu, mimo zwiększenia liczby GP. Należy podkreślić, że optymalizacja była wykonywana w kierunku zwiększenia liczby zielonych regenerantów, a nie poprawy wydajności spontanicznego podwajania. Zintensyfikowanie podwojenia liczby chromosomów w przypadku jęczmienia i pszenżyta, może odbywać się poprzez zastosowanie związków o działaniu antymitotycznym, przy czym spontaniczna duplikacja genomu nie stanowi problemu szczególnie u jęczmienia.

Podsumowanie badań zaprezentowanych w publikacji P1

- Proces optymalizacji warunków kultur *in vitro* w kierunku uzyskania poprawy wydajności uzyskiwania zielonych regenerantów skutkowało wzrostem liczby GP pszenżyta w porównaniu z kontrolą, co wynika z wpływu zastosowanych jonów miedzi i srebra oraz czasu trwania kultury *in vitro*.

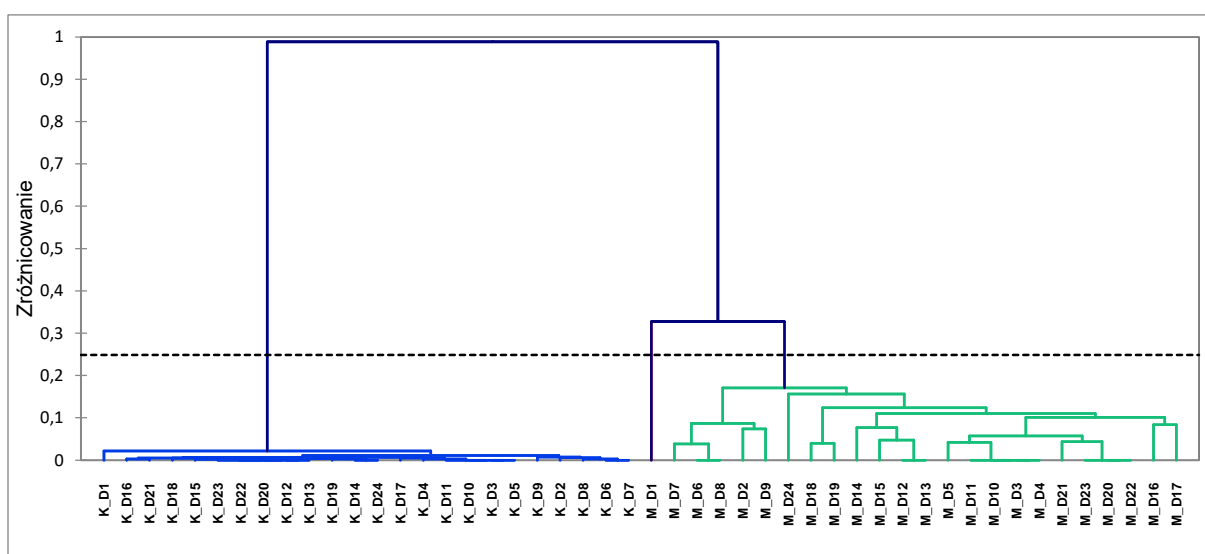
- W przypadku kultur pylnikowych jęczmienia i pszenżyta wykazano obniżenie liczebności albinotycznych regenerantów w stosunku do zregenerowanych zielonych roślin.
- Ze wzrostem liczby zregenerowanych zielonych roślin nie obserwowano podwyższenia liczby spontanicznie podwojonych haploidów.
- Metoda Taguchiego wybrana do optymalizacji zawartości jonów Cu^{2+} i Ag^+ w pożywce indukującej oraz czasu inkubacji eksplantatów na IM pozwoliła na zredukowanie liczby wariantów eksperymentalnych z 27, wykonywanych w przypadku planu kompletnego, do dziewięciu.
- Bazując na uzyskanych wynikach dowiedziono, że dodawanie do IM CuSO_4 i AgNO_3 oraz modulacja czasu inkubacji eksplantatów na IM, prowadzi do zoptymalizowania warunków kultur pylnikowych i wpływa na poprawę uzyskiwania zielonych regenerantów badanych zbóż.

Wpływ jonów metali i czasu na zmienność wywołaną kulturą *in vitro* (P2-P3)

Pożywki indukujące, a w szczególności obecne w nich jony metali, ze względu na ich istotną rolę w procesach biochemicznych zachodzących w komórkach mogą odgrywać istotną rolę w odniesieniu do zmienności wywołanej kulturą *in vitro*. Ze względu na odmienne mechanizmy regeneracji roślin na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy można oczekiwać, że będą występowały różnice w poziomie zmienności zależne od stężeń tych jonów.

Rośliny donorowe wykorzystane w procesie uzyskiwania regenerantów na drodze androgenezy wykazywały minimalny poziom heterozygotyczności (He) (0,003 i 0,007 dla danych sekwencyjnych (K) i metylacyjnych (M)) (P2), podobnie niską wartość He (0,007 dla K i M) (P3) uzyskano dla roślin donorowych, z których pozyskiwano eksplantaty do somatycznej embriogenezy, taki wynik wskazuje, że źródło eksplantatu może w bardzo niewielkim stopniu wpływać na zmienność obserwowaną u regenerantów. Niemniej jednak, aby całkowicie wykluczyć możliwość wpływu wynikającego z różnego poziomu zmienności u poszczególnych roślin donorowych, a przez to ograniczyć wpływ genotypu [284, 149, 285] na zmienność wywołaną kulturą *in vitro*, z puli roślin donorowych, wybrano losowo jedną roślinę, a regeneranty pochodzące z tej rośliny zostały włączone do analiz. Taka procedura dała pewność, że zmiany obserwowane u regenerantów są wynikiem działania warunków kultur *in vitro*, a nie wynikają ze zmienności wprowadzonej

z eksplantatem (pre-existing variation). Hierarchiczna analiza skupień wykonana dla roślin donorowych wykazała obecność dwóch klastrów odzwierciedlających zmiany w sekwencji (K), oraz zmiany w metylacji (M) DNA badanych roślin (Ryc. 2). Ponadto, zaobserwowano niższy poziom zmienności dotyczącej sekwencji DNA, w porównaniu ze zmianami dotyczącymi metylacji (Ryc. 2). Wynik uzyskany dla roślin donorowych pszenżyta w publikacjach **P2** i **P3** jest zgodny z wcześniejszymi danymi dotyczącymi szacowania zmienności u roślin donorowych jęczmienia wykorzystywanych jako źródło eksplantatów do androgenyzy [263] i somatycznej embriogenezy [261].



Rycina 2. Zróżnicowanie (epi)genetyczne roślin donorowych (D) pszenżyta, wykonane w oparciu o analizę skupień uwzględniającą markery sekwencyjne (K) i metylacyjne (M) ze współczynnikiem podobieństwa Jaccarda.

Wykorzystanie techniki metAFLP łącznie z opracowanym uprzednio sposobem ilościowej oceny TCIV oraz jej składowych, umożliwiło ocenę zmienności sekwencyjnej, metylacji *de novo* i demetylacji DNA [141, 263] w odniesieniu do warunków kultury *in vitro*, uwzględniając uzupełnienie IM solami miedzi i srebra oraz modyfikując czas inkubacji eksplantatów (pylniki i niedojrzałe zarodki zygotyczne) na IM. Przyjmuje się, że skład pożywki [286-288] i czas utrzymywania kultury *in vitro* [289] mogą wpływać na zmienność wywołaną kulturą tkankową [260, 290, 262, 261]. Wykazano, że jony miedzi i srebra mogą wpływać na metylację DNA i zmienność sekwencyjną [186]. Ponadto, dla pszenżyta obserwowano pozytywny wpływ uzupełnienia IM o CuSO_4 w stężeniu $10 \mu\text{M}$ na uzyskiwanie zielonych regenerantów (**P1**). Mając na uwadze powyższe obserwacje, spodziewano się, że uzupełnienie IM jonami Cu^{2+} , Ag^+ jak również zmiana długości czasu

inkubacji eksplantatów na IM może mieć wpływ na TCIV obserwowaną u regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy (**P2**) i somatycznej embriogenezy u pszenżyta (**P3**).

U regenerantów pszenżyta uzyskanych w kulturach pylnikowych (**P2**) najwyższą wartość TCIV-52,24% obserwowano dla wariantu doświadczenia nr 3, charakteryzującego się najniższym stężeniem jonów miedzi i najwyższym stężeniem jonów srebra w pożywce i z najdłuższym czasem inkubacji pylników na pożywkach indukujących (Tab. 2). Najniższe TCIV obserwowano dla wariantu nr 9 z najwyższym stężeniem jonów miedzi, brakiem jonów srebra i średnim czasem inkubacji pylników na pożywkach indukujących. Co ciekawe, warunki te odpowiadały największej liczbie zielonych regenerantów pszenżyta, jak wykazano w badaniach opublikowanych w pracy **P1**. Najbardziej znaczący udział w TCIV identyfikowanej u regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy miały zmiany w sekwencji DNA mieszczące się w zakresie 43,76 (wariant nr. 3)-43,03% (wariant nr 9). Średnio obserwowano ponad 43% takich zmian, w porównaniu z około 20% odnotowanymi we wcześniejszych pracach [146]. Ta prawie dwukrotna różnica mogła odzwierciedlać wpływ warunków prowadzenia kultury tkankowej (różne składy pożywek do kultur *in vitro*). Ponadto, najniższe wartości SV obserwowano przy najwyższym poziomie miedzi oraz przy skrajnych poziomach (niskim i wysokim) jonów Ag^+ , co wskazuje na brak wpływu jonów srebra na obserwowane zmiany w sekwencji DNA regenerantów pszenżyta. Podobną zależność dotyczącą SV odnotowano także u regenerantów jęczmienia uzyskanych w kulturach pylnikowych [263]. Niższe wartości w porównaniu z SV obserwowano dla zmian metylacyjnych. Demetylacja DNA mieściła się w granicach 5,08-5,26% i była najwyższa dla najniższego stężenia jonów Cu^{2+} (0,1 μM) (wariant nr 3). Średnia wartość DMV była zbieżna z wynikami uzyskanymi we wcześniejszych pracach [146]. Zaobserwowano także różnice w poziomie metylacji *de novo* u regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy w różnych warunkach kultur *in vitro*. Metylacja *de novo* mieściła się w granicach 3,13-3,48%, a najwyższy poziom DNMV dotyczył pośredniego stężenia jonów Cu^{2+} bez obecności jonów Ag^+ i przy najdłuższym czasie inkubacji (49 dni) pylników na pożywkach indukujących (wariant nr 5) (Tab. 2). Najmniej nowych zdarzeń DNMV zaobserwowano w warunkach kontrolnych (wariant nr 1) i wariacie nr 2 przy niskich stężeniach Cu^{2+} , Ag^+ i pośrednim czasie inkubacji (42 dni). ANOVA wykazała różnice między poszczególnymi wariantami doświadczenia dla TCIV, SV i DNMV, i brak istotnych różnic dla DMV (Tab. 2).

Tabela 2. Średnie wartości zmienności wywołanej kulturą *in vitro* oraz jej składowych dla regenerantów pszenżyta uzyskanych na drodze androgenezy (**P2**) i somatycznej embriogenezy (**P3**) w różnych warunkach (WD: warianty doświadczenia 1-9) kultury *in vitro*. Wartości statystyki (*F*) oraz prawdopodobieństwa (*p*) dla analizy wariancji (ANOVA).

WD [†]	Składowe metAFLP (%) ^{††}								Warunki kultury <i>in vitro</i>		
	Androgeneza (P2)				Somatyczna embriogeneza (P3)						
	TCIV	SV	DMV	DNMV	TCIV	SV	DMV	DNMV	Cu ²⁺ (μM)	Ag ⁺ (μM)	Czas (dni)
(1)	51,84 ^a	43,55 ^{ab}	5,08 ^a	3,21 ^c	45,55 ^a	38,45 ^a	5,97 ^b	1,12 ^a	0,1	0	35
(2)	51,73 ^{ab}	43,47 ^{abc}	5,14 ^a	3,13 ^c	45,62 ^a	38,57 ^a	5,93 ^b	1,11 ^a	0,1	2	42
(3)	52,24 ^a	43,76 ^a	5,26 ^a	3,22 ^{bc}	45,47 ^a	38,43 ^a	5,93 ^b	1,11 ^a	0,1	10	49
(4)	51,89 ^a	43,39 ^{abc}	5,11 ^a	3,39 ^{abc}	45,40 ^a	38,35 ^a	5,93 ^b	1,11 ^a	5	10	42
(5)	52,12 ^a	43,52 ^{abc}	5,12 ^a	3,48 ^a	45,10 ^{ab}	38,01 ^{ab}	5,97 ^b	1,12 ^a	5	0	49
(6)	51,78 ^{ab}	43,20 ^c	5,14 ^a	3,44 ^{ab}	45,10 ^{ab}	38,01 ^{ab}	5,97 ^b	1,12 ^a	5	2	35
(7)	51,81 ^{ab}	43,23 ^{bc}	5,24 ^a	3,34 ^{abc}	44,36 ^b	37,29 ^b	5,95 ^b	1,12 ^a	10	2	49
(8)	51,66 ^{ab}	43,11 ^c	5,19 ^a	3,35 ^{abc}	44,84 ^b	37,39 ^b	6,33 ^a	1,12 ^a	10	10	35
(9)	51,50 ^b	43,03 ^c	5,12 ^a	3,35 ^{abc}	44,69 ^b	37,32 ^b	6,26 ^{ab}	1,12 ^a	10	0	42
ANOVA	<i>F</i>	2,794	3,202	2,045	7,923	8,750	15,534	27,199	1,160		
	<i>p</i>	0,017	0,008	0,069	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001	0,429		

[†](1), kontrola; (2–9), warianty doświadczenia optymalizacyjnego;

^{††}Skróty: TCIV, SV, DMV, i DNMV odzwierciedlają zmienność wywołaną kulturą *in vitro*, zmienność sekwencyjną, demetylację i metylację *de novo*; wartości oznaczone różnymi literami (a-c) w obrębie jednej kolumny różnią się istotnie ($p < 0.05$); grupowanie wykonane testem post-hoc Tukeya.

Natomiast grupowanie wykonane przy użyciu testu post-hoc Tukeya pokazało, że testowane warunki regeneracji miały swoje odzwierciedlenie w różnym poziomie zmian identyfikowanych u regenerantów, co świadczy o tym, że składniki pożywek są odpowiedzialne za TCIV. Chociaż w literaturze można znaleźć informacje dotyczące TCIV u regenerantów pszenżyta uzyskanych metodą androgenezy i embriogenezy somatycznej [291, 146], to w żadnym z tych badań nie próbowano modulować poziomu TCIV u regenerantów pszenżyta. Dane zaprezentowane w publikacji **P2**, dowodzą, że

zmiana stężenia składników IM i czasu inkubacji eksplantatów na IM może zwiększyć lub zmniejszyć poziom TCIV. Można przypuszczać, że to jony miedzi zastosowane w wyższych stężeniach były odpowiedzialne za najniższe wartości TCIV. Biorąc pod uwagę, że warunki zaproponowane w wariantcie doświadczenia nr 9 sprzyjają najwyższej liczebności zielonych regeneratów pszenżyta (**P1**), fakt niskiego TCIV wydaje się być doskonałą przesłanką do wyboru takich warunków kultury *in vitro*, które nie tylko poprawią wydajność systemu pod względem produkcji zielonych regenerantów, ale także pozwolą na uzyskanie genetycznie jednorodnych roślin DH.

Charakterystyka ilościowa danych uzyskanych techniką metAFLP dla regenerantów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy (**P3**) wykazała, że najwyższy poziom TCIV, (w zakresie 44,36-45,55%) obserwowano dla wariantu nr 2, przy najniższym stężeniu jonów miedzi, pośrednim poziomie jonów srebra i pośrednim czasie inkubacji niedojrzałych zarodków zygotycznych na IM (Tab. 2). Podobnie przy niskim stężeniu jonów miedzi uzyskiwano najwyższe wartości dla TCIV u regenerantów pszenżyta uzyskanych w procesie androgenezy (**P2**). Z kolei najwyższy poziom zastosowanych jonów miedzi, pośredni poziom jonów srebra i najwyższy czas inkubacji spowodowały najmniejsze zmiany wywołane przez kulturę *in vitro* (wariant nr 7). Różny skład pożywek indukujących obejmujący dodatek jonów miedzi i srebra wraz z różnym czasem inkubacji niedojrzałych zarodków zygotycznych na IM różnicował regeneranty pochodzące z różnych warunków doświadczenia (warianty nr. 1-9), uwzględniając poziom TCIV, co potwierdziła ANOVA (Tab. 2). Uzyskany, średni poziom TCIV dla regenerantów pszenżyta uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy (45,13%) zasadniczo nie odbiegał od poziomu zmian wywołanych podczas regeneracji roślin pszenżyta na drodze androgenezy (51,84%) (**P2**). Natomiast uzyskany wynik jest wyższy niż TCIV obserwowana u regenerantów jęczmienia (8,74%), uzyskanych w takim samym typie kultury tkankowej [261]. Tak znaczne różnice w poziomie TCIV w DNA regenerantów dwóch różnych gatunków zbóż mogą wynikać z różnic między gatunkami. Jęczmień jest gatunkiem samopylnym, diploidalnym, o $2n=14$ chromosomów i wielkości genomu 5,1 Gbp [292]. Z drugiej strony, pszenżyto to syntetyczny allopoliploidalny gatunek zboża, który łączy w swoim genomie chromosomy pszenicy i żyta. Kiedy genomy rodziców łączą się, tworząc złożony allopoliploidalny genom, może dojść do rearanżacji [293], co może prowadzić do niestabilności genomu hybrydowego [294]. Ponadto, zaobserwowano także wpływ dodatku do IM różnych stężeń jonów miedzi i srebra, czego odzwierciedleniem jest

poziom TCIV, i co potwierdziła ANOVA. Obecność jonów miedzi w pożywkach do kultur tkankowych, czy to w pożywkach indukujących czy też regeneracyjnych, wydaje się uzasadniona, biorąc pod uwagę znaczenie tego mikroelementu w funkcjonowaniu roślin [295]; miedź jest obecna w ponad 100 enzymach zaangażowanych w kluczowe procesy życiowe roślin [182]. Wśród składowych TCIV obserwowanych u regenerantów pszenżyta uzyskanych na drodze SE, zmienność genetyczna, tj. zmiany w sekwencji DNA, miały największy udział (38%) (**P3**). Przy czym najwyższej zmienności sekwencyjnej towarzyszyło najniższe stężenie jonów miedzi (wariant nr 2). Podobny udział zmian SV w TCIV odnotowano także u regenerantów pszenżyta wyprowadzonych zarówno na drodze somatycznej embriogenezy [146], jak i androgenezy (**P2**), [146], należy jednak zaznaczyć, że w badaniach Machczyńskiej i wsp. [146] poziom SV był niższy i wynosił ok. 19%. Udział zmian epigenetycznych, które dotyczyły spadku metylacji DNA (demetylacja) i wzrostu metylacji genomowego DNA (metylacja *de novo*) w porównaniu z roślinami donorowymi wynosił odpowiednio, około 6% i 1% (**P3**). Porównanie danych dla wariantów doświadczenia (warianty nr. 1-9) oparte na ANOVA dla poszczególnych składowych TCIV wykazało istotne różnice między wariantami doświadczenia dla SV i DMV, natomiast nie zaobserwowano różnic dla DNMV. Warunki kultur *in vitro* przy najniższym stężeniu $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ skutkowały najwyższym poziomem zmienności genetycznej u regenerantów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy (**P3**). Nie można wykluczyć, że minimalne stężenie jonów miedzi w IM nie zapewnia odpowiedniej ilości tego pierwiastka, pełniącego funkcję kofaktora w dysmutazie nadmanganowej Cu/Zn SOD. W konsekwencji może dojść do dysfunkcji tego enzymu i stresu oksydacyjnego, powodującego mutacje w DNA [296]. Obserwowane zmiany metylacji DNA u regenerantów uzyskanych na drodze SE (**P3**) były zdecydowanie niższe niż zmiany w sekwencji DNA. Ponadto, istotne różnice między regenerantami uzyskanymi w różnych warunkach kultur *in vitro* zaobserwowano tylko dla DMV, przy czym najniższy poziom DMV obserwowano w obecności minimalnego stężenia $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, zaś najwyższe stężenie jonów miedzi prowadziło do najwyższego poziomu DMV. Dane te są tylko częściowo zgodne z wynikami dla regenerantów uzyskanych w kulturach pylnikowych (**P2**). Wydaje się, że wysoki poziom DMV związany z maksymalnym użytym stężeniem $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ może odzwierciedlać działanie miedzi jako czynnika odpowiedzialnego za produkcję wolnych rodników tlenowych (ang. reactive oxygen species: ROS). Podwyższony poziom ROS może prowadzić do zmian oksydacyjnych w metylowanej

cytozynie [297] oraz, poprzez mechanizmy naprawcze, do jej usunięcia [298], a w konsekwencji do obniżenia metylacji genomowego DNA.

Technika metAFLP pozwala na wykonanie analiz dotyczących szacowania zmienności w poszczególnych kontekstach sekwencji DNA, w których może lokalizować się metylowana cytozyna. W przypadku regenerantów pszenżyta uzyskanych na drodze androgenezy (**P2**), każdy kontekst był odmienny, przy czym najwięcej zmian obserwowano w dwóch kontekstach symetrycznych (SV_CHG-22,97-23,55% i SV_CG-11,36-11,57%) i mniej w kontekście asymetrycznym (SV_CHH-8,54-8,75%; DMV_CHH-0,73-0,89% oraz DNMV_CHH-0,37-0,71)%. Obserwowany rozkład zmienności nie jest zaskakujący, ponieważ powszechnie metylacja w kontekstach asymetrycznych występuje najrzadziej [299]. Jednak, mimo że metylacja w roślinnym DNA występuje częściej w symetrycznym kontekście CG niż w kontekście CHG [299] to w przypadku pszenżyta wyższą zmienność zaobserwowano właśnie w kontekście CHG. Szczegółowa analiza składowych TCIV w poszczególnych kontekstach sekwencji wskazała na istotne różnice, które obserwowano między wariantami doświadczenia dla: SV_CHG, SV_CG, SV_CHH, DMV_CHH i DNMV_CHH w przypadku regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy (Tab. 3) (**P2**). Analiza ta pokazuje, że różnice między regenerantami uzyskanymi w testowanych warunkach kultury *in vitro* w kontekstach symetrycznych (CHG i CG) są widoczne tylko w przypadku zmienności sekwencyjnej. Natomiast zastanawiający może być brak różnic dotyczących zmian w metylacji DNA (DMV i DNMV) w obydwu kontekstach symetrycznych. Podobna analiza wykonana dla regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze androgenezy [263] i somatycznej embriogenezy [261] wskazała na różnice wynikające ze zmian w metylacji DNA. Nie można jednak wykluczyć, że obserwowane zmiany są związane ze specyfiką gatunkową – jęczmień jest gatunkiem naturalnie diploidalnym. Jednocześnie pszenżyto jest sztucznym gatunkiem powstałym w wyniku skrzyżowania pszenicy i żyta, i jest cytologicznie [300], i genetycznie niestabilny [301]. W analizie tej jedyne różnice dotyczące zmian w metylacji DNA między regenerantami, wynikające z warunków utrzymania kultury *in vitro*, dotyczyły metylacji *de novo* w najmniej reprezentowanym asymetrycznym kontekście CHH. Najwyższy poziom DNMV w kontekście sekwencji CHH odnotowano w wariacie nr 5, Jednocześnie warunki te sprzyjały też najwyższemu poziomowi zmian sekwencyjnych w DNA w kontekście CG. Nie można wykluczyć, że czynnikiem, który wpłynął na najwyższy poziom obserwowanych zmian, był czas-najdłuższy

w prezentowanym eksperymencie. Ta obserwacja może odzwierciedlać ogólną zależność, zgodnie, z którą wydłużenie czasu utrzymania kultury *in vitro* wiąże się ze wzrostem poziomu zmienności somaklonalnej [173].

Tabela 3. Średnie wartości składowych zmienności wywołanej kulturą *in vitro* w określonych kontekstach sekwencji DNA dla regenerantów pszenżyta uzyskanych na drodze androgenyzy (**P2**) i somatycznej embriogenezy (**P3**) w różnych warunkach (WD: warianty doświadczenia 1-9) kultury *in vitro*.

WD		Składowe metAFLP w kontekstach sekwencji DNA (%)							
		Androgenyza (P2)				Somatyczna embriogeneza (P3)			
		SV_ CHG	SV_ CG	SV_ CHH	DMV_ CHH	DNMV_ CHH	SV_ CHG	SV_ CG	DMV_ CG
(1)	23,46 ^{a†}	11,48 ^{ab}	8,66 ^{ab}	0,74 ^a	0,37 ^a	22,02 ^a	6,20 ^c	0,37 ^b	
(2)	23,42 ^{ab}	11,51 ^{ab}	8,58 ^{ab}	0,73 ^a	0,37 ^a	22,20 ^a	6,20 ^c	0,36 ^b	
(3)	23,55 ^a	11,52 ^{ab}	8,73 ^{ab}	0,89 ^a	0,41 ^{ab}	22,05 ^a	6,20 ^c	0,36 ^b	
(4)	23,35 ^{abc}	11,36 ^b	8,70 ^{ab}	0,74 ^a	0,60 ^{bcd}	21,98 ^{ab}	6,20 ^c	0,36 ^b	
(5)	23,23 ^{abc}	11,57 ^a	8,75 ^a	0,74 ^a	0,71 ^d	21,48 ^b	6,21 ^{bc}	0,37 ^b	
(6)	23,16 ^{bc}	11,52 ^{ab}	8,54 ^b	0,73 ^a	0,69 ^{cd}	21,48 ^b	6,21 ^{bc}	0,37 ^b	
(7)	23,15 ^{bc}	11,52 ^{ab}	8,59 ^{ab}	0,79 ^a	0,55 ^{bc}	20,87 ^c	6,22 ^{bc}	0,37 ^b	
(8)	23,06 ^{bc}	11,52 ^{ab}	8,56 ^{ab}	0,74 ^a	0,55 ^{bc}	20,96 ^c	6,23 ^a	0,73 ^a	
(9)	22,97 ^c	11,52 ^{ab}	8,57 ^{ab}	0,74 ^a	0,55 ^{bc}	20,88 ^c	6,23 ^b	0,73 ^c	
ANOVA	F	5,575	2,361	3,910	4,239	1143,106	23,214	6,951	2807,620
	p	0,0001	0,038	0,017	0,013	0,0001	0,0001	0,002	0,0001

[†]Wartości oznaczone różnymi literami (a-c) w obrębie jednej kolumny różnią się istotnie ($p < 0,05$); grupowanie wykonane testem post-hoc Tukeya.

Badanie różnic między regenerantami uzyskanymi w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych (**P3**) w różnych wariantach doświadczenia dla poszczególnych składowych TCIV z uwzględnieniem kontekstów sekwencji wykazało, że największa średnia SV była w kontekście SV_CHG (21,55%), a najmniejsza w CG (6,21%). Następnie od 4,44% do 0,45% zmian demetylacyjnych obserwowano w kontekstach CHG i CG,

a najmniej zmian było związanych z metylacją *de novo* (0,76-0%) (Publikacja P3, Fig.3). ANOVA wykazała istotne różnice między wariantami doświadczenia tylko dla SV_CHG, SV_CG i DMV_CG (Tab. 3). Różnice między regenerantami uzyskanymi w odrębnych warunkach kultury *in vitro* dla pozostałych składowych metAFLP i kontekstów sekwencji były nieistotne. ANOVA uwzględniająca poziom zmienności regenerantów z różnych wariantów doświadczenia w zakresie kontekstów sekwencji potencjalnie wskazała jony miedzi jako czynnik, który może wpływać na obserwowane zmiany. Zmienność wywołana kulturą *in vitro*, identyfikowana u regenerantów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy była największa w kontekstach CHG i CHH (**P3**). Jest to wynik nieco odmienny od analogicznej analizy wykonanej dla regenerantów pszenżyta uzyskanych na drodze androgenezy, gdzie najwyższy poziom zmienności obserwowano w kontekstach CHG i CG [181].

Podsumowanie badań zaprezentowanych w publikacjach P2 i P3

- Wśród uzyskanych roślin donorowych oraz regenerantów uzyskanych w kulturach pylnikowych oraz w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych nie obserwowano zmienności na poziomie ich cech morfologicznych. Brak zmian morfologicznych nie wykluczył, zmienności obserwowanej na poziomie (epi)genetycznym.
- Wykazano, że rośliny donorowe poddane jednemu cyklowi generatywnemu były jednorodne pod względem (epi)genetycznym, co ma znaczenie dla doboru odpowiedniego materiału matecznego (np. rośliny donorowe) do założenia kultur *in vitro* oraz prowadzenia badań poświęconych zmienności wywołanej kulturą *in vitro*.
- Niski poziom heterozygotyczności obserwowany dla roślin donorowych świadczy o tym, iż źródło eksplantatu może w bardzo niewielkim stopniu przyczyniać się do zmienności obserwowanej między regenerantami.
- Zastosowana technika badawcza-metAFLP, bazująca na dwóch różnych zestawach enzymów restrykcyjnych (Acc65I/Mse i KpnI/MseI) okazała się skuteczna do identyfikacji i rozróżniania zmienności wynikającej z polimorfizmu sekwencji DNA oraz ze zmian w jego metylacji, czego potwierdzeniem są wyniki hierarchicznej analizy skupień.
- Warunki kultur *in vitro* z uwzględnieniem składu pożywek oraz czasu inkubacji eksplantatów na pożywkach indukujących, mogą wpływać na składowe TCIV także

w odniesieniu do kontekstów sekwencji, prowadząc do zwiększenia lub zmniejszenia poziomu zmienności.

- Wyższym stężeniem jonów miedzi towarzyszył niższy poziom TCIV u regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy (**P2**), takie warunki kultur *in vitro* promowały też wydajniejszą regenerację zielonych roślin (**P1**)
- Fakt niskiego poziomu TCIV wydaje się być doskonałą przesłanką do wyboru takich warunków kultury *in vitro*, które nie tylko poprawią wydajność systemu pod względem produkcji zielonych regenerantów, ale także pozwolą na uzyskanie (epi)genetycznie jednorodnych roślin DH.
- Szczegółowa analiza poziomu zmienności dla regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy (**P2**) w różnych warunkach kultur *in vitro* w odniesieniu do kontekstów sekwencji wykazała, że najwyższy poziom zmienności jest obserwowany w obszarach symetrycznych kontekstów CG i CHG. Natomiast kontekst asymetryczny CHH charakteryzuje się najniższym poziomem zmienności.
- Warunki kultur *in vitro* z uwzględnieniem składu pożywek oraz czasu inkubacji eksplantatów na pożywkach indukujących, mogą wpływać na poziom zmienności regenerantów; w przypadku regeneracji w kulturach niedojrzałych zarodków zygocytynych (**P3**) zaobserwowano wpływ jonów miedzi, gdzie wraz z obniżeniem stężenia CuSO_4 zwiększał się poziom TCIV.
- Przeprowadzone analizy nie wskazują na znaczenie uzupełnienia pożywek indukujących solami srebra oraz nie wskazują na czas inkubacji eksplantatów na IM jako na czynniki mogące determinować zmiany genetyczne i epigenetyczne w regenerantach pszenżyta uzyskanych drogą somatycznej embriogenezy, przynajmniej w zakresie elementarnych testów statystycznych.
- Analiza metAFLP umożliwiła identyfikację subtelnych zmian w metylacji DNA dotyczących symetrycznych i asymetrycznych kontekstów sekwencji DNA, wskazując na istotne różnice obserwowane u regenerantów pszenżyta uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy (**P3**) w różnych warunkach regeneracji. Różnice te odnosiły się do zmienności sekwencyjnej w kontekstach CHG i CG, oraz do zmian w demetylacji DNA w kontekście CG. Taki wynik może sugerować, że uzupełnienie IM jonami miedzi wpływa na równowagę szlaków metabolicznych i powoduje TCIV.

Porównanie TCIV w odniesieniu do androgenyzy i somatycznej embriogenezy (P4).

Uzyskanie regenerantów pszenżyta na drodze androgenyzy lub somatycznej embriogenezy wiąże się ze zmiennością wywołaną kulturą *in vitro*. Jony metali w pożywce indukującej wydają się mieć różny wpływ na poziom zmienności w zależności od sposobu regeneracji. Ciekawym wydaje się więc porównanie regenerantów uzyskanych w obu metodach pod względem zmienności zależnej od warunków wyprowadzenia oraz składu pożywki indukującej. Stąd w publikacji **P4** porównano składowe metAFLP dla regenerantów pszenżyta uzyskanych na drodze androgenyzy i somatycznej embriogenezy. Ponadto, w pracy podjęto próbę wskazania, który sposób uzyskiwania regenerantów pszenżyta może być bardziej korzystny w odniesieniu do powstawania zmienności wywołanej kulturą tkankową u regenerantów pszenżyta.

Porównanie między regenerantami uzyskanymi na drodze androgenyzy (A) i somatycznej embriogenezy (SE) dla podstawowych składowych TCIV w odniesieniu do poziomu jonów miedzi ujawniło nieznaczne różnice między regenerantami. Dla regenerantów pochodzących z A i SE wzrost stężenia Cu^{2+} powodował zmniejszenie SV (Publikacja **P4**, Ryc. 1 a, b) oraz wzrost DMV bardziej widoczny w SE niż w A (Publikacja **P4**, Ryc. 1 c, d). Natomiast DNMV była wyższa w A niż w SE, gdy wzrastało stężenie Cu^{2+} (Publikacja **P4**, Ryc. 1 e, f).

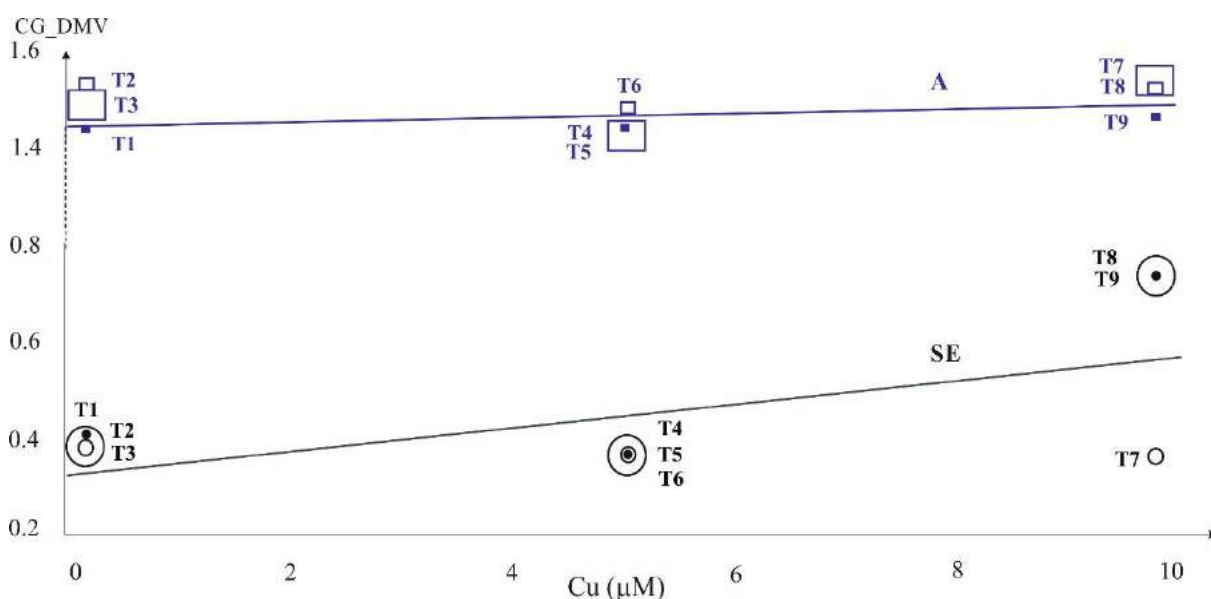
Zmiana stężenia Cu^{2+} w IM wskazuje na różnice dotyczące metylacji *de novo* DNA (Publikacja **P4**, Ryc. 2 a, b) i demetylacji (Publikacja **P4**, Ryc. 2 c, d) między regenerantami uzyskanymi na drodze androgenyzy lub somatycznej embriogenezy. Takie różnice mogą wynikać z procesu przeprogramowania rozwoju komórek [302]. W kulturach pylnikowych demetylacja DNA towarzyszy zmianie szlaku rozwojowego mikrospor z gametofitowego na sporofitowy [303]. W przypadku embriogenezy, w świetle dostępnych badań, wydaje się, że inicjacja embriogenezy, niezależnie od tego, czy jest to embriogeneza zygotyczna, czy embriogeneza somatyczna, wiąże się z silną aktywacją metylotransferaz DNA [304]. Natomiast rozpoczęcie embriogenezy jest inicjowane przez sygnały, które wpływają na wzorce metylacji na wczesnym etapie rozwoju zarodka, niezależnie od tego, czy pochodzi on z embriogenezy zygotycznej czy somatycznej [305]. Biorąc pod uwagę rozbieżne wyniki dotyczące globalnej metylacji DNA podczas somatycznej embriogenezy, zakłada się, że poziom metylacji DNA nie jest jednoznacznie związany z embriogenezą, ale jest związany z efektem kultury *in vitro per se* (np. skład pożywek) i prawdopodobnie odzwierciedla stan epigenetyczny eksplantatów [306].

W embriogenezie usunięcie lub obniżenie poziomu metylacji DNA może być istotnym etapem związanym z przeprogramowaniem komórek z rozwoju wegetatywnego na embriogeniczny [307]. Wydaje się, że demetylacja DNA w A i SE odgrywa taką samą rolę; jednak w przypadku mikrospor z haploidalną liczbą chromosomów, przywrócenie wzorca metylacji, zwłaszcza w kontekście sekwencji asymetrycznych i symetrycznej (CHG) będącej pod kontrolą epigenetyczną lub częściowo epigenetyczną, może być problematyczne. Stąd mogą wynikać różnice obserwowane w poziomie DMV i DNMV u regenerantów uzyskanych dwoma różnymi metodami kultur *in vitro*.

W przypadku analizy poziomu zmienności sekwencyjnej w kontekstach CHH i CG u regenerantów uzyskanych w kulturach pylnikowych oraz w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych (Publikacja **P4**, Ryc. 3 a, b) zaobserwowano, że zmienność sekwencyjna niemalże nie zmienia się ze wzrostem stężenia jonów Cu^{2+} w IM, zaś w kontekście sekwencji CHG zwiększenie ilości jonów Cu^{2+} zmniejszyło poziom SV u regenerantów uzyskanych w obydwu metodach regeneracji (Publikacja **P4**, Ryc. 3 c). Analiza poziomu SV w różnych kontekstach sekwencji w odniesieniu do zastosowanego stężenia jonów Cu^{2+} pokazuje, że w CG i CHH różnica między regenerantami uzyskanymi w A i SE wynika z poziomu zmian sekwencyjnych identyfikowanych u regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy i nie jest zależna od stężenia jonów Cu^{2+} , natomiast poziom SV identyfikowanej w kontekście CHG u regenerantów uzyskanych w A i SE zmienia się w zależności od stężenia zastosowanych jonów Cu^{2+} w IM. W androgenezie metylacja kontekstu sekwencji CHG jest kontrolowana (epi)genetycznie, natomiast CHH - poprzez mechanizm epigenetyczny [308-311]. Zakładając, że zjawiska epigenetyczne biorą udział zarówno podczas uzyskiwania regenerantów na drodze androgenezy jak i somatycznej embriogenezy, przypuszczalne problemy z przywróceniem metylacji DNA mogłyby wyjaśnić niewielki spadek SV dla CHH w A.

W analizie dotyczącej badania poziomu demetylacji w kontekstach sekwencyjnych u regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy oraz na drodze somatycznej embriogenezy dowiedziono, że różnice między regenerantami wynikające z uzupełnienia IM różnymi stężeniami soli miedzi są najbardziej wyraźne dla kontekstu CG (Ryc. 3). U regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy wzrost poziomu DMV w kontekście CG jest niższy w porównaniu ze wzrostem poziomu DMV w tym samym kontekście dla regenerantów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy w odniesieniu do

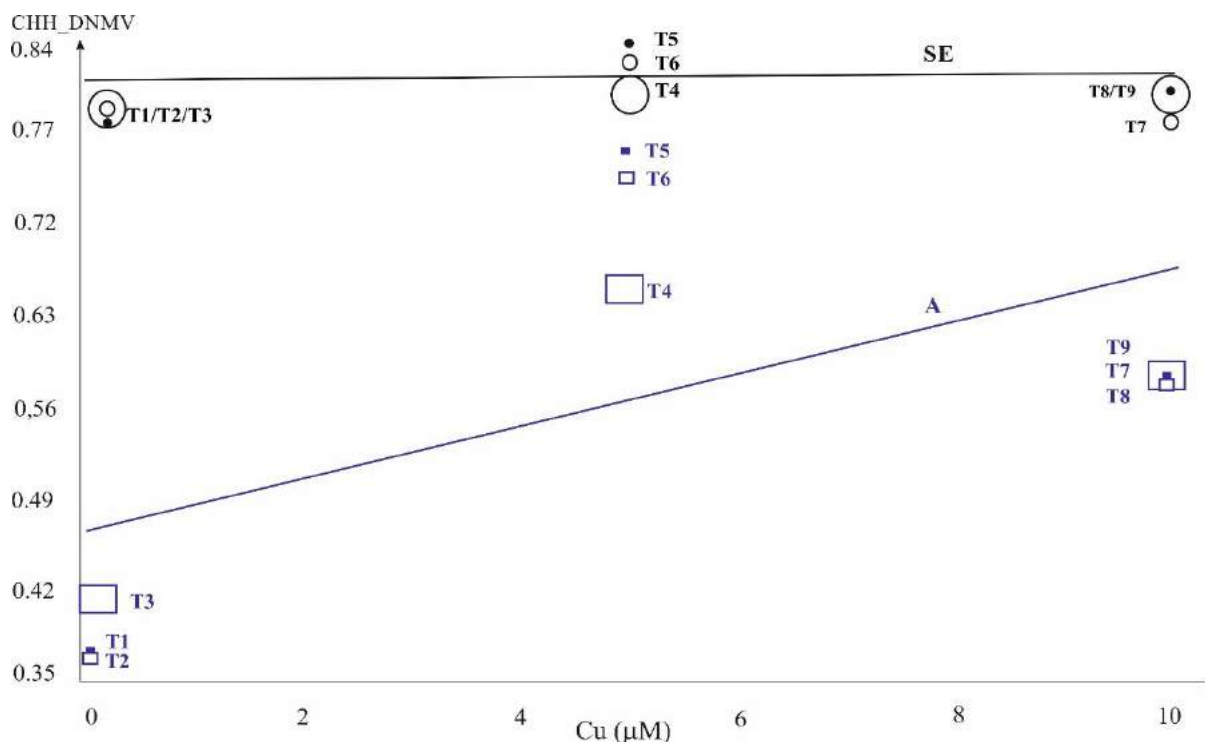
zwiększającego się poziomu jonów miedzi w IM. Najprawdopodobniej demetylacja DNA w sekwencjach CG odzwierciedla proces demetylacji DNA następujący podczas etapu replikacji [312]. Różnice w poziomie DMV w kontekście CG w przypadku A i SE mogą odzwierciedlać różnice w demetylacji DNA wynikające z różnych typów eksplantatów. Ponadto, nie można wykluczyć, że metoda metAFLP może identyfikować więcej zmian w eksplantatach o wyższej heterozygotyczności, pochodzących z tkanki diploidalnej, co może skutkować ogólnie niższymi wartościami DMV u regenerantów uzyskanych drogą somatycznej embriogenezy.



Rycina 3. Zależność między stężeniem jonów Cu^{2+} w IM a poziomem demetylacji DNA (%) w kontekście CG dla regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy "A" i somatycznej embriogenezy "SE".

Najbardziej wyraźne różnice między regenerantami pochodzącymi z A i SE można zaobserwować w przypadku zależności między Cu^{2+} i DNMMV w kontekście sekwencji CHH (Ryc. 4). Wraz ze wzrostem stężenia Cu^{2+} obserwowano wzrost poziomu DNMMV u regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy podczas gdy u regenerantów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy poziom DNMMV w kontekście CHH pozostawał na stałym poziomie. Stąd można przypuszczać, że DNMMV w kontekście CHH jest pod kontrolą epigenetyczną, co jest zgodne z danymi literaturowymi [308-311]. Zmiana ścieżki rozwojowej mikrospor ze szlaku gametofitowego na sporofitowy wymaga przeprogramowania epigenetycznego, które następuje po nabyciu przez mikrospory kompetencji do embriogenezy. Takie przeprogramowanie polega na globalnym zmniejszeniu metylacji DNA i aktywacji proliferacji komórek, po czym następuje wzrost

metylacji DNA i różnicowanie w zarodek [76, 313, 314, 303, 315]. Bardziej szczegółowe badania konkretnych kontekstów metylacji DNA, przeprowadzone podczas somatycznej embriogenezy u soi, pokazują, że metylacja DNA wzrasta podczas rozwoju zarodka somatycznego. Przeciwnie, wzrost metylacji w kontekście CHH może być związany z aktywnym programem wyciszania transkrypcji, który jest wynikiem podwyższenia metylacji DNA w całym genomie podczas rozwoju zarodka somatycznego [316]. Uzyskany wynik wskazujący na wyższe poziomy DNMTV przy wzroście jonów miedzi podczas uzyskiwania regenerantów na drodze androgenezy w porównaniu z uzyskiwaniem regenerantów na drodze SE może wskazywać na udział metylacji w kontekście CHH podczas przeprogramowania rozwoju mikrospor i brak takiego efektu podczas tworzenia zarodka somatycznego w kulturach niedojrzałych zarodków zygocycznych. Ponadto, metylacja DNA w kontekście CHH może być krytyczna dla ekspresji genów wpływających na regenerację roślin. Co ciekawe, nie obserwowano zmian w poziomie DNMTV w kontekstach CG i CHG w odniesieniu do poziomu stężenia Cu^{2+} . Jednak w obu przypadkach DNMTV była wyższa dla CG i CHG u regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy w porównaniu do regenerantów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy. Wydaje się, że różnice te odzwierciedlają epigenetyczne aspekty ustanawiania metylacji w asymetrycznych kontekst sekwencji. We wszystkich wykonanych porównaniach nie obserwowano wpływu jonów Ag^+ dodawanych do IM. W przypadku prezentowanego eksperymentu nie zaobserwowano również wpływu na regenerację czasu inkubacji eksplantatów na IM, dlatego też czynnik ten nie został uwzględniony na wykresach.



Rycina 4. Zależność między stężeniem jonów Cu^{2+} w IM a poziomem metylacji *de novo* DNA (%) w asymetrycznym kontekście sekwencji CHH dla regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy "A" i somatycznej embriogenezy "SE".

Podsumowanie badań zaprezentowanych w publikacji P4

- Porównanie regenerantów uzyskanych na drodze A i SE przy różnym uzupełnieniu IM jonami Cu^{2+} pokazuje, że poziom DMV i DNMV jest różny u regenerantów pochodzących z tych dwóch typów kultur *in vitro*, co może wiązać się z koniecznością przeprogramowania jakie ma miejsce podczas androgenezy;
- Analiza poziomu zmienności sekwencyjnej w zależności od poziomu Cu^{2+} w różnych kontekstach pokazała, że w CG i CHH różnica między regenerantami uzyskanymi w A i SE była tylko ilościowa, natomiast SV związana z CHG przyjmowała niższe wartości w SE niż w A, co może dotyczyć innego sposobu ustanawiania metylacji w różnych kontekstach sekwencji;
- Analiza poziomu demetylacji DNA w zależności od poziomu Cu^{2+} w różnych kontekstach sekwencji pokazała, największą zależność dla kontekstu CG, co może się wiązać z procesem demetylacji DNA zachodzącym podczas replikacji. Różnice w poziomie DMV u regenerantów pochodzących z dwóch różnych typów kultur *in vitro* mogą odzwierciedlać różnice w demetylacji DNA wynikające z innych mechanizmów zaangażowanych w regenerację roślin w różnych typach kultur tkankowych;

- Analiza poziomu metylacji *de novo* DNA w zależności od poziomu Cu^{2+} w różnych kontekstach sekwencji wskazała na wzrost DNMT u regenerantów pochodzących z A w kontekstach asymetrycznych CHH co wiąże się kontrolą epigenetyczną tych sekwencji DNA. W proces androgenezy wpisany jest etap przeprogramowania epigenetycznego, które polega na globalnym zmniejszeniu metylacji DNA i aktywacji proliferacji komórek, po czym następuje wzrost metylacji DNA i różnicowanie w zarodek;
- Na podstawie przedstawionych wyników nie obserwowano istotnego wpływu jonów srebra oraz czasu inkubacji eksplantatów na IM na zmiany poziomu SV, DMV i DNMT obserwowane u regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy i somatycznej embriogenezy;
- Regeneranty uzyskane drogą androgenezy i somatycznej embriogenezy różnią się poziomem DMV i DNMT w odniesieniu do poziomu Cu^{2+} w IM, przy czym najbardziej widoczne różnice dotyczą CG_DMV i CHH_DNMT. Uzyskane dane sugerują, że różnice te odzwierciedlają przejście ze ścieżki gametofitowej na sporofitową w androgenezie, i brak takiego przeprogramowania w somatycznej embriogenezie oraz pewne nieoczywiste aspekty mechanizmów epigenetycznych wpływających na A i S.

5. PODSUMOWANIA I WNIOSKI

1. Optymalizacja składu pożywki dotycząca stężenia jonów miedzi (II), srebra (I) oraz czasu trwania kultury u pszenżyta pozytywnie wpływa na wydajność regeneracji zielonych roślin na drodze androgenezy. Ważną rolę odgrywają tu jony miedzi, których podwyższone stężenie do 10 μM sprzyja procesowi regeneracji. Nie wszystkie z badanych gatunków zbóż identycznie reagowały na zmiany stężeń jonów Cu^{2+} w pożywce indukującej. Znaczenie jonów srebra oraz czasu trwania kultury *in vitro* było zależne od gatunku.

2. Optymalizacja składu pożywki indukującej dotycząca stężenia jonów miedzi i srebra oraz czasu trwania kultur *in vitro* z wykorzystaniem metody optymalizacji warunków doświadczalnych Taguchiego może być wykorzystana do zwiększenia wydajności regeneracji zielonych roślin na drodze androgenezy u wybranych gatunków zbóż.

3. Jony miedzi w pożywce indukującej wpływają na poziom zmienności sekwencyjnej oraz metylacji genomowego DNA wywołanej kulturą *in vitro* identyfikowanej u regenerantów pszenżyta wyprowadzonych na drodze androgenezy. Stwierdzono, że wraz ze wzrostem stężenia jonów miedzi poziom zmienności genetycznej maleje. Przy czym, zmiany te w różnym stopniu dotyczą określonych kontekstów sekwencyjnych. Najwięcej zmian obserwowano w przypadku kontekstów symetrycznych CG i CHG, a najmniej w asymetrycznych CHH. Najwyższy poziom zmian metylacyjnych (demetylacja i metylacja *de novo* DNA) był obserwowany przy pośrednim poziomie jonów Cu^{2+} . Nie stwierdzono by jony srebra czy też czas trwania kultur *in vitro* wpływały istotnie na poziom zmian sekwencyjnych i metylacyjnych w przypadku regeneracji roślin na drodze androgenezy u pszenżyta.

4. Jony miedzi w pożywce indukującej wpływają na poziom zmienności sekwencyjnej oraz metylacji genomowego DNA wywołanej kulturą *in vitro* identyfikowanej u regenerantów pszenżyta wyprowadzonych na drodze somatycznej embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych. Stwierdzono, że wraz z obniżeniem stężenia jonów miedzi poziom zmienności genetycznej rośnie. Natomiast demetylacja DNA jest najwyższa przy najwyższym stężeniu jonów Cu^{2+} . Obserwowane zmiany w różnym stopniu dotyczą określonych kontekstów sekwencyjnych. Największe zmiany sekwencyjne obserwowano w przypadku kontekstu CHG, a najmniejsze w CG. Z kolei

najwyższe istotne statystycznie zmiany demetylacji DNA dotyczyły kontekstu CG. Uzyskane wyniki nie wskazują jednak na znaczenie dodatku soli srebra lub wpływu czasu jako czynników mogących determinować zmiany genetyczne i epigenetyczne w DNA regenerantów pszenżyta, przynajmniej w zakresie elementarnych testów statystycznych.

5. Metoda metAFLP pozwala na ilościową ocenę zmian genetycznych oraz zmian wzorów metylacji genomowego DNA wywołanych kulturą *in vitro* u regenerantów pszenżyta wyprowadzanych na drodze androgenyzy i somatycznej embriogenezy. Zmiany te są wynikiem różnic w stężeniach jonów Cu^{2+} i w mniejszym stopniu Ag^+ w pożywce indukującej. Czas wydaje się być mniej istotnym czynnikiem warunkującym wspomnianą zmienność.

6. Regeneracja roślin na drodze androgenyzy i somatycznej embriogenezy w wyniku modyfikacji stężenia jonów miedzi (II), srebra (I) w pożywce indukującej oraz czasu trwania kultury *in vitro* w różnym stopniu wpływają na zmienność genetyczną i wzorów metylacji co może wynikać z wyjściowej ploidalności eksplantatu (haploidalny vs diploidalny) użytego do uzyskania regenerantów.

7. Optymalizacja składu pożywki indukującej pod względem stężeń mikroelementów może się okazać użytecznym kierunkiem dla zwiększenia wydajności uzyskiwania zielonych roślin na drodze androgenyzy u roślin zbożowych.

6. BIBLIOGRAFIA

1. Stace, C.A., *Triticale: A case of nomenclatural mistreatment*. TAXON, 1987. **36**(2): p. 445-452.
2. Larter, E.N., et al., *Rosner, a hexaploid triticale cultivar*. Canadian Journal of Plant Science, 1970. **50**(1): p. 122-124.
3. Tarkowski, C. and D. Otłowska, *Badania nad heksaploidalnymi Triticale i jego mieszkańcami z żytem i pszenicą*. Hod. Rośl. Aklim., 1968. **12**: p. 577-598.
4. Dziamba, K., *Zboże przyszłości*. Postępy Nauk Rolniczych, 1979. **2**: p. 3-8.
5. Sodkiewicz, W., *Amphiploid Triticum monococcum L. Secale cereale L. (AARR) – A new form of tetraploid triticale*. Cereale Res. Com. 12 (1–2): 35–40. Cereal Research Communications, 1984. **12**(1-2): p. 35-40.
6. Sodkiewicz, W., *Synteza allotetraploidów pszeniczno-żytnich w procesie introgresji genów Triticum monococcum L. ($2n = 14$) do pszenżyta heksaploidalnego ($2n = 6x = 42$) (*xTriticosecale* WITTMACK)*. . Seria: Rozprawy i Monografie, IGR PAN, Poznań, 1997. **7**: p. 1-109.
7. Gruszecka, D.B., *Zarys genetyki zbóż*, in *Pszenżyto, kukurydza i owies*, A.G. Górny, Editor. 2005, Instytut Genetyki Roślin: Poznań. p. 15-121.
8. Ryöppy, P.H., *Haploidy in triticale*, in *In Vitro Haploid Production in Higher Plants: Volume 4 - Cereals*, S.M. Jain, S.K. Sopory, and R.E. Veilleux, Editors. 1997, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 117-131.
9. Müntzing, A., *Triticale results and problems* Supplement X to J. of Plant Breed, 1979. **103**.
10. Ammar, K., M. Mergoum, and S. Rajaram, *The history and evolution of triticale*, in *Triticale improvement and production*, M. Mergoum and H. Gómez-Macpherson, Editors. 2004: Rome. p. 1-10.
11. Mergoum, M., et al., *Triticale (*x Triticosecale* Wittmack) Breeding*, in *Advances in Plant Breeding Strategies: Cereals: Volume 5*, J.M. Al-Khayri, S.M. Jain, and D.V. Johnson, Editors. 2019, Springer International Publishing: Cham. p. 405-451.
12. Kiss, A., *Neue Richtung in der Triticale-zuchtung*. Z. Pflanzenzucht, 1966. **55**(4): p. 309-329.
13. Martínez-Estrada, E., et al., *Assessment of somaclonal variation during sugarcane micropropagation in temporary immersion bioreactors by intersimple sequence repeat (ISSR) markers*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2017. **53**(6): p. 553-560.
14. Long, E.A., et al. *Triticale as a Cover and Double Crop on a New York Dairy*. 2013.
15. Blum, A., *The Abiotic Stress Response and Adaptation of Triticale — A Review*. Cereal Research Communications, 2014. **42**(3): p. 359-375.
16. Liu, W., et al., *Multiple-line cross QTL mapping for grain yield and thousand kernel weight in triticale*. Plant Breeding, 2016. **135**(5): p. 567-573.

17. Randhawa, H.S., L. Bóna, and R. Graf. *Triticale Breeding—Progress and Prospect*. 2015.
18. Friebe, B., et al., *Transfer of Hessian fly resistance from 'Chaupon' rye to hexaploid wheat via a 2BS/2RL wheat-rye chromosome translocation*. *Theor Appl Genet*, 1990. **79**(3): p. 385-9.
19. Wiśniewska, H. and K. Kowalczyk, *Resistance of cultivars and breeding lines of spring wheat to *Fusarium culmorum* and powdery mildew*. *J Appl Genet*, 2005. **46**(1): p. 35-40.
20. Sisodia, N.S. and R.C. McGinnis, *Importance of Hexaploid Wheat Germ Plasm in Hexaploid Triticale Breeding I*. *Crop Science*, 1970. **10**(2): p. crops1970.0011183X001000020013x.
21. Arseniuk, E., Krzymuski, J., Martyniak, J., Oleksiak, T., *Historia hodowli i nasiennictwa na ziemiach polskich w XX wieku.*, ed. J. Krzymuski 2003, Radzików: : Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin.
22. Thomas, J.B. and P.J. Kaltsikes, *The genomic origin of the unpaired chromosomes in triticale*. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 1972. **18**(4): p. 687-700.
23. Niedziela, A., et al., *The genetic diversity of triticale genotypes involved in Polish breeding programs*. Springerplus, 2016. **5**: p. 355.
24. Belaid, A., *Nutritive and economic value of triticale as a feed grain for poultry*. CIMMYT Economics Working Paper. Vol. 94-01. 1994, Mexico: CIMMYT
25. Bajaj, Y.P.S., *In vitro production of haploids and their use in cell genetics and plant breeding*, in *Biotechnology in agriculture and forestry, part I. haploids in crop improvement*, Y.P.S. Bajaj, Editor. 1990, Springer: Berlin. p. 1-44.
26. Glatthar, J., J.J. Heinisch, and T. Senn, *Unmalted triticale cultivars as brewing adjuncts: effects of enzyme activities and composition on beer wort quality*. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 2005. **85**(4): p. 647-654.
27. Pérez, G.T., et al., *Use of triticale flours in cracker-making*. *European Food Research and Technology*, 2003. **217**(2): p. 134-137.
28. Tohver, M., et al., *Quality of triticale cultivars suitable for growing and bread-making in northern conditions*. *Food Chemistry*, 2005. **89**(1): p. 125-132.
29. Mupondwa, E., X. Li, and L. Tabil, *Integrated bioethanol production from triticale grain and lignocellulosic straw in Western Canada*. *Industrial Crops and Products*, 2018. **117**: p. 75-87.
30. Gowda, M., et al., *Potential for simultaneous improvement of grain and biomass yield in Central European winter triticale germplasm*. *Field Crops Research*, 2011. **121**(1): p. 153-157.
31. Tyrka, M., et al., *Populations of doubled haploids for genetic mapping in hexaploid winter triticale*. *Molecular breeding : new strategies in plant improvement*, 2018. **38**(4): p. 46-46.
32. FAO, *FAO* <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL> 2022.
33. Ayalew, H., et al., *Triticale improvement for forage and cover crop uses in the southern great plains of the United States*. *Frontiers in Plant Science*, 2018. **9**: p. 1130-1130.

34. Ablova, I.B., *RESISTANCE TO HEAD BLIGHT IN VARIOUS TYPES OF WHEAT AND TRITICALE IN KRASNODAR ENVIRONMENT*. Cereal Research Communications, 1997. **25**(3): p. 715-720.
35. Ukalska, J. and W. Kociuba, *Phenotypical diversity of winter triticale genotypes collected in the Polish gene bank between 1982 and 2008 with regard to major quantitative traits*. Field Crops Research, 2013. **149**: p. 203-212.
36. Furman, B.J., et al., *Characterization and Analysis of North American Triticale Genetic Resources*. Crop Science, 1997. **37**(6): p. cropscl1997.0011183X003700060046x.
37. Kamboj, R. and S. Mani, *Genetic divergence in triticale*. Indian Journal of Genetics and Plant Breeding, 1983. **43**(2): p. 173-179.
38. Royo, C., C. Soler, and I. Romagosa, *Agronomical and morphological differentiation among winter and spring triticales*. Plant Breeding, 1995. **114**(5): p. 413-416.
39. van Beuningen, L.T. and R.H. Busch, *Genetic Diversity among North American Spring Wheat Cultivars: III. Cluster Analysis Based on Quantitative Morphological Traits*. Crop Science, 1997. **37**(3): p. cropscl1997.0011183X003700030046x.
40. Pachota, K.A., et al., *Nowoczesne metody genotypowania DArT i GBS w hodowli gatunków roślin użytkowych*. Biuletyn Instytutu Hodowli i Aklimatyzacji Roślin, 2016. **279**: p. 3-18.
41. Kuleung, C., et al., *Evaluating the Genetic Diversity of Triticale with Wheat and Rye SSR Markers*. Crop Science, 2006. **46**(4): p. 1692-1700.
42. Badea, A., Eudes, F., Salmon, D., Tuvešson, S., Vrolijk, A., Larsson, C.T., Caig, V., Huttner, E., Kilian, A., Laroche, A., *Development and assessment of DArT markers in triticale*. Theoretical and Applied Genetics, 2011. **122**(8): p. 1547-1560.
43. Costa, C.T.d., et al., *Genetic diversity of Brazilian triticales evaluated with genomic wheat microsatellites*. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2007. **42**: p. 1577-1586.
44. Kuleung, C., P.S. Baenziger, and I. Dweikat, *Transferability of SSR markers among wheat, rye, and triticale*. Theoretical and Applied Genetics, 2004. **108**(6): p. 1147-1150.
45. Alheit, K.V., et al., *Genome-wide evaluation of genetic diversity and linkage disequilibrium in winter and spring triticale (*x* *Triticosecale* Wittmack)*. BMC Genomics, 2012. **13**(1): p. 235.
46. Losert, D., et al., *Phenotypic and genotypic analyses of diversity and breeding progress in European triticale (*x* *Triticosecale* Wittmack)*. Plant Breeding, 2017. **136**(1): p. 18-27.
47. Tams, S.H., et al., *Genetic diversity in European winter triticale determined with SSR markers and coancestry coefficient*. Theoretical and Applied Genetics, 2004. **108**(7): p. 1385-1391.
48. Woś, H. and A. Strzembicka, *Znaczenie hodowli odpornościowej w integrowanej pochronie pszenżyta*, in *Metodyka integrowanej ochrony pszenżyta ozimego i jarego*, M. Korbas and M. Mrówczyński, Editors. 2011, TOTEM: Poznań. p. 27-49.
49. Drażkiewicz, K., et al., *Lista opisowa odmian roślin rolniczych 2021*. 2021, Nowa Słupia: Centralny Ośrodek Badania Odmian Roślin Uprawnych. 168.

50. Hartl, L., et al., *Identification of AFLP markers closely linked to the powdery mildew resistance genes Pm1c and Pm4a in common wheat (Triticum aestivum L.)* Genome, 1999. **42**(2): p. 322-329.
51. Liu, Z., et al., *Development of SCAR markers linked to the Pm21 gene conferring resistance to powdery mildew in common wheat*. Plant Breeding, 1999. **118**(3): p. 215-219.
52. Ma, Z.Q., M.E. Sorrells, and S.D. Tanksley, *RFLP markers linked to powdery mildew resistance genes Pm1, Pm2, Pm3, and Pm4 in wheat*. Genome, 1994. **37**(5): p. 871-5.
53. Singr un, C., et al., *Powdery mildew resistance gene Pm22 in cultivar Virest is a member of the complex Pm1 locus in common wheat (Triticum aestivum L. em Thell.)*. Theor Appl Genet, 2003. **106**(8): p. 1420-4.
54. Stepie n, L., et al., *Combined use of linked markers for genotyping the Pm1 locus in common wheat*. Cell Mol Biol Lett, 2004. **9**(4b): p. 819-27.
55. Wang, X.Y., et al., *Identification of RAPD markers tightly linked to wheat powdery mildew resistance gene Pm6.l*. Yi Chuan Xue Bao, 2000. **27**(12): p. 1072-9.
56. Salach-Warzecha, K., Z. Staszewski, and R. Warzecha, *Męska sterylno c u pszenżyta heksaploidalnego*. Zesz. Nauk. AR Szec., 1994. **162**: p. 235-237.
57. Spiss, L. and H. G oral, *Hodowla form męskosterylnych i przywracajcych płodno c pszenżyta*. Zesz. Nauk. AR Szczec. , 1994. **162**: p. 243-246.
58. Wasiak, M., *Genetyczne podstawy cytoplazmatyczno-jdrowej męskiej sterylno ci (CMS) u ro lin oraz jej wykorzystanie w hodowli*. Praca przegldowa. Agronomy Science, 2019. **74**(1): p. 15-30.
59. Budar, F. and G. Pelletier, *Male sterility in plants: occurrence, determinism, significance and use*. C R Acad Sci III, 2001. **324**(6): p. 543-50.
60. Maheshwari, P. and J.D. Laurie, *Triticale Isolated Microspore Culture for Doubled Haploid Production*, in *Doubled Haploid Technology: Volume 1: General Topics, Alliaceae, Cereals*, J.M. Segui-Simarro, Editor. 2021, Springer US: New York, NY. p. 295-312.
61. Oleszczuk, S., S. Sowa, and J. Zimny, *Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (Triticosecale Wittmack) cv. Bogo*. Plant Cell Reports, 2004. **22**: p. 885–893.
62. Pauk, J., et al., *In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2000. **61**(3): p. 221-229.
63. Reinert, J., *Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten*. Planta, 1959. **53**(4): p. 318-333.
64. Steward, F.C., *Growth and development of cultivated cells. III. Interpretations of the growth from free cell of carrot*. American Journal of Botany, 1958. **45**: p. 709-713.

65. Armstrong, K.C., C. Nakamura, and W.A. Keller, *Karyotypic instability in tissue culture regenerants of triticale (x Triticosecale Wittmack) cv 'Welsh' from 6-month-old callus cultures*. Zeitschrift für Pflanzenzüchtung, 1983. **91**(3): p. 233-245.
66. Nakamura, C. and W.A. Keller, *Callus proliferation and plant regeneration from immature embryos of hexaploid triticale*. Pflanzenzüchtg, 1982. **88**: p. 137-160.
67. Eapen, S. and P.S. Rao, *Plant regeneration from immature inflorescence callus cultures of wheat, rye and triticale*. Euphytica, 1985. **34**(1): p. 153-159.
68. Stolarz, A. and H. Lörz, *Somatic embryogenesis in vitro manipulation and plant regeneration from immature embryos of hexaploid Triticale (X Triticosecale Wittmack)*. Z. Pflanzenzüchtung 1986. **96**: p. 353-362.
69. Zimny, J. and J.J. Rybczyński. *Somatic embryogenesis of Triticale*. in *Genetic Manipulations in Plant Breeding*. 1986. Berlin (West).
70. Vogel, G., *How Does a Single Somatic Cell Become a Whole Plant?* Science, 2005. **309**(5731): p. 86-86.
71. Hanning, G.E. and B.V. Conger, *Factors Influencing Somatic Embryogenesis from Cultured Leaf Segments of Dactylis glomerata*. Journal of Plant Physiology, 1986. **123**(1): p. 23-29.
72. Gulzar, B., et al., *Genes, proteins and other networks regulating somatic embryogenesis in plants*. Journal, genetic engineering & biotechnology, 2020. **18**(1): p. 31-31.
73. Kępczyński, J. and E. Kępczyńska, *Znaczenie etylenu w ustępowaniu spoczynku i kiełkowaniu nasion*. Kosmos, 2000. **49**(1-2): p. 161-168.
74. Guha, S. and S.C. Maheswari, *In vitro production of embryos from anthers of Datura*. Nature, 1964. **204**: p. 497.
75. Birnbaum, K.D. and F. Roudier, *Epigenetic memory and cell fate reprogramming in plants*. Regeneration, 2017. **4**(1): p. 15-20.
76. El-Tantawy, A.A., et al., *Changes in DNA Methylation Levels and Nuclear Distribution Patterns after Microspore Reprogramming to Embryogenesis in Barley*. Cytogenetic and Genome Research, 2014. **143**(1-3): p. 200-208.
77. Maraschin, S.F., et al., *Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male gametophyte perspective*. Journal of Experimental Botany, 2005. **56**(417): p. 1711-1726.
78. Hoekstra, S., van Bergen S., van Brouwershaven I.R., Schilperoort, R.A., Wang, M., *Androgenesis in Hordeum vulgare L.: Effects on mannitol calcium and abscisic acid on anther pretreatment*. Plant Science, 2004. **126**: p. 211-218.
79. Kasha, K.J., et al., *Nuclear fusion leads to chromosome doubling during mannitol pretreatment of barley (Hordeum vulgare L.) microspores*. Journal of Experimental Botany, 2001. **52**(359): p. 1227-1238.
80. Kozdój, J. and J. Zimny, *Microspore development stages in chilled and unchilled anthers of Triticale (x Triticosecale Wittmack)*. Bul Pol Acad Sci, 1993. **2**(93): p. 108-116.

81. Tenhola-Roininen, T., P. Tanhuanpää, and S. Immonen, *The effect of cold and heat treatments on the anther culture response of diverse rye genotypes*. Euphytica, 2005. **145**(1-2): p. 1-9.
82. Touraev, A., et al., *Stress-induced microspore embryogenesis in tobacco: an optimized system for molecular studies*. Plant Cell Reports, 1996. **15**(8): p. 561-5.
83. Touraev, A., et al., *Efficient microspore embryogenesis in wheat (Triticum aestivum L.) induced by starvation at high temperature*. Sexual Plant Reproduction, 1996. **9**: p. 209-215.
84. Yan, G., et al., *Accelerated Generation of Selfed Pure Line Plants for Gene Identification and Crop Breeding*. Front Plant Sci, 2017. **8**: p. 1786.
85. Zimny, J. and K. Michalski, *Development of in vitro culture techniques for advancement of rye (Secale cereale L.) breeding*. ACTA BIOLOGICA CRACOVENSIS Series Botanica, 2019. **61**(1): p. 7-15.
86. Makowska, K. and S. Oleszczuk, *Albinism in barley androgenesis*. Plant Cell Rep, 2014. **33**(3): p. 385-92.
87. Bednarek, P.T., et al., *Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (Hordeum vulgare L.)*. BMC Plant Biology, 2007. **7**: p. 10.
88. Niemirowicz-Szczytt, K., *Haploidy roślin w biotechnologii*. 1995. **44**(3-4): p. 703-708.
89. Wędzony, M., *Otrzymywanie i wykorzystanie linii podwojonych haploidów zbóż*. Biotechnologia, 2001. **1**(52): p. 51-62.
90. Kasha, K.J. and K.N. Kao, *High frequency haploid production in barley (Hordeum vulgare L.)*. Nature, 1970. **225**: p. 874-876.
91. Custers, J.B.M., et al., *Androgenesis in Brassica*, in *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*, S.S. Bhojwani and W.-Y. Soh, Editors. 2001, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 451-470.
92. Gupta, S., *Morphogenetic response of haploid callus tissue of Pisum sativum (var. B22)*. Indian Agriculturist, 1975. **19**: p. 11-21.
93. Ochatt, S., et al., *Abiotic stress enhances androgenesis from isolated microspores of some legume species (Fabaceae)*. Journal of Plant Physiology, 2009. **166**(12): p. 1314-1328.
94. Seguí-Simarro, J.M., et al., *Androgenesis in recalcitrant solanaceous crops*. Plant Cell Rep, 2011. **30**(5): p. 765-78.
95. Sood, S., et al., *Optimized Protocol for Development of Androgenic Haploids and Doubled Haploids in FCV Tobacco (Nicotiana tabacum)*. Methods Mol Biol, 2021. **2288**: p. 293-305.
96. Mishra, A. and P. Khurana, *Genotype Dependent Somatic Embryogenesis and Regeneration from Leaf Base Cultures of Sorghum bicolor*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology, 2003. **12**(1): p. 53-56.
97. Narváez, I., et al., *Plant Regeneration via Somatic Embryogenesis in Mature Wild Olive Genotypes Resistant to the Defoliating Pathotype of Verticillium dahliae*. Frontiers in Plant Science, 2019. **10**.

98. D'Onghia, A.M., et al., *Elimination of Citrus psorosis virus by somatic embryogenesis from stigma and style cultures*. Plant Pathology, 2001. **50**(2): p. 266-269.
99. Basto, S., C. Serrano, and E. Hodson de Jaramillo, *Effects of donor plant age and explants on in vitro culture of Cedrela montana Moritz ex Turcz.* Universitas Scientiarum, 2012. **17**: p. 263-271.
100. Cardoso, H.G., et al., *Use of morphometric parameters for tracking ovule and microspore evolution in grapevine (Vitis vinifera L., cv. "Aragonez") and evaluation of their potential to improve in vitro somatic embryogenesis efficiency from gametophyte tissues*. In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 2010. **46**(6): p. 499-508.
101. Merkle, S., et al., *In vitro embryogenesis in plants*. Ed. Thorpe TA, 1995. **51**: p. 203.
102. Catalano, C., et al., *Different Cell Types Affect the Transition from Juvenile to Mature Phase in Citrus Plants Regenerated through Somatic Embryogenesis*. Plants, 2022. **11**(14): p. 1811.
103. Christopher, T. and M.V. Rajam, *Effect of genotype, explant and medium on in vitro regeneration of red pepper*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1996. **46**(3): p. 245-250.
104. Valera-Montero, L.L. and G.C. Phillips, *Long-lasting Capsicum baccatum 'Organogenic callus' formation*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2005. **41**(4): p. 470-476.
105. Ganesan, M. and N. Jayabalan, *Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton, Gossypium hirsutum L. cv. SVPR2 through suspension cultures*. Indian Journal of Experimental Biology, 2005. **43**(10): p. 921-5.
106. Eudes, F., et al., *A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003. **73**(2): p. 147-157.
107. Monteiro, T.R., et al., *Assessing the influence of subcultures and liquid medium during somatic embryogenesis and plant regeneration in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.)*. The Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 2018. **93**(2): p. 196-203.
108. Lobo, A., et al., *Effect of temperature and osmotic stress during somatic embryogenesis on phenology and physiology of abies nordmanniana emblings*. Forest Ecology and Management, 2022. **514**: p. 120212.
109. Chen, C.C., et al., *Influence of LED light spectra on in vitro somatic embryogenesis and LC-MS analysis of chlorogenic acid and rutin in Peucedanum japonicum Thunb.: a medicinal herb*. Bot Stud, 2016. **57**(1): p. 9.
110. Islam, S.M. and N. Tuteja, *Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pretreatments in major crop species*. Plant Sci, 2012. **182**: p. 134-44.
111. Smýkal, P., *Pollen Embryogenesis - The Stress Mediated Switch from Gametophytic to Sporophytic Development. Current Status and Future Prospects*. Biologia Plantarum, 2000. **43**(4): p. 481-489.

112. Jiménez, V.M., *Involvement of Plant Hormones and Plant Growth Regulators on in vitro Somatic Embryogenesis*. Plant Growth Regulation, 2005. **47**(2): p. 91-110.
113. Nishiwaki, M., et al., *Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota L.*) seedlings in culture*. Planta, 2000. **211**(5): p. 756-759.
114. Atanassov, A. and D.C. Brown, *Plant regeneration from suspension culture and mesophyll protoplasts of *Medicago sativa L.** Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1984. **3**(2): p. 149-162.
115. Garrocho-Villegas, V., M.T. de Jesús-Olivera, and E.S. Quintanar, *Maize Somatic Embryogenesis: Recent Features to Improve Plant Regeneration*, in *Plant Cell Culture Protocols*, V.M. Loyola-Vargas and N. Ochoa-Alejo, Editors. 2012, Humana Press: Totowa, NJ. p. 173-182.
116. Verma, D., et al., *Protocol for in vitro somatic embryogenesis and regeneration of rice (*Oryza sativa L.*)*. Indian J Exp Biol, 2011. **49**(12): p. 958-63.
117. Raemakers, C.J.J.M., E. Jacobsen, and R.G.F. Visser, *Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding*. Euphytica, 1995. **81**(1): p. 93-107.
118. Rao, K.S., *Embryogenesis in flowering plants: Recent approaches and prospects*. Journal of Biosciences, 1996. **21**(6): p. 827-841.
119. Andersen, S.B., *Haploids in the Improvement of Woody Species*, in *Haploids in Crop Improvement II*, C.E. Don Palmer, W.A. Keller, and K.J. Kasha, Editors. 2005, Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg. p. 243-257.
120. Germanà, M.A., *Haploids and doubled haploids in fruit trees*, in *Advances in haploid production in higher plants*. , A. Touraev, Forster, B.P., Jain, S.M., Editor. 2009, Springer: Dordrecht, Netherlands. p. 241-263.
121. Srivastava, P. and R. Chaturvedi, *In vitro androgenesis in tree species: An update and prospect for further research*. Biotechnology Advances, 2008. **26**(5): p. 482-491.
122. Sriskandarajah, S., et al., *Increased recovery of green doubled haploid plants from barley anther culture*. Crop Science, 2015. **55**(6): p. 2806.
123. Dordević, B., et al., *Effects of copper and arsenic stress on the development of Norway spruce somatic embryos and their visualization with the environmental scanning electron microscope*. New Biotechnology, 2019. **48**: p. 35-43.
124. Malik, W.A., et al., *Exploring potential of copper and silver nano particles to establish efficient callogenesis and regeneration system for wheat (*Triticum aestivum L.*)*. GM Crops & Food-Biotechnology in Agriculture and the Food Chain, 2021: p. 1-22.
125. Nuutila, A.M., J. Hämäläinen, and L. Mannonen, *Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare L.*)*. Plant Science, 2000. **151**: p. 85-92.

126. Jacquard, C., et al., *Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars*. Plant Cell Reports, 2009. **28**(9): p. 1329-39.
127. Miroschnichenko, D., A. Klementyeva, and S. Dolgov, *The Effect of Daminozide, Dark/Light Schedule and Copper Sulphate in Tissue Culture of Triticum timopheevii*. Plants-Basel, 2021. **10**(12): p. 2620.
128. Wojnarowicz, G., et al., *Influence of copper sulfate on anther culture in barley (Hordeum vulgare L.)*. Plant Science, 2002. **162**: p. 843-847.
129. Paladi, R.K., A.N. Rai, and S. Penna, *Silver nitrate modulates organogenesis in Brassica juncea (L.) through differential antioxidant defense and hormonal gene expression*. Scientia Horticulturae, 2017. **226**: p. 261-267.
130. Hobson, G.E., et al., *The inhibition of tomato fruit ripening by silver*. Journal of Plant Physiology, 1984. **116**(1): p. 21-29.
131. Kumar, V., G. Parvatam, and G.A. Ravishankar, *AgNO₃ - a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator*. Electronic Journal of Biotechnology, 2009. **12**(2): p. 0-0.
132. Orłowska, R., et al., *Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops*. Electronic Journal of Biotechnology, 2020. **43**: p. 8-15.
133. Wu, L.M., Y.M. Wei, and Y.L. Zheng, *Effects of silver nitrate on the tissue culture of immature wheat embryos*. Russian Journal of Plant Physiology, 2006. **53**(4): p. 530-534.
134. Carvalho, C.H.S., et al., *Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes*. Plant Cell Reports, 1997. **17**(1): p. 73-76.
135. Ghobeishavi, H., et al., *Study of Factors Influencing Somatic Embryogenesis in Rice (Oryza sativa L.)*. International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2015. **3**(1): p. 43-50.
136. Hassan, M.F. and S.M.S. Islam, *Effect of silver nitrate and growth regulators to enhance anther culture response in wheat (Triticum aestivum L.)*. Heliyon, 2021. **7**(5): p. e07075-e07075.
137. Cassells, A.C., A. Plunkett, and D. Kelleher, *Screening of Saintpaulia ionantha Wendl. cultivars for caulogenetic potential based on the in vitro responses of young axenic leaves on auxin and cytokinin factorial media*. Scientia Horticulturae, 1986. **30**(1): p. 151-157.
138. Khan, S., B. Saeed, and N. Kauser, *Establishment of genetic fidelity of in vitro raised banana plantlets*. Pakistan Journal of Botany, 2011. **43**(1): p. 233-242.
139. Ponitka, A., et al., *The influence of various in vitro culture conditions on androgenetic embryo induction and plant regeneration from hexaploid triticales [xTriticosecale Wittm.]*. Journal of Applied Genetics, 1999. **40**(3).
140. Wędzony, M., et al., *Progress in doubled haploid technology in higher plants*, in *Advances in Haploid Production in Higher Plants* A. Touraev, B.P. Forster, and J.S. M., Editors. 2009, Springer,; Netherlands, . p. 1-33.

141. Machczyńska, J., et al., *Extended metaAFLP approach in studies of the tissue culture induced variation (TCIV) in case of triticale*. *Molecular Breeding*, 2014. **34**: p. 845-854.
142. Larkin, P.J. and W.R. Scowcroft, *Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1981. **60**: p. 197-214.
143. Bairu, M.W., A.O. Aremu, and J. Van Staden, *Somaclonal variation in plants: causes and detection methods*. *Plant Growth Regulation*, 2011. **63**(2): p. 147-173.
144. Metakovsky, E.V., A.Y. Novoselskaya, and A.A. Sozinov, *Problems of interpreting results obtained in studies of somaclonal variation in gliadin proteins in wheat*. *Theoretical and Applied Genetics*, 1987. **73**(5): p. 764-766.
145. Sato, M., M. Hosokawa, and M. Doi, *Somaclonal variation is induced de novo via the tissue culture process: A study quantifying mutated cells in Saintpaulia*. *PLoS ONE*, 2011. **6**(8): p. e23541.
146. Machczyńska, J., J. Zimny, and P. Bednarek, *Tissue culture-induced genetic and epigenetic variation in triticale (\times *Triticosecale* spp. Wittmack ex *A. Camus* 1927) regenerants*. *Plant Molecular Biology*, 2015. **89**(3): p. 279-292.
147. Pachota, K.A., R. Orłowska, and P.T. Bednarek, *Medium composition affects the tissue culture-induced variation in triticale regenerants*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2022. **151**: p. 35-46.
148. Guzy-Wrobelska, J., et al., *Vernalization and photoperiod-related changes in the DNA methylation state in winter and spring rapeseed*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 2013. **35**(3): p. 817-827.
149. Etienne, H. and B. Bertrand, *Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants*. *Tree Physiology*, 2003. **23**(6): p. 419-426.
150. Thieme, R. and H. Griess, *Somaclonal variation in tuber traits of potato*. *Potato Research*, 2005. **48**(3): p. 153-165.
151. Vázquez, A.M., *Insight into somaclonal variation*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 2001. **135**(1): p. 57-62.
152. Sales, E.K. and N.G. Butardo, *Molecular analysis of somaclonal variation in tissue culture derived bananas using MSAP and SSR markers*. *Int J Biol Vet Agric Food Eng*, 2014. **8**(6): p. 615-622.
153. Sun, S.L., et al., *Tissue culture-induced somaclonal variation of decreased pollen viability in *Torenia* (*Torenia fournieri* Lind.)*. *Botanical studies*, 2013. **54**(1): p. 36-36.
154. Karp, A., *Origins, Causes and Uses of Variation in Plant Tissue Cultures*, in *Plant Cell and Tissue Culture*, I.K. Vasil and T.A. Thorpe, Editors. 1994, Springer Netherlands: Dordrecht. p. 139-151.

155. Sharma, R., et al., *Heat treatment affects regeneration, protein expression and genetic make-up of Vigna aconitifolia (Jacq.) Marechal*. Annals of Agrarian Science, 2018. **16**(2): p. 116-120.
156. Cassels, A.C. and R.F. Curry, *Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001. **64**: p. 145-157.
157. Joyce, S.M., Cassels, A.C., Mohan Jain, S., *Stress and aberrant phenotypes in in vitro culture*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2003. **74**: p. 103-121.
158. Krishna, H., et al., *Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement*. 3 Biotech, 2016. **6**(1): p. 54.
159. Yoshida, S., K. Watanabe, and M. Fujino, *Non-random gametoclonal variation in rice regenerants from callus subcultured for a prolonged period under high osmotic stress*. Euphytica 1998. **104**: p. 87-94.
160. Tremblay, L., C. Levasseur, and F.M. Tremblay, *Frequency of somaclonal variations in plants of black spruce (Picea mariana, Pinaceae) and white spruce (P. glauca, Pinaceae) derived from somatic embryogenesis and identification of some factors involved in genetic instability*. American Journal of Botany, 1999. **86**(10): p. 1373-1381.
161. Popescu, A.N., et al. *SOMACLONAL VARIATION IN PLANTS REGENERATED BY ORGANOGENESIS FROM CALLUS CULTURE OF STRAWBERRY (FRAGARIA X ANANASSA)*. 1997. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
162. Puolimatka, M. and A. Karp, *Effect of genotype on chromosome variation in tissue culture of inbred and outbred rye*. Heredity, 1993. **71**(2): p. 138-144.
163. Duncan, R.R., *Tissue Culture-Induced Variation and Crop Improvement*. Advances in Agronomy, 1996. **58**: p. 201-240.
164. Sahijram, L., J.R. Soneji, and K.T. Bollamma, *Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (Musa spp.)*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2003. **39**(6): p. 551-556.
165. Krishna, H., et al., *Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments*. Scientia horticultrae, 2008. **118**(2): p. 132-138.
166. Şen, A., *Oxidative Stress Studies in Plant Tissue Culture*, in *Antioxidant Enzyme*, M.A. El-Missiry, Editor. 2012, IntechOpen.
167. Smulders, M.J.M. and G.J. de Klerk, *Epigenetics in plant tissue culture*. Plant Growth Regulation, 2011. **63**(2): p. 137-146.
168. Duarte-Aké, F., et al., *Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in Agave angustifolia Haw. albino variant somaclones during the micropropagation process*. Plant Cell Reports, 2016. **35**(12): p. 2489-2502.

169. Ładyżyński, M., W. Burza, and S. Malepszy, *Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber*. Euphytica, 2002. **125**: p. 349-356.
170. Müller, E., et al., *DNA variation in tissue-culture-derived rice plants*. Theor Appl Genet, 1990. **80**: p. 673-679.
171. Kaeppler, S.M., R.L. Phillips, and P. Olhoft, *Molecular basis of heritable tissue culture - induced variation in plants*, in *Somaclonal variation and induced mutation in crop improvement*, S.M. Jain and D.S. Brar, Ahloowalia, B.S., Editors. 1998, Kluwer Academic: Dordrecht, The Netherlands. p. 465-484.
172. Clarindo, W.R., C.R. Carvalho, and M.A.C. Mendonça, *Ploidy instability in long-term in vitro cultures of Coffea arabica L. monitored by flow cytometry*. Plant Growth Regulation, 2012. **68**(3): p. 533-538.
173. Rival, A., et al., *Variations in genomic DNA methylation during the long-term in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures*. Plant Cell Reports, 2013. **32**: p. 359-368.
174. Gao, X., et al., *In vitro micropropagation of Freesia hybrida and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets*. Journal of Plant Growth Regulation, 2010. **29**(3): p. 257-267.
175. García-Forteza, E., et al., *A highly efficient organogenesis protocol based on zeatin riboside for in vitro regeneration of eggplant*. BMC Plant Biology, 2020. **20**(1): p. 6.
176. Hänisch ten Cate, C.H. and K. Sree Ramulu, *Callus growth, tumour development and polyploidization in the tetraploid potato cultivar bintje*. Plant Science, 1987. **49**(3): p. 209-216.
177. Kumar, P.S. and V.L. Mathur, *Chromosomal instability in callus culture of Pisum sativum*. Plant Cell Tiss. Org. Cult, 2004. **78**: p. 267-271.
178. Arnholdt-Schmitt, B., *Rapid changes in amplification and methylation pattern of genomic DNA in cultured carrot root explants (Daucus carota L.)*. Theoretical and Applied Genetics, 1993. **85**(6): p. 793-800.
179. Siragusa, M., et al., *Genetic instability in calamondin (Citrus madurensis Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives*. Plant Cell Reports, 2007. **26**(8): p. 1289-1296.
180. Dolezel, J. and F.J. Novák, *Sister chromatid exchanges in garlic (Allium sativum L.) callus cells*. Plant Cell Reports, 1986. **5**: p. 280-283.
181. Orłowska, R., et al., *Triticale Green Plant Regeneration Is Due to DNA Methylation and Sequence Changes Affecting Distinct Sequence Contexts in the Presence of Copper Ions in Induction Medium*. Cells, 2022. **11**(1): p. 84.
182. Burkhead, J.L., et al., *Copper homeostasis*. New Phytologist, 2009. **182**(4): p. 799-816.

183. Cassells, A.C. and R.F. Curry, *Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2001. **64**(2): p. 145-157.
184. Orłowska, R., et al., *S-Adenosyl-L-Methionine and Cu(II) Impact Green Plant Regeneration Efficiency*. Cells, 2022. **11**(17): p. 2700.
185. Bednarek, P.T., et al., *Glutathione and copper ions as critical factors of green plant regeneration efficiency of triticale in vitro anther culture*. Frontiers in Plant Science, 2022. **13**.
186. Bednarek, P.T., et al., *Structural Equation Modeling (SEM) analysis of sequence variation and green plant regeneration via anther culture in barley*. Cells, 2021. **10**(10): p. 2774.
187. Orłowska, R., *Triticale doubled haploid plant regeneration factors linked by structural equation modeling*. Journal of Applied Genetics, 2022. **63**(4): p. 677-690.
188. Osorio-Montalvo, P., L. Sáenz-Carbonell, and C. De-la-Peña, *5-Azacytidine: A Promoter of Epigenetic Changes in the Quest to Improve Plant Somatic Embryogenesis*. International journal of molecular sciences, 2018. **19**(10): p. 3182.
189. Zhang, D., et al., *Tissue Culture-Induced Heritable Genomic Variation in Rice, and Their Phenotypic Implications*. PLOS ONE, 2014. **9**(5): p. e96879.
190. Jiang, Y., et al., *Rice functional genomics research: Progress and implications for crop genetic improvement*. Biotechnology Advances, 2012. **30**(5): p. 1059-1070.
191. Miyao, A., et al., *Molecular Spectrum of Somaclonal Variation in Regenerated Rice Revealed by Whole-Genome Sequencing*. Plant and Cell Physiology, 2011. **53**(1): p. 256-264.
192. Sabot, F., et al., *Transpositional landscape of the rice genome revealed by paired-end mapping of high-throughput re-sequencing data*. The Plant Journal, 2011. **66**(2): p. 241-246.
193. Xuan, Y.H., T. Peterson, and C.D. Han, *Generation and Analysis of Transposon Ac/Ds-Induced Chromosomal Rearrangements in Rice Plants*. Methods Mol Biol, 2016. **1469**: p. 49-61.
194. Touchell, D.H., I.E. Palmer, and T.G. Ranney, *In vitro Ploidy Manipulation for Crop Improvement*. Frontiers in Plant Science, 2020. **11**(722).
195. Ngezahayo, F., Y. Dong, and B. Liu, *Somaclonal variation at the nucleotide sequence level in rice (*Oryza sativa* L.) as revealed by RAPD and ISSR markers, and by pairwise sequence analysis*. J Appl Genet, 2007. **48**(4): p. 329-36.
196. Hou, B.-H., et al., *Cultivar-specific markers, mutations, and chimerism of Cavendish banana somaclonal variants resistant to *Fusarium oxysporum* f. sp. cubense tropical race 4*. BMC Genomics, 2022. **23**(1): p. 470.
197. Jiang, C., et al., *Regenerant Arabidopsis lineages display a distinct genome-wide spectrum of mutations conferring variant phenotypes*. Current Biology, 2011. **21**(16): p. 1385-90.

198. Rodríguez López, C.M., et al., *Detection of somaclonal variation during cocoa somatic embryogenesis characterised using cleaved amplified polymorphic sequence and the new freeware Arbio*. Molecular Breeding, 2010. **25**(3): p. 501-516.
199. Cooke, M.S., et al., *Oxidative DNA damage: mechanisms, mutation, and disease*. The FASEB Journal, 2003. **17**(10): p. 1195-1214.
200. Zhang, M., et al., *Tissue culture-induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3*. Plant Cell Rep, 2010. **29**(1): p. 51-9.
201. Palombi, M. and C. Damiano, *Comparison between RAPD and SSR molecular markers in detecting genetic variation in kiwifruit (*Actinidia deliciosa* A. Chev)*. Plant Cell Reports, 2002. **20**(11): p. 1061-1066.
202. Phillips, R.L., S.M. Kaeppler, and P. Olhoft, *Genetic instability of plant tissue cultures: Breakdown of normal controls*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1994. **91**: p. 5222-5226.
203. Wang, X., et al., *Tissue culture-induced genetic and epigenetic alterations in rice pure-lines, F1 hybrids and polyploids*. BMC Plant Biology, 2013. **13**(77).
204. Jain, S.M., *Tissue culture-derived variation in crop improvement*. Euphytica, 2001. **118**: p. 153-166.
205. Oleszczuk, S., et al., *Aneuploidy among androgenic progeny of hexaploid triticale (*XTriticosecale* Wittmack)*. Plant Cell Reports, 2011. **30**(4): p. 575-586.
206. Azizi, P., et al., *Epigenetic changes and their relationship to somaclonal variation: a need to monitor the micropropagation of plantation crops*. Functional Plant Biology, 2020. **47**(6): p. 508-523.
207. Machczyńska, J., et al., *DNA methylation changes in triticale due to in vitro culture plant regeneration and consecutive reproduction*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 2014. **119**(2): p. 289-299.
208. Jain, S.M. *Creation of variability by mutation and tissue culture for improving plants*. 1997. International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium.
209. Maddock, S.E., et al., *Somaclonal Variation in the Gliadin Patterns of Grains of Regenerated Wheat Plants*. Journal of Experimental Botany, 1985. **36**(173): p. 1976-1984.
210. Larkin, P.J., et al., *Heritable somaclonal variation in wheat*. Theoretical and Applied Genetics, 1984. **67**(5): p. 443-455.
211. Cooper, D.B., et al., *Heritable somaclonal variation in gliadin proteins of wheat plants derived from immature embryo callus culture*. Theoretical and Applied Genetics, 1986. **71**(6): p. 784-790.
212. Botstein, D., et al., *Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms*. The American Journal of Human Genetics, 1980. **32**: p. 314-331.

213. Roth, E.J., et al., *Genetic variation in an inbred plant: variation in tissue cultures of soybean [Glycine max (L.) Merrill]*. Genetics, 1989. **121**(2): p. 359-368.
214. Jaligot, E., T. Beule, and A. Rival, *Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism*. Theor Appl Genet, 2002. **104**(8): p. 1263-1269.
215. Valles, M.P., et al., *Analysis of genetic stability of plants regenerated from suspension cultures and protoplasts of meadow fescue (Festuca pratensis Huds.)*. Plant Cell Rep, 1993. **12**: p. 101-106.
216. Williams, J.G., et al., *DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers*. Nucleic Acids Research, 1990. **18**(22): p. 6531-6535.
217. Bouman, H. and G.-J. Klerk, *Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays*. Theoretical and Applied Genetics, 2001. **102**: p. 111-117.
218. Heinze, B. and J. Schmidt, *Monitoring genetic fidelity vs somaclonal variation in Norway spruce (Picea abies) somatic embryogenesis by RAPD analysis*. Euphytica, 1995. **85**(1): p. 341-345.
219. Oleszczuk, S., J. Zimny, and P.T. Bednarek, *The application of the AFLP method to determine the purity of homozygous lines of barley (Hordeum vulgare L.)*. Cellular and Molecular Biology Letters, 2002. **7**: p. 777-783.
220. Peredo, E.L., R. Arroyo-García, and M.Á. Revilla, *Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants*. Journal of Plant Physiology, 2009. **166**(10): p. 1101-1111.
221. Bobadilla Landey, R., et al., *High Genetic and Epigenetic Stability in Coffea arabica Plants Derived from Embryogenic Suspensions and Secondary Embryogenesis as Revealed by AFLP, MSAP and the Phenotypic Variation Rate*. PLoS ONE, 2013. **8**(2): p. e56372.
222. Kawiak, A. and E. Łojkowska, *Application of RAPD in the Determination of Genetic Fidelity in Micropropagated Drosera Plantlets*. In Vitro Cellular & Developmental Biology. Plant, 2004. **40**(6): p. 592-595.
223. Munthali, M.T., H.J. Newbury, and B.V. Ford-Lloyd, *The detection of somaclonal variants of beet using RAPD*. Plant Cell Rep, 1996. **1996**: p. 474-478.
224. Martin, C., E. Uberhuaga, and C. Pérez, *Application of RAPD markers in the characterisation of Chrysanthemum varieties and the assessment of somaclonal variation*. Euphytica, 2002. **127**(2): p. 247-253.
225. Al-Zahim, M.A., B.V. Ford-Lloyd, and H.J. Newbury, *Detection of somaclonal variation in garlic (Allium sativum L.) using RAPD and cytological analysis*. Plant Cell Rep, 1999. **18**: p. 853-857.

226. Santos, M.D., G.C. Buso, and A.C. Torres, *Evaluation of genetic variability in micropropagated propagules of ornamental pineapple [Ananas comosus var. bracteatus (Lindley) Coppens and Leal] using RAPD markers*. Genet Mol Res, 2008. **7**(4): p. 1097-105.
227. Yang, H., Tabei, Y., Kamada, H., Kayano, T., Takaiwa, F., *Detection of somaclonal variation in cultured rice cells using digoxigenin-based random amplified polymorphic DNA*. Plant Cell Reports, 1999. **8**: p. 520–526.
228. Linacero, R., E. Freitas Alves, and A.M. Vazquez, *Hot spots of DNA instability revealed through the study of somaclonal variation in rye*. Theor Appl Genet, 2000. **100**(3/4): p. 506-511.
229. Linacero, R., et al., *Genetic and epigenetic relationship in rye, Secale cereale L., somaclonal variation within somatic embryo-derived plants*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2011. **47**(5): p. 618-628.
230. Cloutier, S. and B.S. Landry, *Molecular markers applied to plant tissue culture*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 1994. **30**(1): p. 32-39.
231. Osipova, E.S., et al., *Analysis of SCAR marker nucleotide sequences in maize (Zea mays L.) somaclones*. Plant Science, 2011. **180**(2): p. 313-322.
232. Costa, G.F.d., et al., *Clonal Fidelity and Genetic Diversity of Micropropagated Hancornia speciosa Gomes (Apocynaceae) as Evaluated by Molecular Markers*. Forests, 2022. **13**(10): p. 1645.
233. Rathore, M.S., et al., *Evaluation of Genetic Homogeneity in Tissue Culture Regenerates of Jatropha curcas L. using Flow Cytometer and DNA-based Molecular Markers*. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2014. **172**(1): p. 298-310.
234. Rostiana, O., Niwa, M., Marubashi, W., *Efficiency of inter-simple sequence repeat PCR for detecting somaclonal variation among leaf-cultured generated plants of horseradish*. Breed. Sci., 1999. **49**: p. 245-250.
235. Bhatia, R., et al., *Assessment of clonal fidelity of micropropagated gerbera plants by ISSR markers*. Scientia Horticulturae, 2009. **119**(2): p. 208-211.
236. Kalendar, R., et al., *IRAP and REMAP: two new retrotransposon-based DNA fingerprinting techniques*. Theor Appl Genet, 1999. **98**: p. 704-711.
237. Peredo, E.L., M.A. Revilla, and R. Arroyo-Garcia, *Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli*. Journal of Plant Physiology, 2006. **163**: p. 1071-1079.
238. Smykal, P., et al., *Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (Pisum sativum L.)*. Plant Cell Rep, 2007. **26**: p. 1985–1998.
239. Vos, P., et al., *AFLP: a new technique for DNA fingerprinting*. Nucleic Acids Research, 1995. **23**: p. 4407-4414.

240. Witsenboer, H., R.W. Michelmore, and J. Vogel, *Identification, genetic localization, and allelic diversity of selectively amplified microsatellite polymorphic loci in lettuce and wild relatives (Lactuca spp.)*. Genome, 1997. **40**(6): p. 923-36.
241. Baurens, F.-C., et al., *Using SD-AFLP and MSAP to Assess CCGG Methylation in the Banana Genome*. Plant Molecular Biology Reporter, 2003. **21**: p. 339-348.
242. Waugh, R., et al., *Genetic distribution of Bare-1-like retrotransposable elements in the barley genome revealed by sequence-specific amplification polymorphisms (S-SAP)*. Mol Gen Genet, 1997. **253**: p. 687-694.
243. Perrini, R., et al., *An evaluation of a new approach to the regeneration of Helichrysum italicum (Roth) G. Don, and the molecular characterization of the variation among sets of differently derived regenerants*. Cell Mol Biol Lett, 2009. **14**(3): p. 377-94.
244. de la Puente, R., et al., *Somaclonal variation in rye (Secale cereale L.) analyzed using polymorphic and sequenced AFLP markers*. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 2008. **44**(5): p. 419-426.
245. Paglia, G.P., A.M. Olivieri, and M. Morgante, *Towards second-generation STS (sequencetagged sites) linkage maps in conifers, a genetic map of Norway spruce (Picea abies K.)*. Mol Gen Genet, 1998. **258**: p. 466-478.
246. Morgante, M. and J. Vogel, *Compound microsatellite primers for the detection of genetic polymorphisms*. U.S. Patent Appl 08/326456, 1994.
247. Gimenez, C., et al., *SAMPL: A Technique for Somaclonal Variation Fingerprinting in Musa*. Plant Molecular Biology Reporter, 2005. **23**: p. 263-269.
248. Li, X., et al., *Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (Hordeum brevisubulatum (Trin.) Link)*. Plant Cell Tiss Org., 2007. **90**.
249. Reyna-Lopez, G.E., J. Simpson, and J. Ruiz-Herrera, *Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms*. Mol Gen Genet, 1997. **253**: p. 703 - 710.
250. Fulneček, J. and A. Kovařík, *How to interpret Methylation Sensitive Amplified Polymorphism (MSAP) profiles?* BMC Genetics, 2014. **15**(1): p. 2.
251. Francischini, J.H.M.B., et al., *DNA methylation in sugarcane somaclonal variants assessed through methylation-sensitive amplified polymorphism*. Genetics and Molecular Research, 2017. **16**(2).
252. Zhang, W., et al., *Assessment of Epigenetic and Phenotypic Variation in Populus nigra Regenerated via Sequential Regeneration*. Frontiers in Plant Science, 2021. **12**(1373).
253. Patzak, J., et al., *Evaluation of methylation epigenetics changes in micropropagated hop plants*. Acta Horticulturae, 2021. **1328**: p. 17-22.

254. Schellenbaum, P., et al., *Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (Vitis vinifera L.)*. BMC Plant Biology, 2008. **8:78**(doi:10.1186/1471-2229-8-78): p. <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/8/78>.
255. Tiwari, J.K., et al., *Analysis of genetic and epigenetic variation in in vitro propagated potato somatic hybrid by AFLP and MSAP marker*. Electronic Journal of Biotechnology, 2013. **16**(6).
256. Chakrabarty, D., K.W. Yu, and K.Y. Paek, *Detection of DNA methylation changes during somatic embryogenesis of Siberian ginseng (Eleutherococcus senticosus)*. Plant Science, 2003. **165**: p. 61-68.
257. Orłowska, R., J. Zimny, and P.T. Bednarek, *Copper ions induce DNA sequence variation in zygotic embryo culture-derived barley regenerants*. Frontiers in Plant Science, 2021. **11**: p. 614837-614837.
258. Pachota, K.A. and R. Orłowska, *Effect of copper and silver ions on sequence and DNA methylation changes in triticale regenerants gained via somatic embryogenesis*. Journal of Applied Genetics, 2022. **63**(4): p. 663-675.
259. Fiuk, A., P.T. Bednarek, and J.J. Rybczyński, *Flow cytometry, HPLC-RP, and metaAFLP analyses to assess genetic variability in somatic embryo-derived plantlets of Gentiana pannonica Scop.* Plant Molecular Biology Reporter, 2010. **28**: p. 413-420.
260. Bednarek, P.T. and R. Orłowska, *CG demethylation leads to sequence mutations in an anther culture of barley due to the presence of Cu, Ag ions in the medium and culture time* International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(12): p. 4401.
261. Orłowska, R., *Barley somatic embryogenesis-an attempt to modify variation induced in tissue culture*. Journal of Biological Research-Thessaloniki, 2021. **28**(1): p. 9.
262. Bednarek, P.T., J. Zebrowski, and R. Orłowska, *Exploring the biochemical origin of DNA sequence variation in barley plants regenerated via in vitro anther culture*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(16): p. 5770.
263. Orłowska, R. and P.T. Bednarek, *Precise evaluation of tissue culture-induced variation during optimisation of in vitro regeneration regime in barley*. Plant Molecular Biology, 2020. **103**: p. 33-50.
264. Coronel, C.J., et al., *Analysis of somaclonal variation in transgenic and regenerated plants of Arabidopsis thaliana using methylation related metaAFLP and TMD markers*. Plant Cell Reports, 2018. **37**(1): p. 137-152.
265. Chwedorzewska, K.J. and P.T. Bednarek, *Genetic and epigenetic variation in a cosmopolitan grass Poa annua from Antarctic and Polish populations*. Polish Polar Research, 2012. **33**: p. 63–80.
266. Śliwińska, A.A., et al., *Comparative study of the genetic and biochemical variability of Polyscias filicifolia (Araliaceae) regenerants obtained by indirect and direct somatic*

- embryogenesis as a source of triterpenes*. International Journal of Molecular Sciences, 2021. **22**(11): p. 5752.
267. Daneshvar, N., et al., *Biodegradation of dye solution containing malachite green: Optimization of effective parameters using Taguchi method*. J. Hazard. Mater., 2007. **143**: p. 214-219.
268. Sirisansaneeyakul, S., et al., *Optimization of lactic acid production by immobilized Lactococcus lactis IO-1*. J Ind Microbiol Biotechnol 2007. **34**: p. 381–391.
269. Ramakrishna, U., et al., *Taguchi optimization of duplex PCR for simultaneous identification of Staphylococcus aureus and Clostridium perfringens alpha toxins*. FEMS Microbiology Letters, 2013. **340**(2): p. 93-100.
270. Chu, C.C., *The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops*, in *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*, H. Hu, Editor. 1978, Science Press: Peking. p. 43-50.
271. Wang, P. and Y. Chen, *Preliminary study on production of high of pollen H2 generation in winter wheat grown in the field*. Acta Agron Sin, 1983. **9**: p. 283-284.
272. Zhuang, J.J. and J. Xu, *Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus*, in *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*, H. Hu and M.R. Vega, Editors. 1983, Science Press: Beijing. p. 431.
273. Kumlehn, J., et al., *Genetic transformation of barley (Hordeum vulgare L.) via infection of androgenetic pollen cultures with Agrobacterium tumefaciens*. Plant Biotechnology Journal, 2006. **4**(2): p. 251-261.
274. Peakall, R. and P.E. Smouse, *GenAlEx 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research-an update*. Bioinformatics, 2012. **28**.
275. Addinsoft, *XLSTAT statistical and data analysis solution*. <https://www.xlstat.com> 2022: New York, USA.
276. Murashige, T. and F. Skoog, *A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture*. Physiologia Plantarum, 1962. **15**: p. 473-497.
277. Pauk, J., et al., *Androgenesis in hexaploid spring wheat F2 populations and their parents using a multiple-step regeneration system*. Plant Breeding, 1991. **107**: p. 18-27.
278. Devaux, P. and K.J. Kasha, *Overview of barley doubled haploid production*, in *Advances in haploid production in higher plants*, A. Touraev, B.P. Forester, and S.M. Jain, Editors. 2009, Springer: Dordrecht. p. 47-63.
279. Makowska, K., S. Oleszczuk, and J. Zimny, *The effect of copper on plant regeneration in barley microspore culture*. Czech Journal of Genetics and Plant Breeding, 2017. **53**(1): p. 17-22.

280. Ghaemi, M., A. Sarrafi, and G. Alibert, *The effects of silver nitrate, colchicine, cupric sulfate and genotype on the production of embryoids from anthers of tetraploid wheat (Triticum turgidum)*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1994. **36**: p. 355-359.
281. Grauda, D., et al., *Anther culture effectiveness in producing doubled haploids of cereals*. Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences, 2014. **68**(3-4): p. 142-147.
282. Purnhauser, L. and G. Gyulai, *Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993. **35**(2): p. 131-139.
283. Brew-Appiah, R.A.T., et al., *Generation of doubled haploid transgenic wheat lines by microspore transformation*. PLoS ONE, 2013. **8**(11).
284. Bradaï, F., C. Sánchez-Romero, and C. Martín, *Somaclonal variation in olive (Olea europaea L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: Influence of genotype and culture age on genetic stability*. Scientia Horticulturae, 2019. **251**: p. 260-266.
285. Yu, X., et al., *Tissue culture-induced genomic alteration in maize (Zea mays) inbred lines and F1 hybrids*. Annals of Applied Biology, 2011. **158**(3): p. 237-247.
286. Aydin, M., et al., *Analyses of somaclonal variation in endosperm-supported mature embryo culture of rye (Secale cereale L.)*. Biotechnology and Biotechnological Equipment, 2016. **30**(6): p. 1082-1089.
287. Mahmoud, R.A., et al., *Somaclonal variation in regenerated plants derived from callus of peach rootstocks*, in *Acta Horticulturae*. 2017. p. 233-241.
288. Matsuda, S., et al., *Cutting Leaves and Plant Growth Regulator Application Enhance Somaclonal Variation Induced by Transposition of VGs1 of Saintpaulia*. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science, 2014. **83**(4): p. 308-316.
289. Liberatore, C.M., et al., *In vitro leaf-derived organogenesis and somaclonal variant detection in Humulus lupulus L.* In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant, 2020. **56**(6): p. 865-874.
290. Bednarek, P.T. and R. Orłowska, *Time of in vitro anther culture may moderate action of copper and silver Ions that affect the relationship between DNA methylation change and the yield of barley green regenerants*. Plants-Basel, 2020. **9**(9): p. 1064.
291. Machczyńska, J., et al. *Comparative study on tissue culture induced variation identified with metAFLP and RP-HPLC in barley and triticale regenerants*. in *BioTechnologia. Journal of Biotechnology Computational Biology and Bionanotechnology*. 2015.
292. Sato, K., *History and future perspectives of barley genomics*. DNA research, 2020. **27**(4): p. dsaa023.
293. Ma, X.-F. and J.P. Gustafson, *Allopolyploidization-accommodated Genomic Sequence Changes in Triticale*. Annals of Botany, 2008. **101**(6): p. 825–832.

294. Oleszczuk, S., et al., *Heritability of meiotic restitution and fertility restoration in haploid triticale*. Plant Cell Reports, 2019. **38**(12): p. 1515-1525.
295. Yruela, I., *Copper in plants: acquisition, transport and interactions*. Functional Plant Biology, 2009. **36**(5): p. 409-430.
296. Poetsch, A.R., *The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis*. Computational and Structural Biotechnology Journal, 2020. **18**: p. 207-219.
297. Kurek, K., B. Plitta-Michalak, and E. Ratajczak, *Reactive Oxygen Species as Potential Drivers of the Seed Aging Process*. Plants-Basel, 2019. **8**(6): p. 174.
298. Zhu, J.K., *Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases*. Annual Review of Genetics, 2009. **43**: p. 143-66.
299. Cokus, S.J., et al., *Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning*. Nature, 2008. **452**(7184): p. 215-219.
300. Evtushenko, E.V., et al., *Cytogenetic and molecular characteristics of rye genome in octoploid triticale (\times Triticosecale Wittmack)*. Comparative Cytogenetics, 2019. **13**(4).
301. Kalinka, A. and M. Achrem, *Reorganization of wheat and rye genomes in octoploid triticale (\times Triticosecale)*. Planta, 2018. **247**(4): p. 807-829.
302. Feng, S., S.E. Jacobsen, and W. Reik, *Epigenetic Reprogramming in Plant and Animal Development*. Science, 2010. **330**(6004): p. 622-627.
303. Solís, M.-T., et al., *DNA methylation dynamics and MET1a-like gene expression changes during stress-induced pollen reprogramming to embryogenesis*. Journal of Experimental Botany, 2012. **63**(18): p. 6431-6444.
304. Jullien, Pauline E., et al., *DNA Methylation Dynamics during Sexual Reproduction in Arabidopsis thaliana*. Current Biology, 2012. **22**(19): p. 1825-1830.
305. Markulin, L., et al., *Taking the Wheel – de novo DNA Methylation as a Driving Force of Plant Embryonic Development*. Frontiers in Plant Science, 2021. **12**.
306. Wójcikowska, B., A.M. Wójcik, and M.D. Gaj, *Epigenetic Regulation of Auxin-Induced Somatic Embryogenesis in Plants*. International Journal of Molecular Sciences, 2020. **21**(7): p. 2307.
307. Nic-Can, G.I. and C. De la Peña, *Epigenetic Advances on Somatic Embryogenesis of Agronomical and Important Crops*, in *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications: Transcriptional Regulation and Chromatin Remodelling in Plants*, R. Alvarez-Venegas, C. De la Peña, and J.A. Casas-Mollano, Editors. 2014, Springer International Publishing: Cham. p. 91-109.
308. Gent, J.I., et al., *CHH islands: de novo DNA methylation in near-gene chromatin regulation in maize*. Genome Research, 2013. **23**(4): p. 628-637.
309. Law, J.A. and S.E. Jacobsen, *Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals*. Nature Reviews Genetics, 2010. **11**: p. 204.

310. Stroud, H., et al., *Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis*. Nature structural & molecular biology, 2014. **21**(1): p. 64.
311. Zemach, A., et al., *The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin*. Cell, 2013. **153**(1): p. 193-205.
312. Liu, R. and Z. Lang, *The mechanism and function of active DNA demethylation in plants*. Journal of Integrative Plant Biology, 2020. **62**(1): p. 148-159.
313. Rodríguez-Sanz, H., et al., *Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak, Quercus suberL*. BMC Plant Biology, 2014. **14**(1): p. 224.
314. Solís, M.-T., et al., *5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley*. Frontiers in Plant Science, 2015. **6**(472).
315. Testillano, P.S., M.T. Solís, and M.C. Risueño, *The 5-methyl-deoxy-cytidine (5mdC) localization to reveal in situ the dynamics of DNA methylation chromatin pattern in a variety of plant organ and tissue cells during development*. Physiol Plant, 2013. **149**(1): p. 104-13.
316. Ji, L., et al., *Genome-Wide Reinforcement of DNA Methylation Occurs during Somatic Embryogenesis in Soybean*. The Plant Cell, 2019. **31**(10): p. 2315-2331.

7. OŚWIADCZENIA O PROCENTOWYM UDZIALE AUTORÓW W OPRACOWANIU PUBLIKACJI

W porozumieniu ze wszystkimi współautorami, ustalono procentowy wkład doktoranta w realizację poszczególnych publikacji. Oświadczenia współautorów dotyczące udziału w poszczególnych publikacjach potwierdzono podpisami i umieszczono w niniejszej dysertacji w załączniku.

P1. Orłowska R., Pachota K.A., Machczyńska J., Niedziela A., Makowska K., Zimny J., Bednarek P.T.* (2020) Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. *Electronic Journal of Biotechnology*, 43: 8-15, doi:10.1016/j.ejbt.2019.11.001.

[IF₂₀₂₁=2,826; MEiN₂₀₂₁=70]

Zakres badań wykonany przez doktoranta: udział w uzyskaniu materiału roślinnego i w prowadzeniu eksperymentu w laboratorium kultur in vitro. Wkład w pracę: 10%

P2. Pachota K.A., Orłowska, R.,* Bednarek, P.T. (2022) Medium composition affects the tissue culture-induced variation in triticale regenerants *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151: 35-46, doi:10.1007/s11240-022-02327-z

[IF₂₀₂₁=2,726; MEiN₂₀₂₁=100]

Zakres badań wykonany przez doktoranta: udział w uzyskaniu materiału roślinnego, w analizie danych, w przygotowaniu manuskryptu do druku oraz w przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje. Wkład w pracę: 80%

P3. Pachota K.A., Orłowska R.* (2022) Effect of copper and silver ions on sequence and DNA methylation changes in triticale regenerants gained *via* somatic embryogenesis. *Journal of Applied Genetics*, 63: 663-675, doi:10.1007/s13353-022-00717-9

[IF₂₀₂₁=2,653; MEiN₂₀₂₁=140]

Zakres badań wykonany przez doktoranta: udział w uzyskaniu materiału roślinnego, w analizach molekularnych, w analizie danych, w przygotowaniu manuskryptu do druku oraz w przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje. Wkład w pracę: 90%

P4. Pachota K.A.* (2022) Comparison of tissue culture-induced variation in triticales regenerants obtained by androgenesis and somatic embryogenesis. Cereal Research Communications, doi:10.1007/s42976-022-00300-2

[IF₂₀₂₁=1,240; MEiN₂₀₂₁=20]

Zakres badań wykonany przez doktoranta: Stworzenie koncepcji i hipotezy badawczej pracy, zestawienie danych molekularnych, analiza zebranych wyników, graficzne przedstawienie danych, zebranie i przestudiowanie literatury naukowej; samodzielnie napisany artykuł eksperymentalny. Wkład w pracę: 100%

8. ZAŁĄCZNIKI

Lista załączników w postaci publikacji oraz oświadczeń autorów prac:

1. Oświadczenia autorów do publikacji **P1**.
2. Orłowska R., Pachota K.A., Machczyńska J., Niedziela A., Makowska K., Zimny J., Bednarek P.T.* (2020) Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. *Electronic Journal of Biotechnology*, 43: 8-15, doi:10.1016/j.ejbt.2019.11.001.
3. Oświadczenia autorów do publikacji **P2**.
4. Pachota K.A., Orłowska R.,* Bednarek, P.T. (2022) Medium composition affects the tissue culture-induced variation in triticale regenerants *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 151: 35-46, doi:10.1007/s11240-022-02327-z.
5. Oświadczenia autorów do publikacji **P3**.
6. Pachota K.A., Orłowska R.* (2022) Effect of copper and silver ions on sequence and DNA methylation changes in triticale regenerants gained *via* somatic embryogenesis. *Journal of Applied Genetics*, 63: 663-675, doi:10.1007/s13353-022-00717-9.
7. Pachota K.A.* (2022) Comparison of tissue culture-induced variation in triticale regenerants obtained by androgenesis and somatic embryogenesis. *Cereal Research Communications*, doi:10.1007/s42976-022-00300-2.

dr inż. Renata Orłowska
dr hab. inż. Agnieszka Niedziela
prof. dr hab. Janusz Zimny
prof. dr hab. Piotr T. Bednarek

Radzików, 31.08.2022

.....
Miejscowość i data

.....
Imię i nazwisko

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
-Państwowy Instytut Badawczy
Radzików
05-870 Błonie

.....
Afilacja

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE PRACY WIELOAUTORSKIEJ

Oświadczam, że w pracy:

Orłowska R., Pachota K.A., Machczyńska J., Niedziela A., Makowska K., Zimny J., Bednarek P.T.*
(2020) **Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops.**
Electronic Journal of Biotechnology, 43: 8-15; doi:10.1016/j.ejbt.2019.11.001.

dr inż. Renata Orłowska: Mój udział polegał na: sformułowaniu problemu badawczego, planowaniu badań, uzyskaniu materiału roślinnego, wykonaniu analiz statystycznych wyników i ich interpretacji, oraz na przygotowaniu manuskryptu do druku oraz przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział szacuję na 40%.

.....
Renata Orłowska

Podpis

dr hab. inż. Agnieszka Niedziela: Mój udział dotyczył pomocy w uzyskaniu roślin donorowych i szacuję go na 10%.

.....
Agnieszka Niedziela

Podpis

Prof. dr hab. Janusz Zimny: Mój udział dotyczył sformułowania problemu badawczego oraz planowania badań i szacuję go na 10%.

.....
Janusz Zimny

Podpis

Piotr T. Bednarek: Mój udział dotyczył sformułowania problemu badawczego, planowania badań, analizy wyników oraz pisania manuskryptu i szacuję go na 10%.

.....
Bednarek P.T.

Podpis

dr Joanna Machczyńska

.....
Imię i nazwisko

Radzików, 31.08.2022

.....
Miejscowość i data

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
-Państwowy Instytut Badawczy
Radzików
05-870 Błonie
.....

Afiliacja

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE PRACY WIELOAUTORSKIEJ

Oświadczam, że w pracy:

Orłowska R., Pachota K.A., Machczyńska J., Niedziela A., Makowska K., Zimny J., Bednarek P.T.*
(2020) **Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops.**
Electronic Journal of Biotechnology, 43: 8-15; doi:10.1016/j.ejbt.2019.11.001.

Mój udział dotyczył pomocy w uzyskaniu roślin donorowych i szacuję go na 10%.

Joanna Machczyńska

Podpis

dr Makowska Katarzyna

.....
Imię i nazwisko

Radzików, 31.08.2022

.....
Miejscowość i data

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
-Państwowy Instytut Badawczy
Radzików
05-870 Błonie
.....

Afiliacja

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE PRACY WIELOAUTORSKIEJ

Oświadczam, że w pracy:

Orłowska R., Pachota K.A., Machczyńska J., Niedziela A., Makowska K., Zimny J., Bednarek P.T.*
(2020) **Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops.**
Electronic Journal of Biotechnology, 43: 8-15; doi:10.1016/j.ejbt.2019.11.001.

Mój udział dotyczył uzyskania roślin donorowych i szacuję go na 10%.

Katarzyna Makowska
.....
Podpis



Research article

Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops

Renata Orłowska^a, Katarzyna A. Pachota^a, Joanna Machczyńska^a, Agnieszka Niedziela^a, Katarzyna Makowska^b, Janusz Zimny^b, Piotr T. Bednarek^{a,*}^a Plant Breeding and Acclimatization Institute–National Research Institute, Department of Plant Physiology and Biochemistry, 05-870 Błonie, Radzików, Poland^b Plant Breeding and Acclimatization Institute–National Research Institute, Department of Plant Biotechnology and Cytogenetics, 05-870 Błonie, Radzików, Poland

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 April 2019

Accepted 20 November 2019

Available online 29 November 2019

Keywords:

AgNO₃

Androgenic embryos

Anther culture

Cereal

Crops

CuSO₄

Gametophytic

Microspores

Sporophytic

Taguchi method

ABSTRACT

Background: Plant tissue cultures have the potential to reprogram the development of microspores from normal gametophytic to sporophytic pathway resulting in the formation of androgenic embryos. The efficiency of this process depends on the genotype, media composition and external conditions. However, this process frequently results in the regeneration of albino instead of green plants. Successful regeneration of green plants is affected by the concentration of copper sulfate (CuSO₄) and silver nitrate (AgNO₃) and the length of induction step. In this study, we aimed at concurrent optimization of these three factors in barley (*Hordeum vulgare* L.), wheat (*Triticum aestivum* L.), and triticale (*x Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) using the Taguchi method. We evaluated uniform donor plants under varying experimental conditions of *in vitro* anther culture using the Taguchi approach, and verified the optimized conditions.

Results: Optimization of the regeneration conditions resulted in an increase in the number of green regenerants compared with the control. Statistic Taguchi method for optimization of the *in vitro* tissue culture plant regeneration *via* anther cultures allowed reduction of the number of experimental designs from 27 needed if full factorial analysis is used to 9. With the increase in the number of green regenerants, the number of spontaneous doubled haploids decreased. Moreover, in barley and triticale, the number of albino regenerants was reduced.

Conclusion: The statistic Taguchi approach could be successfully used for various factors (here components of induction media, time of incubation on induction media) at a one time, that may impact on cereals anther cultures to improve the regeneration efficiency.

How to cite: Orłowska R, Pachota KA, Machczyńska J, et al. Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. Electron J Biotechnol 2020;43. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.11.001>.

© 2019 Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Production and hosting by Elsevier B.V. All rights reserved. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introduction

Different stresses such as heat shock [1], cold treatment [2], osmotic stress [3] or anti-microtubular agents (colchicine) [4] triggered microspores develop into androgenic embryos. Regeneration of green doubled haploid (DH) plants from immature pollen requires reprogramming of microspores from the gametophytic to the sporophytic pathway. The efficiency of this process depends on the plant genotype, media composition, and external conditions used in *in vitro* trials. Fine-tuning the experimental conditions induces microspores to undergo cell division, leading to the formation of embryo-like structures, which ultimately produce plants. However, instead of green plants, albino plants

are regenerated, possibly because of the inability of proplastids to form mature functional chloroplasts [5]; albino plants are unable to survive outside of the *in vitro* culture conditions.

Several factors control the switch of microspores into the sporophytic pathway; among these, media composition and environmental stresses, *i.e.*, inducing sporophytic pathway or tissue culture aging, are the easiest to control. To date, the effect of many different media components on plant regeneration has been analyzed, including plant growth regulators [6], casein hydrolysate [7], carbohydrates (for fine-tuning osmotic stress) [8,9] and micro- and macroelements [10,11,12,13,14]. However, cupric (Cu²⁺) and silver (Ag⁺) ions seem to be the most important. Copper plays a central role in photosynthesis, antioxidant reactions, metabolic respiration and hormone biosynthesis and perception [15,16]. However, the amount of Cu²⁺ ions in plants must be maintained under a precise control, as excess copper is toxic. In cereal crops, the benefits of copper on androgenesis rely on increasing the number of green

* Corresponding author.

E-mail address: p.bednarek@ihar.edu.pl (P.T. Bednarek).

Peer review under responsibility of Pontificia Universidad Católica de Valparaíso.

regenerants (GRs), which have better survivability than albino regenerants (ARs), and the synchronization of first microspore division [17]. Other favorable effects of copper in the induction media concern general plant regeneration [10]. Copper sulfate is commonly used in plant tissue culture media, including the most frequently used Murashige and Skoog (MS) medium [18]. However, the concentration of CuSO_4 may need optimization for better performance. In contrast to Cu^{2+} , Ag^+ ions do not only directly influence the number of GRs in tissue culture, but also affect *i.e.*, somatic embryogenesis, multiple shoot induction and shoot regeneration as well as rooting [19,20,21]. Silver nitrate is commonly used in plant culture media; it is soluble in water and has no toxic effects under a wide range of concentrations. The positive impact of Ag^+ ions on the production of regenerants is derived from the ability of Ag^+ ions to inhibit ethylene, which accumulates in culture plates during tissue culture, and influences the production and growth of regenerants [22]. Adequately adjusted concentration of silver salts in culture media significantly modulates organogenesis [23], increases the frequency of shoot regeneration [24], green plant regeneration [20] and embryo formation [25], and prevents callus necrosis, thus improving the frequency of embryogenic callus development and growth [19].

Stress conditions are necessary for the regeneration of green plants *via* androgenesis [26]. The time of tissue culture is critical for plant regeneration. The duration of *in vitro* culture and the number of subcultures [27] induces changes in plant morphology, DNA sequence and DNA methylation patterns [28]. Tissue culture over an extended period of time results in accumulation of mutations [29]. These DNA mutations/rearrangements may be manifested as deletions in chloroplast DNA (ctDNA) [30], possibly resulting in the regeneration of albino plants [31].

The greater the number of factors that need to be optimized, the larger the experimental design [32]. In a complete factorial analysis [33], optimization of three factors present at three levels requires 27 experiments. Such an approach is time consuming and expensive, and thus impractical. Using a proper statistical approach, such as the Taguchi method, may resolve this problem. The Taguchi approach is the method of choice for optimizing multiple factors [34], and relies on regression analysis and orthogonal array. Although the Taguchi method was primarily developed for technological processes, such as waste water treatment and bioremediation [35], and has been used in the healthcare industry [36], it has also proven valuable in biotechnological approaches such as fermentation for improving product yields [37], and reaction condition optimization [38]. More complex optimization problems inspired by nature require more intelligent tools called nature-inspired algorithms [39,40]. Here, the Taguchi method is suitable when the starting biological material is limited, as is the case in tissue culture experiments leading to DH production. Notably, using the statistic Taguchi method, the number of needed experiments in case of optimization three factors (AgNO_3 , CuSO_4 , length of induction step) and three levels of each of them, was trim down from 27 to 9. However, the use of the Taguchi method in tissue culture experiments needs to be verified.

In this study, we employed the Taguchi method for the simultaneous optimization of three factors (CuSO_4 and AgNO_3 concentrations and length of induction step) in anther cultures of barley, wheat and triticale for the regeneration of green plants.

2. Material and methods

2.1. Plant material

Spring barley cultivar NAD2 was provided by Poznan Plant Breeders LTD-Nagradowice, Poland. Winter triticale T28/2 was derived from *cv.* Mungis \times *cv.* Presto cross [41], and supplied by Sylwia Oleszczuk IHAR-PIB, Poland. Winter wheat genotype Svilena was provided by

Janos Pauk, Cereal Research Non-profit Limited Company, Szeged, Hungary.

2.2. Plant growth conditions

Barley, wheat and triticale plants were grown in pots (26 cm width \times 23 cm height) filled with a mixture of soil and sand (soil: sand = 3:1). A total of 24 plants were used for each species, with six plants per pot. Plants were grown until the collection of spikes in a growth chamber maintained under controlled conditions (16 h light/8 h dark photoperiod, 16°C and 12°C temperature during the subjective day and night, respectively, and approximately 190 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity using sodium lamps—light intensity was measured using the GLOptic (Poznan, Poland) spectroradiometer. During the vegetative stage, plants were fertilized (Florovit) every 2 weeks. Spikes were harvested when the microspores were in the mid to late uninucleate stage, which was determined using acetic carmine staining. Suitable spikes of barley, wheat and triticale plants were incubated in the dark at 4°C in a pot containing water for 21, 22 and 20 d, respectively. Subsequently, spikes were sterilized by soaking in 70% ethanol for 1 min, followed by soaking in 10% sodium hypochlorite for 20 min, and then washed four times with sterile distilled water [42]. Under sterile conditions, anthers were placed on species-specific semi-solid induction medium (Table 1) and incubated in the dark at 26°C until the end of callus formation. After 2–4 weeks of anther culture, androgenic embryo-like structures (1.5–3 mm in size) were transferred to the regeneration medium (Table 1).

Calli and embryo-like structures were incubated at 26°C under a 16 h light/8 h dark photoperiod (50 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity). Green regenerated plantlets were transferred to glass flasks containing N6I rooting medium [43] supplemented with 2 mg l^{-1} indole-3-acetic acid (IAA). The developed seedlings were transferred to pots and grown in a greenhouse. The chromosome number doubled spontaneously. Species that required vernalization were incubated at 4°C under 8 h light/16 h dark photoperiod for 6 weeks (20 $\mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity). Spikes from randomly chosen regenerants were self-pollinated. Progenies derived from DH regenerants served as donors of explants (anthers) for regenerating plants for the optimization (Experiment 1) and verification (Experiment 2) of *in vitro* anther culture conditions.

2.3. Taguchi method

In Experiment 1, the Taguchi method was used for the simultaneous optimization of three factors (CuSO_4 and AgNO_3 concentrations and length of induction step) at three levels each, leading to a total of nine trials (M1–M9). Varying concentrations of CuSO_4 and AgNO_3 were added to the induction medium, as shown in Table 2. The length of the induction step, comprising the time from the plating of anthers on induction media to the collection of calli and subsequent transfer to

Table 1

Composition of species-specific media used for plant induction and regeneration from microspores.

Species	Induction medium ^a	Regeneration medium ^b
Barley	N6I medium containing macro- and microelements [43] supplemented with 2 mg l^{-1} , 2,4-D, 0.5 mg l^{-1} NAA and 0.5 mg l^{-1} kinetin	K4NB medium [64] supplemented with 0.225 mg l^{-1} BAP
Wheat	C17 medium [65] supplemented with 2 mg l^{-1} 2,4-D and 0.5 mg l^{-1} kinetin	190–2 medium [66] supplemented with 0.5 mg l^{-1}
Triticale	190–2 medium [66] supplemented with 2 mg l^{-1} , 2,4-D and 0.5 mg l^{-1} kinetin	NAA and 1.5 mg l^{-1} kinetin

^a 2,4-D: 2,4-dichlorophenoxyacetic acid; NAA: naphthaleneacetic acid;

^b BAP: 6-benzylaminopurine.

Table 2

Optimisation of factors and levels of each factor for the regeneration of green plants *via* androgenesis in barley, wheat and triticale in Experiment 1 in nine trials (M1–M9) according to the Taguchi method.

Trial	Optimisation factors (Taguchi design)		
	Additional components in induction medium		Length of induction step (days)
	CuSO ₄ (μM)	AgNO ₃ (μM)	
M1 (control)	0.1	0	21/35/35
M2	0.1	10	28/42/42
M3	0.1	60	35/49/49
M4	5	60	28/42/42
M5	5	0	35/49/49
M6	5	10	21/35/35
M7	10	10	35/49/49
M8	10	60	21/35/35
M9	10	0	28/42/42

regeneration media, varied with the species (Table 2). A total of nine trials (M1–M9) were performed; M1 trial served as a control, whereas trials M2–M9 represented optimization conditions. The results of all nine trials were compared by calculating the number of GRs and ARs produced per 100 anthers. Subsequently, the number of regenerants produced on regeneration media was counted, and the number of GRs and ARs per 100 anthers was calculated. These data were analyzed using the QI Macros230T software, and conditions (CuSO₄ and AgNO₃ concentrations and length of induction step) leading to the maximum production of GRs were identified. The length of induction step included time from plating anthers on induction media to the collection of calli and subsequent transfer to regeneration media. Thus, in Experiment 1, conditions optimal for green plant regeneration *via* androgenesis were determined for all three species. In Experiment 2, optimized conditions were verified by obtaining regenerants from anther cultures. The composition of regeneration media for each species was the same in both experiments.

2.4. Optimizing induction media and plant growth hormones – Experiment 1

Anthers from spikes of donor plants (24 plants per species) were plated on species-specific induction media (Table 1) containing CuSO₄ and AgNO₃ at varying concentrations; the length of induction step was carried out for different durations (Table 2). The procedure for plant regeneration was the same as that described above.

2.5. Verification of induction media – Experiment 2

In Experiment 2, conditions optimized in Experiment 1 were tested for plant regeneration from anthers obtained from 12 donor plants. The primary components of each of the induction media for the regeneration of green plants prepared as indicated in Table 1 contained extra ingredients as in Table 3. The length of induction step was adjusted as given in Table 3. A total of two trials were performed: M10 (control) and M11; trial M11 in barley, wheat and triticale has been

Table 3

Array of factors verified in Experiment 2 according to the Taguchi method.

Trial	Optimized factors		
	Additional components in induction medium		Length of induction step (d)
	CuSO ₄ (μM)	AgNO ₃ (μM)	
M10 (control)	0.1	0	21 (barley), 35 (wheat and triticale)
M11B	10	30	21
M11 W	0.1	60	37
M11 T	10	0	49

referred to as M11B, M11W and M11T, respectively (Table 3). The number of GRs and ARs was calculated as described in Experiment 1.

2.6. Ploidy level

Ploidy of regenerants was analyzed indirectly by comparing plant morphology (plant height and leaf shape) and fertility (seed number) between donor and regenerated plants. The rate of spontaneous diploidization was calculated as follows:

$$\text{Rate of spontaneous diploidization} = \left(\frac{\text{Number of DHs}}{\text{Total number of GRs}} \right) \times 100$$

where the total number of GRs includes DH and haploid plants.

2.7. Statistical analysis

The number of GRs and ARs obtained per 100 anthers in Experiments 1 and 2 was examined for the presence of outliers using the Grubbs' tests. Outliers were removed from further analyses, and data were analyzed using analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's HSD test. The total number of GRs (DH and haploid) and DH regenerants in Experiments 1 and 2 were analyzed *via* linear regression. All calculations were performed using the XLSTAT 2018.1.49205 software.

3. Results

3.1. Obtaining plants

The regeneration of barley, wheat and triticale plants *via in vitro* anther culture resulted in both GRs and ARs. For each species, we evaluated 24 green, mature and fertile DHs that were phenotypically identical to the sources of explants in terms of plant height, leaf shape and fertility. The progeny of regenerants served as donor plants for the optimization (Experiment 1) as well as verification (Experiment 2) of experimental conditions for maximizing the production of GRs.

3.2. Optimizing induction media – Experiment 1

The first calli from barley, wheat and triticale anther cultures in Experiments 1 and 2 became visible after 19, 32 and 35 d, respectively. The embryo-like structures were 2–3 mm in size when transferred to regeneration media, where light conditions successfully discriminated between green and albino structures. Despite the regeneration of albino embryo-like structures, a total of 0.1–14.62 GRs per 100 anthers were obtained among all nine optimization trials (M1–M9) (Table 4). The regeneration of green plants was most difficult in barley, where the number of GRs per trial in Experiment 1 varied from 0.1 (M5) to 2.91 (M7); the corresponding number varied

Table 4

Number of green regenerants (GRs) obtained *in vitro* per 100 anthers of barley, wheat and triticale in Experiment 1.

Trial [†]	Number of GRs per 100 anthers [§]		
	Barley	Wheat	Triticale
M1 (control)	0.64 ^{bc}	5.52 ^{ab}	0.91 ^b
M2	0.67 ^{bc}	7.93 ^{ab}	0.87 ^b
M3	1.09 ^{bc}	14.62 ^a	1.52 ^b
M4	0.45 ^{bc}	14.07 ^{ab}	0.71 ^b
M5	0.10 ^c	5.81 ^{ab}	2.38 ^{ab}
M6	2.12 ^{ab}	4.33 ^b	1.17 ^b
M7	2.91 ^a	4.44 ^{ab}	3.79 ^{ab}
M8	1.77 ^{abc}	10.71 ^{ab}	4.24 ^{ab}
M9	0.54 ^{bc}	5.67 ^{ab}	6.06 ^a

[†] Factors analyzed in various trials (M1–M9) are described in Table 1.

[§] Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$; Tukey's HSD test).

from 4.33 (M6) to 14.62 (M3) in wheat, and from 0.71 (M4) to 6.06 (M9) in triticale. Statistical analysis of these data using ANOVA demonstrated that differences among the number of GRs obtained in Experiment 1 for all three species were significant (Table 5).

According to Tukey's grouping (Table 4), the results of experimental conditions tested among the nine trials varied for barley, wheat and triticale. In barley, M6, M7 and M8 trials grouped together and encompassed the most prospective M7 conditions. The result of M7 trial was several-fold better than that of the M5 trial, which was different from the M6–M8 group. In wheat and triticale, M3 and M9 trials were the most promising (Table 4). However, in wheat the M3 trial was a member of a larger group of trials with the M6 being distinct from the M3 one. In triticale the M9 trial was in the group of encompassing M5, M7 and M8 experimental conditions. In wheat, the number of GRs in M3 trial was 3-fold higher than that in M6. In triticale, the M9 trial produced 8-fold more GRs than the weakest trial (M4). In barley and triticale, the best conditions produced significantly greater number of GRs than control conditions (M1).

3.3. Verification of induction media – Experiment 2

In barley, the Taguchi approach suggested slightly distinct conditions in Experiment 2 than those used in Experiment 1. This difference was because of the addition of AgNO₃ (30 μM) and induction for a minimum time of 21 d (Table 3). In wheat and triticale, concentrations of CuSO₄ and AgNO₃ used were the same as those that produced the highest number of GRs in Experiment 1; however, the length of induction decreased in wheat and increased in triticale, compared with the length of induction in Experiment 1 (Table 3). For all three species, Experiment 2 resulted in a different number of GRs (0.55–7.99) and ARs (0.92–9.10) compared with Experiment 1 (Table 6). In Experiment 2, the lowest and highest numbers of GRs were obtained from triticale [0.55 (M10) and 1.61 (M11)] and wheat [4.95 (M10) and 7.99 (M11)], respectively (Table 6). The number of GRs produced in M11 trial was at least 2-fold higher than that in the M10 (control) for all three species. In parallel to the increase in the number of GRs in Experiment 2, the number of ARs also increased. However, this increase was higher in barley and wheat, and remained at the same level as in triticale compared M10 to M11 in every species.

Despite the differences in numbers of GRs and ARs in Experiment 2, results of ANOVA showed that the model was significant only for the number of GRs produced from triticale (Table 7), and non-significant for ARs from all three species in Experiment 2 (Table 7).

According to the results of Tukey's HSD test, the number of GRs in wheat and barley showed no significant differences between M10 (control) and M11 trials, although this number was 2-fold higher in M11 trial compared with M10 (Table 6). In triticale, the number of GRs in M11 trial was 3-fold higher than that in M10 (Table 6). A similar analysis of ARs failed to identify any significant differences between M10 and M11 trials in all three species. Nonetheless, the number of ARs in M11 trial was increased by ca. 30% in barley and 40% in wheat compared with M10, although no difference was observed in triticale. Within the M11 trial, the number of ARs was 4-fold higher in barley and ca. 2-fold lower in wheat and triticale than the number of GRs. Moreover, analysis of GR/AR ratio under control (M10) and M11 conditions in Experiment 2 showed that the number

Table 5

Analysis of the number of green regenerants (GRs) obtained from anther culture of barley, wheat and triticale genotypes in Experiment 1 using ANOVA.

Species	F-value	p-Value
Barley	5.415	0.0001
Wheat	2.921	0.005
Triticale	3.193	0.002

Table 6

Number of green regenerants (GRs) and albino regenerants (ARs) obtained *in vitro* per 100 anthers of barley, wheat, and triticale in Experiment 2 according to the Taguchi method.

Plants	Trial [†]	Species [§]		
		Barley	Wheat	Triticale
GRs	M10	0.95 ^a	4.95 ^a	0.55 ^b
	M11	1.97 ^a	7.99 ^a	1.61 ^a
ARs	M10	6.45 ^a	2.21 ^a	1.05 ^a
	M11	9.10 ^a	3.67 ^a	0.92 ^a

[†] Factors analyzed in M10 (control) and M11 trials are described in Table 3.

[§] Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.05$; Tukey's HSD test).

of ARs in barley and triticale decreased in M11; however, there was no evident gain in wheat (Table 8).

3.4. Haploids and DHs derived in optimization and verification experiments

Some GRs obtained in Experiments 1 and 2 varied in morphology compared with donor plants. Such regenerants appeared to be haploids. The DH regenerants obtained in Experiments 1 and 2 were identical to donor plants at the morphological level. Based on the number of GRs that appeared fertile, spontaneous duplication varied from 0% (triticale; M3, M6 and M8) to 89% (barley; M5) in Experiment 1, and from 4.65% (wheat; M11) to 50% (barley; M11) in Experiment 2 (Table 9).

Linear regression analysis of the total number of GRs (DH and haploid) and DH regenerants revealed a correlation (r) of -0.525; however, this model was not significant ($F = 2.176$, $p < 0.152$). The coefficient of determination (R^2) was 0.28, suggesting that 28% of the variability among all GRs explained the data for DHs.

4. Discussion

DH plants are a useful tool in plant breeding [44]; these serve as genetically uniform homozygous lines for genetic analysis and modern breeding programs [45,46]. Despite the evident utility of DH lines, many aspects of DH production need improvement. For example, the efficiency of production of GRs needs to be increased in many plant species including cereals such as wheat [47,48], and the number of ARs needs to be reduced [47]. Additionally, the problem of spontaneous diploidization in DHs needs to be resolved [49]. Adjusting the concentrations of chemicals in the induction and regeneration media and fine-tuning the length of induction step have been used for modifying the efficiency of green plant regeneration [50,51]. However, it is highly challenging to test multiple factors simultaneously in one experiment, as this requires several trials. From the experimental point of view, availability of morphologically and genetically uniform and stable regenerants as the starting material is of fundamental importance so that the resulting progeny can serve as a donor of explants.

In this study, care was taken to assure that the starting plant material was highly uniform, at least at the morphological level. Thus, donor plants originated from DH plants. Previous investigations suggest that

Table 7

Analysis of the number of green regenerants (GRs) and albino regenerants (ARs) obtained from anther culture of barley, wheat and triticale genotypes in Experiment 2 using ANOVA.

Plants	Species	F-value	p-Value
GRs	Barley	2.256	0.142
	Wheat	0.814	0.375
	Triticale	12.716	0.001
ARs	Barley	1.357	0.251
	Wheat	0.455	0.505
	Triticale	0.226	0.636

Table 8

Ratio of green regenerants (GRs) to albino regenerants (ARs) produced via anther culture of barley, wheat and triticale genotypes under control (M10) and verified conditions (M11) in Experiment 2.

Experimental conditions	GR:AR		
	Barley	Wheat	Triticale
M10	1:6	1:0.5	1:2
M11	1:4	1:0.5	1:0.5

in some cereals, such as barley, the generative progeny of DH plants is a better choice as a donor of explants, as it is stable both at the genetic and epigenetic levels [45]. Unfortunately, this is not always the case, as evidenced in triticale [52]. Nonetheless, morphological differences among the generative progeny of barley and triticale are not observed [46,53]. This is consistent with the current study as a single cycle of self-pollination would suffice for the production of sufficiently uniform DHs progeny from an individual genotype of barley, wheat and triticale for further experiments dedicated towards increasing the recovery of GRs via anther culture. However, optimization of any *in vitro* tissue culture technique requires several tests. Generally, if several factors need to be optimized, an orthogonal array is used [54]. Here, we decided to employ the Taguchi method, which relies on mathematical regression [34]. The Taguchi method substantially reduced the number of trials needed, diminishing the total number of donor plants required. Thus, instead of 27 trials, only nine trials (including a control) were needed for the simultaneous optimization of CuSO₄ and AgNO₃ concentrations in the induction medium and the length of induction step.

Optimization of conditions in Experiment 1 demonstrated that all tested factors (CuSO₄ and AgNO₃ concentrations and the length of induction step) were essential for the regeneration of green plants. Moreover, each of the three species tested (barley, wheat and triticale) exhibited different requirements for different levels of each factor used in Experiment 1.

Among the nine trials performed, conditions used in M7 trial appeared to be the most promising for the production of GRs in barley, while those used in the M5 trial were the worst. In the M7 trial, 10 μM each of CuSO₄ and AgNO₃ was added to the induction medium, whereas in the M5 trial, which produced the lowest number of GRs, only 5 μM CuSO₄ was added to the induction medium (without AgNO₃); the length of induction step was the same in M5 and M7 trials. Comparison of the number of GRs suggests the beneficial effect of CuSO₄ and adverse influence of AgNO₃ on green plant regeneration. The effect of the addition of CuSO₄ (10–80 μM) to liquid pre-treatment medium or culture medium on green plant regeneration from barley anther culture has been examined previously [12]. Although the number of GRs in our study (0.1–2.91)

Table 9

Percentage of spontaneous diploidization among green regenerants (GRs) derived from anther culture of barley, wheat and triticale genotypes in Experiments 1 and 2.

Trial ^a	Spontaneous diploidization (%)			
	Barley	Wheat	Triticale	
M1 (control)	56.82	12.82	5.88	
M2	64.29	16.67	27.27	
M3	42.86	2.94	0.00	
M4	50.00	3.03	33.33	
Experiment 1	M5	88.89	6.45	44.00
	M6	53.33	2.00	0.00
	M7	45.45	15.15	20.00
	M8	55.00	25.71	0.00
	M9	85.71	16.67	10.00
Experiment 2	M10 (control)	56.82	11.39	64.29
	M11	50	4.65	40

^a Factors analyzed in various trials performed in experiment 1 (M1–M9) and experiment 2 (M10–M11) are described in Tables 2 and 3, respectively.

was lower than that in the study of Jacquard et al. [12] (0–106.6), the increase in the number of regenerated plants was observed. It should be stressed that the concentration of CuSO₄ in culture medium cannot be increased endlessly; at concentrations >80 μM, microspore embryogenesis is completely inhibited [12]. Additionally, Makowska et al. [10] reported an increase in the number of GRs in barley via isolated microspore culture in the presence of 10 μM CuSO₄. These data are congruent with the results of Experiment 1 in this study, suggesting that 10 μM CuSO₄ is ideal for maximizing the production of GRs. Nevertheless, there are discrepancies in the number of GRs between our results and those of others. We obtained fewer GRs (0.1–2.91) than Jacquard and co-workers (0–106.6) [12]. This incongruity could be due to the difference in genotypes used, as the genotype affects the ability of androgenesis [55]. Additionally, differences could have originated from poor reproducibility under *in vitro* culture conditions. This possibility is supported by the presence of outliers in our experiments that were removed from data analysis to avoid misinterpretations. The highest number of GRs was obtained in the presence of 10 μM each of CuSO₄ and AgNO₃. Thus, the highest supplementation of AgNO₃ (60 μM) alone did not guarantee the best production of GRs (M3). Notably, none of the AgNO₃ concentrations (0–60 μM; M1, M2 and M3) in the presence of lowest CuSO₄ concentration led to an increase in the number of GRs. In barley, the highest number of GRs was obtained at the maximum concentration of CuSO₄ (10 μM) and moderate concentration of AgNO₃ (10 μM) examined. Interestingly, the barley genotype used in this study seems to prefer an average length of induction compared with the control. Although the reason for this observation is not apparent, we speculate that very short duration of induction is not sufficient for the regeneration of a high number of green plants, whereas prolonged induction may be toxic to barley anther cultures or may make the medium toxic.

In wheat, M3 and M4 trials produced a greater number of GRs than M6 and M7 trials, suggesting that wheat prefers the lowest CuSO₄ (0.1 μM) concentration and the highest AgNO₃ (60 μM) concentration, in conjunction with extended length of induction step. If the concentrations of CuSO₄ were increased and AgNO₃ were decreased, the quantity of regenerants was reduced. Similarly the higher concentration of AgNO₃ (15–30 μM) in tested variant than in control increased the frequency of embryoid formation in three out of four genotypes studied [25]. In light of the known effects of Cu²⁺ ions, it is unclear why wheat prefers low rather than high CuSO₄ concentration in the induction medium. It is possible that anther cultures of wheat, or specifically of the winter wheat genotype Svilena, are more sensitive to Cu²⁺ ion toxicity. Different reactions of other wheat genotypes towards the presence of Cu²⁺ ions have been observed in *in vitro* cultures, supporting the latter hypothesis [56,57]. The androgenic response of wheat genotypes to CuSO₄ appears to be broad (0.1–100 μM). Purnhauser and Gyulai [58] reported that in the presence of 100 μM CuSO₄, the mean shoot number per regenerating callus was the same as that in the presence of 10 μM CuSO₄. In wheat regeneration in Experiment 1, intermediate (and extended) length of induction step produced better results than that used in the control trial (M1), similar to that in barley. Thus, extended length of induction step strengthens the action of components in the induction medium.

In triticale, conditions of the M9 trial favored the production of GRs, whereas those of the M4 trial did not. Thus, the highest concentration of CuSO₄ and absence of AgNO₃ in anther culture induction medium promotes the production of GRs from triticale, whereas intermediate CuSO₄ and high AgNO₃ concentrations reduce the number of GRs. The length of induction step seemed to have no significant effect on the production of GRs. However, Purnhauser and Gyulai [58] reported that concentrations of CuSO₄ (0–100 μM) and AgNO₃ (1–100 μM) affect the number of regenerated shoots and roots in triticale. The authors showed that CuSO₄ enhances shoot regeneration, with the highest regeneration within the 0.1–1 μM range. At a concentration of 10 μM

CuSO₄, the average number of shoots regenerated per callus decreased. Further increase in CuSO₄ concentration (up to 100 µM) resulted in a further decrease in the number of regenerated shoots. These results on triticale shoot regeneration are consistent with the production of green plants from triticale anther culture. Interestingly, a wide range of AgNO₃ concentrations (1–100 µM) has been shown to improve shoot regeneration in triticale compared with the control lacking Ag⁺ ions and containing Cu²⁺ ions at a low concentration [58]. However, better shoot producing calli are observed in triticale at 1–10 µM AgNO₃ than at 100 µM AgNO₃. In our experiments, the presence of AgNO₃ reduced the number of green plants, when the concentration of CuSO₄ was 0.1–5 µM. By contrast, AgNO₃ slightly affected green plant regeneration if the concentration of CuSO₄ was high (M7, M8 trials). These results suggest that at least at high CuSO₄ concentrations, AgNO₃ has limited effects on green plant and shoot regeneration in triticale. The effect of the length of induction step on green plant regeneration from triticale anther culture was similar to that in other crop species.

Our results suggest that triticale and barley have similar requirements for CuSO₄ but different preferences for AgNO₃ in the induction media. The requirement of wheat for CuSO₄ and AgNO₃ was different from that of barley and triticale. We suggest that the distinct preferences of the three species for CuSO₄ and AgNO₃ concentrations stem from different mechanisms of induction of plant regeneration in *in vitro* anther cultures among these species. However, these mechanisms remain unclear and need further investigation. Moreover, it is not clear why, in all three species, longer induction resulted in a higher number of GRs than shorter induction. While it was not the goal of the present study, it would be of value to better understand the action of the studied factors on biochemical processes involved in green plant regeneration in the three species.

The Taguchi approach allowed the identification of optimized conditions necessary for increasing the production of GRs. However, the number of GRs obtained in Experiment 2 was suboptimal compared with that those in Experiment 1 for all three species. This difference may be due to uncontrollable factors that affect *in vitro* tissue culture [59,60]. To avoid this problem, biological replicates are performed. However, because of the shortage of donor plants and for reducing the experiment size, we could not perform biological replicates. Instead, we removed outliers and used statistics to predict *in vitro* culture conditions optimal for the generation of GRs.

Using the Taguchi method, the same induction media composition was identified as optimum for producing GRs from wheat and triticale in Experiment 1, although there were differences in the length of induction step between the two species. The verification conditions used for barley in Experiment 2 indicated that higher AgNO₃ concentration and shorter induction than that determined in Experiment 1 resulted in a suboptimal number of GRs. Such outcomes are not expected using the Taguchi approach. This cannot be attributed to poor reproducibility of *in vitro* culture trials, as we excluded outliers from data analysis. Moreover, control conditions in the Experiments 1 and 2 used for barley, wheat and triticale were identical. Notably, most of the changes in investigated factors suggested by the Taguchi approach affected the length of induction step in all three species and resulted in a suboptimal number of green plants, compared with the optimisation conditions in Experiment 1. Thus, either the method failed to optimize time, or we did not choose the correct length of induction step in Experiment 1. Alternatively, the length of induction step might be the most problematic issue itself, and needs further investigation. Nonetheless, in all three species, verification conditions resulted in 2–3-fold higher number of GRs than the respective control conditions (Table 6). Others have also reported a difference in the number of GRs between optimized and control conditions, although this difference is not always significant [10]. This is consistent with our data obtained in M10 and M11 trials (Experiment 2) for barley and wheat but not for triticale, as indicated

by ANOVA (Table 8). Therefore, removing outliers from data analyses may not lead to the evaluation of the best results during verification using the Taguchi method. Nevertheless, this approach proved to be useful and should be the method of choice in multifactorial optimization experiments, with limited availability of experimental material.

Optimization of conditions for maximizing the production of GRs reduced the number of ARs in barley and triticale, but not in wheat. The obtained data, at least in barley and triticale, could be explained by the action of CuSO₄. A positive effect on the production on GRs vs ARs was observed in barley when added CuSO₄ to the regeneration media [61] and to pre-treatment solutions [17]. Such supplementation seems to be a general rule when regeneration is performed *via* androgenesis [58]. Additionally, in wheat, CuSO₄ has been reported to increase the number of GRs and reduce the number of ARs [62], but this was not observed in our experiments. Since the only difference between control trial (M10) and other trials in Experiment 2 for wheat was related to the length of induction, we speculate that prolonged induction does not affect the GR/AR ratio. The lack of evident reduction in the number of ARs may be due to poor reproducibility of *in vitro* tissue cultures or the lack of a sufficient number of biological repeats.

In all three species, spontaneous diploidization observed in Experiment 2 was lower than that observed in the respective controls (M10) (Table 9). In Experiment 1, the best results for barley were obtained at low CuSO₄ concentration, no AgNO₃ and 35 days of induction step. However, the Taguchi approach suggested that increasing the concentrations of both CuSO₄ and AgNO₃ (Table 3) and shortening the induction period to 21 days would lead to suboptimal results. Thus, modifications suggested by the method negatively influenced spontaneous diploidization. The same was true in wheat, where optimization conditions were comparable with the best verification conditions for media composition but were different for the length of induction and resulted in a low rate of spontaneous diploidization (Table 9). In triticale, spontaneous diploidization was lower in Experiment 2 compared with Experiment 1, although AgNO₃ and CuSO₄ concentrations in the induction medium in both experiments were the same. The difference between the experiments for triticale reflected the prolonged induction step in Experiment 2. Thus, in our study, conditions for reducing spontaneous diploidization were incongruent with those for increasing the production of GRs. This is inconsistent with the study of Mirzaei et al. [63] in wheat; the authors reported a negative relationship between embryogenesis and spontaneous diploidization. It should be stressed, however, that our aim was not to increase the number of DHs but to generate more green plants, as spontaneous genome duplication is not a problem in barley and triticale.

An encouraging highlight of our study was the relationship between the total number of GRs (DH and haploid) and DHs. Based on optimized conditions and linear regression data, we noted that the total number of GRs contrasted the number of spontaneously originated DHs. Our results suggest that this phenomenon is unique to cereals, which to the best of our knowledge has not been reported previously. Possibly, the presence of CuSO₄ or AgNO₃ influences spontaneous chromosome doubling. Regardless, an increase in the number of GRs is preferred, as DH plants may be easily generated using antimetabolic agents; the greater the number of GRs, the higher the number of potential DHs.

5. Conclusion

Optimization of *in vitro* anther cultures of barley, wheat and triticale using the Taguchi approach enabled the identification of regeneration conditions that favor an increase in the number of GRs compared with control conditions. The Taguchi method reduced the number of experiments needed from 27 to 9, even though three factors were tested at three levels each. Since our goal was to obtain green plants

from *in vitro* anther culture, we tested the effect of CuSO_4 and AgNO_3 concentrations and the length of induction. All three species showed distinct responses towards the concentration of salts in the induction medium and length of induction step. The optimized regeneration conditions showed that with an increase in the number of GRs, the number of DHs decreased. Moreover, under optimized conditions, the GR/AR ratio decrease in barley and triticale. Optimized conditions appeared to be the best compared with those used for the optimization; this difference could be the result of changes in the length of induction, as it was the most discriminating factor between controls and optimized conditions. Alternatively, differences could be attributed to unknown factors in tissue culture. Overall, we conclude that the Taguchi approach could be successfully used for the simultaneous optimisation of multiple factors affecting *in vitro* anther culture.

Financial support

This study was performed within project no. HORhn-801-PB-22/15-18 funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development (Poland). Spectroradiometer was financed by the grant NCBiR-PBS3/B8/19/2015 (Poland).

Conflict of interest

The authors declare no competing interests.

References

- [1] Dubas E, Custers J, Kieft H, et al. Microtubule configurations and nuclear DNA synthesis during initiation of suspensor-bearing embryos from *Brassica napus* cv. Topas microspores. *Plant Cell Rep* 2011;30(11):2105–16. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1117-8>. 21779827.
- [2] Tenhola-Roininen T, Tanhuanpää P, Immonen S. The effect of cold and heat treatments on the anther culture response of diverse rye genotypes. *Euphytica* 2005; 145(1–2):1–9. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000400016>.
- [3] Bal U, Elliatioglu S, Abak K. Induction of symmetrical nucleus division and multi-nucleate structures in microspores of eggplant (*Solanum melongena* L.) cultured *in vitro*. *Sci Agric* 2009;66(4):535–9. <https://doi.org/10.1590/S0103-90162009000400016>.
- [4] Li JR, Zhuang FY, Qu CG, et al. Microspore embryogenesis and production of haploid and doubled haploid plants in carrot (*Daucus carota* L.). *Plant Cell Tiss Org Cult* 2012; 112(3):275–87. <https://doi.org/10.1007/s11240-012-0235-5>.
- [5] Makowska K, Oleszczuk S. Albinism in barley androgenesis. *Plant Cell Rep* 2014;33(3):385–92. <https://doi.org/10.1007/s00299-013-1543-x>. 24326697.
- [6] Esteves P, Clermont I, Marchand S, et al. Improving the efficiency of isolated microspore culture in six-row spring barley: II—Exploring novel growth regulators to maximize embryogenesis and reduce albinism. *Plant Cell Rep* 2014;33(6):871–9. <https://doi.org/10.1007/s00299-014-1563-1>. 24519013.
- [7] Sriskandarajah S, Sameri M, Lerceteau-Köhler E, et al. Increased recovery of green doubled haploid plants from barley anther culture. *Crop Sci* 2015;55(6):2806. <https://doi.org/10.2135/cropsci2015.04.0245>.
- [8] Wojnarowicz G, Caredda S, Devaux P, et al. Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. *J Plant Physiol* 2004;161:747–55. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-01061>. 15266723.
- [9] Slama-Ayed O, De Buyser J, Picard E, et al. Effect of pre-treatment on isolated microspores culture ability in durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. durum Desf.). *J Plant Breed Crop Sci* 2010;2(2):30–8.
- [10] Makowska K, Oleszczuk S, Zimny J. The effect of copper on plant regeneration in barley microspore culture. *Czech J Genet Plant Breed* 2017;53(1):17–22. <https://doi.org/10.17221/82/2016-cjgpb>.
- [11] Abdollahi MR, Shirin R. Production and conversion of haploid embryos in chickpea (*Cicer arietinum* L.) anther cultures using high 2,4-D and silver nitrate containing media. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2018;133(1):39–49. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1359-4>.
- [12] Jacquard C, Nolin F, Hecart C, et al. Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: Effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Rep* 2009;28(9):1329–39. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0733-z>. 19529940.
- [13] Echavarri B, Soriano M, Cistué L, et al. Zinc sulphate improved microspore embryogenesis in barley. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2008;93(3):295–301. <https://doi.org/10.1007/s11240-008-9376-y>.
- [14] Germanà MA, Crescimanno FG, Motisi A. Factors affecting androgenesis in *Citrus clementina* Hort. ex Tan. *Advances in Horticultural Science* 2000;14(2):43–51.
- [15] Penarrubia L, Romero P, Carrio-Segui A, et al. Temporal aspects of copper homeostasis and its crosstalk with hormones. *Front Plant Sci* 2015;6:255. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00255>. 25941529.
- [16] Festa RA, Thiele DJ. Copper: An essential metal in biology. *Curr Biol* 2011;8(21): 877–83. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2011.09.040>. 22075424.
- [17] Wojnarowicz G, Jacquard C, Devaux P, et al. Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci* 2002;162:843–7. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00036-5).
- [18] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plantarum* 1962;15:473–97. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>.
- [19] Wu LM, Wei YM, Zheng YL. Effects of silver nitrate on the tissue culture of immature wheat embryos. *Russ J Plant Physiol* 2006;53(4):530–4. <https://doi.org/10.1134/S1021443706040157>.
- [20] Jha AK, Dahleen LS, Suttle JC. Ethylene influences green plant regeneration from barley callus. *Plant Cell Rep* 2007;26:285–90. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0252-0>. 17043878.
- [21] Würschum T, Tucker MR, Maurer HP, et al. Ethylene inhibitors improve efficiency of microspore embryogenesis in hexaploid triticale. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2015;122(3):751–7. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0808-1>.
- [22] Tiainen T. Influence of ethylene in microspore embryogenesis. In: Jain SM, Sopory SK, Veilleux RE, editors. *In vitro haploid production in higher plants*. Current plant science and biotechnology in agriculture/Dordrecht: Springer; 1996. p. 177–87. https://doi.org/10.1007/978-94-017-1860-8_10.
- [23] Paladi RK, Rai AN, Penna S. Silver nitrate modulates organogenesis in *Brassica juncea* (L.) through differential antioxidant defense and hormonal gene expression. *Sci Hortic* 2017;226:261–7. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.038>.
- [24] Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M, et al. Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana glauca* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO_3 . *Plant Cell Rep* 1987;6(1):1–4. <https://doi.org/10.1007/bf00269725>. 24248436.
- [25] Ghaemi M, Sarrafi A, Alibert G. The effects of silver nitrate, colchicine, cupric sulfate and genotype on the production of embryos from anthers of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1994;36:355–9. <https://doi.org/10.1007/BF00046093>.
- [26] Islam SM, Tuteja N. Enhancement of androgenesis by abiotic stress and other pre-treatments in major crop species. *Plant Sci* 2012;182:134–44. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2011.10.001>. 22118624.
- [27] Ladyżyński M, Burza W, Malepszy S. Relationship between somaclonal variation and type of culture in cucumber. *Euphytica* 2002;125:349–56. <https://doi.org/10.1023/A:1016017825907>.
- [28] Rival A, Ilbert P, Labeyrie A, et al. Variations in genomic DNA methylation during the long-term in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep* 2013;32:359–68. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1369-y>. 23179461.
- [29] López CMR, Bravo HS, Wetten AC, et al. Detection of somaclonal variation during cocoa somatic embryogenesis characterised using cleaved amplified polymorphic sequence and the new freeware Artbio. *Mol Breeding* 2010;25(3):501–16. <https://doi.org/10.1007/s11032-009-9348-x>.
- [30] Abe T, Li N, Togashi A, et al. Large deletions in chloroplast DNA of rice calli after long-term culture. *J Plant Physiol* 2002;159:917–23. <https://doi.org/10.1078/0176-1617-00815>.
- [31] Mozhgova GV, Zaitseva OI, Lemesh V. Structural changes in chloroplast genome accompanying albinism in anther culture of wheat and triticale. *Cereal Res Commun* 2012;40(4):467–75. <https://doi.org/10.1556/CRC.40.2012.0007>.
- [32] Rao RS, Kumar CG, Prakasham RS, et al. The Taguchi methodology as a statistical tool for biotechnological applications. *Biotechnol J* 2008;3:510–23. <https://doi.org/10.1002/biot.200700201>. 18320563.
- [33] Collins LM, Dziak JJ, Li R. Design of experiments with multiple independent variables: A resource management perspective on complete and reduced factorial designs. *Psychological methods* 2009;14(3):202–24. (<https://doi.org/10.1037/a0015826> PMID: 19719358).
- [34] Taguchi G. In: U., editor. *Introduction to quality engineering*. White Plains: NY: Asian Productivity Organization; 1986. p. 191.
- [35] Daneshvar N, Khataee AR, Rasoulifard MH, et al. Biodegradation of dye solution containing malachite green: optimization of effective parameters using Taguchi method. *J Hazard Mater* 2007;143:214–9. <https://doi.org/10.1016/j.jhazmat.2006.09.016>. 17052836.
- [36] Tanfous NGB, Kallel H, Jarboui MA, et al. Expression of *Pichia pastoris* of a recombinant scFv form of MAb 107, an anti human CD11b integrin antibody. *Enzyme Microb Technol* 2006;38:636–42. <https://doi.org/10.1016/j.enzmictec.2005.07.014>.
- [37] Sirisansaneeyakul S, Luangpipat T, Vanichsrirata W, et al. Optimization of lactic acid production by immobilized *Lactococcus lactis* 10-1. *J Ind Microbiol Biotechnol* 2007;34:381–91. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0208-6>. 17318489.
- [38] Ramakrishna U, Kingston JJ, Sripathi MH, et al. Taguchi optimization of duplex PCR for simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* and *Clostridium perfringens* alpha toxins. *FEMS Microbiol Lett* 2013;340(2):93–100. <https://doi.org/10.1111/1574-6968.12070>. 23278425.
- [39] Wang GG, Deb S, Dos Santos Coelho L. Earthworm optimisation algorithm: A bio-inspired metaheuristic algorithm for global optimisation problems. *Int J Bio-Inspir Com* 2018;12(1):1–22. <https://doi.org/10.1504/IJBIC.2015.10004283>.
- [40] Wang GG, Deb S, Gao X, et al. A new metaheuristic optimisation algorithm motivated by elephant herding behaviour. *Int J Bio-Inspir Com* 2016;8(6):394–409. <https://doi.org/10.1504/IJBIC.2016.081335>.
- [41] Tyrka M, Oleszczuk S, Rabiza-Swider J, et al. Populations of doubled haploids for genetic mapping in hexaploid winter triticale. *Mol Breeding: new strategies in plant improvement* 2018;38(4):46. <https://doi.org/10.1007/s11032-018-0804-3>. PMID:29623004.
- [42] Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J. Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (*Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep* 2004;22:885–93. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0796-9>.
- [43] Chu CC. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. *Proc. Symp. Plant Tissue Culture* 25–30 May 1978. Pekin: Science Press; 1978. p. 43–50.

- [44] Germanà MA. Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2010;104(3):283–300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>.
- [45] Bednarek PT, Orłowska R, Koebner RMD, et al. Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biology* 2007;7(10). (<https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-10> PMID: 17335560).
- [46] Machczyńska J, Zimny J, Bednarek P. Tissue culture-induced genetic and epigenetic variation in triticale (\times *Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. *Plant Mol Biol* 2015;89(3):279–92. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0368-0>. 26337939.
- [47] Lantos C, Pauk J. Anther culture as an effective tool in winter wheat (*Triticum aestivum* L.) breeding. *Russ J Genet* 2016;52(8):794–801. <https://doi.org/10.1134/S102279541608007x>.
- [48] Bokore FE, Knox RE, Cuthbert RD, et al. Effects of media supplements on doubled haploid production in durum wheat. *Can J Plant Sci* 2016;97(1):65–71. <https://doi.org/10.1139/cjps-2016-0066>.
- [49] Castillo AM, Cistué L, Vallés MP, et al. Chromosome doubling in monocots. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM, editors. *Advances in haploid production in higher plants*. Dordrecht: Springer; 2009. p. 329–38. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8854-4_27.
- [50] Puolimatka M, Pauk J. Effect of induction duration and medium composition on plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Plant Physiol* 2000;156:197–203. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(00\)80306-5](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(00)80306-5).
- [51] Chen QF, Wang CL, Lu YM, et al. Anther culture in connection with induced mutations for rice improvement. *Euphytica* 2001;120(3):401–8. <https://doi.org/10.1023/a:1017518702176>.
- [52] Machczyńska J, Orłowska R, Mańkowski DR, et al. DNA methylation changes in triticale due to *in vitro* culture plant regeneration and consecutive reproduction. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2014;119(2):289–99. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0533-1>.
- [53] Orłowska R, Machczyńska J, Oleszczuk S, et al. DNA methylation changes and TE activity induced in tissue cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Biol Res-Thessalon* 2016;23:19. <https://doi.org/10.1186/s40709-016-0056-5>. PMID: 27508170.
- [54] EL-Moslamy SH, Elkady MF, Rezk HA, et al. Applying Taguchi design and large-scale strategy for mycosynthesis of nano-silver from endophytic *Trichoderma harzianum* SYA.F4 and its application against phytopathogens. *Sci Rep-UK* 2017;7:45297. <https://doi.org/10.1038/srep45297>. PMID: 28349997.
- [55] Devaux P, Kasha KJ. Overview of barley doubled haploid production. In: Touraev A, Forster BP, Jain SM, editors. *Advances in haploid production in higher plants*. Dordrecht: Springer; 2009. p. 47–63.
- [56] Grauda D, Mikelsone A, Lisina N, et al. Anther culture effectiveness in producing doubled haploids of cereals. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences, Section B: Natural, Exact, and Applied Sciences* 2014;68(3–4):142–7. <https://doi.org/10.2478/prolas-2014-0016>.
- [57] Dahleen LS. Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell, Tiss Organ Cult* 1995;43(3):267–9.
- [58] Purnhauser L, Gyulai G. Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures *Plant Cell Tiss Organ Cult* 1993;35(2):131–9. <https://doi.org/10.1007/bf00032962>.
- [59] Datta SK. Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Curr Sci* 2005;89(11):1870–8.
- [60] Tyankova N, Zagorska N. Factors affecting *in vitro* androgenesis in cereals. *Int J Plant Dev Biol* 2008;2(1):59–78.
- [61] Nuutila AM, Hämäläinen J, Mannonen L. Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci* 2000;151:85–92. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00202-2](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00202-2).
- [62] Brew-Appiah RAT, Ankrah N, Liu W, et al. Generation of doubled haploid transgenic wheat lines by microspore transformation. *PLoS ONE* 2013;8(11):e80155. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0080155>. 24260351.
- [63] Mirzaei M, Kahrizi D, Rezaei A. Androgenesis and spontaneous chromosome doubling in *Hordeum vulgare* L. Researches of the First International Conference. Babylon and Razi Universities; 2011. p. 248–52.
- [64] Kumlehn J, Serazetdinova L, Hensel G, et al. Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol J* 2006;4(2):251–61. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x>. 17177801.
- [65] Wang P, Chen Y. Preliminary study on production of high of pollen H2 generation in winter wheat grown in the field. *Acta Agron Sin* 1983;9:283–4.
- [66] Zhuang JJ, Xu J. Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu H, Vega MR, editors. *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Beijing: Science Press; 1983.

dr inż. Renata Orłowska
prof. dr hab. Piotr T. Bednarek

.....
Imię i nazwisko

Radzików, 31.08.2022

.....
Miejscowość i data

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
-Państwowy Instytut Badawczy
Radzików
05-870 Błonie
.....

Afiliacja

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE PRACY WIELOAUTORSKIEJ

Oświadczam, że w pracy:

Pachota K.A., Orłowska, R.,* Bednarek, P.T. (2022) **Medium composition affects the tissue culture-induced variation in triticale regenerants**. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 151: 35-46, doi:10.1007/s11240-022-02327-z

dr inż. Renata Orłowska: Mój udział polegał na: sformułowaniu problemu badawczego, planowaniu badań, uzyskaniu materiału roślinnego, analizie danych, przygotowaniu manuskryptu do druku oraz na przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział szacuję na 10%.

.....
Renata Orłowska

Podpis

Prof. dr hab. Piotr T. Bednarek: Mój udział dotyczył sformułowania problemu badawczego, planowania badań, analizy wyników oraz pisania manuskryptu. Mój udział szacuję na 10%.

.....
Piotr T. Bednarek

Podpis



Medium composition affects the tissue culture-induced variation in triticale regenerants

Katarzyna A. Pachota¹ · Renata Orłowska¹ · Piotr T. Bednarek¹

Received: 1 July 2021 / Accepted: 17 May 2022
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Nature B.V. 2022

Abstract

Obtaining doubled haploids of triticale is urgently needed to reduce the time and cost of new varieties' development. Therefore, the acquisition of doubled haploid lines in tissue culture should be based on efficient regeneration methods and lead to highly homozygous materials. Therefore, in this study, we investigated the effect of Cu²⁺ (0.1, 5, 10 μM) and Ag⁺ (0, 2, 10 μM) ions and the time (35, 42, 49 days) of explant incubation on induction media on tissue culture-induced variation, which may affect the genetic homogeneity of the regenerants. And also, it was checked whether manipulating the in vitro conditions can affect the level of variation in the obtained regenerants. The methylation sensitive Amplified Fragment Length Polymorphism results revealed a high level of tissue culture-induced variation (51%). At the same time, the average sequence variation was 43%, demethylation was 5%, and de novo methylation was 3%. Among the tested nine various conditions (T1–T9), different levels of variation were observed depending on the modification of the medium. The test to determine the level of changes depending on the methylation context showed that the most changes are located in the areas of symmetric contexts CG and CHG. Still, the asymmetric context (CHH) has the slightest changes. Our study revealed a relationship between medium composition and the changes observed between triticale donor plants and their regenerants. Both changes in DNA sequence and its methylation may be dependent on the culture conditions. It seems that the results obtained may give rise to studies aimed at obtaining regenerants with the desired direction of variation (lowest, highest) generated by plant tissue culture.

Key message

The gaining triticale haploids under modified in vitro culture conditions have shown a relationship between the composition of the medium and the changes observed between triticale donor plants and their regenerants.

Keywords Triticale · Androgenesis · Copper · Silver · Optimization · Genetic variation · metAFLP

Abbreviations

DH	Doubled haploid
DMV	Demethylation
DNMV	De novo methylation
metAFLP	Methylation sensitive amplified fragment length polymorphism
PIC	Polymorphic index content
SV	Sequence variation
TCIV	Tissue culture-induced variation

Introduction

The progress that has been made in recent years in tissue culture is associated with an increase in the yield of green regenerants (Dreger et al. 2019; Hossein Pour et al. 2020; Klimek-Chodacka et al. 2020), an improvement of ploidy manipulation e.g., chromosome doubling (Kasha 2005; Ślusarkiewicz-Jarzina et al. 2017; Touchell et al. 2020), and with an rise in the knowledge of the mechanisms participating during plant regeneration (Ichihashi et al. 2020; Ikeuchi et al. 2018; Lee and Seo 2018; Pasternak and Dudits 2019). One of the difficulties faced is the existence of tissue culture-induced variation (TCIV) (Machczyńska et al. 2014) in regenerants, sometimes interchangeably called somaclonal variation (Ghosh et al. 2021). The TCIV may be manifested at morphological (Cao et al. 2016; Eeckhaut et al. 2020),

Communicated by Sergio J. Ochatt.

✉ Renata Orłowska
r.orłowska@ihar.edu.pl

¹ Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute, Radzików, 05-870 Błonie, Poland

biochemical (Filipecki et al. 2006), organellar (Ballesteros et al. 2009; Schmidt et al. 1996), and DNA (Aydin et al. 2016; Orłowska 2021) levels.

Tissue culture-induced variation is a complex phenomenon (Bednarek and Orłowska 2020b; Krishna et al. 2016) displayed at both genetic and epigenetic levels concerning the DNA of regenerants (Coronel et al. 2018; Fiuk et al. 2010; Mikuła et al. 2011). During plant regeneration when the explants are isolated microspores or anthers, reprogramming of the developmental pathway from gametophytic to sporophytic occurs (Chege et al. 2020; Hale et al. 2020; Marschin et al. 2005). This reprogramming is associated with a change in DNA methylation status (de novo methylation and demethylation); hence, such changes identified in the DNA of regenerants may impact TCIV. Moreover, methylation pattern alterations (DNA demethylation) may resonate with sequence variation (SV) (Bednarek and Orłowska 2020a) and such actions may be partly controlled by ingredients of in vitro tissue cultures (Kumlehn et al. 2006; Makowska et al. 2017a; Menke-Milczarek and Zimny 2001; Oleszczuk et al. 2006) involving the appropriate balance of ions and the maintenance of a proper time regime. Such ingredients may influence biochemical pathways and may contribute to the cell fate (Bustillo-Avenidaño et al. 2018; Ikeda-Iwai et al. 2003; Kiyosue et al. 1990; Pěňčík et al. 2015). They may also result in improved plant regeneration (Makowska et al. 2017b; Sakina et al. 2020; Warchoł et al. 2021). Among the many ions tested in culture media, copper and silver are particularly noteworthy and have been documented to have positive effects on plant regeneration (Kaur and Kumar 2020; Kumar et al. 2009; Orłowska et al. 2020; Wojnarowicz et al. 2002). Enrichment of in vitro culture media with copper ions resulted primarily in increased green plant regeneration (Dahleen 1995; Jacquard et al. 2009). It could be due to microspore's survival improvement (Wojnarowicz et al. 2002), densification of the number of plastids in cells, accumulation of starch grains in microspores, and induction of amyloplasts transforming into proplastids followed by chloroplasts development (Jacquard et al. 2009). Unlike copper, silver ions added to in vitro culture media indirectly affect plant regeneration due to the physicochemical properties of silver being an ethylene inhibitor (Jha et al. 2007; Kumar et al. 2009). The good solubility, availability, and stability of AgNO_3 predisposes this compound as a supplement to in vitro culture media (Kumar et al. 2009). AgNO_3 mediates ethylene inhibition and reverses growth inhibition of cultures (Lemos and Blake 1996). Silver ions improve callus formation (Fei et al. 2000; Hayta et al. 2016) and facilitate shoot multiplication (Hassanein et al. 2018; Purnhauser et al. 1987; Sarropoulou et al. 2016). Positive effects of silver have also been reported for regeneration and in vitro rooting (Jha et al. 2007; Wu et al. 2006; Würschum et al. 2015) and on anther culture of strawberry (Shahvali-Kohshour et al.

2013). Silver ions also counteracted callus necrosis (Wu et al. 2006) and had a modulatory effect on organogenesis (Paladi et al. 2017).

Another factor that influences plant regeneration and somaclonal variation is the time of in vitro culture. The longer the time of in vitro culture and the more passages are done, the higher the level of changes observed (Bairu et al. 2006; Deepthi 2018; Etienne and Bertrand 2003). It was documented that changes affecting DNA methylation in regenerants may be related to time on the tissue culture run (Bednarek and Orłowska 2020c; Rival et al. 2013).

Even though silver and copper ions are readily used in plant tissue cultures and are present in many biochemical pathways (Puchkova et al. 2019), little is known about their role in the TCIV in triticale. There is also a lack of broader evidence regarding the effect of time on triticale plant regeneration through the androgenesis pathway in anther cultures. Hence, a study was undertaken to evaluate Cu and Ag ions' effect on variation in triticale regenerants. The importance of triticale has been enlarged in recent years, reflected in the increasing area harvested from 467 ha previously recorded in 1975 to almost four mln ha of worldwide area in 2019 (3.8 mln ha) (FAO 2019). Due to its adaptation to various environmental conditions, triticale is a viable alternative crop that performs better than wheat on poor quality soils (Ayalew et al. 2018) and is more resistant to typical cereal fungal diseases (Ablova 1997).

The study aims to evaluate the role of copper and silver ions and time on the tissue culture-induced variation that arises during triticale plant regeneration in anther cultures.

Materials and methods

Donor plants regeneration

Winter triticale (*X Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) cultivar T28/2 derived from cv. Mungis × cv. Presto cross was provided by Sylwia Oleszczuk (Plant Breeding and Acclimatization Institute-National Research Institute, Radzików, Poland). Mature, dry seeds of initial triticale plants were surface-sterilized with 10% aqueous solution of sodium hypochlorite for 10 min, rinsed three times with distilled water, placed on wet filter paper in Petri dishes and left for 24 h at 4 °C and next left for 24 h in a room temperature. Sprouted seeds were put into seedling starting trays filled with soil and sand (3:1). Plants were grown under controlled conditions in a growth chamber at 16/12 °C (day/night) regime until the 4th leaf was fully formed. Photoperiod (16 h/8 h; light/dark) and light intensity ($190 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) was maintained using high-pressure sodium lamps. Next, seedlings were vernalized at 4 °C for 6 weeks under short-day photoperiod (8 h/16 h) in $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity.

After vernalization, plants were potted into pots filled with a soil-sand mixture and grown in greenhouse conditions. During the vegetative stage, plants were watered twice a week with soluble fertilizer (Florovit).

Tillers of initial triticale plants were ready to harvest when most of the microspores were mid to the uninucleate stage. The developmental stage of microspores was estimated by acetic carmine staining. Collected tillers were wrapped in plastic bags and stored for 20 days at 4 °C in the dark in jars with water. Anther culture was established from spikes sterilized by soaking in 70% ethanol for 1 min, followed by soaking in 10% sodium hypochlorite for 20 min and washed four times with sterile deionized water (Oleszczuk et al. 2004). Then, under sterile conditions, the anthers were excised of spikes and placed on a semi-solid induction medium prepared in Petri dishes (55 mm diameter). Here was used 190-2 medium (Zhuang and Xu 1983) with 90 g l⁻¹ maltose and 438 mg l⁻¹ glutamine supplemented with 2 mg l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.5 mg l⁻¹ kinetin. Anthers on induction medium were incubated in the dark at 26 °C. After ca. 35 days first calli, embryo-like structures, and embryos were transferred onto regeneration 190-2 medium (Zhuang and Xu 1983) supplemented with 0.5 mg l⁻¹ naphthalene acetic acid and 1.5 mg l⁻¹ kinetin. The incubation on regeneration media occurred at 26 °C under 16 h/8 h light/dark photoperiod with 50 µE m⁻² s⁻¹ light intensity. Green plants were transferred to glass flasks containing N6I rooting medium (Chu 1978) supplemented with 2 mg l⁻¹ indole-3-acetic acid. The developed plantlets were planted to pots with a soil-sand mixture and were vernalized as initial triticale plants (4 °C for 6 weeks). After vernalization, plants grown in greenhouse conditions. The chromosome doubling occurred spontaneously. The ploidy of the regenerants was estimated, considering their morphology (plant growth, leaf shape, color and width, tillering mode, spike number) and comparing it with the initial plants. Spikes from randomly chosen regenerants were self-pollinated. Generative progenies derived from doubled haploids (DH) regenerants were used as donor plants (D) in the experiment tested various concentrations of CuSO₄ and AgNO₃ in the induction media and the time of incubation explants on them.

Plant regeneration conditions

The protocol described above for triticale donor plant regeneration from anthers in plant tissue cultures was repeated and treated as a control experiment (T1). Other tested conditions (T2–T9) consisted of modifying the control trial T1 by adding Cu²⁺ and Ag⁺ ions to the induction medium and changing the induction media's incubation time. Thus induction media were prepared in nine trials (T1–T9) considering the addition of CuSO₄ (0.1, 5, 10 µM) and AgNO₃ (0, 10,

60 µM) ions and the incubation time (35, 42, 49 days) of anthers on these media. The induction step's length covered the time from plating explants on induction media to calli collection and transferred them on regeneration media.

DNA extraction

Young leaves of regenerants and donor plants were collected and ground in liquid nitrogen. According to the manufacturer procedure, the genomic DNA from leaf samples was extracted using the Plant DNeasy MiniPrep Kit (Qiagen, Hilding, Germany). DNA concentration and purity were estimated using a spectrophotometer at a wavelength of 260 and 280 nm. The integrity of DNA samples was checked in 1.2% agarose gel electrophoresis with ethidium bromide staining. Finally, there was prepared 500 ng of genomic DNA for each restriction reaction.

Methylation sensitive amplified fragment length polymorphism procedure

The subsequent steps of the metAFLP method were performed as previously published (Bednarek et al. 2007). Minor changes were made to the procedure (Machczyńska et al. 2014). Briefly, two DNA samples were prepared for each plant tested, each with 500 ng of genomic DNA. These samples were digested in parallel with two restriction enzymes *Acc65I/MseI* and *KpnI/MseI*. Once DNA fragments were obtained, synthetic oligonucleotides (adapters) (Table S1) were attached following their ligation. The ligation product was diluted with water (1:3), and 2.5 µl were extracted from it for the pre-selective PCR. Pre-selective amplification of DNA fragments was performed in the presence of pre-selective primers. The pre-selective amplification product was diluted with water (1:20). From this mixture, 1.5 µl were taken for a selective PCR using selective primers. The sequences of all oligonucleotides used are given in Table S1. In selective PCR, one primer (CG-, CXG- or CXX-) was ³²P-labeled. The product of selective PCR was electrophoresed in a 7% polyacrylamide gel. Visualization of fractionated DNA fragments was performed by exposing the gels to X-ray film.

Assignment of markers to DNA methylation and sequence changes

Band profiles obtained from the separation of DNA fragments derived from the *Acc65I/MseI* and *KpnI/MseI* cuts were converted into zero–one matrices. The presence of a band was coded as "1", the absence as "0". These matrices were then set against each other. Using the *Acc65I/MseI* enzyme pair provides information about changes in sequence and DNA methylation (matrix A). In contrast, the bands

obtained from the separation of DNA fragments released by the *KpnI/MseI* restriction endonucleases only provide information about DNA sequence changes (matrix K). Thus, the juxtaposition of the two matrices allows extraction of DNA fragments related only to DNA methylation changes (matrix M).

Quantification of metAFLP characteristics accounting for symmetric and asymmetric methylation

Juxtaposed 0–1 matrices derived from cutting DNA with two different sets of restriction enzymes allow simple estimation of DNA fragments associated with changes in sequence and DNA methylation and enable accurate characterization of changes such as DNA demethylation (DMV), de novo methylation (DNMV), and sequence variation (SV). Such estimation is possible because of *Acc65I* and *MseI* enzymes' different activities concerning the presence of methylated cytosine at the DNA cut site. Besides, juxtaposing band profiles from the donor plant and the regenerant allows quantification of individual metAFLP characteristics (DNM, DNMV, SV) and tissue culture-induced variation (TCIV).

Using specially designed selective primers directed towards symmetric and asymmetric DNA sequences evaluated in the metAFLP technique allows identifying CG, CHG, and CHH methylation changes contexts. This distinction is based on information regarding the restriction site recognition by the *Acc65I* and *KpnI* enzymes which recognize the 5'-GGATCC-3' sequence. Therefore, selective primers ending in any combination of A and T can amplify the asymmetric CHH sequence. The metAFLP primers that end with the -CHG sequence at the 3'-end and those with the -CG sequence reflect symmetric context. Based on such assumptions, it is possible to assign changes in methylation patterns and changes in DNA sequence to either symmetric or asymmetric contexts. A detailed description of the metAFLP enumeration system and the assignment of methylation contexts was provided previously (Orłowska and Bednarek 2020).

The metAFLP markers

GenAlex (Excel add-in software) (Peakall and Smouse 2012) was employed for the evaluation of molecular marker characteristics of metAFLP markers using the *KpnI/MseI* platform (matrix K) and those addressed to methylation changes (matrix M). There were assessed: the percentage of polymorphic loci (%P), heterozygosity and polymorphic index content (PIC) – calculated as $PIC = 2fi(1 - fi)$ where fi is a frequency of the given markers indicated as “1” and $1 - fi$ is a frequency of “0” markers (Anderson et al. 1993; Roldán-Ruiz et al. 2000; Soengas et al. 2006). The total number of markers averaged the PICs of individual

markers. XLSTAT software (Addinsoft 2020) was applied to perform agglomeration (UPGMA and dissimilarity Jaccard coefficients).

Analysis of variance (ANOVA)

One-way ANOVA or one-way Welch ANOVA performed determination of differences between mean values for metAFLP characteristics (TCIV, SV, DMV, DNMV) in specific methylation contexts (CHH, CG, CHG) for the regeneration conditions tested (1T–9T). If homogeneity of variances was violated, as assessed by Levene's test, the multiple comparisons were checked by Games-Howell post hoc test instead of Tukey's post hoc test. ANOVA was performed using XLSTAT software (Addinsoft 2020).

Results

Visual inspection of plant material

Twenty-four donor plants, which were the generative progeny of regenerants derived from anther cultures, were obtained. All donor plants showed the same morphology (plant growth, leaf shape, color and width, tillering mode, and spikes number) as the initial triticale plants. Anthers from a randomly selected donor plant were used as explants to collect triticale regenerants in an experiment testing different in vitro culture conditions (trials T1–T9). For nine different testing experiments, 44 regenerants were collected, which were spontaneously doubled haploids. Spontaneous doubling of regenerants was evaluated by indirect method considering plant morphology—plant height, leaf size, plant vigor, fertility, and grain set. The regenerants selected for analysis did not differ from the donor plant at morphological level.

Marker system characteristics

The metAFLP approach allowed the identification of 449 and 555 markers reflecting donors and regenerated plants sequence variation, respectively. The respective characteristics of markers related to DNA methylation patterns were 34 and 160 (Table 1). There were 448 and 463 (K) and 30 and 77 (M) markers with a frequency higher than 5%. The two marker sets exhibited a large number of private bands in regenerants and none of such bands for donors. PIC values for the K and M markers were the same for K and M markers for donors 0.007 and 0.023 for K and 0.017 for M markers for the regenerants set. Heterozygosity was lower for donors (0.003 for K and 0.007 for M) than for regenerants set (0.079 for K and 0.0229 for M markers) (Table 1, Fig. 1).

Table 1 Total band patterns data for donors and regenerants for sequence (K) and methylation (M) pattern change markers

Characteristics	Donors		Regenerants	
	K	M	K	M
No. Bands	449	34	555	160
No. Bands Freq. $\geq 5\%$	448	30	463	77
No. Private Bands	0	0	432	37
No. LComm Bands ($\leq 25\%$)	0	0	0	0
No. LComm Bands ($\leq 50\%$)	0	0	0	0
Mean He	0.003	0.007	0.079	0.029
SE of Mean He	0.002	0.002	0.005	0.003

Sequence and DNA methylation-related markers used in agglomeration analysis of donors (Fig. 1a) and regenerants (Fig. 1b) demonstrated a lower level of variation of the analyzed samples based on sequence markers than DNA methylation-related ones.

Agglomeration analysis performed on donor plants grouped samples into two clusters. The first one reflected sequence whereas the second DNA methylation changes (Fig. 2a). The same grouping pattern was observed for regenerants of a single donor (Fig. 2a, b). In both cases,

grouping based on sequence data (K) exhibited lower variation between samples compared to methylation changes (M). Independently of whether K or M markers were used for analysis donor plant was always apart from the regenerants however, within the cluster of K or M.

Trials by general quantitative metAFLP characteristics

The highest value of the TCIV was observed for the trial T3, characterized by the lowest concentration of copper ions and the highest concentration of silver ions in the medium, however, with the longest in vitro tissue culture time (Table 2). Very similar outcomes were observed for trial T5. Interestingly, in this case, medium copper ion concentration and lack of silver ions with the longest time of culture were applied. The lowest TCIV was evaluated for T9 with the highest copper ion concentration, lack of silver ions, and medium time of in vitro tissue cultures. ANOVA post hoc Tukey's (HSD) test showed that the T1, T3, T4, and T5 were in the same group, whereas the T9 in the second. The remaining trials were classified into the two groups simultaneously. Sequence variation varied slightly from trials with the lowest value for T9 and the highest for T3. ANOVA

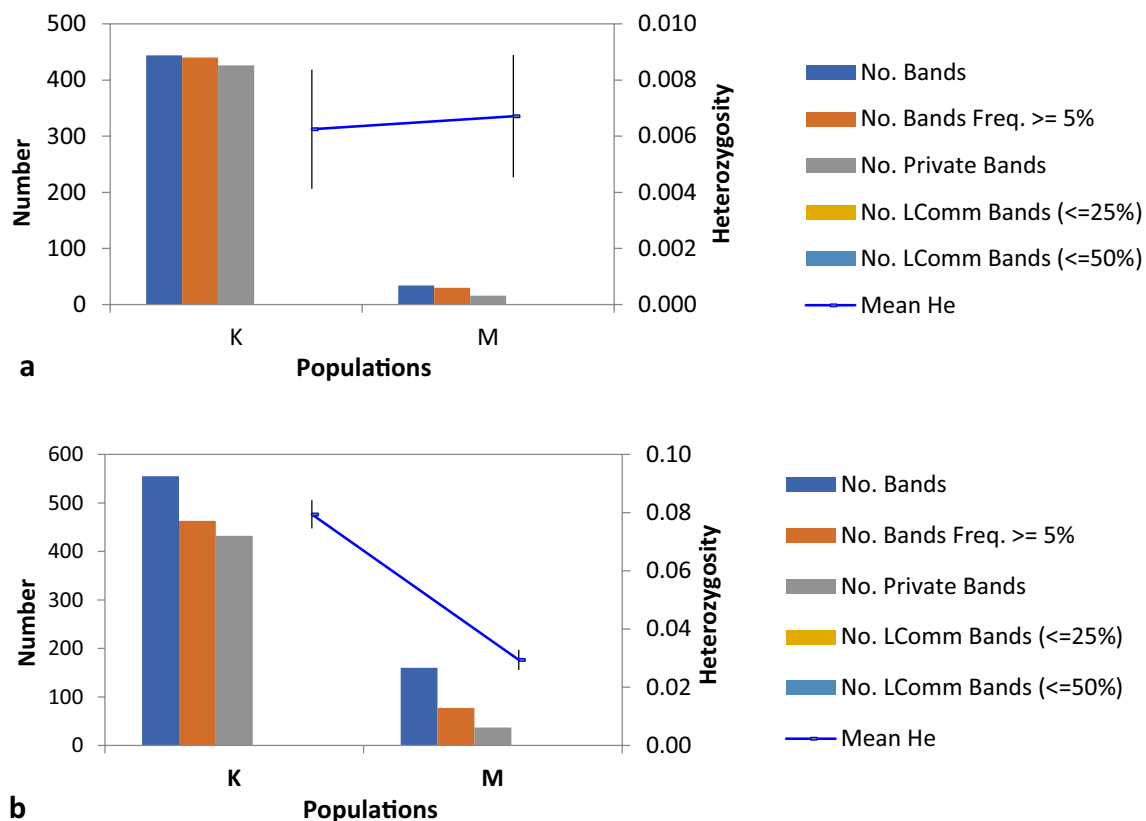


Fig. 1 The illustration of marker types for donors (a) and regenerants (b) analyzed with sequence (K) and DNA methylation (M) pattern change markers, respectively

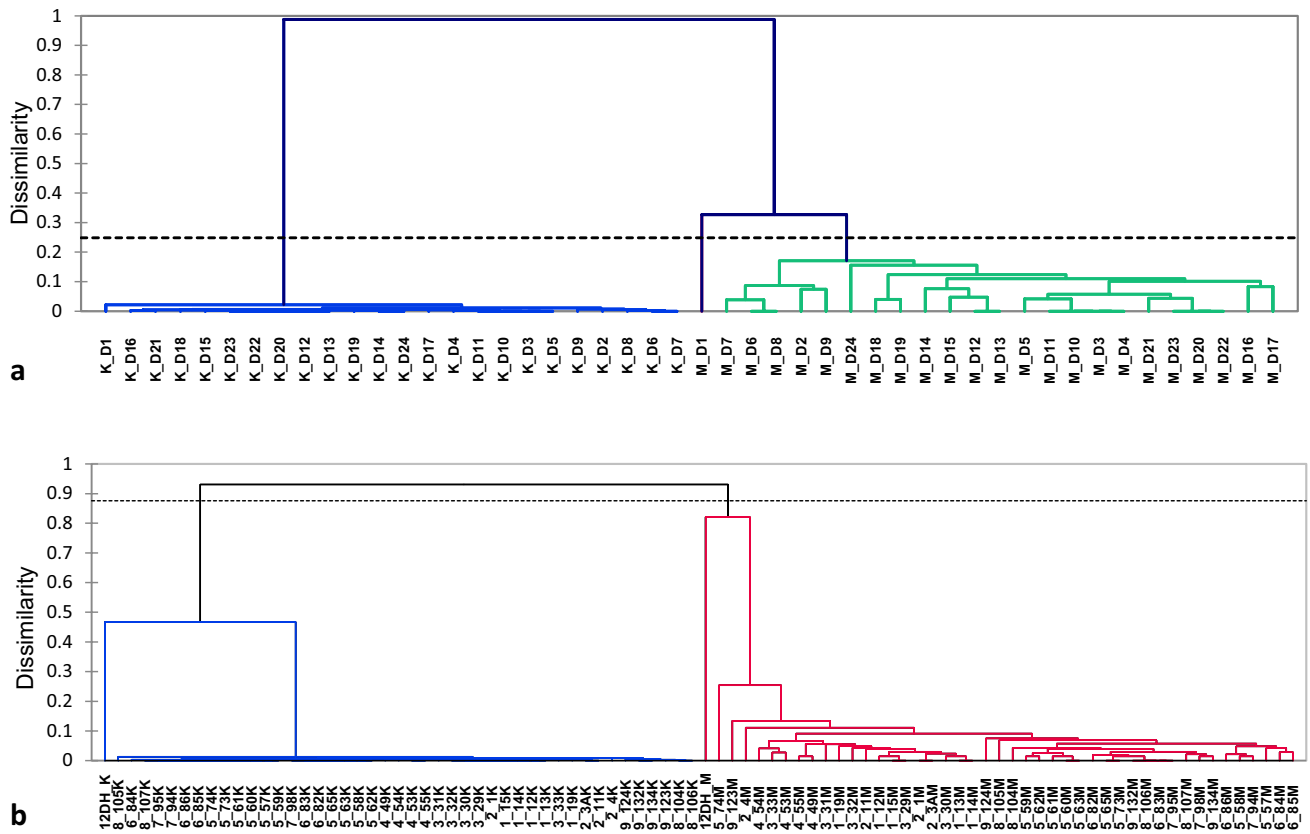


Fig. 2 Agglomeration analysis (UPGMA, Jaccard) based on sequence (K) and virtual markers related to DNA methylation differences (M) evaluated for donors (**a**) and one donor plant with its regenerants (**b**) derived via androgenesis in the T1–T9 trials

Table 2 The arrangement of ANOVA data grouping trials according to general metAFLP quantitative characteristics based on Tukey's (HSD) post hoc test

Trial [†]	metAFLP characteristics ^{††}				In vitro conditions		
	TCIV	SV	DMV	DNMV	Cu ²⁺ (μM)	Ag ⁺ (μM)	Time (days)
T1	51.84 ^a	43.55 ^{ab}	5.08 ^a	3.21 ^c	0.1	0	35
T2	51.73 ^{ab}	43.47 ^{abc}	5.14 ^a	3.13 ^c	0.1	2	42
T3	52.24 ^a	43.76 ^a	5.26 ^a	3.22 ^{bc}	0.1	10	49
T4	51.89 ^a	43.39 ^{abc}	5.11 ^a	3.39 ^{abc}	5	10	42
T5	52.12 ^a	43.52 ^{abc}	5.12 ^a	3.48 ^a	5	0	49
T6	51.78 ^{ab}	43.20 ^c	5.14 ^a	3.44 ^{ab}	5	2	35
T7	51.81 ^{ab}	43.23 ^{bc}	5.24 ^a	3.34 ^{abc}	10	2	49
T8	51.66 ^{ab}	43.11 ^c	5.19 ^a	3.35 ^{abc}	10	10	35
T9	51.50 ^b	43.03 ^c	5.12 ^a	3.35 ^{abc}	10	0	42
F	2.794	3.202	2.045	7.923			
<i>p</i>	0.017	0.008	0.069	0.0001			

The a, b and c superscript letters indicate Tukey's grouping

[†]T1, control; T2–T9, optimisation trials

^{††}The TCIV, SV, DMV, and DNMV characteristics reflect tissue culture-induced variation, sequence variation, demethylation, de novo methylation, respectively

indicated two groups represented by T3 and the second by T8 and T9 trials. The remaining were classified into several groups simultaneously. DNA demethylation with the lowest

values was identified for the T2. The trial was conducted with the lowest concentration of copper ions, low concentration of silver ions in the medium and average time of culture.

Table 3 The results of ANOVA statistics and the Games-Howell post hoc tests demonstrating differences between DNA sequence contexts for the metAFLP characteristics

Methylation context	metAFLP characteristics		
	SV	DMV	DNMV
CHG	23.27 ^a	2.92 ^a	1.63 ^a
CG	11.51 ^b	1.44 ^b	1.15 ^b
CHH	8.65 ^c	0.76 ^c	0.55 ^c
F Welch	68,943.775	34,718.649	1289.097
<i>p</i>	0.0001	0.0001	0.0001

The a, b, and c superscript letters indicate Games-Howell's grouping

ANOVA was not significant and the trials did not differ in DMV. The DNMV was the highest for the T5 and the lowest for the T2. ANOVA grouping showed that the T5 was distinct from the T1 and T2, whereas the other trials were classified into several groups simultaneously.

Comparison of the metAFLP quantitative characteristics by DNA contexts

ANOVA indicated that grouping metAFLP characteristics according to sequence contexts within variation types (SV, DMV and DNMV) was significant (Table 3). According to the Games-Howell *post-hoc* tests contexts differed from each other in all cases and formed separate groups based on variation mean values.

Trials by DNA contexts

According to Levene's test, the assumption of homogeneity of variance for the metAFLP characteristics in CHG and CG contexts met assumptions. Thus, ANOVA showed that using CHG context-related metAFLP markers, the comparisons between trials were significant only for SV_CHG ($F=5.575$, $p=0.0001$). ANOVA presented differences between trials in the CG context and only for SV_CG ($F=2.361$, $p=0.038$). Slightly different results were evaluated for the asymmetric CHH context; here, according to Levene's test, the assumption of homogeneity of variance was violated ($p<0.01$) for all metAFLP characteristics. An unequal number of samples represented the trials. Thus, the Welch's ANOVA was run and displayed significant differences between trials for all metAFLP characteristics SV_CHH ($F=3.910$, $p=0.017$), DMV_CHH ($F=4.239$, $p=0.013$, and DNMV_CHH ($F=1143.106$, $p=0.0001$).

Tukey's HSD test for SV_CHG established that T3 and T9 formed two distinct groups, whereas the other trials fell into two or three groups simultaneously. The lowest SV_CHG was in T9, encompassing regenerants derived under the highest copper ion concentration, lack of silver

ions in the medium, and incubation time on induction medium. When copper ion concentration was the lowest, silver ions were low, and time was intermediate, SV_CHG was the highest (T3) (Table 4).

When CG sequence context was analyzed (Table 4), mean differences between trials were significant only in SV_CG. According to Tukey's HSD test, T4 was distinct from T5, whereas the other trials were in both T4 and T5 groups. T5 exhibited the highest values of SV_CG; here, the moderate amount of Cu²⁺ ions was used, without Ag⁺ ions and during the most extended incubation on induction media (49 days).

As the assumption of homogeneity of variance was violated for all metAFLP characteristics in the CHH context, the Games-Howell post hoc test was conducted. The T5 differed from T6 based on SV_CHH, with the highest mean CHH_SV value equal to 8.75 (T5) and the lowest 5.54 for T6 (Table 4). A moderate concentration of Cu²⁺ ions in the medium was applied, without Ag⁺ ions, and the most extended incubation on induction media (49 days). The Games-Howell post hoc test for DMV_CHH was not discriminatory enough to show differences between the trials (Table 4). For de novo methylation, the Games-Howell post hoc test demonstrated that trials T1 and T2 composed one group, which differ from T5, whereas the other trials were classified either to T1 or T2 groups or to both of them simultaneously (Table 4). Moreover, DNMV_CHH was the highest for T5 and the lowest in T1 and T2 (Table 4). Similar to SV_CHH, the moderate amount of Cu²⁺ ions, absence of Ag⁺ ones, and the most extended incubation on induction media (49 days) favored the highest level of DNMV_CHH. Nevertheless, the lowest values for de novo methylation in the context of CHH were observed at the lowest Cu²⁺ level, at no or intermediate Ag⁺ level, and at the shortest and average anther incubation time on inducing media.

Table 4 Turkey's HSD post hoc test for trials by metAFLP characteristics within CHG and CG sequence context

Trial	metAFLP characteristics in methylation contexts				
	SV_CHG	SV_CG	SV_CHH	DMV_CHH	DNMV_CHH
T1	23.46 ^a	11.48 ^{ab}	8.66 ^{ab}	0.74 ^a	0.37 ^a
T2	23.42 ^{ab}	11.51 ^{ab}	8.58 ^{ab}	0.73 ^a	0.37 ^a
T3	23.55 ^a	11.52 ^{ab}	8.73 ^{ab}	0.89 ^a	0.41 ^{ab}
T4	23.35 ^{abc}	11.36 ^b	8.70 ^{ab}	0.74 ^a	0.60 ^{bcd}
T5	23.23 ^{abc}	11.57 ^a	8.75 ^a	0.74 ^a	0.71 ^d
T6	23.16 ^{bc}	11.52 ^{ab}	8.54 ^b	0.73 ^a	0.69 ^{cd}
T7	23.15 ^{bc}	11.52 ^{ab}	8.59 ^{ab}	0.79 ^a	0.55 ^{bc}
T8	23.06 ^{bc}	11.52 ^{ab}	8.56 ^{ab}	0.74 ^a	0.55 ^{bc}
T9	22.97 ^c	11.52 ^{ab}	8.57 ^{ab}	0.74 ^a	0.55 ^{bc}

The a, b, c, and d superscript letters indicate Tukey's grouping

Discussion

Studies employing in vitro cultures indicate that tissue cultures are a stressful environment used for plant regeneration. That kind of abiotic stress is not without effect on the resulting tissues or plants and can lead to TCIV manifested at the phenotypic (Abdellatif et al. 2012; Farahani et al. 2018), cytological (Currais et al. 2013), biochemical (Filipecki et al. 2006) and (epi)genetic levels (Machczyńska et al. 2015a; Oleszczuk et al. 2002; Orłowska and Bednarek 2020). Analysis of morphological traits (plant height, leaf size, tillering, and fertile grain setting) showed that regenerants and their donor plants were in type without any visually observed differences. Lack of morphological differences was also demonstrated in the case of barley (Orłowska 2021), *Gentianna pannonica* (Fiuk et al. 2010), and also in triticale (Machczyńska et al. 2015b). Thus, morphological differences in regenerants seem to be rare and off-type regenerants could be easily removed from experiments. Evidently however lack of morphological differences between regenerants does not exclude that other levels are not affected by in vitro tissue culture. Alternatively, pre-existing minor level of variation due to i.e., somatic mutations could also contribute to the phenomenon (Karp 1994).

To minimize the pre-existing variation level, the donor plants were the generative progeny of a single DH plant. We have used a similar approach of donor plant preparation routinely (Machczyńska et al. 2014; Orłowska 2021; Orłowska and Bednarek 2020). It was showed that donor plants that subjected to generative cycle exhibited higher uniformity levels than their regenerants (Machczyńska et al. 2014; Machczyńska et al. 2015b; Orłowska et al. 2016). Hence, designing an appropriate way to obtain donor plants that were the source of anthers was crucial in the present study and involved a single generative cycle in which regenerants underwent selfing.

The other vital aspect of the study was the metAFLP approach's involvement in evaluating markers reflecting sequence and DNA methylation-related markers. The metAFLP technique exploits the properties of restriction endonucleases which are isoschizomers that differ in their sensitivity towards site DNA methylation within the restriction site and its vicinity. The *Acc65I/MseI* and *KpnI/MseI*, metAFLP profile comparison, could be used to have sequence and DNA methylation-related markers (Chwedorzewska and Bednarek 2012). The approach was successfully used by us and the others (Chwedorzewska and Bednarek 2012; Orłowska and Bednarek 2020), and proved its value in the current study. The donors showed a minimal level of heterozygosity (0.003 and 0.007 for K and M data), indicating that the explant source could contribute to the variation shared among regenerants to a very tiny level.

Further, as a marginal variation between donor plants existed, and using distinct donors could contribute to TCIV, only a single, randomly chosen donor plant was used as a source of explant tissue for plant regeneration. Thus, the effect of genotype (Bradai et al. 2019; Etienne and Bertrand 2003; Yu et al. 2011) was also taken into account. As demonstrated by heterozygosity and agglomeration analysis, the regenerants exhibited higher variation levels and genetic distance than donor plants based on K and M markers interpreted by us in terms of the TCIV. Besides, methylation-related markers revealed an increased variation level between regenerants compared to sequence-related markers. That is in line with our earlier results evaluated on barley donor plants and regenerants derived via somatic embryogenesis (Orłowska 2021) and androgenesis (Orłowska and Bednarek 2020). Still, we cannot exclude that pre-existing variation somewhat affected the data. Nevertheless, we believe that the effect was negligible.

The value of the metAFLP approach is the opportunity to quantify sequence variation, de novo methylation, and DNA demethylation (Machczyńska et al. 2014; Orłowska and Bednarek 2020) relative to ingredients present in the induction medium. It is being accepted that media composition (Aydin et al. 2016; Mahmoud et al. 2017; Matsuda et al. 2014) and time (Liberatore et al. 2020) may influence tissue culture-induced variation (Bednarek and Orłowska 2020a, c; Bednarek et al. 2020; Orłowska 2021). It was demonstrated that copper and silver ions might influence the Yang cycles affecting DNA methylation and sequence variation (Bednarek and Orłowska 2020a). Moreover, the changes contributed to the number of green plants was somewhat controlled by the ions in barley (Bednarek and Orłowska 2020c). Besides, the time of cultures was also crucial in those cases (Bednarek and Orłowska 2020c). Thus, we have expected that the ions might be vital for the regeneration of other cereals. The notion is supported by the fact that by optimizing the concentration of copper and silver ions in the media and time of cultures, we succeeded in optimizing triticale in vitro tissue culture conditions towards an increased number of green plants (Orłowska et al. 2020). Analysis of differences of means based on ANOVA showed that the trials differing in conditions applied for plant regeneration gathered into separate groups using any of the metAFLP quantitative characteristics, supporting the hypothesis that media ingredients are responsible for the TCIV. Although data on TCIV in triticale regenerants obtained by androgenesis and somatic embryogenesis can be found in the literature (Machczyńska et al. 2015a, b), no studies have attempted to modulate TCIV levels in triticale. Our data demonstrate that manipulating ingredient concentration and time of in vitro culture may either increase or decrease TCIV variation level. Possibly, copper ions at increased concentrations were responsible for the lowest values of TCIV.

Interestingly, those conditions corresponded to the highest number of green plants, as showed earlier (Orłowska et al. 2020). The very similar results were evaluated for anther derived barley regenerants where the highest copper ion concentration promoted the lowest TCIV (Orłowska and Bednarek 2020). Furthermore, a high concentration of Cu^{2+} ions applied to barley cultures improved anther response by 15% and positively affected green plant regeneration (Jacquard et al. 2009; Wojnarowicz et al. 2002) and formation of embryo-like structures (Warchoł et al. 2021).

The most significant contribution to the total variation identified in regenerants was due to DNA sequence changes. On average, more than 43% of such changes were observed, compared to about 20% reported in earlier work (Machczyńska et al. 2015b). The nearly twofold difference may have been the result of various genotype tested or culture media conditions. Despite the difference in sequence variation in our study and previously published studies (Machczyńska et al. 2015b), the demethylation value is similar in both cases. However, we observed differences in de novo methylation levels. The lower level of DNMT recorded in work presented here may have affected the level of sequence variation observed in the DNA of triticales regenerants.

When analyzing the amount of SV in each trial, the lowest values of sequence changes were observed at the highest level of copper and at the extreme levels (low and high) of Ag^+ ions, indicating the lack of influence of silver ions on the observed DNA sequence changes. A similar trend regarding SV was also observed in barley regenerants obtained in anther cultures (Orłowska and Bednarek 2020). On the other hand, the results related to demethylation (ca. 5%) and de novo methylation (ca. 3%) were slightly different; however, ANOVA indicated no significant differences between DNMT trials. De novo methylation was the highest in the trial (T5) with average copper levels, no Ag^+ , and the longest incubation step of the explants (49 days) on the induction medium. The fewest new de novo methylation events were observed under control conditions (T1) and at low Cu^{2+} , Ag^+ levels, and intermediate incubation time (42 days). Considering that the conditions proposed in the T9 trial are conducive to the best performance in the production of green regenerants of triticales (Orłowska et al. 2020), the fact of low TCIV seems an excellent rationale to select in vitro culture conditions that will not only improve the performance of the system in terms of production of green regenerants but also produce genetically equal DH plants.

Applying the metAFLP method gives the possibility to determine which methylation contexts were most likely to change. For all metAFLP characteristics tested according to ANOVA, each context was distinct, with the most variation identified in the two symmetric contexts (CG and CHG) and the lowest in the asymmetric CHH. The observed variation

distribution is not surprising since commonly methylation in asymmetric contexts occurs least frequently (Cokus et al. 2008). However, even though methylation in plants occurs more frequently in the symmetric CG context than in the CHG context (Cokus et al. 2008), higher variability was observed precisely in the CHG context in the case of triticales.

A more in-depth analysis of the methylation contexts shows that differences between the trials in the symmetric context (CHG and CG) are only apparent to sequence variation. The lack of differences in methylation changes (DNMT and DNMT) for both symmetric contexts may be puzzling. A similar analysis performed for barley regenerants obtained by androgenesis (Orłowska and Bednarek 2020) and somatic embryogenesis (Orłowska 2021) did not rule out differences due to changes in DNA methylation. However, we cannot exclude the possibility that the observed changes are related to species specificity—barley is a natural diploid species. At the same time, triticales is the artificial species created by crossing wheat (*Triticum* spp.) and rye (*Secale cereal* L.) and is cytologically (Evtushenko et al. 2019) and genetically unstable (Kalinka and Achrem 2018). The only differences between culture conditions that affected DNA methylation changes for specific contexts referred to de novo methylation in the least represented CHH asymmetric context. Again, the highest level of DNMT methylation was observed in the presence of an average level of Cu^{2+} without Ag^+ and the longest time of anther incubation on inducing media. At the same time, these conditions were also favorable for the highest level of DNA sequence changes in CG and CHH contexts. It cannot be excluded that the factor that influenced the highest level of observed changes was time—the longest in the presented experiment. That observation may reflect the general pattern that increased culture time comes with increased somaclonal variation (Rival et al. 2013).

Conclusions

The presented data demonstrate that media ingredients such as copper and silver ion concentrations and time of tissue culture may influence variation types, including their sequence contexts leading towards increased or decreased levels of variation. As the ions may participate in numerous biochemical pathways, it is crucial to verify whether similar pathways revealed in barley are affected in triticales.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02327-z>.

Author contributions RO and PTB conceived the project and designed the research. KAP performed the experiments. KAP and RO prepared the plant material. KAP, RO and PTB analyzed the data. KAP, RO and PB wrote the first draft of the manuscript. KAP, RO and PTB, revised

and finalized the manuscript. All authors contributed to the article and approved the final version of the manuscript.

Funding This research was funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, Poland (Grant No. HORhn-801-PB-22/15-18).

Code availability Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Consent to participate All authors have contributed to this manuscript, reviewed, and approved the current form of the manuscript to be submitted.

Consent for publication All authors agree.

Ethical approval Not applicable.

References

- Abdellatif KF, Hegazy AE, Aboshama HM, Emara HA, El-Shahed AA (2012) Morphological and molecular characterization of somaclonal variations in tissue culture-derived banana plants. *J Genet Eng Biotechnol* 10(1):47–53. <https://doi.org/10.1016/j.jgeb.2012.05.002>
- Ablova IB (1997) Resistance to head blight in various types of wheat and triticale in Krasnodar environment. *Cereal Res Commun* 25(3):715–720
- Addinsoft (2020) XLSTAT statistical and data analysis solution. New York, USA. <https://www.xlstat.com>
- Anderson JA, Churchill GA, Autrique JE, Tanksley SD, Sorrells ME (1993) Optimizing parental selection for genetic linkage maps. *Genome* 36(1):181–186. <https://doi.org/10.1139/g93-024>
- Ayalew H, Kumssa TT, Butler TJ, Ma X-F (2018) Triticale improvement for forage and cover crop uses in the southern great plains of the United States. *Front Plant Sci* 9:1130–1130. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01130>
- Aydin M, Arslan E, Taspinar MS, Karadayi G, Agar G (2016) Analyses of somaclonal variation in endosperm-supported mature embryo culture of rye (*Secale cereale* L.). *Biotechnol Biotechnol Equip* 30(6):1082–1089. <https://doi.org/10.1080/13102818.2016.1224980>
- Bairu MW, Fennell CW, van Staden J (2006) The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (*Musa AAA cv. 'Zelig'*). *Sci Hortic* 108:347–351
- Ballesteros I, Linacero R, Vázquez AM (2009) Mitochondrial DNA amplification in albino plants of rye (*Secale cereale* L.) regenerated in vitro. *Plant Sci* 176(6):722–728. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2009.02.016>
- Bednarek PT, Orłowska R (2020a) CG demethylation leads to sequence mutations in an anther culture of barley due to the presence of Cu, Ag ions in the medium and culture time. *Int J Mol Sci* 21(12):4401. <https://doi.org/10.3390/ijms21124401>
- Bednarek PT, Orłowska R (2020b) Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 140(2):245–257. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01724-1>
- Bednarek PT, Orłowska R (2020c) Time of in vitro anther culture may moderate action of copper and silver ions that affect the relationship between DNA methylation change and the yield of barley green regenerants. *Plants* 9(9):1064. <https://doi.org/10.3390/plants9091064>
- Bednarek PT, Orłowska R, Koebner RMD, Zimny J (2007) Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biol* 7:10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-10>
- Bednarek PT, Zebrowski J, Orłowska R (2020) Exploring the biochemical origin of DNA sequence variation in barley plants regenerated via in vitro anther culture. *Int J Mol Sci* 21(16):5770
- Bradaï F, Sánchez-Romero C, Martín C (2019) Somaclonal variation in olive (*Olea europaea* L.) plants regenerated via somatic embryogenesis: influence of genotype and culture age on genetic stability. *Sci Hortic* 251:260–266. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2019.03.010>
- Bustillo-Avendaño E, Ibáñez S, Sanz O, Sousa Barros JA, Gude I, Perianez-Rodríguez J, Micol JL, Del Pozo JC, Moreno-Risueno MA, Pérez-Pérez JM (2018) Regulation of hormonal control, cell reprogramming, and patterning during de novo root organogenesis. *Plant Physiol* 176(2):1709–1727. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00980>
- Cao Z, Sui S, Cai X, Yang Q, Deng Z (2016) Somaclonal variation in 'Red Flash' caladium: morphological, cytological and molecular characterization. *Plant Cell, Tissue Organ Cult (PCTOC)* 126(2):269–279. <https://doi.org/10.1007/s11240-016-0996-3>
- Chege P, Lantos C, Pauk J (2020) Retrospect on in vitro androgenesis of sorghum (*Sorghum bicolor*). *Plant Breed* 139(6):1043–1051. <https://doi.org/10.1111/pbr.12843>
- Chu CC (1978) The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: Hu H (ed) Proceedings of symposium on plant tissue culture. Science Press, Peking, pp 43–50
- Chwedorzewska KJ, Bednarek PT (2012) Genetic and epigenetic variation in a cosmopolitan grass *Poa annua* from Antarctic and Polish populations. *Pol Polar Res* 33:63–80. <https://doi.org/10.2478/v10183-012-0004-5>
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M, Jacobsen SE (2008) Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452(7184):215–219. <https://doi.org/10.1038/nature06745>
- Coronel CJ, González AI, Ruiz ML, Polanco C (2018) Analysis of somaclonal variation in transgenic and regenerated plants of *Arabidopsis thaliana* using methylation related metAFLP and TMD markers. *Plant Cell Rep* 37(1):137–152. <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2217-x>
- Currais L, Loureiro J, Santos C, Canhoto JM (2013) Ploidy stability in embryogenic cultures and regenerated plantlets of tamarillo. *Plant Cell, Tissue Organ Cult (PCTOC)* 114(2):149–159. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0311-5>
- Dahleen LS (1995) Improved plant regeneration from barley callus cultures by increased copper levels. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 43:267–269. <https://doi.org/10.1007/BF00039954>
- Deepthi VP (2018) Somaclonal variation in micro propagated bananas. *Adv Plants Agric Res* 8(6):624–627. <https://doi.org/10.15406/apar.2018.08.00395>
- Dreger M, Mól R, Deja A, Raj E, Mańkowska G, Wielgus K (2019) Improved plant regeneration in callus cultures of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *In Vitro Cell Dev Biol -Plant* 55(2):190–198. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09963-9>
- Eeckhaut T, Van Houtven W, Bruznican S, Leus L, Van Huylenbroeck J (2020) Somaclonal variation in chrysanthemum × morifolium protoplast regenerants. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.607171>
- Etienne H, Bertrand B (2003) Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension

- age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiol* 23(6):419–426. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.6.419>
- Evtushenko EV, Lipikhina YA, Stepochkin PI, Vershinin AV (2019) Cytogenetic and molecular characteristics of rye genome in octoploid triticales (\times Tritico-secale Wittmack). *Comp Cytogenet.* <https://doi.org/10.3897/CompCytogen.v13i4.39576>
- FAO (2019). <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>. Accessed 13 Apr 2021
- Farahani F, Yari R, Noormohammadi Z, Sheidai M (2018) Study of morphological trait changes in in-vitro plantlets of three olive cultivars ('Dezful Baghmalek', 'Dezful Safiabab' and 'Roughani') domesticated in Iran. In: 2018 International Society for Horticultural Science (ISHS), Leuven, Belgium, pp 87–90
- Fei S, Read PE, Riordan TP (2000) Improvement of embryogenic callus induction and shoot regeneration of buffalograss by silver nitrate. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 60(3):197–203. <https://doi.org/10.1023/a:1006468324616>
- Filipecki M, Yin Z, Wiśniewska A, Smiech M, Malinowski R, Malepszy S (2006) Tissue-culture-responsive and autotetraploid-responsive changes in metabolic profiles of cucumber (*Cucumis sativus* L.). *J Appl Genet* 47(1):17–21. <https://doi.org/10.1007/bf03194594>
- Fiuk A, Bednarek PT, Rybczyński JJ (2010) Flow cytometry, HPLC-RP, and metaFLP analyses to assess genetic variability in somatic embryo-derived plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. *Plant Mol Biol Rep* 28:413–420. <https://doi.org/10.1007/s11105-009-0167-3>
- Ghosh A, Igamberdiev AU, Debnath SC (2021) Tissue culture-induced DNA methylation in crop plants: a review. *Mol Biol Rep* 48(1):823–841. <https://doi.org/10.1007/s11033-020-06062-6>
- Hale B, Phipps C, Rao N, Wijeratne A, Phillips GC (2020) Differential expression profiling reveals stress-induced cell fate divergence in soybean microspores. *Plants* 9(11):1510
- Hassanein A, Salem J, Faheed F, El-Nagish A (2018) Effect of anti-ethylene compounds on isoenzyme patterns and genome stability during long term culture of *Moringa oleifera*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult (PCTOC)* 132(1):201–212
- Hayta S, Smedley MA, Li J, Harwood WA, Gilmartin PM (2016) Plant regeneration from leaf-derived callus cultures of primrose (*Primula vulgaris*). *HortScience* 51(5):558. <https://doi.org/10.21273/hortsci.51.5.558>
- Hossein Pour A, Aydin M, Haliloglu K (2020) Plant regeneration system in recalcitrant rye (*Secale cereale* L.). *Biologia* 75(7):1017–1028. <https://doi.org/10.2478/s11756-019-00395-9>
- Ichihashi Y, Hakoyama T, Iwase A, Shirasu K, Sugimoto K, Hayashi M (2020) Common mechanisms of developmental reprogramming in plants—lessons from regeneration, symbiosis, and parasitism. *Front Plant Sci* 11:1084–1084. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.01084>
- Ikeda-Iwai M, Umehara M, Satoh S, Kamada H (2003) Stress-induced somatic embryogenesis in vegetative tissues of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 34(1):107–114. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.x.2003.01702.x>
- Ikeuchi M, Shibata M, Rymen B, Iwase A, Bågman AM, Watt L, Coleman D, Favero DS, Takahashi T, Ahnert SE, Brady SM, Sugimoto K (2018) A gene regulatory network for cellular reprogramming in plant regeneration. *Plant Cell Physiol* 59(4):765–777. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy013>
- Jacquard C, Nolin F, Hecart C, Grauda D, Rashal I, Dhondt-Cordelier S, Sangwan RS, Devaux P, Mazeyrat-Gourbeyre F, Clement C (2009) Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Rep* 28(9):1329–1339. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0733-z>
- Jha AK, Dahleen LS, Suttle JC (2007) Ethylene influences green plant regeneration from barley callus. *Plant Cell Rep* 26:285–290. <https://doi.org/10.1007/s00299-006-0252-0>
- Kalinka A, Achrem M (2018) Reorganization of wheat and rye genomes in octoploid triticales (\times Tritico-secale). *Planta* 247(4):807–829. <https://doi.org/10.1007/s00425-017-2827-0>
- Karp A (1994) Origin, causes, and uses of variation in plant tissue cultures. In: Vasil IK, Thorpe TA (eds) *Plant cell and tissue culture*. Kluwer, Dordrecht, pp 136–151
- Kasha KJ (2005) Chromosome doubling and recovery of doubled haploid plants. In: Don Palmer CE, Keller WA, Kasha KJ (eds) *Haploids in crop improvement II*. Springer, Berlin, pp 123–152
- Kaur A, Kumar A (2020) The effect of gelling agent, medium pH and silver nitrate on adventitious shoot regeneration in *Solanum tuberosum*. *bioRxiv*. <https://doi.org/10.1101/2020.01.03.894063>
- Kiyosue T, Takano K, Kamada H, Harada H (1990) Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can J Bot* 68(10):2301–2303. <https://doi.org/10.1139/b90-293>
- Klimek-Chodacka M, Kadluczka D, Lukasiewicz A, Malec-Pala A, Baranski R, Grzebelus E (2020) Effective callus induction and plant regeneration in callus and protoplast cultures of *Nigella damascena* L. *Plant Cell, Tissue Organ Cult (PCTOC)* 143(3):693–707. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01953-9>
- Krishna H, Alizadeh M, Singh D, Singh U, Chauhan N, Eftekhari M, Sadh RK (2016) Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech* 6(1):54. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0389-7>
- Kumar V, Parvatam G, Ravishankar GA (2009) AgNO₃—a potential regulator of ethylene activity and plant growth modulator. *Electron J Biotechnol*. <https://doi.org/10.2225/vol12-issue2-fulltext-1>
- Kumlehn J, Serazetdinova L, Hensel G, Becker D, Loerz H (2006) Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnol J* 4(2):251–261. <https://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00178.x>
- Lee K, Seo PJ (2018) Dynamic epigenetic changes during plant regeneration. *Trends Plant Sci* 23(3):235–247. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.11.009>
- Lemos E, Blake J (1996) Control of leaf abscission in nodal cultures of *Annona squamosa* L. *J Horticult Sci* 71(5):721–728
- Liberatore CM, Rodolfi M, Beghè D, Fabbri A, Ganino T, Chiancone B (2020) In vitro leaf-derived organogenesis and somaclonal variant detection in *Humulus lupulus* L. *In Vitro Cell Dev Biol - Plant* 56(6):865–874. <https://doi.org/10.1007/s11627-020-10088-7>
- Machczyńska J, Orłowska R, Zimny J, Bednarek PT (2014) Extended metaFLP approach in studies of the tissue culture induced variation (TCIV) in case of triticales. *Mol Breed* 34:845–854. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0079-2>
- Machczyńska J, Orłowska R, Ogórek KA, Bednarek PT (2015a) Comparative study on tissue culture induced variation identified with metaFLP and RP-HPLC in barley and triticales regenerants. *Bio-Technologia. J Biotechnol Comput Biol Bionanotechnol* 96:98–98
- Machczyńska J, Zimny J, Bednarek P (2015b) Tissue culture-induced genetic and epigenetic variation in triticales (\times Tritico-secale spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. *Plant Mol Biol* 89(3):279–292. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0368-0>
- Mahmoud RA, Bakr EI, El-Kosary S, Fayed EK (2017) Somaclonal variation in regenerated plants derived from callus of peach rootstocks. *Acta Horticult* 1187:233–241
- Makowska K, Kałużniak M, Oleszczuk S, Zimny J, Czaplicki A, Konieczny R (2017a) Arabinogalactan proteins improve plant regeneration in barley (*Hordeum vulgare* L.) anther culture. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 131(2):247–257. <https://doi.org/10.1007/s11240-017-1280-x>
- Makowska K, Oleszczuk S, Zimny J (2017b) The effect of copper on plant regeneration in barley microspore culture. *Czech J Genet Plant Breed* 53(1):17–22. <https://doi.org/10.17221/82/2016-cjgpb>
- Maraschin SF, de Priester W, Spaink HP, Wang M (2005) Androgenic switch: an example of plant embryogenesis from the male

- gametophyte perspective. *J Exp Bot* 56(417):1711–1726. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri190>
- Matsuda S, Sato M, Ohno S, Yang S-J, Doi M, Hosokawa M (2014) Cutting leaves and plant growth regulator application enhance somaclonal variation induced by transposition of *VGs1* of *Saintpaulia*. *J Jpn Soc Hortic Sci* 83(4):308–316. <https://doi.org/10.2503/jjshs.1.MI-009>
- Menke-Milczarek I, Zimny J (2001) NH_4^+ and NO_3^- requirement for wheat somatic embryogenesis. *Acta Physiol Plant* 23(1):37–42. <https://doi.org/10.1007/s11738-001-0020-2>
- Mikuła A, Tomiczak K, Rybczynski JJ (2011) Cryopreservation enhances embryogenic capacity of *Gentiana cruciata* (L.) suspension culture and maintains (epi)genetic uniformity of regenerants. *Plant Cell Rep* 30(4):565–574. <https://doi.org/10.1007/s00299-010-0970-1>
- Oleszczuk S, Zimny J, Bednarek PT (2002) The application of the AFLP method to determine the purity of homozygous lines of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Cell Mol Biol Lett* 7:777–783
- Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J (2004) Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (*Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo. *Plant Cell Rep* 22:885–893. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0796-9>
- Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J (2006) Androgenic response to pre-culture stress in the microspore cultures of barley. *Protoplasma* 228(1–3):95–100. <https://doi.org/10.1007/s00709-006-0179-x>
- Orłowska R (2021) Barley somatic embryogenesis—an attempt to modify variation induced in tissue culture. *J Biol Res-Thessalon* 28(1):9. <https://doi.org/10.1186/s40709-021-00138-5>
- Orłowska R, Bednarek PT (2020) Precise evaluation of tissue culture-induced variation during optimisation of in vitro regeneration regime in barley. *Plant Mol Biol* 103:33–50. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00973-5>
- Orłowska R, Machczyńska J, Oleszczuk S, Zimny J, Bednarek PT (2016) DNA methylation changes and TE activity induced in tissue cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Biol Res (thessaloniki, Greece)* 23:19–19. <https://doi.org/10.1186/s40709-016-0056-5>
- Orłowska R, Pachota KA, Machczyńska J, Niedziela A, Makowska K, Zimny J, Bednarek PT (2020) Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. *Electron J Biotechnol* 43:8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.11.001>
- Paladi RK, Rai AN, Penna S (2017) Silver nitrate modulates organogenesis in *Brassica juncea* (L.) through differential antioxidant defense and hormonal gene expression. *Sci Hortic* 226:261–267. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.038>
- Pasternak T, Dudits D (2019) Epigenetic clues to better understanding of the asexual embryogenesis in planta and in vitro. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00778>
- Peakall R, Smouse PE (2012) GenAlEx 6.5: genetic analysis in excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics*. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts460>
- Pěničák A, Turečková V, Paulišić S, Rolčík J, Strnad M, Mihaljević S (2015) Ammonium regulates embryogenic potential in *Cucurbita pepo* through pH-mediated changes in endogenous auxin and abscisic acid. *Plant Cell, Tissue Organ Cult (PCTOC)* 122(1):89–100. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0752-0>
- Puchkova LV, Brogginini M, Polishchuk EV, Ilyechova EY, Polishchuk RS (2019) Silver ions as a tool for understanding different aspects of copper metabolism. *Nutrients* 11(6):1364. <https://doi.org/10.3390/nu11061364>
- Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M, Dix PJ, Márton L (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana plumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO_3 . *Plant Cell Rep* 6(1):1–4. <https://doi.org/10.1007/bf00269725>
- Rival A, Ilbert P, Labeyrie A, Torres E, Doulbeau S, Personne A, Dussert S, Beulé T, Durand-Gasselín T, Tregear JW, Jaligot E (2013) Variations in genomic DNA methylation during the long-term in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep* 32:359–368. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1369-y>
- Roldán-Ruiz I, Dendauw J, Van Bockstaele E, Depicker A, De Loose M (2000) AFLP markers reveal high polymorphic rates in ryegrasses (*Lolium* spp.). *Mol Breed* 6(2):125–134. <https://doi.org/10.1023/A:1009680614564>
- Sakina A, Mir S, Najeeb S, Zargar SM, Nehvi FA, Rather ZA, Salgotra RK, Shikari AB (2020) Improved protocol for efficacious in vitro androgenesis and development of doubled haploids in temperate japonica rice. *PLoS ONE* 15(11):e0241292–e0241292. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0241292>
- Sarropoulou V, Dimassi-Therious K, Therios I (2016) Effect of the ethylene inhibitors silver nitrate, silver sulfate, and cobalt chloride on micropropagation and biochemical parameters in the cherryrootstocks CAB-6P and Gisela 6. *Turk J Biol* 40(3):670–683
- Schmidt M, Walz C, Hesemann CU (1996) Somaclonal variation of the mitochondrial ATPase subunit 6 gene region in regenerated triticale shoots and full-grown plants. *Theor Appl Genet* 93(3):355–360. <https://doi.org/10.1007/bf00223176>
- Shahvali-Kohshour R, Moieni A, Baghizadeh A (2013) Positive effects of cold pretreatment, iron source, and silver nitrate on anther culture of strawberry (*Fragaria × ananassa* Duch.). *Plant Biotechnol Rep* 7(4):481–488. <https://doi.org/10.1007/s11816-013-0286-z>
- Soengas P, Velasco P, Padilla G, Ordás A, Carrea ME (2006) Genetic relationships among brassica napus crops based on SSR markers. *HortScience* 41(5):1195. <https://doi.org/10.21273/hortsci.41.5.1195>
- Ślusarkiewicz-Jarzina A, Pudelska H, Wozna J, Pniewski T (2017) Improved production of doubled haploids of winter and spring triticale hybrids via combination of colchicine treatments on anthers and regenerated plants. *J Appl Genet* 58(3):287–295. <https://doi.org/10.1007/s13353-016-0387-9>
- Touchell DH, Palmer IE, Ranney TG (2020) In vitro ploidy manipulation for crop improvement. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.00722>
- Warchoń M, Juzoń K, Dziurka K, Czyczyło-Mysza I, Kapłoniak K, Marcińska I, Skrzypek E (2021) The effect of zinc, copper, and silver ions on oat (*Avena sativa* L.) androgenesis. *Plants* 10(2):248
- Wojnarowicz G, Jacquard C, Devaux P, Sangwan RS, Clement C (2002) Influence of copper sulfate on anther culture in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Sci* 162:843–847. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(02\)00036-5](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(02)00036-5)
- Wu LM, Wei YM, Zheng YL (2006) Effects of silver nitrate on the tissue culture of immature wheat embryos. *Russ J Plant Physiol* 53(4):530–534. <https://doi.org/10.1134/S1021443706040157>
- Würschum T, Tucker MR, Maurer HP, Leiser WL (2015) Ethylene inhibitors improve efficiency of microspore embryogenesis in hexaploid triticale. *Plant Cell, Tissue Organ Cult* 122(3):751–757. <https://doi.org/10.1007/s11240-015-0808-1>
- Yu X, Li X, Zhao X, Jiang L, Miao G, Pang J, Qi X, Liu B (2011) Tissue culture-induced genomic alteration in maize (*Zea mays*) inbred lines and F1 hybrids. *Ann Appl Biol* 158(3):237–247. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2011.00458.x>
- Zhuang JJ, Xu J (1983) Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu H, Vega MR (eds) *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Science Press, Beijing, p 431

dr inż. Renata Orłowska

Radzików, 31.08.2022

.....
Imię i nazwisko

.....
Miejscowość i data

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin
-Państwowy Instytut Badawczy
Radzików
05-870 Błonie
.....

Afiliacja

OŚWIADCZENIE DOTYCZĄCE PRACY WIELOAUTORSKIEJ

Oświadczam, że w pracy:

Pachota K.A., Orłowska R.* (2022) **Effect of copper and silver ions on sequence and DNA methylation changes in triticale regenerants gained via somatic embryogenesis.** Journal of Applied Genetics, doi:10.1007/s13353-022-00717-9

Mój udział polegał na: sformułowaniu problemu badawczego, uzyskaniu materiału roślinnego, analizach molekularnych, analizie danych, przygotowaniu manuskryptu do druku oraz na przygotowywaniu odpowiedzi na recenzje. Mój udział w publikacji szacuję na: 10%.


.....

Podpis



Effect of copper and silver ions on sequence and DNA methylation changes in triticale regenerants gained via somatic embryogenesis

Katarzyna Anna Pachota¹ · Renata Orłowska¹

Received: 22 April 2022 / Revised: 1 August 2022 / Accepted: 5 August 2022 / Published online: 19 August 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Somatic embryogenesis is a plant regeneration method that can be exploited in tissue culture systems for a variety of tasks, such as genetic modification or the selection of somaclones with advantageous characteristics. Therefore, it is crucial to create efficient regeneration procedures and comprehend how medium components affect regeneration effectiveness or the degree of variation created in plant tissue cultures. The level of tissue culture-induced variation in triticale regenerants was examined in the current study in relation to the concentration of copper and silver ions in the induction media as well as the length of time immature zygotic embryo explants were incubated on these media. The high degree of variation (45%) revealed by the methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism approach for estimating variation included 38% DNA sequence alterations, 6% DNA demethylation, and 1% de novo DNA methylation. Different levels of variance were found in relation to various DNA sequence settings. The CHG context had the most alterations, whereas CG experienced the fewest; sequence variation predominated in each sequence context. Lower copper ion concentrations showed the most variance. However, it could not be connected to the duration of in vitro culture or the effect of silver ions. Accordingly, we think that altering the concentration of copper ions in the induction medium may throw off the equilibrium of the metabolic processes in which copper is involved, resulting in tissue culture-induced variation.

Keywords CG · CHG · CHH · Copper · Epigenetic variation · Genetic variation · Immature zygotic embryos · metAFLP · Silver

Introduction

Plant tissue culture (PTC) methods take advantage of the induced plant cell totipotency, which finds its outstanding reflection in the phenomenon of somatic embryogenesis (SE). Somatic embryogenesis is the multi-step developmental process in which somatic cells of plant explants differentiate into bipolar structures known as somatic embryos. Induction of SE can occur by acting on the explants with stress (Zavatieri et al. 2010) or through appropriate growth regulators (Méndez-Hernández et al. 2019). In addition, the success of

plant regeneration through SE is also influenced by genotype (Fiuk and Rybczyński 2008), type and age of explant (Atak et al. 2008), condition of donor plants (Dahleen 1999), the composition of culture media (Dahleen and Bregitzer 2002), and especially type and concentration of growth regulators (Przetakiewicz et al. 2003) or carbon source (Ganesan and Jayabalan 2005) as well as the release of organic molecules by the explants into the culture medium (Nic-Can et al. 2015). Furthermore, depending on the mode, somatic embryo formation can occur either directly (without the callus phase) (Eudes et al. 2003) or indirectly (Vega et al. 2009), when somatic embryos are formed on the produced calli.

Over 60 years of studies on the phenomenon of SE has led to developing protocols for plant regeneration for many species, including cereals. In vitro, culture methods allowing obtaining plants via the SE pathway have also been elaborated for triticale, a new, and synthetic crop with increasing importance for agriculture and plant breeding. Successful induction of SE in triticale was first reported for immature inflorescence-derived callus cultures (Eapen and Rao 1985)

Communicated by: Izabela Pawłowicz

Katarzyna Anna Pachota currently does not work at the Institute.

✉ Renata Orłowska
r.orłowska@ihar.edu.pl

¹ Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute, Radzików 05-870 Błonie, Poland

and then in callus cultures obtained from immature (Zimny and Rybczyński 1985) and mature zygotic embryos (Padmaja et al. 1992). When it comes to the last two types of explants, embryogenic callus from immature embryos is more likely to produce somatic embryos than tissue grown from mature embryos (Vikrant and Rashid 2001). Although, in the case of triticale, more emphasis seems to have been put on systems of androgenic embryogenesis to obtain plants that are doubled haploids (DH) (Oleszczuk et al. 2004), the induction of SE with the use of zygotic embryos as explant is constantly practiced (Machczyńska et al. 2015).

Regenerants obtained by SE should be morphologically and genetically identical to the donor plant. However, this assumption is not always valid. Some changes (phenotypic, cytological, genetic) are observed in regenerants (de la Puente et al. 2008). The changes are defined by the common term somaclonal variation (Larkin and Scowcroft 1981) or tissue culture-induced variation (TCIV) (Machczyńska et al. 2014). The first term describes changes affecting regenerants (Eeckhaut et al. 2020) and sometimes also their generative progeny (Zehr et al. 1987), while the second one refers only to changes affecting regenerants (Orłowska et al. 2021b). The causes of variation induced by in vitro culture are complex (Bednarek and Orłowska 2019; Bednarek et al. 2021); indeed, the components forming the culture media (Elena and Ginzo 1988; Immonen 1996), time (Etienne and Bertrand 2003), and conditions of PTC can be the source of variation. For example, among the culture media components, micronutrients such as copper or silver seem to influence the course of SE and, as recently shown, genetic and epigenetic changes (Orłowska et al. 2021b).

At a concentration of 0.1 M, copper sulfate (CuSO_4) is one of the main components of the MS medium, and it exhibits positive effects on callus production and regeneration (Malik et al. 2021). Copper ions have been widely used in PTC to promote plant regeneration via SE (Dordević et al. 2019) and androgenesis pathways (Warchoń et al. 2021). In the latter case, copper ions reduced the production of albino plants (Grauda et al. 2014). Also, CuSO_4 in a concentration of 0.1–100 μM significantly improved the regeneration of triticale shoots (Purnhauser and Gyulai 1993). On the other hand, the concentration of CuSO_4 from 1 to 80 μM had a positive effect on the induction of SE and plant regeneration and, in the case of androgenesis, it decreased the number of albino regenerants (Cho et al. 1998; Jacquard et al. 2009). However, the concentration of 100 μM had a toxic effect and suppressed the formation of embryogenic calli, adversely influenced regeneration, and promoted the formation of albino wheat plants (Miroshnichenko et al. 2021).

Silver nitrate (AgNO_3) (Rojas-Lorz et al. 2019), silver thiosulfate ($\text{Ag}_2\text{S}_2\text{O}_3$) (Diab 2017), and silver nanoparticles (AgNPs) (Malik et al. 2021) are all added to in vitro culture media. Their primary function is to accelerate the

callogenesis process and improve plant regeneration. Silver nitrate, usually added to the culture media at a concentration of 6–88 μM , impacts SE, shoot formation, efficient root growth, and organogenesis, prerequisites for successful genetic transformation (Paladi et al. 2017). The use of AgNO_3 improved SE in wheat species *Triticum durum* (a more than 22-fold increase) (Fernandez et al. 1999) and *Triticum aestivum* (Wu et al. 2006), barley (Orłowska et al. 2020), maize (Carvalho et al. 1997), and rice (Ghobeishavi et al. 2015). Silver nitrate has been shown to mediate the inhibition of ethylene (Beyer 1976), a plant hormone involved in many developmental processes, including fruit ripening, abscission, senescence, growth, and flowering (Hobson et al. 1984). As an ethylene inhibitor, AgNO_3 has significantly improved shoot regeneration in wheat (Purnhauser et al. 1987) and counteracted the aging process of callus of this species (Wu et al. 2006).

Time is another factor that may impact somatic embryogenesis. The extended duration of in vitro culture increases the number of mutations in regenerated plants (Duncan 1996), which may involve an increased mutation rate (Murashige and Nakano 1965) and sequential accumulation of mutations over time (Kaeppeler et al. 2000). Thus, prolonged tissue culture time resulted in increased variation, manifested in different phenotypic variants (Armstrong and Phillips 1988). Also, increased callus induction time during SE decreases plant morphogenic potential and increases the numbers of albino plants and calli (Wen et al. 2004). It was documented that DNA methylation changes in regenerants may be related to time on the tissue culture run (Bednarek and Orłowska 2020).

Assessment of TCIV variation can be performed at different levels using a range of techniques, from the use of morphological characteristics of the clones (Eeckhaut et al. 2020) through the use of biochemical methods (Thomas et al. 2006) to molecular methods (Bednarek et al. 2007; Orłowska and Bednarek 2020; Patzak et al. 2021). The development of molecular techniques such as methylation-sensitive amplified fragment length polymorphism (metAFLP) has made it possible to characterize the variation induced by in vitro cultures at the level of DNA sequence and its methylation in one analysis. The metAFLP exploits the properties of restriction enzymes which are sensitive to the presence of methylated cytosine in or around the cutting site. The metAFLP method utilizes the Acc65I and KpnI isoschizomers to recognize the 5'-GGTACC-3' sequence. Acc65I does not hydrolyze a DNA strand if the cytosine is methylated. On the other hand, the restriction enzyme KpnI cuts the DNA strand regardless of the presence of cytosine methylation. In the metAFLP technique, the differences between DNA profiles result from cutting the DNA of the donor plant and the regenerant with two pairs of restriction enzymes, namely Acc65I/MseI and KpnI/MseI. The method allows the estimation of changes both qualitatively

and quantitatively. Using the isoschizomers permits quantitative assessment of TCIV and its components (sequence variation-SV, demethylation-DMV, and de novo DNA methylation-DNMV). In addition, the development of the method enabled the estimation of changes in specific DNA nucleotide sequences (hereafter referred to as sequence contexts) reflecting symmetric (CG and CHG) and asymmetric (CHH) cytosine methylation (H stands for A, C, T).

Although the function of copper and silver ions is relatively well studied concerning obtaining regenerants in PTC, including cereal ones, there is a lack of information on how these ions, in combination with various incubation times of immature zygotic embryos on induction medium (IM), can influence TCIV in triticales regenerants obtained by SE. Thus, the aim of this study was to evaluate the impact of copper and silver ions and incubation time of explants on TCIV in triticales regenerants obtained via SE in immature zygotic embryo cultures.

Material and methods

Acquisition of donor plants

The cultivar T28/2 of winter triticales (*X Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) derived from cv. Presto × cv. Mungis cross provided by dr Sylwia Oleszczuk (Plant Breeding and Acclimatization Institute-NRI, Radzików, Poland) served to prepare donor plants via in vitro anther culture. The precise procedure for getting donor plants was previously published (Pachota et al. 2022). Simply put, we first obtained regenerants that were DH in anther culture. The final donor plants in the experiment were then obtained as the generative progeny of DH regenerants. Twenty donor plants were used to conduct additional research on triticales plant regeneration via SE from immature zygotic embryos under various in vitro growth conditions.

Plant regeneration via somatic embryogenesis

Twenty donor seedlings were cultivated in a growth chamber at 16/12 °C (day/night). Photoperiod (16 h/8 h; light/dark) and light intensity ($190 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) were maintained using high-pressure sodium lamps. After vernalization at 4 °C for 6 weeks under short-day photoperiod (8 h/16 h) in $20 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$ light intensity plants were grown in greenhouse conditions. Spikes with unripe caryopses were harvested after 12–16 days of self-pollination. The caryopses removed from the tillers

were surface-sterilized with 70% ethanol for 1 min and then transferred to 10% sodium hypochlorite solution (NaOCl) for 20 min. The caryopses were then thoroughly rinsed four times with distilled water. Immature zygotic embryos were dissected from the disinfected caryopses and plated on an MS induction medium (Murashige and Skoog 1962) with 2 mg l^{-1} 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. Nine variants of tissue culture (trials: T1–T9) included IM with various concentrations of $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1, 5, 10 μM) and AgNO_3 (0, 10, 60 μM), and the incubation time (35, 42, 49 days) of immature embryos on these media (Table 1). The combination of the factors tested (Cu, Ag, time), as well as the concentration levels and the number of days, was determined according to the design of experiment principles based on Taguchi's orthogonal arrays (Taguchi 1986). The induction step's length (incubation time) covered the time from plating embryos on IM to calli collection and transferring them on regeneration media. Trial T1 was considered a control. Immature zygotic embryos were incubated on IM at 26 °C under a photoperiod of 16 h/8 h (light/dark). After several days, first calli and subsequent somatic embryos were recorded and transferred on a solid regeneration medium 190–2. Calli and embryos were incubated at 26 °C under 16 h/8 h (light/dark) conditions. Regenerated plants were transferred to a glass flask with rooting medium N6I (Chu 1978) supplemented with 2 mg l^{-1} indole-3-acetic acid. Seedlings with a well-developed root system were transferred into pots (soil to sand 3:1) and grown to maturity under controlled conditions in the greenhouse on a 16 h/8 h (light/dark) photoperiod. Immature zygotic embryos from each donor plant were plated on all the IM tested (T1–T9); however, regenerants for each trial were not obtained for every donor plant. Between 0 and 12 regenerants were obtained per trial for different donor plants. Finally, regenerants from a single donor plant representing all in vitro culture conditions tested (T1–T9) were selected for analysis. After all, forty-five regenerants originating from one donor plant were prepared for analysis. Five regenerants from each trial (T1–T9) were tested.

DNA extraction and metaAFLP procedure

The leaves of young seedlings of 20 donor plants and 45 regenerants were grounded in liquid nitrogen. The extraction of DNA was performed using the DNeasy MiniPrep Kit (Qiagen, Hilding, Germany) according to the procedure recommended by the manufacturer. The amount of DNA was estimated spectrophotometrically (Nanodrop, Thermo Fisher

Table 1 Conditions of triticales plant regeneration on induction media via somatic embryogenesis

Trial	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (μM)	0.1	0.1	0.1	5	5	5	10	10	10
AgNO_3 (μM)	0	10	60	60	0	10	10	60	0
Incubation time (days)	35	42	49	42	49	35	49	35	42

Scientific, Wilmington, USA) at $A_{260/280} \sim 1.8$ and $A_{260/230} \sim 2.0$. DNA quality and integrity were tested in a 1.2% agarose gel by staining DNA fragments with ethidium bromide. For the metAFLP technique, two samples of genomic DNA (2×500 ng) were prepared from each plant.

Obtaining DNA band profiles by metAFLP was performed for donor plants and regenerants according to the methodology described previously (Bednarek et al. 2007) and then modified (Machczyńska et al. 2014). The prepared DNA samples, two from each plant, were subjected to restriction enzyme digestion; the 6-bp cutting enzymes *Acc65I* and *KpnI* and the 4-bp cutting enzyme *MseI* were used (NEB Ipswich, Massachusetts, USA). Adapters were ligated onto the digested DNA fragments, and these fragments were then amplified using a polymerase chain reaction (PCR). After pre-selective PCR amplification, products were diluted with sterile distilled water (1:19 dilutions), of which 1.5 μ L was used as the template for selective PCR amplification with radio-labeled primer (labeling with γ^{32} P) and unlabeled *MseI*+YYY (Table 2). Electrophoresis was carried out on 7% polyacrylamide in $1 \times$ TBE buffer. Gels were exposed to X-ray film, then developed by a conventional procedure.

Analysis of data obtained by metAFLP

The metAFLP profiles were scored and generated binary presence-absence data matrices (1 for presence, 0 for absence of a band). Two matrices were prepared: one reflected fragments obtained with *Acc65I/MseI* (A) enzymes and the second with *KpnI/MseI* (K). The binary data from the two matrices were collated and compared. The *Acc65I* and *MseI* enzyme pair for cutting genomic DNA provided

information regarding changes in DNA sequence and methylation. On the other hand, cutting genomic DNA with *KpnI* and *MseI* enzymes provided information on DNA sequence variations (genetic variation). Comparing the two matrices allows DNA fragments to be extracted and describe changes in DNA methylation (epigenetic variation) and creates a third virtual matrix (M). Based on matrices K and M, we calculated the total number of loci generated in the analysis and expected heterozygosity (H_e) under the assumption of Hardy–Weinberg equilibrium in GenAlex (Excel add-in software). XLSTAT software was applied to agglomeration (UPGMA and dissimilarity Jaccard coefficients).

The quantitative characterization of TCIV was previously described in detail (Bednarek et al. 2007; Machczyńska et al. 2014), with some modifications accompanied by an Excel file capable of carrying out the relevant calculations (Orłowska and Bednarek 2020). This description included formulas for estimating SV, DMV, DNMV, and TCIV also in specific sequence contexts (CG, CHG—symmetrical, and CHH—asymmetrical) in which in vitro culture-induced changes may occur.

The values obtained during the estimation of in vitro culture-induced changes were analyzed using analysis of variance (one-way ANOVA) and ANOVA with Brown-Forsythe F when the data did not meet the assumptions of the Levene test (lack of homogeneity of variances in the study groups). The means for different metAFLP characteristics (TCIV, SV, DMV, DNMV) were compared with each other, also in different sequence contexts (CHH, CG, CHG) for regenerants obtained under different in vitro conditions (trials T1–T9). Multiple comparisons were checked with the Games-Howell post hoc test when the homogeneity of variance was violated. ANOVA was performed using XLSTAT software.

Table 2 Arrangement of primers used for selective DNA amplification of triticales donors and regenerants by the metAFLP technique

metAFLP oligomer	Sequence 5' → 3'
Labeled γ^{32} P selective oligonucleotides	
CG-GAC	CA TGC GTA CAG TAC CGA C
CG-GCA	CA TGC GTA CAG TAC CGC A
CG-GGC	CA TGC GTA CAG TAC CGG C
CG-TCG	CA TGC GTA CAG TAC CTC G
CXG-AGA	CA TGC GTA CAG TAC CAG A
CXG-AGC	CA TGC GTA CAG TAC CAG C
CXG-AGG	CA TGC GTA CAG TAC CAG G
CXG-ATG	CA TGC GTA CAG TAC CAT G
CXG-TGC	CA TGC GTA CAG TAC CTG C
CXG-TTG	CA TGC GTA CAG TAC CTT G
CXX-ATT	CA TGC GTA CAG TAC CAT T
CXX-TAA	CA TGC GTA CAG TAC CTA A
Selective oligonucleotides <i>MseI</i> +YYY	
M-CAC	GAT GAG TCC TGA GTA ACA C
M-CGT	GAT GAG TCC TGA GTA ACG T

Results

Twenty donor plants that were the generative progeny of a regenerant obtained through androgenesis showed no morphological differences from each other. Only one donor plant out of twenty from which immature zygotic embryos were obtained for the somatic embryogenesis process yielded 45 regenerants in all in vitro culture variants tested (T1–T9). The regenerants were morphologically identical to the donor plant independently of in vitro plant regeneration conditions (trials T1–T9).

The metAFLP resulted in fully stable and reproducible banding patterns amplified for donors and regenerants. Four hundred forty-four bands amplified with 13 primer pairs based on the KpnI/MseI (K) metAFLP platform were evaluated for donor plants. The Acc65I/MseI – KpnI/MseI (M) data reflecting DNA methylation changes resulted in 34 bands. There were 426 unique bands for donors derived under specific trial conditions and related to sequence variation. In contrast, a unique banding pattern related to DNA methylation change was exhibited by 16 signals (Table 3). The metAFLP analysis (with 11 primer pairs) concerning regenerants revealed the presence of 213 related to sequence variation and 39 to DNA methylation change; 186 and 12 were unique for regenerants representing selected trials. The He was lower for donors (0.007 for K and M) than for the regenerants set (0.014 for K and M markers) (Table 3). The polymorphic loci (%P) percentage was slightly lower for the K matrix than M for donors. Similar differences in the %P level were observed for K and M matrices for regenerants (Table 1). The %P for regenerants also indicated a lower value for sequence data (K) and a higher value for methylation data (M) (Table 3).

Agglomeration analysis of donor plants based on (K) and (M) data (Fig. 1a, b) shows donor plants exhibited higher variation based on M than on K. In both analyses, a single donor plant was somewhat apart from the other samples, which were more uniform but still formed three additional clusters.

Table 3 Total band patterns data for donors and regenerants for sequence (K) and methylation (M) pattern change markers

Characteristics	Donors		Regenerants	
	K	M	K	M
No. bands	444	34	213	39
No. private bands	426	16	186	12
Mean heterozygosity (He)	0.007	0.007	0.014	0.014
Standard error of mean He	0.002	0.002	0.004	0.004
Polymorphic loci (%P)	3.04	3.26	5.12	8.27
Standard error of %P	0.011	0.011	0.022	0.022

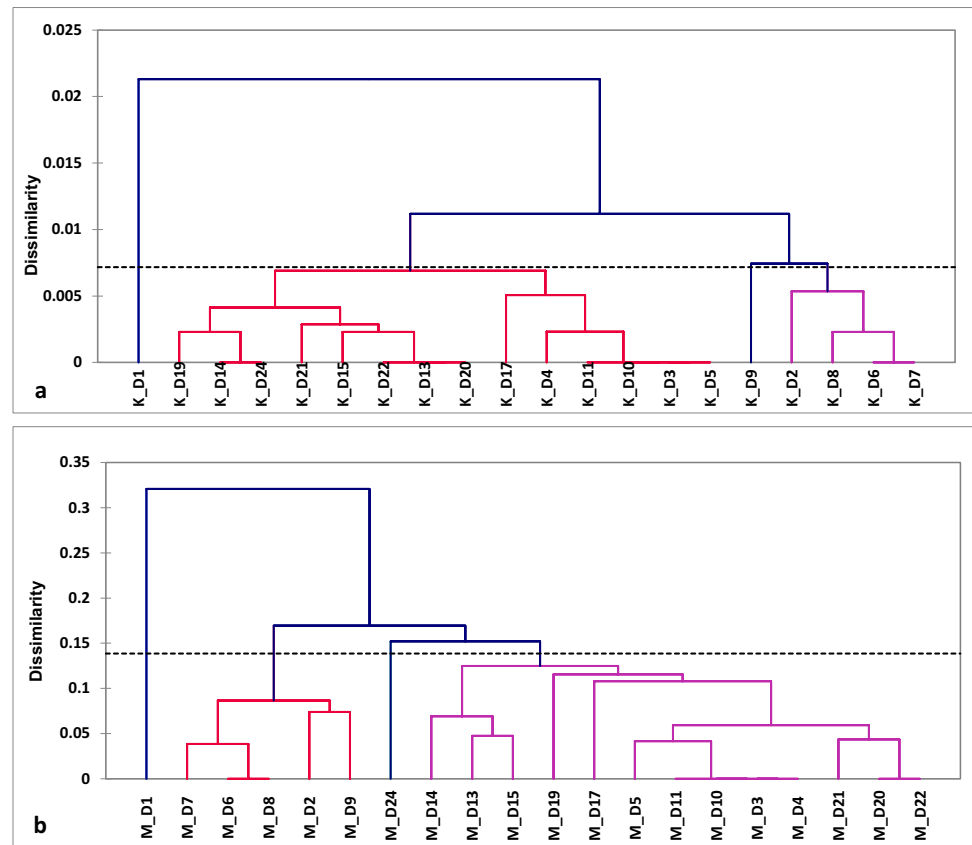
Factor analyses carried on K and M markers are congruent with the UPGMA analyses (Fig. 2a, b), where a single donor plant is apart from the other samples, possibly forming clusters encompassing individuals from different trials.

The metAFLP quantitative characteristics (Table 4) showed that the highest level of TCIV was observed for trial T2, with the lowest concentration of copper ions, intermediate levels of silver ions, and the intermediate incubation time of immature zygotic embryos on the IM (Table 1). In contrast, the highest level of copper ions applied, the intermediate level of silver ions, and the highest incubation time resulted in the slightest changes induced by the in vitro culture (T7). Among the components of TCIV, SV was the highest, and maximum and minimum levels of DNA sequence changes were recorded for regenerants from T2 and T7 trials, similarly to TCIV. However, DNA methylation changes were lower than SV and amounted to about 6% for DMV and 1% for DNMV. Furthermore, DMV was favored by the highest levels of copper and silver ions and the intermediate incubation time of the explants on the inducing media (T8), whereas the slightest demethylation events were recorded for the T2–T4 trials at the lowest copper and intermediate and highest silver ion concentrations; the incubation time of immature embryos on the IM for these trials was intermediate and the longest. Similar to DMV, the fewest de novo DNA methylation events were observed for T2–T4 and the highest for T5–T9 (Table 4).

According to Levene's test, the assumption of homogeneity of variance for trials in each metAFLP characteristic was violated (Table 4). ANOVA indicated differences between TCIV, SV, and DMV trials, while no differences were observed for DNMV (Table 4). Games-Howell's post hoc analysis for TCIV trials revealed that trials T1–T4 and T7–T9 compose separate groups; each group contains a trial with the highest or lowest in vitro induced variation level. Similar to TCIV, the Games-Howell test noted inter-trial significant differences for SV. For changes concerning DNA methylation, significant differences were noted only for DMV. The post hoc Games-Howell test indicated a homogeneous group that included regenerants from T1–T7 trials and distinct regenerants representing trial T8. Trial 8 included the regenerants with the highest DMV.

ANOVA and grouping according to the Games-Howell post hoc test indicated significant differences between individual metAFLP characteristics concerning symmetric and asymmetric sequence contexts. For SV and DMV, the most significant changes were observed in the symmetric CHG context and the least in the symmetric CG context. On the other hand, in the case of changes concerning DNMV, no such changes were observed in the symmetric CG context, and the highest DNMV was observed in the asymmetric CHH context (Table 5).

Fig. 1 Agglomeration analysis (UPGMA, Jaccard) based on sequence (K) (a) and virtual markers related to DNA methylation differences (M) (b) evaluated for donors



A detailed examination of the differences between the regenerants belonging to the different trials in the different characteristics of the metAFLP considering the CG, CHG, and CHH contexts showed that a higher variation was observed in the DNA sequence in the CHG context (21.55%) and the least in the CG (6.21%) (Fig. 3). Subsequently, between 4 and 0.45% of the changes were related to DMV in the CHG and CG contexts, and the least number of changes was related to DN MV (0–0.76%).

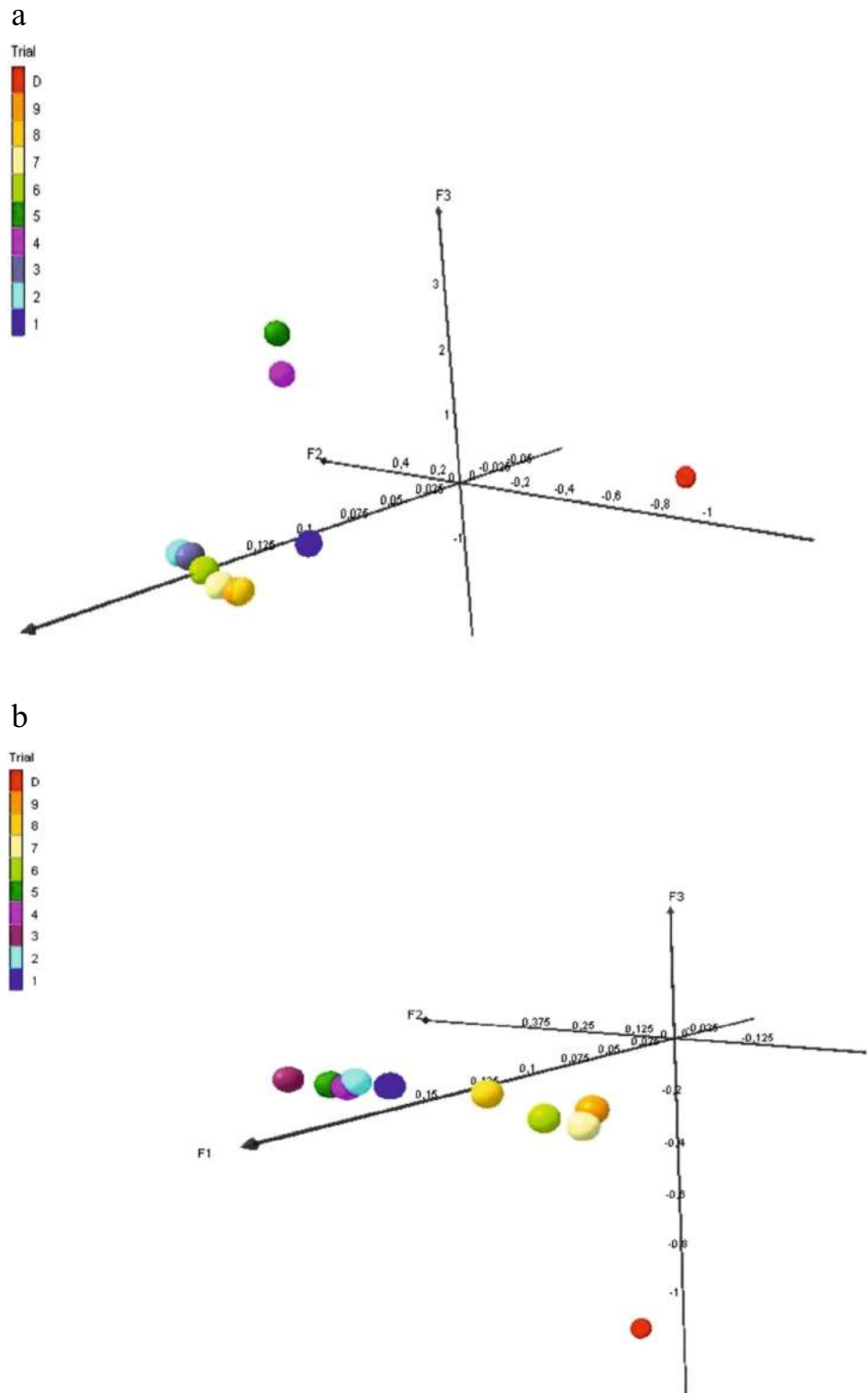
According to Levene's test, the assumption of homogeneity of variance for almost all tested metAFLP characteristics and sequence contexts violated the assumptions ($p < 0.0001$), apart from SV_CHG. Thus, ANOVA with a Tukey HSD post hoc test for SV_CHG indicated differences between trials. T1–T3, T4–T6, and T7–T9 trials are divided into separate groups. In the cases of SV_CG and DMV_CG, ANOVA with a Games-Howell post hoc test was used. This analysis for SV_CG indicated differences between regenerants belonging to trials T1–T4, T8, and T9. The same analysis was conducted for DMV_CG grouped regenerants from trials T1–T7, showing their distinctiveness from regenerants belonging to trials T8 and T9 (Table 6). Differences between regenerants obtained in

separate in vitro culture conditions for the other metAFLP characteristics and sequence contexts were insignificant.

Discussion

Regenerating plants via in vitro cultures is often affected by TCIV (Orłowska et al. 2021a), possibly due to in vitro culture conditions (Bednarek and Orłowska 2019). Such variation was also observed in triticales regenerants obtained by SE, where somaclones/regenerants differ in resistance to the *Fusarium* head blight (Góral and Arseniuk 1997), showing the variation of the mitochondrial atp6 gene region (Schmidt et al. 1996), or showing confirmed rearrangements in the mtDNA (Weigel et al. 1995). The use of the metAFLP method to study variation induced by tissue culture allowed the estimation of TCIV concerning changes in the sequence and methylation of genomic DNA (Machczyńska et al. 2014). Running experiments with the metAFLP technique require the appropriate research material, consisting of selected donor plants and their regenerants (Bednarek et al. 2007). Such material can attribute the observed changes to the action of in vitro culture. Hence, in the

Fig. 2 Visualization of factor analysis of molecular data based on sequence (K) (a) and virtual markers related to DNA methylation differences (M) (b) evaluated for donor D and its regenerants derived via somatic embryogenesis in the T1–T9 trials



present study, evaluating the level and characteristics of variation in triticale regenerants obtained under different in vitro conditions (T1–T9), donor plants were used, which are the generative progeny of the regenerant obtained

by androgenesis. All obtained donor plants showed no phenotypic changes and were identical to the initial plant, indicating their genetic uniformity. This result was also confirmed at the level of molecular patterns obtained

Table 4 Mean values for in vitro induced variation and its components for triticale regenerants, including grouping trials by the post hoc test

Trial [†]	metAFLP characteristics ^{††}			
	TCIV	SV	DMV	DNMV
T1	45.55 ^a	38.45 ^a	5.97 ^b	1.12 ^a
T2	45.62 ^a	38.57 ^a	5.93 ^b	1.11 ^a
T3	45.47 ^a	38.43 ^a	5.93 ^b	1.11 ^a
T4	45.40 ^a	38.35 ^a	5.93 ^b	1.11 ^a
T5	45.10 ^{ab}	38.01 ^{ab}	5.97 ^b	1.12 ^a
T6	45.10 ^{ab}	38.01 ^{ab}	5.97 ^b	1.12 ^a
T7	44.36 ^b	37.29 ^b	5.95 ^b	1.12 ^a
T8	44.84 ^b	37.39 ^b	6.33 ^a	1.12 ^a
T9	44.69 ^b	37.32 ^b	6.26 ^{ab}	1.12 ^a
Levene's test, <i>p</i>	0.037	0.027	0.0001	0.0001
Browne-Forsythe <i>F</i> -ratio	8.750	15.534	27.199	1.160
<i>p</i>	0.0001	0.0001	0.0001	0.429

[†]T1, control; T2–T9, experimental trials

^{††}The TCIV, SV, DMV, and DNMV characteristics reflect tissue culture-induced variation, sequence variation, demethylation, de novo methylation, respectively

The a, b and c superscript letters indicate Games-Howell grouping

Table 5 The results of ANOVA statistics and the Games-Howell post hoc tests demonstrating differences between DNA sequence contexts for the metAFLP characteristics

Methylation context	metAFLP characteristics		
	SV	DMV	DNMV
CHG	21.55 ^a	4.44 ^a	0.37 ^b
CG	6.21 ^c	0.45 ^c	0.00 ^c
CHH	10.21 ^b	1.13 ^b	0.76 ^a
Levene's test, <i>p</i>	0.0001	0.0001	0.0001
Browne-Forsythe <i>F</i> -ratio	26,015.670	22,620.932	439,028.173
<i>p</i>	0.0001	0.0001	0.0001

The a, b and c superscript letters indicate Games-Howell grouping

with the metAFLP technique. We obtained donor plants that revealed as little as 3.04% and 3.26% of polymorphic metAFLP loci concerning sequence and methylation changes, respectively. Also, the expected heterozygosity confirmed a low level of polymorphism of donor plants in the case of both matrices K and M. Cluster analysis showed that donors' genetic and epigenetic dissimilarities varied depending on whether genetic or methylation data were analyzed, indicating higher variation regarding changes in DNA methylation (0.7% K vs. 14% M). One plant was randomly selected from the pool of donor plants, and regenerants derived from this plant were included in the analysis to avoid the impact of pre-existing variation (Flinn

et al. 2020) on TCIV. This procedure avoided disturbances in TCIV that could result from potential variations introduced by the donors.

The evaluation of molecular data for regenerants obtained under different in vitro culture conditions showed that He and %P for regenerants were higher than for donors, which was expected due to tissue culture-induced stress. Furthermore, in regenerants also, more polymorphic fragments were observed for methylation data. Visualization of the factor analysis results for regenerants illustrated the clustering of regenerants forming individual trials and therefore obtained under different in vitro culture conditions. For sequence and DNA methylation data, the donor plant was located at the periphery of the regenerants. In contrast, the regenerants formed two groups, each reflecting Cu and Ag ion supplementation and modifications regarding the incubation time of immature zygotic embryos on IM. Thus, pointing to the applied modifications of the substrates and the conditions for obtaining regenerants as those that can influence the resulting changes detected at the molecular level.

The metAFLP analysis performed for triticale regenerants obtained in immature zygotic embryo cultures indicated a high level of TCIV ranging from 44.36 to 45.55%. The result obtained is higher than the TCIV observed in barley regenerants (8.74%) acquired in the same type of tissue culture (Orłowska 2021). However, the results received for TCIV do not generally differ from the level of changes induced in plant tissue culture in triticale regenerants derived by androgenesis (Orłowska et al. 2022), although they are slightly lower (45.13 somatic embryogenesis vs. 51.84 androgenesis). Such significant differences in TCIV levels for regenerants for two different kinds of grain cereal may be due to the genome specificity of each species. Barley is a self-pollinating, diploid species with $2n = 14$ chromosomes and a genome size of 5.1 Gbp (Sato 2020). On the other hand, triticale is a synthetic allopolyploid cereal species that combines wheat and rye chromosomes in its genome. When the parental genomes fuse to form a complex allopolyploid genome, rearrangements can occur in the genomes of the parental forms (Ma and Gustafson 2008), which can result in instability of the hybrid genome (Oleszczuk et al. 2019). Also, we can see that manipulation of the concentration of copper and silver ions in the IM is reflected in the level of TCIV, which is highlighted in the ANOVA results.

The presence of copper ions in in vitro culture media, whether in induction or regeneration ones, seems natural, given the importance of this micronutrient in plant function (Yruela 2009). Furthermore, copper is present in more than 100 enzymes involved in crucial life processes of plants (Burkhead et al. 2009); obtaining plants through in vitro cultures may indirectly lead to sequence variation in the genome of regenerants (Orłowska et al. 2021b). The highest

Fig. 3 Level of changes identified in regenerants across different metAFLP characteristics and sequence contexts

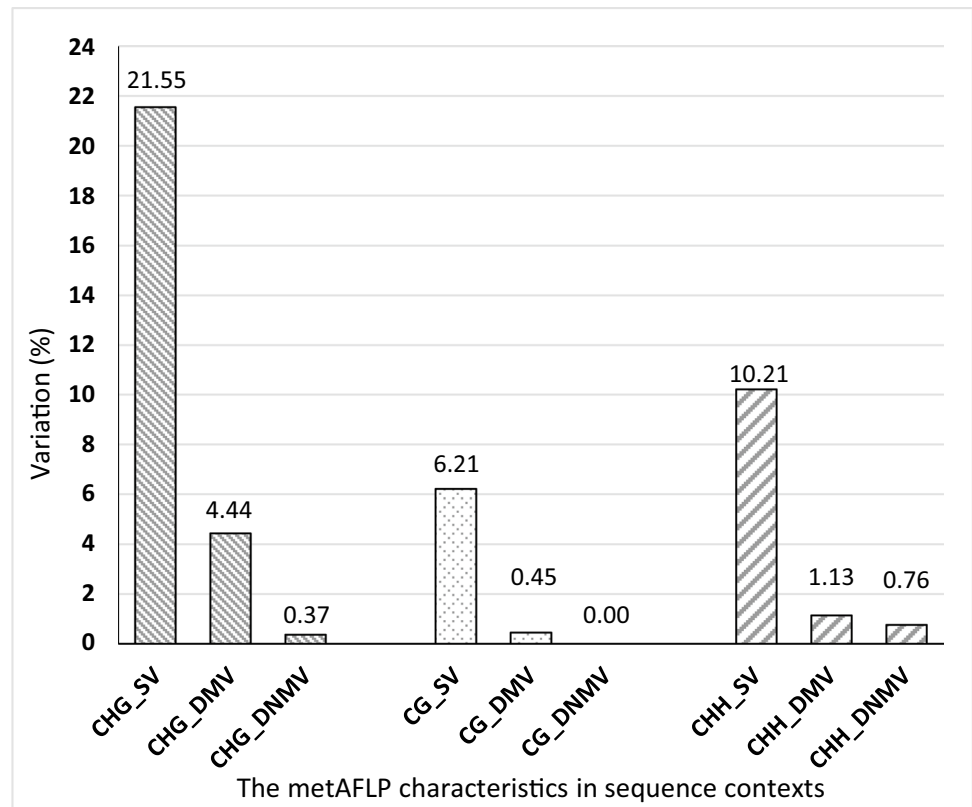


Table 6 ANOVA statistics for metAFLP characteristics considering sequence contexts (CHG, CG) for regenerants obtained in various in vitro conditions (trials T1–T9) with post hoc tests

Trial	metAFLP characteristics in methylation contexts		
	Sequence variation		Demethylation
	SV_CHG	SV_CG	DMV_CG
T1	22.02 ^a	6.20 ^c	0.37 ^b
T2	22.20 ^a	6.20 ^c	0.36 ^b
T3	22.05 ^a	6.20 ^c	0.36 ^b
T4	21.98 ^{ab}	6.20 ^c	0.36 ^b
T5	21.48 ^b	6.21 ^{bc}	0.37 ^b
T6	21.48 ^b	6.21 ^{bc}	0.37 ^b
T7	20.87 ^c	6.22 ^{bc}	0.37 ^b
T8	20.96 ^c	6.23 ^a	0.73 ^a
T9	20.88 ^c	6.23 ^a	0.73 ^a
Levene’s test, <i>p</i>	0.679	0.0001	0.0001
ANOVA <i>F</i> -test	23.214		
<i>p</i>	0.0001		
Browne-Forsythe <i>F</i> -ratio		6.951	2807.620
<i>p</i>		0.002	0.0001

The a, b and c superscript letters indicate grouping trials by post-hoc test

level of TCIV observed here was for the T2 trial, where the lowest level of $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (0.1 μM) was used. In contrast, the highest concentration of $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ (10 μM) resulted in the lowest observed TCIV level. These results are consistent with data for triticale regenerants obtained by androgenesis (Orłowska et al. 2022).

The variation induced in plant tissue cultures is genetic and epigenetic. Genetic variation, i.e., changes in DNA sequence, had the highest contribution to TCIV. Similarly, the highest contribution of SV to TCIV was observed in regenerants obtained by androgenesis (Machczyńska et al. 2015; Orłowska et al. 2022) and somatic embryogenesis (Machczyńska et al. 2015), although in the study by Machczyńska and co-authors, the level of SV was lower and oscillated around 19%. The in vitro culture conditions with the lowest $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ concentration showed the most remarkable genetic changes. It cannot be excluded that the minimum amount of copper does not provide an adequate amount of copper cofactor for the superoxide dismutase Cu/Zn-SOD.

Consequently, the dysfunction of the enzyme and oxidative stress, causing mutations in DNA (Poetsch 2020), may be elevated. Apart from SV, epigenetic changes were also observed in the regenerants, which concerned a decrease in DNA methylation (demethylation) and an increase in genomic DNA methylation compared to the donor plants; these changes were described as de novo

methylation. Changes in up- (DNMV-3.34%) or down- (5.15%) methylation were a lot smaller than changes in the sequence variation. Furthermore, differences between regenerants obtained under different in vitro culture conditions were noted only for DMV. ANOVA did not reveal differences between trials concerning DNMV. Regenerants from the T3–T4 trials had the lowest DMV in the presence of a minimal concentration of $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$.

In contrast, the highest copper ion concentration led to the most significant changes in DMV. This data is only partially consistent with the results for regenerants obtained by anther cultures. While concordance was observed for in vitro culture conditions leading to minimal DMV levels, the highest DMV levels in regenerants obtained by androgenesis were associated with minimal $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ concentrations. It appears that the high DMV associated with maximum $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ levels may reflect the action of copper as a factor responsible for ROS production. Elevated levels of ROS may lead to oxidative changes in methylated cytosine (Kurek et al. 2019) and, through repair mechanisms, to its removal (Zhu 2009) and consequently to a decrease in genomic DNA methylation.

Studies on the effect of AgNO_3 on the regeneration of plants show both positive (Hassan and Islam 2021) and negative (Anantasaran and Kanchanapoom 2008) effects of Ag ions on the production of regenerants. The present work combined the maximum and minimum levels of TCIV with moderate supplementation of IM with AgNO_3 (10 μM). The same was observed in the case of SV. Regenerants with the lowest level of DMV were derived in trials with moderate and the lowest level of AgNO_3 . Also, the highest level of DMV was observed in regenerants acquired in the presence of the highest value of AgNO_3 (60 μM). However, one cannot exclude the function of silver as a moderator and mediator in mediation or moderation analyses, where silver concentration as another third variable may influence the regression model.

The variation observed in DNA regenerants assigned to particular sequence contexts was the highest in CHG and CHH contexts. It is not fully congruent with what was observed for triticales regenerants obtained by androgenesis (Orłowska et al. 2022), where the CHG and CG contexts were the most affected. This result is slightly different from the data for plant genomes, where most changes concerning DNA methylation are related to the symmetric context CG for regenerants derived under varying in vitro culture conditions. Here was shown that significant differences between regenerants were recorded for SV in the symmetric CHG (SV_CHG) and CG (SV_CG) contexts and for DMV in the CG context (DMV_CG). Furthermore, for triticales regenerants obtained by androgenesis, differences were recorded for sequence variation (Pachota et al. 2022). Finally, comparing

the presented data with the results for barley, we observed that in the genome of barley regenerants received both by somatic embryogenesis and androgenesis, the changes between regenerants concerned all the sequence contexts (Orłowska 2021).

Analyzing different in vitro culture conditions for the changes assigned to SV in the CHG and CG contexts and DMV in the CG context, it can be seen that the highest level of SV in the CHG context is combined with minimal supplementation with copper ions and with the full range of silver concentrations and the full range of days of incubation of immature zygotic embryos on IM. This arrangement of data also applies to SV in the CG context and generally replicates the variation analysis performed for TCIV and SV without splitting the data into methylation contexts. In contrast, DMV in the CG context was highest in maximum $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ concentration (T8, T9) and the presence (60 μM) (T8) and absence (T9) of Ag ion supplementation. Furthermore, the incubation time of immature zygotic embryos on IM where the highest DMV was detected in the CG context was the lowest (37 days, T8) and moderate (42 days, T9). In contrast, differences between trials for the CG context concerning DMV were not observed for triticales regenerants obtained by androgenesis (Pachota et al. 2022). This relationship between in vitro culture conditions and DMV was similar to an analysis where demethylation changes were studied without considering methylation contexts. Therefore, an analysis that considers the level of variation for regenerants from different trials concerning sequence contexts potentially typifies copper ions as a factor that may influence the observed changes. However, other analyses would be required to determine how copper may affect SV and DMV in symmetric CHG and CG contexts.

Conclusions

The emergence of TCIV has an impact on the production of triticales regenerants from immature zygotic embryo cultures; furthermore, the magnitude of this variation seems to be influenced by the tissue culture conditions. The modifications that were noticed were impacted by the addition of copper salts to IM. However, the analyses carried out do not suggest the relevance of supplementation with silver salts or the influence of time as factors that can determine genetic and epigenetic alterations in triticales regenerants, at least within the scope of elementary statistical tests. Additionally, an in-depth investigation of the metAFLP technique's molecular data revealed certain DNA sequence contexts (CHG and CG) in which sequence-related alterations (SV_CG, SV_CHG), as well as DNA demethylation (DMV_CG), were noted. Therefore, we have a tendency to believe that

altering copper ion supplementation in the IM affects the balance of metabolic pathways and causes TCIV.

Author contribution R. O. conceptualization; K. A. P. and R. O. methodology and formal analysis and investigation; R. O. and K. A. P. writing—original draft preparation and writing—review and editing.

Funding This study was funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development (Poland), project no. HORhn-801-PB-22/15–18.

Data availability All data generated during this study are included in this published article.

Declarations

Conflict of interest The authors declare no competing interests.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Anantasaran J, Kanchanapoom K (2008) Influence of medium formula and silver nitrate on in vitro plant regeneration of Zinnia cultivars. *Songklanakarini J Sci Technol* 30:1–6
- Armstrong CL, Phillips RL (1988) Genetic and cytogenetic variation in plants regenerated from organogenic and friable, embryogenic tissue-cultures of maize. *Crop Sci* 28:363–369. <https://doi.org/10.2135/cropsci1988.0011183X002800020038x>
- Atak M, Kaya M, Khawar KM, Saglam S, Ozcan S, Ciftci CY (2008) Effect of age on somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of 5 Turkish triticale genotypes. *Afr J Biotechnol* 7:1765–1768
- Bednarek PT, Orłowska R (2020) Time of in vitro anther culture may moderate action of copper and silver ions that affect the relationship between DNA methylation change and the yield of Barley Green Regenerants. *Plants-Basel* 9:1064. <https://doi.org/10.3390/plants9091064>
- Bednarek PT, Orłowska R, Koebner RM, Zimny J (2007) Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biol* 7:10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-10>
- Bednarek PT, Orłowska R (2019) Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell Tiss Org* 140:245–257. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01724-1>
- Bednarek PT, Pachota KA, Dynkowska WM, Machczynska J, Orłowska R (2021) Understanding in vitro tissue culture-induced variation phenomenon in microspore system. *Int J Mol Sci* 22:7546. <https://doi.org/10.3390/ijms22147546>
- Beyer EM (1976) A potent inhibitor of ethylene action in plants. *Plant Physiol* 58:268–271. <https://doi.org/10.1104/pp.58.3.268>
- Burkhead JL, Gogolin Reynolds KA, Abdel-Ghany SE, CoHu CM, Pilon M (2009) Copper homeostasis. *New Phytol* 182:799–816. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02846.x>
- Carvalho CHS, Bohorova N, Bordallo PN, Abreu LL, Valicente FH, Bressan W, Paiva E (1997) Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes. *Plant Cell Rep* 17:73–76. <https://doi.org/10.1007/s002990050355>
- Cho MJ, Jiang W, Lemaux PG (1998) Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Sci* 138:229–244. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(98\)00162-9](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(98)00162-9)
- Chu CC (1978) The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: Hu H (ed) *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture*. Science Press, Peking, pp 43–50
- Dahleen LS (1999) Donor-plant environment effects on regeneration from barley embryo-derived callus. *Crop Sci* 39:682–685. <https://doi.org/10.2135/cropsci1999.0011183X003900020013x>
- Dahleen LS, Bregitzer P (2002) An improved media system for high regeneration rates from barley immature embryo-derived callus cultures of commercial cultivars. *Crop Sci* 42:934–938. <https://doi.org/10.2135/cropsci2002.0934>
- de la Puente R, González AI, Ruiz ML, Polanco C (2008) Somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) analyzed using polymorphic and sequenced AFLP markers. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 44:419–426. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9152-z>
- Diab MI (2017) In vitro propagation of the endangered date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Ghazal: 2- Improvement of germination and development of embryos by silver nitrate and silver thiosulfate. *IOSR-JBB* 3:66–74. <https://doi.org/10.9790/264X-03046674>
- Dordević B, Neděla V, Tihlaříková E, Trojan V, Havel L (2019) Effects of copper and arsenic stress on the development of Norway spruce somatic embryos and their visualization with the environmental scanning electron microscope. *New Biotech* 48:35–43. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2018.05.005>
- Duncan RR (1996) Tissue culture-induced variation and crop improvement. *Adv Agron* 58:201–240. [https://doi.org/10.1016/S0065-2113\(08\)60256-4](https://doi.org/10.1016/S0065-2113(08)60256-4)
- Eapen S, Rao PS (1985) Plant regeneration from immature inflorescence callus cultures of wheat, rye and triticale. *Euphytica* 34:153–159. <https://doi.org/10.1007/BF00022875>
- Eeckhaut T, Van Houtven W, Bruznican S, Leus L, Van Huylenbroeck J (2020) Somaclonal variation in *Chrysanthemum* × morifolium protoplast regenerants. *Front Plant Sci* 11. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.607171>
- Elena EB, Ginzo HD (1988) Effect of auxin levels on shoot formation with different embryo tissues from a cultivar and a commercial hybrid of wheat (*Triticum aestivum* L.). *J Plant Physiol* 132:600–603. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(88\)80261-X](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(88)80261-X)
- Etienne H, Bertrand B (2003) Somaclonal variation in *Coffea arabica*: effects of genotype and embryogenic cell suspension age on frequency and phenotype of variants. *Tree Physiol* 23:419–426. <https://doi.org/10.1093/treephys/23.6.419>
- Eudes F, Acharya S, Laroche A, Selinger LB, Cheng KJ (2003) A novel method to induce direct somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and regeneration of fertile green cereal plants. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 73:147–157. <https://doi.org/10.1023/A:1022800512708>
- Fernandez S, Michaux-Ferrière N, Coumans M (1999) The embryogenic response of immature embryo cultures of durum wheat (*Triticum durum* Desf.): histology and improvement by AgNO₃. *Plant Growth Regul* 28:147–155. <https://doi.org/10.1023/A:1006142504577>

- Fiuk A, Rybczyński JJ (2008) Genotype and plant growth regulator-dependent response of somatic embryogenesis from *Gentiana* spp. leaf explants. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 44:90–99. <https://doi.org/10.1007/s11627-008-9124-3>
- Flinn B, Dale S, Disharoon A, Kresovich S (2020) Comparative analysis of in vitro responses and regeneration between diverse bioenergy sorghum genotypes. *Plants-Basel* 9:248. <https://doi.org/10.3390/plants9020248>
- Ganesan M, Jayabalan N (2005) Carbon source dependent somatic embryogenesis and plant regeneration in cotton, *Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR2 through suspension cultures. *Indian J Exp Biol* 43:921–925
- Ghobeishavi H, Dorani Uliiae E, Alavikia SS, Valizadeh M (2015) Study of factors influencing somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Int J Adv Biol Biomed Res* 3:43–50
- Góral T, Arseniuk E (1997) Somaclonal variation in winter triticale for resistance to fusarium head blight. *Cereal Res Commun* 25:741–742. <https://doi.org/10.1007/BF03543830>
- Grauda D et al (2014) Anther culture effectiveness in producing doubled haploids of cereals. *Proc Latv Acad Sci Sect B* 68:142–147. <https://doi.org/10.2478/prolas-2014-0016>
- Hassan MF, Islam SMS (2021) Effect of silver nitrate and growth regulators to enhance anther culture response in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Heliyon* 7:e07075–e07075. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e07075>
- Hobson GE, Nichols R, Davies JN, Atkey PT (1984) The inhibition of tomato fruit ripening by silver. *J Plant Physiol* 116:21–29. [https://doi.org/10.1016/S0176-1617\(84\)80080-2](https://doi.org/10.1016/S0176-1617(84)80080-2)
- Immonen AST (1996) Influence of media and growth regulators on somatic embryogenesis and plant regeneration for production of primary triticales. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 44:45–52. <https://doi.org/10.1007/BF00045912>
- Jacquard C et al (2009) Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Rep* 28:1329–1339. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0733-z>
- Kaeppler SM, Kaeppler HF, Rhee Y (2000) Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Mol Biol* 43:179–188. <https://doi.org/10.1023/a:1006423110134>
- Kurek K, Plitta-Michalak B, Ratajczak E (2019) Reactive oxygen species as potential drivers of the seed aging process. *Plants-Basel* 8:174. <https://doi.org/10.3390/plants8060174>
- Larkin PJ, Scowcroft WR (1981) Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theor Appl Genet* 60:197–214
- Ma X-F, Gustafson JP (2008) Allopolyploidization-accommodated genomic sequence changes in triticale. *Ann Bot (lond)* 101:825–832. <https://doi.org/10.1093/aob/mcm331>
- Machczyńska J, Orłowska R, Zimny J, Bednarek PT (2014) Extended metaFLP approach in studies of the tissue culture induced variation (TCIV) in case of triticale. *Mol Breed* 34:845–854. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0079-2>
- Machczyńska J, Zimny J, Bednarek P (2015) Tissue culture-induced genetic and epigenetic variation in triticale (\times *Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. *Plant Mol Biol* 89:279–292. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0368-0>
- Malik WA et al. (2021) Exploring potential of copper and silver nano particles to establish efficient callogenesis and regeneration system for wheat (*Triticum aestivum* L.). *GM Crop Food*:1–22. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1917975>
- Méndez-Hernández HA et al (2019) Signaling overview of plant somatic embryogenesis. *Front Plant Sci* 10:77–77. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00077>
- Miroshnichenko D, Klementyeva A, Dolgov S (2021) The effect of daminozide, dark/light schedule and copper sulphate in tissue culture of *Triticum timopheevii*. *Plants-Basel* 10:2620
- Murashige T, Nakano R (1965) Morphogenetic behavior of tobacco tissue cultures and implication of plant senescence. *Am J Bot* 52:819–827. <https://doi.org/10.1002/j.1537-2197.1965.tb07253.x>
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nic-Can GI, Galaz-Ávalos RM, De-la-Peña C, Alcazar-Magaña A, Wrobel K, Loyola-Vargas VM (2015) Somatic embryogenesis: identified factors that lead to embryogenic repression. A case of species of the same genus. *PLoS One* 10:e0126414. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0126414>
- Oleszczuk S, Grzechnik N, Mason AS, Zimny J (2019) Heritability of meiotic restitution and fertility restoration in haploid triticale. *Plant Cell Rep* 38:1515–1525. <https://doi.org/10.1007/s00299-019-02462-6>
- Oleszczuk S, Sowa S, Zimny J (2004) Direct embryogenesis and green plant regeneration from isolated microspores of hexaploid triticale (*Triticosecale* Wittmack) cv. Bogo *Plant Cell Rep* 22:885–893. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0796-9>
- Orłowska R (2021) Barley somatic embryogenesis-an attempt to modify variation induced in tissue culture. *J Biol Res* 28:9. <https://doi.org/10.1186/s40709-021-00138-5>
- Orłowska R, Bednarek PT (2020) Precise evaluation of tissue culture-induced variation during optimisation of in vitro regeneration regime in barley. *Plant Mol Biol* 103:33–50. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00973-5>
- Orłowska R, Pachota KA, Androsiuk P, Bednarek PT (2022) Triticale green plant regeneration is due to DNA methylation and sequence changes affecting distinct sequence contexts in the presence of copper ions in induction medium. *Cells* 11:84
- Orłowska R, Pachota KA, Dynkowska WM, Niedziela A, Bednarek PT (2021a) Androgenic-induced transposable elements dependent sequence variation in barley. *Int J Mol Sci* 22:6783. <https://doi.org/10.3390/ijms22136783>
- Orłowska R, Pachota KA, Machczyńska J, Niedziela A, Makowska K, Zimny J, Bednarek PT (2020) Improvement of anther cultures conditions using the Taguchi method in three cereal crops. *Electron J Biotechnol* 43:8–15. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2019.11.001>
- Orłowska R, Zimny J, Bednarek PT (2021b) Copper ions induce DNA sequence variation in zygotic embryo culture-derived barley regenerants. *Front Plant Sci* 11:614837–614837. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.614837>
- Pachota KA, Orłowska R, Bednarek PT (2022) Medium composition affects the tissue culture-induced variation in triticale regenerants. *Plant Cell Tissue Organ Cult*. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02327-z>
- Padmaja G, Reddy V, Reddy G (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from mature embryo callus. *Indian J Exp Biol* 30:181–184
- Paladi RK, Rai AN, Penna S (2017) Silver nitrate modulates organogenesis in *Brassica juncea* (L.) through differential antioxidant defense and hormonal gene expression. *Sci Hortic* 226:261–267. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.038>
- Patzak J, Henychová A, Svoboda P, Malířová I (2021) Evaluation of methylation epigenetics changes in micropropagated hop plants. *Acta Hort* 1328:17–22. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2021.1328.2>
- Poetsch AR (2020) The genomics of oxidative DNA damage, repair, and resulting mutagenesis. *Comp Struct Biotechnol J* 18:207–219. <https://doi.org/10.1016/j.csbj.2019.12.013>
- Przetakiewicz A, Orczyk W, Nadolska-Orczyk A (2003) The effect of auxin on plant regeneration of wheat, barley and triticale. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 73:245–256. <https://doi.org/10.1023/A:1023030511800>
- Purnhauser L, Gyulai G (1993) Effect of copper on shoot and root regeneration in wheat, triticale, rape and tobacco tissue cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 35:131–139. <https://doi.org/10.1007/bf00032962>

- Purnhauser L, Medgyesy P, Czako M, Dix PJ, Márton L (1987) Stimulation of shoot regeneration in *Triticum aestivum* and *Nicotiana glumbaginifolia* Viv. tissue cultures using the ethylene inhibitor AgNO₃. *Plant Cell Rep* 6:1–4. <https://doi.org/10.1007/bf00269725>
- Rojas-Lorz L, Arrieta-Espinoza G, Valdez-Melara M, Pereira LFP, Gatica-Arias A (2019) Influence of silver nitrate on somatic embryogenesis induction in Arabica coffee (*Coffea arabica* L.). *Braz Arch Biol Technol* 62
- Sato K (2020) History and future perspectives of barley genomics. *DNA Res* 27:dsaa023. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsaa023>
- Schmidt M, Walz C, Hesemann CU (1996) Somaclonal variation of the mitochondrial ATPase subunit 6 gene region in regenerated triticale shoots and full-grown plants. *Theor Appl Genet* 93:355–360. <https://doi.org/10.1007/BF00223176>
- Taguchi G (1986) Introduction to quality engineering: designing quality into products and processes; White Plains, UNIPUB/quality resources; Dearborn, Mich., American Supplier Institute: NY p. 181
- Thomas J, Raj Kumar R, Mandal AK (2006) Metabolite profiling and characterization of somaclonal variants in tea (*Camellia* spp.) for identifying productive and quality accession. *Phytochemistry* 67:1136–1142. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2006.03.020>
- Vega R, Vásquez N, Espinoza AM, Gatica AM, Valdez-Melara M (2009) Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). *Rev Biol Trop* 57:141–150
- Vikrant RA (2001) Comparative study of somatic embryogenesis from immature and mature embryos and organogenesis from leaf-base of Triticale. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 64:33–38. <https://doi.org/10.1023/A:1010627630651>
- Warchoł M, Juzoń K, Dziurka K, Czyczyło-Mysza I, Kapłoniak K, Marcińska I, Skrzypek E (2021) The effect of zinc, copper, and silver ions on oat (*Avena sativa* L.) androgenesis. *Plants-Basel* 10:248
- Weigel R, Wolf M, Hesemann CU (1995) Mitochondrial DMA variation in plants regenerated from embryogenic callus cultures of CMS triticale. *Theor Appl Genet* 91:1237–1241. <https://doi.org/10.1007/bf00220934>
- Wen F, Sorensen EL, Barnett FL, Liang GHL (2004) Callus induction and plant regeneration from anther and inflorescence culture of Sorghum. *Euphytica* 52:177–181
- Wu LM, Wei YM, Zheng YL (2006) Effects of silver nitrate on the tissue culture of immature wheat embryos. *Russ J Plant Physiol* 53:530–534. <https://doi.org/10.1134/S1021443706040157>
- Yruela I (2009) Copper in plants: acquisition, transport and interactions. *Funct Plant Biol* 36:409–430. <https://doi.org/10.1071/FP08288>
- Zavattieri M, Frederico A, Lima M, Sabino R, Arnholdt-Schmitt B (2010) Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology*. *Electron J Biotechnol* 13. <https://doi.org/10.2225/vol13-issue1-fulltext-4>
- Zehr BE, Williams ME, Duncan DR, Widholm JM (1987) Somaclonal variation in the progeny of plants regenerated from callus cultures of seven inbred lines of maize. *Can J Bot-Rev Can Bot* 65:491–499. <https://doi.org/10.1139/b87-061>
- Zhu JK (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* 43:143–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-102108-134205>
- Zimny J, Rybczyński JJ (1985) Somatic embryogenesis of triticale. In: Horn W, Jensen CJ, Odenbach W, Schieder O (eds) Genetic manipulation in plant breeding: Proceedings International Symposium Organized by EUCARPIA, September 8–13, 1985, Berlin (West), Germany. De Gruyter, pp 507–510. <https://doi.org/10.1515/9783110871944-091>

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Comparison of tissue culture-induced variation in triticale regenerants obtained by androgenesis and somatic embryogenesis

Katarzyna A. Pachota¹

Received: 1 April 2022 / Accepted: 4 August 2022
© The Author(s) 2022

Abstract

Triticale is becoming an increasingly important livestock crop production. This is evidenced by increasing triticale-producing areas and by improved yields. In addition, meeting the increasing demand for cereals involves the introduction of high-yielding and stress-resistant varieties into breeding. In vitro culture techniques can accelerate the development of new varieties. Therefore, it seems extremely important to develop efficient plant regeneration methods through in vitro cultures and to understand the mechanisms involved in gaining regenerants. Obtaining regenerants of triticale through somatic embryogenesis and androgenesis may lead to tissue culture-induced variation. In the present study, we compared regenerants obtained in both regeneration systems (anther and immature zygotic embryo cultures), considering the level of genetic and epigenetic changes observed in different DNA sequence contexts for methylated cytosine (CG, CHG, CHH). The changes concerning the DNA sequence (so-called sequence variation) and the changes concerning the DNA methylation patterns, i.e., the removal of methylated cytosine (DNA demethylation) and the introduction of methylation to cytosine (de novo DNA methylation), were analyzed. We observed that regenerants derived via somatic embryogenesis and androgenesis differ notably for demethylation in the symmetrical CG sequence context and de novo methylation in the asymmetrical CHH context. These changes may be related to the reprogramming of microspore development from gametophytic to sporophytic and lack of such process in zygotic embryos.

Keywords Triticale · Somatic embryogenesis · Androgenesis · Tissue culture-induced variation · metAFLP · DNA methylation

Introduction

The botanical tribe *Triticeae* includes cereal genera such as *Triticum*, *Hordeum*, *Secale*, *Aegilops*, and others (Soreng et al. 2017). Species belonging to different genera of this tribe can cross to a greater or lesser extent. Thanks to such abilities, the cross between wheat and rye, *Triticosecale* was created by Wilson in 1875. Wilhelm Rimpau evaluated the first fertile triticale plants in 1888 (Franke and Meinel 1990). After more than 130 years, triticale has developed from a botanical peculiarity to an economically important cereal, as shown by the increasing yield of this cereal from 2.5 t ha⁻¹

in 1975 to 4 t ha⁻¹ in 2020 (FAO 2020). By crossing wheat with rye, it has become to combine the advantages of wheat, such as high protein content in the grain, with the disease, cold, and drought resistance of rye. It is still essential to understand the biology of this species through biochemical, biological, and genetic studies, in which in vitro technique cultures can be a helpful tool.

Somatic embryogenesis is crucial for cereal transformation processes since somatic embryos serve as an ideal material for genetic transformation studies because of their competency in expressing incorporated DNA. However, an efficient and effective regeneration system is necessary for applying genetic transformation and functional genomics studies of important agronomy plants. Somatic embryogenesis in triticale was first reported at the end of 1980s (Stolarz and Lörz 1986; Zimny and Rybczyński 1986). In those studies, somatic embryos were obtained from triticale callus. Since triticale is a new, intergeneric hybrid, there is a constant need to expand the genetic diversity and the number

Communicated by J. Pauk.

✉ Katarzyna A. Pachota
katarzyna.anna.pachota@gmail.com

¹ Plant Breeding and Acclimatization Institute – National Research Institute, 05-870 Błonie, Radzików, Poland

of varieties for breeding. In the aspect of deriving new triticale varieties, *in vitro* culture methods can be extremely useful. In this context, cultures of isolated microspores or anther cultures to obtain doubled haploid (DH) plants play a significant role. For triticale, two systems were known for the production of DH plants, the first based on chromosome elimination (Laurie and Bennett 1989) and the second based on microspore embryogenesis (androgenesis) in anther culture or isolated microspore cultures. First triticale anther culture-derived haploid regenerants were obtained by Wang et al. (1973). In contrast, work on protocols for obtaining doubled triticale haploids in isolated microspore cultures has been successful for the group managed by Pauk et al. (2000). Subsequent years of research developed existing protocols for obtaining triticale DH to improve regeneration efficiency, but a significant breakthrough was using a spikes cooling step (Charmet and Bernard 1984; Lantos et al. 2014; Wurschum et al. 2012). Cold stress is a major factor that alters microspore development from the gametophytic to the sporophytic pathway (Smýkal 2000; Testillano 2020). Finally, the development of *in vitro* cultures based on androgenesis in triticale resulted in the first DH plants for this species (Fossati et al. 1998; González et al. 1997; Wędzony 2003).

Obtaining regenerants of triticale either by somatic embryogenesis or androgenesis is associated with somaclonal or otherwise tissue culture-induced variation (TCIV). Plants obtained in artificial conditions show some genetic (Bebeli et al. 1988) or biochemical changes (Deepthi 2018), which may be reflected by plant morphology (Jordan and Larter 1985), DNA sequence (Machczyńska et al. 2015), DNA (Machczyńska et al. 2014a) or histone (Pérez et al. 2015) methylation patterns, or gene transcription level (Zhang et al. 2010). Since triticale regenerants can be used for a variety of purposes, it is vital whether such plants will be loaded with TCIV or not. While for the improvement of genetic diversity, the presence of somaclones is positive (Jain 2001; Schellenbaum et al. 2008), for the production of highly genetically uniform material, such variability can be a problem because it leads to a loss of reliability (Rani and Raina 2000). Furthermore, a disadvantage of using somaclonal variation as a source of somaclones is that the results of somaclonal variation cannot be predicted. Also, it can be challenging to control changes of a genetic or epigenetic nature in regenerants.

Nevertheless, recent studies on barley obtained in immature zygotic embryos and anther cultures have shown that TCIV levels can be influenced by supplementing induction media with simple micronutrients such as silver and copper salts (Bednarek and Orłowska 2020a; Orłowska et al. 2021). In the case of triticale, no such extensive studies on *in vitro* induced variation have been conducted so far, like in older and naturally derived species. Considering the above and that triticale is an evolutionarily new species, artificially

created and characterized by genetic instability, studies on TCIV may be necessary as basic research and a practical one for obtaining triticale regenerants in tissue cultures.

The present work aimed to compare qualitative and quantitative characteristics of metAFLP for triticale regenerants obtained via androgenesis and somatic embryogenesis. In addition, this work attempts to indicate which way of obtaining triticale regenerants may be more beneficial regarding the tissue culture-induced variation in regenerants.

Materials and methods

Plant material

Triticale donor plants (*X Triticosecale* Wittm., cultivar T28/2) were grown under controlled conditions to an appropriate developmental stage from which explants could be collected. The obtained plants came from a cross between cv. Presto × cv. Mungis and made available by Sylwia Oleszczuk (Plant Breeding and Acclimatization Institute-NRI, Radzików, Poland). Tillers for anther culture were cut when microspores were at the mid-to the uninucleate stage. Then, the cut tillers were subjected to cold stress (4 °C) in the dark for 20 days. After this time, the spikes were sterilized, and anthers were removed onto induction media. The collection of tillers for immature zygotic embryos (IZE) culture was after 12–16 days of self-pollination. Caryopses were immediately removed from the harvested spikes, and after disinfection, IZE were excised out and lined on induction media (IM).

Callus induction and plant regeneration

Anther cultures (androgenesis)

In anther cultures, 190-2 medium (Zhuang and Xu 1983) with 90 g l⁻¹ maltose and 438 mg l⁻¹ glutamine, supplemented with 2 mg l⁻¹ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 0.5 mg l⁻¹ kinetin, was used for induction. The anthers were incubated in the dark at 26 °C. Induction media were made in nine T1-T9 variants testing the effects of copper and silver ions, and time on genetic and epigenetic variation induced in plant tissue culture. Variant T1 contained a standard amount of CuSO₄ × 5H₂O (0.025 mg l⁻¹) and was not supplemented with silver salts (AgNO₃). In contrast, the final concentrations in variants T2–T9 ranged from 0.1 to 10 μM CuSO₄ × 5H₂O and from 0 to 60 μM AgNO₃. The incubation time ranged from 35 to 49 days. From the 35th day of incubation, emerging calli and embryos were transferred to regeneration medium 190-2 (Zhuang and Xu 1983) supplemented with naphthalene acetic acid at a concentration of 0.5 mg l⁻¹ and kinetin at a concentration of 1.5 mg l⁻¹.

Incubation on regeneration medium was carried out at 26 °C in a 16 h/8 h light/dark photoperiod. Green plants were rooted in glass flasks with N6I medium (Chu 1978) supplemented with indole-3-acetic acid at a dose of 2 mg l⁻¹ and then transplanted into pots with a mixture of soil and sand and vernalized for six weeks at 4 °C. Leaves were collected from young plantlets for DNA isolation.

Immature zygotic embryo culture (somatic embryogenesis)

In immature zygotic embryo cultures, MS medium (Murashige and Skoog 1962) with 2 mg l⁻¹ of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid was used to induce somatic embryogenesis. As in the anther cultures, induction media were prepared in nine variants with the same Cu and Ag ion supplementation and identical incubation time of the explants on IM. IZE were incubated on IM at 26 °C in a photoperiod of 16 h/8 h (light/dark). After a few days, the first callus and embryos were recorded and transferred to a regeneration medium the same for anther culture. All subsequent steps of regeneration and obtaining plantlets were performed in the same way as for anther cultures. From the seedlings of regenerants, leaves were taken for DNA isolation. Finally, regenerants that were obtained after incubation of explants on induction medium after 35, 42, and 49 days were taken for analysis.

Molecular assays

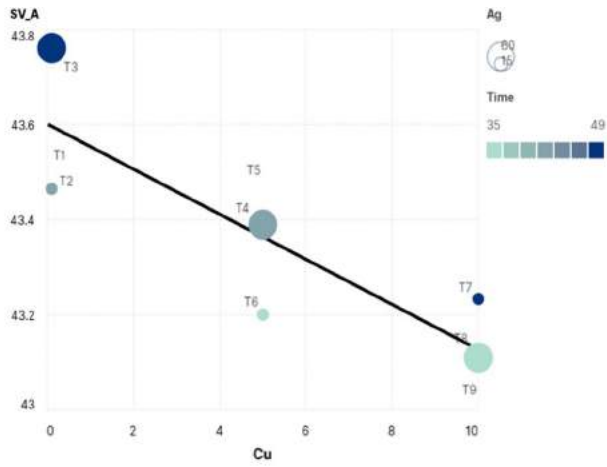
Young leaves of regenerants from anther cultures, IZE cultures, and donor plants were collected. DNA was extracted using the Plant DNeasy MiniPrep Kit (Qiagen, Hilding, Germany). DNA concentration was checked using a Nanodrop spectrophotometer (Thermo Scientific). The integrity of DNA was tested in 1.2% agarose gel electrophoresis. For methylation sensitive Amplified Fragment Length Polymorphism (metAFLP) manipulation, there were prepared 2 × 500 ng of DNA for each plant.

Forty-four regenerants derived from anther cultures and a donor plant and 45 regenerants derived from IZE cultures and the donor plant were selected for analysis by the metAFLP technique. All steps of the metAFLP technique were performed with the previously published procedure of Bednarek et al. (2007) with modifications according to Machczyńska et al. (2014b). DNA fragments were amplified in two steps: a preselective PCR reaction followed by selective PCR with appropriate primers (Pachota et al. 2022). After selective PCR, DNA samples were diluted with water 1:20. PCR products were electrophoresed in 7% polyacrylamide gel and fixed on X-ray films, and then visualized via developing photography chemicals. The metAFLP products (clearly identifiable and repetitive) were scored as present (1) or absent (0) based on the electropherograms. There were two sets of bands profiles, one generated from the separation

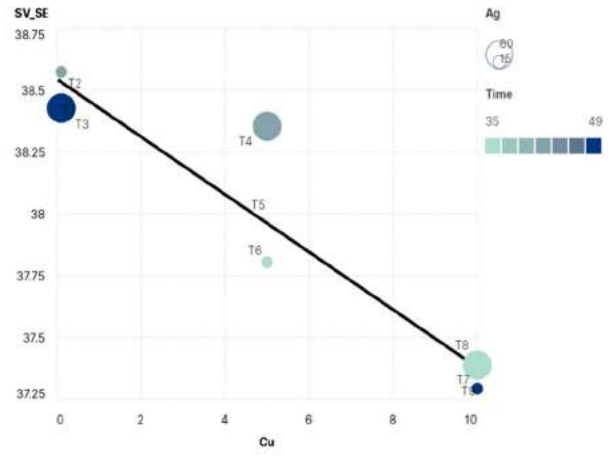
of DNA fragments derived from the Acc65I and MseI, and second generated with KpnI and MseI restriction enzymes. The DNA strand arrays obtained were matched against each other according to the primers used for the selective PCR reaction, and the presence of DNA fragments was compared. The Acc65I and MseI enzyme pair allow information to be obtained regarding changes in sequence and DNA methylation. In contrast, KpnI and MseI enzymes cut the same DNA samples to obtain information regarding changes in the DNA sequence. Such a comparison of the two DNA fragment matrices is possible because the properties of the restriction enzymes used, Acc65I and KpnI, are isoschizomers that recognize the same nucleotide sequence but cut DNA depending on the presence of a methyl group in the cytosine. Appropriately selected plant material consisting of a donor plant that is the generative progeny of regenerants obtained by androgenesis and the regenerants derived from it provide a basis for estimating tissue culture-induced variation (TCIV). Hence, comparing with each other the DNA profiles for the donor plant and its regenerants obtained from DNA cutting with two sets of restriction enzymes allowed us to reveal changes in DNA sequence (sequence variation—SV) and changes in DNA methylation (DNA demethylation—DMV) and de novo DNA methylation—DNMV). Using specially designed selective primers directed toward symmetric and asymmetric DNA sequences evaluated in the metAFLP technique allows identifying CG, CHG, and CHH methylation changes contexts. A detailed description of the metAFLP enumeration system and the assignment of methylation contexts was reported previously (Orłowska and Bednarek 2020). For individual regenerants obtained in IZE cultures and anther cultures, the level of metAFLP characteristics (SV, DMV, DNM) forming TCIV was quantified and expressed as percentages (%). Then, the characteristics for the regenerants from IZE and anther cultures were compared on graphs, also taking into account the methylation contexts (CG, CHG, and CHH). The graphs were generated using SCImago Graphica Beta 1.0.17 software (www.graphica.app).

Results

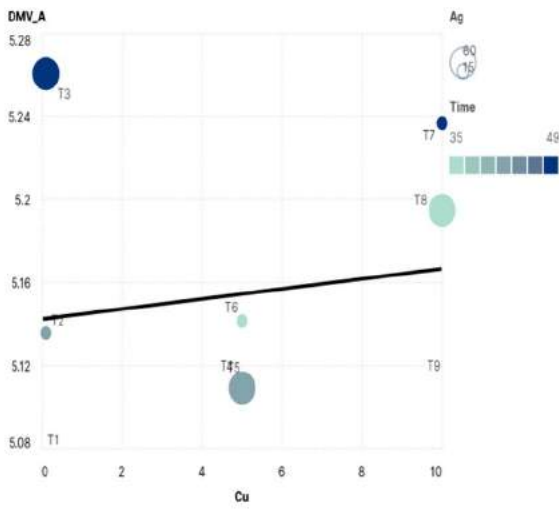
Only minor differences could be detected when comparing regenerants derived from androgenesis ‘A’ and somatic embryogenesis ‘SE’ using general metAFLP characteristics concerning Cu(II) ion concentration in the induction media (IM). In both cases, the increase in Cu(II) concentration results in the decrease of sequence variation (SV) (Fig. 1 a, b). No apparent dependence on the time of anther culture is seen. The same is valid for the Ag(I) concentration. DNA demethylation (DMV) increases in ‘A’ and ‘SE’ with Cu(II) elevation in the induction medium (Fig. 1c, d). However,



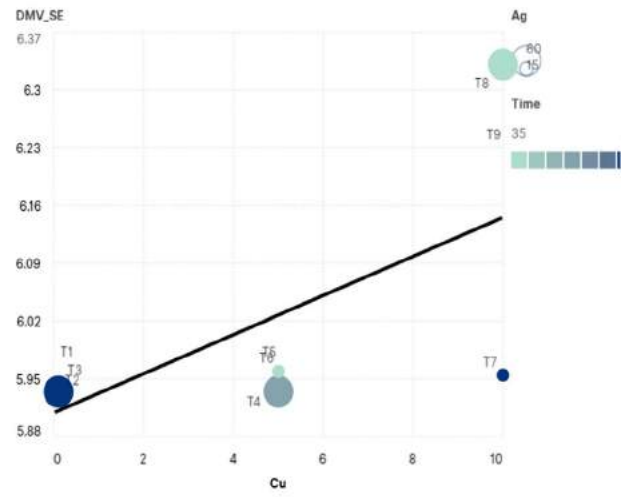
a



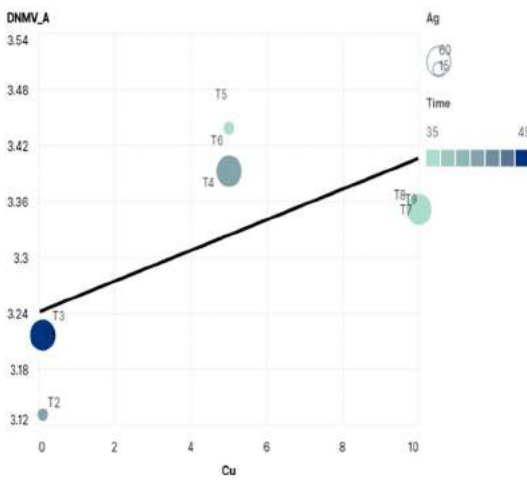
b



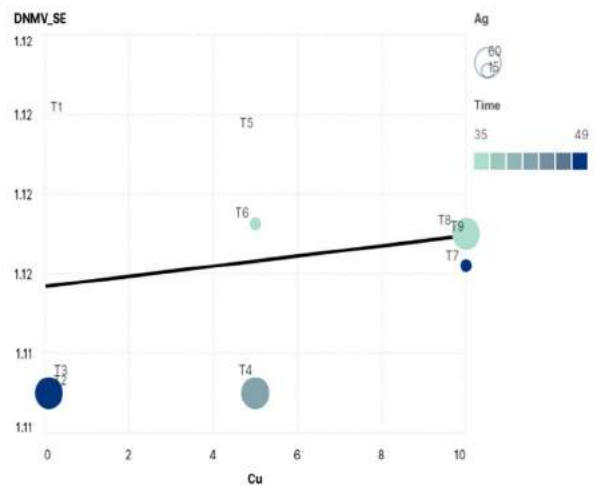
c



d



e



f

Fig. 1 The relationship between Cu(II) and sequence variation (SV) for anther-derived ‘A’ regenerants (a) and somatic embryo-derived regenerants ‘SE’ (b); Cu(II) and DNA demethylation (DMV) for ‘A’ (c), and ‘SE’ (d); Cu (II) and de novo DNA methylation (DNMV) for ‘A’ (e) and ‘SE’ (f) based on general metAFLP characteristics. Time (days) of tissue cultures is given as color; Ag (I) concentration is shown as circles of different diameters

the trend is more pronounced in ‘SE.’ The DMV is more evident under the highest Ag(I) concentration (T8), whereas under the lowest one and the longest time of anther culture is the lowest. Under anther culture, the reverse is observed. De novo DNA methylation (DNMV) is higher in ‘A’ than in ‘SE’ when Cu(II) increases (Fig. 1e, f). Both time and Ag(I) are not key players here.

The relationship between DNMV and SV evidences that with the increase of DNMV, SV decreases (Fig. 2a, b). However, no apparent dependence is seen on Ag(I) concentration and time of anther culture. A similar comparison of DMV and SV shows that SV slightly increases in ‘A’ but decreases in ‘SE’ (Fig. 2c, d). Furthermore, the highest DMV is reflected by trials T8 and T9 with the highest Cu(II) and Ag(I) in ‘SE’, whereas in ‘A’ also, high Cu(II) and Ag(I) is observed with increased DMV; however, the dependence is less pronounced.

Comparison of sequence variation for regenerants derived from androgenesis ‘A’ and somatic embryogenesis ‘SE’ in sequence contexts shows that asymmetric CHH (Fig. 3a) and symmetric CG (Fig. 3b) sequences seem to be nearly

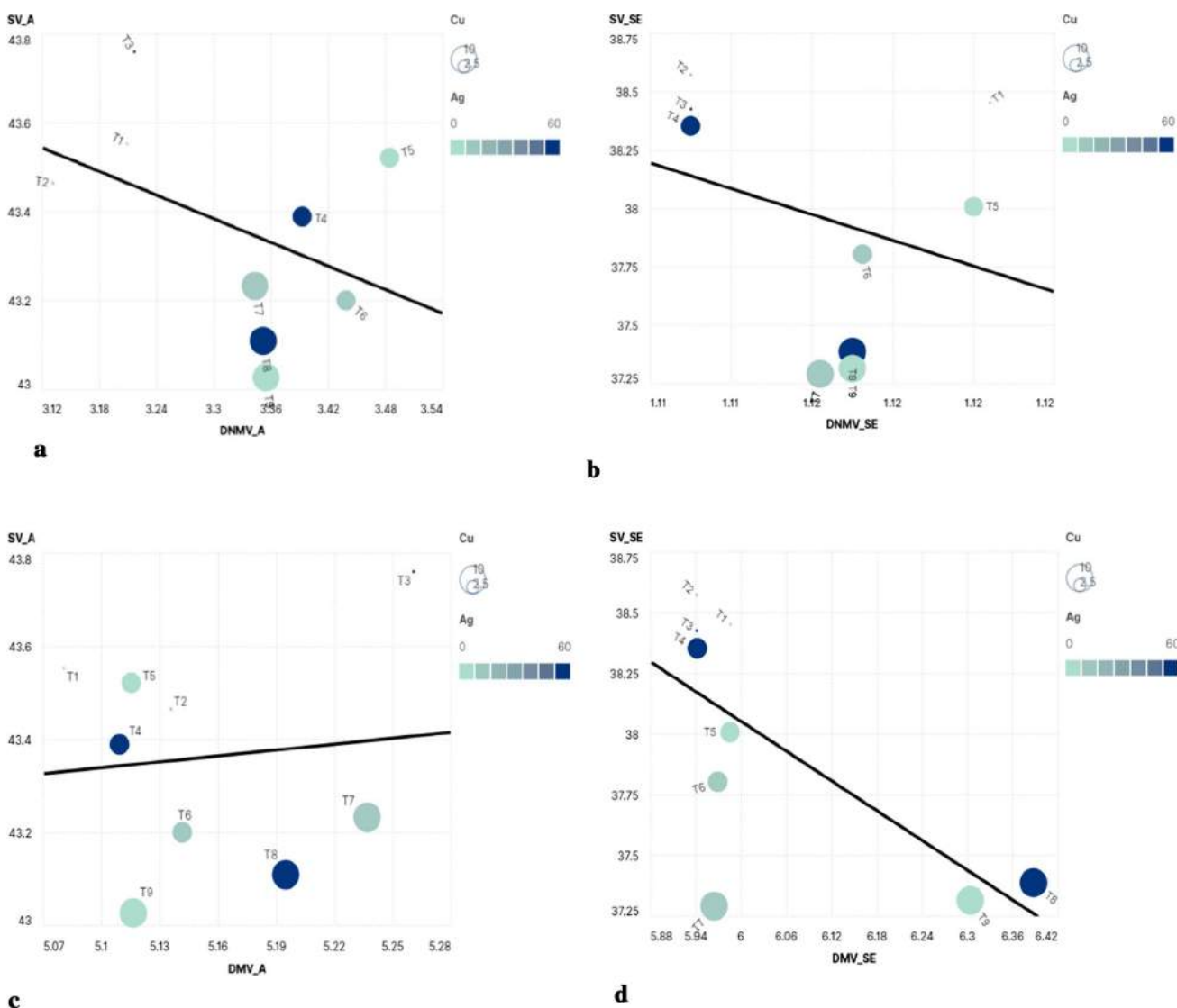


Fig. 2 The relationship between sequence variation (SV) and de novo DNA demethylation (DNMV) for anther-derived ‘A’ regenerants (a) and somatic embryo-derived regenerants ‘SE’ (b) and between

SV and demethylation (DMV) ‘A’ (c), and ‘SE’ (d) based on general metAFLP characteristics; Ag(I) concentration is given as color; Cu(II) concentration is shown as circles of different diameters

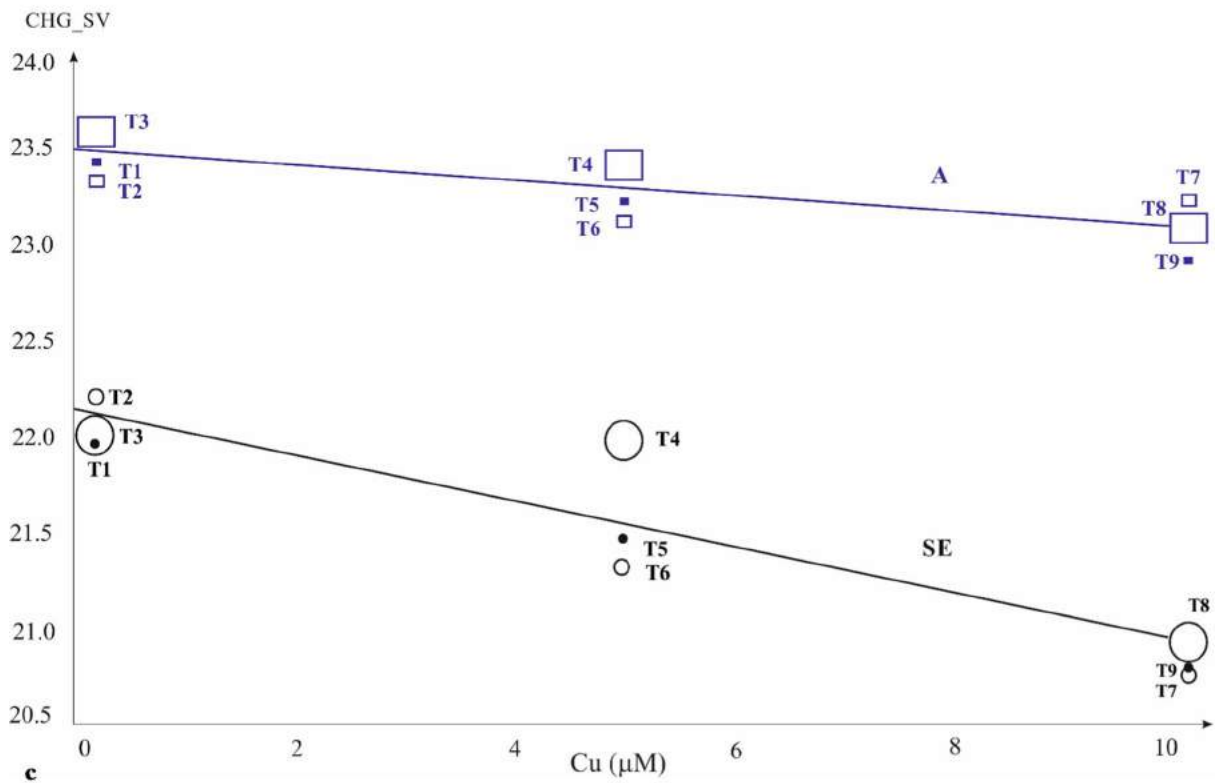
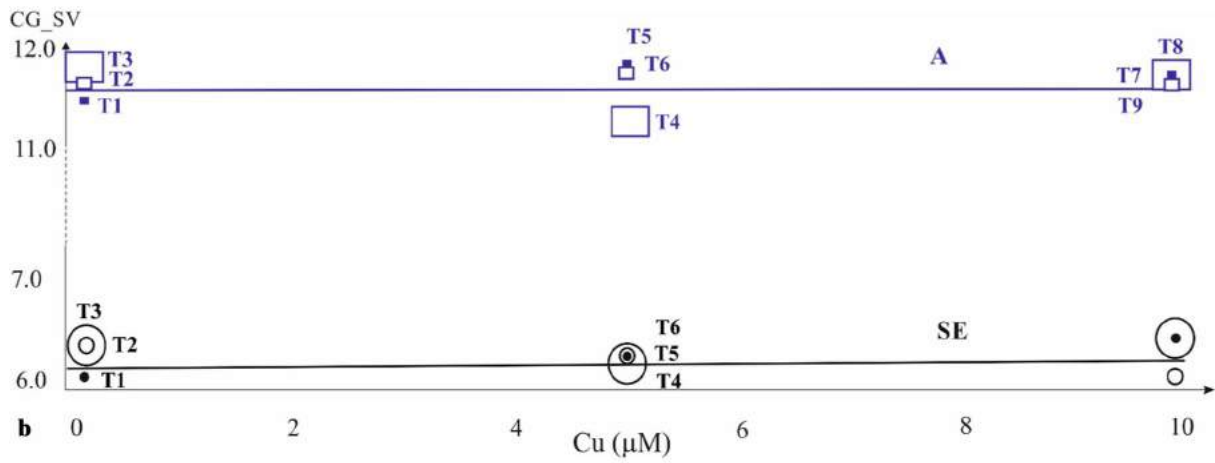
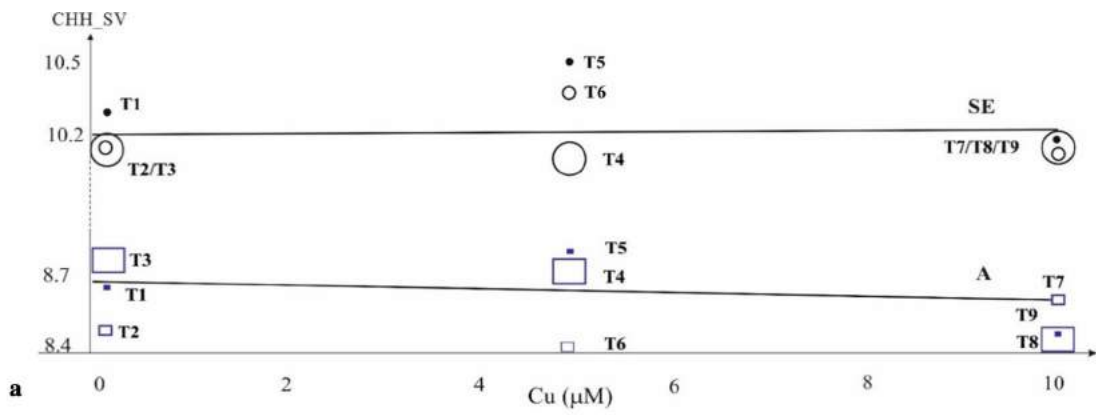


Fig. 3 a The relationship between Cu(II) ion concentration in the IM and sequence variation level (in %) affecting CHH asymmetric sequence context for anther-derived 'A' regenerants and somatic embryo-derived regenerants 'SE'; Ag(I) concentration is given as circles/dots and squares/filled squares from the smallest to the biggest (0, 10, 60 μ M). **b** The relationship between Cu(II) ion concentration in the IM and sequence variation level (in %) affecting CG symmetric sequence context for anther-derived 'A' regenerants and somatic embryo-derived regenerants 'SE'; Ag(I) concentration is given as circles/dots and squares/filled squares from the smallest to the biggest (0, 10, 60 μ M). **c** The relationship between Cu(II) ion concentration in the IM and sequence variation level (in %) affecting CHG symmetric sequence context for anther-derived 'A' regenerants and somatic embryo-derived regenerants 'SE'; Ag(I) concentration is given as circles/dots and squares/filled squares from the smallest to the biggest (0, 10, 60 μ M)

constant with increasing Cu(II) ion concentration in the IM (maybe in 'A' a slight decrease in sequence variation level is evidenced). However, SV affecting CHH contexts is higher for the 'SE' than for 'A'. The opposite is observed for the CG sequence contexts. Contrasting 'SE' and 'A' for the CHG sequence contexts shows that increasing Cu(II) ions decreases sequence variation within the contexts in both tissue culture regeneration methods (Fig. 3c). However, the decrease in 'SE' is higher than in 'A' with increased Cu(II), but a higher level of SV is evidenced for 'A'.

Comparing the contexts, the DNA demethylation level (DMV) for "SE" is higher than that for "A" in CHH and CHG contexts (Fig. 4a, c). In contrast, the opposite situation is observed in the CG context, where the DMV level is higher in "A" than in "SE" (Fig. 4b). The evaluation of the impact of Cu(II) ions in the IM on DNA demethylation level within sequence contexts for 'SE' and 'A' demonstrates that in the CHH context, DNA demethylation affecting 'SE' regenerants somewhat increases with Cu(II) concentration, whereas decreases for the 'A' derived plants (Fig. 4a). Comparing 'SE' and 'A' in CG context indicates the increase of SV with Cu(II) with higher changes affecting 'SE' than 'A' (Fig. 4b). Nevertheless, the level of DMV is higher for A than for 'SE'. No change in DMV due to Cu(II) ion concentration was found for the CHG sequence context (Fig. 4c). Again, different levels of DMV could be seen for 'SE' and 'A' depending on sequence context type, which is higher for 'SE' in the CHH and CHG contexts. No evident dependence on Ag(I) of anther culture could be seen.

Possibly the most pronounced differences between 'SE' and 'A' derived regenerants could be seen in the case of relationships between Cu(II) and de novo DNA methylation (DNMV) affecting asymmetric (CHH) sequence contexts (Fig. 5a). While in 'SE', increasing Cu(II) seems not to impact DNMV in 'A' de novo methylation increases with Cu(II) concentration. Still, DNMV in 'SE' is higher than in 'A'. The DNMV of other sequence contexts (Fig. 5b, c) for 'SE' and 'A' behave similarly and is constant. However,

DNMV of those contexts is higher for 'A' than for 'SE' derived regenerants. Again, no apparent influence of Ag(I) could be seen.

Discussion

The comparison of the androgenesis 'A' and somatic embryogenesis 'SE' due to change in Cu(II) concentration supplemented in the induction media (IM) indicates that, in general, DNA demethylation and de novo methylation differ between the two approaches. Such a trend aligns with the cell reprogramming step (Feng et al. 2010). In anther cultures, DNA demethylation accompanies the switch of microspores from gametophytic to sporophytic fate (Solís et al. 2012). In the case of embryogenesis, in light of the available studies, it appears that the initiation of embryogenesis, whether it occurs as zygotic embryogenesis or any asexual embryogenesis, including somatic embryogenesis, is associated with strong activation of DNA methyltransferases (Jullien et al. 2012), which is not dependent on fertilization (Park et al. 2020) and does not differ between zygotic and somatic embryogenesis. In contrast, the initiation of embryogenesis is not initiated by the fertilization process but by other signals that affect methylation patterns in the early embryo regardless of whether it originates from zygotic or asexual embryogenesis (Markulin et al. 2021). Apart from stress conditions, the synthetic auxin, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), is a factor that significantly influences the initiation of somatic embryogenesis (Ikeda-Iwai et al. 2002; Mordhorst et al. 1998). Furthermore, exogenous auxin, which promotes somatic embryogenesis, increases DNA methylation in carrot cell cultures (Lo Schiavo et al. 1989). Such effect is due to the 2,4-D regulation of genes encoding DNA methyltransferases and downregulation of demethylases (Grzybkowska et al. 2018). However, another work on somatic embryogenesis indicates an inverse effect of 2,4-D on methylation levels and embryogenic competence, as reflected by DNA hypomethylation at early embryonic stages in *Pinus nigra* (Noceda et al. 2009). Given the divergent results of global DNA methylation during somatic embryogenesis, it is assumed that the level of DNA methylation is not explicitly related to embryogenesis but is related to the effect of in vitro culture per se (composition of the media) and probably reflects the epigenetic state of the explants (Wójcikowska et al. 2020). In embryogenesis, resetting or decreasing DNA methylation levels could be an essential step of cell fate transition from the vegetative to embryogenic (Nic-Can and De la Peña 2014). In some way, DNA demethylation in 'A' and 'SE' plays the same role in both two approaches; however, in the case of microspores with haploid chromosomes, the reestablishment of the methylation pattern, especially in asymmetric sequence context

Fig. 4 a The relationship between Cu(II) ion concentration in the IM and DNA demethylation variation level (in %) affecting CHH asymmetric sequence context for anther-derived 'A' regenerants and somatic embryo-derived regenerants 'SE'; Ag(I) concentration is given as circles/dots and squares/filled squares from the smallest to the biggest (0, 10, 60 μ M). **b** The relationship between Cu(II) ion concentration in the IM and DNA demethylation variation level (in %) affecting CG symmetric sequence context for anther-derived 'A' regenerants and somatic embryo-derived regenerants 'SE'; Ag(I) concentration is given as circles/dots and squares/filled squares from the smallest to the biggest (0, 10, 60 μ M). **c** The relationship between Cu(II) ion concentration in the IM and DNA demethylation variation level (in %) affecting CHG symmetric sequence context for anther-derived 'A' regenerants and somatic embryo-derived regenerants 'SE'; Ag(I) concentration is given as circles/dots and squares/filled squares from the smallest to the biggest (0, 10, 60 μ M)

and the symmetric one (CHG) being either under epigenetic or partially epigenetic control may be problematic. That is possibly why DMV in 'SE' is more apparent than in 'A', whereas DNMT in 'A' is more apparent than in 'SE'.

The analysis of SV as a function of Cu(II) affecting different contexts shows that in CG and CHH ones, the difference between 'A' and 'SE' is only quantitative, whereas CHG-related SV drops faster in 'SE' than in 'A'. In androgenesis, CHG sequence context methylation is controlled (epi)genetically, whereas CHH is via an epigenetic mechanism (Gent et al. 2013; Law and Jacobsen 2010; Stroud et al. 2014; Zemach et al. 2013). Assuming that epigenetics participates in both cases and methylation leads to SV, it is apparent that putative problems with DNA methylation reestablishment could explain a slight decrease in SV for CHH in 'A'.

DMV due to Cu(II) in the IM is most pronounced for the CG context. While in 'A', the increase in DMV of the contexts is less evident with Cu(II) in the IM, in SE, it seems to proceed faster; however, in general, it is less quantitative than in 'A'. Most probably, DNA demethylation of the CG site reflects the process of DNA demethylation during the replication stage (Liu and Lang 2020). The differences in DMV of the CG contexts concerning 'A' and 'SE' may reflect the differences in DNA demethylation of the two sources of explants. It cannot be excluded that the metAFLP approach could detect more changes in putatively more heterozygous explants that originated from diploid tissue, which might result in overall lower values of DMV in 'SE'. In CHH and CHG sites, DMV behaves nearly identically in 'A' and 'SE', with a lack of decrease or increase of its values for the CHG in 'A' and 'SE' and negligible decrease in DMV in 'A' for CHH context. Interestingly, the overall value of DMV for all Cu(II) concentrations was lower for 'A' than for 'SE' for the CHG and CHH contexts. Possibly, the observed data reflect some epigenetic mechanisms affecting methylation of the two contexts in contrast to the CG one.

Here, Cu(II) concentration impacts CHH DNMT; with increased Cu(II) concentration, DNMT increases in 'A,'

whereas 'SE' remains constant. Thus, DNMT of the CHH is under epigenetic control (Gent et al. 2013; Law and Jacobsen 2010; Stroud et al. 2014; Zemach et al. 2013). Changing the development pathway of microspores toward androgenesis requires epigenetic reprogramming occurring after induction of microspores into a totipotent state and initiation of microspore embryogenesis (androgenesis). Such reprogramming involves a global decrease in DNA methylation and activation of cell proliferation, followed by an increase in DNA methylation and differentiation into the embryo (El-Tantawy et al. 2014; Rodríguez-Sanz et al. 2014; Solís et al. 2012, 2015; Testillano et al. 2013). More detailed studies on specific DNA methylation contexts performed during somatic embryogenesis in soybean show that DNA methylation increases during somatic embryo development. To the contrary, the increase in methylation in the CHH context may be related to an active transcriptional silencing program that enhances genome-wide DNA methylation during somatic embryo development (Ji et al. 2019). In addition, it should be noted that asymmetric DNA methylation (CHH) is mainly removed from male gametes and then restored after fertilization. Additionally, CHH methylation levels are reduced in the nucleus of the sperm cell while showing significantly higher levels in microspores. It may suggest a conflict between methylation maintenance and demethylation during male germline development (Walker et al. 2018). Our result indicating higher DNMT levels with an increase in copper ions during 'A' compared to 'SE' may indicate the involvement of methylation in CHH context during reprogramming of microspore development and the absence of such an effect during somatic embryo formation in immature zygotic embryo cultures. Furthermore, CHH context DNA de novo methylation may be critical for the expression of genes impacting plant regeneration. Interestingly, CG and CHG DNMT was not affected by Cu(II) concentrations remaining constant. However, in both cases DNMT was higher for CG and CHG in 'A' than in 'SE' which is the reversed case compared to CHH DNMT. We tend to think that the differences reflect epigenetic aspects of DNMT affecting asymmetric sequence context.

The other intriguing result is that sequence variation decreases with DNMT in 'SE' while reversed, but a less expressed trend is seen in 'A'. The result seems to be in line with the fact that the less DNA is methylated, the less it is subjected to mutations due to, i.e., oxidative stress (Lewandowska-Gnatowska et al. 2014). On the other hand, DNMT in 'A' and 'SE' behave in a very similar way. If oxidative stress is responsible for SV, one might expect that increasing DNMT the SV should increase. Still, the opposite is seen. While the explanation is not apparent, we speculate that maybe after the demethylation stage, de novo methylation

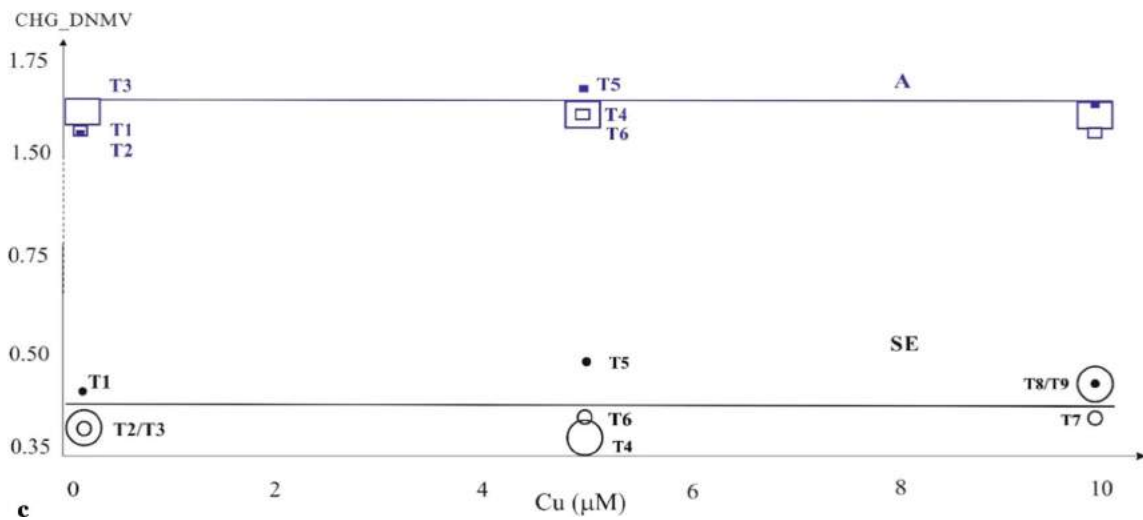
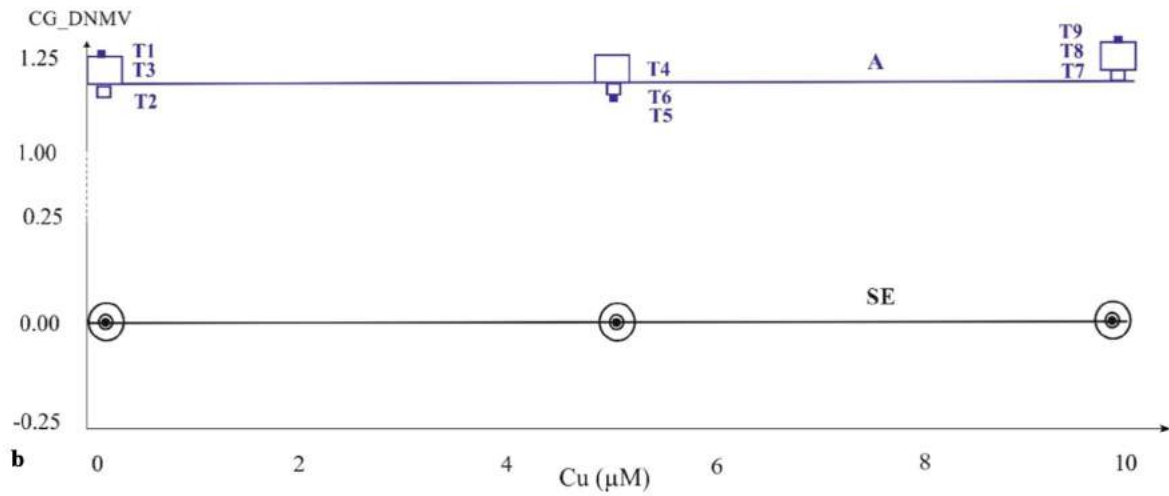
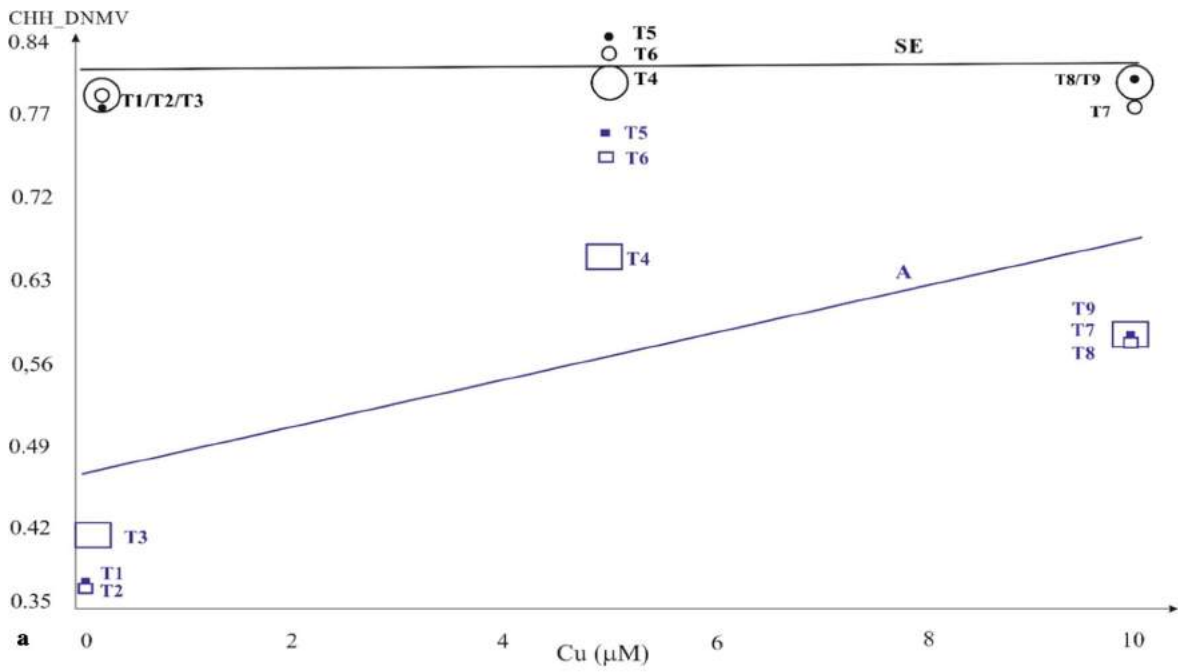


Fig. 5 a The relationship between Cu(II) ion concentration in the IM and de novo DNA methylation variation level (in %) affecting CHH asymmetric sequence context for anther-derived 'A' regenerants and somatic embryo-derived regenerants 'SE'; Ag(I) concentration is given as circles/dots and squares/filled squares from the smallest to the biggest (0, 10, 60 μ M). **b** The relationship between Cu(II) ion concentration in the IM and de novo DNA methylation variation level (in %) affecting CG symmetric sequence context for anther-derived 'A' regenerants and somatic embryo-derived regenerants 'SE'; Ag(I) concentration is given as circles/dots and squares/filled squares from the smallest to the biggest (0, 10, 60 μ M). **c** The relationship between Cu(II) ion concentration in the IM and de novo DNA methylation variation level (in %) affecting CHG symmetric sequence context for anther-derived 'A' regenerants and somatic embryo-derived regenerants 'SE'; Ag(I) concentration is given as circles/dots and squares/filled squares from the smallest to the biggest (0, 10, 60 μ M)

runs with limited stress conditions resulting in decreased SV with increased DNMTV.

Literature reports indicate a positive effect of silver ions on the efficiency of somatic embryogenesis (Bashir et al. 2022; Malik et al. 2021). Silver ions may also affect sequence variation (Ag⁺ ions acted as a mediator), observed in barley regenerants obtained in anther cultures (Bednarek and Orłowska 2020a). Also, manipulating AgNO₃ concentration with prolonged culture time affected the production of green barley regenerants (Bednarek and Orłowska 2020b). Unfortunately, such an effect of silver ions was not observed in the case of triticale regenerants obtained by androgenesis and somatic embryogenesis based on the presented results. The effect of culture time was also not observed in the case of the experiment presented; therefore, this factor was not included in the graphs. In the present work, the culture time is related to incubating explants (anthers and immature zygotic embryos) on induction media. On the other hand, there are known reports where culture time/culture duration influenced the production of secondary metabolites and biomass in plant tissue cultures (de Andrade Figueiró et al. 2010). Furthermore, the manipulation of plant tissue culture duration is reflected in somaclonal variation, which increases with a multiplying number of subcultures (passages) and may relate to accumulating changes in DNA methylation (Eeuwens et al. 2002; Rival et al. 2013).

Summing up, androgenesis and embryogenesis differ in sequence contexts, with the most exhibited differences concerning CG_DMV and CHH_DNMV due to Cu(II) concentration. Our data suggest that the differences reflect the switch from gametophytic to sporophytic pathway in 'A' missing in 'SE' and some not apparent aspects of epigenetic mechanisms affecting 'A' and 'SE'.

Author contributions Not applicable.

Funding This research was funded by the Ministry of Agriculture and Rural Development, Poland (grant no. HORh-801-PB-22/15-18).

Code availability Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

Ethical approval This article does not contain any studies with human participants or animals performed by the author.

Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

References

- Bashir MA, Silvestri C, Salimonti A, Rugini E, Cristofori V, Zelasco S (2022) Can ethylene inhibitors enhance the success of olive somatic embryogenesis? *Plants* 11:168
- Bebeli P, Karp A, Kaltsikes PJ (1988) Plant regeneration and somaclonal variation from cultured immature embryos of sister lines of rye and triticale differing in their content of heterochromatin. *Theor Appl Genet* 75:929–936. <https://doi.org/10.1007/BF00258056>
- Bednarek PT, Orłowska R (2020a) CG demethylation leads to sequence mutations in an anther culture of barley due to the presence of Cu, Ag ions in the medium and culture time. *Int J Mol Sci* 21:4401. <https://doi.org/10.3390/ijms21124401>
- Bednarek PT, Orłowska R (2020b) Time of in vitro anther culture may moderate action of copper and silver ions that affect the relationship between DNA methylation change and the yield of barley green regenerants. *Plants* 9:1064. <https://doi.org/10.3390/plant9091064>
- Bednarek PT, Orłowska R, Koebner RMD, Zimny J (2007) Quantification of the tissue-culture induced variation in barley (*Hordeum vulgare* L.). *BMC Plant Biol* 7:10. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-7-10>
- Charmet G, Bernard S (1984) Diallel analysis of androgenetic plant production in hexaploid Triticale (*X. triticosecale*, Wittmack). *Theor Appl Genet* 69:55–61. <https://doi.org/10.1007/BF00262539>
- Chu CC (1978) The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: Hu H (ed) Proceedings of symposium on plant tissue culture. Science Press, Peking, pp 43–50
- de Andrade FA, Manira Correa C, Vieira Astarita L, Romanato Santarém E (2010) Long-term maintenance of in vitro cultures affects

- growth and secondary metabolism of St. John's Wort. *Ciencia Rural* 40:2115–2121
- Deepthi VP (2018) Somaclonal variation in micro propagated bananas. *Adv Plants Agric Res* 8:624–627. <https://doi.org/10.15406/apar.2018.08.00395>
- Eeuwens CJ, Lord S, Donough CR, Rao V, Vallejo G, Nelson S (2002) Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of “manted” flowering in clonally propagated oil palm *Plant Cell. Tissue Organ Culture* 70:311–323
- El-Tantawy AA, Solís MT, Risseño MC, Testillano PS (2014) Changes in DNA methylation levels and nuclear distribution patterns after microspore reprogramming to embryogenesis in barley. *Cytogenet Genome Res* 143:200–208. <https://doi.org/10.1159/000365232>
- FAO (2020). <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>. Accessed 17 Mar 2022
- Feng S, Jacobsen SE, Reik W (2010) Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330:622–627. <https://doi.org/10.1126/science.1190614>
- Fossati D, Jaquiere R, Fossati A (1998) Agronomical performance of triticale F1 hybrids. In: *Proceedings of the 4th International Triticale Symposium*, pp 26–31
- Franke R, Meinel A (1990) History of the first fertile amphidiploid wheat X rye hybrid W. Rimpau's triticale. *Cereal Res Commun* 18:103–109
- Gent JI, Ellis NA, Guo L, Harkess AE, Yao Y, Zhang X, Dawe RK (2013) CHH islands: de novo DNA methylation in near-gene chromatin regulation in maize. *Genome Res* 23:628–637. <https://doi.org/10.1101/gr.146985.112>
- González M, Hernández I, Jouve N (1997) Analysis of anther culture response in hexaploid triticale. *Plant Breed* 116:302–304
- Grzybkwaska D, Morończyk J, Wójcikowska B, Gaj MD (2018) Azacitidine (5-AzaC)-treatment and mutations in DNA methylase genes affect embryogenic response and expression of the genes that are involved in somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Growth Regul* 85:243–256. <https://doi.org/10.1007/s10725-018-0389-1>
- Ikeda-Iwai M, Satoh S, Kamada H (2002) Establishment of a reproducible tissue culture system for the induction of *Arabidopsis* somatic embryos. *J Exp Bot* 53:1575–1580
- Jain SM (2001) Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 118:153–166
- Ji L et al (2019) Genome-wide reinforcement of DNA methylation occurs during somatic embryogenesis in soybean. *Plant Cell* 31:2315–2331. <https://doi.org/10.1105/tpc.19.00255>
- Jordan MC, Larter EN (1985) Somaclonal variation in triticale (*X*Triticosecale Wittmack) cv Carman. *Can J Genet Cytol* 27:151–157. <https://doi.org/10.1139/g85-023>
- Jullien Pauline E, Susaki D, Yelagandula R, Higashiyama T, Berger F (2012) DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 22:1825–1830. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2012.07.061>
- Lantos C, Bóna L, Boda K, Pauk J (2014) Comparative analysis of in vitro anther- and isolated microspore culture in hexaploid Triticale (*X* *Triticosecale* Wittmack) for androgenic parameters. *Euphytica* 197:27–37. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-1031-y>
- Laurie DA, Bennett MD (1989) The timing of chromosome elimination in hexaploid wheat X maize crosses. *Genome* 32:953–961. <https://doi.org/10.1139/g89-537>
- Law JA, Jacobsen SE (2010) Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet* 11:204. <https://doi.org/10.1038/nrg2719>
- Lewandowska-Gnatowska E, Polkowska-Kowalczyk L, Szczegielniak J, Barciszewska M, Barciszewski J, Muszyńska G (2014) Is DNA methylation modulated by wounding-induced oxidative burst in maize? *Plant Physiol Biochem* 82:202–208. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2014.06.003>
- Liu R, Lang Z (2020) The mechanism and function of active DNA demethylation in plants. *J Integr Plant Biol* 62:148–159. <https://doi.org/10.1111/jipb.12879>
- Lo Schiavo P, Pitto L, Torti G, Nuti-ROnchi V, Marezzi D, Vergera R, Orselli S, Terzi M (1989) DNA methylation of embryonic carrot cell culture and its variation as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs. *Theor Appl Genet* 77:325–331
- Machczyńska J, Orłowska R, Mańkowski DR, Zimny J, Bednarek PT (2014a) DNA methylation changes in triticale due to in vitro culture plant regeneration and consecutive reproduction. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 119:289–299. <https://doi.org/10.1007/s11240-014-0533-1>
- Machczyńska J, Orłowska R, Zimny J, Bednarek PT (2014b) Extended metALP approach in studies of the tissue culture induced variation (TCIV) in case of triticale. *Mol Breed* 34:845–854. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0079-2>
- Machczyńska J, Zimny J, Bednarek P (2015) Tissue culture-induced genetic and epigenetic variation in triticale (*X* *Triticosecale* spp. Wittmack ex A. Camus 1927) regenerants. *Plant Mol Biol* 89:279–292. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0368-0>
- Malik WA et al (2021) Exploring potential of copper and silver nano particles to establish efficient callogenesis and regeneration system for wheat (*Triticum aestivum* L.). *GM Crops Food*. <https://doi.org/10.1080/21645698.2021.1917975>
- Markulin L, Škiljaica A, Tokić M, Jagić M, Vuk T, Bauer N, Leljak Levanić D (2021) Taking the wheel—de novo DNA methylation as a driving force of plant embryonic development. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.764999>
- Mordhorst AP, Voerman KJ, Hartog MV, Meijer EA, van Went J, Koornneef M, de Vries SC (1998) Somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* is facilitated by mutations in genes repressing meristematic cell divisions. *Genetics* 149:549–563
- Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue culture. *Physiol Plant* 15:473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nic-Can GI, De la Peña C (2014) Epigenetic advances on somatic embryogenesis of agronomical and important crops. In: Alvarez-Venegas R, De-la-Peña C, Casas-Mollano JA (eds) *Epigenetics in plants of agronomic importance: fundamentals and applications: transcriptional regulation and chromatin remodelling in plants*. Springer, Cham, pp 91–109. https://doi.org/10.1007/978-3-319-07971-4_6
- Noceda C, Salaj T, Pérez M, Viejo M, Cañal MJ, Salaj J, Rodriguez R (2009) DNA demethylation and decrease on free polyamines is associated with the embryogenic capacity of *Pinus nigra* Arn. cell culture. *Trees* 23:1285–1293
- Orłowska R, Bednarek PT (2020) Precise evaluation of tissue culture-induced variation during optimisation of in vitro regeneration regime in barley. *Plant Mol Biol* 103:33–50. <https://doi.org/10.1007/s11103-020-00973-5>
- Orłowska R, Zimny J, Bednarek PT (2021) Copper ions induce DNA sequence variation in zygotic embryo culture-derived barley regenerants. *Front Plant Sci* 11:614837–614837. <https://doi.org/10.3389/fpls.2020.614837>
- Pachota KA, Orłowska R, Bednarek PT (2022) Medium composition affects the tissue culture-induced variation in triticale regenerants. *Plant Cell Tissue Organ Culture (PCTOC)*. <https://doi.org/10.1007/s11240-022-02327-z>
- Park K, Lee S, Yoo H, Choi Y (2020) DEMETER-mediated DNA demethylation in gamete companion cells and the endosperm, and

- its possible role in embryo development in Arabidopsis. *J Plant Biol* 63:321–329
- Pauk J, Puolimatka M, Lökös Tóth K, Monostori T (2000) In vitro androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 61:221–229. <https://doi.org/10.1023/A:1006416116366>
- Pérez M, Cañal MJ, Toorop PE (2015) Expression analysis of epigenetic and abscisic acid-related genes during maturation of *Quercus* suber somatic embryos. *Plant Cell Tissue Organ Culture (PCTOC)* 121:353–366
- Rani V, Raina SN (2000) Genetic fidelity of organized meristem-derived micropropagated plants: a critical reappraisal. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 36:319–330. <https://doi.org/10.1007/s11627-000-0059-6>
- Rival A et al (2013) Variations in genomic DNA methylation during the long-term in vitro proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Rep* 32:359–368. <https://doi.org/10.1007/s00299-012-1369-y>
- Rodríguez-Sanz H, Manzanera J-A, Solís M-T, Gómez-Garay A, Pintos B, Risueño MC, Testillano PS (2014) Early markers are present in both embryogenesis pathways from microspores and immature zygotic embryos in cork oak *Quercus suber* L. *BMC Plant Biol* 14:224. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0224-4>
- Schellenbaum P, Mohler V, Wenzel G, Walter B (2008) Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). *BMC Plant Biol* 8:78
- Smýkal P (2000) Pollen embryogenesis—the stress mediated switch from gametophytic to sporophytic development. Current status and future prospects. *Biol Plant* 43:481–489. <https://doi.org/10.1023/A:1002835330799>
- Solís M-T, Rodríguez-Serrano M, Meijón M, Cañal M-J, Cifuentes A, Risueño MC, Testillano PS (2012) DNA methylation dynamics and MET1a-like gene expression changes during stress-induced pollen reprogramming to embryogenesis. *J Exp Bot* 63:6431–6444. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers298>
- Solís M-T, El-Tantawy A-A, Cano V, Risueño MC, Testillano PS (2015) 5-azacytidine promotes microspore embryogenesis initiation by decreasing global DNA methylation, but prevents subsequent embryo development in rapeseed and barley. *Front Plant Sci*. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00472>
- Soreng RJ et al (2017) A worldwide phylogenetic classification of the Poaceae (Gramineae) II: an update and a comparison of two 2015 classifications. *J Syst Evol* 55:259–290. <https://doi.org/10.1111/jse.12262>
- Stolarz A, Lörz H (1986) Somatic embryogenesis in vitro manipulation and plant regeneration from immature embryos of hexaploid Triticale (*X Triticosecale* Wittmack). *Z Pflanzenzüchtung* 96:353–362
- Stroud H et al (2014) Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis. *Nat Struct Mol Biol* 21:64
- Testillano PS (2020) Stress-induced microspore embryogenesis in crop plants: cell totipotency acquisition and embryo development. In: Cánovas FM, Lüttge U, Leuschner C, Risueño M-C (eds) *Progress in botany*, vol 81. Springer, Cham, pp 227–241. https://doi.org/10.1007/124_2018_24
- Testillano PS, Solís MT, Risueño MC (2013) The 5-methyl-deoxycytidine (5mdC) localization to reveal in situ the dynamics of DNA methylation chromatin pattern in a variety of plant organ and tissue cells during development. *Physiol Plant* 149:104–113. <https://doi.org/10.1111/ppl.12015>
- Walker J, Gao H, Zhang J, Aldridge B, Vickers M, Higgins JD, Feng X (2018) Sexual-lineage-specific DNA methylation regulates meiosis in Arabidopsis. *Nat Genet* 50:130–137
- Wang YY, Sun CS, Wang CC, Chien NF (1973) The induction of the pollen plantlets of triticale and *Capsicum annuum* from anther culture. *Sci Sin* 16:147–151
- Wędzony M (2003) Protocol for anther culture in hexaploid triticale (*X Triticosecale* Wittm.). In: Maluszynski M, Kasha KJ, Forster BP, Szarejko I (eds) *Doubled haploid production in crop plants: a manual*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 135–140
- Wójcikowska B, Wójcik AM, Gaj MD (2020) Epigenetic regulation of auxin-induced somatic embryogenesis in plants. *Int J Mol Sci* 21:2307
- Wurschum T, Tucker MR, Reif JC, Maurer HP (2012) Improved efficiency of doubled haploid generation in hexaploid triticale by in vitro chromosome doubling. *BMC Plant Biol* 12:109. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-12-109>
- Zemach A et al (2013) The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* 153:193–205. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.02.033>
- Zhang M, Wang H, Dong Z, Qi B, Xu K, Liu B (2010) Tissue culture-induced variation at simple sequence repeats in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) is genotype-dependent and associated with down-regulated expression of a mismatch repair gene, MLH3. *Plant Cell Rep* 29:51–59. <https://doi.org/10.1007/s00299-009-0797-9>
- Zhuang JJ, Xu J (1983) Increasing differentiation frequencies in wheat pollen callus. In: Hu H, Vega MR (eds) *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement*. Science Press, Beijing, p 431
- Zimny J, Rybczyński JJ (1986) Somatic embryogenesis of Triticale. In: *Genetic manipulations in plant breeding*, Berlin (West), vol 505