

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-, hekso- 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 embriogenyzy 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.