

„Analiza czynników wpływających na gametyczną embriogenezę u gatunków opornych na haploidyzację”

2021

Kierownik tematu: Agnieszka Kielkowska, email: a.kielkowska@urk.edu.pl

Wykonawcy: A. Adamus, D. Chachłowska, V. Piasetskaya, M. Warias, U. Pieniążek, P. Albiński

W. Kiszczak, M. Podwyszyńska, A. Marasek-Ciołakowska, J. Góraj-Koniarska, M. Burian, U. Kowalska, D. Prochalska

Współpraca: POŁĄCZONA POLSKA HODOWLA

Leszek Róg, Wojciech Matuszak, Maciej Maciejewski



MINISTERSTWO
ROLNICTWA I ROZWOJU WSI

Finansowanie badań:

**Badania na rzecz postępu
biologicznego w produkcji roślinnej**

Lp.	Tytuł i cele zadania	Czy cel został osiągnięty
Opracowanie metody indukcji haploidów i badanie czynników stymulujących gametyczną embriogenezę (GE)		
1.1	Zgromadzenie i wyprowadzenie (kontrolowane zapylenia) kolekcji materiałów wyjściowych (4 gatunki do ind. haploidów oraz 2 gatunki, jako zapylacze do indukcji partenogenezy)	TAK
1.2	Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (pylniki, załącznie)	TAK
1.3	Analiza przydatności poszczególnych metod haploidyzacji do indukcji GE u 4 gatunków (pomidor: andro- i gynogeneza, papryka: androgeneza, sałata: androgeneza i ind. partenogeneza, bób: andro- i gynogeneza, ind. partenogeneza)	TAK
1.4	Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), oraz chemicznych (baza pożywki i substancje wzrostowe) na haploidyzację	TAK

Tytuł zadania i stosowane metody

1.1 Zgromadzenie i wyprowadzenie (kontrolowane zapylenia) kolekcji materiałów wyjściowych (4 gatunki do ind. haploidów oraz 2 gatunki, jako zapylacze do indukcji partenogenezy)

Wysiewy nasion badanych gatunków w warunkach polowych i szklarniowych, pielęgnacja roślin, ochrona przeciw chorobom i szkodnikom, izolacja roślin, kastrowanie, kontrolowane zapylenia ręczne

1.2 Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (pylniki, załącznie)

Ocena stadium mikrosporogenezy – preparatyka cytologiczna, barwienie preparatów (b. Aleksandra, DAPI), mikroskopia fluorescencyjna i światła przechodzącego w celu ustalenia wielkości pąka do androgenozy, dokumentacja fotograficzna

Ocena dojrzałości załączni – obserwacje makroskopowe pąków kwiatowych, mikroskopia stereoskopowa, dokumentacja fotograficzna

Barwienie łagiewek pyłkowych i załączni – utrwalanie materiału roślinnego, maceracja w NaOH, barwienie błękitem aniliny, preparatyka cytologiczna, mikroskopia fluorescencyjna, dokumentacja fotograficzna

1.3 Analiza przydatności poszczególnych metod haploidyacji do indukcji GE u 4 gatunków (pomidor: andro- i gynogeneza, papryka: androgeneza, sałata: androgeneza i ind. partenogeneza, bób: andro- i gynogeneza, ind. partenogeneza)

Odkazanie materiałów do kultur – różne procedury i związki chemiczne

Androgeneza - izolacja pylników (mikroskopia stereoskopowa, izolacja igłami preparacyjnymi) i mikrospor (maceracja mechaniczna, filtrowanie, wirowanie, obliczanie gęstości zawiesiny przy pomocy hemocytometru), obserwacje zwrotności mikrospor w kulturze – mikroskopia fluorescencyjna

Gynogeneza – izolacja załączni, załączków i słupków (mikroskopia stereoskopowa, izolacja igłami preparacyjnymi)

Indukowana partenogeneza – wykonanie kastracji pąków kwiatowych, zapyleń ręcznych, oprysku auksyną 2,4-D, izolacja załączni i słupków przy użyciu lupy stereoskopowej)

1.4 Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), oraz chemicznych (baza pożywki i substancje wzrostowe) na haploidyację

Indukcja szoków termicznych (32°C lub 4°C) przez określony czas (2, 4, 6 dni) na pylniki i mikrospory - termostaty

Wpływ pożywki (baza pożywki i regulatory wzrostu) wpływ dodatków do pożywki (putrescyna, azacytydyna)

Zgromadzenie i wyprowadzenie (kontrolowane zapylenia) kolekcji materiałów wyjściowych (4 gatunki do ind. haploidów oraz 2 gatunki, jako zapylacze do indukcji partenogenezy)

1. Kolekcja obiektów bazowych i zapylaczy



Lactuca sativa



Capsicum annuum



Solanum lycopersicum



Helianthus annuus



Vicia faba



Phaseolus vulgaris

Materiał	Nazwa rodzaju	Nazwa łacińska	Liczba obiektów	Nazwa obiektu
Bazowy	sałata	<i>Lactuca sativa</i>	2	linia 230/2, linia 212/3
	papryka	<i>Capsicum annuum</i>	2	Roberta, linia 13
	pomidor	<i>Solanum lycopersicum</i>	2	linia 238/19, linia 246/19
	bób	<i>Vicia faba</i>	2	Bartek, Rambos
Zapylacz	fasola	<i>Phaseolus vulgaris</i>	1	Eryka
	stonecznik	<i>Helianthus annuus</i>	1	Lech
Razem			10	



Prowadzenie roślin donorowych do haploidyzacji u pomidora i bobu. Uprawa szklarniowa roślin pomidora (a) oraz bobu i fasoli (b) oraz uprawa polowa bobu (c). (fot. A. Kiełkowska)

2. Wyprowadzenie materiałów wyjściowych bobu do indukcji andro- i gynogenezy

Liczba wykonanych krzyżówek	Liczba efektywnych krzyżowców (strąki z nasionami)
902	292



Krzyżowanie kierunkowe u bobu. Roślina na której wykonano (a) strąk z zawiązanymi nasionami (b). (fot. W. Matuszak)



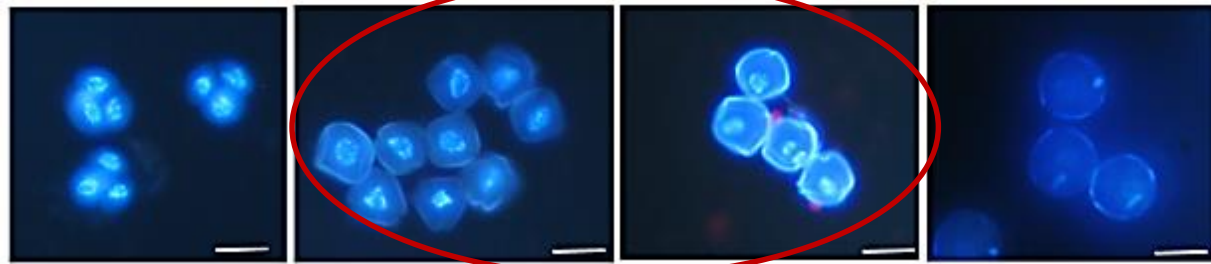
Prowadzenie roślin donorowych do haploidyzacji u sałaty i papryki. Uprawa szklarniowa sałaty (a,b) uprawa sałaty na poletkach (c), uprawa szklarniowa papryki (d). (fot. W. Kiszczak)

ZADANIE 1.2

Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (pylniki, mikrospory)

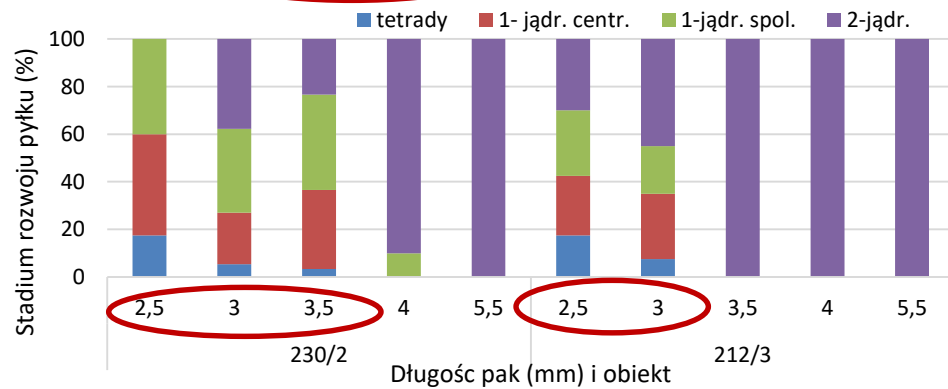
Metoda	Gat. / technika
androgeneza	sałata/pylnik papryka/pylniki pomidor/mikrospory bób/mikrospory

1. Ocena stadium mikrogametogenezy w pąkach kwiatowych – na czerwono oznaczono optymalne stadia wybrane do doświadczeń

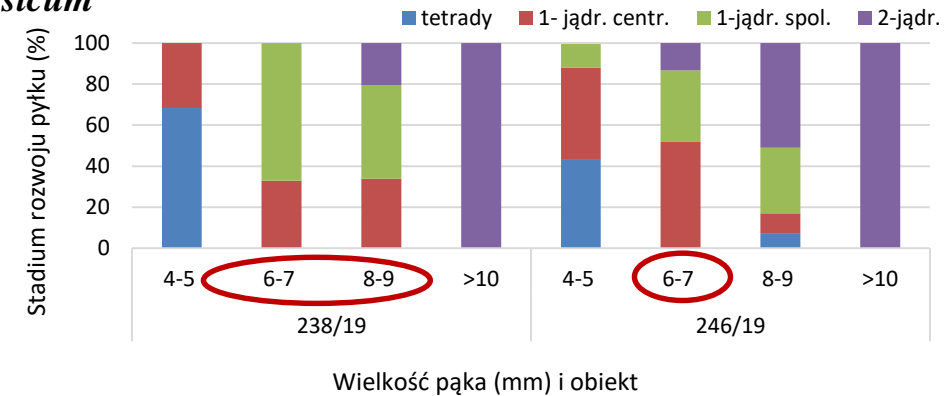


Stadia mikrogametogenezy u pomidora po barwieniu DAPI. Od lewej: tetrady mikrospor; mikrospory z jądrem centralnie położonym; stadium z jądrem spolaryzowanym; pyłek dwujądrowy. Skala 20 µm (fot. A. Kielkowska)

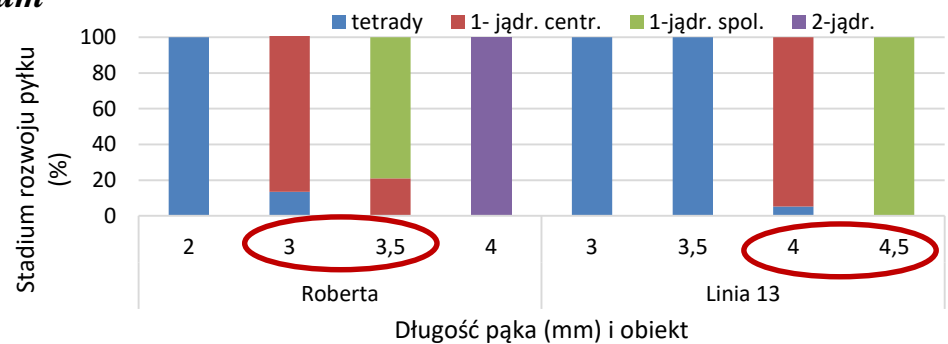
Lactuca sativa



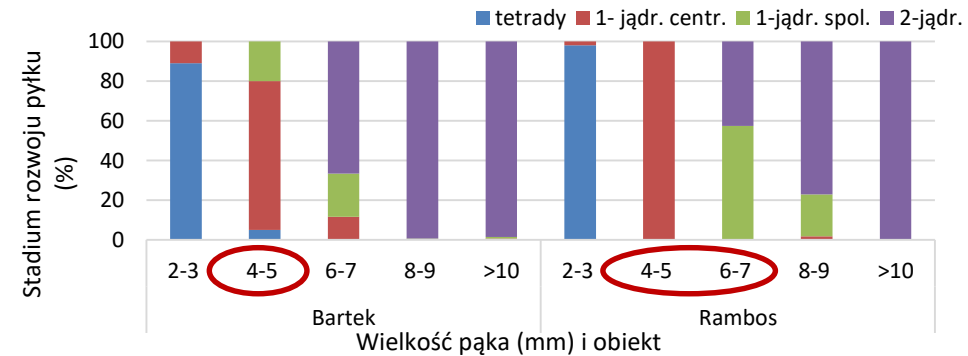
Solanum lycopersicum



Capsicum annuum



Vicia faba

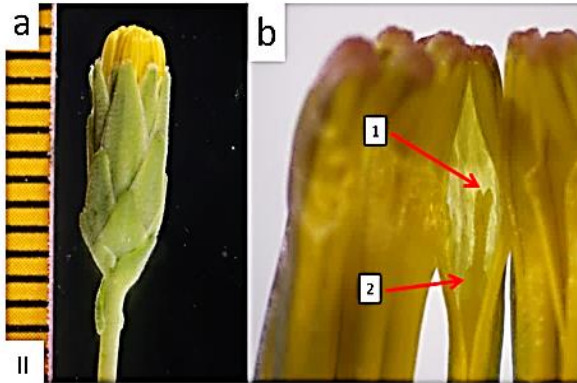


ZADANIE 1.2

Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (zaląźnie)

2. Ocena dojrzałości zaląźni i wykonanie zapyleń – na fotografiach pokazano wybrane do doświadczeń stadia rozwoju pąka u poszczególnych gatunków, poprzedzające samozapylenie

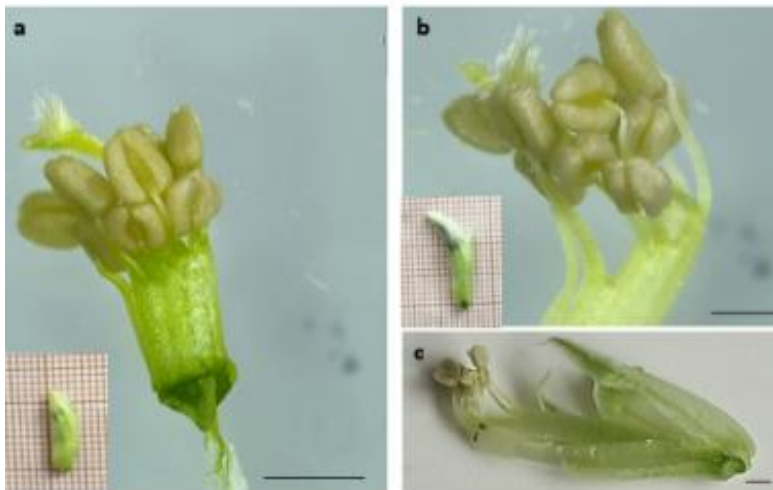
L. sativa – pąki do induk. partenogenezy



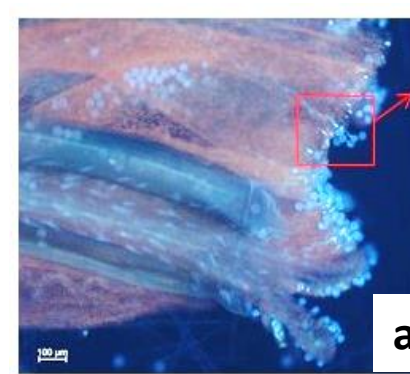
S. lycopersicum – pąki do gynogenezy



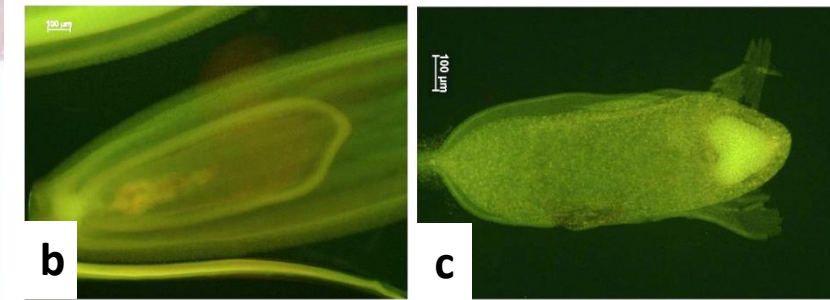
V. faba – pąki do gynogenezy i indukowanej partenogenezy



3. Barwienie łągierek i zaląźni błękitem aniliny

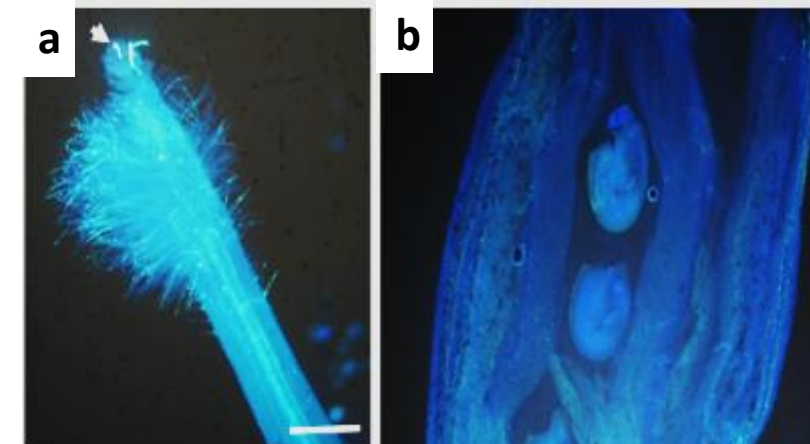


L. sativa – zapylanie *H. tuderosum*



Obserwacje znamienia słupka oraz zaląźni sałaty po zapyleniu pyłkiem słonecznika zwyczajnego (*Helianthus annuus* L.). a) pyłek na znamionach słupka -pojedyncze ziarna pyłku kielkują, (b) degeneracja zaląźki, (c) rozwijający się zarodek w stadium serca

V. faba – zapylanie *P. vulgaris*



Obserwacje znamienia słupka oraz zaląźni bobu po zapyleniu pyłkiem fasoli (*Phaseolus vulgaris* L.). (a) pyłek fasoli na znamionach słupka bobu - pojedyncze kielkujące ziarna pyłku, (b) niezapłodnione zaląźki bobu

Metoda	Gat. /technika
gynogeneza	pomidor/kult. zaląźni pomidor/kult. zaląźków bób/kult. słupków
indukowana partenogen.	sałata x słonecznik bób x fasola

ZADANIE 1.3**Analiza przydatności poszczególnych metod haploidyzacji do indukcji GE u 4 gatunków**

Gatunek	Metoda haploidyzacji	Technika haploidyzacji	Wynik	Uwagi
<i>L. sativa</i>	Androgeneza	Kultury pylników	Kalus na pylnikach	Uzyskano haploidalny kalus
	Induk. partenogeneza po zapyleniu pyłkiem słonecznika	Kultury zaląźni	Brak rozwoju	-
<i>C. annuum</i>	Androgeneza	Kultury pylników	Kalus na pylnikach	-
<i>S. lycopersicon</i>	Androgeneza	Kultury izolowanych mikrospor	Kalus z kultur mikrospor	Niska żywotność mikrospor, niska aktywność mitotyczna
	Gynogeneza	Kultury zaląźni	Kalus na zaląźniach	-
	Gynogeneza	Kultury zaląźków	Kalus na zaląźkach	Uzyskano haploidalny kalus
<i>V. faba</i>	Androgeneza	Kultury izolowanych mikrospor	Brak rozwoju	Niska żywotność mikrospor, niska aktywność mitotyczna
	Gynogeneza	Kultury słupków	Kalus na słupkach	-
	Induk. partenogeneza po zapyleniu pyłkiem fasoli	Kultury słupków	Kalus na słupkach	-

ZADANIE 1.4

Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), oraz chemicznych (baza pożywki i substancje wzrostowe) na haploidyzację

Gatunek	Metoda haploidyzacji	Technika haploidyzacji	Pożywka/ dodatki do pożywki	Stres temperaturowy	Wyselekcjonowane parametry
<i>L. sativa</i>	Androgeneza	Kultury pylników	MS, B5, 80-130 g/l sacharozy, azacytydyna, putrescyna	4°C przez 2, 4, 6 dni	B5, 80g/l sacharozy, szok 4°C 2-6 dni
	Induk. partenogeneza po zapyleniu słonecznikiem	Kultury zalążni	MS, B5	-	nie określono warunków, brak rozwoju
<i>C. annuum</i>	Androgeneza	Kultury pylników	MS, B5, 30-80-130 g/l sacharozy, azacytydyna, putrescyna	32°C przez 2,4 dni	MS, 80g/l sacharozy, szok 32°C 2 dni

ZADANIE 1.4

Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), oraz chemicznych (baza pożywki i substancje wzrostowe) na haploidyzację

Gatunek	Metoda haploidyzacji	Technika haploidyzacji	Pożywka/ dodatki do pożywki	Stres temperaturowy	Wyselekcjonowane parametry
S. lycopersicon	Androgeneza	Kultury izolowanych mikrospor	TMC1, 190/2	32°C lub 4°C przez 2 dni	TMC1, 4°C przez 2 dni
	Gynogeneza	Kultury zaląźni	G1, G4	-	nie określono warunków, kalus poch. somatycznego na obu pożywkach
	Gynogeneza	Kultury zaląźków	G1, G4	-	na obu pożywkach rozwój kalusa haploidalnego
V. faba	Androgeneza	Kultury izolowanych mikrospor	190/2, 190/4	32°C lub 4°C przez 2 dni	nie określono warunków, brak rozwoju
	Gynogeneza	Kultury słupków	G2, G3	-	nie określono warunków, kalus poch. somatycznego na obu pożywkach
	Induk. partenogeneza po zapyleniu fasolą	Kultury słupków	G2, G3	-	nie określono warunków, kalus poch. somatycznego na obu pożywkach

Informacja nt. mierników tematu badawczego

Lp.	miernik ¹	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1.1	Liczba genotypów zgromadzonych do wykonania doświadczeń (4 gat x 2 genotypy + 2 zapylacze)	10	10
1.2	Liczba typów obserwacji do określenia stadiów rozwojowych eksplantatu (mikrosporogeneza, dojrzałość zalążni, kiełkowanie łagiewek po obcym zapyleniu)	3	3
1.3	Liczba testowanych metod indukcji haploidów w warunkach <i>in vitro</i> (andro-, gynogeneza, ind. partenogeneza)	3	3
1.4	Liczba testowanych czynników wpływających na haploidyzację (temperatura i pożywka)	2	2

Informacja nt. prezentacji wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja ¹	liczba prezentacji podana w opisie zadania	liczba prezentacji zrealizowana
1.	nie dotyczy w bieżącym roku	-	-	-
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	publikacja ²	liczba publikacji podana w opisie zadania	liczba publikacji zrealizowana
1.	nie dotyczy w bieżącym roku	-	-	-

Adres pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy

<https://projekty.urk.edu.pl/index/site/7635>