

Zadanie nr 36:

Wykorzystanie somatycznej hybrydyzacji do poszerzenia zakresu zmienności wybranych roślin warzywnych

Okres realizacji: **84 miesiące (lata 2021-2027)**

Zespół wykonawców projektu:

dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK – kierownik projektu; email: ewa.grzebelus@urk.edu.pl

dr hab. inż. Agnieszka Kiełkowska, prof. URK

dr hab. Marek Szklarczyk, prof. URK

dr inż. Katarzyna Stelmach-Wityk



Współpraca: POŁĄCZONA POLSKA HODOWLA



dr Leszek Róg, mgr Marta Mosakowska, dr inż. Wojciech Matuszak

Finansowanie badań:



MINISTERSTWO
ROLNICTWA I ROZWOJU WSI

Badania na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej

Cele projektu w 2024 r.

Temat badawczy 1 (Wyprowadzenie/utrzymanie kultur embriogenego kalusa warzyw amarylkowatych):

- indukcja embriogenego kalusa czosnku zwyczajnego (*Allium sativum* L.) i cebuli szalotki (*Allium ascalonicum* L.)
- utrzymanie embriogenego kalusa cebuli zwyczajnej (*Allium cepa* L.), czosnku zwyczajnego i cebuli szalotki
- dopracowanie warunków regeneracji kalusa cebuli zwyczajnej, czosnku zwyczajnego i cebuli szalotki w rośliny

Temat badawczy 2 (Określenie parametrów inaktywacji genomów jądrowych i organellowych):

- określenie parametrów inaktywacji genomów jądrowych pasternaku i szalotki
- określenie parametrów inaktywacji genomów organellowych pietruszki i cebuli

Temat badawczy 3 (Elektrofuzja protoplastów wybranych obiektów i regeneracja komórek mieszańcowych):

- opracowanie warunków elektrofuzji symetrycznej dla czosnku oraz regeneracji komórek mieszańcowych
- opracowanie warunków elektrofuzji symetrycznej dla jarmużu i kapusty galicyjskiej oraz regeneracji komórek mieszańcowych

wszystkie cele zostały zrealizowane

Materiały i metody

Temat badawczy 1 (Wyprowadzenie/utrzymanie kultur embriogenego kalusa warzyw amarylkowatych)

Materiały roślinne

- wyprowadzenie nowych linii kalusa: czosnek zwyczajny (*Allium sativum* L.) – 1 odmiana; cebula szalotka (*A. ascalonicum* L.) – 2 linie
- utrzymanie wyprowadzonych linii kalusa: czosnku (4 odmiany), cebuli zwyczajnej (*A. cepa* L.; 2 linie), szalotki (1 linia)
- regeneracja kalusa: czosnku (2 odmiany), cebuli (2 linie), szalotki (1 linia)

Metody

- indukcja kalusa czosnku z piętek ząbków i zarodków zygocycznych cebuli szalotki/2 pożywki
- regeneracja kalusa/2 pożywki

Temat badawczy 2 (Określenie parametrów inaktywacji genomów jądrowych i organellowych)

Materiały roślinne

- regeneracja protoplastów szalotki - 1 obiekt
- inaktywacja genomu jądrowego pasternaku (1 obiekt) i szalotki (1 obiekt)
- Inaktywacja genomów organellowych pietruszki (1 obiekt) i cebuli (1 obiekt)

Metody

- inaktywacja genomu jądrowego: 125-1000 J m⁻²
- inaktywacja genomów organellowych: 0,2-0,9 mM IOA
- kultura protoplastów w pożywkach płynnych po immobilizacji w alginianie/agarozie (różne warianty pożywkowe)

Temat badawczy 3 (Elektrofuzja protoplastów wybranych obiektów i regeneracja komórek mieszańcowych)

Materiały roślinne

- fuzja symetryczna warzywa amarylkowate: czosnek 'Arkus' (+) czosnek 'Ornak'
- fuzja symetryczna warzywa kapustowate: jarmuż 'Scarlet' (+) kapusta galicyjska 'Vates'

Metody

- izolacja protoplastów z kalusa (amarylkowate) lub liści (kapustowate)
- barwienie różnicowe protoplastów komponentów rodzicielskich FDA lub RITC
- fuzja protoplastów w warunkach ustalonych parametrów dla prądu zmiennego i stałego
- kultura protoplastów w pożywkach płynnych po immobilizacji w alginianie wapnia/agarozie (różne warianty pożywkowe)
- regeneracja roślin wybranych kultur protoplastów na pożywkach stałych

Wyniki

Wyprowadzenie kultur kalusa czosnku i szalotki

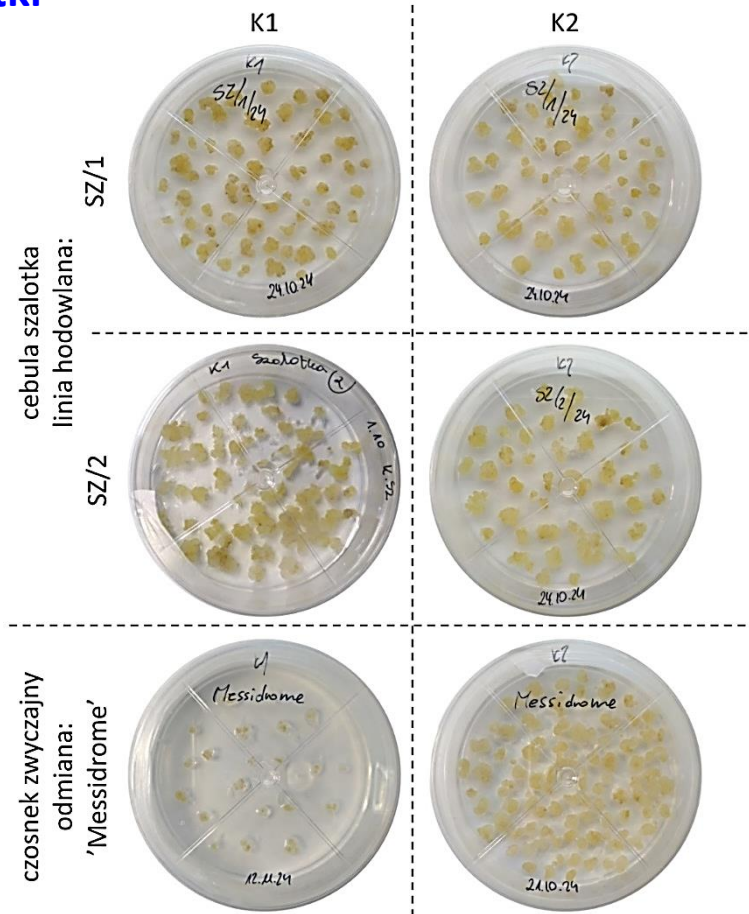
Indukcja kalusa z fragmentów piętek ząbków **czosnku zwyczajnego**

<u>Obiekt</u>	<u>Pożywka indukcyjna</u>	<u>Średnia liczba (±SE) eksplantatów tworzących kalus</u>	<u>% indukcji kalusa</u>
'Messidrome'	K1	7,7 ± 0,3	15,2
	K2	13,0 ± 2,1	26,0

Indukcja kalusa z zarodków zygotycznych **cebuli szalotki**

<u>Linia</u>	<u>Pożywka indukcyjna</u>	<u>Średnia liczba (±SE) zarodków tworzących kalus</u>	<u>% indukcji kalusa</u>
SZ/1/24	K1	34,0 ± 2,6 a	68,0
	K2	45,7 ± 1,2 b	91,3
SZ/2/24	K1	42,7 ± 1,2 b	85,3
	K2	46,0 ± 1,5 b	92,0

Pożywka do prowadzenia kultury kalusa:



Regeneracja kalusa – etap przed konwersją w zarodki

czosnek zwyczajny odmiana:

cebula szalotka

cebula zwyczajna linia hodowlana:

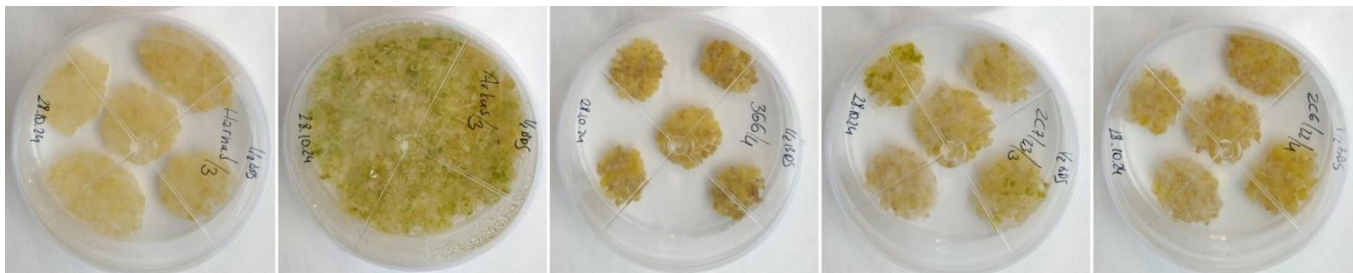
'Harnaś'

'Arkus'

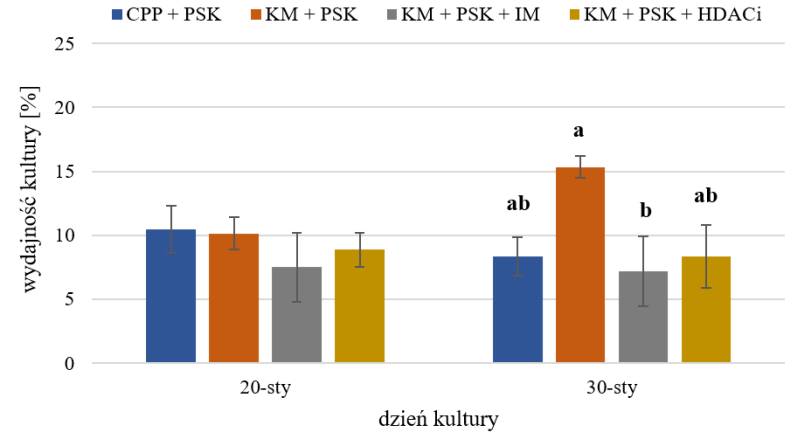
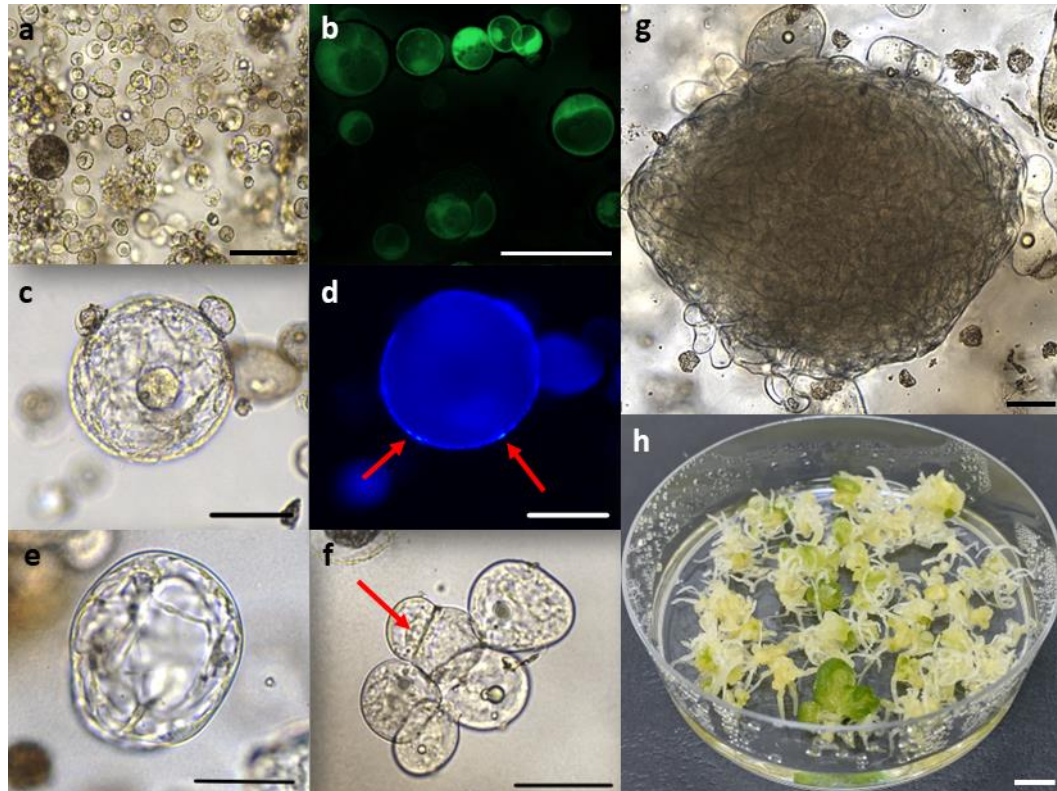
linia hodowlana 366

ZC7

ZC6



Regeneracja protoplastów szalotki

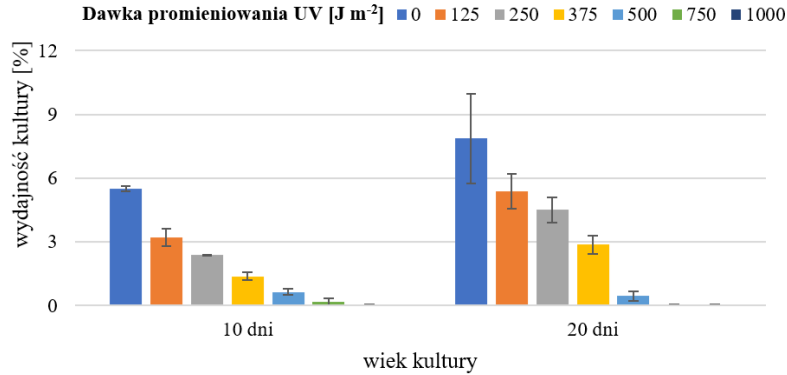


Średni procent tworzących się agregatów komórkowych (wydajność kultury) w 20-sto i 30-sto dniowej kulturze protoplastów cebuli szalotki w czterech wariantach pożywki (wąsy reprezentują błąd standardowy; litery nad słupkami oznaczają grupy jednorodnie przy $P \leq 0,05$). Zastosowane skróty: CPP + PSK – pożywka CPP z dodatkiem 100 nM fitosulfokiny (PSK), KM + PSK – pożywka KM z dodatkiem 100 nM PSK, KM + PSK + IM – pożywka KM z dodatkiem 100 nM PSK oraz 50 μM azacytydyny, KM + PSK + HDACi – pożywka KM z dodatkiem 100 nM PSK oraz 0,05 μM SAHA

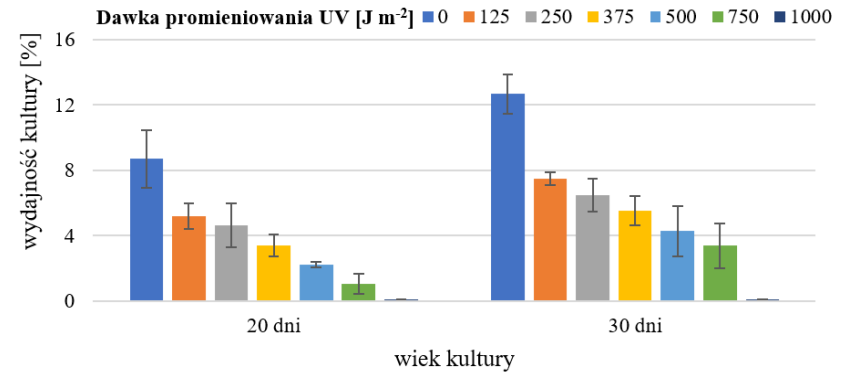
Kultura protoplastów cebuli szalotki: (a) uwolnione protoplasty z kalusa po jego maceracji w mieszaninie enzymatycznej HAS; (b) żywotne protoplasty, wybarwione diocetanem fluoresceiny, emitujące zieloną fluorescencję w świetle UV; (c, e) protoplasty z widoczną reorganizacją cytoplazmy w piątym dniu kultury, (d) wczesna faza resyntezy ściany komórkowej (zaznaczona strzałkami) w piątym dniu kultury w pożywce KM + PSK, (f) pierwszy podział komórkowy (zaznaczony strzałką) obserwowany w dziesięciodniowej kulturze w pożywce KM + PSK, (g) wielokomórkowe agregaty o strukturze proembriogennej obecne w trzydziestodniowej kulturze w pożywce KM + PSK; (h) regeneranty formujące się w trzecim miesiącu kultury na pożywce regeneracyjnej ½ BDS. Podziałka: a-b – 100 μm , c-g – 50 μm , h – 1 cm

Formowanie i rozwój zarodków w 60-tym dniu kultury protoplastów cebuli szalotki w różnych wariantach pożywki. 1 – CPP + PSK; 2 – KM + PSK; 3 – KM + PSK + HDACi. Podziałka: 1 cm

Inaktywacja genomu jądrowego

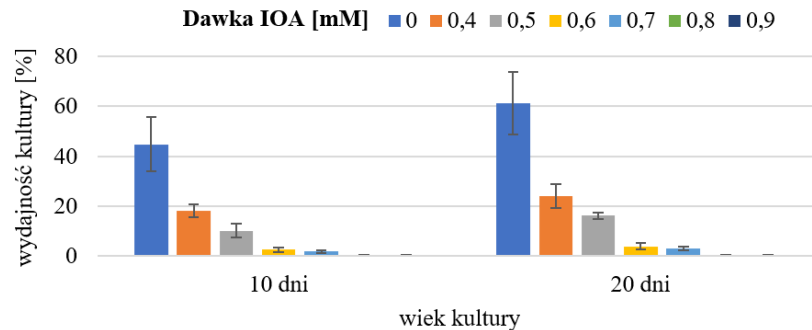


Wydajność 10- i 20-dniowej kultury **protoplastów pasternaku** poddanych inaktywacji genomu jądrowego (6 dawek promieniowania; wąsy reprezentują błąd standardowy)

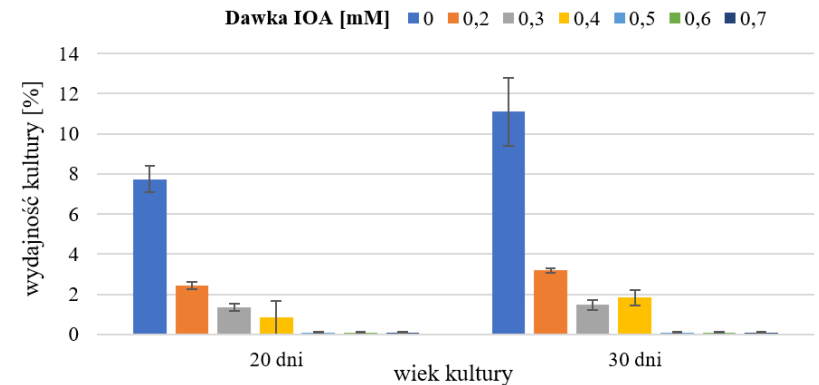


Wydajność 20- i 30-dniowej kultury **protoplastów szalotki** poddanych inaktywacji genomu jądrowego (6 dawek promieniowania; wąsy reprezentują błąd standardowy)

Inaktywacja genomów organellowych

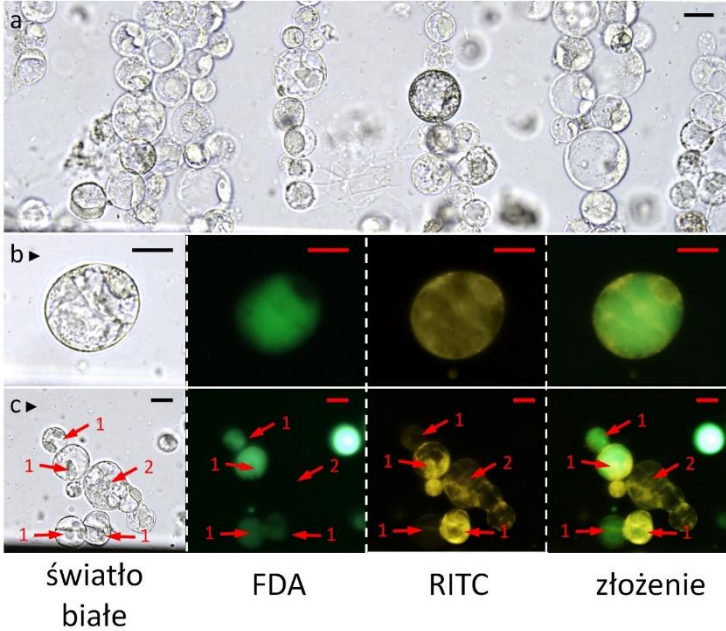


Wydajność 10- i 20-dniowej kultury **protoplastów pietruszki** poddanych inaktywacji genomu organellowego (6 dawek kwasu jodooctowego, IOA; wąsy reprezentują błąd standardowy)



Wydajność 20- i 30-dniowej kultury **protoplastów cebuli** zwyczajnej poddanych inaktywacji genomu cytoplazmatycznego (6 dawek kwasu jodooctowego, IOA; wąsy reprezentują błąd standardowy)

czosnek 'Arkus' (+) czosnek 'Ornak'



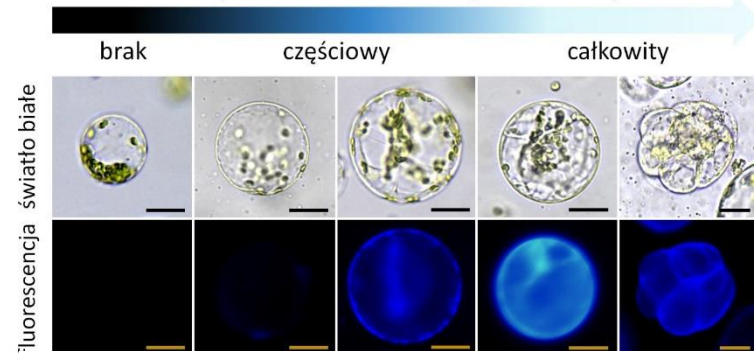
Symetryczna fuzja protoplastów

Czynnik	Liczba agregatów komórkowych
Obiekt kontrolny/wariant fuzji^a	
Arkus	1,1 ± 0,5
Ornak	1,8 ± 0,6
wariant 1	0,6 ± 0,4
wariant 2	1,4 ± 0,6
wariant 3	0,3 ± 0,3
Wariant pożywki	
KM + PSK	1,3 ± 0,4
KM + PSK + AOPP	0,9 ± 0,4
KM + PSK + OBHA	1,1 ± 0,4
Typ kultury^b	
standardowa	1,3 ± 0,3 a
kultura „niańka”	0,0 b



jarmuż 'Scarlet' (+) kapusta galicyjska 'Vates'

Stopień odtworzenia ściany komórkowej:



Czynnik

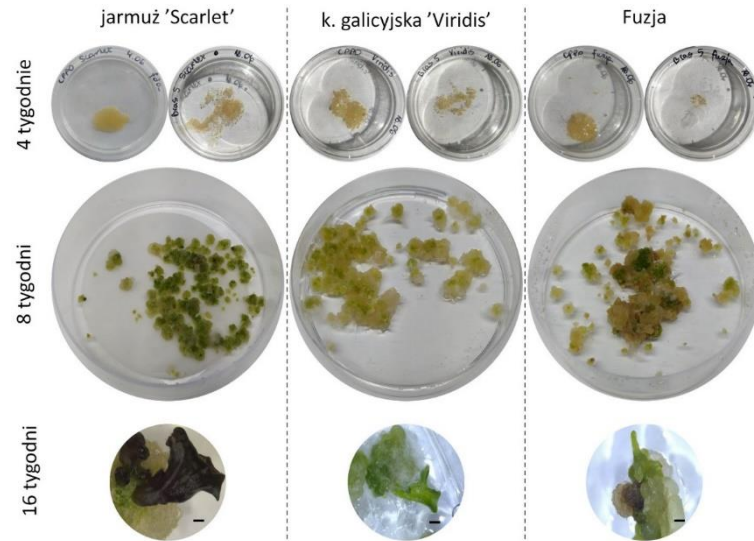
Wydajność kultury (% ± SE)

Obiekt kontrolny/wariant fuzji^a

jarmuż 'Scarlet'	38,4 ± 2,2 b
kapusta galicyjska 'Vates'	53,7 ± 2,6 a
wariant 1	35,3 ± 2,7 b
wariant 2	40,5 ± 3,7 b
wariant 3	35,7 ± 2,5 b

Wariant pożywki

CPPO1	54,2 ± 1,4 a
Bras5	26,5 ± 1,6 b



Wnioski

Temat badawczy 1 (Wyprowadzenie/utrzymanie kultur embriogenego kalusa warzyw amarylkowatych)

*Indukcja embriogenego kalusa czosnku zwyczajnego (*Allium sativum* L.) i cebuli szalotki (*Allium ascalonicum* L.)*

1. Pożywki indukcyjne K1 i K2, stosowane w latach ubiegłych, stymulowały formowanie się kalusa u nowych obiektów zarówno z fragmentów piętek ząbków czosnku, jak i zarodków zygotycznych cebuli szalotki.
2. Kalus cebuli szalotki charakteryzował się dobrym tempem wzrostu na obu pożywkach indukcyjnych, przy czym kalus linii SZ/2/24 charakteryzował się bardziej pożądaną w kontekście izolacji protoplastów suchą strukturą.

Utrzymanie embriogenego kalusa cebuli zwyczajnej, czosnku zwyczajnego i cebuli szalotki

1. Aby zachować wysoką wydajność izolacji protoplastów oraz zdolność regeneracyjną kultury protoplastów wskazane jest odnawianie linii kalusowych z eksplantaów pierwotnych co 2-3 lata.

Dopracowanie warunków regeneracji kalusa cebuli zwyczajnej, czosnku zwyczajnego i cebuli szalotki w rośliny

1. W bieżącym roku zastosowano dwie pożywki regeneracyjne, wyselekcjonowane na podstawie protokołu regeneracji zastosowanego w ubiegłym roku.
2. W trakcie drugiej rundy pasażu kalusa na w/w pożywkach zaobserwowano zazielenienie kalusa, symptom obserwowany w pierwszych próbach regeneracji kalusa czosnku w roku ubiegłym, poprzedzający konwersję kalusa w rośliny.

Temat badawczy 2 (Określenie parametrów inaktywacji genomów jądrowych i organellowych)

Opracowanie warunków izolacji i kultury protoplastów szalotki

1. Żywotność protoplastów wyizolowanych z linii 366 była wysoka i wynosiła blisko 80% w dniu izolacji.
2. Udział tworzących się agregatów komórkowych w 30-sto dniowych kulturach wahał się w granicach 7,2-15,3% i był zależny od składu pożywki.
3. Pełna pożywka KM z dodatkiem 100 nM PSK najlepiej stymulowała aktywność podziałową w kulturach protoplastów szalotki.
4. Zaobserwowano formowanie się i dojrzewanie zarodków somatycznych we wszystkich wariantach pożywki do kultury. Na pożywce regeneracyjnej ½ BDS obserwowano dalszy rozwój zarodków, niemniej jednak charakteryzowały się one nieprawidłową morfologią objawiającą się przede wszystkim nadmiernym rozrostem części korzeniowej.

Określenie parametrów inaktywacji genomów jądrowych pasternaku i szalotki

1. Zastosowane dawki promieniowania UV okazały się skuteczne do określenia optymalnych warunków inaktywacji genomu jądrowego pasternaku i cebuli szalotki.
2. Dla pasternaku dawka ta wynosi 750 J m^{-2} , podczas gdy dla cebuli szalotki 1000 J m^{-2} .

Określenie parametrów inaktywacji genomów organellowych pietruszki i cebuli

1. Zastosowane dawki kwasu jodooctowego okazały się skuteczne do określenia optymalnych warunków inaktywacji genomów organellowych pietruszki i cebuli zwyczajnej.
2. Dla pietruszki dawka ta wynosi 0,8 mM, natomiast dla cebuli zwyczajnej 0,5 mM.

Temat badawczy 3 (Elektrofuzja protoplastów wybranych obiektów i regeneracja komórek mieszańcowych)

Czosnek

1. Zaobserwowano wpływ zastosowanych wariantów elektrofuzji na wydajność tworzenia heterokarionów - największą efektywność elektrofuzji uzyskano dla: $U'_{\sim} = 2,5 \text{ V}$; $t = 15 \text{ s}$; $U_{\eta} = 30 \text{ V}$; $t = 30 \mu\text{s}$; $n = 2$; $U''_{\sim} = 1,0 \text{ V}$; $t = 5 \text{ s}$.
2. Proces resyntezy ściany komórkowej rozpoczął się w drugiej dobie zarówno w kulturach kontrolnych, jak i pofuzyjnych. Pożywka KM z dodatkiem 10 nM PSK najsilniej stymulowała proces odbudowy ściany komórkowej.
3. Kultury pofuzyjne drugiego wariantu elektrofuzji charakteryzowały się najwyższą wydajnością kultury, zbliżoną do kultur kontrolnych. Wydajność kultury nie była zależna od wariantu pożywki.
4. W kulturach pofuzyjnych każdego wariantu elektrofuzji obserwowano formowanie się mikrogrudek kalusa, niemniej jednak intensywność formowania była mniejsza niż w kulturach kontrolnych.
5. Zastosowanie kultury „niańki” nie miało znaczącego wpływu na poprawę parametrów procesu rozwojowego kultur pofuzyjnych.

Kapustne (jarmuż i kapusta galicyjska)

1. Wszystkie zastosowane parametry elektrofuzji (3 warianty prądu stałego i zmiennego) w podobny sposób stymulowały powstawanie heterokarionów (7-8%).
2. Proces regeneracji ściany komórkowej przebiegał nieco szybciej w kulturach kontrolnych niż w kulturach założonych z mieszanin pofuzyjnych. Resynteza ściany komórkowej rozpoczynała się przed 48-ą godziną kultury.
3. Liczba powstających kolonii komórkowych w piętnastym dniu kultur kontrolnych i kultur mieszanin pofuzyjnych wahała się odpowiednio w przedziale 38-54% oraz 35-40% i była zależna od pożywki.
4. Regenerację pędów obserwowano dla wszystkich wariantów, przy czym z lepszą wydajnością na pożywce regeneracyjnej P (10 g/l sacharozy, 20g/l mannitolu, 1 mg/l NAA, 1 mg/l 2iP oraz 0,02 mg/l GA_3).
5. Analiza cytometryczna fragmentów liści kapusty czerwonej i kapusty brukselskiej uzyskanych z indukcji w roku 2023 wykazała znaczny udział roślin tetraploidalnych (61%) i diploidalnych (36%).

Mierniki dla zadania - prezentacja wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	miernik ²	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	9 th Cental European Congress of Life Sciences EUROBIOTECH 2024, 27-28 czerwca, Kraków , Polska, jedna osoba, prezentowano wyniki nt. wpływu inhibitorów metylacji i deacetylacji histonów na wzrost potencjału regeneracyjnego protoplastów pasternaku z roku 2023 (str. 73-79)	poster	2*	1
2	XVI Ogólnopolska Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin , 23-25 września, Kraków , Polska, dwie osoby, prezentowano wyniki nt.: (1) zastosowania protoplastyzacji w badaniach podstawowych i aplikacyjnych u wybranych warzyw z roku 2021 (str. 45-71), 2022 (str.52-78) oraz 2023 (str. 62-92) (2) wpływu inhibitorów metylacji i deacetylacji histonów na wzrost potencjału regeneracyjnego protoplastów cebuli i czosnku z roku 2023 (str. 85-90)	poster	1*	2
*w karcie tamatu pomyłono liczby – miały być takie jak w kolumnie ‘wartość miernika zrealizowana’; obie konferencje były konferencjami krajowymi, odbywającymi się w miejscu zamieszkania autorów posterów, koszt udziału w konferencjach był podobny				
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	miernik ³	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	czasopismo z listy JRC; wyniki regeneracji protoplastów <i>Brassicaceae</i> z 2021 roku (str. 62-67), 2022 roku (str. 68-72) oraz z 2023 roku (str. 79-85): Stelmach-Wityk K, Szymonik K, Grzebelus E, Kiełkowska A (2024) Development of optimized protocol for protoplast-to-plant regeneration of selected varieties of <i>Brassica oleracea</i> L. BMC Plant Biology, w recenzjach (IF ₂₀₂₃ = 4.3; pkt MNiSW = 140)	publikacja oryginalna	1	1