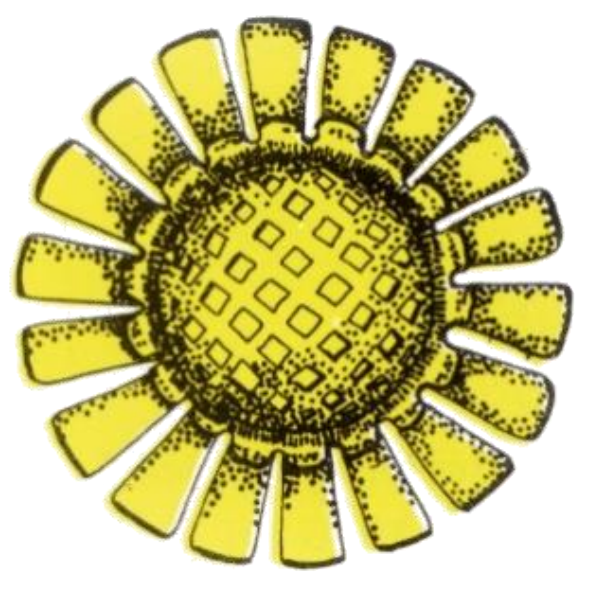




# Protoplasty w badaniach podstawowych i aplikacyjnych u wybranych warzyw



Ewa Grzebelus\*, Agnieszka Kiełkowska, Katarzyna Stelmach-Wityk, Kamil Szymonik

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa  
Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie; \*e-mail: ewa.grzebelus@urk.edu.pl

## Wstęp

Protoplasty są jednym z wielu materiałów wyjściowych wykorzystywanych do inicjacji roślinnych kultur *in vitro*. Jako komórki pozbawione ściany komórkowej stanowią unikatowy materiał startowy, który może być wykorzystywany zarówno w badaniach podstawowych jak i aplikacyjnych. Mimo, że znane są procedury otrzymywania roślin z protoplastów dla ponad 400 gatunków roślin, wciąż wiele, szczególnie gatunki uprawne, charakteryzuje się tzw. opornością na kultury protoplastów.

## Cel badań

Celem badań było opracowanie systemu regeneracji roślin w kulturach protoplastów wybranych gatunków uprawnych z rodziny Brassicaceae i Apiaceae z uwzględnieniem różnej suplementacji pożywek do kultury protoplastów.

## Metodyka

### Kultury protoplastów wybranych gatunków Brassicaceae

**Źródło protoplastów** – 4-tygodniowe rośliny z nasion wyprowadzone w kulturach *in vitro*

**Kultura protoplastów** - w pożywkach płynnych po immobilizacji w alginianie wapnia

**Warianty pożywkowe**

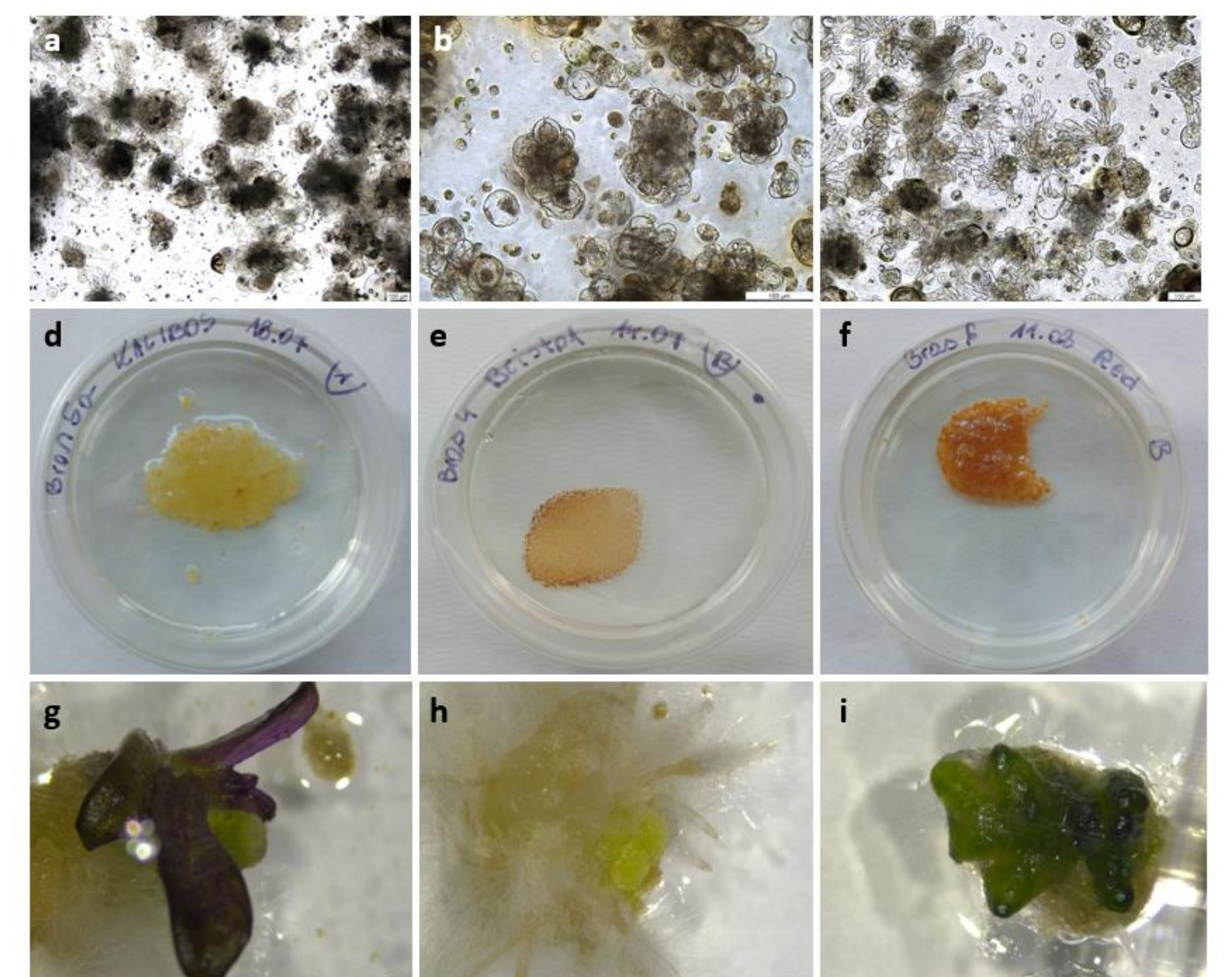
CPPO1 – KM<sup>1</sup> + 0,1 mg/l 2,4-D + 0,5 mg/l NAA + 0,5 mg/l BA  
Bras 3 – B5<sup>2</sup> + 0,5 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA  
Bras 4 – KM + 0,5 mg/l 2,4-D + 0,8 mg/l NAA + 1,0 mg/l BA  
Bras 5 – B5 + 0,3 mg/l 2,4-D + 1,0 mg/l NAA + 1,0 mg/l BA  
Bras 6 – B5 + 0,3 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l NAA + 0,2 mg/l BA

<sup>1</sup> KM – makro-, mikroelementy oraz kwasy organiczne wg Kao i Michaluk (1975); <sup>2</sup> B5 - Gamborg i in. (1968)

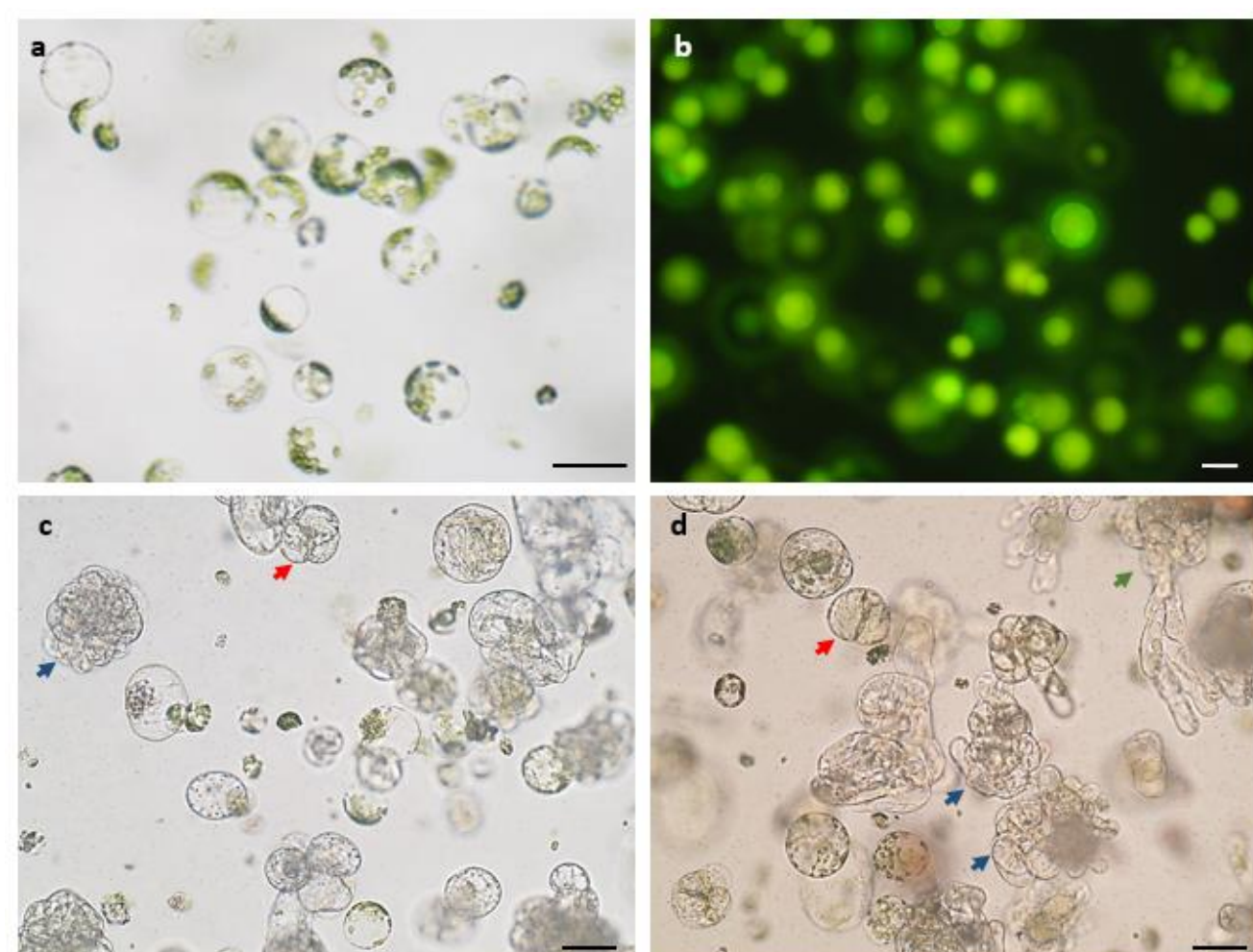
## Wyniki

**Wydajność kultury (WK - liczba tworzących się agregatów komórkowych) w 15 dniu kultury protoplastów**

Czynnik	WK (% ± SE)
<b>Obiekt – grupa 1/pożywka CPPO1</b>	
Jarmuż 'Kaprał'	79,5 ± 1,7 a
Kapusta galicyjska 'Vates'	74,3 ± 1,6 b
<b>Obiekt – grupa 2</b>	
Jarmuż 'Scarlet'	41,2 ± 2,1 b
Kapusta pekińska 'Hilton'	47,6 ± 1,9 a
Kapusta brukselska 'Casiopea'	39,7 ± 1,4 b
<b>Pożywka do kultury protoplastów dla obiektu grupa 2</b>	
CPPO1	55,3 ± 1,2 a
Bras3	28,0 ± 2,1 b
Bras4	30,3 ± 1,7 b
Bras5	52,9 ± 1,5 a
<b>Obiekt – grupa 3</b>	
Kapusta głowiasta czerwona 'Haco'	45,0 ± 1,6 b
Kapusta głowiasta czerwona 'Kalibos'	55,9 ± 1,9 a
Kapusta pekińska 'Bristol'	39,9 ± 1,8 b
Kapusta brukselska 'Red'	52,4 ± 1,9 a
<b>Pożywka do kultury protoplastów dla obiektu grupa 3</b>	
CPPO1	58,6 ± 2,1 a
Bras4	45,9 ± 1,3 b
Bras5	38,4 ± 1,9 c
Bras6	47,1 ± 1,4 b



Rozwój kultury protoplastów wybranych warzyw kapustnych w piętnastej dobie (a-c), po 30 dniach kultury (d-f) oraz regeneracja mikrokalusa uzyskanego z protoplastów po 90 dniach kultury na pożywkach regeneracyjnych (g-i). Kultura kapusty czerwonej (a,d,g), kapusty pekińskiej (b,e,h) i kapusty brukselskiej (c,f,i). Embriogeny kalus z zawiązkami pędów (g,i) oraz korzeni (h). Skala 100 μm



Rozwój w kulturze protoplastów na przykładzie kapusty galicyjskiej. (a) Sferyczne protoplasty immobilizowane w alginianie w dniu izolacji; (b) żywotne protoplasty w dniu izolacji, emitujące zieloną fluorescencję po barwieniu FDA; aktywność mitotyczna w 5. (c) i 15. (d) dniowej kulturze protoplastów – strzałka czerwona oznacza pierwsze podziały komórkowe, niebieska agregaty komórkowe kompaktowe, zielona agregaty gwiaździste (podziałka 20 μm)

## Metodyka

### Kultury protoplastów pasternaku (Apiaceae)

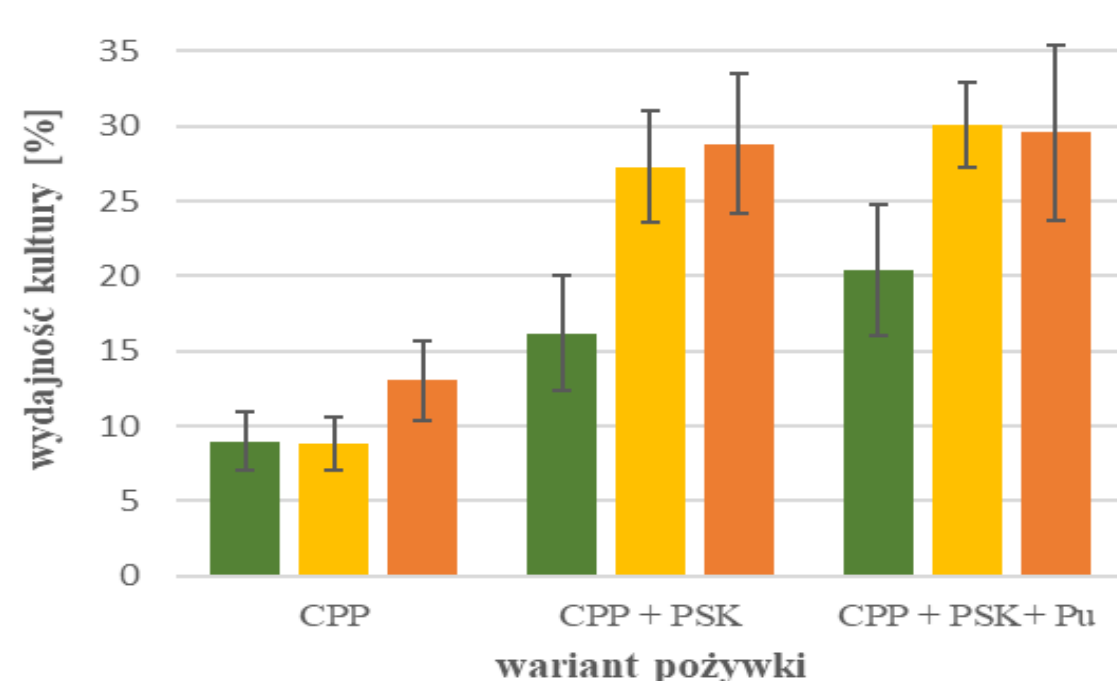
**Źródło protoplastów** – 2-tygodniowe rośliny z nasion wyprowadzone w kulturach *in vitro*

**Kultura protoplastów** – jak u Brassica

**Warianty pożywkowe**

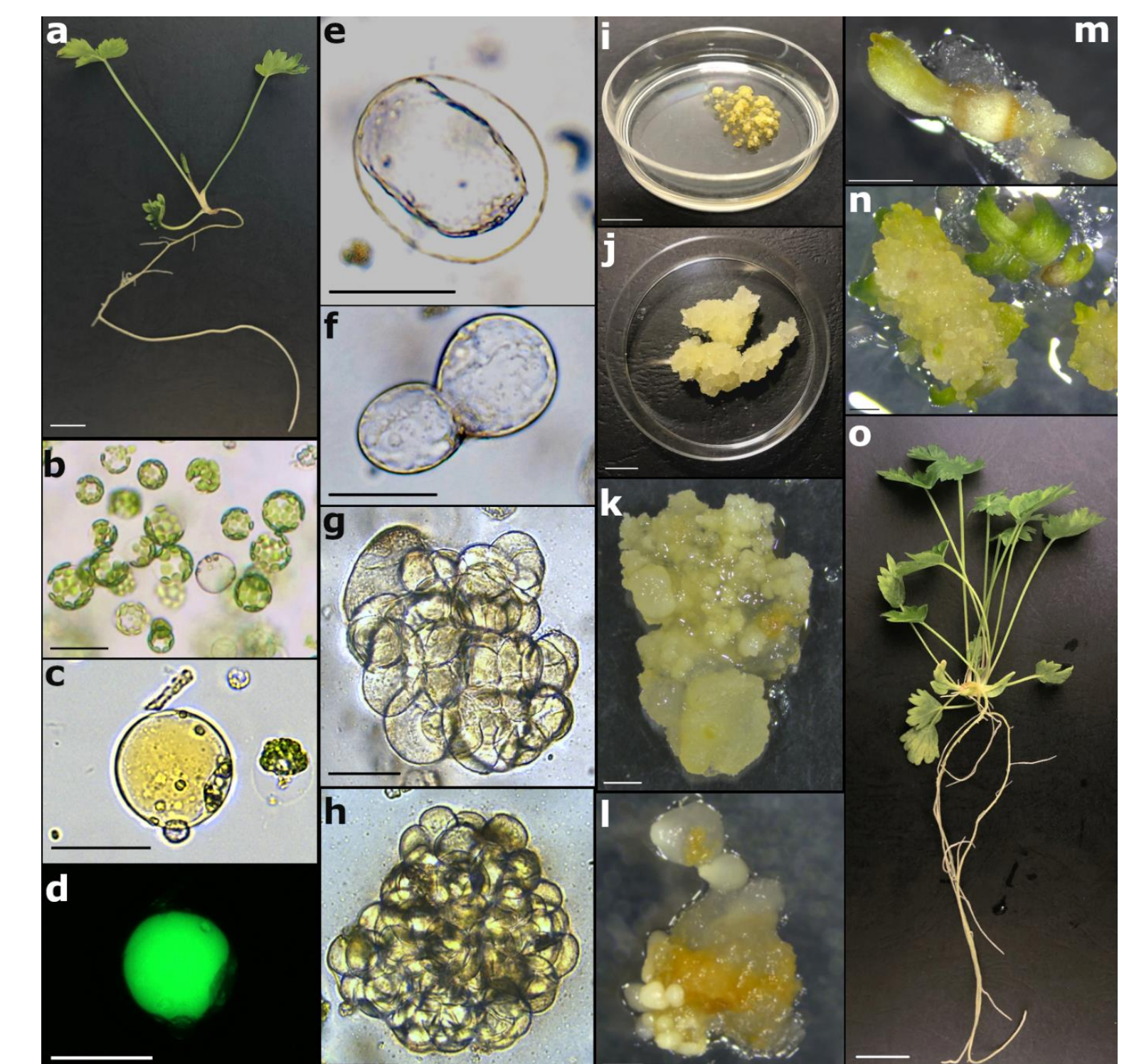
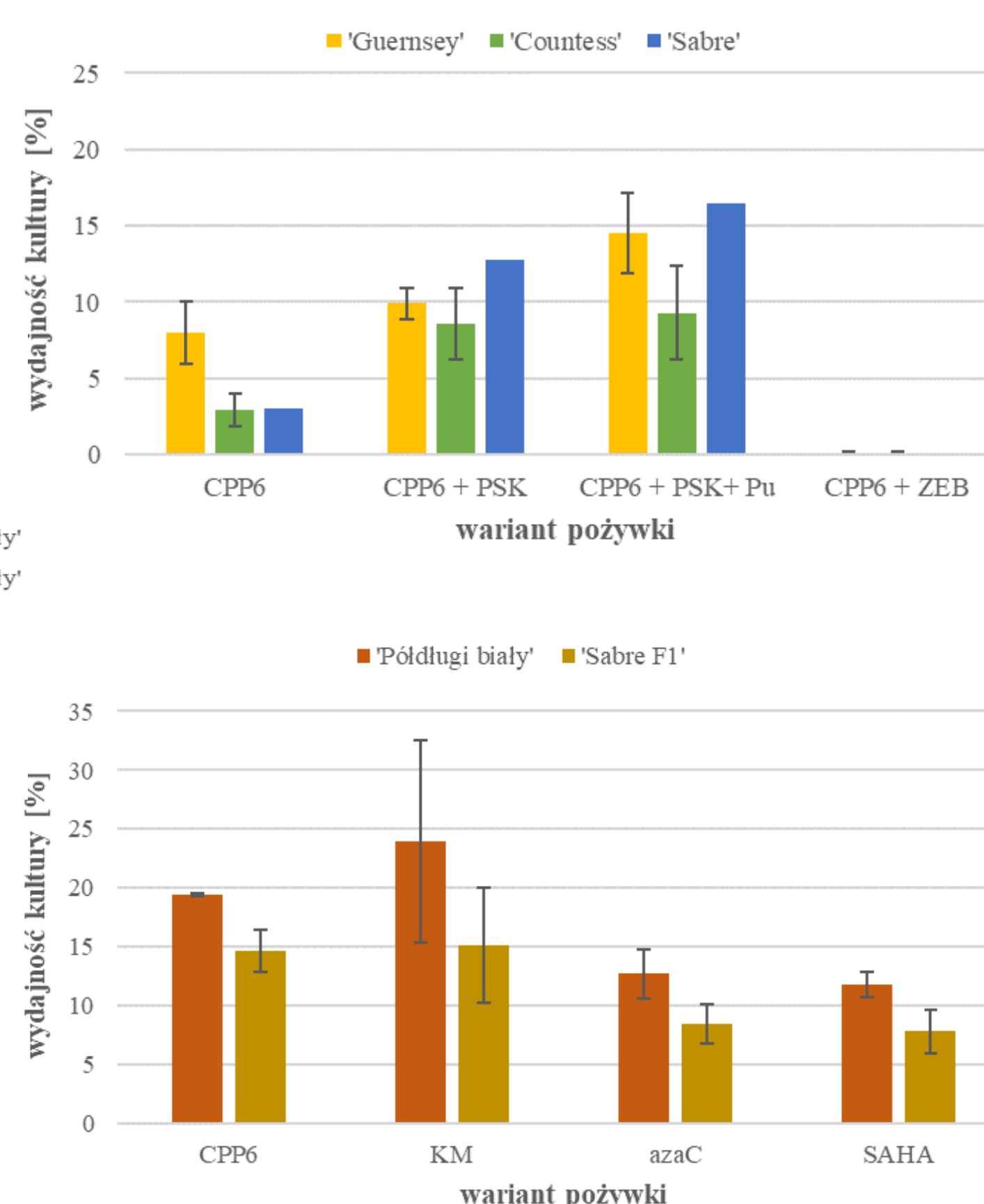
CPP – KM<sup>1</sup> + 74 g/l glukoza  
CPP6 – KM + 108 g/l glukoza  
KM – pełna żywka Kao i Michaluk + PSK<sup>2</sup>  
azaC – CPP6 + 0,75 μM azacytydyny  
SAHA – CPP6 z dodatkiem 0,075 μMkw. SAHA + PSK

<sup>1</sup> KM – makro-, mikroelementy, kwasy organiczne wg Kao i Michaluk (1975) + 0,1 mg/l 2,4-D + 0,2 mg/l zeatyna  
<sup>2</sup> PSK = 100 nM fitosulfokina; Pu = 8mg/l putrescyna; ZEB = 10 μM zebularyna



## Wyniki

**Rozwój kultury protoplastów różnych odmian pasternaku**

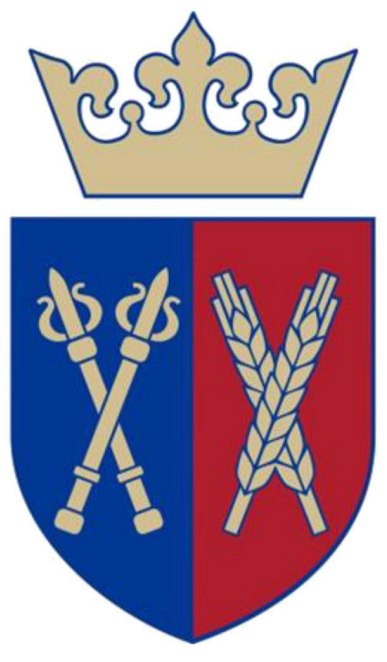


Kultura liściowych protoplastów pasternaku. (a) roślina donorowa wyprowadzona z nasion w warunkach *in vitro*; (b) uwolnione protoplasty z tkanki po maceracji liści w mieszaninie enzymatycznej ESIV; (c-d) żywotny protoplast wybarwiony diocetanem fluoresceiny widoczny w świetle białym (c) oraz UV (d); (e) plazmoliza obserwowana w 10. dniu kultury protoplastów; (f) pierwszy podział mitotyczny w 10. dniowej kulturze w pożywce CPP6; (g-h) wielokomórkowe agregaty obecne w 20. dniowej kulturze w pożywce CPP6; (i) błona alginianowa przerośnięta tkanką kalusową w 90. dniu kultury protoplastów; (j) niembriogeny kalus na pożywce BI + PSK; (k) masa proembriogenna w szóstym miesiącu kultury kalusa na pożywce BI + PSK; (l) kalus proembriogeny z zarodkami somatycznymi w stadium globalnym; (m) dojrzały zarodek somatyczny; (n) asynchroniczny rozwój zarodków somatycznych; (o) zregenerowana roślina pasternaku odmiany 'Pódlugi biały' gotowa do aklimatyzacji *ex vitro*. Skala: (b-h) 50 μm, (k-m) 1 mm, (a, i-j, o) 1 cm

## Wnioski

- Więcej agregatów komórkowych powstawało na pełnej żywce KM w porównaniu do bazy CPP
- Dodatek fitosulfokiny i putrescyny efektywnie stymulował aktywność podziałową





# Wpływ inhibitorów metylacji DNA i deacetylacji histonów na wzrost potencjału regeneracyjnego w kulturach protoplastów czosnku i cebuli



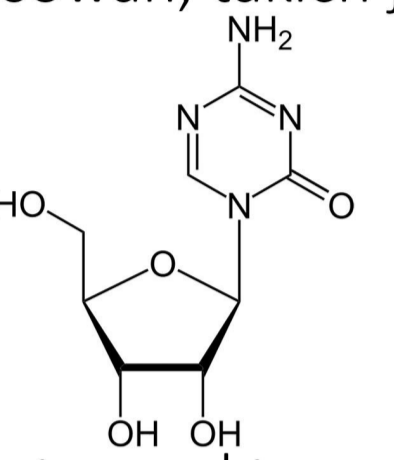
Kamil Szymonik, Katarzyna Stelmach-Wityk, Ewa Grzebelus

Katedra Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie, Al. Mickiewicza 21, 31-120 Kraków

e-mail: kamil.szymonik@urk.edu.pl

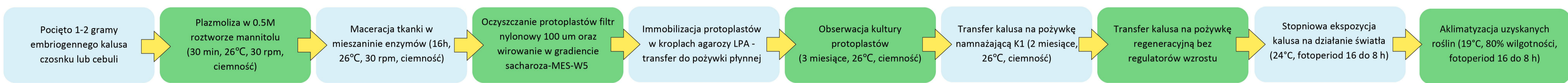
Niekorzystnie ukierunkowane modyfikacje epigenetyczne i niewłaściwa aktywacja ekspresji genów może negatywnie wpłynąć na rozwój kultur protoplastów. Procesy odpowiedzialne za modyfikacje epigenetyczne, takie jak metylacja DNA i acetylowanie histonów, są odwracalne i okazują się być obiecującym obszarem badań w zakresie przełamania latencji podziałowej komórek. Opracowanie skutecznej metody regeneracji protoplastów gatunków z rodzaju *Allium* może stanowić ważne narzędzie w hodowli tych roślin, zwłaszcza czosnku, którego dostępne na rynku odmiany uprawne rozmnażają się wyłącznie wegetatywnie. Optymalizacja wydajnego protokołu prowadzenia kultury protoplastów otwiera drzwi do innych zastosowań, takich jak elektrofuzja oraz transfekcja bezwektorowa.

**Celem badań była ocena wpływu inhibitorów metylacji DNA i deacetylacji histonów na zdolność regeneracyjną protoplastów czosnku i cebuli, do czego wykorzystano dwa związki chemiczne worinostat (SAHA) oraz azacytydynę (AZA).**



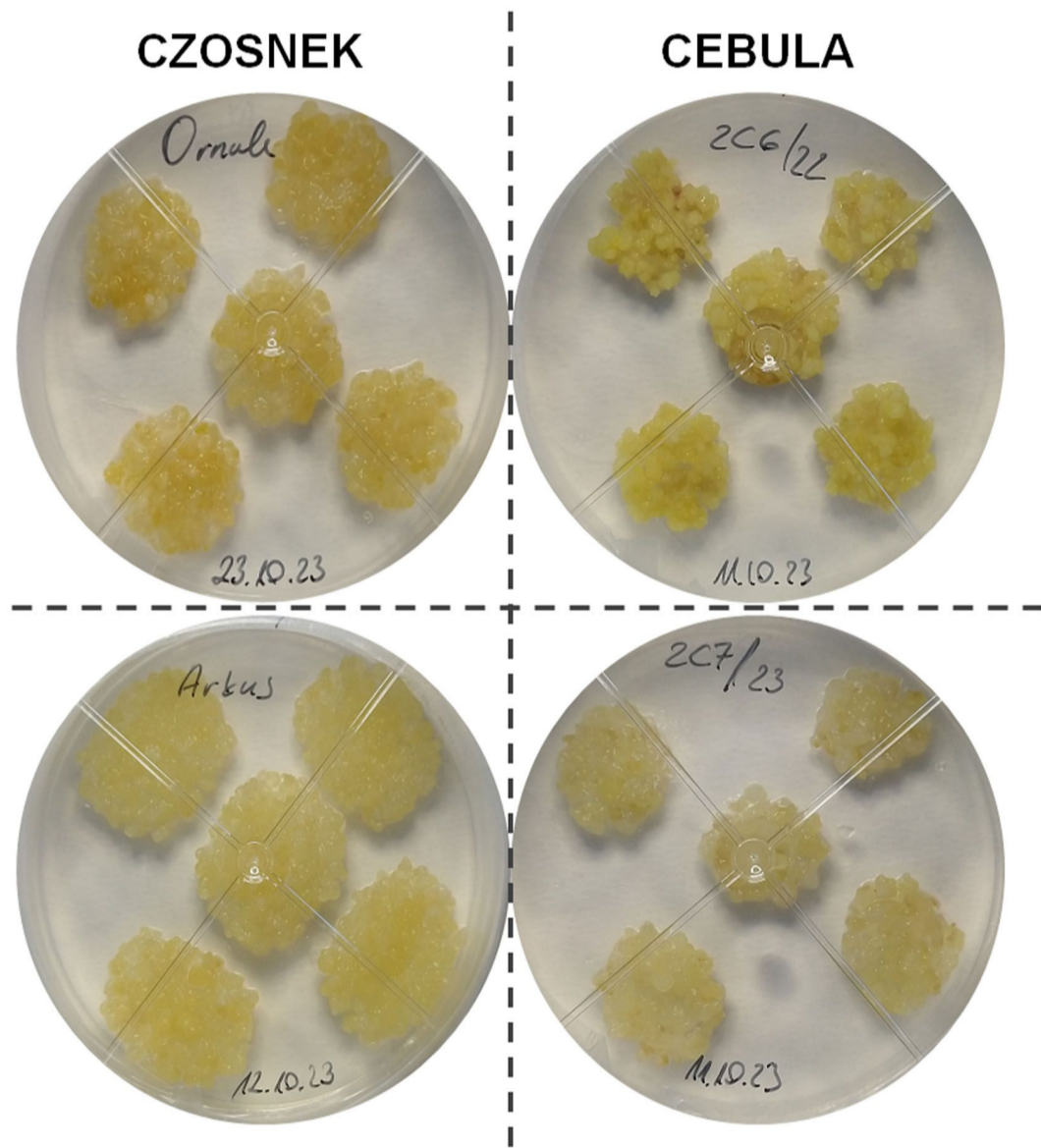
SAHA należy do klasy związków, które hamują deacetylazy histonowe. Inhibitor wiąże się z miejscem aktywnym deacetylazy, chelatując jony cynku, które występują w centrum aktywnym enzymu. Skutkuje to akumulacją acetylowanych histonów i acetylowanych białek, w tym czynników transkrypcyjnych kluczowych dla ekspresji genów potrzebnych do indukowania różnicowania komórek. AZA jest chemicznym analogiem nukleozydu cytydyny, która jest obecna w DNA i RNA. AZA po zmetabolizowaniu do 5-aza-2'-trifosforanu deoksycytydyny może zostać włączona w strukturę DNA. W niskich dawkach związek hamuje działanie metylotransferaz DNA, powodując hipometylację i wyzwalając mechanizmy naprawcze DNA.

## METODYKA

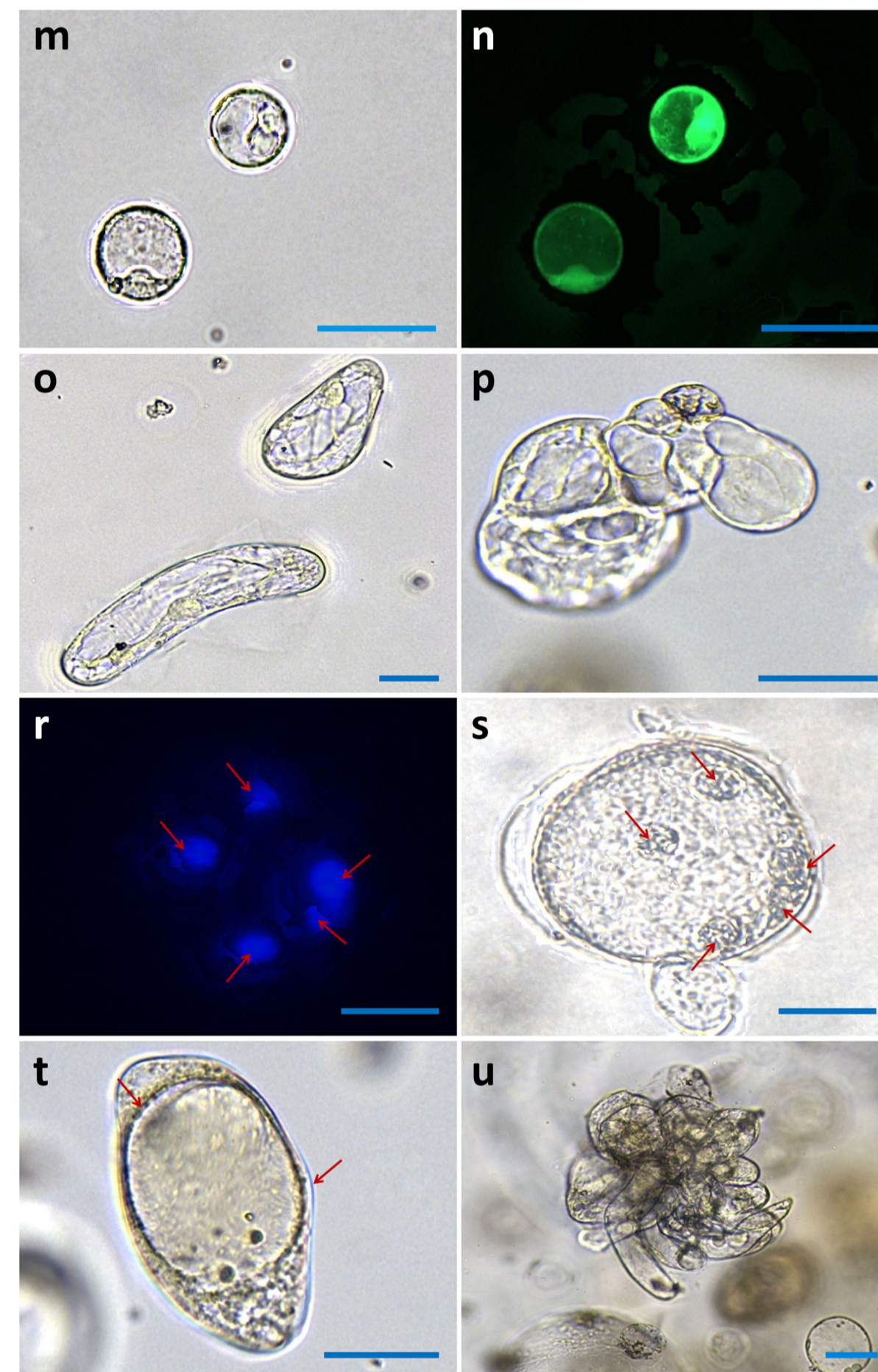
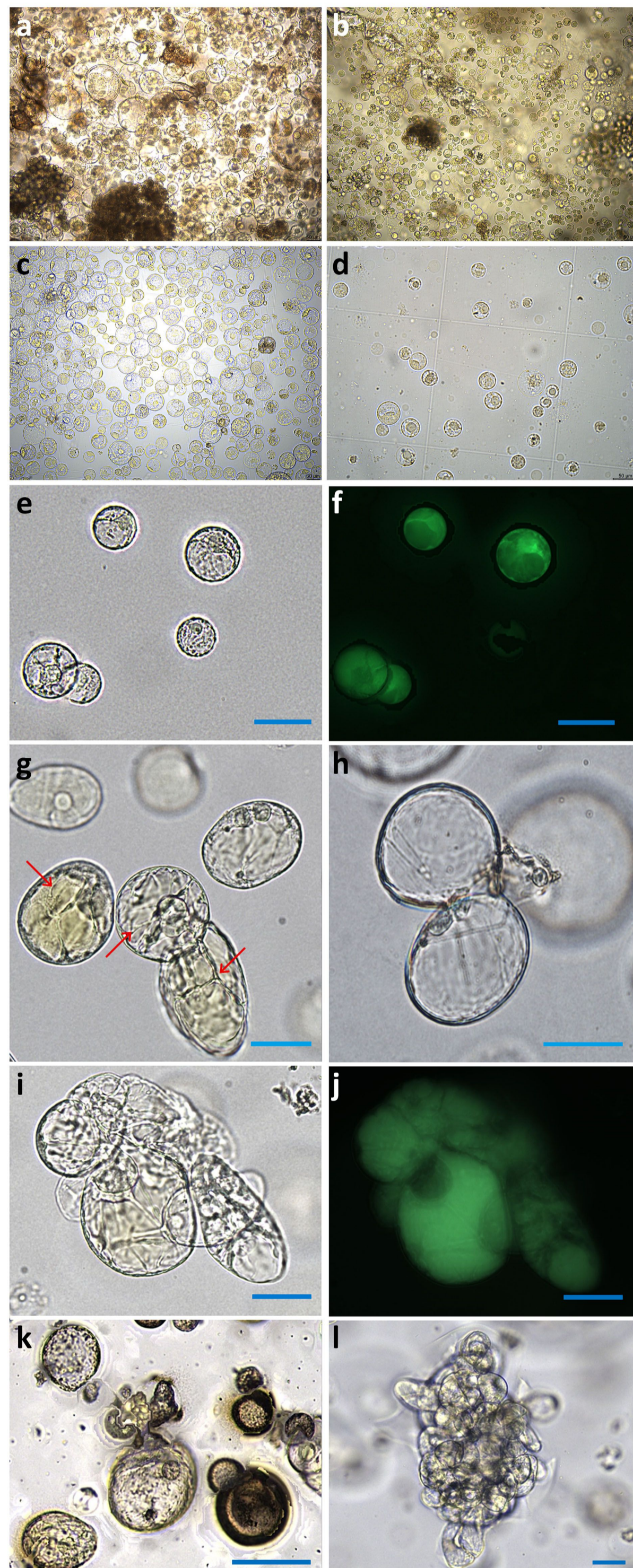


## WYNIKI

▼ Kultury kalusa czosnku (odmian 'Arkus', 'Ornak' oraz linii hodowlanych cebuli (ZC6, ZC7) wykorzystane do izolacji protoplastów dwa tygodnie po pasażu.

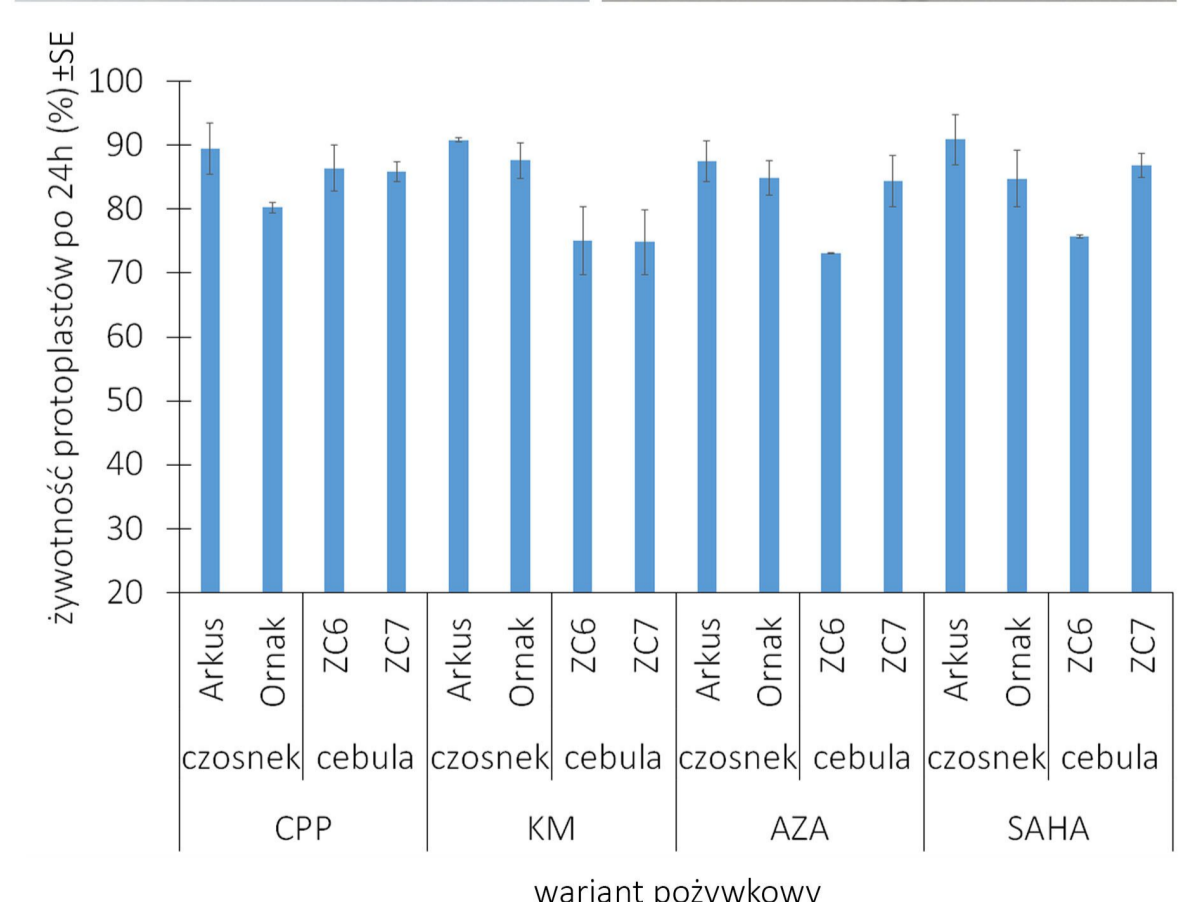
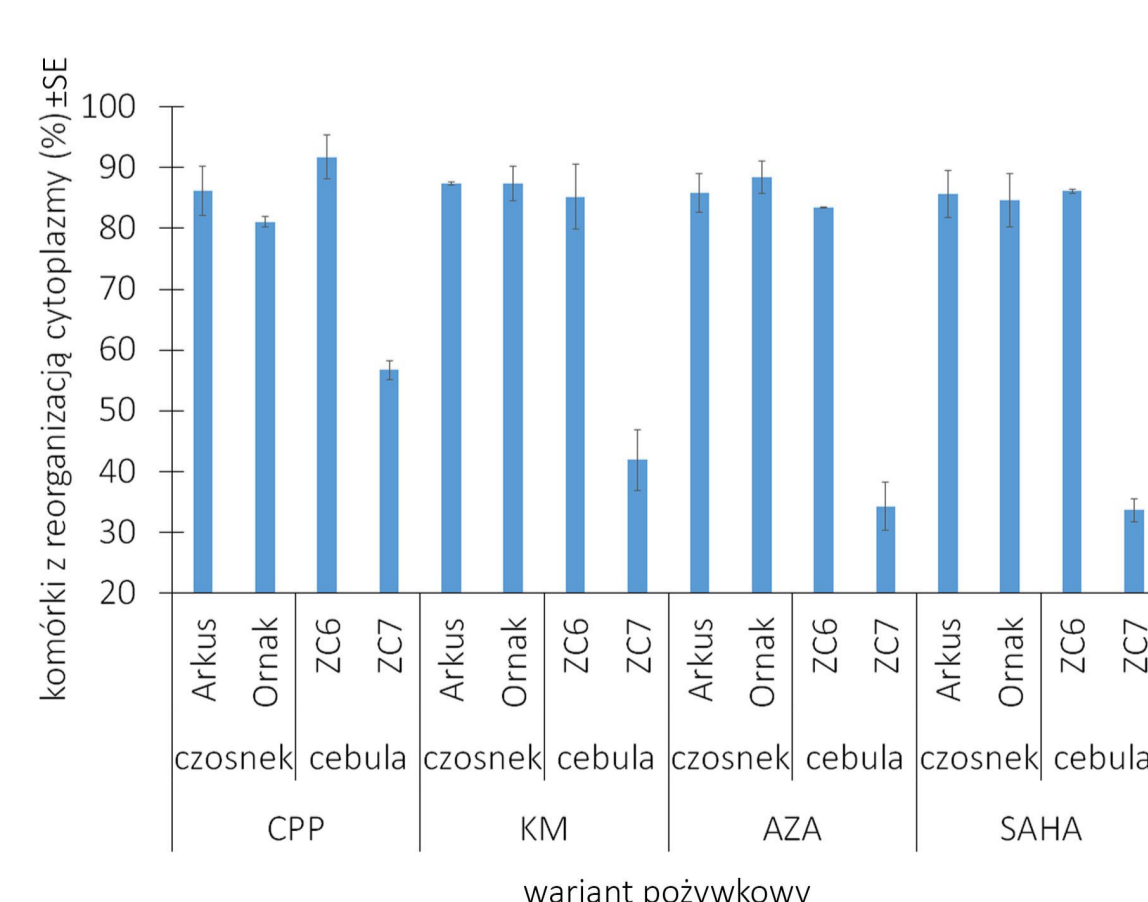
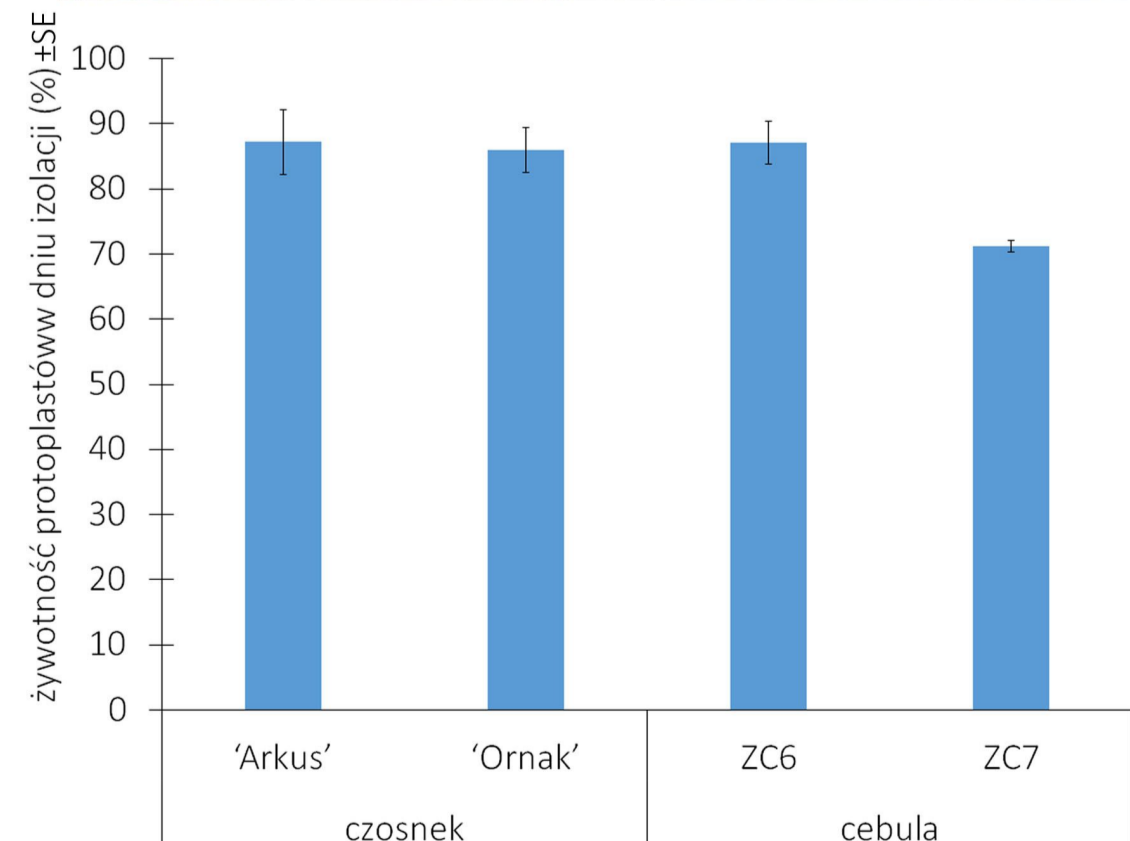
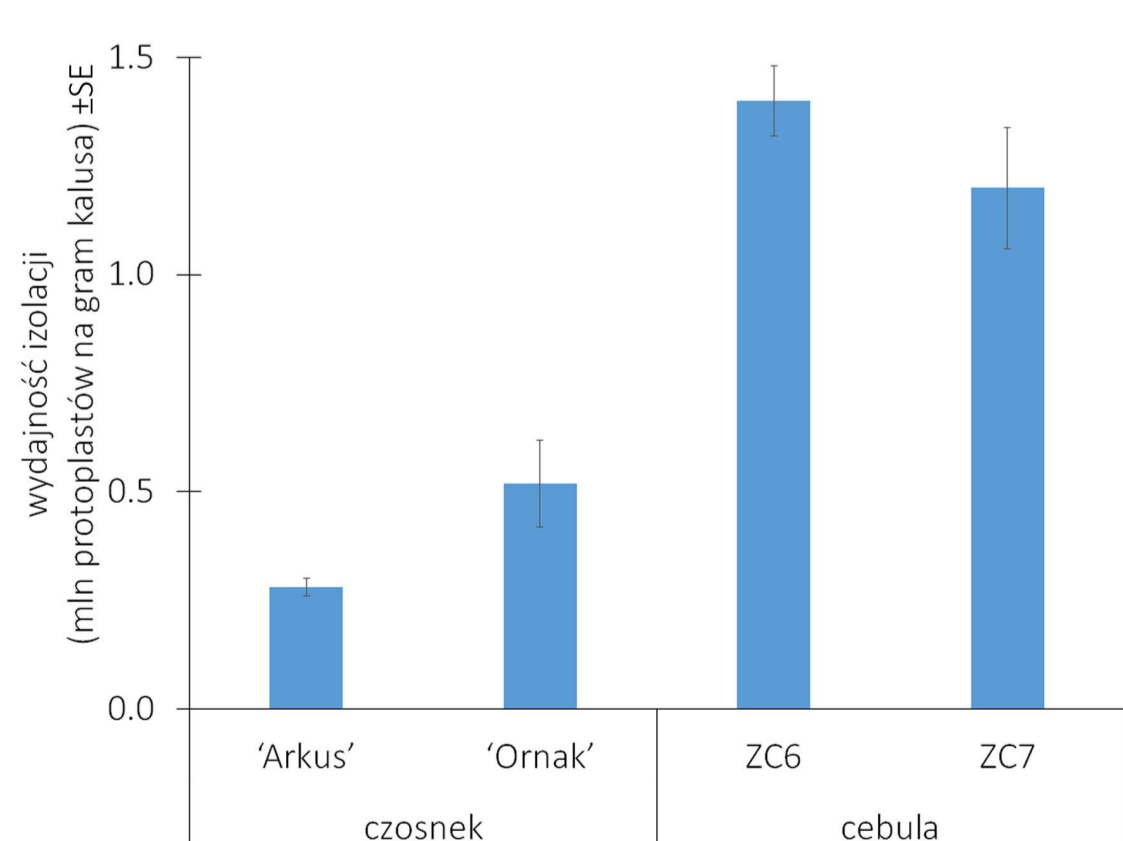
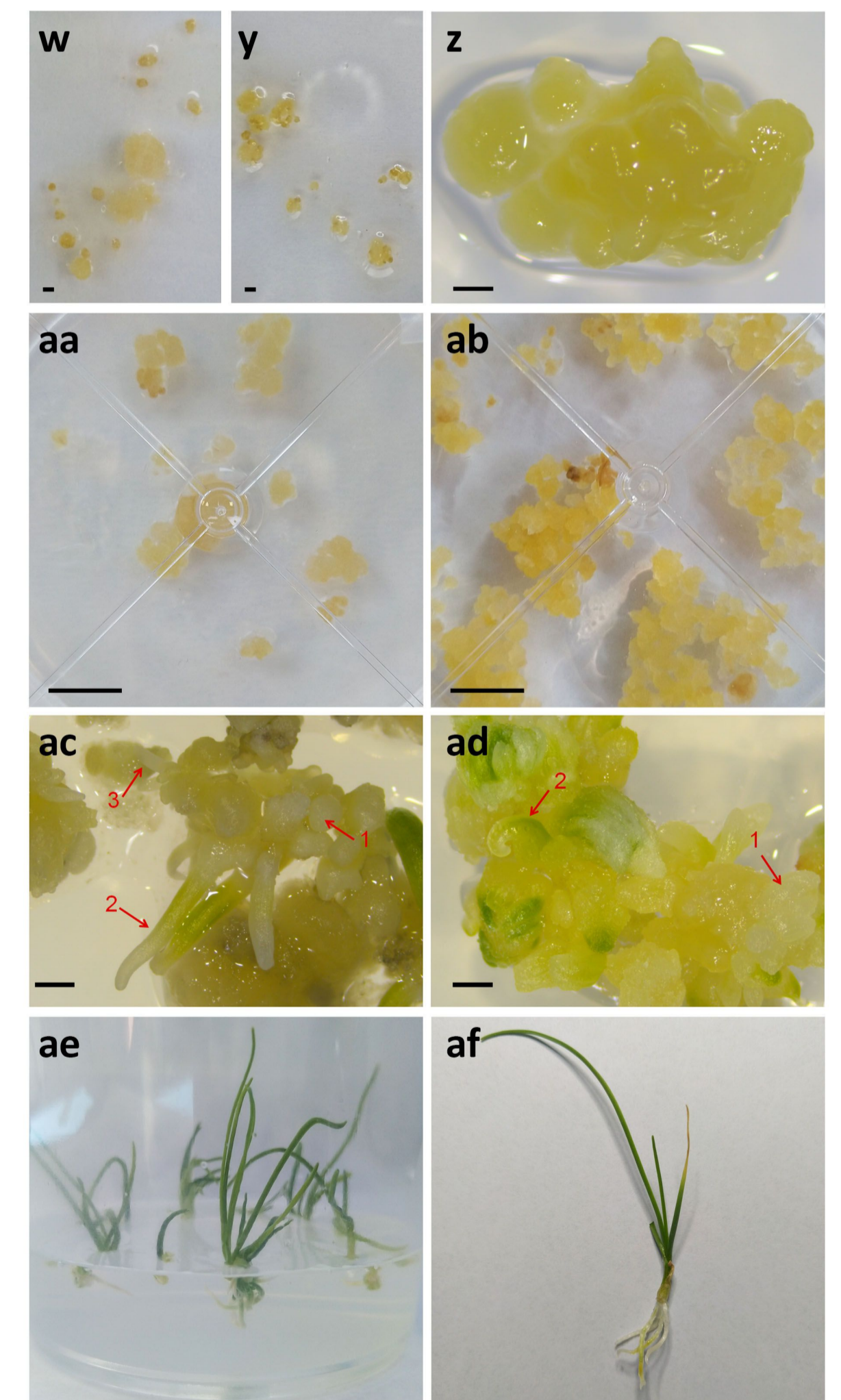


► Kultury protoplastów czosnku: (a-b) protoplasty odmiany 'Arkus' i 'Ornak' w mieszaninie maceracyjnej oraz (c-d) po oczyszczeniu w gradiencie sacharoza-MES-W5; (e-f) żywotne protoplasty immobilizowane w agarze LPA – pierwszy dzień kultury; (g) komórki przechodzące reorganizację cytoplazmy (oznaczono strzałkami), (h) niedokończony podział komórkowy, (i-j) dzielące się komórki w 20-tym dniu kultury, (k) brązowienie kultury w 30-stym dniu (pożywka CPP), (l) wielokomórkowy agregat obserwowany w 60-tym dniu kultury (pożywka KM + SAHA). Skala: 50 µm.



► Kultura protoplastów cebuli: (m-n) żywotne protoplasty zatopione w agarze, w dniu izolacji – barwienie FDA; (o) wydłużające się komórki z widoczną reorganizacją cytoplazmy w 10 dniu kultury; (p) fragmentacja komórki – 10 dzień kultury; (r-s) barwienie jąder komórkowych (czerwone strzałki) DAPI – 10 dzień; (t) brązowienie z widoczną plazmolizą – 20 dzień; (u) agregat komórkowy linia ZC6 – 20 dzień – żywka KM +PSK+AZA. Skala: m-p, t-u – 50 µm; r-s – 25 µm.

▼ Regeneracja kalusa czosnku i cebuli: (w-z) formujące się w obrębie kropli agarowej mikrogrudki kalusa czosnku – 90. dzień kultury, (aa) 4-tygodniowa kultura kalusa czosnku na pożywce K1, (ab) 8-tygodniowa kultura kalusa czosnku na pożywce K1, (ac) 12-tygodniowa kultura kalusa czosnku: 1 – masa proembriogenna, 2 – listek zarodkowy, 3 – korzeń zarodkowy, (ad) 12-tygodniowa kultura kalusa cebuli: 1 – zarodek somatyczny, 2 – listek zarodkowy, (ae) mikrorośliny czosnku odmiany 'Ornak', (af) w pełni wykształcona roślina czosnku odmiany 'Ornak' przed aklimatyzacją. Skala: w-z, ac-ad – 1 mm, aa-ab – 1 mm.



## WNIOSKI

1. Uwolnione protoplasty wszystkich badanych obiektów charakteryzowały się wysoką żywotnością (średnio 71-87%).
2. Zastosowane warianty pożywki stymulowały prawidłowe zmiany rozwojowe charakterystyczne dla wczesnej kultury protoplastów, tj. zwiększenie objętości komórek, zmianę ich kształtu reorganizację cytoplazmy oraz reaktywację podziałów mitotycznych.
3. W pożywce KM z dodatkiem AZA lub SAHA zaobserwowano tworzenie się pojedynczych agregatów komórkowych, tworzących w 90-cio dniowej kulturze mikrogrudki kalusa.
4. Otrzymany kalus czosnku i cebuli po przeniesieniu na pożywkę stałą intensywnie się namnażał.
5. Pod wpływem światła następowało formowanie masy proembriogennej. W 12-tygodniowej kulturze zaobserwowano tworzenie się zarodków somatycznych, zdolnych w kolejnych miesiącach do konwersji w rośliny.