

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](mailto:ewa.grzebelus@urk.edu.pl)**

**dr hab. inż. Agnieszka Kiełkowska, prof. URK**

**dr hab. Marek Szklarczyk, prof. URK**

# Cele projektu w 2022 r.

## Temat badawczy 1 (Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie):

- zsekwencjonowanie mitochondrialnego DNA u dziewięciu roślin warzywnych oraz plastydowego DNA u sześciu roślin warzywnych\*
- opracowanie markerów organellowych różnicujących pasternak i pietruszkę
- opracowanie markerów organellowych różnicujących jarmuż i kapustę galicyjską\*

## Temat badawczy 2 (Wyprowadzenie/utrzymanie kultur pędowych i embriogennej tkanki kalusowej warzyw amarylkowatych):

- opracowanie warunków prowadzenia krótko- i długoterminowych kultur pędowych czosnku o wysokim potencjale namnożeniowym
- opracowanie warunków indukcji i utrzymania embriogenego kalusa cebuli i czosnku
- opracowanie warunków kiełkowania nasion czosnku niedźwiedziego w warunkach *in vitro/ex vitro*
- analiza histologiczna kalusa wygenerowanego w poprzednim roku i próba jego regeneracji w rośliny

## Temat badawczy 3 (Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów form rodzicielskich):

- wybór obiektu/ów pasternaku o dobrej zdolności regeneracyjnej
- opracowanie protokołu izolacji i kultury protoplastów jarmużu, kapusty pekińskiej i kapusty brukselskiej
- opracowanie protokołu izolacji i kultury protoplastów czosnku i cebuli

\* cel zrealizowany częściowo (analizy w toku)  
*pozostałe cele zostały zrealizowane*

# Materiały i metody

## Temat badawczy 1 (Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie)

### Materiały roślinne

- pasternak zwyczajny (*Pastinaca sativa* L.) – odmiana Gladiator (Tozer Seeds)
- pietruszka zwyczajna (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) – odmiana Ołomuńska (Plantico)
- jarmuż (*Brassica oleracea* L. var. *sabellica*) – odmiana Kapral (Sustainable Seeds)
- kapusta galicyjska (*Brassica oleracea* L. var. *viridis*) – odmiana Vates (Plantico)

} wykorzystano po  
20 siewek z  
każdego obiektu

### Metody

- sekwencjonowanie genomowego DNA organelli z wykorzystaniem platformy firmy Illumina (wariant PE150)
- PCR z elektroforezą produktów w standardowym żelu agarozowym lub w natywnym żelu poliakrylamidowym (ewentualne trawienie restrykcyjne produktów amplifikacji przed elektroforezą)

## Temat badawczy 2 (Wyprowadzenie/utrzymanie kultur pędowych i embriogennej tkanki kalusowej warzyw amarylkowatych)

### Materiały roślinne

czosnek zwyczajny (*Allium sativum* L.) – 3 obiekty; cebula zwyczajna (*Allium cepa* L.) – 2 linie; czosnek niedźwiedzi (*Allium ursinum* L.) – 2 obiekty

### Metody

- indukcja krótko- i długoterminowej kultury pędowej z piętek ząbków czosnku (1 pożywka)
- indukcja kalusa czosnku z piętek ząbków czosnku i zarodków zygotycznych cebuli (2 pożywki)
- indukcja kiełkowania nasion czosnku niedźwiedziego w warunkach *in vitro/ex vitro* (3 zestawy parametrów)
- regeneracja kalusa czosnku i cebuli (2 obiekty, 3 pożywki)

## Temat badawczy 3 (Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów form rodzicielskich)

### Materiały roślinne

pasternak zwyczajny – 3 obiekty; jarmuż, kapusta galicyjska, kapusta brukselska – 1 obiekt; czosnek zwyczajny – 2 obiekty; cebula zwyczajna – 2 obiekty;

### Metody

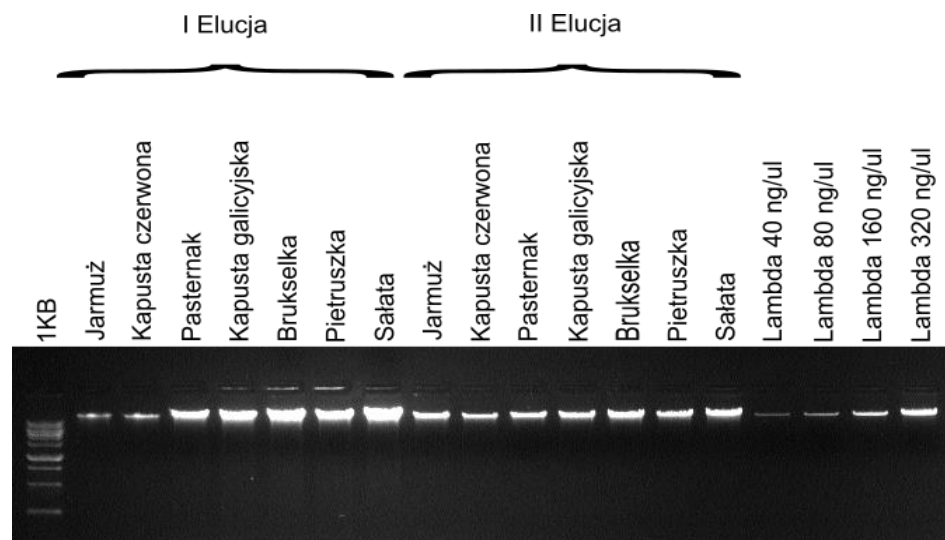
- kultura roślin donorowych z nasion w warunkach *in vitro*
- maceracja enzymatyczna liści/kalusa dla izolacji protoplastów (różne warianty składu mieszaniny maceracyjnej)
- kultura protoplastów w pożywkach płynnych po immobilizacji w alginianie wapnia (różne warianty pożywkowe)
- regeneracja roślin wybranych kultur protoplastów na pożywkach stałych

# Wyniki

## Sekwencjonowanie prób organellowego DNA

Organellowe DNA (mtDNA i cpDNA) izolowano z: kapusty głowiastej czerwonej odm. Haco, kapusty warzywnej brukselskiej odm. Casiopea, sałaty głowiastej masłowej odm. Mira, czosnku zwyczajnego odm. Ornak oraz z czosnku niedźwiedziego.

Preparaty organellowego DNA wyizolowano ze zbiorczych prób mitochondriów i plastydów pozyskanych z poszczególnych analizowanych obiektów. Zmierzone spektrofotometrycznie wartości stężenia DNA otrzymanych preparatów wynosiły w granicach od 61 do 491 ng/μl. Analiza spektrofotometryczna umożliwiła również pomiar jakościowy otrzymanych preparatów poprzez pomiar stosunku absorpcji przy 260 i 280 nm. Średnia wartość zmierzonego parametru wynosiła 1,82, co świadczy o braku kontaminacji badanych preparatów DNA związkami absorbującymi promieniowanie o długości fali 280 nm, np. białkami.

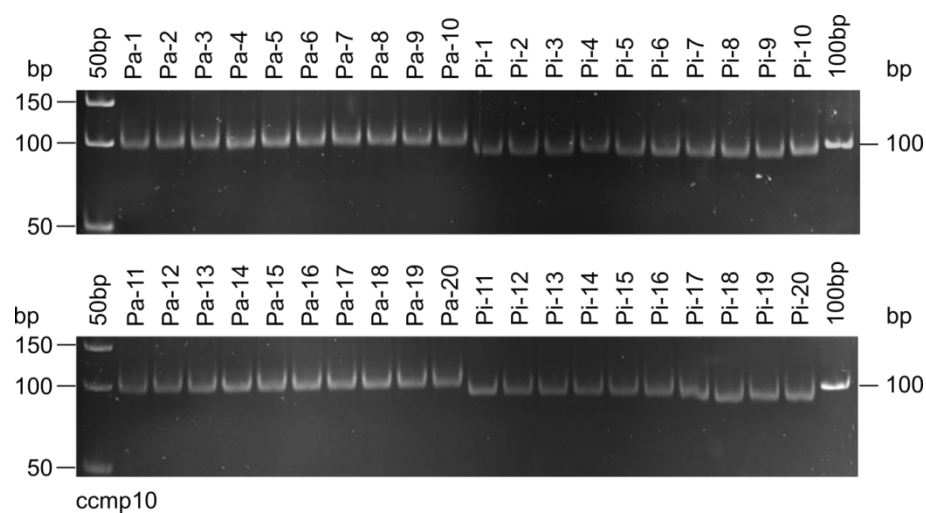


Otrzymane preparaty organellowego DNA wysłano do komercyjnego usługodawcy, któremu zlecono przygotowanie bibliotek i ich zsekwencjonowanie. Aktualnie proces przygotowywania bibliotek został ukończony i trwa proces ich sekwencjonowania.

CpDNA badanych obiektów rozdzielone w żelu agarozowym wraz ze znanymi ilościami DNA faga lambda.

## Opracowanie markerów organellowych różnicujących komponenty rodzicielskie: pasternak i pietruszkę oraz jarmuż i kapustę galicyjską

W toku analiz porównywano profile markerowe wygenerowane dla siewek pasternaku i pietruszki oraz profile uzyskane dla siewek jarmużu i kapusty galicyjskiej. W uzyskanych elektroforegramach poszukiwano produktów PCR/restrykcji, które były specyficzne dla jednego z obiektów danej pary. Analizy prowadzono dwustopniowo: najpierw na dwóch roślinach z obiektu (typowanie markerów), następnie na 20 roślinach z obiektu (weryfikacja markerów).



Profile prążkowe otrzymane przy użyciu przykładowego markera cpDNA dla 20 roślin pasternaku oraz 20 roślin pietruszki (weryfikacja markerów).

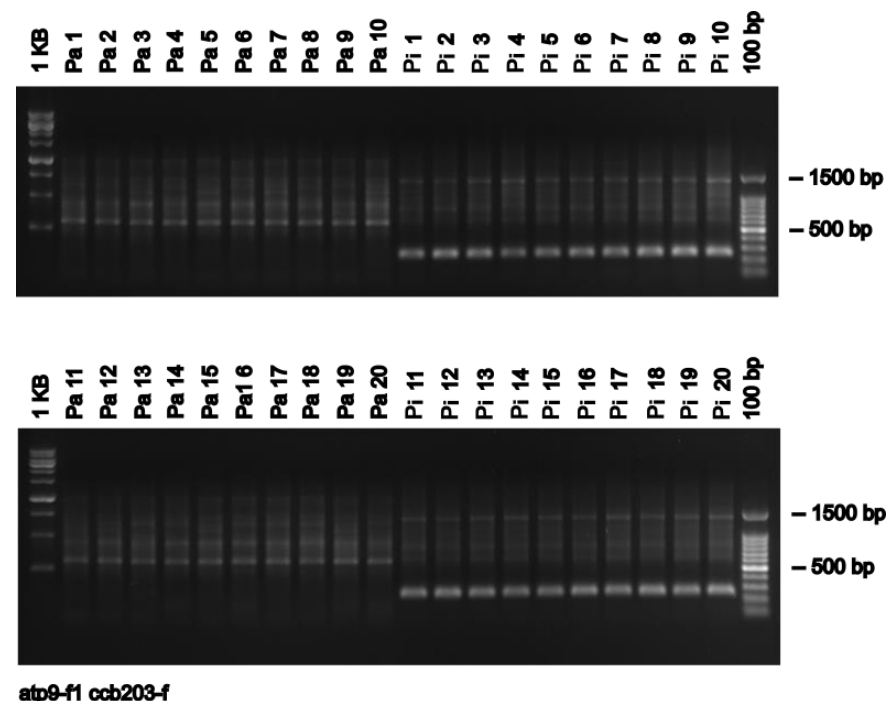
### Pasternak/pietruszka

Przy zastosowaniu 10 markerów uzyskano ogółem 22 produkty amplifikacji/restrykcji występujące wyłącznie w jednym porównywanym obiekcie.

### Jarmuż/kapusta galicyjska

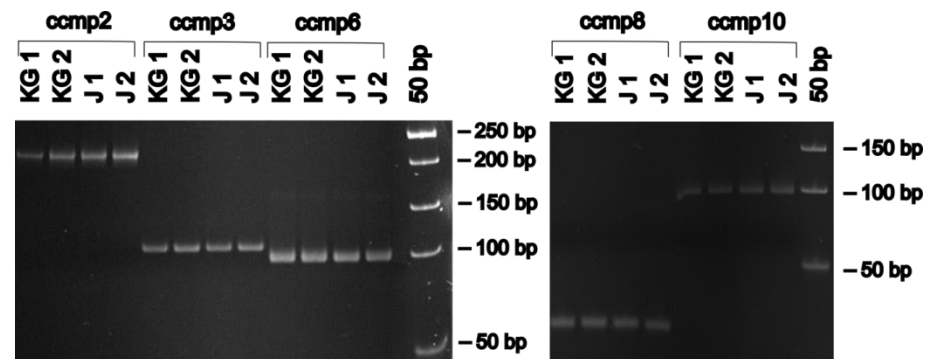
Pomimo przetestowania 20 markerów (typowanie), żaden z nich nie różnicował badanych obiektów. Ma to związek z faktem, iż obydwa obiekty reprezentują ten sam gatunek - *Brassica oleracea* L.

Zidentyfikowane produkty różnicujące pasternak i pietruszkę będzie można zastosować do selekcji odpowiednich produktów fuzji somatycznej (cybrydy).



### **atp9-f1 ccb203-f**

Profile prążkowe otrzymane przy użyciu przykładowego markera mtDNA dla 20 roślin pasternaku oraz 20 roślin pietruszki (weryfikacja markerów).

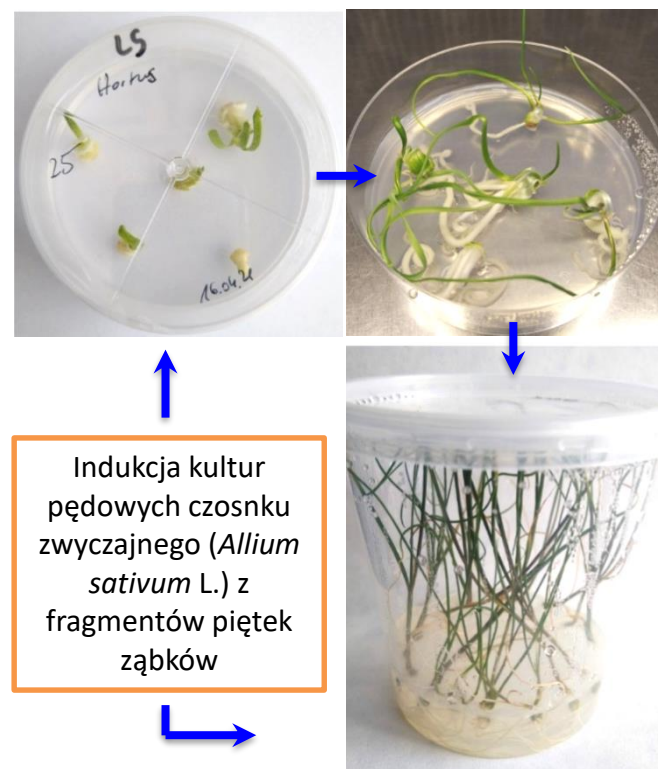


Profile prążkowe otrzymane przy użyciu pięciu markerów cpDNA dla 2 roślin kapusty galicyjskiej i 2 roślin jarmużu (typowanie markerów).

## Wyprowadzenie/utrzymanie kultur pędowych czosnku

Współczynnik namnażania w kulturach fragmentów piętek czosnku zwyczajnego (*Allium sativum* L.)

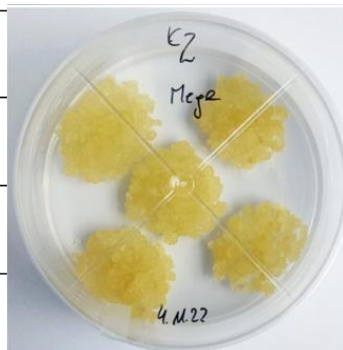
Obiekt	Liczba wyłożonych eksplantatów	Liczba otrzymanych roślin	Współczynnik namnożenia ( $\pm$ SE)
'Arkus'	150	204	1,4 $\pm$ 0,1 (a)
'Mega'	150	583	3,9 $\pm$ 0,4 (b)
465K	150	636	4,2 $\pm$ 0,6 (b)
Ogółem	450	1423	3,2 $\pm$ 0,5



## Wyprowadzenie/utrzymanie kultur kalusa czosnku i cebuli

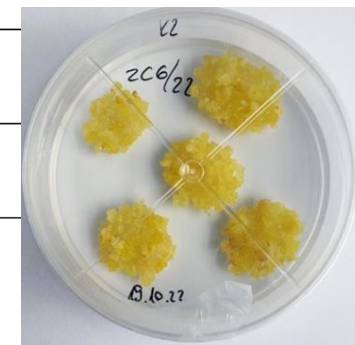
Indukcja kalusa z fragmentów piętek ząbków czosnku zwyczajnego (*Allium sativum* L.)

Obiekt	Pożywka indukcyjna	Średnia liczba ( $\pm$ SE) eksplantatów tworzących kalus
'Arkus'	K1	24,3 $\pm$ 13,2
	K2	21,3 $\pm$ 4,6
'Mega'	K1	44,7 $\pm$ 2,6
	K2	47,0 $\pm$ 0,0
465K	K1	42,7 $\pm$ 4,5
	K2	42,7 $\pm$ 6,3



Indukcja kalusa z zarodków zygocycznych cebuli zwyczajnej (*Allium cepa* L.)

Obiekt	Pożywka indukcyjna	Średnia liczba ( $\pm$ SE) zarodków tworzących kalus	% indukcji kalusa
ZC5	K1	2,0 $\pm$ 1,6	4,0
	K2	2,0 $\pm$ 0,8	4,0
ZC6	K1	31,3 $\pm$ 4,8	62,7
	K2	27,7 $\pm$ 4,6	55,3





# Indukcja kiełkowania nasion czosnku niedźwiedziego

*in vitro*

Obiekt	Wariant kiełkowania	Liczba nasion		Współczynnik kiełkowania
		wyłożonych	skielkowanych	
'Ramsons'	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20°C	100	0	0
	papier ścierny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4°C	100	0	0
wild garlic	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 20°C	60	0	0
	papier ścierny + H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 4°C	60	0	0

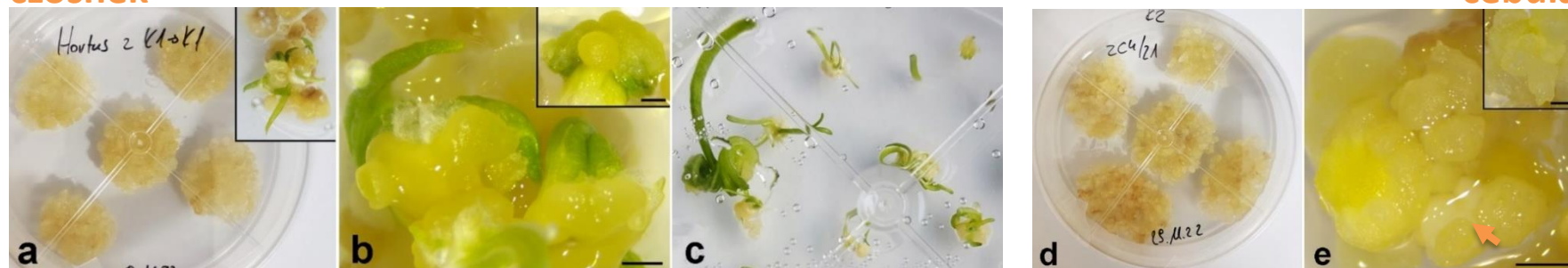
*ex vitro*

Obiekt	Liczba nasion		Współczynnik kiełkowania
	wyłożonych	skielkowanych	
'Ramsons'	200	0	0
wild garlic	120	0	0

czosnek

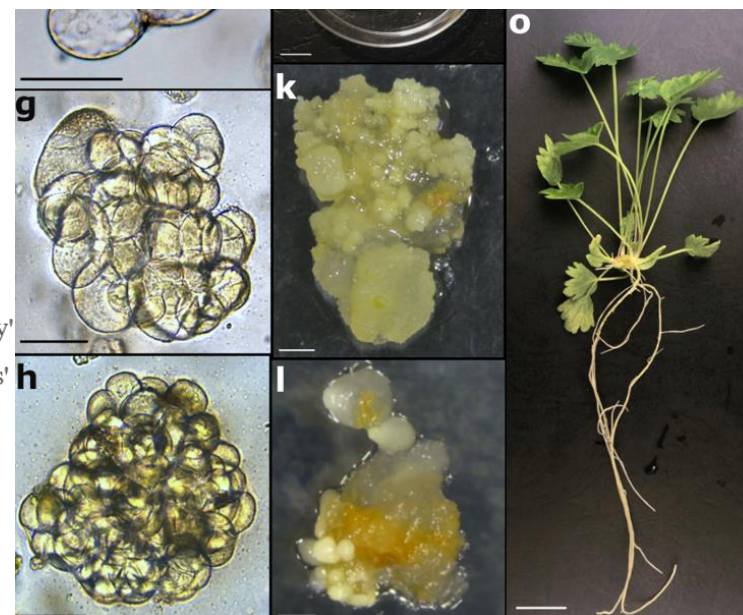
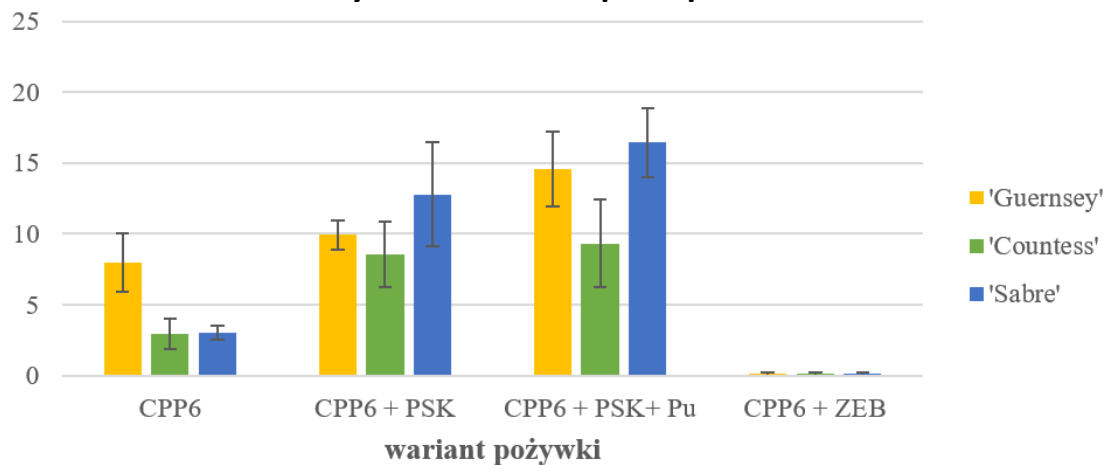
Regeneracja kalusa

cebula



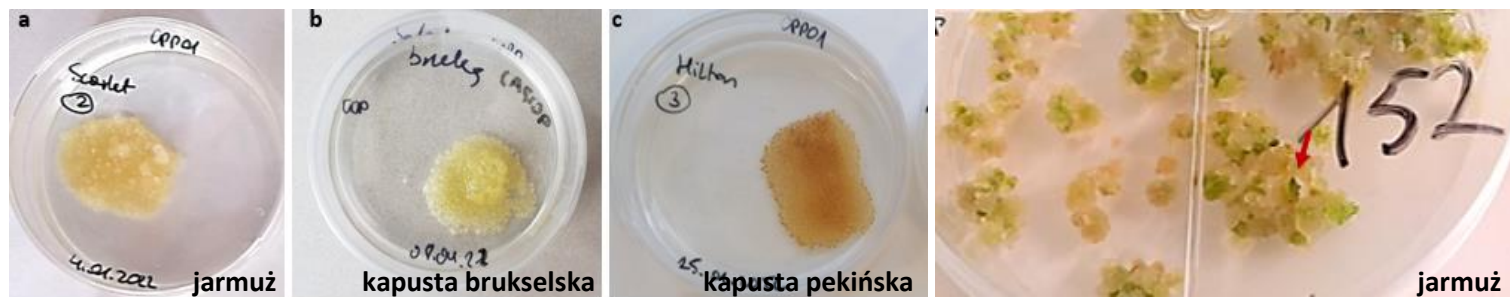
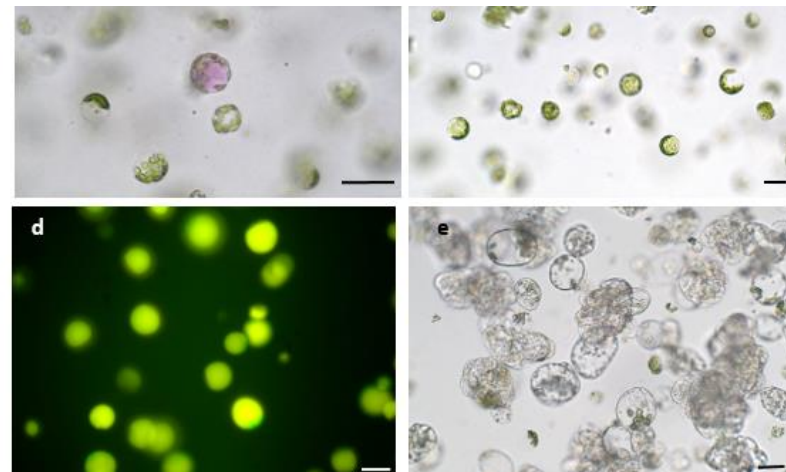
## Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów pasternaku

Procent tworzących się agregatów komórkowych w kulturach protoplastów



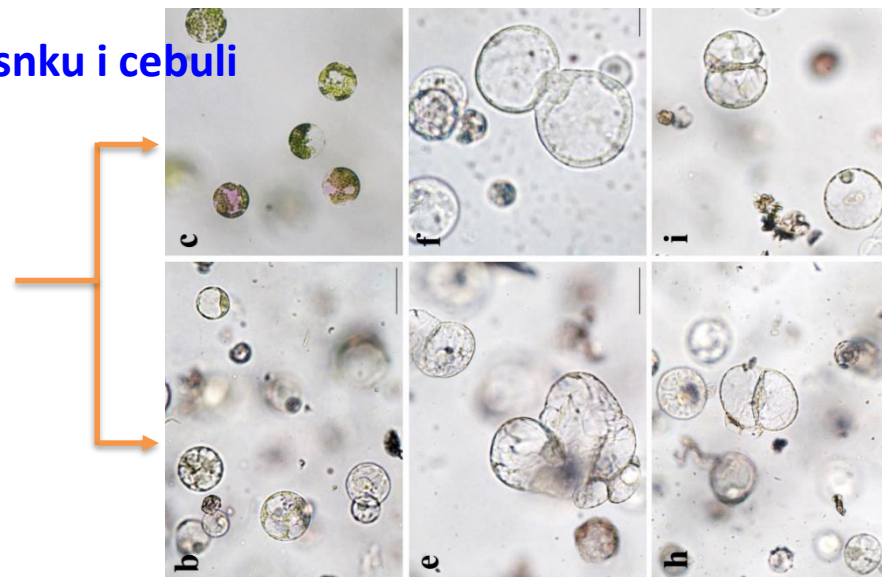
## Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów jarmużu, kapusty pekińskiej i brukselskiej

Czynnik	Wydajność kultury (% ± SE)	
	5. dzień	15. dzień kultury
<b>Obiekt</b>		
Jarmuż 'Scarlet'	17,4±0,7 b	41,2±2,1 b
Kapusta pekińska 'Hilton'	20,7±1,5 a	47,6±1,9 a
Kapusta brukselska 'Casiopea'	15,6±0,5 b	39,7±1,4 b
<b>Pożywka do kultury protoplastów</b>		
CPPO1	23,4±1,7 a	55,3±1,2 a
Bras3	16,1±0,8 b	28,0±2,1 b
Bras4	13,1±0,5 c	30,3±1,7 b
Bras5	17,4±0,7 b	52,9±1,5 a



## Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów czosnku i cebuli

Materiał donorowy	Rodzaj/ odmiana/linia	Wariant pożywki	Symptomy rozwojowe
pędy	czosnek/Mega czosnek/Ornak	CPP-1	zmiana kształtu komórek, odtworzenie ścian, reorganizacja cytoplazmy, indukcja pierwszego podziału mitotycznego, agregaty dwu- i wielokomórkowe
		CPP-2	
		CPP-3	
		CPP-8	
kalus	czosnek/Ornak	CPP-4	
	czosnek/POL030	CPP-5	
	cebula/ZC2	CPP-6	
	cebula/ZC4	CPP-7	





# Wnioski

## Temat badawczy 1 (Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie)

1. Uzyskano preparaty organellowego DNA do sekwencjonowania wysokoprzepustowego. Zarówno pod względem ilościowym jak i jakościowym spełniały one kryteria przydatności do konstrukcji bibliotek sekwencyjnych. Na bazie uzyskanych preparatów sporządzono biblioteki, które obecnie są poddawane sekwencjonowaniu w serwisie zewnętrznym z użyciem platformy firmy Illumina.
2. W wyniku genotypowania pasternaku i pietruszki zidentyfikowano 10 markerów organellowych, które będą przydatne do identyfikacji cytoplazmatycznych mieszańców somatycznych (cybrydy) pomiędzy tymi gatunkami.
3. Dotychczas nie udało się zidentyfikować markerów organellowych różnicujących kapustę galicyjską i jarmuż, co wynika z bliskiego pokrewieństwa tych roślin – obydwie reprezentują gatunek *Brassica oleracea* L.

## Temat badawczy 2 (Wyprowadzenie/utrzymanie kultur pędowych i embriogennej tkanki kalusowej warzyw amarylkowatych)

### ***Kultury pędowe czosnku***

1. Odm. Mega i 465K charakteryzowały się wyższym współczynnikiem namnażania.
2. Zastosowane warunki krótko- jak i długoterminowej kultury pędowej pozwoliły na systematyczne utrzymywanie w kulturze liczby roślin wystarczającej do ewentualnej izolacji protoplastów.

### ***Kultury kalusa czosnku i cebuli***

1. Wybrane pożywki indukcyjne stymulowały formowanie się kalusa zarówno z fragmentów piętek ząbków czosnku jak i zarodków zygotycznych cebuli, przy czym zarodki linii ZC5 charakteryzowały się niską wydajnością indukcji kalusa.
2. Na pożywce K2 kalus namnażał się zdecydowanie szybciej niż na pożywce K1 i charakteryzował się preferowaną suchą strukturą i drobno-ziarnistą teksturą.

### ***Kiełkowanie nasion czosnku niedźwiedziego w warunkach in vitro/ex vitro***

1. Testowane metody kiełkowania nasion *ex vitro* jak i *in vitro* (uwzględniające mechaniczną i chemiczną skaryfikację i inkubację w roztworze kwasu giberelinowego) nie przełamały spoczynku nasion.

### ***Analiza histologiczna kalusa oraz weryfikacja jego zdolności regeneracyjnej***

1. Analiza histologiczna kalusa czosnku i cebuli potwierdziła ich embriogeniczny charakter
2. Wstępne pozytywne próby regeneracji kalusa w rośliny zostaną wykorzystane do opracowania protokołu regeneracji, który będzie wykorzystany do otrzymania roślin z kultur protoplastów dla rodzaju *Allium*

# Wnioski –c.d.

## Temat badawczy 3 (Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów form rodzicielskich)

### ***Pasternak***

1. Udział tworzących się agregatów komórkowych w kulturach badanych obiektów wahał się w granicach 7-11% i był zależny od składu pożywki.
2. Pożywka z fitosulfokina i putrescyną efektywnie stymulowała aktywność podziałową w kulturach protoplastów pasternaku.
3. Spośród przetestowanych w bieżącym roku obiektów odmiana Sabre F1, jako obiekt o najwyższej zdolności regeneracyjnej, powinna zostać wykorzystana do dalszych etapów badań nad wprowadzeniem cechy CMS z pasternaku do pietruszki.
4. Regenerację roślin na drodze somatycznej embriogenezy zaobserwowano dla długoterminowej kultury kalusa odmiany Półdługi biały otrzymanego z kultur protoplastów.

### ***Jarmuż, kapusta pekińska i kapusta brukselska***

1. Aktywność mitotyczna badanych obiektów była stosunkowo wysoka i wahała się w granicach 40-47% w piętnastym dniu kultury i była zależna od obiektu i pożywki do kultury
2. Obserwowano różnice w morfologii kalusa otrzymanego z protoplastów u badanych obiektów.
3. Regenerację pędów z kultur protoplastów obserwowano u dwóch obiektów (jarmuż i kapusta brukselska). Nie obserwowano organogenezy pędowej z kultur protoplastów kapusty pekińskiej
4. Analiza cytometryczna uzyskanych pędów jarmużu i kapusty brukselskiej wskazuje na stabilność uzyskanych regenerantów, które były w większości diploidalne.

### ***Czosnek***

1. Spośród zastosowanych dwóch nowych mieszanin enzymatycznych ta zawierająca celulazę, macerozymę i driselazę efektywnie macerowała liście czosnku oraz kalus czosnku i cebuli uwalniając wystarczającą liczbę protoplastów.
2. Uwolnione protoplasty liściowe i kalusowe wszystkich badanych obiektów charakteryzowały się wysoką żywotnością (średnio 90%).
3. Zastosowane warianty pożywkowe stymulowały prawidłowe zmiany rozwojowe charakterystyczne dla wczesnej kultury protoplastów zwiększenie objętości komórek, zmianę ich kształtu, reorganizację cytoplazmy oraz aktywację mitozy.
4. Jednak w żadnym wariantcie kultury nie obserwowano tworzenia się agregatów wielokomórkowych

---

*W roku 2022 (drugi rok realizacji projektu)*

*nie planowano prezentacji doniesień konferencyjnych i publikacji*