

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



UNIWERSYTET ROLNICZY
im. Hugona Kollątaja w Krakowie

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 2023 r.

Temat badawczy 1 (Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie):

opracowanie markerów jądrowych i organelowych różnicujących:

- cebulę zwyczajną i szalotkę
- dwie odmiany czosnku pospolitego
- kapustę brukselską i kapustę czerwoną

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

- utrzymanie wyprowadzonych kultur pędowych czosnku zwyczajnego w warunkach kultury *in vitro*
- opracowanie warunków indukcji i utrzymania embriogennej kalusa cebuli, czosnku zwyczajnego i czosnku niedźwiedzi*
- opracowanie warunków regeneracji kalusa cebuli i czosnku zwyczajnego w rośliny

*czosnek niedźwiedzi zastąpiono cebulą szalotką

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

- poprawa zdolności regeneracyjnej wyselekcjonowanych obiektów pasternaku
- opracowanie protokołu izolacji i kultury protoplastów kapusty głowiastej czerwonej, kapusty pekińskiej i kapusty brukselskiej
- opracowanie protokołu izolacji i kultury protoplastów czosnku zwyczajnego i cebuli

wszystkie cele zostały zrealizowane

Materiały i metody

Temat badawczy 1 (Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie)

Materiały roślinne

- kapusta głowiasta czerwona (*Brassica oleracea* L. var. *capitata* (L.) Duchesne f. *rubra*) odmiany Haco (Polan Kraków)
- kapusta warzywna brukselska (*Brassica oleracea* L. var. *gemmifera* (DC.) Zenker) odmiany Casiopea (Polan Kraków)
- cebula zwyczajna (*Allium cepa* L.) z linii hodowlanych ZC1 – ZC6 (Plantico Zielonki)
- cebula szalotka (*Allium ascalonicum* L.) z linii hodowlanej 543 (Plantico Zielonki)
- czosnek zwyczajny (*Allium sativum* L.) odmiany Arkus (Plantico Zielonki)
- czosnek zwyczajny (*Allium sativum* L.) odmiany Ornak (Plantico Zielonki)

Metody

- markery SSR, CAPS i SCAR z elektroforezą produktów w standardowym żelu agarozowym lub w natywnym żelu poliakrylamidowym

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.) – 1 obiekt; cebula szalotka (*Allium ascalonicum* L.) – 1 obiekt

Metody

- utrzymanie krótkoterminowej kultury pędowej czosnku (1 pożywka, 7 obiektów, kultury otrzymane w latach poprzednich)
- indukcja kalusa czosnku z piętek ząbków i zarodków zygotycznych cebuli zwyczajnej i cebuli szalotki (2 pożywki)
- indukcja kalusa czosnku niedźwiedziego (zarodki zygotyczne, pąki kwiatowe, cebulki; 6 pożywek)
- regeneracja kalusa czosnku i cebuli (7 obiektów czosnku, 5 obiektów cebuli; 2 pożywki)

Temat badawczy 3 (Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów form rodzicielskich)

Materiały roślinne

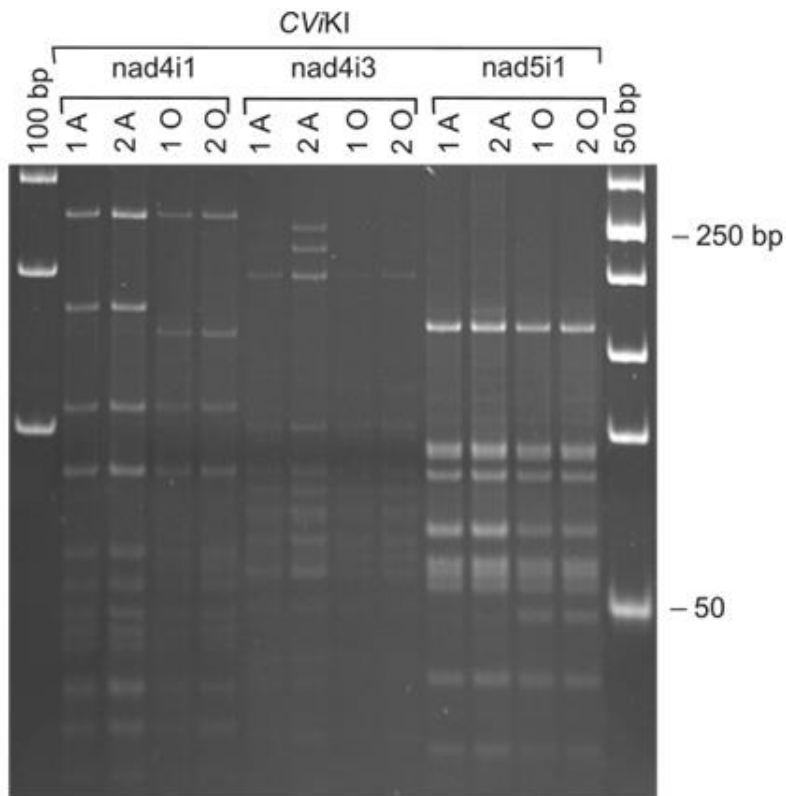
pasternak zwyczajny – 2 obiekty; kapusta głowiasta czerwona – 2 obiekty, kapusta pekińska – 1 obiekt, kapusta brukselska – 1 obiekt; czosnek zwyczajny – 2 obiekty; cebula zwyczajna – 2 obiekty

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 lub agarozie (różne warianty pożywkowe)
- regeneracja roślin wybranych kultur protoplastów na pożywkach stałych

Wyniki

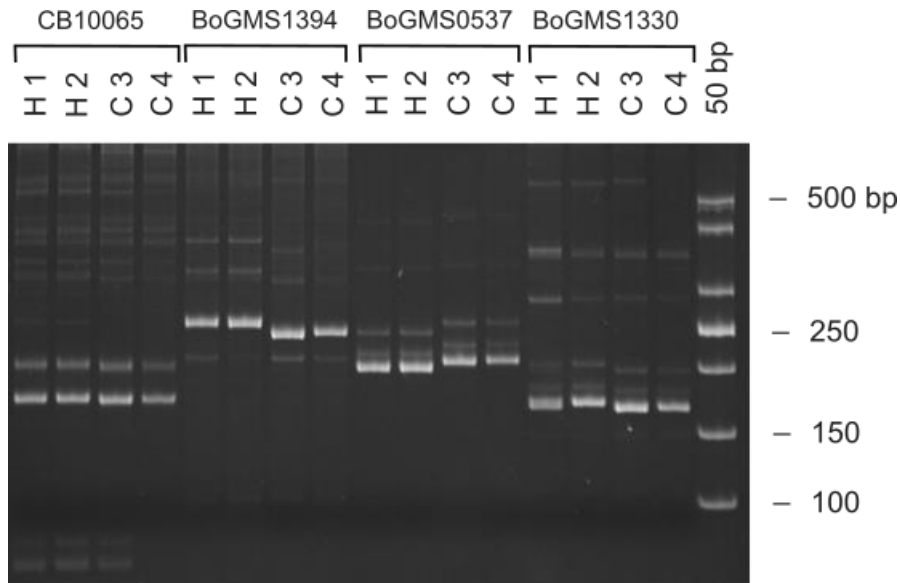
Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie



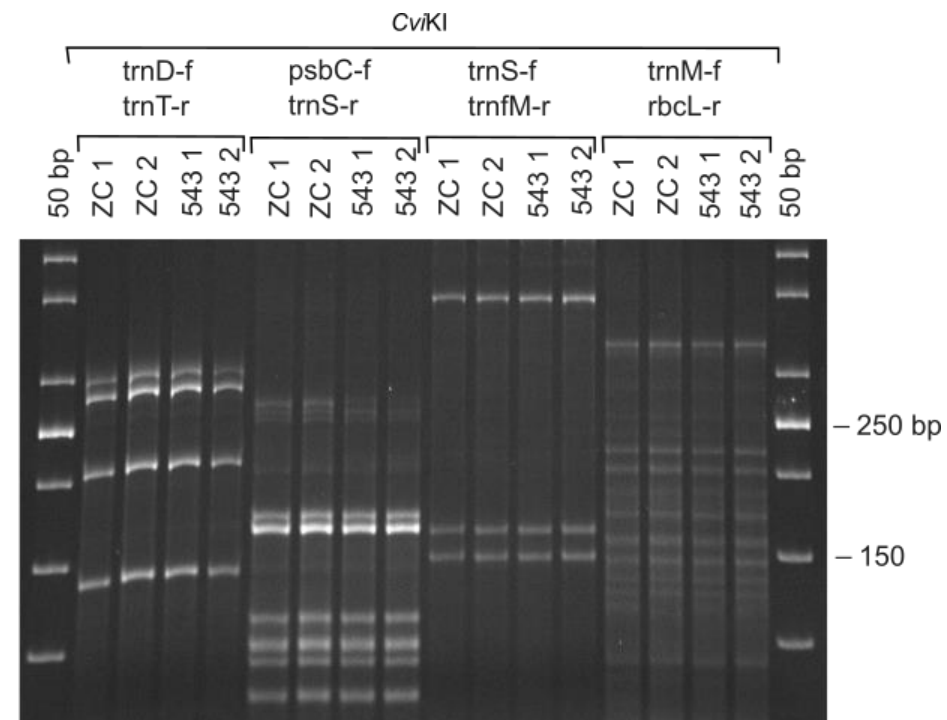
dwie odmiany czosnku – markery mitochondrialne

Typowanie markerów

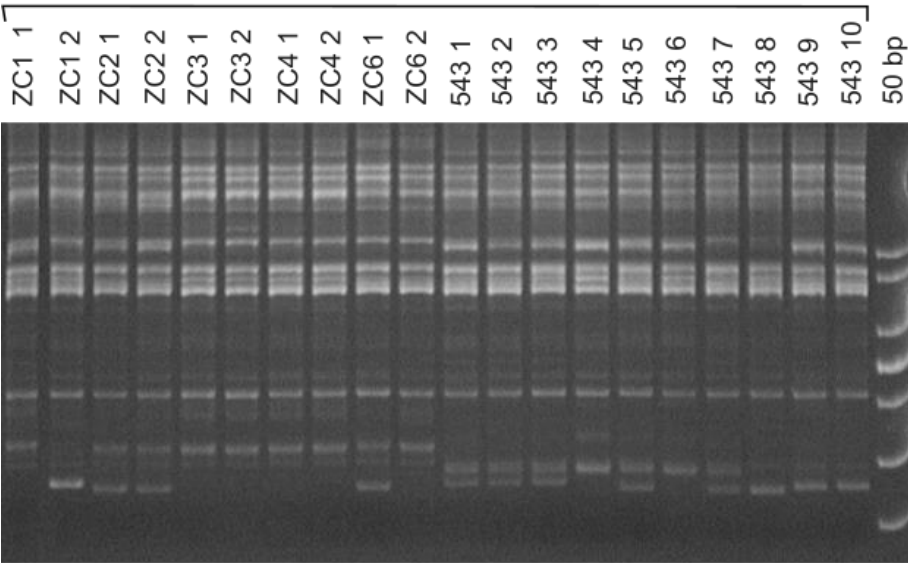
Cebula i szalotka – markery plastydowe



kapusta czerwona i brukselka – markery jądrowe

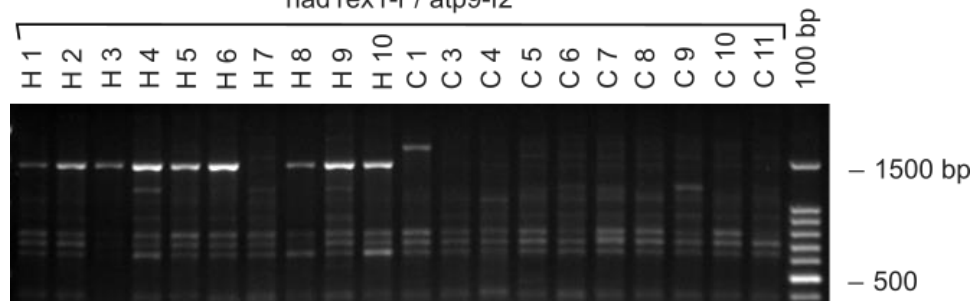


AMS-23



cebula i szalotka –
marker jądrowy

nad1ex1-r / atp9-f2

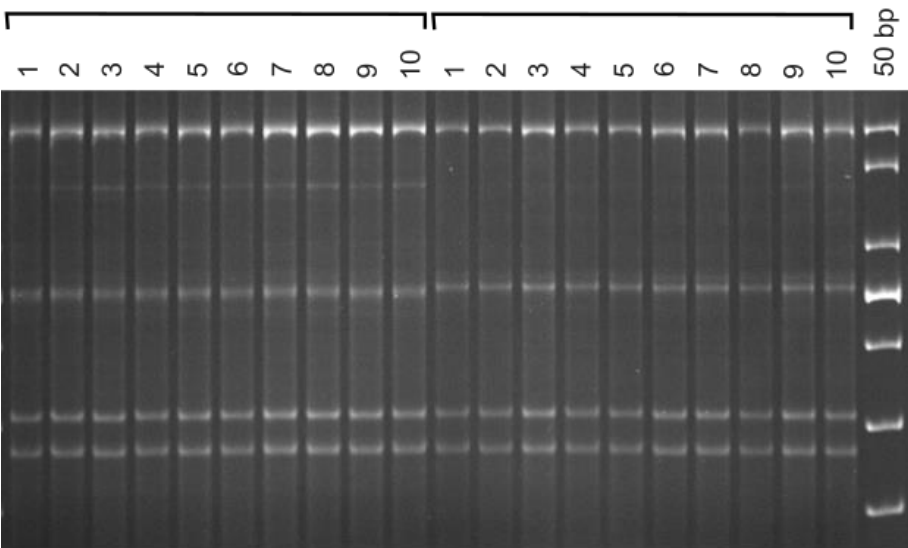


kapusta czerwona i brukselka –
marker mitochondrialny

trnK-F / trnK-R2 / CviKI

Arkus

Ornak



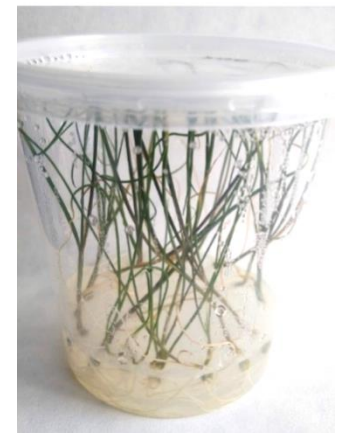
dwie odmiany czosnku – marker plastydowy

Weryfikacja markerów

Utrzymanie kultur pędowych czosnku

Kultury pędowe uzyskane w latach 2021 i 2022 – w sumie było to 7 obiektów druga połowa roku → zakażenie mikrobiologiczne wszystkich kultur.

W przypadku zapotrzebowania na protoplasty liściowe → bieżąca indukcja świeżych kultur pędowych wg dopracowanego protokołu indukcji kultur pędowych.



Wyprowadzenie/utrzymanie kultur kalusa czosnku i cebuli

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>
'Germidour'	K1	8,7 ± 4,5	17,3
	K2	11,0 ± 3,1	22,0
'Morado'	K1	29,0 ± 8,4	58,0
	K2	34,0 ± 7,9	68,0
'Violetta'	K1	29,7 ± 3,4	59,3
	K2	32,0 ± 4,0	64,0

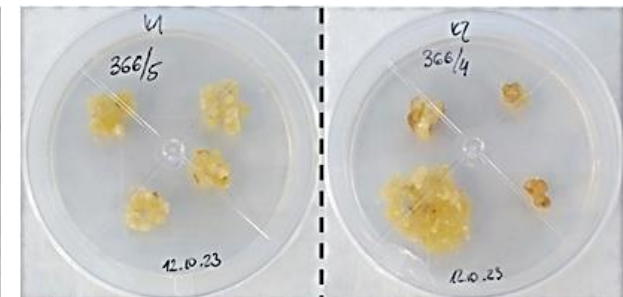
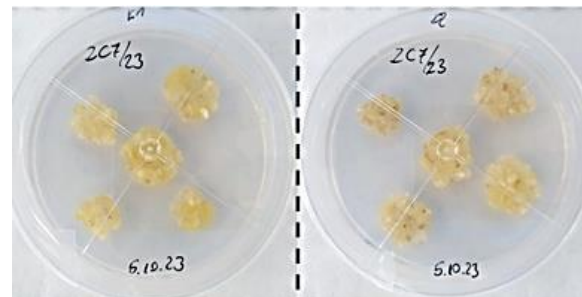
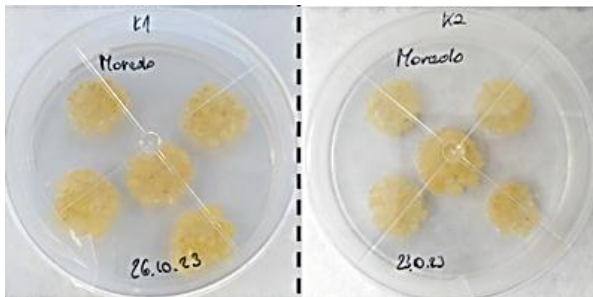
Indukcja kalusa z zarodków zygotycznych cebuli zwyczajnej i cebuli szalotki

<u>Gatunek/ Linia</u>	<u>Pożywka indukcyjna</u>	<u>Średnia liczba (±SE) zarodków tworzących kalus</u>	<u>% indukcji kalusa</u>
<i>A. cepa</i> ZC7	K1	43,7 ± 2,0	87,3
	K2	43,7 ± 1,3	87,3
<i>A. cepa</i> ZC8	K1	41,3 ± 2,3	82,7
	K2	44,0 ± 1,0	88,0
<i>A. ascalonicum</i> 366	K1	44,3 ± 1,9	88,7
	K2	46,3 ± 1,2	92,7

czosnek

cebula

szalotka



Regeneracja kalusa

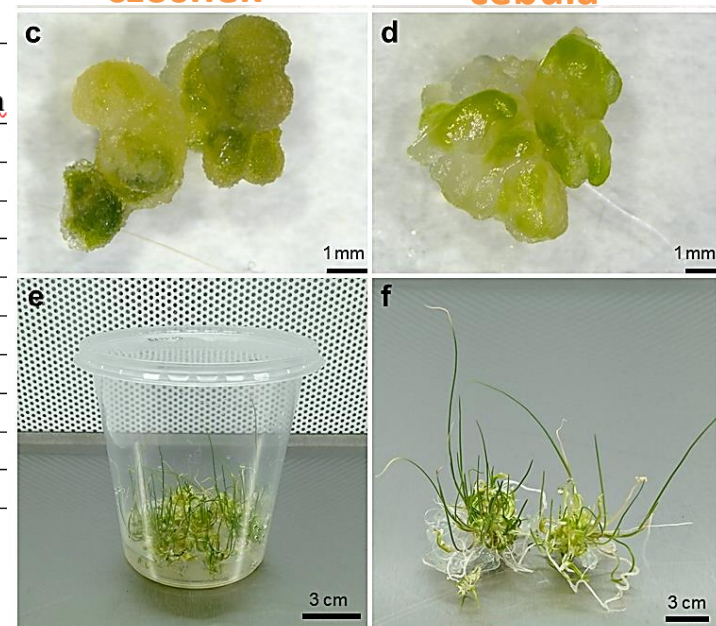
Odmiana /linia	Pożywka regeneracyjna	Liczba otrz. roślin
Harnaś	½ BDS	46
	R	33
Hortus	½ BDS	135
	R	11
Ornak	½ BDS	66
	R	21

Odmiana	Liczba analiz. roślin	Stopień ploidalności
Harnaś	15	2x
Hortus	15	2x
Ornak	15	4x

Odmiana /linia	Pożywka regeneracyjna	Liczba otrz. roślin
ZC1	½ BDS	3
	R	0
ZC2	½ BDS	0
	R	0
ZC3	½ BDS	7
	R	0
ZC4	½ BDS	5
	R	0
ZC6	½ BDS	7
	R	0

czosnek

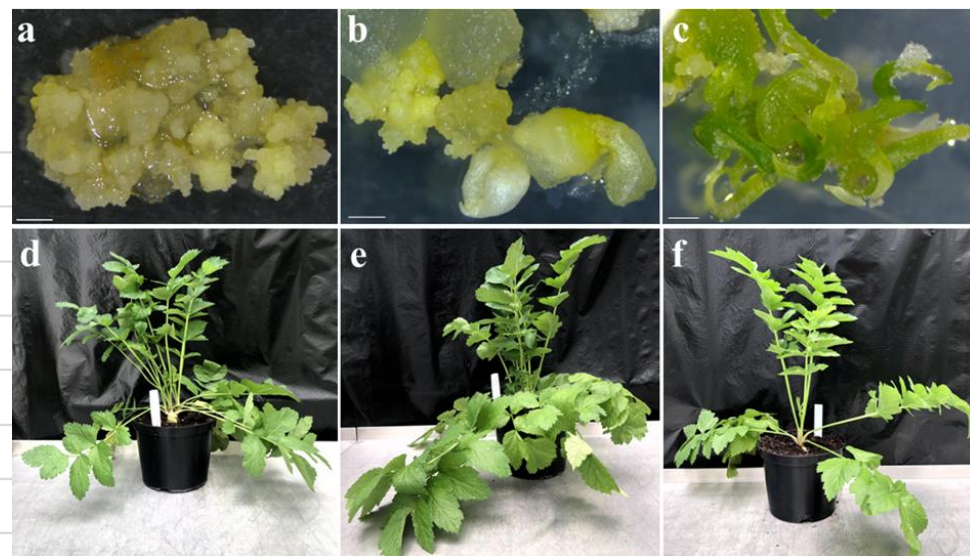
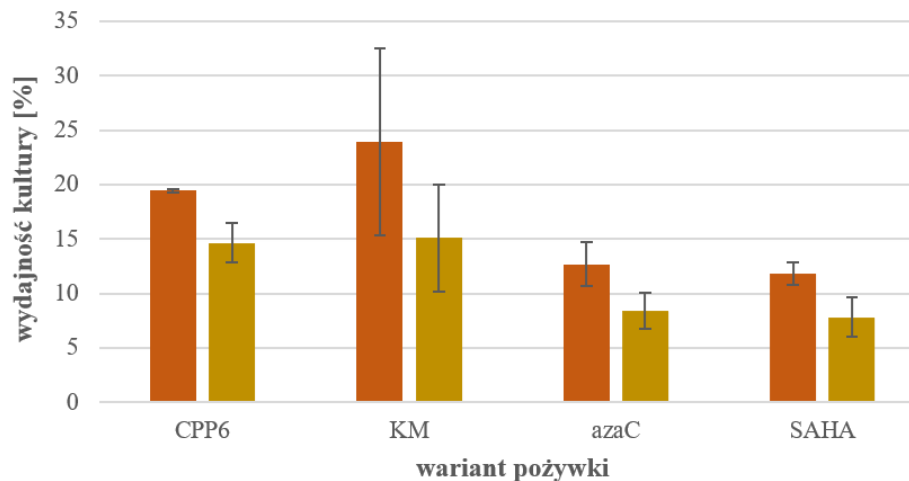
cebula



Poprawa zdolności regeneracyjnej protoplastów pasternaku

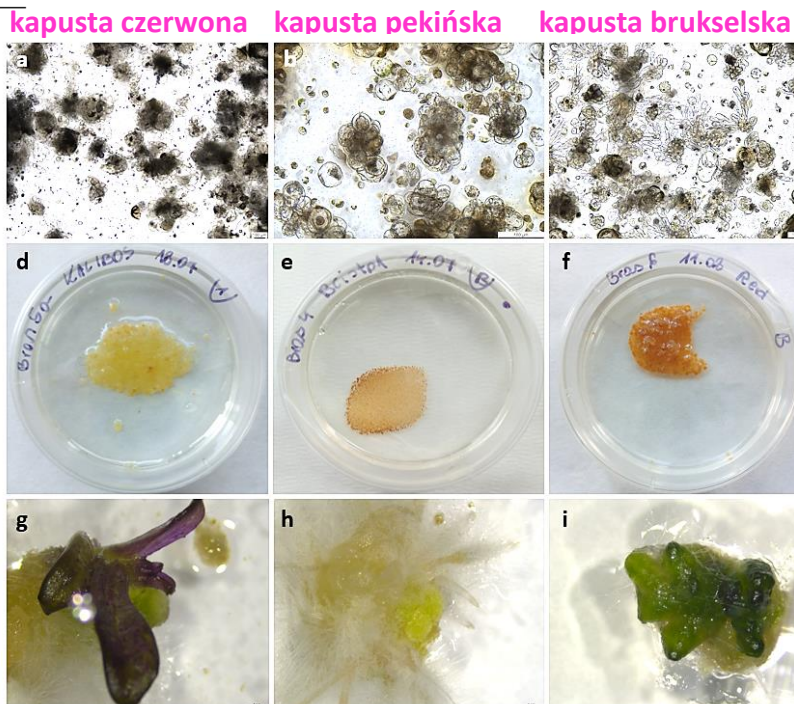
Procent tworzących się agregatów komórkowych w kulturach protoplastów

■ 'Półdługi biały' ■ 'Sabre F1'



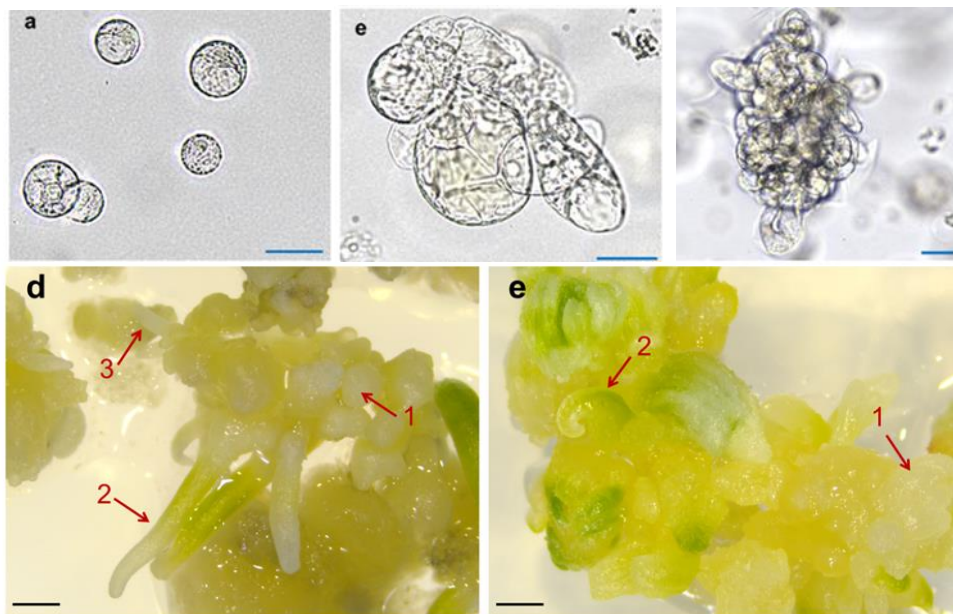
Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów kapusty czerwonej, pekińskiej i brukselskiej

Czynnik	Wydajność kultury (% ± SE)	
	5-ty dzień	15-ty dzień
Obiekt		
Kapusta głowiasta czerwona 'Haco'	26,9±1,4 a	45,0±1,6 b
Kapusta głowiasta czerwona 'Kalibos'	26,4±1,3 a	55,9±1,9 a
Kapusta pekińska 'Bristol'	20,8±1,0 b	39,9±1,8 b
Kapusta brukselska 'Red'	27,0±0,9 a	52,4±1,9 a
Pożywka do kultury protoplastów		
CPPO1	29,3±1,3 a	58,6±2,1 a
Bras4	24,4±1,0 b	45,9±1,3 b
Bras5	22,1±1,2 b	38,4±1,9 c
Bras6	23,5±1,1 b	47,1±1,4 b



Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów czosnku i cebuli

Obiekt	Odmiana/ linia	Wariant pożywki ¹	Komórki przechodzące reorganizację cytoplazmy [%±SE]
czosnek	Arkus	CPP	86,2 ± 4,0
		KM	87,4 ± 0,3
		azaC	85,8 ± 3,2
		SAHA	85,7 ± 3,9
	Ornak	CPP	81,1 ± 0,8
		KM	87,4 ± 2,8
		azaC	88,4 ± 2,7
		SAHA	84,7 ± 4,4
cebula	ZC6	CPP	91,7 ± 3,6
		KM	85,2 ± 5,3
		azaC	83,5 ± 0,1
		SAHA	86,1 ± 0,3
	ZC7	CPP	56,7 ± 1,5
		KM	41,9 ± 5,0
		azaC	34,3 ± 4,0
		SAHA	33,7 ± 1,9



Wnioski

Temat badawczy 1 (Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie)

1. Zidentyfikowano 11 markerów różnicujących kapustę czerwoną i brukselkę. Tylko jeden z nich miał charakter organellowy. Spośród produktów markerowych 8 było specyficznych dla kapusty czerwonej a 6 dla brukselki.
2. Cztery zastosowane markery różnicowały cebulę zwyczajną i szalotkę. Były to wyłącznie markery jądrowe. Przy ich użyciu wygenerowano 4 produkty specyficzne dla cebuli zwyczajnej i 2 produkty specyficzne dla szalotki.
3. Badane odmiany czosnku były różnicowane przez 9 markerów – 3 jądrowe i 6 organellowych. Spośród 22 produktów o charakterze diagnostycznym 9 było specyficznych dla odmiany Arkus a 13 dla odmiany Ornak.

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

Kultury pędowe czosnku

1. W kolejnych pasażach, podobnie jak to miało miejsce w roku ubiegłym, duża część roślin wypadła z dalszej kultury na skutek zjawiska szklistości tkanek oraz przypadkowych zakażeń mikrobiologicznych występujących na dużą skalę.
2. Rozwiązanie: pozyskiwanie protoplastów liściowych z indukowanych każdorazowo świeżych kultur pędowych.

Kultury kalusa czosnku zwyczajnego, czosnku niedźwiedziego, cebuli zwyczajnej i cebuli szalotki

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 zwyczajnej i cebuli szalotki.
2. Kalus cebuli szalotki charakteryzował się dobrym tempem wzrostu na obu pożywkach indukcyjnych, przy czym pożywka K1 dawała lepsze efekty jakościowe (większy udział kalusa drobnoziarnistego).
3. Pomimo wykorzystania różnych typów eksplantatów (zarodki, pąki kwiatowe, cebulki) oraz zróżnicowanych pod względem zawartości regulatorów wzrostu pożywek, nie powiodła się indukcja kalusa czosnku niedźwiedziego. Wobec tego zrezygnowano w dalszych badaniach z wykorzystania tego obiektu – planuje się zastąpić go szalotką.

Regeneracja kalusa cebuli i czosnku zwyczajnego w rośliny

1. W bieżącym roku zastosowano dwie pożywki regeneracyjne, wyselekcjonowane na podstawie wstępnego protokołu regeneracji zastosowanego w ubiegłym roku.
2. Pożywka regeneracyjna R dawała lepsze efekty ilościowe w regeneracji czosnku, natomiast regeneracja roślin cebuli była możliwa wyłącznie na pożywce ½ BDS.
3. Rośliny czosnku zregenerowane z kalusa trzech odmian czosnku w większości zachowały diploidalny charakter charakterystyczny dla materiału donorowego (2x). Jedynie w regenerantach odmiany Ornak doszło do podojenia ploidalności (4x) w stosunku do materiału donorowego.

Temat badawczy 3 (Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów form rodzicielskich)

Pasternak

1. Żywotność protoplastów wyizolowanych ze wszystkich obiektów była wysoka i wynosiła powyżej 80%.
2. Udział tworzących się agregatów komórkowych w kulturach badanych obiektów wahał się w granicach 9-19% i był zależny od składu pożywki.
3. Pożywka KM najlepiej stymulowała aktywność podziałową w kulturach protoplastów pasternaku.
4. Regenerację roślin na drodze somatycznej embriogenezy zaobserwowano dla trzymiesięcznej kultury kalusa odmiany Sabre F1 otrzymanego z kultury protoplastów prowadzonej na pożywce KM.
5. Analiza cytometryczna otrzymanych w ubiegłym roku regenerantów odmiany Sabre F1 wykazała brak zmian ploidalności w stosunku do roślin donorowych.

Kapusta głowiasta czerwona, kapusta pekińska i kapusta brukselska

1. Badane obiekty tj. kapusta czerwona, kapusta brukselska i kapusta pekińska charakteryzowały się wysoką wydajnością izolacji protoplastów z liści młodych roślin pochodzących z kultur *in vitro*.
2. U wszystkich badanych obiektów żywotność uzyskanych protoplastów była wysoka i wahała się w granicach 80-93% w dniu izolacji, potem spadała do 57-89% w piątej dobie kultury.
3. Wydajność kultury dla badanych obiektów była stosunkowo wysoka i wahała się w granicach 40-56% w piętnastym dniu kultury i była zależna od obiektu i pożywki.
4. Regenerację pędów z kultur protoplastów obserwowano u dwóch obiektów (kapusta czerwona i kapusta brukselska). Nie obserwowano organogenezy pędowej z kultur protoplastów kapusty pekińskiej.
5. Analiza cytometryczna roślin jarmużu i kapusty brukselskiej uzyskanych w roku 2022 wskazuje na stabilność uzyskanych regenerantów, które są w większości diploidalne.

Czosnek i cebula

1. Nowa mieszanina enzymatyczna zawierająca celulazę RS efektywniej macerowała kalus czosnku, uwalniając liczbę protoplastów wystarczającą do założenia kultury.
2. Uwolnione protoplasty kalusowe wszystkich badanych obiektów charakteryzowały się wysoką żywotnością (średnio 70-90%).
3. Zastosowane warianty pożywkowe stymulowały prawidłowe zmiany rozwojowe charakterystyczne dla wczesnej kultury protoplastów, tj. zwiększenie objętości komórek, zmianę ich kształtu, reorganizację cytoplazmy oraz reaktywację mitozy.
4. W pożywce KM z dodatkiem azocytydyny lub kwasu SAHA zaobserwowano tworzenie się pojedynczych agregatów wielokomórkowych, tworzących w 90-cio dniowej kulturze grudki mikrokalusa.
5. Kalus czosnku i cebuli umieszczony na pożywce regeneracyjnej ½ BDS podejmował dalszy wzrost i formował masę proembriogenną. W 12-tygodniowej kulturze zaobserwowano zarodki somatyczne na różnym etapie rozwoju (formujące się liście i korzenie zarodkowe).

Mierniki dla zadania - prezentacja wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	miernik ¹	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
	<p>11th <u>biennial</u> PSEPB Conference, 19-22 września, Poznań, Polska, dwie osoby, zaprezentowano wyniki nt.:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. E Grzebelus, K Stelmach-Wityk, D Kadłuczka, D Chachłowska, 2023. Embryogenic callus induction for protoplast cultures in the genus <i>Allium</i>, 200 2. K Stelmach-Wityk, K Szymonik, E Grzebelus, 2023. Research on breaking the cell division latency in <i>Allium</i> protoplast cultures, 201 	poster	2	2
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	miernik ²	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana
1	Stelmach K, Grzebelus E (2023) Plant regeneration from protoplasts of <u><i>Pastinaca sativa</i></u> L. via somatic embryogenesis. <i>Plant Cell Tissue and Organ Culture</i> 153:205-217 (IF ₂₀₂₂ = 3.0; pkt <u>MEiN</u> = 100)	publikacja oryginalna	1	1