

EWA GRZEBELUS**MAREK SZKLARCZYK****RAFAŁ BARAŃSKI****ANETA MALEC**

Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Kierownik Tematu: dr hab. Ewa Grzebelus Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie

Al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków, tel. (12) 6625190, e-mail: e.grzebelus@urk.edu.pl

Prace zostały wykonane w ramach badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej na podstawie decyzji Ministra Rolnictwa i Rozwoju Wsi nr HOR.hn.802.8.2018, Zadanie 101.

Transfer cytoplazmatycznej męskiej sterylności poprzez somatyczną hybrydyzację u marchwi

Transfer of cytoplasmic male sterility through somatic hybridization in carrot

Słowa kluczowe: białka fluorescencyjne, elektrofuzja protoplastów, inaktywatory genomów organellowych i jądrowego, wczesna selekcja cybryd, utrwalenie wariantów allelicznych

OPRACOWANIE MARKERÓW DNA PRZYDATNYCH DO IDENTYFIKACJI FORM CYBRYDOWYCH ORAZ STABILIZACJA GENETYCZNA I SELEKCJA FORM DONOROWYCH

Celem tematu było: (1) uzyskanie korzeni wysadkowych potomstw z samozapylenia roślin męskopłodnych wyselekcjonowanych w poprzednim roku badań, (2) produkcja nasion donora i akceptorów CMS do wykorzystania w eksperymentach fuzji protoplastów, (3) weryfikacja obecności i utrwalenia pożądaných markerowych wariantów allelicznych w partiach nasion donora i akceptorów CMS oraz (4) weryfikacja plazmotypów reprezentowanych przez partie nasion donora i akceptorów CMS.

Opis wyników

Dla badanych sublinii poszukiwano markerów o utrwalonym charakterze tzn. występujących u wszystkich prób zbiorczych w wariacie wskazującym na homozygotyczność. Przykładowo, w przypadku markera chr1-DcS15 męskopłodne sublinie 174-9, 176-12, 188-7, 188-20 i 189-5 generowały wyłącznie profil odpowiadający homozygotom 650/650. Z kolei przy zastosowaniu tego samego markera

dla męskosterylnej sublinii 4503/4 × 4501/5 uzyskano wyłącznie profil odpowiadający homozygotom 880/880. Jeżeli — jak w podanym przykładzie — sublinia męskosterylna zawiera inny homozygotyczny allel markerowy niż któraś z sublinii męskopłodnych, regeneraty otrzymane z wykorzystaniem tych komponentów rodzicielskich będzie można weryfikować przy zastosowaniu wspomnianego markera (w podanym przykładzie chr1-DcS15). Pomimo nieznacznej heteroplazmii odnotowanej u części linii męskosterylnych (znikoma „domieszka” produktu o wielkości 360 bp) dla analizowanych w bieżącym roku materiałów uzyskano bardzo czytelny i zgodny z oczekiwaniami obraz reprezentowanego przez nie plazmotypu. Potwierdza to możliwość wykorzystania analizowanych sublinii męskosterylnych jako donorów cytoplazmy sterylizującej, a sublinii męskopłodnych jako jej akceptorów. Ponadto, w ramach reprodukcji komponentów rodzicielskich do eksperymentów fuzji, uzyskano korzenie wysadkowe i nasiona.

REGENERACJA PROTOPLASTÓW GATUNKÓW POKREWNYCH I OKREŚLENIE PARAMETRÓW INAKTYWACJI ICH GENOMÓW JĄDROWYCH

Celem tematu była optymalizacja parametrów inaktywacji genomu jądrowego kolendry siewnej i kminu rzymskiego.

Opis wyników

W sumie przeanalizowano wpływ 4 dawek UV w zakresie od 1500 do 3000 J·m⁻² na rozwój protoplastów w pożywce bazowej oraz w wzbogaconej o fitosulfokinę (PSK) i putrescynę (Pu).

W warunkach kontrolnych kmin charakteryzował się niemal dwukrotnie większą zdolnością do tworzenia agregatów komórkowych w porównaniu do kolendry. Po zastosowaniu promieniowania UV, komórki obu obiektów reagowały podobną, obniżoną zdolnością do formowania agregatów komórkowych. Po 2 miesiącach kultury obserwowano większą ilość tkanki kalusowej w wariantach wzbogaconych w PSK i Pu w stosunku do pożywki bazowej, przy czym kmin wykazywał większą intensywność formowania tkanki kalusowej niż kolendra. Podczas dalszego prowadzenia kultury kalusa na pożywce regeneracyjnej jedynie u kminu zaobserwowano regenerację roślin.

Ogólnie, lepsza zdolność regeneracyjna kminu skutkowałą zastosowaniem wyższej dawki promieniowania UV w celu inaktywacji genomu jądrowego niż w przypadku kolendry. Dawka UV o wartości 2000 J m⁻² była dawką letalną dla protoplastów kolendry — stwierdzono brak wzrostu tkanki kalusowej, mimo niskiej (lecz nie zerowej) wydajności kultury. Przy tej wartości dawki UV obserwowano jeszcze u kminu słabą intensywność formowania tkanki kalusowej, której nie odnotowano już przy dawce 2500 J·m⁻² na pożywce niesuplementowanej.

ELEKTROFUZJA PROTOPLASTÓW MARCHWI Z WYKORZYSTANIEM RÓŻNYCH INAKTYWATORÓW GENOMÓW ORGANELLOWYCH

Celem tematu było uzyskanie komórek cybrydowych po inaktywacji genomów organellowych biorcy CMS (1) kwasem jodooctowym (IOA) oraz (2) amidem kwasu jodooctowego (IOAA).

Opis wyników

Komponentami fuzji były protoplasty wyizolowane z populacji wyselekcjonowanych pod względem określonych wariantów allelicznych markerów jądrowych i plazmotytów organellowych, tak, aby możliwa była skuteczna i pewna identyfikacja zregenerowanych cybryd. W celu bezpośredniej selekcji cybryd po elektrofuzji, protoplasty akceptora CMS (traktowane IOA lub IOAA) barwiono izotiocjanianem rodaminy, natomiast protoplasty donora CMS (traktowane promieniowaniem UV) barwiono dioocetanem fluoresceiny (FDA). Do inaktywacji genomów organellowych wytypowano 4 sublinie biorcy CMS.

Zastosowana procedura izolacji protoplastów oraz parametry inaktywacji i elektrofuzji umożliwiły uzyskanie komórek cybrydowych po inaktywacji genomów organellowych biorcy CMS zarówno kwasem jodooctowym, jak i amidem kwasu jodooctowego. Fluorochromy w zastosowanych stężeniach umożliwiły identyfikację komórek cybrydowych, charakteryzujących się podwójną fluorescencją. W celu ograniczenia wycieku barwników z komórek oraz zmniejszenia labilności błon komórkowych, protoplasty przed jak i po fuzji inkubowano w niskiej temperaturze. Dzięki temu zastosowane barwniki wykazywały silną fluorescencję i długo utrzymywały się w komórkach, co umożliwiło wczesną selekcję komórek cybrydowych.

SELEKCJA, REGENERACJA I WZROST ROŚLIN HYBRYDOWYCH

Celem tematu była: (1) selekcja komórek cybrydowych bezpośrednio po przeprowadzonej fuzji protoplastów, (2) aktywacja podziałów mitotycznych u wyselekcjonowanych produktów fuzji poprzez wykorzystanie systemu niańki oraz (3) regeneracja roślin cybrydowych.

Opis wyników

Wczesna selekcja cybryd przeprowadzona za pomocą mikromanipulatora sprzężonego z mikroskopem odwróconym była skuteczna. W sumie wyselekcjonowano 200 cybryd, po 50 z każdego wariantu elektrofuzji. Podziały mitotyczne u wyselekcjonowanych komórek cybrydowych były aktywowane poprzez wykorzystanie kultury niańki. W tym celu w jednym naczyniu hodowlanym, ale odseparowane membraną insertu, umieszczano protoplasty cybryd oraz protoplasty niańki czyli protoplasty charakteryzujące się wysoką aktywnością mitotyczną. Podczas prowadzenia kultury komórek cybrydowych obserwowano tworzenie się pojedynczych agregatów komórkowych, pierwsze z nich pojawiały się między 10 a 20 dniem kultury. Ogólna liczba tworzących się agregatów była stosunkowo niska, gdyż jedynie 1,5% z 200 wyselekcjonowanych cybryd weszło w podziały komórkowe. Zaproponowany układ eksperymentalny, tj. fuzja komplementarna w połączeniu z bardzo wczesną selekcją komórek cybrydowych

z wykorzystaniem mikromanipulatora, testowany był po raz pierwszy. W trakcie realizacji tegorocznych eksperymentów udało się poznać słabe punkty tak zaplanowanego układu i w przyszłości będzie można je wyeliminować. Te słabe punkty to głównie umiejętności techniczne pozwalające na szybkie wyławianie komórek cybrydowych, które są bardzo delikatne i przy tego typu manipulacjach mogą bardzo łatwo zostać uszkodzone. Dodatkowym mankamentem w tegorocznych doświadczeniach były nieoczekiwane trudności, związane z kiełkowaniem nasion wytypowanych do eksperymentów sublinii biorcy i dawcy CMS, co skutkowało przesunięciem zaplanowanych pierwotnie terminów fuzji. W związku z powyższym wyselekcjonowane cybrydy są wciąż na etapie regeneracji.