

EWA GRZEBELUS
KATARZYNA MAĆKOWSKA
ANETA MALEC
KATARZYNA STELMACH
GABRIELA MACHAJ
MAREK SZKLARCZYK
DARIUSZ GRZEBELUS

Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii, Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa, Uniwersytet Rolniczy
im. H. Kołłątaja w Krakowie, al. 29 Listopada 54, 31-425 Kraków
e-mail: ewa.grzebelus@urk.edu.pl

Wczesna selekcja mieszańców somatycznych marchwi — obiecujące narzędzie dla gatunków o wysokim potencjale regeneracyjnym

Somatyczna hybrydyzacja roślin polegająca na fuzji protoplastów jest techniką, która łączy komórki somatyczne dwóch różnych odmian, gatunków czy rodzajów w celu wygenerowania nowej zmienności. Jest ona szczególnie interesująca dla hodowców w kontekście transferu cechy CMS, gdyż daje potencjalne możliwości skrócenia długiego procesu krzyżowania wstecznego w celu otrzymania par linii męskosterylnych i dopełniających oraz wykorzystania innych gatunków (np. pokrewnych) jako nowych źródeł męskiej sterility lub innych cech o strategicznym znaczeniu gospodarczym (np. odporności na stropy biotyczne czy abiotyczne).

Wydatna hybrydyzacja somatyczna wymaga precyzyjnej selekcji mieszańcowych produktów fuzji. Efektywny system selekcji powinien wykluczać pracochłonną identyfikację mieszańców spośród dużej liczby regenerantów. Znane strategie selekcji uwzględniające właściwości form donorowych obejmują genetyczną lub fizjologiczną komplementację, inaktywację komórek rodzicielskich, czy selekcję mechaniczną (opartą na różnicach morfologicznych protoplastów lub na ich różnicowym wybarwieniu) z pomocą mikromanipulatora lub sortera komórek. Jednak ze względu na specyfikę poszczególnych gatunków i trudności w generowaniu mutantów do selekcji opartej na komplementacji, systemy weryfikacji form mieszańcowych muszą być dopracowywane indywidualnie. W przypadku marchwi, ze względu na jej wysoki potencjał regeneracyjny, wczesna selekcja mieszańcowych produktów fuzji wydaje się konieczna, tym bardziej, że komplementarna inaktywacja genomów jądrowego i cytoplazmatycznego stosowana

rutyno przy transferze CMS nie zawsze jest całkowita, w efekcie umożliwiając także rozwój komórek, które nie są produktami fuzji lub są rezultatem fuzji symetrycznej.

Celem prezentowanych badań było wypracowanie skutecznego systemu wczesnej selekcji produktów fuzji i ich regeneracji. System selekcji testowano w dwóch układach eksperymentalnych uwzględniających (1) fuzję symetryczną pomiędzy marchwią uprawną (*Daucus carota* sub. *sativus*) a dzikim podgatunkiem *D. carota* sub. *gadecaei* oraz (2) fuzję komplementarną w obrębie marchwi uprawnej dla wprowadzenia cechy CMS z linii męskosterylnej do męskopłodnej. Elementem systemu szybkiej selekcji komórek mieszańcowych było opracowanie sposobu barwienia protoplastów fluorochromami przyżyciowymi o różnych właściwościach spektralnych. Protoplasty poddawano elektrofuzji a następnie komórki hybrydowe, czyli te z podwójną fluorescencją, bezpośrednio po fuzji wyławiano za pomocą mikromanipulatora i przenoszono do kultury niańki dla stymulacji podziałów mitotycznych, ze względu na stosunkowo niską gęstość posiewu komórek hybrydowych. Kulturę niańkę stanowiły protoplasty liściowe marchwi immobilizowane w alginianie - systemie gwarantującym wysoki potencjał regeneracyjny niezależnie od obiektu.

Zastosowany system wczesnej selekcji umożliwił prawie 100% identyfikację komórek mieszańcowych. Tym samym od początku kultury regenerację prowadzono tylko i wyłącznie dla właściwych obiektów, co znacząco zredukowało nakłady pracy, a tym samym koszty całej procedury. Skuteczność zaproponowanego systemu została potwierdzona w przeprowadzonych analizach morfologicznych, cytogenetycznych i molekularnych otrzymanych regenerantów.