

„Analiza czynników wpływających na gametyczną embriogenezę u gatunków opornych na haploidyzację”

2024

Kierownik tematu: Agnieszka Kielkowska, email: a.kielkowska@urk.edu.pl

Wykonawcy:

A. Adamus, M. Czernicka, M. Szklarczyk, D. Chachłowska, W. Skrzypkowski,
B. U. Czech

W. Kiszczak, M. Podwyszyńska, A. Marasek-Ciołakowska, M. Burian, U.
Kowalska, A. Trzewik, M. Markiewicz, J. Aniszewski

Współpraca:

POŁĄCZONA POLSKA HODOWLA
Leszek Róg, Wojciech Matuszak








MINISTERSTWO
ROLNICTWA I ROZWOJU WSI

Finansowanie badań:

**Badania na rzecz postępu
biologicznego w produkcji roślinnej**

Lp.	Tytuł i cele zadania	Czy cel został osiągnięty
Opracowanie metody indukcji haploidów i badanie czynników stymulujących gametyczną embriogenezę (GE)		
1	Optymalizacja dla każdego z 4 gatunków jednej wybranej techniki indukcji haploidów oraz weryfikacja jej przydatności z użyciem różnych genotypów	TAK
2	Analiza wpływu dodatku do pożywki wybranych substancji stymulujących rozwój w kulturze	TAK
Analiza rozwoju eksplantatów w kulturze		
1	Analiza histo-cytologiczna poszczególnych stadiów rozwojowych eksplantatów w kulturze	TAK
2	Analiza ekspresji genów na wybranych etapach rozwoju eksplantatów w kulturze oraz walidacja poziomu ekspresji	TAK
Opracowanie markerów molekularnych do oceny genetycznej roślin donorowych i regenerantów		
1	Identyfikacja markerów DNA do selekcji roślin donorowych do kultur <i>in vitro</i> u 4 badanych gatunków	TAK

Materiały roślinne i metody haploidyzacji użyte w tegorocznych doświadczeniach

Nazwa rodzaju	Nazwa łacińska	Liczba obiektów	Nazwa obiektu	Metoda haploidyzacji i technika	Sposób uprawy
sałata	<i>Lactuca sativa</i>	3	linia 237, linia 230/2, Nochowska	Androgeneza, k. pylników	szklarnia 
papryka	<i>Capsicum annuum</i>	3	linia 6, linia 9, Roberta	Androgeneza, k. pylników	szklarnia 
pomidor	<i>Solanum lycopersicum</i>	3	r. płodne: Mieszko F1 r. męskosterylne: I-MS10, II-PS	Gynogeneza, k. zalążków	szklarnia 
bób	<i>Vicia faba</i>	3	Bartek, Bonus, Bolero	Ind. partenogeneza, k. zalążków po obcym zapyleniu	Komory wzrostowe 
groszek pachnący	<i>Lathyrus odoratus</i>	1	Mieszanka nasion odmian Senator, Kenneth, America	-	Poletka URK 
		13			

Tytuł zadania i stosowane metody

Opracowanie metody indukcji haploidów i badanie czynników stymulujących gametyczną embriogenezę (GE)

Odkazanie materiałów do kultur – różne procedury i związki chemiczne

Androgeneza - izolacja pylników (mikroskopia stereoskopowa, izolacja igłami preparacyjnymi). Aplikacja szoków termicznych (32°C lub 4°C) przez określony czas (2-4 dni) na eksplantaty - termostaty

Gynogeneza – izolacja zalążków (mikroskopia stereoskopowa, izolacja igłami preparacyjnymi)

Indukowana partenogeneza – wykonanie kastracji pąków kwiatowych, zapyleń ręcznych, oprysku wybranym fitohormonem, izolacja zalążków przy użyciu lupy stereoskopowej)

Przygotowanie pożywek do kultur (baza pożywki i sploty np. fitohormony, aminokwasy, kw. askorbinowy, węgiel aktywny i in.), autoklawowanie, prace z komorami laminarnymi

Cytometria przepływowa (FCM)

Analiza rozwoju eksplantatów w kulturze

Ocena żywotności pyłku (acetokarmin), ocena stadiów rozwoju pyłku– preparatyka cytologiczna, barwienie preparatów (DAPI), mikroskopia fluorescencyjna i światła przechodzącego w celu ustalenia długości pąka odpowiedniego do androgenezy, dokumentacja fotograficzna

Ocena morfologii kwiatu i dojrzałości zalążni – obserwacje makroskopowe pąków kwiatowych, mikroskopia stereoskopowa, dokumentacja fotograficzna

Barwienie łagiewek pyłkowych – utrwalanie materiału roślinnego, maceracja tkanek (enzymy, NaOH), barwienie błękitem aniliny, preparatyka cytologiczna, mikroskopia fluorescencyjna, dokumentacja fotograficzna

Zatapianie obiektów w żywicach półtwardych (technovit), mikrotom, barwienie histochemiczne (błękit toluidyny), mikroskopia świetlna

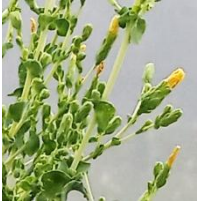

Analiza transkryptomu – izolacja RNA (kity), enzymatyczne oczyszczanie ekstraktów (DNaza i proteinaza), przygotowanie bibliotek CDNA, sekwencjonowanie wielkoprzepustowe (NGS) metodą RNA-seq z użyciem platformy NovaSeq X Plus Series (Illumina) za pośrednictwem firmy Novogene. Obróbka bioinformatyczna wyników sekwencjonowania.

Opracowanie markerów molekularnych do oceny genetycznej roślin donorowych i regenerantów



Izolacja DNA, kontrola jakości wyizolowanego DNA i jego rozcieńczenie, dobór i projektowanie starterów

Reakcje PCR, trawienie enzymami restrykcyjnymi produktów PCR, elektroforeza w żelu agarozowym i poliakrylamidowym

ZADANIE 1 Opracowanie metody indukcji haploidów i badanie czynników stymulujących gametyczną embriogenezę (GE)

Gatunek	Metoda/technika haploidyacji	Testowane parametry	Wyniki
 <p><i>Salata</i> <i>L. sativa</i></p>	<p>Androgeneza</p> <p>Kultury pylników</p>	<p>Pożywki podstawowe: MS, DBM2 z dodatkiem NAA, 2,4-D</p> <p>Dodatki do pożywek: węgiel aktywny, fitohormony (BAP, NAA)</p> <p>Stres termiczny na pylniki - 4°C przez 2 lub 6 dni</p>	<ul style="list-style-type: none"> - obserwowano wpływ genotypu na rozwój kalusa na pylnikach (najlepsza (7,5%) odmiana Nochowska, potem linia 237 (4,5%), najstabilniej linia 230/2 (0,3%)) - baza DBM2-45 + 0,1 mg/l NAA,+ 0,1 mg/l 2,4-D była lepsza dla dwóch z trzech obiektów - dodatek IAA w stęż. 0,3 mg/l hamował rozwój kalusa na pylnikach badanych obiektów sałaty - dodatek BAP w stęż. 2 mg hamował rozwój kalusa na pylnikach badanych obiektów sałaty - dodatek węgla aktywnego w stęż. 2500 mg/l hamował rozwój kalusa na pylnikach badanych obiektów sałaty - szok termiczny u jednego obiektu lepszy przez 6 dniowy, u dwóch lepszy przez 2 dni - analiza cytometryczna wykazała obecność wyłącznie diploidalnych grudek kalusa
 <p>Papryka <i>C. annuum</i></p>	<p>Androgeneza</p> <p>Kultury pylników</p>	<p>Pożywki podstawowe: MS, DBM2</p> <p>Dodatki do pożywek: węgiel aktywny, AgNO₃, biotyna, fitohormony (2,4-D, NAA, BAP, kinetyna), gerlite</p> <p>Stres termiczny na pylniki: 35°C przez 2 dni lub 4°C przez 4 dni</p>	<ul style="list-style-type: none"> - bardzo niski rozwój kalusa na pylnikach badanych obiektów (0-0,3% reagujących pylników) - żadna z 2 pożywek podstawowych nie spowodowała indukcji rozwoju pylników u badanych obiektów papryki - dodatek 0,01 mg/l 2,4-D stymulował kalus na poziomie kontroli tylko u jednego obiektu na 3 badane - dodatek podwyższonego stężenia AgNO₃ (15 mg/l) i gerlitu dodanego zamiast agaru do pożywki –nie zwiększała efektywności rozwoju ponad kontrolę - łączne zastosowanie 0,01 mg/l 2,4-D, 0,01 mg/l kinetyny, i obniżonego stężenia węgla aktywnego (z 2500 do 500 mg/l) – nie zwiększały efektywności rozwoju ponad kontrolę - zastosowanie zubożonej pożywki (zawierającej tylko 500 mg/l węgla aktywnego, 5 mg/l AgNO₃ obniżono do i dodano tylko 0,01 mg/l 2,4-D) było skuteczne 2 badanych obiektów - szok termiczny wysokiej temp. ani niskiej nie spowodował tworzenia kalusa na pylnikach badanych obiektów papryki - Analiza cytometryczna wykazała, że otrzymane kalusy były głównie tetraploidane (73%) i diploidalne (18%)

ZADANIE 1 Opracowanie metody indukcji haploidów i badanie czynników stymulujących gametyczną embriogenezę (GE)

Gatunek	Metoda/technika haploidyacji	Testowane parametry	Wyniki
 Pomidor <i>S. lycopersicum</i>	Gynogeneza Kultury zalążków	Pożywka indukcyjna: 3 (wybrana na podstawie wyników badań 2021-2023) Pożywki namnożeniowe do kalusa: 4 i SE1 Dodatek do pożywki namnożeniowej: glutation zredukowany (GSH)	<ul style="list-style-type: none"> - na pożywce indukcyjnej obserwowano powiększanie się zalążków, zamieranie i rozwój kalusa - na pożywce indukcyjnej rozwój kalusa był wyraźnie wyższy u linii męskosterylnych (450%) niż obiektu płodnego (34%) - na pożywkach namnożeniowych obserwowano wpływ genotypu na przeżywalność kalusa (II-PS - pożywka 4 - 89%, SE1 - 70%; I-MS10 48-51% na obu pożywkach, Mieszko F1 pożywka 4 - 50%, SE1 - 11%) - GSH w stężeniu 30 mg/l sprzyjał ograniczeniu nekroz kalusa, gdy był dodany do pożywki SE1, dodatek GSH do pożywki 4 nie miał wpływu na nekrozy - analiza cytometryczna wykazała, obecność pojedynczych grudek (9%) określonych jako mixoploidy z pikiem dla haploida (1x + 2x), 50% prób była diploidalna, obserwowano również kalus tetraploidalny i mixoploidalny (2x+4x) (13-18%)
 Bób <i>V. faba</i>	Induk. partenogeneza po zapyleniu pyłkiem groszku pachnącego (<i>L. odoratus</i>) Kultury zalążków	Pożywka indukcyjna: G8 (wybrana na podstawie wyników badań 2021-2023) Dodatek do pożywki indukcyjnej: kwas cytrynowy Pożywki namnożeniowe do kalusa: RM3 i RM4	<ul style="list-style-type: none"> - na pożywce indukcyjnej obserwowano rozwój kalusa na zalążkach i zależny był on od genotypu (Bonus 26%, Bartek i Bolero 2,5-4,5% zalążków z kalusem) - dodatek kwasu cytrynowego (10 i 20 mg/l) do pożywki indukcyjnej w niektórych kombinacjach ograniczał rozwój kalusa - obserwowano interakcję pożywki indukcyjnej, namnożeniowej i genotypu (najefektywniejszy rozwój kalusa u Bartek - (15%) i Bolero (5%), gdy indukcja kalusa nastąpiła na pożywce G8 z dodatkiem 10 mg/l kw. cytrynowego a następnie po pasażu kalusa na pożywkę namnażającą RM4, Bonus (27-31%) gdy indukcję prowadzono na pożywce kontrolnej G8, niezależnie od pożywki regeneracyjnej) - analiza cytometryczna kalusa z zalążków z roku 2023 wykazała przewagę kalusów diploidalnych (42%) i poliploidalnych (17%) - analiza cytometryczna kalusa z pylników z roku 2023 wykazała obecność kalusa oznaczonego jako mixoploid z pikiem dla haploida (1x + 2x)

ZADANIE 2 Analiza rozwoju eksplantatów w kulturze

Gatunek	Testowane parametry	Wyniki
<i>Salata</i> <i>L. sativa</i>	Żywotność pyłku Rozwój pyłku w pąkach kwiatowych	<ul style="list-style-type: none"> - żywotność pyłku roślin sałaty użytych jako donory do kultur in vitro była zależna od genotypu i wynosiła u wszystkich badanych obiektów 98-99%. - optymalne długości pąków dla indukcji androgenezy u sałaty były podobne u badanych obiektów i mieściły się w przedziale wynoszący 4,0 do 5,0 mm.
Papryka <i>C. annuum</i>	Żywotność pyłku Rozwój pyłku w pąkach kwiatowych	<ul style="list-style-type: none"> - żywotność pyłku roślin papryki użytych jako donory do kultur in vitro była zależna od genotypu i wynosiła u odm. Roberta 76% a dla Linii 6 i 9 93-97%. - optymalne długości pąków dla indukcji androgenezy u papryki były podobne u badanych obiektów i mieściły się w przedziale wynoszący 4,0 do 5,0 mm.
Pomidor <i>S. lycopersicum</i>	Analizy transkryptomocne	<ul style="list-style-type: none"> - analiza transkryptomów embriogenego i nieembriogenego kalusa pomidora linii męskosterylnej wskazała na zróżnicowanie profili ekspresji genów między tymi próbkami. - geny charakteryzujące się nadekspresją w próbkach kalusa embriogenego związane były głównie z odpowiedzią na stres oksydacyjny, metabolizmem glukanów, modyfikacją ściany komórkowej oraz ze szlakami metabolicznymi m.in biosyntezą fenylopropanoidów, konwersją glukourynianów, biosyntezą metabolitów wtórnych i transdukcją sygnałów szlaków hormonalnych. - w efekcie realizacji niniejszego zadania wytypowane zostaną geny, które w kolejnym roku realizacji projektu będą przedmiotem szczegółowej analizy ekspresji genów metodą real-time PCR
Bób <i>V. faba</i>	Analiza histo-cytologiczna materiałów z kultur in vitro	<ul style="list-style-type: none"> - analizy wykonano na materiałach z kultur załączków bobu po obcym zapyleniu. Były to izolowane załączki z kombinacji po zapyleniu i kontrolnych. - Analizy wykazały, że pobierane załączki zawierają dojrzałe woreczki załączkowe - kalus w kulturze rozwija się od strony mikropyle, ale również obserwowano rozwój kalusa z miejsca po oderwaniu sznureczka (tkanki somatyczne)

ZADANIE 3 Opracowanie markerów molekularnych do oceny genetycznej roślin donorowych i regenerantów

Gatunek	Liczba testowanych obiektów	Liczba testowanych par starterów	Wyniki
<i>Salata</i> <i>L. sativa</i>	3	15	U sałaty 13 z 15 par starterów generowało produkty PCR, a 4 spośród 13 starterów generowało produkty różnicujące, pozostałe startery nie wykazywały przydatności dla identyfikacji badanych materiałów.
Papryka <i>C. annuum</i>	3	15	U papryki 10 z 15 par starterów generowało produkty PCR, a 2 spośród 10 starterów generowało produkty różnicujące, pozostałe startery nie wykazały przydatności dla identyfikacji badanych materiałów.
Pomidor <i>S. lycopersicum</i>	4	10	U pomidora 7 z 10 testowanych markerów generowało fragmenty DNA wykazujące polimorfizm w badanym zestawie obiektów. Fragmentów takich uzyskano ogółem 12, trzy z nich były unikalne dla konkretnego obiektu. W materiałach pomidora z reguły nie odnotowywano zmienności wewnątrzobektowej. Trzema markerami wykazano heterozygotyczność obiektu Progress. Jeden marker wykazywał heterozygotyczność całego obiektu PS II.
Bób <i>V. faba</i>	4	10	U bobu wszystkie 10 testowanych markerów wykazywało polimorfizm w badanym zestawie odmian. Markery te wygenerowały ogółem 38 różnicujących produktów amplifikacji. Każdy z zastosowanych markerów w przynajmniej jednej odmianie wykazywał zmienność wewnątrzobektową. Jedynie dla odmiany Bizon zmienności takiej nie wykryto żadnym z zastosowanych markerów. Przy użyciu ośmiu markerów uzyskano profile wskazujące na heterozygotyczność niektórych roślin. Najwięcej takich przypadków odnotowano dla odmian Bartek i Bonus. Żaden profil heterozygotyczny nie wystąpił u roślin z odmiany Bizon.

Informacja nt. mierników tematu badawczego

lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
1	Liczba genotypów testowanych z wykorzystaniem wybranych metod indukcji haploidów w warunkach <i>in vitro</i>	13	13	1,00
2	Liczba testowanych kombinacji pożywek do indukcji i namnażania kalusa w kulturach <i>in vitro</i>	9	9	1,00
temat badawczy 2				
1	Liczba typów obserwacji do analizy rozwoju eksplantatów	2	2	1,00
2	Liczba bibliotek do analizy ekspresji genów	10	10	1,00
temat badawczy 3				
1	Liczba analizowanych obiektów sałaty i papryki	6	6	1,00
2	Liczba markerów testowanych na materiałach sałaty	15	15	1,00
3	Liczba markerów testowanych na materiałach papryki	15	15	1,00
4	Liczba analizowanych obiektów rodzicielskich pomidora i bobu	8	8	1,00
5	Liczba markerów testowanych na materiałach pomidora	10	10	1,00
6	Liczba markerów testowanych na materiałach bobu	10	10	1,00
			ŚREDNIA	1,00
		% REALIZACJI ZADANIA		100%

Informacja nt. prezentacji wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja ¹	liczba prezentacji podana w opisie zadania	liczba prezentacji zrealizowana
1.	19 th International Symposium on Agriculture, 11-16 luty 2024, Chorwacja 1 osoba, wyniki z 2023 r., androgeniza u bobu, sprawozdanie str. 9-10, 30-32, 50-51	poster	1	1
2	XVI Konferencja Kultur In Vitro i Biotechnologii Roślin, 23-25 września 2024, Kraków, Polska 1 osoba, wyniki z 2023 r., gynogeneza u pomidora, sprawozdanie str. 11-12, 29-30, 48-50	poster	1	1
	9 th Central European Congress of Life Sciences Eurobiotech, 27-28 czerwca 2024, Kraków, Polska 1 osoba, wyniki z 2023 r., ind. partenogeneza u bobu, sprawozdanie str. 12, 32-35, 51-53	poster	1	1
Publikacje w monografiach/czasopiśmie recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	publikacja ²	liczba publikacji podana w opisie zadania	liczba publikacji zrealizowana
1.	Current status of haploidization in cool-season grain legume crop species (z uwzględnieniem wyników z ind. partenogenezy u bobu z lat 2021 (str. 20-21, 33-36, 50-51) i 2022 (str. 22-23, 36-37, 55-56))	przeglądowa	1	1

Adres pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy

<https://projekty.urk.edu.pl/projekty/postep-biologiczny-mrirw>