

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

2023

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

**Wykonawcy: A. Adamus, M. Szklarczyk, D. Chachłowska, W. Skrzypkowski, K. Rolka, U. Pieniążek**



**W. Kiszczak, M. Podwyszyńska, A. Marasek-Ciołakowska, M. Burian, U. Kowalska, A. Trzewik, M. Markiewicz, D. Prochaska**



**Współpraca: POŁĄCZONA POLSKA HODOWLA**

**Leszek Róg, Wojciech Matuszak**



**Finansowanie badań:**



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

Lp.	Tytuł i cele zadania	Czy cel został osiągnięty
<b>Opracowanie metody indukcji haploidów i badanie czynników stymulujących gametyczną embriogenezę (GE)</b>		
1	Analiza stadiów rozwojowych organów generatywnych (pylniki, słupki) badanych gatunków i wybór eksplantatów do zakładania kultur <i>in vitro</i>	TAK
2	Analiza przydatności poszczególnych technik haploidyacji do indukcji gametycznej embriogenezy u 4 badanych gatunków	TAK
3	Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), i chemicznych (skład pożywki) na gametyczną embriogenezę	TAK
<b>Opracowanie markerów molekularnych do oceny genetycznej roślin donorowych i regenerantów</b>		
1	Identyfikacja markerów DNA do selekcji roślin donorowych do kultur <i>in vitro</i> u 4 badanych gatunków	TAK

## Tytuł zadania i stosowane metody

### **Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (pylniki, słupki)**

Ocena żywotności pyłku (acetokarmin, b. Aleksandra), 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

### **Analiza przydatności poszczególnych metod haploidyzacji do indukcji GE u 4 gatunków (sałata: androgeneza i gynogeneza papryka: androgeneza, pomidor: andro- i gynogeneza, bób: androgeneza, ind. partenogeneza)**

Odkazanie materiałów do kultur – różne procedury i związki chemiczne  
Androgeneza - izolacja pylników (mikroskopia stereoskopowa, izolacja igłami preparacyjnymi) i mikrospor (maceracja mechaniczna, filtrowanie, wirowanie, obliczanie gęstości zawiesiny przy pomocy hemocytometru), obserwacje żywotności mikrospor w kulturze – mikroskopia fluorescencyjna  
Gynogeneza – izolacja zalążni, zalążków (mikroskopia stereoskopowa, izolacja igłami preparacyjnymi)  
Indukowana partenogeneza – wykonanie kastracji pąków kwiatowych, zapyleń ręcznych, oprysku wybranym fitohormonem, izolacja słupków i zalążków przy użyciu lupy stereoskopowej)  
Cytometria przepływowa (FCM)

### **Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), oraz chemicznych (baza pożywki i substancje wzrostowe) na haploidyzację**

Aplikacja szoków termicznych (32°C lub 4°C) przez określony czas (1-7 dni) na eksplantaty - termostaty  
Wpływ pożywki (baza pożywki i regulatory wzrostu) wpływ dodatków do pożywki (np. fitohormony, fitosulfokina, kw. askorbinowy, węgiel aktywny i in.)

### **Identyfikacja markerów DNA do selekcji roślin donorowych do kultur *in vitro* u 4 badanych gatunków**

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

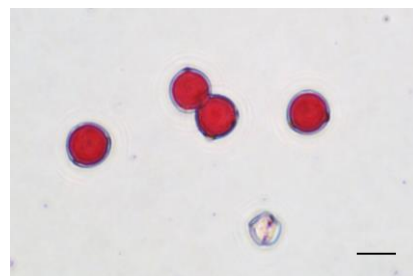
Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (pylniki, mikrospory)

Papryka – k. pylników i k. mikrospor  
 Pomidor – k. mikrospor i k. mikrospor  
 Bób – k. pylników

Nazwa rodzaju	Nazwa łacińska	Liczba obiektów	Nazwa obiektu
sałata	<i>Lactuca sativa</i>	2	linia 209, linia 212
papryka	<i>Capsicum annuum</i>	2	Roberta, linia 13
pomidor	<i>Solanum lycopersicum</i>	4	r. płodne: linia 221/19, 231/19 r. męskosterylne: I-MS10, II-PS
bób	<i>Vicia faba</i>	4	Bartek, Rambos, Windsor, Bonus
grozek p.	<i>Lathyrus odoratus</i>	1	Mieszanka nasion odmian Senator, Kenneth, America
Razem		13	

1. Ocena żywotności pyłku donorów do androgenezy i zapylacza do ind. partegogenezy

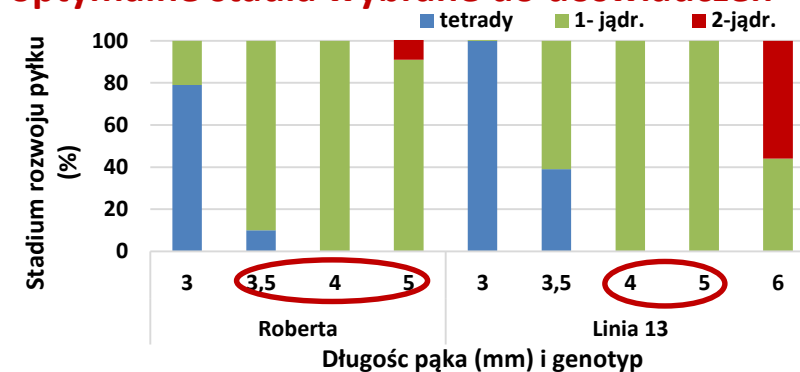
Obiekt	Żywotność pyłku
papryka	75-87%
pomidor	90-93%
bób	82-87%
grozek pachnący	86-98%



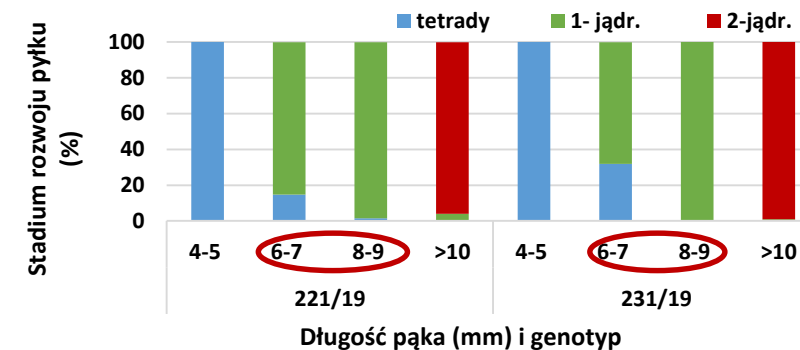
Ocena żywotności pyłku pomidora po barwieniu acetokarminem. Skala 20 µm.

2. Ocena stadiów rozwoju pyłku w pąkach kwiatowych – na czerwono oznaczono optymalne stadia wybrane do doświadczeń

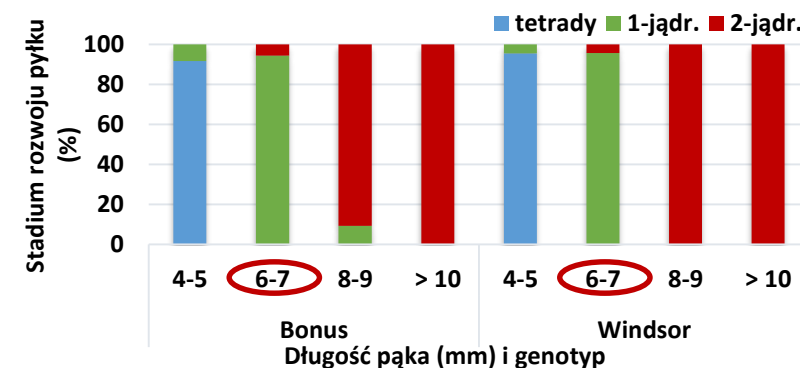
*Capsicum annuum*



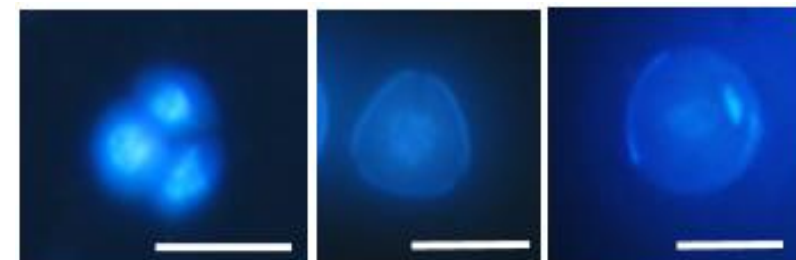
*Solanum lycopersicum*



*Vicia faba*



Stadia rozwoju pyłku pomidora po barwieniu DAPI. Od lewej: tetrada mikrospor; mikrospory z jądrem centralnie położonym; pyłek dwujądrowy. Skala 20 µm.

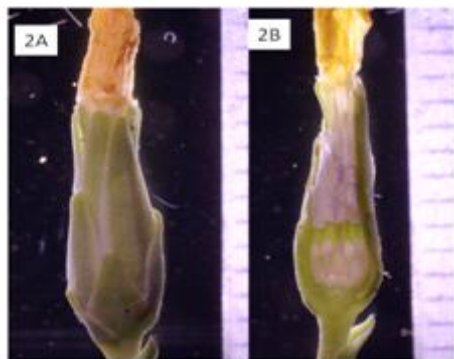


## ZADANIE 1

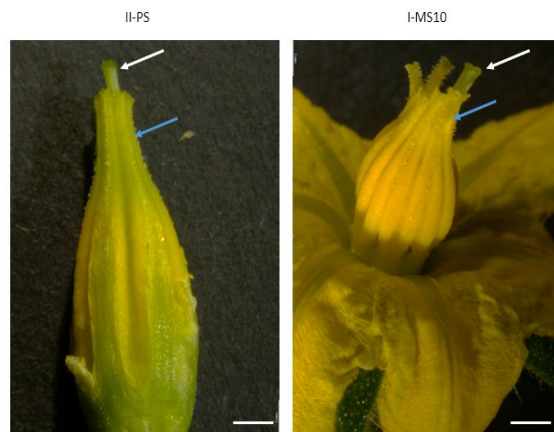
### Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu

1. **Morfologia kwiatów** – na fotografiach pokazano wybrane do doświadczeń stadia rozwoju pąka u poszczególnych gatunków, poprzedzające samozapylenie

*L. sativa* – pąki do gynogenezy



*S. lycopersicum* – pąki do gynogenezy, r. męskosterylne



*V. faba* – pąki do indukowanej partenogenezy

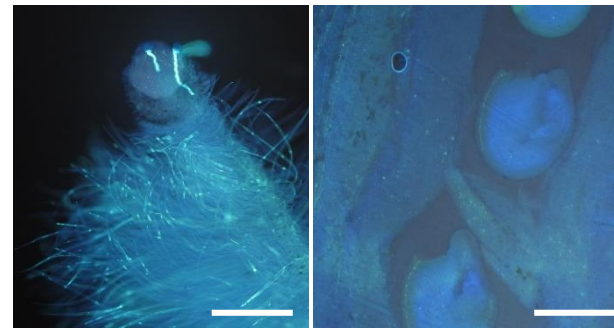


*S. lycopersicum* – pąki do gynogenezy, r. męskopłodne

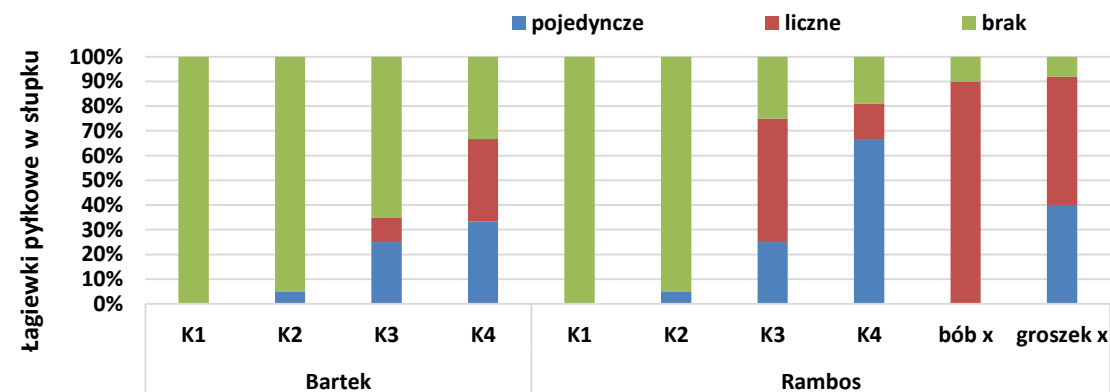


Metoda	Gat. /typ kultury
gynogeneza	Sałata – k. zalążni Pomidor - kult. zalążków
indukowana partenogen.	bób x groszek pachnący – kult. kult. zalążków

2. **Barwienie łagiewek błękitem aniliny - *V. faba zapylane L. odoratus***



Słupki bobu zapylone pyłkiem groszku pachnącego i barwione błękitem aniliny. Obserwacje po 24 h od zapylenia. Pyłek groszku наносono ręcznie na znamię bobu - widoczne kielkowanie pojedynczych ziaren pyłku na znamieniu i niezapylone zalążki w zalążni. Skala 500 µm.



Kombinacja zapylen i obiekt

Kielkowanie łagiewek pyłkowych w różnych kombinacjach doświadczenia nad indukcją partenogenezy u bobu. Obserwacje 24 h po zapyleniu/oprysku.

KOMBINACJE: kontrole: bób x, groszek x ; K1- bez zapylenia i bez oprysku GA3 ; K2- bez zapylenia i oprysk GA3; K3- zapylenie, bez oprysku GA3; K4- zapylenie i oprysk GA3

**ZADANIE 2 i 3****Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), oraz chemicznych (baza pożywki i substancje wzrostowe) na haploidyzację**

Gatunek	Metoda haploidyzacji	Technika haploidyzacji	Pożywka/ dodatki do pożywki	Stres temperaturowy	Wyniki	Wyselekcjonowane parametry
<i>Salata L. sativa</i>	Gynogeneza	Kultury zalążni	MS, B5 kwas askorbinowy, fitohormony (BAP, NAA, 2,4D)	32°C lub 4°C przez 4-7 dni	- pożywka B5, - kw askorbinowy nie stymulował rozwoju - pozytywny wpływ zastosowanych fitohormonów - szok termiczny nie zwiększał efektywności rozwoju ponad kontrolę	pożywka B5 (B5, 0,6 mg/l BA i 0,1 mg/l NAA)
<i>Papryka C. annuum</i>	Androgeneza	Kultury pylników	MS, B5 kolchicina, biotyna, kwas askorbinowy fitohormony (NAA, BAP) węgiel aktywny	35°C przez 2 dni	- pożywka B5, - kolchicina – pozytywny efekt u jednego obiektu - biotyna – rozwój kalusa u obu obiektów, powyżej kontroli - kwas askorbinowy –nie zwiększał efektywności rozwoju ponad kontrolę - fitohormony – rozwój kalusa stymulowany u obu obiektów - węgiel aktywny – rozwój kalusa stymulowany u obu obiektów - szok termiczny efektywny u obu obiektów	pożywka B5 (0,1 mg/l BA, 4mg/l NAA, 25 mg/l węgiel aktywny)  0,05 mg/l biotyny  35°C przez 2 dni
		Kultury mikrospor	MS, B5 sacharoza	32°C przez 2 dni	- pożywka B5 - 130 g sacharozy – efektywne u jednego obiektu - szok termiczny -nieefektywny u obu obiektów	Pożywka 2 (0,1 mg/l BA, 4mg/l NAA, 2,5 mg/l węgiel aktywny)  32°C przez 4 dni

**ZADANIE 2 i 3****Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), oraz chemicznych (baza pożywki i substancje wzrostowe) na haploidyzację**

Gatunek	Metoda haploidyzacji	Technika haploidyzacji	Pożywka/ dodatki do pożywki	Stres temperaturowy	Wyniki	Wyselekcjonowane parametry
Pomidor <i>S. lycopersicum</i>	Androgeneza	Kultury pylników	2 warianty Pożywki stałe TMC1, TAC4  Pożywki płynno-stałe	chłodzenie pąków 4°C przez 2 dni  32°C lub 4°C przez 2 -3 dni	- kalus (6-24%), wysokie zamieranie pylników - stres temperaturowy efektywny u jednego obiektu - podłoża płynno-stałe nieefektywne	pożywka TAC4  chłodzenie pąków
		Kultury mikrospor	TAC1, TMC6 fitosulfokina	chłodzenie pąków 4°C przez 2 dni  32°C lub 4°C przez 2 -3 dni	- niska efektywność podziałów (3-5%) - fitosulfokina - zwiększała efektywność rozwoju ponad kontrolę - nieliczne podziały na obu pożywkach i po działaniu obu stresów	fitosulfokina  chłodzenie pąków
	Gynogeneza	Kultury zalążków	indukcja - 3 namnażanie - TG4, TAC3	-	- obiekty ms i płodne - obiekty ms efektywniejszy rozwój kalusa - jednakowe kalusowanie na obu pożywkach	pożywka 3 do indukcji
Bób <i>V. faba</i>	Androgeneza	Kultury pylników	2 warianty Pożywki stałe 190/8, 190/10  Pożywki płynno-stałe	Chłodzenie pąków 4°C przez 2 dni  32°C lub 4°C przez 2 -3 dni	- zwiększona frekwencja kalusa (11-15%) - ELS ok 2% - więcej rozwoju na pożywce 190/8 i po chłodzeniu pąków - podłoża płynno-stałe nieefektywne	pożywka 190/8 (B5 z dodatkiem 2,4D, NAA i kinetyny) chłodzenie pąków
	Induk. partenogeneza po zapyleniu fasolą	Kultury zalążków – 2 warianty dośw. 1. słupki → zalążki → pożywka 2. zalążki → żywka	G7, G8	-	- więcej zalążków powiększonych i kalusujących na poź. G8 - kalusowanie od strony mikropyle - wariant 1 pracochłonny - szybkie zamieranie kalusa	wariant 2 pożywka G8 (B5, 0,2 mg/l BAP, 0,5 mg/l kin, 0,2 mg/l 2,4-D)

**ZADANIE 2 i 3****Analiza przydatności poszczególnych metod haploidyzacji do indukcji GE u 4 gatunków**

Gatunek	Metoda haploidyzacji	Technika haploidyzacji	Wynik	Uwagi
<i>Salata</i> <i>L. sativa</i>	Gynogeneza	Kultury zalążni	Kalus z zalążni	- analiza cytometryczna (FCM) <b>16% aneuploidów 1x+ (dodatkowe chromosomy)</b>
<i>Papryka</i> <i>C. annuum</i>	Androgeneza	Kultury pylników	Kalus z pylników Kolchicina w pożywce	- analiza cytometryczna (FCM) diploidalny, mixoploidalny (4x+8x), poliploidalny kalus (4x, 6x)
		Kultury izolowanych mikrospor	ELS	- bardzo niska efektywność <b>- pojedyncze struktury zarodkowe</b>
<i>Pomidor</i> <i>S. lycopersicum</i>	Androgeneza	Kultury pylników	Kalus z pylników (na biegunach i ze środk. cz.)	- kalus tylko z środkowej cz. pylników
		Kultury izolowanych mikrospor	Brak rozwoju	- żywotność mikrospor 8-12%, niska aktywność mitotyczna 0-7%
	Gynogeneza	Kultury zalążków	Kalus na zalążkach	<b>- uzyskano haploidalny kalus (FCM)</b>
<i>Bób</i> <i>V. faba</i>	Androgeneza	Kultury pylników	Kalus z pylników ELS	- efektywność rozwoju kalusa 11-15% <b>- efektywność rozwoju ELS 0-2,2%</b>
	Induk. partenogeneza po zapyleniu pyłkiem groszku pachnącego ( <i>L. odoratus</i> )	Kultury zalążków	Kalus z zalążków	- <b>rozwój kalusa głównie od strony mikropylarnej zalążków</b> - szybkie zamieranie kalusa



**ZADANIE 4****Opracowanie markerów molekularnych do oceny genetycznej roślin donorowych i regenerantów**

W bieżącym roku dla wszystkich 4 badanych gatunków rozpoczęto prace nad poszukiwaniem markerów molekularnych do selekcji roślin donorowych (heterozygoty) – **kolorem zaznaczono potencjalnie przydatne markery**

L.p.	Sałata	Fragment DNA [bp]	Papryka	Fragment DNA [bp]	Pomidor	Fragment DNA [bp]	Bób	Fragment DNA [bp]
1	LSSA03a	332	CM0001	120	Rex1/Rex2	160 i 570	FBESO-369	–
2	LSSA15	–	CM0002	125	Pto-f/Pto-r	520	FBESO-375	–
3	LSSA22	221	CM0003	160, 500	I7-f/I7-r	200, 610, 810	FBESO-699	–
4	LSSA27-1	448	CM0004	103	Mi 23-f/Mi 23-r	380	FBESO-005	–
5	LSSA28-1	151, 220	CM0005	160	I3-f/I3-r	35, 40	FBESO-053	–
6	LSSA35R-1	316	CM0006	130	TG 40-F/TG 40-R	405, 870	FBESO-015	205, 210, 215, 220
7	LSSA35R-2	158	CM0007	103	SCN13-U/SCN13-T	–	FBESO-064	235, 240
8	LSSA43	208	CM0008	195	Sw5-2-f/Sw5-2-r	–	FBESO-265	210
9	LSSB03	225	CM0009	112	I1-f/I1-r	–	FBESO-761	100, 110, 140
10	LSSB09	170	Chr3SSR13	–	Ve1-rt/Ve1-amp	–	FBESO-113	190
11	LSSB22-1	–	Chr4SSR11	–				
12	LSSB33	329	CAMS-478	248				
13	LSSB49	–	CAMS-489	240				
14	LSSB57-1	256, 300	CAMS-492	250, 500				
15	LSSB68	–	CAMS-619	–				

## Informacja nt. mierników tematu badawczego

lp.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
<b>temat badawczy 1</b>				
1	Liczba genotypów zgromadzonych do wykonania doświadczeń (2 gat. x 4 genotypy + 2 gat. x 2 genotypy + 1 zapylacz)	13	13	1,00
2	Liczba typów obserwacji do określenia stadiów rozwojowych eksplantatu (mikrosporogeneza, żywotność pyłku, kielkowanie łagiewek po obcym zapyleniu)	3	3	1,00
3	Liczba testowanych metod indukcji haploidów w warunkach <i>in vitro</i> (andro-, gynogeneza, ind. partenogeneza)	3	3	1,00
4	Liczba testowanych czynników wpływających na haploidyzację (temperatura i pożywka)	2	2	1,00
<b>temat badawczy 2</b>				
	Liczba analizowanych obiektów papryki i sałaty (2 obiekty x 2 gatunki (papryka i sałata))	4	4	1,00
	Liczba starterów SSR testowanych u sałaty	15	15	1,00
	Liczba starterów SSR testowanych u papryki	15	15	1,00
	Liczba analizowanych obiektów rodzicielskich pomidora i bobu (4 obiekty x 2 gatunki (pomidor i bób))	8	8	1,00
	Liczba markerów testowanych u pomidora	10	10	1,00
	Liczba markerów testowanych u bobu	10	10	1,00
		<b>ŚREDNIA</b>		<b>1,00</b>
		<b>% REALIZACJI ZADANIA</b>		<b>100%</b>

## Informacja nt. prezentacji wyników badań

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja <sup>1</sup>	liczba prezentacji podana w opisie zadania	liczba prezentacji zrealizowana
1.	11th International Conference "Agriculture and Food" 14-17 sierpnia 2023, Bułgaria 1 osoba, wyniki z 2022 r. induk. partenogeneza u bobu, sprawozdanie str. 9-11, 21-23, 34-37, 55-56	poster	1	1
2	11 Konferencja Polskiego Towarzystwa Biologii Eksperymentalnej Roślin (PSEPB), 19-22 września 2023, Poznań 1 osoba, wyniki z 2022 r. gynogeneza u pomidora, sprawozdanie str. 8-9, 20-21, 48-51	poster	1	1
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	publikacja <sup>2</sup>	liczba publikacji podana w opisie zadania	liczba publikacji zrealizowana
1.	<b>nie dotyczy w bieżącym roku</b>	-	-	-

Adres pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy

<https://projekty.urk.edu.pl/index/site/7635>