

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

2022

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

Wykonawcy: A. Adamus, D. Chachłowska, W. Skrzypkowski, K. Rolka, U. Pieniążek, P. Albiński

W. Kiszczak, M. Podwyszyńska, A. Marasek-Ciołakowska, M. Burian, U. Kowalska, D. Prochalska

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)		
1.1	Zgromadzenie i wyprowadzenie (kontrolowane zapylenia) kolekcji materiałów wyjściowych (4 gatunki do ind. haploidów oraz 1 gatunek, jako zapylacz do indukcji partenogenezy)	TAK
1.2	Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (pylniki, słupki)	TAK
1.3	Analiza przydatności poszczególnych metod haploidyzacji do indukcji GE u 4 gatunków (sałata: andro- i gynogeneza, papryka: androgeneza, pomidor: andro- i gynogeneza, bób: androgeneza, ind. partenogeneza)	TAK
1.4	Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), oraz chemicznych (baza pożywki i substancje wzrostowe) na haploidyzację	TAK

Tytuł zadania i stosowane metody

1.1 Zgromadzenie i wyprowadzenie (kontrolowane zapylenia) kolekcji materiałów wyjściowych (4 gatunki do ind. haploidów oraz 1 gatunek, jako zapylacz do indukcji partenogenezy)

Wysiewy nasion badanych gatunków w warunkach polowych, szklarniowych i fitotronowych, pielęgnacja roślin, ochrona przeciw chorobom i szkodnikom, izolacja roślin, kastrowanie, kontrolowane zapylenia ręczne

1.2 Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (pylniki, słupki)

Ocena żywotności pyłku (acetokarmin, b. Aleksandra), ocena stadium mikrosporogenezy – preparatyka cytologiczna, barwienie preparatów (DAPI), mikroskopia fluorescencyjna i światła przechodzącego w celu ustalenia wielkości pąka do androgenyzy, dokumentacja fotograficzna

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

Barwienie łagiewek pyłkowych i zalążni – utrwalanie materiału roślinnego, maceracja w NaOH, barwienie błękitem aniliny, preparatyka cytologiczna, mikroskopia fluorescencyjna, dokumentacja fotograficzna

1.3 Analiza przydatności poszczególnych metod haploidyacji do indukcji GE u 4 gatunków (sałata: androgenyza i gynogenyza papryka: androgenyza, pomidor: andro- i gynogenyza, bób: androgenyza, ind. partenogeneza)

Odkazanie materiałów do kultur – różne procedury i związki chemiczne

Androgenyza - izolacja pylników (mikroskopia stereoskopowa, izolacja igłami preparacyjnymi) i mikrospor (maceracja mechaniczna, filtrowanie, wirowanie, obliczanie gęstości zawiesiny przy pomocy hemocytometru), obserwacje zwrotności mikrospor w kulturze – mikroskopia fluorescencyjna

Gynogenyza – izolacja zalążni, zalążków (mikroskopia stereoskopowa, izolacja igłami preparacyjnymi)

Indukowana partenogeneza – wykonanie kastracji pąków kwiatowych, zapyleń ręcznych, oprysku auksyną 2,4-D, izolacja zalążni i słupków przy użyciu lupy stereoskopowej)

Cytometria przepływowa (FCM)

1.4 Analiza wpływu wybranych czynników fizycznych (stres temp.), oraz chemicznych (baza pożywki i substancje wzrostowe) na haploidyację

Indukcja szoków termicznych (32°C lub 4°C) przez określony czas (2, 4 dni) na pylniki i mikrospory i zalążnie - termostaty

Wpływ pożywki (baza pożywki i regulatory wzrostu) wpływ dodatków do pożywki (azacytydyna, aminokwasy, kw. askorbinowy, putrescyna, fitohormony)

Zgromadzenie i wyprowadzenie (kontrolowane zapylenia) kolekcji materiałów wyjściowych (4 gatunki do ind. haploidów oraz 1 gatunek jako zapylacz do indukcji partenogenezy)

1. Kolekcja obiektów bazowych i zapylaczy



plodne

Lactuca sativa

Capsicum annuum



ms

Vicia faba

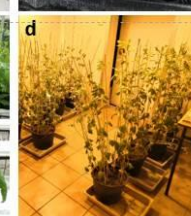
Lathyrus odoratus

Solanum lycopersicum



Uprawa roślin donorowych do haploidyżacji u sałaty i papryki. Uprawa szklarniowa sałaty (a,b) uprawa szklarniowa papryki (c), pąki kwiatowe na roślinie donorowej papryki (d)

Materiał	Nazwa rodzaju	Nazwa łacińska	Liczba obiektów	Nazwa obiektu
Bazowy	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 205/19, 221/19, r. męskosterylne: I-MS10, II-PS
	bób	<i>Vicia faba</i>	4	Bartek, Rambos, Bachus, Bonus
Zapylacz	fasola	<i>Lathyrus odoratus</i>	1	Mieszanka nasion odmian Senator, Kenneth, America
Razem			13	



Prowadzenie roślin donorowych do haploidyżacji u pomidora i bobu oraz zapylacza do indukcji partenogenezy u bobu. Uprawa szklarniowa roślin pomidora - rozsada roślin męskosterylnych przed przesadzaniem do donic (a) kwitnące rośliny pomidora (b). Rośliny bobu – młode siewki gotowe do przeniesienia do komór wegetacyjnych (c) oraz kwitnące rośliny bobu w komorach przeznaczonych do ind. partenogenezy (d). Kwitnące rośliny groszku pachnącego (zapylacz dla bobu) w uprawie polowej (e).

2. Wyprowadzenie materiałów wyjściowych bobu do indukcji andro- i gynogenezy

W bieżącym roku obiektami krzyżowań były odmiany: Bizon, Rambos, Bolero, Buffalo oraz linia hodowlana 3280. Ogółem wykonano 10 kombinacji krzyżowań między w/w obiektami. W obrębie tych kombinacji wykonano 400 krzyżowań. Oceniano wydajność wiązania nasion.

Liczba wykonanych krzyżowań	Liczba krzyżowań z których uzyskano strąki	Liczba uzyskanych nasion
400	80	148



Strąk z nasionami po ręcznym zapyleniu

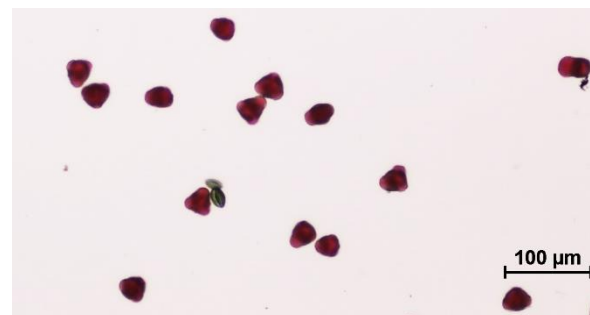
ZADANIE 1.2

Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (pylniki, mikrospory)

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

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

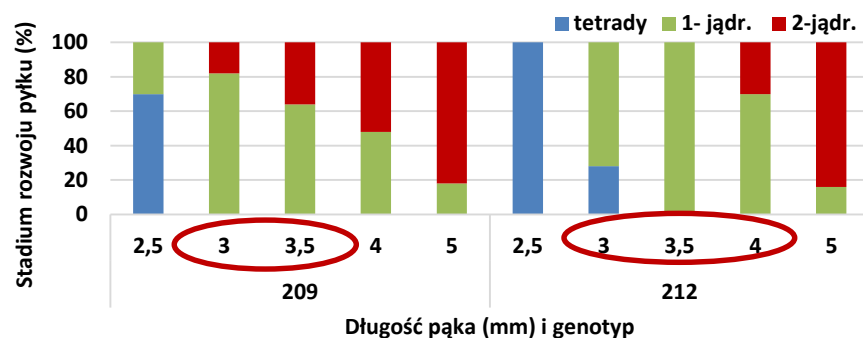
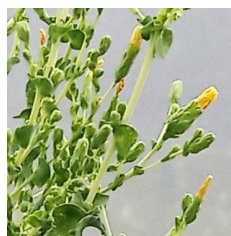
Obiekt	Żywotność pyłku
sałata	92-93%
papryka	76-85%
pomidor	81-85%
bób	93-96%
groszek pachnący	92-98%



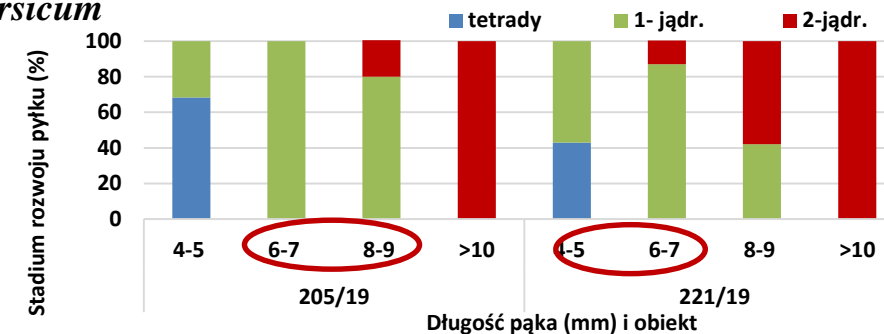
Ocena żywotności pyłku papryki na preparatach barwionych wg. metody Aleksandra. Żywotne ziarna pyłku wybarwiają się na intensywnie czerwony kolor.

2. Ocena stadium mikrogametogenezy w pąkach kwiatowych – na czerwono oznaczono optymalne stadia wybrane do doświadczeń

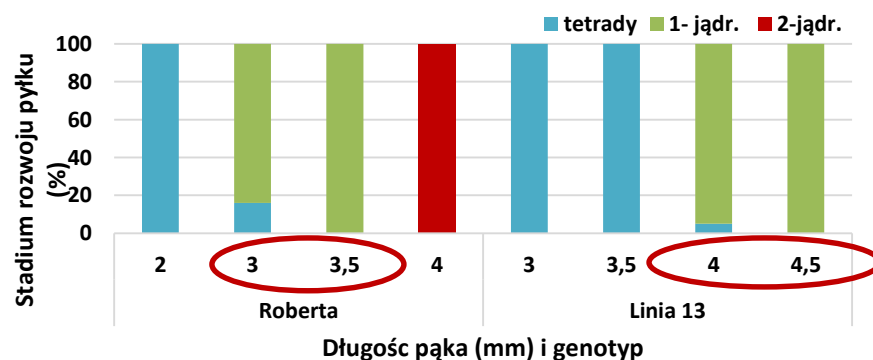
Lactuca sativa



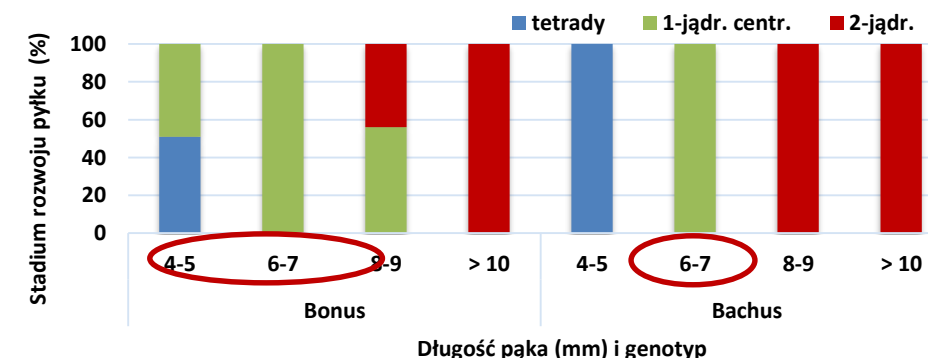
Solanum lycopersicum



Capsicum annuum



Vicia faba

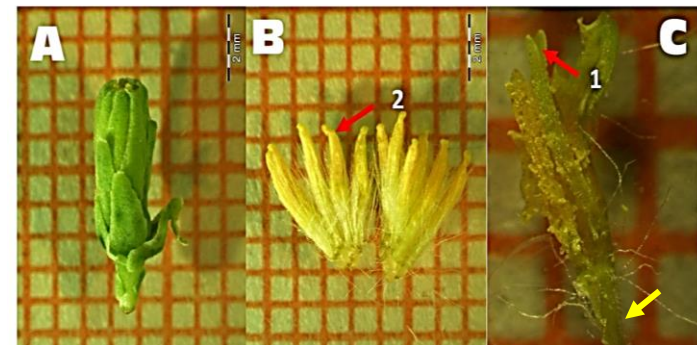


ZADANIE 1.2

Analiza stadiów rozwojowych eksplantatu (zaląźnie)

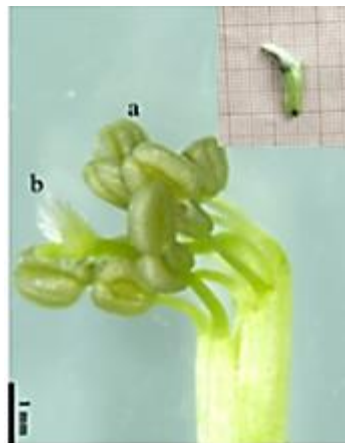
2. Ocena dojrzałości zaląźni i wykonanie zapyleń – na fotografiach pokazano wybrane do doświadczeń stadia rozwoju pąka u poszczególnych gatunków, poprzedzające samozapalenie

L. sativa – pąki do *avnoagenezy*



Pąk z zamkniętymi pylnikami (2) i widocznym znamieniem słupka (1)

V. faba – pąki do indukowanej partenogenezy

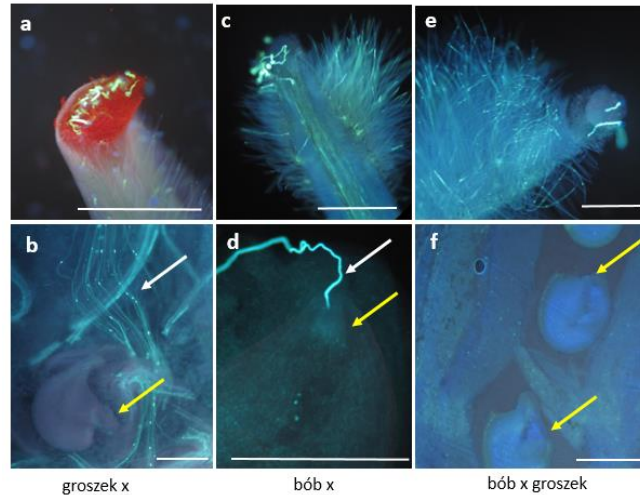


1,5 – 1,8 cm

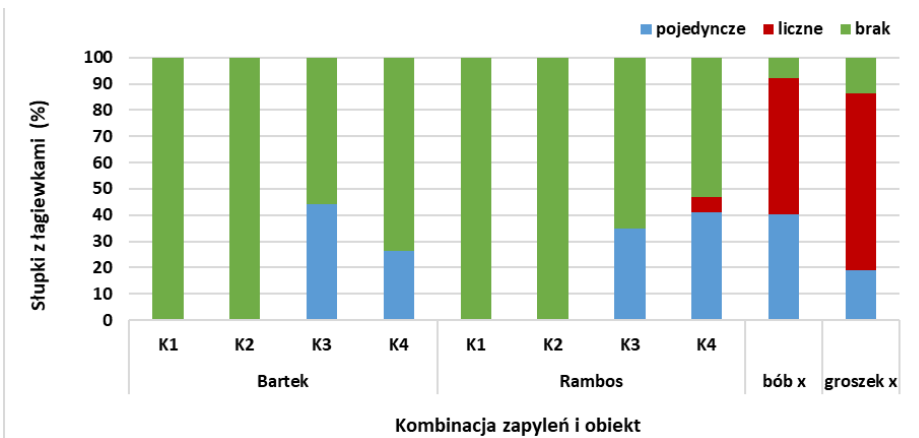
S. lycopersicum – pąki do *gynogenezy*, r. *meskosterylna*



3. Barwienie łągiełek i zaląźni błękitem aniliny - *V. faba* zapylane *L. odoratus*



Słupki barwione błękitem aniliny w wybranych kombinacjach doświadczenia. Obserwacje po 24 h od zapylecia. Opis: groszek zapylano groszkiem (groszek x) - widoczny pyłek na znamieniu (a) i liczne łągiełki pyłkowe (b); bób zapylono pyłkiem bobu (bób x): widoczne kiełkowanie pyłku na znamieniu (c) i wnikanie łągiełki do zaląźki przez mikropyle (d); pyłek groszku nanoszono na znamię bobu (bób x groszek) - widoczne kiełkowanie pojedynczych ziaren pyłku na znamieniu (e) i niezapylone zaląźki w zaląźni (f). Biała strzałka wskazuje łągiełki pyłkowe, strzałka żółta zaląźki. Skala 500 μm.



kontrola: bób x, groszek x
K1- bez zapylecia i bez oprysku 2,4-D;
K2- bez zapylecia i oprysku 2,4-D;
K3- zapylecie, bez oprysku 2,4-D;
K4- zapylecie i oprysku 2,4-D

Kiełkowanie łągiełek pyłkowych w różnych kombinacjach doświadczenia nad indukacją partenogenezy u bobu. Obserwacje 24 h po zapyleciu/oprysku.

ZADANIE 1.3**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>	Androgeneza	Kultury izolowanych mikrospor	Kalus z kultur mikrospor	Żywotność mikrospor 18-35%, niska aktywność mitotyczna
	Gynogeneza	Kultury zaląźni	Kalus na zaląźniach	-
Papryka <i>C. annuum</i>	Androgeneza	Kultury pylników	Kalus na pylnikach	Analiza cytometryczna (FCM) wykazała tylko poliploidalny kalus (4x, 6x)
		Kultury izolowanych mikrospor	Kalus z kultur mikrospor	Bardzo niska żywotność mikrospor 1-5%, niska aktywność mitotyczna
Pomidor <i>S. lycopersicum</i>	Androgeneza	Kultury izolowanych mikrospor	Brak rozwoju	Żywotność mikrospor 22-27%, niska aktywność mitotyczna 1-3%
	Gynogeneza	Kultury fragmentów zaląźni	Kalus na zaląźniach	Kalus głównie na ścianach zaląźni i łożysku, nie z zaląźników
		Kultury zaląźników	Kalus na zaląźnikach	Uzyskano haploidalny kalus (FCM)
Bób <i>V. faba</i>	Androgeneza	Kultury pylników	Kalus na pylnikach	Efektywność rozwoju kalusa 0,3-0,8%
		Kultury izolowanych mikrospor	Brak rozwoju	Niska żywotność mikrospor 10-11%, bardzo niska aktywność mitotyczna 0-0,15%
	Induk. partenogeneza po zapyleniu pyłkiem groszku pachnącego (<i>L. odoratus</i>)	Kultury słupków	Kalus na słupkach	Rozwój kalusa na zewnętrznych tkankach słupka
		Kultury zaląźników	Kalus na zaląźnikach	Rozwój kalusa głównie od strony mikropylarnej zaląźników

ZADANIE 1.4**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>Sałata L. sativa</i>	Androgeneza	Kultury mikrospor	1+col przez 24 h, potem pasaż na pożywkę 1,	32°C przez 4 dni	<ul style="list-style-type: none"> - niska efektywność rozwoju kalusa (<10% szalek) - brak pozytywnego wpływu szoku termicznego 	nie określono warunków
	Gynogeneza	Kultury zalążni	MS, B5 kwas askorbinowy, aminokwasy (glu i ser), fitohormony (BAP+IAA, NAA+2,4D)	32°C lub 4°C przez 4 dni	<ul style="list-style-type: none"> - pożywka B5, - kw askorbinowy nie zwiększał liczby zalążni z kalusem - aminokwasy - brak reakcji na poź. z seryną, glutamina stymuluje kalusa tylko u jednego obiektu - brak pozytywnego wpływu fitohormonów - szok termiczny efektywny tylko u jednego obiektu 	pożywka B5 (B5, 0,6 mg/l BA i 0,1 mg/l NAA) 32°C przez 4 dni
Papryka <i>C. annuum</i>	Androgeneza	Kultury pylników	MS, B5, azacytydyna, putrescyna, aminokwasy (glu i ser), fitohormony (NAA+BAP+węgiel)	32°C przez 4 dni	<ul style="list-style-type: none"> - pożywka MS, - azacydyna – rozwój kalusa u obu obiektów - putrescyna – rozwój kalusa stymulowany nieznacznie tylko u jednego obiektu - Aminokwasy – rozwój kalusa stymulowany u obu obiektów - Fitohormony – rozwój kalusa stymulowany u obu obiektów - szok termiczny efektywny tylko u jednego obiektu 	pożywka MS (0,004 mg/l 2,4D oraz 0,1 mg/l kinetyny) azacytydyna 2,44 mg/l Aminokwasy (800 mg/l glutamina i 100 mg/l seryna) Fitohormony (4 mg/l NAA, 0,1 mg/l BAP, 2,5 g/l węgiel)
		Kultury mikrospor	1, 2	32°C przez 4 dni	<ul style="list-style-type: none"> - pożywka 2 - szok termiczny bardzo efektywny, ale tylko u jednego obiektu 	Pożywka 2 (MS, 0,4 mg/l 2,4D i 0,1 mg/l kinetyny) 32°C przez 4 dni

ZADANIE 1.4**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 mikrospor	TMC5, TMC1	32°C lub 4°C przez 2 dni	- niska efektywność podziałów (0,8-3,6%) - podziały na obu pożywkach i po działaniu obu stresów	nie określono warunków brak rozwoju
	Gynogeneza	Kultury fragmentów zaląźni	G2, G4	-	- powiększanie się tkanek somatycznych zaląźni i kalusowanie ze ścian zaląźni oraz łożyska, głównie na poź. G4 w ciemności	nie określono warunków, kalus poch. somatycznego na obu pożywkach
		Kultury zaląźków	3, TG2	-	- kalusowanie na obu pożywkach	pożywka TG2 - rozwój haploidalnego kalusa
Bób <i>V. faba</i>	Androgeneza	Kultury pylników	Pg-96, 190/8	32°C lub 4°C przez 2 dni	- niska frekwencja kalusa (0-1,7%) - więcej kalusa na pożywce 190/8 i po szoku wysokiej temp.	pożywka 190/8 (B5 z dodatkiem 2,4D, NAA i kinetyny) 32°C przez 2 dni
		Kultury mikrospor	190/7, PMC	32°C lub 4°C przez 2 dni	- niska efektywność podziałów (do 0,4%) tylko u odm. Bonus na poź. 190/7 po szoku wys. temp a na poź. PMC po szoku niskiej temp	nie określono warunków brak rozwoju
	Induk. partenogeneza po zapyleniu fasolą	Kultury słupków	G6, H2	-	-więcej słupków powiększonych i kalusujących na poź. G6 - kalusowanie tylko na powierzchni słupka	nie określono warunków, kalus poch. somatycznego na obu pożywkach
		Kultury zaląźków	G6, H2	-	- więcej zaląźków powiększonych i kalusujących na poź. H2 - kalusowanie od strony mikropyle	pożywka H2 (1/2 MS, 0,01 mg/l IAA)

Informacja nt. prezentacji wyników badań

Informacja nt. mierników tematu badawczego

l.p.	miernik	wartość miernika podana w opisie zadania	wartość miernika zrealizowana	stopień realizacji zadania
1	2	3	4	5
temat badawczy 1				
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, kiełkowanie 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
			ŚREDNIA	1,00
		% REALIZACJI ZADANIA		100%

Prezentacja wyników na konferencjach				
lp.	konferencja	prezentacja ¹	liczba prezentacji podana w opisie zadania	liczba prezentacji zrealizowana
1.	34 Konferencja Embriologiczna, 18-21 maja 2022 Zakopane, konf. online 1 osoba, wyniki z 2021 r. kultury mikrospor pomidora, sprawozdanie str. 7, 14, 26-28, 42-44 Załącznik 1	poster	1	1
	VI Polski Kongres Genetyki, 27-30 czerwca 2022 Kraków, konf. stacjonarna 1 osoba, wyniki z 2021 r. gynogeneza u pomidora, sprawozdanie str. 8-10, 17, 28-30, 44-47 Załącznik 2	poster	1	1
	8 th Eurobiotech, 20-22 czerwca 2022 Kraków, konf. stacjonarna 1 osoba, wyniki z 2021 r. induk. partenogeneza u sałaty i bobu, sprawozdanie str. 5-6, 16, 18-21, 33-36 Załącznik 3	poster	1	1
Publikacje w monografiach/czasopismach recenzowanych				
lp.	monografia/czasopismo	publikacja ²	liczba publikacji podana w opisie zadania	liczba publikacji zrealizowana
1.	nie dotyczy w bieżącym roku	-	-	-

Adres pod którym wyniki badań są dostępne na stronie internetowej wnioskodawcy

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