

Zadanie nr 36:

## **Wykorzystanie somatycznej hybrydyzacji do poszerzenia zakresu zmienności wybranych roślin warzywnych**

Okres realizacji: **84 miesiące (lata 2021-2027)**

Zespół wykonawców projektu:

**dr hab. inż. Ewa Grzebelus, prof. URK – kierownik projektu; email: [ewa.grzebelus@urk.edu.pl](mailto:ewa.grzebelus@urk.edu.pl)**

**dr hab. inż. Agnieszka Kiełkowska, prof. URK**

**dr hab. Marek Szklarczyk, prof. URK**

# Cele projektu w 2021 r.

## Temat badawczy 1 (Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie):

- uzyskanie sekwencji transkryptomu liściowego pasternaku
- opracowanie markerów jądrowych różnicujących pasternak i pietruszkę
- opracowanie markerów jądrowych różnicujących jarmuż i kapustę galicyjską

## Temat badawczy 2 (Wyprowadzenie/utrzymanie kultur pędowych i embriogennej tkanki kalusowej warzyw amarylkowatych):

- opracowanie warunków prowadzenia krótko- i długoterminowych kultur pędowych czosnku o wysokim potencjale namnożeniowym
- opracowanie warunków indukcji i utrzymania embriogennej tkanki kalusowej cebuli, czosnku i czosnku niedźwiedziego\*

## Temat badawczy 3 (Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów form rodzicielskich):

- wybór obiektu/ów pasternaku o dobrej zdolności regeneracyjnej
- opracowanie protokołu izolacji i kultury protoplastów jarmużu, kapusty galicyjskiej i sałaty
- opracowanie wstępnych warunków dla izolacji i kultury protoplastów czosnku niedźwiedziego

\* cel zrealizowany częściowo  
*pozostałe cele zostały zrealizowane*

# Materiały i metody

## Temat badawczy 1 (Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie)

### Materiały roślinne

- Pasternak zwyczajny (*Pastinaca sativa* L.) – odmiana Gladiator (Tozer Seeds)
- Pietruszka zwyczajna (*Petroselinum crispum* (Mill.) Fuss) – odmiana Ołomuńska (Plantico)
- Jarmuż (*Brassica oleracea* L. var. *sabellica*) – odmiana Kapral (Sustainable Seeds)
- Kapusta galicyjska (*Brassica oleracea* L. var. *viridis*) – odmiana Vates (Plantico)

} wykorzystano po  
20 siewek z  
każdego obiektu

### Metody

- Sekwencjonowanie liściowego transkryptomu pasternaku w serwisie zewnętrznym z wykorzystaniem platformy firmy Illumina
- Identyfikacja mikrosatelit z użyciem programu MicroSatellite (MISA)
- PCR z elektroforezą produktów w standardowym żelu agarozowym lub w natywnym żelu poliakrylamidowym

## Temat badawczy 2 (Wyprowadzenie/utrzymanie kultur pędowych i embriogennej tkanki kalusowej warzyw amarylkowatych)

### Materiały roślinne

czosnek zwyczajny (*Allium sativum* L.) – 4 obiekty; cebula zwyczajna (*Allium cepa* L.) – 4 linie

### Metody

- indukcja krótko- i długoterminowej kultury pędowej z piętek ząbków czosnku (1 pożywka)
- indukcja kalusa czosnku z piętek ząbków czosnku i zarodków zygotycznych cebuli (2 pożywki)

## Temat badawczy 3 (Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów form rodzicielskich)

### Materiały roślinne

pasternak zwyczajny – 3 obiekty; jarmuż, kapusta galicyjska – 1 obiekt; sałata głowiasta (*Lactuca sativa* L. var. *capitata*) – 2 obiekty; czosnek zwyczajny – 1 obiekt;

### Metody

- kultura roślin donorowych z nasion w warunkach in vitro
- maceracja enzymatyczna liści dla izolacji protoplastów (różne warianty składu mieszaniny maceracyjnej)
- kultura protoplastów w pożywkach płynnych po immobilizacji w alginianie wapnia (różne warianty pożywkowe)
- regeneracja roślin wybranych kultur protoplastów na pożywkach stałych

# Wyniki

## Sekwencjonowanie transkryptomu pasternaku

Analizie RNA-seq poddano pojedynczą roślinę z odmiany Gladiator.

W wyniku wstępnego sekwencjonowania odczytano łącznie 84,8 mln nukleotydów przy średniej długości odczytów wynoszącej 199 nt. W całkowitej puli zsekwencjonowanych nukleotydów, 92,5% charakteryzowało się parametrem jakościowym *Phred score* równym co najmniej 30. Średnia procentowa zawartość GC wynosiła 44%.

Parametry statystyczne wykonanego wstępnego sekwencjonowania transkryptomu pasternaku.

Typ odczytów	Liczba odczytów	Całkowita liczba nukleotydów	%GC	Długość odczytów [nt]					Średnia wartość <i>Phred score</i>	%Q20	%Q30
				Min.	Maks.	Średnia	N50	N95			
forward	213 184	43 317 731	44	16	301	203,19	221	126	69,34	98,19	94,04
reverse	213 184	41 522 409	43	15	301	194,77	210	124	68,63	97,03	91,00

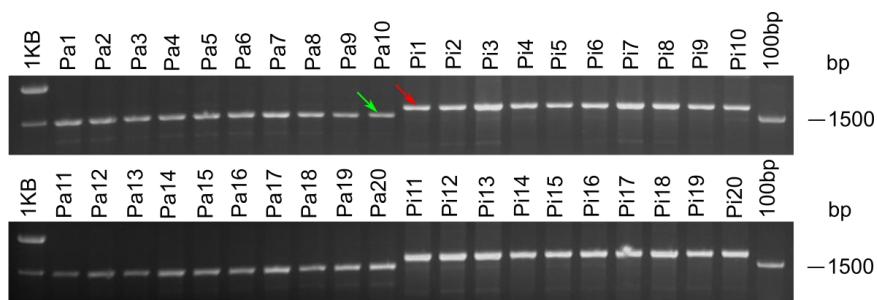
Analiza otrzymanych odczytów programem MISA umożliwiła identyfikację łącznie 269 066 mikrosatelit złożonych z motywów o długości od 2 do 10 nukleotydów powtórzonych od 3 do 38 razy. Największą pulę mikrosatelit – 167 710 – stanowiły 3-krotne powtórzenia 2-nukleotydowe. Stanowiły one 72,3% wszystkich 3-krotnie powtórzonych mikrosatelit oraz 85,3% wszystkich powtórzeń 2-nukleotydowych.

Liczebność różnych typów powtórzeń mikrosatelitarnych zidentyfikowanych w zsekwencjonowanym transkrypcie pasternaku.

Długość motywów	Liczba powtórzeń														Suma	Udział [%]
	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	>15		
2-nukleotydowe	167 710	21 205	3 807	1 217	713	563	329	221	138	88	64	83	40	337	196 515	73,04
3-nukleotydowe	60 838	5 683	1 045	590	169	99	24	20	8	2	2	0	2	8	68 490	25,45
4-nukleotydowe	2 057	162	67	10	22	3	1	1	0	0	0	2	0	0	2 325	0,86
5-nukleotydowe	584	127	26	6	0	0	1	2	2	0	0	0	0	0	748	0,28
6-nukleotydowe	497	299	31	11	10	2	2	2	0	0	1	1	0	0	856	0,32

# Opracowanie markerów jądrowych różnicujących komponenty rodzicielskie: pasternak i pietruszkę oraz jarmuż i kapustę galicyjską

W toku analiz porównywano profile markerowe wygenerowane dla 20 siewek pasternaku i 20 siewek pietruszki oraz profile uzyskane dla 20 siewek jarmużu i 20 siewek kapusty galicyjskiej. W uzyskanych elektroforegramach poszukiwano produktów PCR, które były specyficzne dla jednego z obiektów danej pary.



SSR2-10H-f/SSR2-10H-r

Profile prążkowe otrzymane przy użyciu przykładowego markera (SSR2-10H) dla 20 roślin pasternaku oraz 20 roślin pietruszki.

## Pasternak/pietruszka

Przy zastosowaniu 11 markerów uzyskano ogółem 10 produktów amplifikacji występujących wyłącznie w jednym porównywanym obiekcie.

## Jarmuż/kapusta galicyjska

Przy zastosowaniu 20 markerów uzyskano ogółem 17 produktów amplifikacji występujących wyłącznie w jednym porównywanym obiekcie.

Zidentyfikowane produkty różnicujące będzie można zastosować do selekcji odpowiednich produktów fuzji somatycznej.

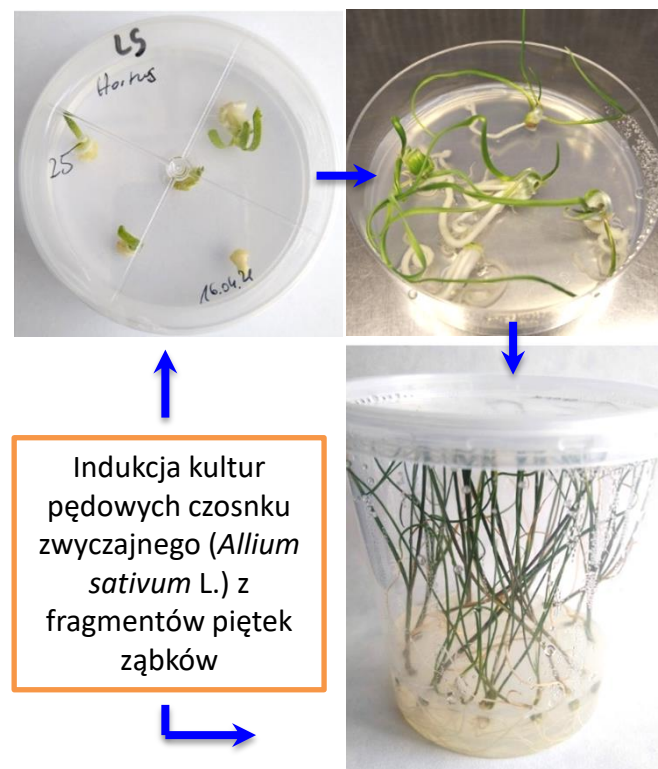
Produkty markerowe różnicujące analizowane odmiany kapusty galicyjskiej i jarmużu (fragment tabeli).

Marker	OI10F09	Ni4b10	Na10G10		OI10D08
Długość diagnostycznego fragmentu DNA [bp]	110	190	160	120	170
<b>Nr rośliny</b>	<b>Kapusta galicyjska</b>				
KG1	+	-	-	-	-
KG2	+	-	-	-	-
KG3	+	-	-	-	-
KG4	+	-	-	-	-
KG5	+	-	-	-	-
KG6	+	-	-	-	-
KG7	+	-	-	-	-
KG8	+	-	-	-	-
KG9	+	-	-	-	-
KG10	+	-	-	-	-
KG11	+	-	-	-	-
KG12	+	-	-	-	-
KG13	+	-	-	-	-
KG14	+	-	-	-	-
KG15	+	-	-	-	-
KG16	+	-	-	-	-
KG17	+	-	-	-	-
KG18	+	-	-	-	-
KG19	+	-	-	-	-
KG20	+	-	-	-	-
<b>Nr rośliny</b>	<b>Jarmuż</b>				
J1	-	+	-	+	+
J2	-	+	-	+	+
J3	-	+	+	-	+
J4	-	+	-	+	+
J5	-	+	+	-	-
J6	-	+	-	+	+
J7	-	+	+	-	+
J8	-	+	+	-	+
J9	-	+	-	+	+
J10	-	+	-	+	+
J11	-	+	+	-	+
J12	-	+	-	+	+
J13	-	+	-	+	-
J14	-	+	-	+	+
J15	-	+	+	-	+
J16	-	+	-	+	+
J17	-	+	+	-	+
J18	-	+	-	+	+
J19	-	+	+	-	-

## Wyprowadzenie/utrzymanie kultur pędowych czosnku

Współczynnik namnażania w kulturach fragmentów piętek czosnku zwyczajnego (*Allium sativum* L.)

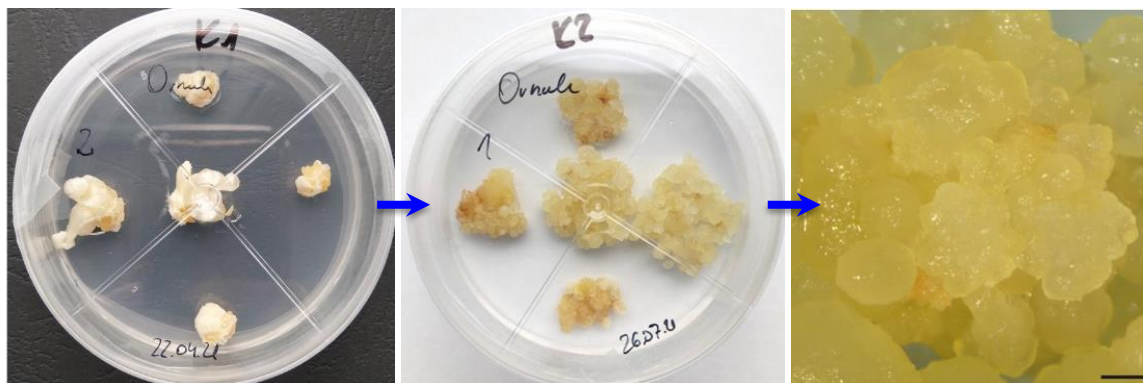
Obiekt	Liczba wyłożonych eksplantatów	Liczba otrzymanych roślin	Współczynnik namnażania ( $\pm$ SE)
'Ornak'	150	467	3,1 $\pm$ 0,2 (a)
'Harnaś'	150	253	1,7 $\pm$ 0,2 (b)
'Hortus'	150	524	3,5 $\pm$ 0,2 (a)
POL030	50	108	2,2
Ogółem	500	1352	2,6 $\pm$ 0,7



## Wyprowadzenie/utrzymanie kultur kalusa czosnku

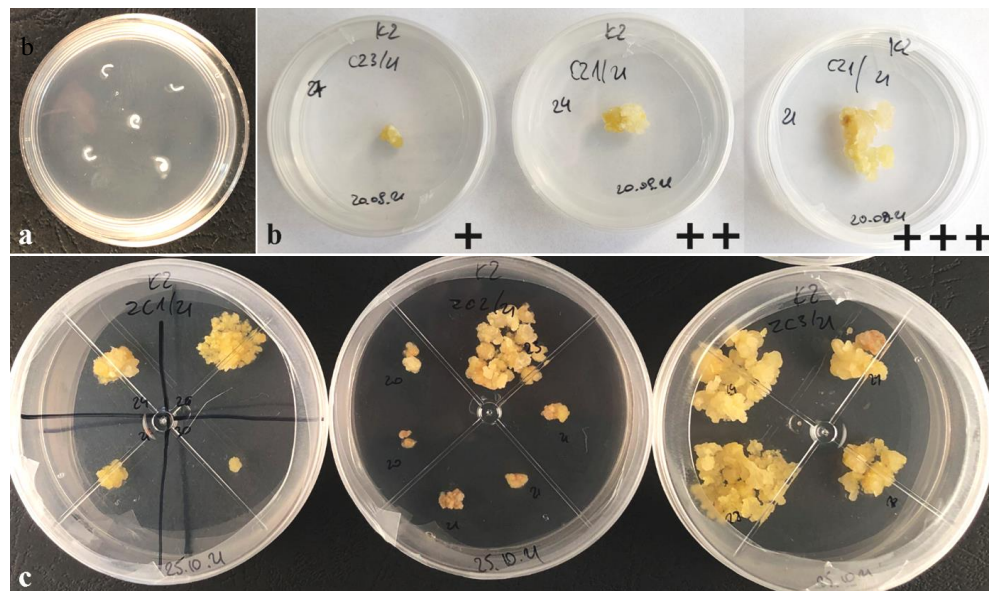
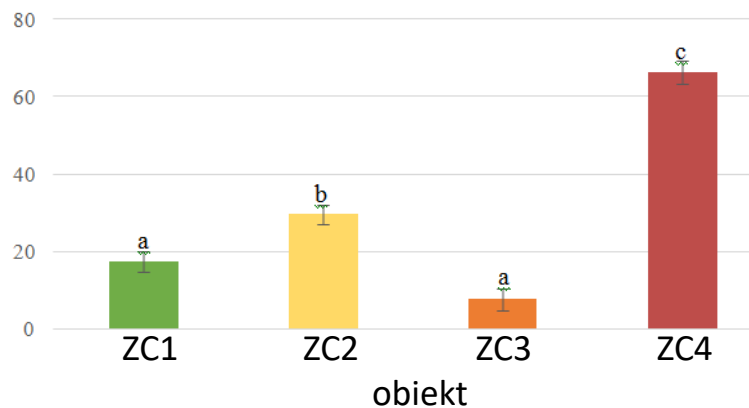
Indukcja kalusa z fragmentów piętek ząbków czosnku zwyczajnego (*Allium sativum* L.)

Obiekt	Pożywka indukcyjna	Średnia liczba ( $\pm$ SE) eksplantatów tworzących kalus
'Ornak'	K1	31,3 $\pm$ 9,0
	K2	41,3 $\pm$ 4,1
'Harnaś'	K1	10,3 $\pm$ 6,2
	K2	22,3 $\pm$ 1,7
'Hortus'	K1	37,7 $\pm$ 0,9
	K2	43,0 $\pm$ 4,1
POL030	K1	41,0
	K2	48,0

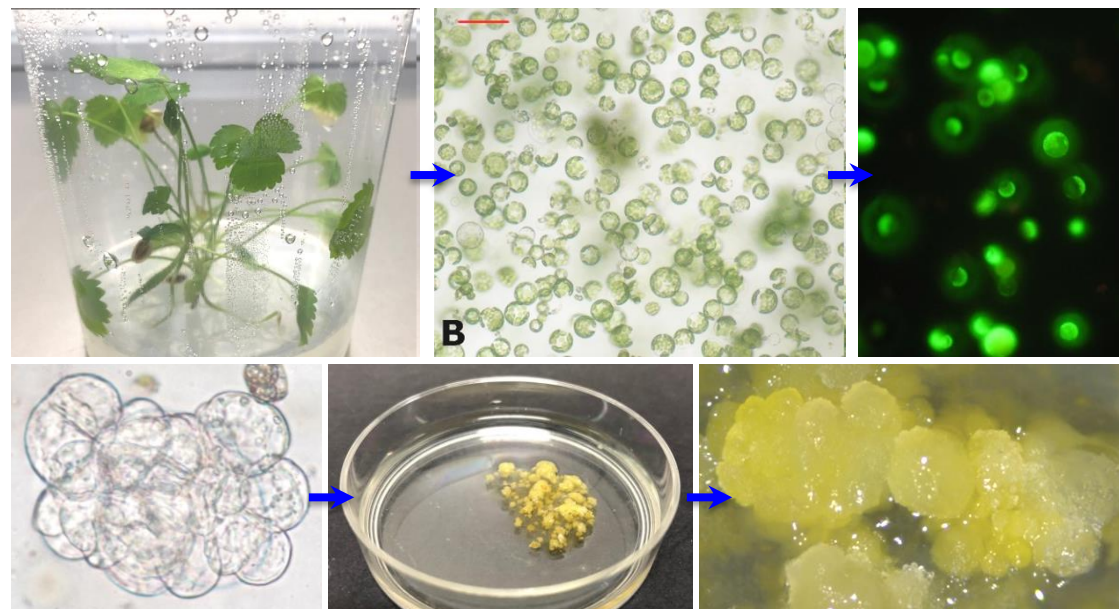
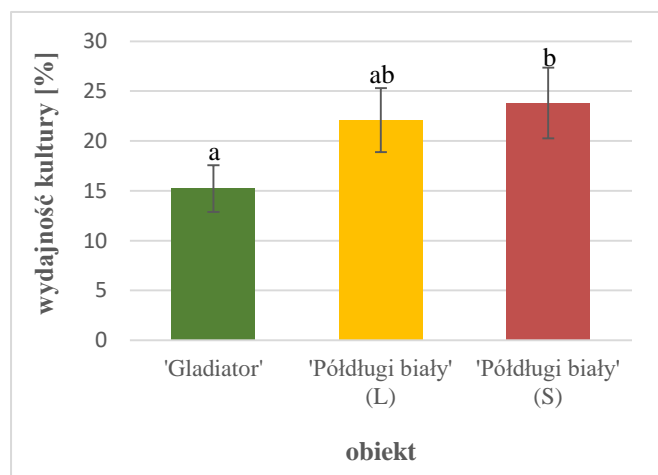


## Wprowadzenie/utrzymanie kultur kalusa cebuli

Wydajność indukcji kalusa (%) z dojrzałych zarodków zygotycznych cebuli (*Allium cepa* L.)



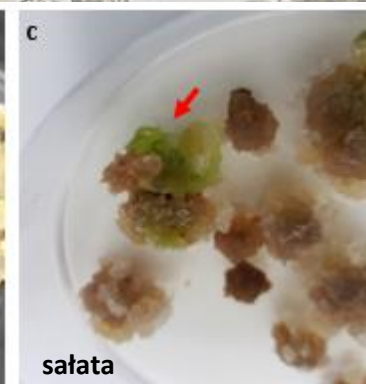
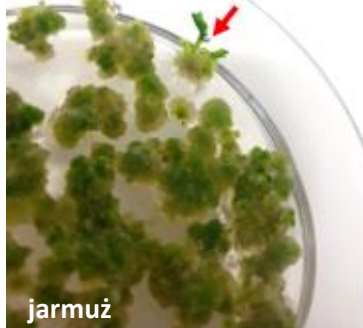
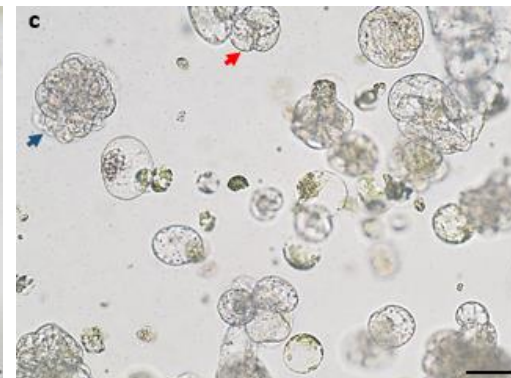
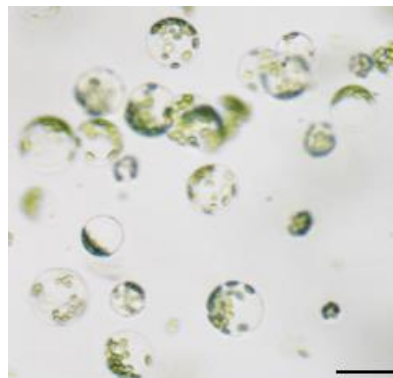
## Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów pasternaku



Procent tworzących się agregatów komórkowych w kulturach protoplastów

## Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów jarmużu, kapusty galicyjskiej, sałaty

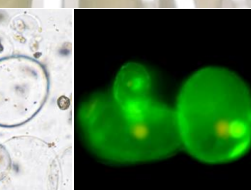
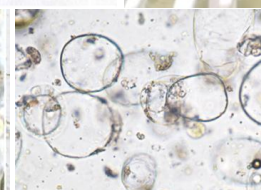
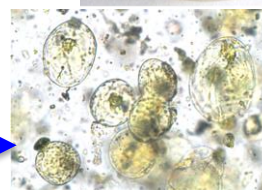
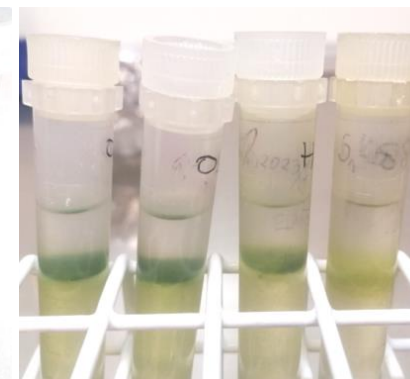
Czynnik	Odmiana	Agregaty komórkowe (% ± SE)	
		5. dzień	15. dzień kultury
<b>Obiekt</b>	<b>Odmiana</b>		
jarmuż	Kapral	57,7 ± 3,4 a	79,5 ± 1,7 a
kapusta galicyjska	Vates	59,1 ± 2,8 a	74,3 ± 1,6 b
sałata	Nochowska	58,9 ± 0,7 a	75,0 ± 0,6 a
	Mira	55,9 ± 0,8 b	75,3 ± 0,8 a
<b>sałata/pożywka</b>			
Lact 1		53,2 ± 0,7 b	71,3 ± 0,7 b
Lact 2		62,0 ± 0,6 a	79,1 ± 0,3 a



## Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów czosnku

Powt.	Żywołność protoplastów (%±SE)	Wydajność kultury (%)								
		10-ty dzień			20-ty dzień			30-ty dzień		
		a <sup>1</sup>	b	c	a	b	c	a	b	c
I	78,9±5,0	N	8,4	9,5	N	7,0	6,9	N		
II	81,4±6,3	brak			brak			brak		
III	86,7±3,4	brak			brak			brak		

<sup>1</sup>pożywki do kultury protoplastów: a – CPP, b – CPP+PSK, c – CPP+PSK+Pu; N – nieliczne podziały



Kultura protoplastów czosnku zwyczajnego





# Wnioski

## Temat badawczy 1 (Identyfikacja markerów różnicujących formy rodzicielskie)

1. Dane sekwencyjne uzyskane w toku analizy RNA-seq pasternaku cechowały się zadowalającymi parametrami jakościowymi i pozwoliły na wydajną identyfikację powtórzeń mikrosatelitarnych w obrębie rejonów transkrybowanych. Długość uzyskanych odczytów sekwencyjnych (nominalnie 300 nt) daje możliwość projektowania starterów do amplifikacji zidentyfikowanych mikrosatelit.
2. Genotypowanie pasternaku i pietruszki ujawniło 10 markerowych produktów amplifikacji, które będą przydatne do identyfikacji mieszańców somatycznych pomiędzy tymi gatunkami.
3. Zidentyfikowano 17 produktów amplifikacji, które różnicowały badane odmiany jarmużu i kapusty galicyjskiej. Produkty te znajdą zastosowanie do selekcji mieszańców somatycznych pomiędzy jarmużem i kapustą galicyjską.

## Temat badawczy 2 (Wyprowadzenie/utrzymanie kultur pędowych i embriogennej tkanki kalusowej warzyw amarylkowatych)

### *Kultury pędowe czosnku*

1. Spośród czterech testowanych obiektów czosnku 'Ornak' i 'Harnaś' charakteryzowały się wyższym współczynnikiem namnażania.
2. Zastosowane warunki krótko- jak i długoterminowej kultury pędowej pozwoliły na systematyczne utrzymywanie w kulturze liczby roślin wystarczającej do ewentualnej izolacji protoplastów.

### *Kultury kalusa czosnku i cebuli*

1. Wybrane pożywki indukcyjne stymulowały formowanie się kalusa zarówno z fragmentów piętek ząbków czosnku jak i zarodków zygotycznych cebuli.
2. Na pożywce K2 kalus namnażał się zdecydowanie szybciej niż na pożywce K1 i charakteryzował się preferowaną suchą strukturą i drobno-ziarnistą teksturą.

# Wnioski –c.d.

## Temat badawczy 3 (Analiza zdolności regeneracyjnej protoplastów form rodzicielskich)

### ***Pasternak***

1. Zastosowana procedura izolacji i oczyszczania protoplastów była wystarczająco wydajna dla wszystkich badanych obiektów pasternaku, a pożywka z fitosulfokina i putrescyną efektywnie stymulowała aktywność podziałową komórek.
2. Odmiana Półdługi biały, jako obiekt o najwyższej zdolności regeneracyjnej, powinna zostać wykorzystana do dalszych etapów badań nad wprowadzeniem cechy CMS z pasternaku do pietruszki.

### ***Jarmuż, kapusta galicyjska, sałata***

1. Zastosowane mieszaniny maceracyjne pozwoliły na otrzymanie wystarczającej liczby protoplastów z liści młodych roślin jarmużu, kapusty galicyjskiej oraz sałaty.
2. Kultury wszystkich obiektów podjęły aktywność podziałową a liczba tworzących się agregatów komórkowych była stosunkowo wysoka i wahała się od 74 do 79% w piętnastym dniu kultury.
3. Po miesiącu kultury protoplastów obserwowano kalus tworzący się z różną wydajnością u poszczególnych obiektów, który regenerował w pędy na zastosowanych pożywkach regeneracyjnych z różną wydajnością.
4. Otrzymane pędy były diploidalne, poliploidane i miksploidalne. Bardziej stabilne pod względem ploidalności okazały się regeneranty kapusty galicyjskiej i sałaty. U jarmużu występowały głównie rośliny tetraploidalne.

### ***Czosnek***

1. Zastosowana mieszanina maceracyjna uwolniła przeciętną liczbę protoplastów z grama liści kultury krótko-terminowej.
2. Mimo, że protoplasty charakteryzowały się wysoką żywotnością obserwowano nieliczne podziały komórkowe i tylko na pożywkach suplementowanych fitosulfokina lub fitosulfokina i putrescyną.
3. W kulturze 60-dniowej nie stwierdzono obecności wielokomórkowych agregatów.

---

*W roku 2021 (pierwszy rok realizacji projektu)  
nie planowano prezentacji doniesień konferencyjnych i publikacji*