

Materiały dydaktyczne z kursu „Nowe techniki biotechnologiczne w hodowli roślin”

Haploidy roślin uprawnych – część 1 (wykład i warsztaty laboratoryjne)

Prowadzący: dr inż. Sylwia Mikołajczyk

Kurs realizowany w ramach projektu „Najlepsi z natury! Podnoszenie kompetencji osób dorosłych przez UPP”, współfinansowanego ze środków Europejskiego Funduszu Społecznego Plus, w ramach programu Fundusze Europejskie dla Rozwoju Społecznego 2021-2027, na podstawie umowy nr FERS.01.05-IP.08-0469/23



Fundusze Europejskie
dla Rozwoju Społecznego



Rzeczpospolita
Polska

Dofinansowane przez
Unię Europejską



Wykład

Cel wykładu:

Celem wykładu jest przedstawienie rozwoju i wykorzystania nowoczesnych metod biotechnologicznych w hodowli roślin, ze szczególnym uwzględnieniem technologii podwojonych haploidów (DH) jako narzędzia do skracania cyklu hodowlanego. W trakcie wykładu zostanie omówiony rozwój metod stosowanych w hodowli od selekcji po współczesne techniki edycji genomu i predykcję genomową oraz hodowlę precyzyjną. Głównym zagadnieniem wykładu jest znaczenie linii podwojonych haploidów (linii DH) w skracaniu cykli hodowlanych, w porównaniu metodami konwencjonalnymi, w tym metodą pojedynczych nasion (single seed descent – SSD) i chowem wsobnym (inbredem). Podczas wykładu zostaną zaprezentowane metody haploidyzacji dla wybranych gatunków uprawnych (metody *in vitro* i *in vivo*). Celem wykładu jest wyjaśnienie mechanizmów haploidyzacji wpływających na efektywność procesu oraz genetycznych uwarunkowań embriogenezy somatycznej i androgenezy.

Zagadnienia:

1. Rozwój i wykorzystanie metod biotechnologicznych stosowanych w hodowli roślin.

Rozwój metod hodowli roślin i genetyki na przestrzeni dziejów, rozpoczyna się w momencie udomowienia roślin. Przełomem był rok 1865 i opisanie przez Grzegorza Mendla praw dziedziczenia, które stanowią podstawę genetyki, a w hodowli zasady te stosowane są do krzyżowania roślin w celu uzyskania pożądanych rekombinantów. Teoria totipotencji sformułowana w 1902 roku przez Gottlieba Haberlandta stanowiła wstęp do rozwoju technik kultur tkankowych. Kolejnym ważnym etapem było dopuszczenie do obrotu przez FDA pierwszej rośliny transgenicznej – pomidora w roku 1994. Z kolei rozwój technik biologii i genetyki molekularnej pozwolił na rozwój MAS – selekcji wspomaganej markerami molekularnymi. Aktualne osiągnięcia pozwalają na edycję genomu z wykorzystaniem NGT, a podejmowane prace zmierzają w kierunku hodowli precyzyjnej. Podsumowując, przejście od początkowych, intuicyjnych metod takich jak selekcja roślin i kontrolowane krzyżowanie do coraz bardziej zaawansowanych i precyzyjnych technik biotechnologicznych, pozwoli przyspieszyć hodowlę roślin i tworzenie nowych odmian roślin uprawnych przystosowanych do zmian klimatu.

2. Linie DH jako narzędzie skracania cyklu hodowlanego.

Linie podwojonych haploidów (DH) stanowią potencjalne narzędzie dla badań podstawowych oraz cenne materiały wyjściowe dla hodowli roślin. Metody otrzymywania haploidów roślin uprawnych

obejmują androgenezę (kultury pylników i izolowanych mikrospor), gynogenezę (kultury zalążków), eliminację chromosomów w krzyżowaniach oddalonych (dla zbóż często po zapyleniu pyłkiem kukurydzy). Efektywność haploidyzacji jest silnie uzależniona od genotypu i wymaga zindywidualizowanego podejścia nie tylko dla gatunku, ale często również dla odmian czy linii. Decydującą rolę w efektywności haploidyzacji odgrywa genotyp rośliny donorowej, który jest czynnikiem kluczowym wpływającym na efektywność tego procesu. Przewagą wykorzystania linii DH nad konwencjonalną hodowlą jest czas otrzymywania homozygot. W konwencjonalnej hodowli trwa to zależnie od gatunku nawet do pokolenia F8, natomiast technologia podwojonych haploidów skraca ten czas do około 4 lat. Ponadto w konwencjonalnej hodowli homozygotyczność jest osiągana stopniowo przez wiele pokoleń samopylenia/krzyżowania wstecznego, a w technologii podwojonych haploidów, 100% homozygotyczność jest osiągana w jednym cyklu wyprowadzania roślin. Technologia podwojonych haploidów upraszcza proces homozygotyzacji, szybko generując czyste linie jednak jej ograniczeniem jest wydajność otrzymywania linii DH.

3. Androgeneza w kulturach mikrospor jako przejaw totipotencji komórek roślinnych. Genetyczne uwarunkowania embriogenezy somatycznej i androgenezy.

Zdolności regeneracyjne w warunkach *in vitro* są kontrolowane genetycznie, a efektywność regeneracji jest zależna od genotypu. Geny podnoszące lub obniżające efektywność regeneracji w kulturach tkankowych roślin są rozproszone na wielu chromosomach co utrudnia skuteczną selekcję w programach hodowlanych. Embriogeneza somatyczna jest kontrolowana przez złożoną sieć genów czynników transkrypcyjnych (np. *BBM*, *LEC1*, *LEC2*, *FUS3*, *ABI3*, *AGL15*) oraz kinaz receptorowych (*SERKs*), które reagują na sygnały wewnętrzne i zewnętrzne (takie jak stresy i uszkodzenia tkanek i poziom hormonów). Negatywne regulatory, takie jak *PRC2* i *HAD6/19*, zapobiegają niekontrolowanej embriogenezie. Wzajemne oddziaływania między czynnikami transkrypcyjnymi, kinazami receptorowymi i negatywnymi regulatorami decydują o tym, czy komórki somatyczne wejdą na ścieżkę rozwoju zarodkowego. Somatyczna embriogeneza zachodzi w zwykłych komórkach somatycznych rośliny (np. z liścia, łodygi, korzenia). W odpowiednich warunkach prowadzenia kultury *in vitro* (np. w zrównoważonym stężeniu auksyn i cytokinin), komórki somatyczne tracą swoją specyfikację tkankową i dzielą się w nieuporządkowany sposób, tworząc nieodróżnioną masę komórek zwaną kalusem. W kalusie mogą wyodrębnić się obszary komórek o potencjale embriogenicznym, które są zdolne do rozwoju w zarodki somatyczne i tworzą struktury zarodkopodobne (embryo-like structure – ELS). Z kalusa embriogenicznego, rozwijają się struktury zarodkowe, a proces ten naśladuje naturalną embriogenezę zygotyczną. Końcowym efektem embriogenezy somatycznej jest zarodek somatyczny, który wygląda jak zarodek powstały z zapłodnionej komórki jajowej. Proces ten pozwala na wegetatywne rozmnażanie roślin. Proces embriogenezy somatycznej jest regulowany wielogenowo, a dodatkowo może być modyfikowany przez regulatory wzrostu i rozwoju roślin oraz sygnały stresowe. Kinazy serynowo-treoninowe *SERKs* (*Somatic Embryogenesis Receptor Kinases*) pełnią kluczową rolę w percepcji sygnałów zewnętrznych i wewnętrznych, inicjując szlak embriogenezy somatycznej. *SERKs* aktywują szlaki prowadzące do ekspresji genów regulatorowych: *BBM* (*Baby Boom*) – gen kodujący czynnik transkrypcyjny *AP2/ERF*, jest kluczowym aktywatorem embriogenezy somatycznej aktywowanym przez *SERKs*. *LEC1* (*LEAFY COTYLEDON 1*) to gen kodujący czynnik transkrypcyjny, niezbędny do prawidłowego rozwoju zarodków, aktywowany przez *BBM*. *LEC2* (*LEAFY COTYLEDON 2*) podobnie jak *LEC1* jest genem kodującym czynnik transkrypcyjny, aktywuje ekspresję genów *AGL15* i *FUS3*, a sam jest aktywowany przez *BBM*. *FUS3* (*FUSCA3*) to gen kodujący czynnik transkrypcyjny B3, który odgrywa rolę w prawidłowym rozwoju zarodków i ich dojrzewaniu.

4. Metody haploidyzacji roślin uprawnych *in vitro* i *in vivo* – wybrane przykłady.

Metody haploidyzacji wykorzystujące techniki *in vitro* to techniki laboratoryjne polegające na hodowli komórek lub tkanek roślinnych w kontrolowanych warunkach. Dzielą się na androgenezę (polegającą na hodowli *in vitro* całych pylników lub mikrospor), gynogenezę (hodowli *in vitro* podlegają zalążnie lub zalążki). W obu w/w metodach celem jest zmiana kierunku rozwoju gametofitycznego na sporofityczny. Druga grupa metod to metody *in vivo*, są to techniki, które zachodzą w żywym organizmie roślinnym, często wykorzystując naturalne procesy (np. partenogenezę lub apomiksję) lub indukcję tworzenia haploidalnych zarodków. W kukurydzy obejmują krzyżowanie wewnątrzgatunkowe, do których stosuje się specyficzne odmiany roślin (tzw. induktory haploidów - zapylacze), które po skrzyżowaniu z linią mateczną prowadzą do powstania potomstwa haploidalnego z chromosomami tylko jednego rodzica (zazwyczaj macierzystego) stąd często stosowane określenie „haploidy mateczne”. Inną metodą jest manipulacja genem CENH3 (kodującym centromeryczny wariant histonu H3), który odgrywa kluczową rolę w segregacji chromosomów i może prowadzić do eliminacji chromosomów jednego z rodziców po krzyżowaniu, co skutkuje powstaniem haploidów. Kolejną metodą jest krzyżowanie oddalone mające na celu eliminację chromosomów. W niektórych krzyżówkach między gatunkami lub rodzajami (np. pszenica lub pszenżyto i kukurydza), dochodzi do eliminacji chromosomów jednego z rodziców we wczesnych stadiach rozwoju zarodka, co prowadzi do powstania haploidalnej rośliny. Niezależnie od metody, która prowadzi do powstania haploidalnego zarodka lub siewki (oznaczonego jako 1n), kolejnym krokiem jest podwojenie jego genomu. Różnorodność podejść do uzyskiwania haploidów i linii DH w celu stworzenia stabilnych, homozygotycznych linii prezentuje złożoność tego procesu.

Literatura:

1. Bhowmik, P., & Bilichak, A. (2021). Advances in Gene Editing of Haploid Tissues in Crops. *Genes*, 12(9), 1410. <https://doi.org/10.3390/genes12091410>
2. Ibáñez, S., Carneros, E., Testillano, P. S., & Pérez-Pérez, J. M. (2020). Advances in Plant Regeneration: Shake, Rattle and Roll. *Plants*, 9(7), 897. <https://doi.org/10.3390/plants9070897>
3. Kalinowska, K., Chamas, S., Unkel, K. et al. (2019). State-of-the-art and novel developments of *in vivo* haploid technologies. *Theor Appl Genet* 132, 593–605. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3261-9>
4. Mabuza, L. M., Mchunu, N. P., Crampton, B. G., & Swanevelder, D. Z. H. (2023). Accelerated Breeding for *Helianthus annuus* (Sunflower) through Doubled Haploidy: An Insight on Past and Future Prospects in the Era of Genome Editing. *Plants*, 12(3), 485. <https://doi.org/10.3390/plants12030485>
5. Pasala R, Chennamsetti M, Patil B, Kadirvel P, Geethanjali S, Nagaram S, et al. (2024). Revolutionizing Crop Production: The Imperative of Speed Breeding Technology in Modern Crop Improvement. *Crop Breed Genet Genom.* 6(2): e240003. <https://doi.org/10.20900/cbgg20240003>
6. Tyankova, N., Zagorska, N.A. (2008). Factors Affecting *In Vitro* Androgenesis in Cereals. *International Journal of Plant Developmental Biology* 2 (1), 59-78.
7. Van Vu, T., Das, S., Hensel, G. et al. (2022). Genome editing and beyond: what does it mean for the future of plant breeding?. *Planta* 255, 130. <https://doi.org/10.1007/s00425-022-03906-2>
8. Yan, T., Hou, Q., Wei, X. et al. (2023). Promoting genotype-independent plant transformation by manipulating developmental regulatory genes and/or using nanoparticles. *Plant Cell Rep* 42, 1395–1417. <https://doi.org/10.1007/s00299-023-03037-2>

Warsztaty laboratoryjne

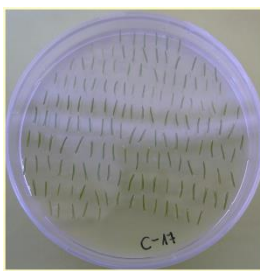
Plan warsztatów:

1. Wprowadzenie – zasady BHP i dobra praktyka laboratoryjna. Organizacja laboratorium kultur tkankowych.
2. Androgeneza w kulturach pylników zbóż na przykładzie żyta – główne zagadnienia:
 - faza rozwojowa roślin i stadium rozwojowe mikrospor optymalne do indukowania androgenezy;
 - stres abiotyczny jako niezbędny etap zmieniający kierunek rozwoju mikrospor z gametofitycznego na sporofityczny;
 - pożywki indukujące androgenezę i ich modyfikacje;
 - genotypowa reakcja żyta na androgenezę.

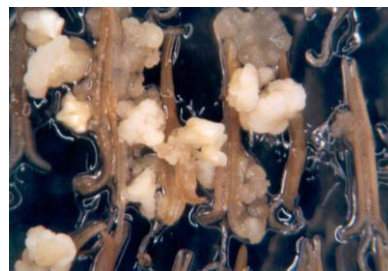
Etapy androgenezy w kulturach pylników żyta



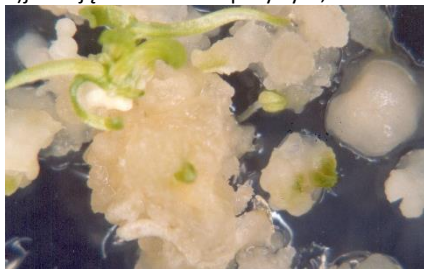
a) jednojądrowe mikrospory żyta;



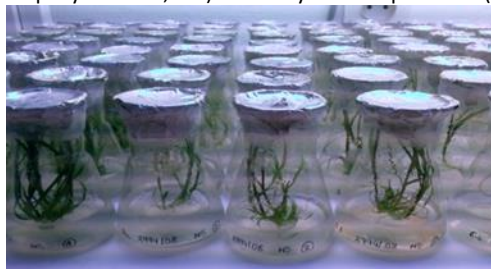
b) pylniki na pożywce C17;



c) struktury zarodkopodobne (ELS)



d) regeneracja pędów z ELS;



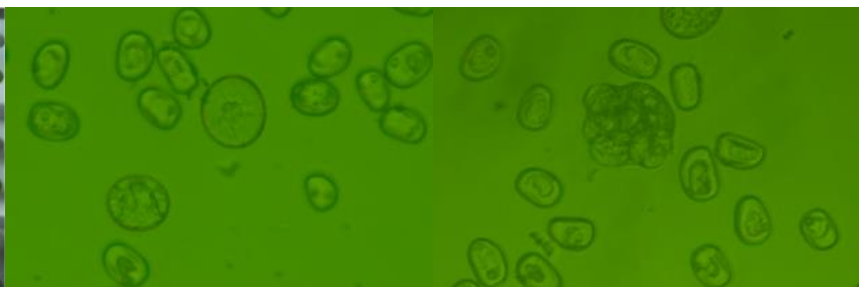
e) rośliny żyta na pożywce regeneracyjnej

3. Kultury izolowanych mikrospor jako jedna z technik androgenezy:
 - określenie fazy rozwojowej roślin donorowych i mikrospor;
 - mechaniczne metody izolacji mikrospor (manualna, blender);
 - czynniki wpływające na wydajność procesu izolacji mikrospor;
 - przyżyciowa ocena prowadzonych kultur w mikroskopie odwróconym.

Początkowe etapy androgenezy w kulturach mikrospor żyta



a) mikrospory w trakcie izolacji;



b) cytoplazma gwiaździsta w mikrosporach

c) struktury wielokomórkowe

4. Problemy związane z prowadzeniem kultur *in vitro* pylników i mikrospor żyta oraz propozycje rozwiązań:
 - zamieranie eksplantanów;
 - zakażenia mikrobiologiczne;
 - problemy z indukcją androgenezy i regeneracją roślin;
 - płodność roślin DH.
5. Dyskusja i podsumowanie warsztatów.