

RZECZPOSPOLITA
POLSKA



Urząd Patentowy
Rzeczypospolitej Polskiej

(12) **OPIS PATENTOWY** (19) **PL** (11) **235096**

(13) **B1**

(21) Numer zgłoszenia: **424149**

(51) Int.Cl.
A01H 4/00 (2006.01)

(22) Data zgłoszenia: **31.12.2017**

(54) **Sposób wytwarzania androgenetycznych roślin marchwi w kulturach pylnikowych**

(43) Zgłoszenie ogłoszono:
01.07.2019 BUP 14/19

(45) O udzieleniu patentu ogłoszono:
18.05.2020 WUP 05/20

(73) Uprawniony z patentu:
INSTYTUT OGRODNICTWA, Skierniewice, PL

(72) Twórca(y) wynalazku:
KRYSTYNA GÓRECKA, Skierniewice, PL
RYSZARD GÓRECKI, Skierniewice, PL
WALDEMAR KISZCZAK, Skierniewice, PL
DOROTA KRZYŻANOWSKA, Warszawa, PL
URSZULA KOWALSKA, Skierniewice, PL

(74) Pełnomocnik:
rzecz. pat. Jarosław Danelski

PL 235096 B1

Opis wynalazku

Przedmiotem wynalazku jest sposób wytwarzania androgenetycznych roślin marchwi w kulturach pylnikowych.

Produkcja roślinna na świecie zdominowana jest przez odmiany, u których występuje efekt heterozji pozwalający uzyskać wyższy plon o lepszej jakości. Hodowla tych odmian metodami tradycyjnymi trwa od 6 do 8 lat. Zastosowanie kultur pylnikowych czy kultur izolowanych mikrospor skraca etap homozygotyzacji komponentów rodzicielskich do około 1–2 lat, w ciągu którego uzyskuje się nową ustabilizowaną genetycznie populację homozygotycznych genotypów w jednym pokoleniu.

Androgeneza jest procesem rozwoju rośliny z gametofitu męskiego. U podstaw technik kultur pylnikowych oraz kultur izolowanych mikrospor leży teoria totipotencji komórki Virchowa z roku 1858 (Vasil I. K. 2008), która zakładała, że każda komórka roślinna ma zdolność do różnicowania w tkanki, organy i odtwarzania całego organizmu. W latach 1964 i 1966 Guha i Maheshwari jako pierwsi na świecie otrzymali zarodki bielunia indyjskiego (*Datura innoxia* L.) z mikrospor w kulturach pylnikowych i zregenerowali z tych zarodków rośliny (Guha-Mukherjee 1999). Ogólnie u roślin wyższych proces taki można indukować przez poddanie pylników lub izolowanych mikrospor kulturze na sztucznej pożywce *in vitro*. Normalnie mikrospory rozwijają się w ziarna pyłku, ale w wyniku różnego rodzaju bodźców zmieniają drogę rozwojową i powstaje zarodek, a potem haploidalna roślina (Heberle-Bors i Reinert 1979, Wang i in. 2000, Shariatpanahi i in. 2006). Zastosowanie technik kultur pylnikowych oraz kultur izolowanych mikrospor pozwala na uzyskanie nowej zmienności genetycznej. W hodowli heterozyznej prowadzi się selekcje na dużej populacji materiału roślinnego przez kilka lat. W rozwiązaniu tego problemu pomaga zastosowanie metod biotechnologicznych, ponieważ cechy recesywne ujawniają się już na etapie regeneracji *in vitro*. Pozwala to na szybką i skuteczną selekcję, a co za tym idzie użycie w hodowli ograniczonej ilości wartościowego materiału roślinnego.

Przez podwojenie liczby chromosomów w haploidach otrzymuje się podwojone haploidy. U podwojonych haploidów wszystkie loci są homozygotyczne, a cechy roślin są wyraźniejsze.

Tworzenie diploidalnych linii podwojonych haploidów daje możliwości ich wykorzystania w hodowli heterozyznej, gdzie wymagane są komponenty rodzicielskie, których skrzyżowanie zapewnia odpowiednio wysoki poziom heterozji w pokoleniu F₁. Linie podwojonych haploidów mają szerokie zastosowania zarówno w badaniach podstawowych, jak i programach hodowlanych. Stosuje się je przy mapowaniu genów, co ma szczególne znaczenie dla identyfikacji genów warunkujących cechy jakościowe i ilościowe, analizach genetycznych, krzyżowaniach oddalonych mających za zadanie wyprowadzenie nowych cech, indukowaniu mutacji, transformacji, somatycznej hybrydyzacji i produkcji sztucznych nasion.

Znany jest sposób regeneracji roślin marchwi z zarodków, który stosowali Andersen S. B., Christiansen I., Farestveit B., opisany w publikacji pt. „Carrot (*Daucus carota* L.): In Vitro Production of Haploids and Field Trials, [w:] Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 12, Haploids in Crop Improvement I, Springer-Verlag Berlin Heidelberg 1990, s. 393–402. Korzenie dwóch swobodnie zapylnych odmian marchwi (Feonia Nobo i Nantes Topschoor), zebrane w polu w październiku, były przechowywane w temperaturze 2–4°C przez zimę i posadzone w okresie od połowy kwietnia do połowy maja w rowki (odstęp między rowkami 50 cm, odstęp między roślinami w rowku 20 cm). Podczas wzrostu boczne pędy były usuwane, aby otrzymać z jednego korzenia tylko jeden dobrze rozwinięty baldach. Baldachy były ścinane z 25-centymetrowym pędem w czerwcu i trzymane przez okres od 2 do 4 dni w temperaturze 5–7°C, przy czym obcięty koniec zanurzony był w wodzie. Baldachy z dobrze rozwiniętym pyłkiem w odpowiednich stadiach rozwoju były wybierane do kultur pylnikowych. Zewnętrzne baldaszki z każdego baldacha głównego były sterylizowane przez 8 minut w 0,1% roztworze HgCl₂ i płukane 3 razy w jałowej wodzie. Zewnętrzne, najlepiej rozwinięte pąki kwiatowe z każdego głównego baldacha, były umieszczane w mieszaninie kwasu octowego lodowatego i alkoholu (1 : 3) do późniejszego określenia dokładnego stadium rozwoju pyłku. Zalążnia pąka kwiatowego była przytrzymywana pensetą, a pylniki były stopniowo wyjmowane pod binokulem przy pomocy igły preparacyjnej, zaś nitki pylnikowe zostawały w pąku. Pożywką do kultur pylnikowych była pożywka B5 (wg Gamborga i in. 1968 r.), zmodyfikowana i zastosowana do kultur pylnikowych rzepaku przez Kellera i Armstronga (1978 r.) wzbogacona o 10% sacharozy, 500 mg/l glutaminy, 100 mg/l seryny, 0,1 mg/l NAA, 0,1 mg/l 2,4-D i 0,8% Difc Bacto Agar. Bloczki pożywki o wymiarach 1,5 × 1,5 × 0,5 cm były cięte z płytek Petriego z zestalonej pożywki. Na każdym bloczku pożywki uprawiano od 30 do 50 pylników jednorazowo. Szalki Petriego z bloczkami pożywki i pylnikami zamykano folią polietylenową. Kultury były inkubowane w temperaturze 27°C w ciemności przez 2 pierwsze tygodnie, a następnie w tej samej temperaturze przez cały pozostały

okres wzrostu w świetle białym ciągłym o wartości 15 W/m^2 . Co 12–14 dni kultury były przenoszone na świeże pożywki. Dla ułatwienia pasażu pylniki były przekładane na krążki z bibuły filtracyjnej. W czasie pierwszego pasażu (przełożenia) eliminowano pylniki z zakażeniami bakteryjnymi. Embriony lub kalus, pojawiające się na pylnikach, po 2–4 miesiącach były przenoszone na pożywkę B5 bez substancji wzrostowych z 2% sacharozą w celu uzyskania regeneracji. Zarodki kiełkowały bezpośrednio w pojedyncze rośliny w ciągu kilku dni. Zregenerowane rośliny były utrzymywane na bawełnianych korkach w szklanych probówkach z płynnym podłożem, takim samym jak w przypadku regeneracji, aż do osiągnięcia 4–6 liści. Rośliny w dobrej kondycji przenoszono do torfu i umieszczano w zaciemnionej szklarni z wysoką wilgotnością, w której przebywały przez 2–4 tygodnie. Wyhodowane korzenie przed liczeniem chromosomów poddawano przez 22 godziny kąpieli w wodzie z lodem oraz w roztworze kwasu octowego i alkoholu.

Znany jest z polskiego opisu patentowego nr 208426 Sposób regeneracji roślin marchwi z zarodków androgenetycznych, który charakteryzuje się tym, że zarodki marchwi uzyskuje się w kulturach pylnikowych prowadzonych w ciemności na znanej pożywce w kolbach zamkniętych folią aluminiową z podkładem z trójwarstwowej ligniny, a następnie po pojawieniu się na pylnikach zarodków przenosi się kolby z pylnikami na światło ciągłe i utrzymuje stałą temperaturę 27°C i oświetlenie o wartości $30 \mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$, a następnie po zazielenieniu się zarodków przenosi się je do probówek na pożywki do regeneracji, przy czym w jednej probówce umieszcza się jeden zarodek, probówkę zamyka folią aluminiową z podkładem z trójwarstwowej ligniny i umieszcza w pokoju wzrostowym, w którym utrzymuje się stałą temperaturę 20°C , długość dnia 16 godzin, długość nocy 8 godzin oraz zapewnia dla warunków dziennych oświetlenie o wartości $30 \mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$, a następnie po pojawieniu się na zarodkach roślinek przenosi się je do słoików zawierających pożywkę do regeneracji, zamyka przykrywkami autoklawowalnymi, przy czym słoiki nadal znajdują się w pokoju wzrostowym, w którym utrzymuje się stałą temperaturę 20°C , długość dnia 16 godzin, długość nocy 8 godzin oraz zapewnia dla warunków dziennych oświetlenie o wartości $30 \mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$. Do regeneracji roślin marchwi z zarodków androgenetycznych stosuje się pożywki do regeneracji, korzystnie B5-2 z 20 g/l sacharozy i bez hormonów; MS-1 z 20 g/l sacharozy i 0,5 g/l węgla aktywnego; MS-2 z 20 g/l sacharozy, 1 mg/l BA i 0,001 mg/l NAA; MS-3 z 20 g/l sacharozy bez regulatorów wzrostu, przy czym wszystkie pożywki została się przy pomocy agaru w ilości 6,5 g/l oraz ustala współczynnik pH o wartości 5,6.

Sposób wytwarzania androgenetycznych roślin marchwi w kulturach pylnikowych według wynalazku charakteryzuje się tym, że do indukcji zarodków androgenetycznych roślin marchwi stosuje się pożywkę B5 (Gamborg i in. 1968) bez $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ i z dodatkiem CaSiO_3 w ilości 1180 mg/l, do regeneracji roślin marchwi uzyskanych z zarodków androgenetycznych stosuje się pożywkę regeneracyjną B5 (Gamborg i in. 1968) bez $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ i z dodatkiem CaSiO_3 w ilości 1180 mg/l, bez hormonów i aminokwasów, z obniżoną do 20 g/l zawartością sacharozy, zaś do aklimatyzacji roślin marchwi do warunków *ex vitro* stosuje się podłoże będące mieszaniną torfu i piasku w stosunku 1 : 3, wzbogacone azofoską w ilości $1,2 \text{ kg/m}^3$, dodatkiem CaCO_3 w ilości 8 kg/m^3 i CaSiO_3 w ilości 2,2 g/l.

Sposób wytwarzania androgenetycznych roślin marchwi w kulturach pylnikowych jest przedstawiony w przykładzie wykonania.

P r z y k ł a d wykonania I

Pylniki marchwi odmiany Kazan umieszczono na 30 ml pożywki indukcyjnej B5 (Gamborg i in. 1968) o zmodyfikowanym składzie: bez $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ i z dodatkiem CaSiO_3 w ilości 1180 mg/l. Pożywka została zestalona agarą w ilości 5,1 g/l o pH 5,8. Pylniki na pożywce umieszczono w kolbach o pojemności 100 ml w 8 rzędach odśrodkowych. W każdym rzędzie umieszczono po 5 pylników, co dało 40 pylników w jednej kolbie. Kolby po zamknięciu kapslem wykonanym z folii aluminiowej wyścielanej materiałem chłonnym umieszczono w cieplarni w temperaturze $+27^\circ\text{C}$ i w ciemności. Począwszy od 3 tygodnia od założenia kultur prowadzono obserwacje. Po pojawieniu się zarodków kolby wystawiono na światło ciągłe o natężeniu $30 \mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ utrzymując tę samą temperaturę. Po zazielenieniu zarodki przełożono na pożywkę regeneracyjną B5 o zmodyfikowanym składzie: bez $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ i z dodatkiem CaSiO_3 w ilości 1180 mg/l oraz bez hormonów i aminokwasów i z obniżoną do 20 g/l zawartością sacharozy. Regenerację przeprowadzono w fitotronie w temperaturze $+20^\circ\text{C}$, period 16 h światła o natężeniu $30 \mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$. Po zregenerowaniu roślin z zarodków poddano je procesowi aklimatyzacji do warunków *ex vitro*. Duże, kompletne rośliny o prawidłowym pokroju, z dobrze wykształconymi liśćmi i korzeniami, po wyjęciu ze szkła wysadzono do podłoża będącego mieszaniną torfu i piasku w stosunku 1 : 3, które wzbogacono azofoską w ilości $1,2 \text{ kg/m}^3$ oraz dodatkiem CaCO_3 w ilości 8 kg/m^3 i CaSiO_3 w ilości 2,2 g/l. Wielodoniczki z roślinami umieszczono na macie podsiąkowej w warunkach

wilgotności podwyższonej do około 100% i w temperaturze +20°C w tuneliku foliowym w komorze wzrostowej dla roślin, po czym tunelik szczelnie zamknięto. Folia musiała być pokryta drobnymi kropelkami wody skraplającej się na niej. Natężenie światła wynosiło 30 $\mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$ przez 16 godzin. Po 3–4 tygodniach rozpoczęto wietrzenie tunelika w celu obniżenia wilgotności do poziomu panującego w komorze wzrostowej lub szklarni.

Tabela 1
Skład pożywki B5

makroelementy	mg/l pożywki	mikroelementy	mg/l pożywki
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134	KJ	0,75
KNO_3	2500	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	150	H_3BO_3	3
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	150	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	250	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
$\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	750	CuSO_4	0,025
		$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
		FeNaDTA	36,70

Tabela 2
Skład zmodyfikowanej pożywki B5-Si

makroelementy	mg/l pożywki	mikroelementy	mg/l pożywki
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	134	KJ	0,75
KNO_3	2500	$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	10
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	150	H_3BO_3	3
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	150	$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	250	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,25
CaSiO_3	1180	CuSO_4	0,025
		$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,025
		FeNaDTA	36,70

W doświadczeniu wykazano, że pożywka indukcyjna B5-Si bez $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, a wzbogacona CaSiO_3 , w istotnym stopniu podnosi efektywność etapu indukcji androgenetycznych zarodków marchwi oraz etapu regeneracji roślin z zarodków.

Tabela 3
Efektywność etapu indukcji androgenetycznych zarodków marchwi

pożywka	liczba		
	wyłożonych pylników	uzyskanych zarodków	zarodków/100 pylników
B5	239	21	8,8
B5-Si	192	66	34,4

Tabela 4
Efektywność etapu regeneracji androgenetycznych roślin marchwi w przeliczeniu na 1 zarodek wyłożony do regeneracji

pożywka	liczba rozet		
	zielone zątki	bez korzeni	z korzeniami (prawidłowe rośliny)
B5	2,9	0,4	3,7
B5-Si	4,4	0,8	4,9

Stwierdzono także, że dodanie CaSiO_3 do podłoża, w którym rośliny przechodzą aklimatyzację, powoduje zwiększenie liczby roślin zaadaptowanych do warunków *ex vitro*.

Zastrzeżenie patentowe

1. Sposób wytwarzania androgenetycznych roślin marchwi w kulturach pylnikowych, w którym zarodki marchwi uzyskuje się w kulturach pylnikowych prowadzonych w ciemności na znanej pożywce w kolbach zamkniętych folią aluminiową z podkładem chłonnym, a następnie po pojawieniu się na pylnikach zarodków przenosi się kolby z pylnikami na światło ciągłe, utrzymuje stałą temperaturę 27°C i oświetlenie o wartości 30 $\mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$, a następnie po zazielenieniu się zarodków przenosi się je na pożywkę do regeneracji, utrzymuje stałą temperaturę 20°C, długość dnia 16 godzin oraz oświetlenie o wartości 30 $\mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$, a następnie po pojawieniu się na zarodkach roślinek przenosi się je na pożywkę do regeneracji, utrzymuje stałą temperaturę 20°C, długość dnia 16 godzin oraz oświetlenie o wartości 30 $\mu\text{moli} \cdot \text{m}^{-2}\text{sec}^{-1}$, **znamienny tym**, że do indukcji zarodków androgenetycznych roślin marchwi stosuje się pożywkę B5 (Gamborg i in. 1968) bez $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ i z dodatkiem CaSiO_3 w ilości 1180 mg/l, do regeneracji roślin marchwi uzyskanych z zarodków androgenetycznych stosuje się pożywkę regeneracyjną B5 (Gamborg i in. 1968) bez $\text{CaCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ i z dodatkiem CaSiO_3 w ilości 1180 mg/l, bez hormonów i aminokwasów, z obniżoną do 20 g/l zawartością sacharozy, zaś do aklimatyzacji roślin marchwi do warunków *ex vitro* stosuje się podłoże będące mieszaniną torfu i piasku w stosunku 1 : 3, wzbogacone azofoską w ilości 1,2 kg/m³, dodatkiem CaCO_3 w ilości 8 kg/m³ i CaSiO_3 w ilości 2,2 g/l.