



Porównanie efektywności dwóch metod izolacji protoplastów z liści borówki wysokiej (*Vaccinium corymbosum* L.) i maliny właściwej (*Rubus idaeus* L.)

WSTĘP

Borówka wysoka (*Vaccinium corymbosum* L.) i malina właściwa (*Rubus idaeus* L.) należą do roślin o dużym znaczeniu gospodarczym i z tego względu są one uprawiane w celach komercyjnych. Istotnym elementem hodowli twórczej obu tych gatunków jest otrzymanie nowych odmian o pożądanych cechach, m.in. podniesionej odporności na choroby oraz wysokiej jakości owoców. Zastosowanie metod inżynierii genetycznej i nowych technik genomowych (NGT) pozwala na uzyskanie genotypów o określonych cechach, które zostaną następnie wykorzystane w programach hodowlanych realizowanych w Instytucie Ogrodnictwa – PIB w Skierniewicach. Izolacja protoplastów jest kluczowym elementem bezwektorowej edycji genomu, dlatego celem niniejszych badań było opracowanie efektywnej metody izolacji protoplastów z liści borówki oraz maliny pochodzących z ustabilizowanych kultur *in vitro*.

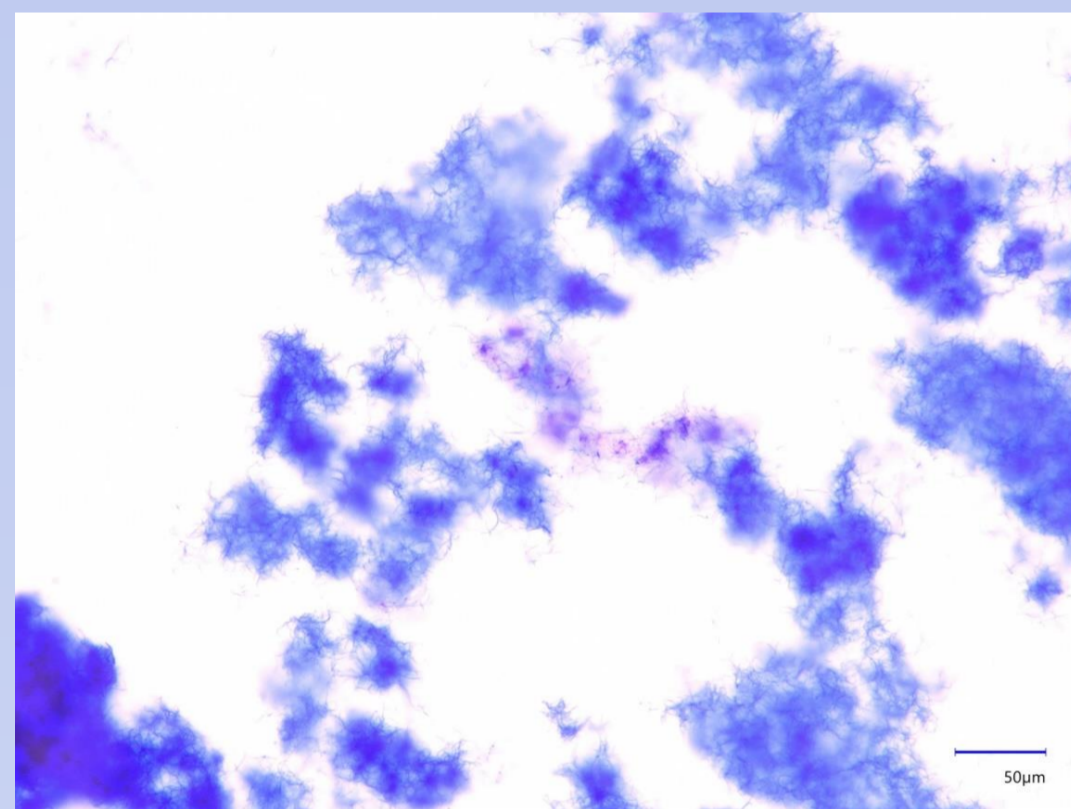
WYNIKI

Po przeprowadzeniu pierwszej izolacji protoplastów z zastosowaniem dwóch enzymów trawiących ścianę komórkową otrzymano częściowe uwolnienie protoplastów w przypadku badanych genotypów borówki. Zaobserwowano nieliczne zgrupowania wyizolowanych, żywotnych protoplastów (Fot. 1), które znajdowały się w obrębie większych skupisk niestrawionych tkanek (Fot. 2). W przypadku maliny zanotowano również niewielkie skupiska żywotnych protoplastów po przeprowadzeniu procesu izolacji (Fot. 3) w obrębie niestrawionych tkanek materiału roślinnego (Fot. 4). W przypadku obu gatunków ściana komórkowa nie została do końca strawiona w badanej mieszance enzymów, z tego względu w następnej izolacji protoplastów zastosowano trzy enzymy w mieszance trawiącej ścianę komórkową. Po przeprowadzeniu drugiej izolacji protoplastów w przypadku borówki zanotowano nieznacznie większą liczbę żywotnych protoplastów po przeprowadzeniu izolacji (Fot. 5) z mniejszą zawartością resztek niestrawionej tkanki (Fot. 6), co może świadczyć o skuteczniejszym działaniu mieszanki enzymatycznej składającej się z trzech enzymów trawiących ścianę komórkową. Znacznie lepsze wyniki po izolacji protoplastów otrzymano u badanych genotypów maliny. Zaobserwowano bardzo liczne skupiska wyizolowanych protoplastów, jednak nadal zanotowano ślady niestrawionych tkanek (Fot. 7, Fot. 8).

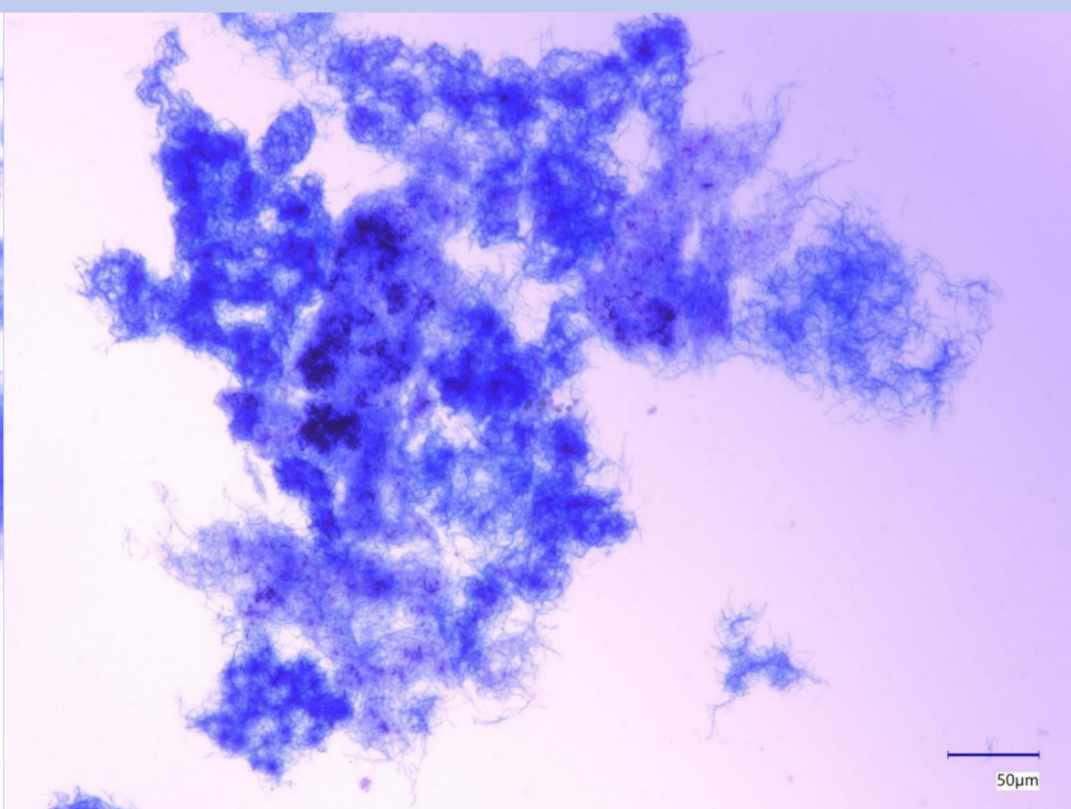
MATERIAŁY I METODY

W procesie izolacji protoplastów wykorzystano liście 2-tygodniowych roślin borówki oraz maliny hodowanych w warunkach *in vitro*. W pierwszej izolacji protoplastów liście badanych roślin borówki oraz maliny inkubowano w roztworze enzymatycznym o następującym składzie: 2% Cellulase Onozuka R10, 0,5% Macerozyme R-10, 0,6 M Mannitol, 20 mM bufor MES oraz 5 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$. W drugiej przeprowadzonej izolacji wykorzystano roztwór enzymatyczny zawierający następujące składniki: 0,5% Driselase™ from Basidiomycetes sp., 0,25% Cellulase RS, 0,025% Pectolyase Y-23, 0,6 M Mannitol, 20 mM bufor MES oraz 5 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$. W obu przypadkach rozdrobioną tkankę roślinną inkubowano w roztworze enzymatycznym przez noc na wytrząsarce (50 obr./min.) w ciemności w temperaturze 26°C. Po oczyszczeniu protoplastów ustalono ich gęstość na poziomie 8×10^5 protoplastów na 1 ml pożywki płynnej.

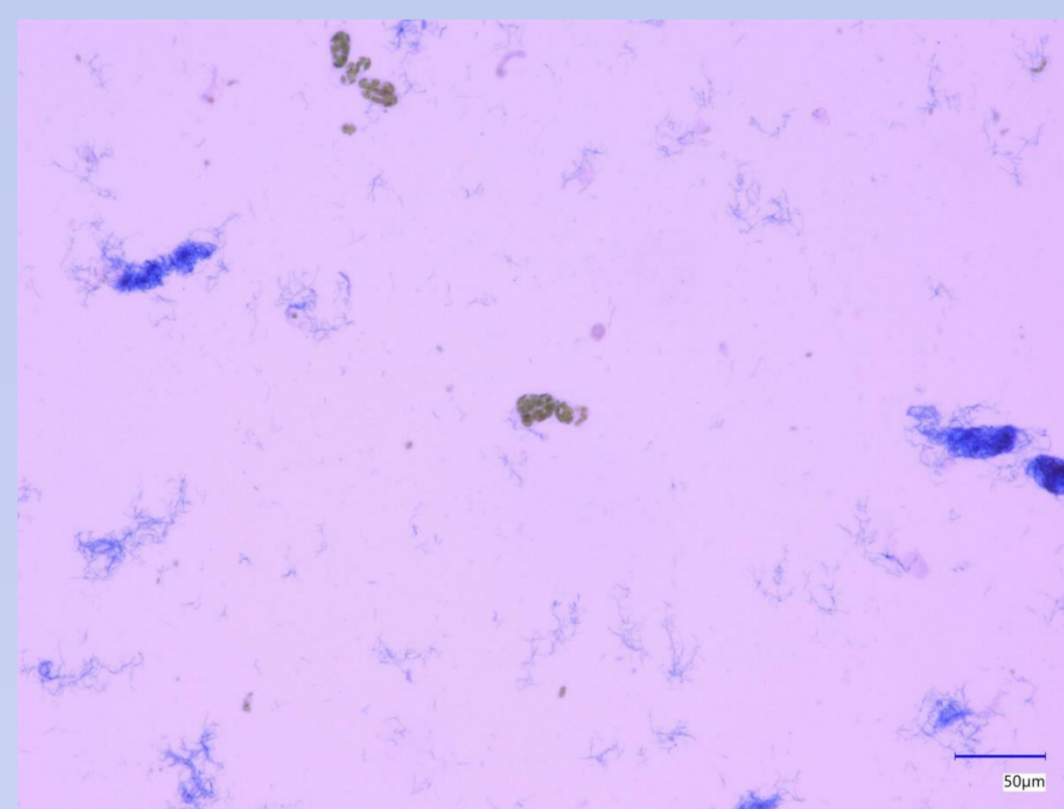
I. Izolacja protoplastów z zastosowaniem dwóch enzymów trawiących ścianę komórkową.



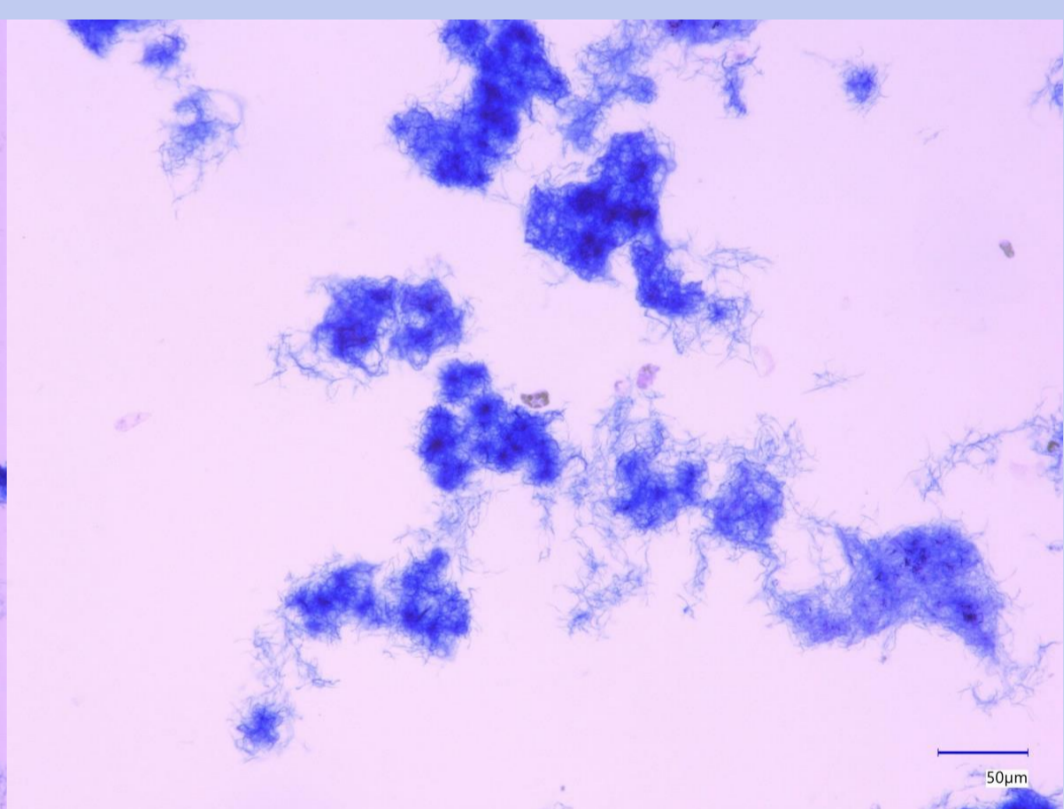
Fot.1 - Zgrupowanie wyizolowanych protoplastów borówki



Fot.2 – Fragmenty niestrawionych tkanek po izolacji protoplastów borówki

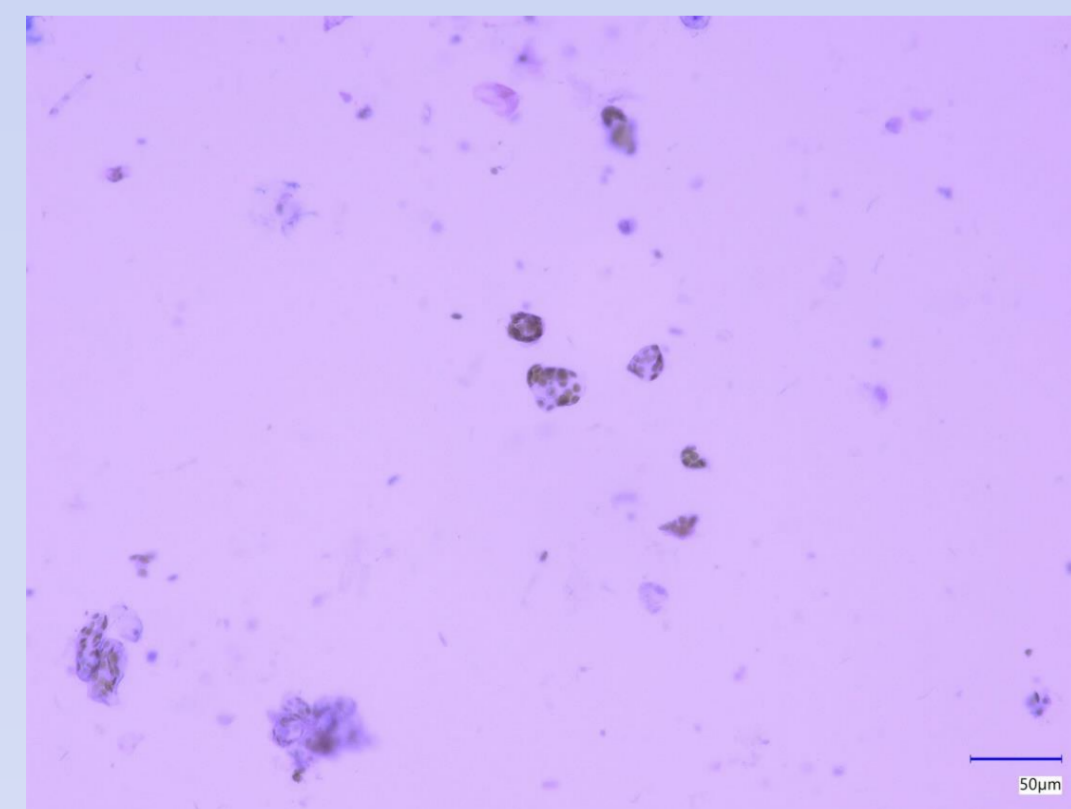


Fot.3 – Wyizolowane protoplasty maliny

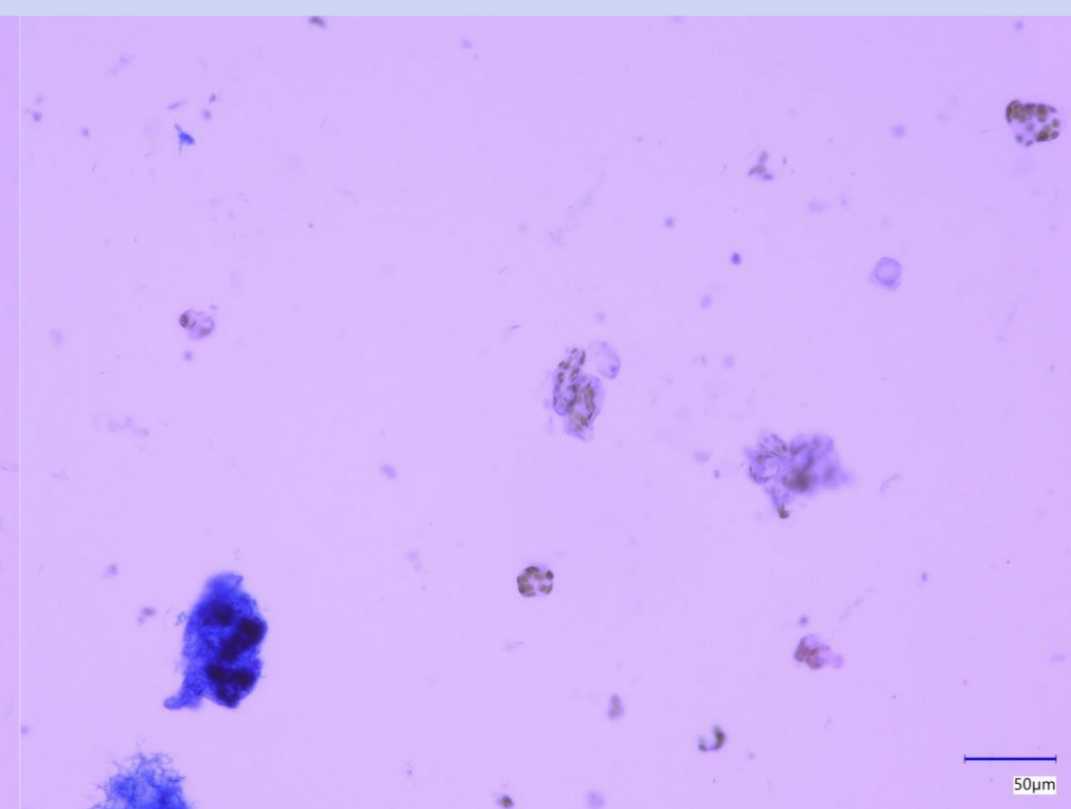


Fot.4 – Fragmenty niestrawionych tkanek po izolacji protoplastów maliny

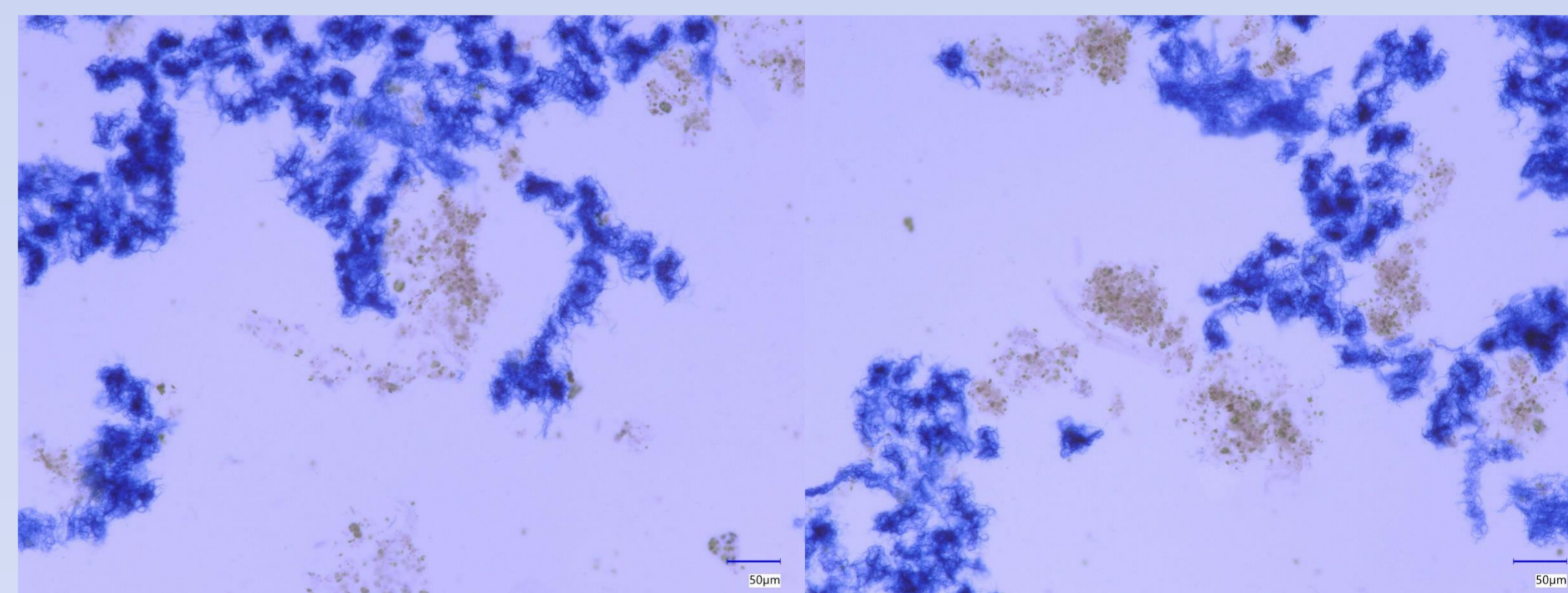
II. Izolacja protoplastów z zastosowaniem trzech enzymów trawiących ścianę komórkową.



Fot.5 – Wyizolowane protoplasty borówki



Fot.6 – Fragmenty niestrawionych tkanek po izolacji w obrębie protoplastów borówki



Fot.7,8 – Liczne skupiska wyizolowanych protoplastów maliny w obrębie niestrawionych tkanek po przeprowadzeniu procesu izolacji

PODSUMOWANIE

Po przeprowadzeniu pierwszej izolacji protoplastów z zastosowaniem dwóch enzymów trawiących ścianę komórkową otrzymano częściowe uwolnienie protoplastów w przypadku obu badanych gatunków. Po przeprowadzeniu drugiej próby w przypadku obu genotypów borówki zanotowano nieznacznie większą liczbę żywotnych protoplastów, natomiast u badanych genotypów maliny zaobserwowano bardzo liczne skupiska wyizolowanych protoplastów. W przypadku obu przeprowadzonych izolacji protoplastów z liści borówki wysokiej oraz maliny właściwej ściana komórkowa nie została do końca strawiona w badanej mieszance enzymów, z tego względu w następnej izolacji protoplastów zostaną przetestowane inne enzymy trawiące ścianę komórkową.

Badania realizowane w ramach Zadania 3.18 „Opracowanie systemu edycji genomu techniką CRISPR/Cas oraz optymalizacja metod regeneracji i transformacji wybranych gatunków roślin jagodowych.”. Kierownik zadania: dr Danuta Wójcik.