



Somatyczna międzygatunkowa hybrydyzacja w rodzaju *Gentiana*

Fiuk A., Tomiczak K., Ładyżyński M., Mięka A., Rybczyński J. J.

Ogród Botaniczny - CZRB PAN, ul. Prawdziwka 2, 02-973 Warszawa

WSTĘP

Duże znaczenie goryczek w farmacji oraz ich wykorzystanie w przemyśle roślin ozdobnych sprawiło, że rodzaj ten stał się atrakcyjnym obiektem hodowlanym. Zastosowanie technik fuzji protoplastów stwarza możliwości uzyskania nowych mieszańców gatunkowych w obrębie *Gentiana*. **Celem** badań było opracowanie warunków elektrofuzji oraz fuzji chemicznej, pozwalających na otrzymywanie heterokarionów z wysoką wydajnością.

MATERIAŁ I METODY

Protoplasty izolowano z embriogenicznych zawiesin komórkowych *G. kurroo* Royle i *G. cruciata* L. Zielone protoplasty tkanki mezofilowej liści (zwane dalej mezofilowymi) pozyskiwano z aksenicznych kultur *G. cruciata* L., *G. pannonica* Scop. i *G. tibetica* King. Do izolacji protoplastów zawiesinowych zastosowano następującą mieszaninę enzymów: 1.5% Cellulase RS, 1.5% Macerozyme R10, 1.5% Driselase, 0.25% Hemicellulase, 0.04% Pectolyase Y-23 oraz 0.976% MES i 9% mannitol (pH 5.8). Mezofilowe protoplasty izolowano używając: 1.0% Cellulase i 0.5% Macerozyme R10. Protoplasty przemywano roztworem CPW z 9% mannitolem, natomiast do odplukania enzymów z protoplastów *G. tibetica* zastosowano roztwór: 1.0 mM CaCl₂ x 5H₂O + 5.0 mM MES + 9% mannitol, pH 5.8.



Elektrofuzja. Protoplasty zawieszano w buforze fuzyjnym (1.0 mM CaCl₂ x 5H₂O + 5.0 mM MES + 9% mannitol, pH 7.2) ustalając ich gęstość na poziomie 1 x 10⁵. Komponenty fuzyjnego mieszanego w stosunku 1:1. Elektrofuzję przeprowadzano za pomocą generatora ECM 2001 (BTX) (**Fot. 1A**) w komorach o pojemności 0.6 ml (**Fot. 1B**). Badano wpływ napięcia prądu zmiennego (AC) w zakresie 10 - 30 V/cm i stałego (DC) w zakresie 300 - 1000 V/cm na częstotliwość powstawania heterokarionów bezpośrednio i po 24 h od fuzji. Żywność określano po 24 h za pomocą barwienia 0.01% FDA.

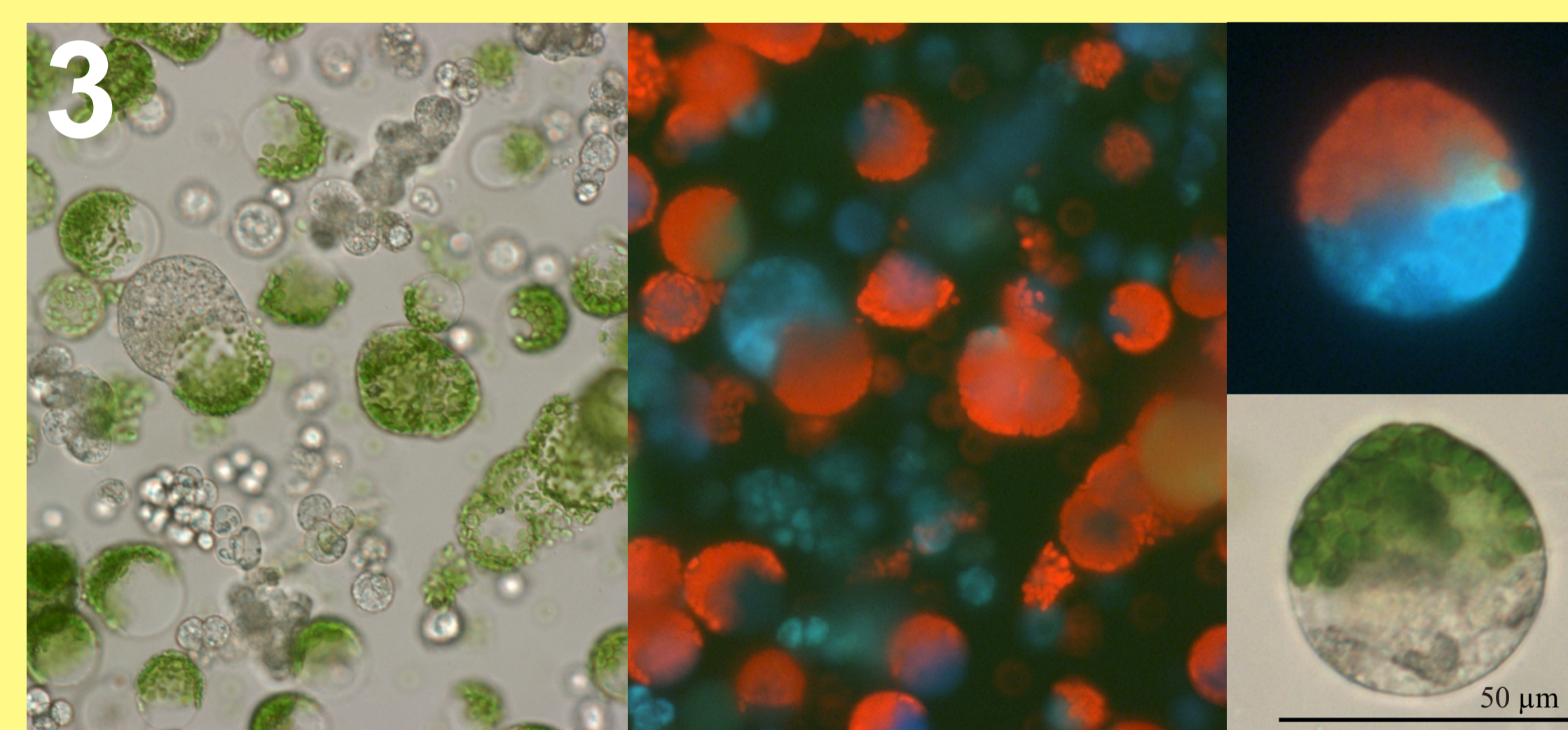
Fuzja chemiczna. Fuzje wykonywano w glikolu polietylenowym (PEG 4000 lub 6000 m.w.) z wykorzystaniem dwóch metod: cienkowarstwowej (CW) (Kao i Michayluk 1989, Power i in. 1984) oraz interfazowej (IF) (Kao 1986). Skład roztworów fuzyjnych podano w **Tab. 1**. Określano parametry gęstości mieszaniny protoplastów, proporcje obu komponentów, sposób umieszczenia na płytce Petriego i czas inkubacji w roztworze PEG-u (metoda CW), skład roztworu do nanoszenia protoplastów na kroplę roztworu fuzyjnego i czas sedymentacji/inkubacji w tym roztworze (metoda IF).

Tab. 1. Skład roztworów użytych w metodach fuzji cienkowarstwowej i interfazowej

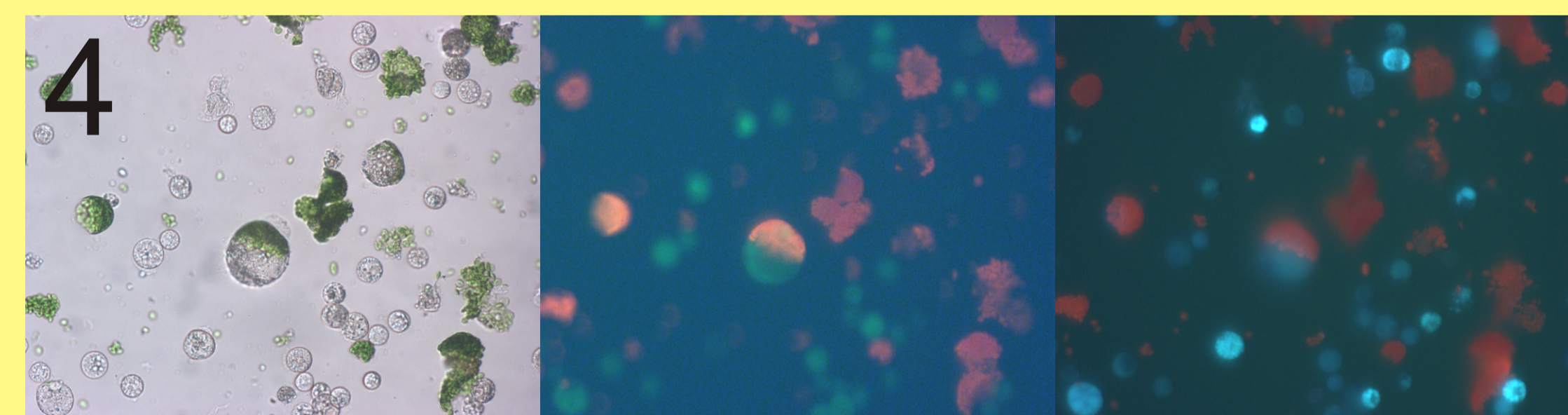
Składniki	CW		IF			
	RF1	RF2	RF1	Glukoza	RF2/pH [*]	RF2/Ca ²⁺
PEG 6000 [g]	22.5	-	-	-	-	-
PEG 4000 [g]	-	-	30	-	-	-
CaCl ₂ x 2H ₂ O [mg]	154.0	740	150	100	294	740
KH ₂ PO ₄ [mg]	9.52	-	10	10	-	-
Glicyna [mg]	-	375	-	-	375	375
Glukoza [g]	-	-	-	9.0	5.4	5.4
Sacharoza [g]	1.8	11	17	-	-	-
H ₂ O [ml]	100	100	100	100	100	100
pH	5.8	5.8	6.0	6.0	9.5	5.8

* - roztwór RF2/pH został zmodyfikowany. W oryginalnej procedurze Kao (1986) zastosowano bufor CAPS pozwalający na ustawienie pH na poziomie 10.5, a także nie dodawano glicyny. Roztwór RF2/Ca²⁺ jest dodatkowym wariantem z Kao (1982) oraz Power i in. (1984).

Obserwacje mikroskopowe prowadzono w mikroskopie Vanox - Olympus z pomocą komputerowego systemu analizy obrazu (analySIS ver. 3.1). Fluorescencja była indukowana przez niebiesko-fioletowe światło z wykorzystaniem filtrów BV (400 - 440 nm) i IB (495 nm).



Fot. 3. Wykorzystanie autofluorescencji chlorofilu i cytoplazmy protoplastów zawiesiny komórkowej w wizualizacji produktów fuzji



Fot. 4. Wczesne podbarwienie FITC protoplastów zawiesiny komórkowej w czasie ich enzymatycznego uwalniania w celu rozwinięcia systemu selekcji heterokarionów

Fuzja chemiczna

W metodzie CW korzystne było obniżenie gęstości zawiesiny z 2 i 1 x 10⁵ protoplastów/ml do 0.5 x 10⁵ oraz jej nanoszenie na płytkę w postaci pięciu 30 µl kropelek zamiast jednej 150 µl. Dzięki tym modyfikacjom uzyskiwano pojedynczą warstwę blisko siebie położonych protoplastów. Zwiększenie stosunku protoplastów zawiesinowych do mezofilowych z 1:1 do 2:1 ograniczyło niepożądane występowanie agregatów protoplastów mezofilowych. Czas inkubacji (15, 20 i 25 min.) mieszaniny protoplastów w roztworze PEG-u nie wpływał znacząco na wydajność fuzji. W metodzie IF zastosowanie roztworu CPW z 9% mannitolem zamiast 9% glukozy ograniczyło deformację protoplastów. Wydłużenie czasu sedymentacji z 10 do 25 - 35 min. pozwoliło na uzyskanie warstwy protoplastów w interfazie.

WNIOSKI

1. Na podstawie przeprowadzonych dotychczas eksperymentów wydaje się, że elektrofuzja jest lepszą metodą do pozyskiwania heterokarionów w obrębie *Gentiana* niż fuzja chemiczna.
2. Napięcie AC równe 20 V/cm najlepiej stymulowało formowanie protoplastów w łańcuchy.
3. Optymalne napięcie DC dla poszczególnych kombinacji badanych gatunków było podobne i wynosiło 350 - 400 V/cm.
4. Spośród badanych kombinacji fuzji, *G. cruciata* (zaw.) + *G. tibetica* (mez.) wymagała niższych wartości AC i DC.

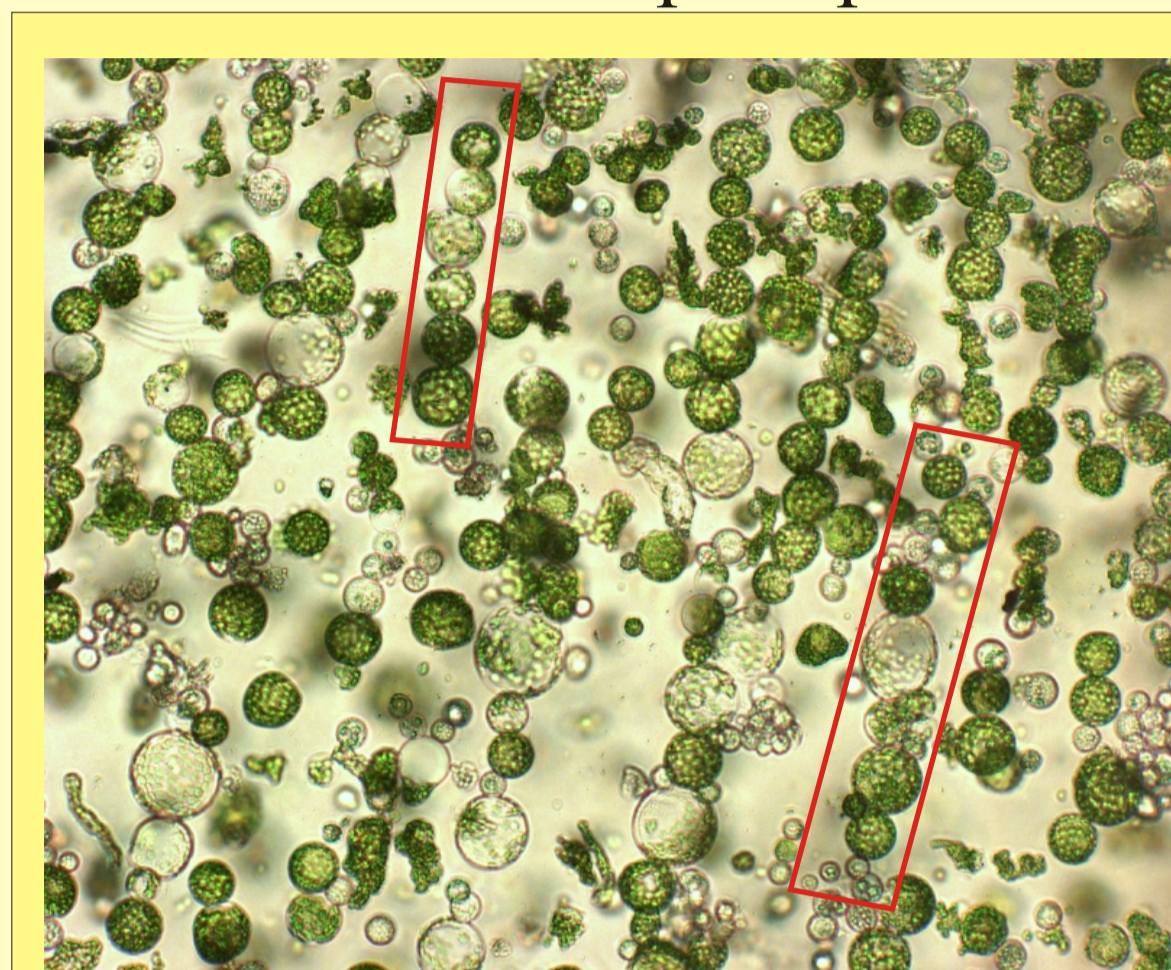
Praca finansowana przez MNiI 3P04C03723

WYNIKI

Elektrofuzja

1. Wpływ napięcia prądu zmiennego (AC)

Zastosowanie badanych zakresów napięcia AC w różny sposób stymulowało ustawianie się protoplastów w łańcuchy (**Fot. 2**). Przy napięciu 10 - 15



Fot. 2. Ustawianie się protoplastów w łańcuchy pod wpływem 20 V/cm AC

V/cm uszeregowanie zachodziło wolno i było nietrwałe, zaś przy 25 - 30 V/cm było zbyt gwałtowne i powodowało pękanie protoplastów lub fuzje wielokrotne. Napięcie 20 V/cm oceniono jako optymalne.

2. Wpływ napięcia prądu stałego (DC)

Napięcie DC wpływało znacząco na procentowy udział nieuszkodzonych protoplastów (**Tab. 2**). Udział ten był odwrotnie

proporcjonalny do wysokości zastosowanego napięcia i ściśle zależał od fuzjonowanych gatunków. Dla kombinacji *G. tibetica* (mez.) + *G. cruciata* (zaw.) po 24 h otrzymywano ok. 50% nieuszkodzonych protoplastów przy napięciu 300 - 350 V/cm (**Tab. 2A**), zaś dla *G. cruciata* (mez.) + *G. kurroo* (zaw.) ok. 64% przy napięciu 400 - 600 V/cm (**Tab. 2B**). Żywność protoplastów i heterokarionów po 24 h od dokonania fuzji w zakresie optymalnych napięć wynosiła około 45 - 59%.

Tab. 2. Wpływ napięcia prądu stałego DC na procentowy udział nieuszkodzonych protoplastów oraz ich żywotność (FDA) po fuzji

	Napięcie DC (V/cm)	Napięcie DC (V/cm)							
		500	400	350	300	1000	800	600	400
% nieuszkodzonych protoplastów	Bepośrednio po fuzji	67.08	80.87	82.07	85.12	71.84	77.74	87.32	91.49
	Po 24 h od fuzji	10.92	22.66	49.18	49.20	7.86	16.58	63.71	64.17
Żywność protoplastów po 24 h od fuzji (%)		10.81	18.54	44.68	46.83	6.05	9.69	42.35	59.33
		A) <i>G. tibetica</i> (mez.) + <i>G. cruciata</i> (zaw.)				B) <i>G. cruciata</i> (mez.) + <i>G. kurroo</i> (zaw.)			

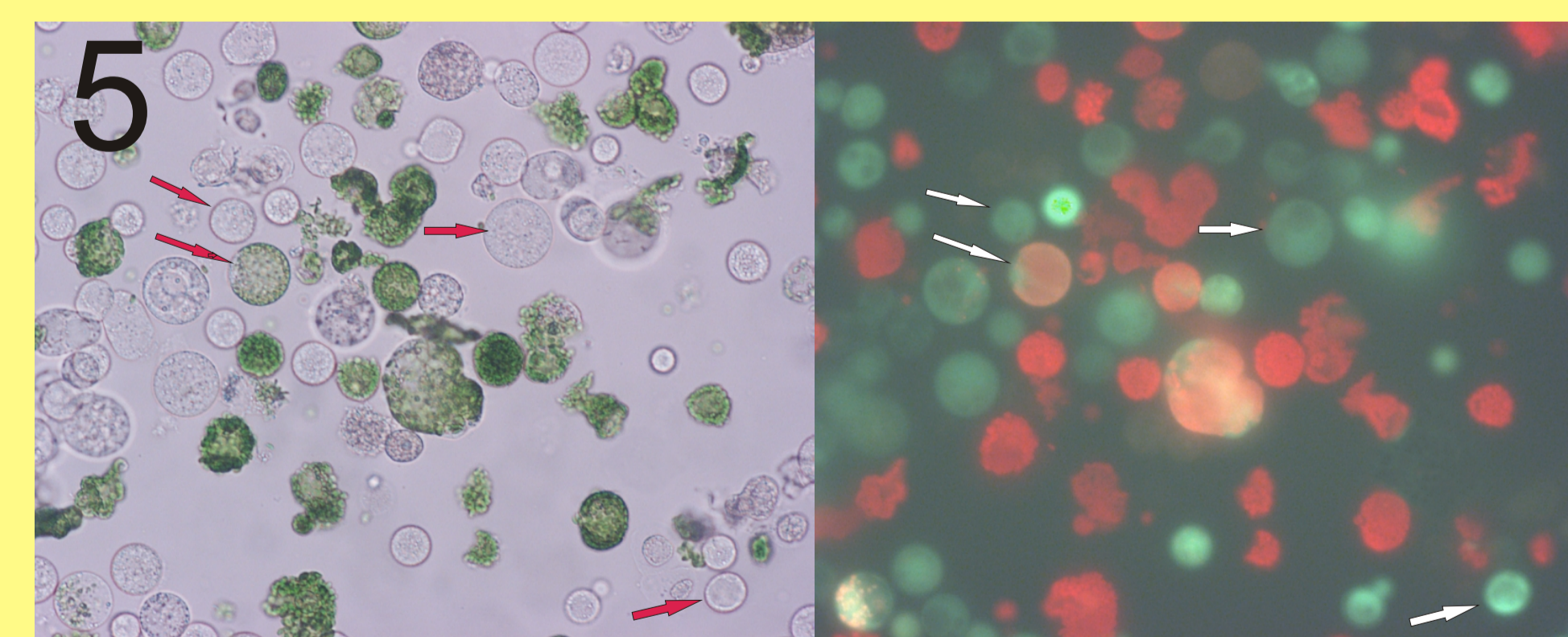
Najwyższą wydajność fuzji wynoszącą 4.80% dla kombinacji protoplastów mezofilowych *G. tibetica* z zawiesinowymi *G. cruciata* (po 24 h) otrzymano przy napięciu 350 V/cm (**Tab. 3A**), zaś 6.72% dla mezofilowych *G. cruciata* z zawiesinowymi *G. kurroo* przy napięciu 400 V/cm (**Tab. 3B**).

Określanie badanych parametrów (**Tab. 2 i 3**) bezpośrednio po dokonaniu fuzji daje błędne rezultaty, o czym świadczą wysoki procent nieuszkodzonych protoplastów (ok. 67 - 91) i wysoka wydajność fuzji (do 15%), radykalnie malejące wraz z upływem czasu po fuzji.

Tab. 3. Wpływ napięcia prądu stałego DC na wydajność fuzji protoplastów (%)

	Napięcie DC (V/cm)	Napięcie DC (V/cm)						
		500	400	350	300	800	600	400
Wydajność fuzji (%)	Bepośrednio po fuzji	15.51 ± 2.59	9.65 ± 2.32	11.18 ± 3.55	7.45 ± 1.91	7.13 ± 1.16	6.41 ± 0.46	6.96 ± 0.83
	Po 24 h od fuzji	0.64 ± 0.45	2.84 ± 0.76	4.80 ± 0.03	4.14 ± 0.14	2.64 ± 2.51	4.06 ± 2.31	6.72 ± 2.73
		A) <i>G. tibetica</i> (mez.) + <i>G. cruciata</i> (zaw.)				B) <i>G. cruciata</i> (mez.) + <i>G. kurroo</i> (zaw.)		

Fot. 5. Określanie żywotności protoplastów i produktów fuzji za pomocą barwienia FDA



Optymalne warunki elektrofuzji dla poszczególnych kombinacji badanych gatunków przedstawiono w **Tab. 4**.

Tab. 4. Optymalne warunki elektrofuzji dla poszczególnych kombinacji gatunków

Kombinacje gatunków	AC			DC		
	Napięcie (V/cm)	Czas trwania (s)	Napięcie po fuzyjne (V/cm)	Czas trwania (µs)	Napięcie (V/cm)	Liczba pulsów
<i>G. kurroo</i> + <i>G. tibetica</i>	20	02	0	30	400	2
<i>G. kurroo</i> + <i>G. cruciata</i>	20	02	0	30	400	2
<i>G. kurroo</i> + <i>G. pannonica</i>	20	02	0	30	400	2
<i>G. cruciata</i> + <i>G. tibetica</i>	18	02	0	30	350	2