

Lp. w zał. Do Rozporządzenia MRiRW; 12

Tytuł zadania: „Analiza zmienności somaklonalnej indukowanej w kulturach *in vitro* u roślin zbożowych.

Kierownik zadania: dr hab. Piotr Tomasz Bednarek, prof. nadzw.,

Cel tematu badawczego 1

Przygotowanie matryc zerojedynkowych z autoradiogramów otrzymanych z analizy techniką metAFLP dla DNA regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta. Wykonanie analiz molekularnych techniką metAFLP dla DNA generatywnego potomstwa regenerantów (uzyskanie autoradiogramów ze wzorami prążków DNA).

Materiały i metody temat badawczy 1

Policzono wszystkie uzyskane fragmenty DNA dla regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8) (90 roślin), pszenicy (genotyp P2/9) (90 roślin) oraz pszenżyta (genotyp 28/2) (90 roślin). Regeneranty były otrzymane w kulturach niedojrzałych zarodków (somatyczna embriogeneza) oraz w kulturach pylnikowych (androgeniza). Z policzonych prążków DNA utworzono matryce „0-1”, gdzie cyfra 1 oznacza obecność prążka zaś „0” – brak. Matryce przygotowano dla DNA ciętego enzymami *Acc65I/MseI* (A) oraz *KpnI/MseI* (K). Dane z matrycy A odzwierciedlają zmienność wynikającą ze zmian w sekwencji DNA (zmienność genetyczna) oraz ze zmian we wzorach metylacji DNA (zmienność metylacyjna). Wyniki uzyskane z matrycy K odnoszą się tylko do zmienności genetycznej. Zestawienie i porównanie ze sobą obydwu matryc skutkowało otrzymaniem trzeciej matrycy (A-K) z danymi, które opisują tylko zmienność metylacyjną.

Uzyskane w poprzednim roku badania preparaty DNA z potomstwa generatywnego regenerantów: jęczmienia genotyp 2dh/8 (84 rośliny), pszenicy (genotyp P2/9 (84 rośliny) i pszenżyta (genotyp 28/2) (84 rośliny) oraz wybrane rośliny donorowe jęczmienia, pszenicy i pszenżyta, wraz z regenerantami, z których otrzymano potomstwo (18 roślin) poddano analizie molekularnej techniką metAFLP. Preparaty DNA amplifikowano za pomocą 4 par selektywnych starterów, dla każdego gatunku i metody pozyskiwania roślin. Analiza wzorów prążkowych z elektroforegramów będzie stanowiła podstawę do szacowania zmienności genetycznej i metylacyjnej w 2018 roku.

Wyniki temat badawczy 1

*Analiza wyników: zliczenie profili metAFLP, analiza statystyczna*

Wykonano rozdziały metAFLP dla 270 regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta (po 90 regenerantów z danego gatunku) oraz 10 roślin donorowych (sprawozdanie 2016r). W sumie amplifikowano 620 fragmentów dla roślin jęczmienia, 757 dla pszenicy i 851 dla pszenżyta dla DNA ciętego obydwoma zestawami enzymów restrykcyjnych (*Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*). Obserwowano większy polimorfizm dla danych odnoszących się do układu enzymów *Acc65I/MseI* niż do układu *KpnI/MseI*. Utworzone matryce stanowiły podstawę do szacowania ilościowych charakterystyk odnoszących się do zmian sekwencyjnych i metylacyjnych identyfikowanych w roślinnych kulturach *in vitro*.

*Wykonanie analiz molekularnych techniką metAFLP dla DNA generatywnego potomstwa regenerantów.*

Analizy wykonano na DNA potomstwa generatywnego regenerantów: jęczmienia genotyp 2dh/8 (84 rośliny), pszenicy genotyp P2/9 (84 rośliny) i pszenżyta genotyp 28/2 (84 rośliny) oraz na odpowiadających im roślinach donorowych jęczmienia, pszenicy i pszenżyta, wraz z regenerantami, z których otrzymano potomstwo (18 roślin). W analizie wykorzystano po 4 pary selektywnych starterów dla jęczmienia i pszenicy dla każdej metody pozyskiwania roślin oraz 5 starterów dla pszenżyta. Wynikiem tej analizy było uzyskanie w sumie 230 fragmentów DNA dla jęczmienia, 363 dla pszenicy oraz 461 dla pszenżyta.

## Podsumowanie temat badawczy 1

Podjęte prace pozwoliły na utworzenie matryc zerojedynkowych do określenia ilościowych charakterystyk dotyczących zmienności indukowanej w trakcie pozyskiwania regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta na drodze kultur tkankowych.

Na podstawie zliczonych fragmentów DNA określono polimorfizm badanych materiałów roślinnych obserwując większe zróżnicowanie wśród danych odnoszących się do układu enzymów *Acc65I/MseI* niż do układu *KpnI/MseI*.

Podjęte prace pozwoliły na przygotowanie czytelnych elektroforegramów dla generatywnego potomstwa regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta w celu określenia poziomu zmian sekwencyjnych oraz metylacyjnych wśród tych roślin.

## Cel tematu badawczego 2

Określenie zmienności genetycznej i metylacyjnej indukowanej *in vitro* u regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8), pszenicy (genotyp P2/9) i pszenżyta (genotyp 28/2) oraz dobór warunków kultur *in vitro* prowadzących do uzyskania minimalnej oraz maksymalnej zmienności indukowanej *in vitro* oraz maksymalnej ilości zielonych regenerantów.

## Materiały i metody temat badawczy 2

Materiałem badawczym w tym temacie były preparaty DNA pozyskane z roślin przygotowywanych w trzech pierwszych latach trwania zadania (lata 2014-2016) pochodzące z gatunków: jęczmień (genotyp 2dh/8), pszenica (genotyp P2/9) i pszenżyto (genotyp 28/2). Były to zarówno rośliny donorowe (10 roślin) jak i regeneranty (6 x 45 roślin) uzyskane w różnych warunkach kultur *in vitro* uwzględniających suplementację  $\text{CuSO}_4$  i  $\text{AgNO}_3$  oraz czas trwania kultury tkankowej (etap indukcji somatycznej embriogenezy i androgenezy).

Do określenia zmian indukowanych w kulturze *in vitro* na poziomie DNA został wykorzystany wariant techniki AFLP – metAFLP. W wariacie tym stosowano dwie pary enzymów restrykcyjnych *Acc65I* i *MseI* oraz *KpnI* i *MseI* do równoległego cięcia genomowego DNA. Enzymy *Acc65I* i *KpnI* są izoschizomerami rozpoznającymi tę samą sekwencję nukleotydową, różniącymi się jednak wrażliwością na obecność metylowanej cytozyny w genomowym DNA. Enzym *Acc65I* jest wrażliwy i nie przecina rozpoznanej sekwencji jeśli w miejscu cięcia jest metylowana cytozyna, zaś *KpnI* nie jest wrażliwy i zawsze przecina rozpoznane miejsce. Zestawienie ze sobą matryc prążków DNA uzyskanych z cięcia enzymami *Acc65I/MseI* oraz *KpnI/MseI* było podstawą do analizy jakościowej i ilościowej zmienności indukowanej *in vitro*. Profile prążków amplifikowanych dla rośliny donorowej (D) i regeneranta (R) dla obydwu matryc zerojedynkowych mogą być przedstawione jako zapis czterocyfrowy. Gdzie dwie pierwsze cyfry oznaczają obecność „,1” lub brak „,0” fragmentu DNA dla układu enzymów *Acc65I/MseI* dla rośliny donorowej (D) i regeneranta (R), zaś dwie kolejne obecność lub brak fragmentu DNA dla rośliny donorowej (D) i regeneranta (R) dla układu enzymów *KpnI/MseI*. Każdy kod odzwierciedla określoną charakterystykę zmian zachodzących w kulturach *in vitro* na poziomie DNA. Są to zmiany sekwencyjne (SV) oraz zmiany związane z metylacją DNA – demetylacja (DMV) oraz metylacja *de novo* (DNMV) jak również inne zmiany. Na podstawie kodów zerojedynkowych możliwe było ilościowe szacowanie poszczególnych typów zdarzeń. W oparciu o przedstawiony system wyliczeń, przy użyciu specjalnie stworzonego arkusza kalkulacyjnego wyliczono ilości poszczególnych zmian powstałych pod wpływem działania kultury tkankowej.

Do przeprowadzenia procesu optymalizacyjnego dotyczącego uzyskania regenerantów o najwyższym lub najniższym poziomie zmienności indukowanej *in vitro* (TTCIV) oraz do uzyskania maksymalnej liczby zielonych regenerantów na 100 wyłożonych pylników wykorzystano metodę Taguchiego. Pod uwagę wzięto trzy czynniki takie jak stężenie  $\text{CuSO}_4$  oraz  $\text{AgNO}_3$  w pożywce indukującej oraz czas prowadzenia kultury *in vitro* w trakcie procesu

indukcji somatycznej embriogenezy lub androgenozy, każdy czynnik na trzech różnych poziomach wartości.

## Wyniki temat badawczy 2

Do analizy wybrano wyniki dotyczące zmienności sekwencyjnej (SV), metylacji *de novo* (DNMV), demetylacji (DMV) oraz całkowitej zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* (TTCIV). Dla jęczmienia dominującym typem zmian była zmienność sekwencyjna zarówno dla regenerantów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy jak i androgenozy (2,7% oraz 3,93%). Również dla pszenicy zmiany dotyczące sekwencji DNA były dominujące, jednakże tylko dla regenerantów otrzymanych w kulturach niedojrzałych zarodków zygocytynych (37,19% vs 0,71%). Podobne wyniki uzyskano dla regenerantów pszenżyta gdzie obserwowano przewagę zmian dotyczących sekwencji DNA nad pozostałymi badanymi typami zmian (36,6% dla regenerantów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy i 40,2% dla regenerantów uzyskanych na drodze androgenozy). Najmniejszy udział zmian dla wszystkich badanych roślin dotyczył metylacji *de novo* bez względu na sposób wyprowadzenia materiału roślinnego w kulturach *in vitro*. Analiza wariancji wykazała, że dla wszystkich badanych gatunków analizowany model (zmienność, sposób wyprowadzenia roślin oraz interakcja między sposobem wyprowadzenia i zmiennością) jest istotny. We wszystkich przypadkach w analizowanym modelu istotny był typ zmienności, natomiast metoda (sposób regeneracji roślin) odgrywała rolę wyłącznie u pszenżyta. Ponadto nie stwierdzono interakcji między typem zmienności a metodą regeneracji u żadnego z badanych gatunków.

Dane uzyskane z przeprowadzonych eksperymentów dotyczące ilości uzyskanych zielonych regenerantów na 100 wyłożonych pylników (sprawozdanie rok 2015) oraz dane dotyczące poziomu zmienności indukowanej w kulturach *in vitro* (TTCIV) (obecne sprawozdanie) posłużyły do wygenerowania poziomu trzech badanych czynników pozwalających na optymalizację prowadzonego procesu (program QIMacros230T).

## Podsumowanie temat badawczy 2

Metoda metAFLP umożliwiła określenie ilościowych zjawisk odnoszących się do zmian w sekwencji DNA oraz jego metylacji u jęczmienia, pszenicy i pszenżyta;

Zmiany w sekwencji DNA przeważały nad zmianami dotyczącymi metylacji *de novo* lub demetylacji u pszenicy i pszenżyta;

Sumarycznie zmiany związane z metylacją DNA były w przewadze u regenerantów jęczmienia;

Metoda Taguchiego ograniczyła ilość wykonywanych eksperymentów i określiła optymalne warunki prowadzenia kultur *in vitro*, które przy minimalnym nakładzie stosowanych czynników pozwolą uzyskać pożądane efekty (maksimum lub minimum TTCIV oraz maksimum zielonych regenerantów)

## Cel tematu badawczego 3

Przygotowanie roślin donorowych w celu uzyskania regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta w wytypowanych w poprzednim temacie warunkach kultur *in vitro* na drodze somatycznej embriogenezy (niedojrzałe zarodki zygocytynne) oraz na drodze androgenozy (pylniki). Pozyskanie DNA z roślin donorowych i przygotowanie do analiz metodą metAFLP.

## Materiały i metody temat badawczy 3

Nasiona podwojonych haploidów uzyskanych na drodze androgenozy w kulturach pylnikowych z jęczmienia (genotyp 2dh/8), pszenicy (genotyp P2/9) i pszenżyta (genotyp 28/2), posłużyły do uzyskania roślin donorowych (Dopt), z których będą wyprowadzone regeneranty w kulturach niedojrzałych zarodków oraz w kulturach pylnikowych. Wykorzystano po ok. 70 nasion z każdego gatunku (po ok. 35 nasion do każdej metody otrzymywania regenerantów). Ziarniaki z wymienionych gatunków zostały skielkowane.

Uzyskane siewki będące potomstwem generatywnym regenerantów (rośliny donorowe Dopt) przesadzono do plat. Gatunki ozime poddano jarowizacji (8 tygodni). Po osiągnięciu kilkunastu centymetrów siewki wysadzono do wiader i prowadzono do pełnej dojrzałości w warunkach kontrolowanych w fitotronie. Z kilkunastodniowych siewek pobrano po 100 mg tkanki liści do izolacji DNA. Ekstrakcja DNA została wykonana za pomocą zestawu do izolacji firmy QIAGEN zgodnie z metodyką producenta. Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie (NanoDrop). Czystość oraz integralność preparatów zweryfikowano elektroforetycznie w żelu agarozowym. Tak pozyskane DNA przygotowano do techniki metAFLP wykonując: trawienie DNA enzymami *Acc65I* i *MseI* oraz *KpnI* i *MseI*, ligację adaptorów komplementarnych do uzyskanych fragmentów DNA, wstępny PCR z preselektywnymi starterami oraz przygotowanie rozcieńczeń preparatów DNA do selektywnego PCR;

### Wyniki temat badawczy 3

W celu uzyskania roślin donorowych (Dopt) będących źródłem niedojrzałych zarodków zygotycznych oraz pylników na potrzeby weryfikacji uzyskanych danych molekularnych oraz dotyczących poprawy efektywności regeneracji wysiano po ok. 35 nasion do każdej metody otrzymywania regenerantów. Ilość taka pozwoliła finalnie na uzyskanie po 24 rośliny donorowe jęczmienia (genotyp 2dh/8) (JDopt) i pszenicy (genotyp P2/9) (PszDopt) oraz 36 roślin donorowych pszenżyta (genotyp 28/2) (PżDopt). Liście z młodych siewek były źródłem pozyskiwania DNA do dalszych analiz. Jakość otrzymanego DNA była poprawna i sprawdzona w żelu agarozowym, natomiast ilość i czystość DNA pozwoliły na przygotowanie preparatów DNA do techniki metAFLP zgodnie z podaną metodyką.

### Podsumowanie temat badawczy 3

Wyhodowano reprezentatywną liczbę roślin donorowych jęczmienia, pszenicy i pszenżyta (Dopt) będących źródłem eksplantatów (niedojrzałe zarodki zygotyczne, pylniki) do uzyskania regenerantów w wytypowanych wcześniej warunkach *in vitro*.

Podjęte prace pozwoliły na przygotowanie preparatów DNA do analiz molekularnych związanych z roślinami donorowymi jęczmienia, pszenicy i pszenżyta (Dopt)