

Lp. w zał. Do Rozporządzenia MRiRW; 89

Tytuł zadania: „Molekularna charakterystyka wpływu elementów mobilnych na zmienność genetyczną w zbożowych kulturach *in vitro*”.

Numer zadania: 89

Numer zadania w planach IHAR-PIB: 4-1-04-4-01

Kierownik zadania: dr inż. Renata Orłowska

Cel tematu badawczego 1

Uzyskanie genomowego DNA z regenerantów jęczmienia do analiz technikami RP-HPLC, MSTD.

Materiały i metody temat badawczy 1

Izolacja DNA została przeprowadzona z 80 regenerantów jęczmienia genotypu 2dh/8 uzyskanych w ubiegłym roku badań z materiału mrożonego. Izolacja DNA została wykonana dwukrotnie z uwagi na dużą ilość analiz za pomocą zestawu do izolacji DNA firmy QIAGEN, zgodnie z metodyką producenta. Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie (NanoDrop). Czystość oraz integralność preparatów zweryfikowano elektroforetycznie w żelu agarozowym.

Wyniki temat badawczy 1

Analizy molekularne obejmowały ekstrakcję genomowego DNA z regenerantów jęczmienia (genotyp 2dh/8) uzyskanych na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych. Wyziolowany genomowy DNA rozdzielono w 1,4% żelach agarozowych w celu sprawdzenia jego integralności. Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie. Uzyskano DNA w odpowiedniej ilości i jakości do dalszych analiz.

Podsumowanie temat badawczy 1

- Wykonana ekstrakcja DNA skutkowała odpowiednimi preparatami DNA do dalszych analiz.

Cel tematu badawczego 2

Oszacowanie poziomu globalnej metylacji DNA dla 80 regenerantów jęczmienia przy użyciu techniki RP-HPLC (*Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*).

Materiały i metody temat badawczy 2

Analizy techniką RP-HPLC wykonano trzykrotnie na DNA regenerantów jęczmienia jarego genotypu 2dh/8.

Oznaczenia nukleozydów wykonano przy użyciu chromatografu cieczowego (625 LC System) firma Waters USA. W temacie zastosowano procedurę RP-HPLC opartą na pracach Johnstona i współpracowników oraz Havliša i Trbuška. Za pomocą oprogramowania Millennium 32 v. 4.0 określono procentowy udział 5mdC w analizowanych preparatach.

Wyniki temat badawczy 2

Określono poziom globalnej metylacji DNA u regenerantów jęczmienia (80 roślin) uzyskanych w kulturach pylnikowych z 4 roślin donorowych (D). Analiza całkowitej metylacji cytydyny (5mdC) genomowego DNA wykonana metodą RP-HPLC wykazała, że średnio 21,31% ( $\pm 0,41$ ) cytydyny uległo metylacji. Dla poszczególnych zestawów regenerantów wyprowadzonych z 4 różnych roślin donorowych uzyskano odpowiednio: JRP72-21,50%, JRP68-21,30%, JRP69-21,22% i JRP70-20,15%. Wykazano istotne różnice ( $F=133,274$ ,  $p=0,0001$ ) między poszczególnymi zestawami regenerantów a roślinami donorowymi uzyskanymi w ubiegłym roku sprawozdawczym (Sprawozdanie PBwPR 89\_2016).

Podsumowanie temat badawczy 2

- Wykonana w temacie badawczym analiza RP-HPLC określiła poziom globalnej metylacji DNA dla 80 regenerantów jęczmienia.
- Obserwowano zróżnicowanie w poziomie globalnej metylacji DNA między zestawami regenerantów.

### Cel tematu badawczego 3

Wykonanie analiz MSTD na DNA regenerantów jęczmienia – uzyskanie autoradiogramów.

### Materiały i metody temat badawczy 3

Wyizolowany we wcześniejszym temacie badawczym DNA regenerantów jęczmienia został poddany analizie techniką MSTD z 7 parami selektywnych starterów. Policzenie poszczególnych prążków DNA z elektroforegramów oraz utworzenie matryc zerojedynkowych i analiza wzorów prążkowych zostanie wykonana w przyszłym roku

### Wyniki temat badawczy 3

Wykonano rozdziały metAFLP dla 80 regenerantów jęczmienia, oraz dla odpowiadających im roślin donorowych (4 rośliny). Rozdziały wykonano w dwóch układach enzymów restrykcyjnych – *Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*. Podjęte prace pozwoliły uzyskać czytelne elektroforegramy. Uzyskane obrazy w zależności od zastosowanych starterów w reakcji PCR różniły się wizualnie liczebnością fragmentów DNA.

### Podsumowanie temat badawczy 3

- Uzyskano stabilne profile prążków DNA techniką MSTD do dalszych prac.

### Cel tematu badawczego 4

Uzyskanie roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów jęczmienia.

### Materiały i metody temat badawczy 4

Regeneranty jęczmienia, pozyskane na drodze androgenezy były źródłem ziarniaków do uzyskania generatywnego potomstwa. W temacie zaplanowano uzyskanie około 90 roślin potomnych z regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy. Ziarniaki po zbiorze i okresie spoczynku poddano sterylizacji przez 15 min w 10 % podchlorynie sodu a następnie wyłożono na wilgotną bibułę w szalkach Petriego. Tak przygotowane szalki pozostawiono przez dobę w temperaturze 4°C, a następnie dobę w temperaturze pokojowej. Uzyskane siewki będące potomstwem generatywnym regenerantów przesadzono do płyt wypełnionych podłożem do pikowania. Po osiągnięciu kilkunastu centymetrów siewki wysadzono na pole i prowadzono do dojrzałości w warunkach polowych.

### Wyniki temat badawczy 4

Aby otrzymać zaplanowane ilości roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów wysiano ok. 10% więcej nasion, niż oczekiwane liczebności roślin potomnych. Uzyskano w sumie 90 roślin z czterech różnych regenerantów.

### Podsumowanie temat badawczy 4

- Uzyskano reprezentatywną liczbę roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów pozyskanych w poprzednim roku badań.