

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

Weryfikacja powtarzalności i stabilności profili prążkowych DNA uzyskiwanych metodą MSTD.

Materiały i metody temat badawczy 1

Materiałem badawczym był DNA roślin jęczmienia jarego z genotypu 2dh/8 będących potomstwem generatywnym podwojonego haploida – 24 rośliny. Analizy wykonano techniką MSTD z trzema parami starterów ukierunkowanych na sekwencje elementów mobilnych genomu BARE-1, Sabrina, Cassandra (startery: BARE-1-C0700/CpXpG-AGA, Sabrina-C0945/CpG-GCA, CAS 978/CpG-GCA). Z autoradiogramów o czytelnych wzorach prążków policzono fragmenty DNA dla testowanych roślin oraz utworzono macierz zerojedynkową.

Wyniki temat badawczy 1

Wykonano analizy techniką MSTD z trzema parami selektywnych starterów. Otrzymano 210 polimorficznych fragmentów DNA dla układów enzymów restrykcyjnych *Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*. Polimorfizm dla układu *Acc65I/MseI* wynosił 68% zaś dla układu *KpnI/MseI* 72,86%. Analiza skupień (PAST) oparta na danych molekularnych dla obydwu układów enzymów restrykcyjnych wykazała odrębność dla zastosowanych restryktaz.

Podsumowanie temat badawczy 1

- Uzyskano stabilne profile prążków DNA techniką MSTD. Wykonane analizy na roślinach jęczmienia będących generatywnym potomstwem podwojonego haploida pozwoliły ocenić przydatność zaprojektowanych starterów oraz oszacować poziom polimorfizmu badanego materiału.

Cel tematu badawczego 2

Oszacowanie poziomu globalnej metylacji DNA dla 24 roślin donorowych jęczmienia w dwukrotnym powtórzeniu przy użyciu techniki RP-HPLC (*Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography*).

Materiały i metody temat badawczy 2

Analizy techniką RP-HPLC wykonano dwukrotnie na DNA roślin donorowych jęczmienia jarego genotypu 2dh/8 (24 rośliny) wyizolowanym w ubiegłym roku badań.

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

Wykonano analizy RP-HPLC dotyczące określenia poziomu globalnej metylacji DNA dla 24 roślin jęczmienia genotypu 2dh/8 będących generatywnym potomstwem podwojonego haploida w dwukrotnym powtórzeniu. Dane obecne i ubiegłoroczne uśredniono. Uzyskany wynik - 20,15% nie odbiegał od wartości uzyskanych w ubiegłym roku.

Podsumowanie temat badawczy 2

- Wykonana w temacie badawczym analiza RP-HPLC określiła poziom globalnej metylacji DNA dla 24 roślin donorowych jęczmienia.

Cel tematu badawczego 3

Uzyskanie genomowego DNA z roślin donorowych jęczmienia do analiz technikami metAFLP, MSTD, IRAP i REMAP.

Określenie poziomu zmienności roślin donorowych jęczmienia w oparciu o technikę metAFLP (*met Amplified Fragment Length Polymorphism*) oraz MSTD.

Analizy z innymi technikami (IRAP/REMAP) opartymi na sekwencji retrotranspozonów.

Materiały i metody temat badawczy 3

Izolację DNA wykonano z 24 roślin donorowych jęczmienia genotypu 2dh/8 uzyskanych w ubiegłym roku badań z zamrożonego materiału roślinnego za pomocą zestawu do izolacji DNA firmy QIAGEN. Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie (NanoDrop). Czystość oraz integralność preparatów zweryfikowano elektroforetycznie w żelu agarozowym. Po izolacji DNA przygotowano do technik metAFLP i MSTD wykonując: trawienie DNA roślin donorowych jęczmienia enzymami: *Acc65I* i *MseI* oraz *KpnI* i *MseI*; ligację syntetycznych oligonukleotydów tzw. adaptorów do fragmentów DNA uzyskanych po cięciu enzymami restrykcyjnymi; pierwszą reakcję PCR tzw. "wstępny PCR" z dwoma starterami i odpowiednie przygotowanie produktów tej reakcji do kolejnej reakcji PCR; drugą reakcję namnażania fragmentów DNA tzw. „selektywny PCR” ze starterami stosowanymi w technice metAFLP CpG/CpXpG/CpXpX oraz ze starterami ukierunkowanymi na elementy mobilne w genomie dla techniki MSTD. Po zakończeniu reakcji PCR, próby DNA rozdzielono w żelu poliakrylamidowym. Z uzyskanych autordiogramów policzono prążki DNA i wykonano analizę molekularną opartą na metodzie metAFLP.

Do techniki IRAP/REMAP wykorzystano DNA roślin donorowych jęczmienia wyizolowany do techniki MSTD o stężeniu 10 ng/μl. Reakcje PCR Wykonano według procedur ustalonych w ubiegłym roku badań.

Wyniki temat badawczy 3

Wykonano ekstrakcję genomowego DNA z zamrożonych liści roślin donorowych. Uzyskany genomowy DNA był integralny i pozwolił na przeprowadzenie zaplanowanych analiz.

W analizie metAFLP wykonano rozdziały elektroforetyczne wykorzystując 5 par selektywnych starterów: CpG-GAC/MCGT, CpXpG-TTG/MCAC, CpXpG-TTG/MCGT, CpXpG-ATG/MCGT, CpXpG-AGC/MCAC dla 24 roślin jęczmienia uzyskując wzory fragmentów DNA wizualizowane autoradiograficznie. W sumie amplifikowano 209 fragmentów DNA (od 25 do 35). Obserwowany polimorfizm w wyniku cięcia DNA jęczmienia enzymami *Acc65I* i *MseI* wynosił 5,74%. Analogiczny wynik dla cięcia DNA enzymami *KpnI* i *MseI* wynosił 9,56%.

Analizy wykonane techniką MSTD skutkowały uzyskaniem 1233 markerów dla obydwu użytych zestawów enzymów restrykcyjnych (*Acc65I* i *MseI* oraz *KpnI* i *MseI*) przy wykorzystaniu 20 par selektywnych starterów ukierunkowanych na sekwencje elementów mobilnych. Poziom polimorfizmu wynosił odpowiednio 66,74% dla zmian sekwencyjnych i 82,5% dla zmian w metylacji DNA. Po zgrupowaniu danych pod względem użytych rodzin elementów mobilnych okazało się, iż najniższy polimorfizm był generowany przez startery ukierunkowane na rodzinę LARD, gdzie obserwowano 18,27% polimorfizmu dla zmian sekwencyjnych w DNA oraz 43,01% dla zmian metylacyjnych. Najwyższy polimorfizm był generowany przez startery oparte na elementach należących do rodziny CACTA.

Hierarchiczna analiza skupień oparta na danych sekwencyjnych (*KpnI/MseI*) uzyskanych przy użyciu selektywnych starterów opartych na elementach mobilnych należących do rodziny TRIM wykazała grupowanie roślin donorowych w trzy klastry, podczas gdy w przypadku rodziny CACTA rośliny te grupowały się w osiem skupień.

Na poziomie zmian metylacyjnych obserwowano mniejsze zróżnicowanie między poszczególnymi rodzinami elementów mobilnych. Dla rodziny TRIM obserwowano grupowanie roślin donorowych w cztery klastry zaś dla rodziny Ty1-Copia hierarchiczna analiza skupień wykazała jedynie o jedno skupienie więcej.

W analizie uzupełniającej z technikami IRAP/REMAP zastosowano trzy startery oparte na elementach mobilnych Caspar i Cassandra: CASP1F/MICRO2, CAS AY16F-MICRO2, CAS AY16F. Amplifikowane profile DNA były odpowiedniej jakości i pozwoliły na zidentyfikowanie poszczególnych prążków. Uzyskano niską ilość fragmentów DNA przypadających na jeden starter (średnio 4,3) zaś poziom polimorfizmu mieścił się w granicach 57-71% w zależności od zastosowanej pary starterów.

Podsumowanie temat badawczy 3

- Ekstrakcja DNA z liści roślin donorowych skutkowała uzyskaniem niezbędnej ilości materiału do analiz molekularnych;
- Poziom zmienności oszacowany techniką metAFLP dla roślin donorowych stanowi informację o tle genetycznym wybranych roślin;
- Zmiany metylacyjne odnoszące się do pięciu badanych rodzin elementów mobilnych były wyższe niż zmiany dotyczące sekwencji DNA;
- W oparciu o dane dotyczące analizy MSTD wykonanej na DNA roślin donorowych możliwe będzie wybranie materiału roślinnego do dalszych badań;
- Okrojona ilość analiz IRAP/REMAP pozwoliła na podanie poziomu polimorfizmu jednak z uwagi na niską liczebność starterów wydaje się, że wyniki są raczej niedoszacowane;

Cel tematu badawczego 4

Wyprowadzenie regenerantów jęczmienia na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych.

Materiały i metody temat badawczy 4

Regeneranty jęczmienia z genotypu 2dh/8 wyprowadzono na drodze androgenyzy w kulturach pylnikowych z roślin donorowych uzyskanych w ubiegłym roku prowadzenia zadania.

Wyniki temat badawczy 4

Wyłożono do 0,3M mannitolu a następnie na pożywki indukujące ok. 5000 pylników z 24 roślin donorowych jęczmienia genotypu 2dh/8. Proces androgenyzy skutkowało uzyskaniem średnio 13 zielonych regenerantów na 100 wyłożonych pylników oraz średnio 28 albinotycznych regenerantów na 100 wyłożonych pylników. Efektywność spontanicznego podwojenia wynosiła 50%. Regeneranty uzyskane w wyniku androgenyzy (podwojone haploidy) charakteryzowały się fenotypem identycznym jak rośliny donorowe. Uzyskane regeneranty będą wykorzystywane w dalszych pracach badawczych w realizowanym zadaniu.

Podsumowanie temat badawczy 4

- Zaproponowany sposób uzyskania podwojonych haploidów jęczmienia genotypu 2dh/8 pozwolił na uzyskanie planowanej liczby regenerantów do dalszych badań.

Prezentacja wyników badań: Poster. The Mobile Genom. Genetic and Physiological Impacts of Transposable Elements. 11-14.10.2017 Heidelberg EMBL Advanced Training Centre, Germany; Poster przygotowano w oparciu o wyniki bieżącego sprawozdania (2017r): strony: 9-11.