

Molekularna charakterystyka wpływu elementów mobilnych na zmienność genetyczną w zbożowych kulturach *in vitro*



Nr zadania: 89 (IHAR – PIB: 4-1-04-4-01)

Realizacja: 2016-2020

Zespół wykonawców:

Kierownik: Renata Orłowska, email: r.orlowska@ihar.edu.pl

Piotr T. Bednarek

Katarzyna A. Pachota

Sławomir Bany

CELE

1. Badanie poziomu zmienności indukowanej *in vitro* oraz dziedzicznej w cyklu generatywnym będącej wynikiem aktywacji elementów mobilnych (EM);
2. Określenie, jakie nadrodziny EM mogą być aktywne u jęczmienia, jako rośliny modelowej;
3. Zbadanie, w jakim stopniu zmiany powodowane migracją poszczególnych elementów mobilnych są powiązane ze zmianami metylacji genomowego DNA zachodzącymi podczas regeneracji roślin metodą kultur *in vitro*;

Wszystkie cele projektu zostały zrealizowane

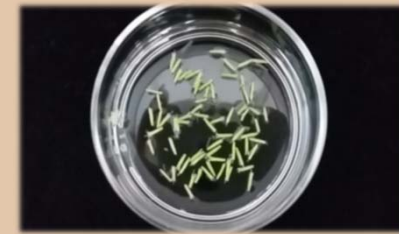
MATERIAŁ I METODY



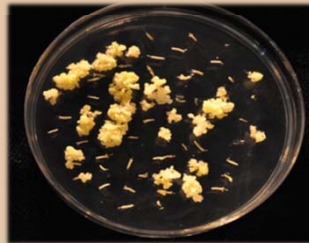
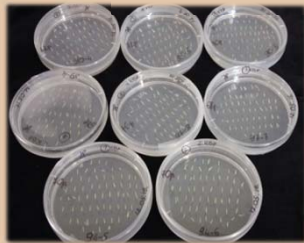
Wysiew nasion jęczmienia
genotypy: 19dh/4, 2dh/8 i 7dh/3
ROŚLINY DONOROWE



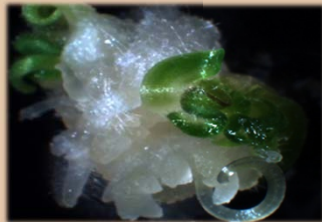
Zbiór kłosów



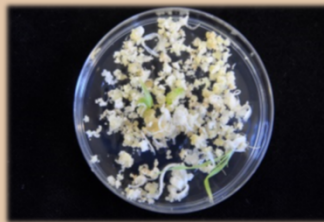
Wykładanie pylników i stres osmotyczny



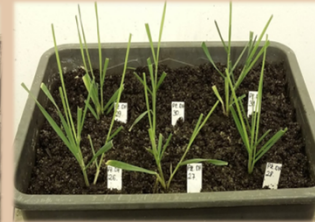
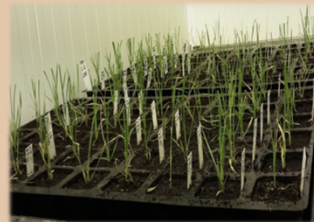
Indukcja



Regeneracja



Ukorzenianie



Wysadzenie do
plat i wader



Doprowadzenie do
dojrzałości i zbiór
nasion z regenerantów
(DH)

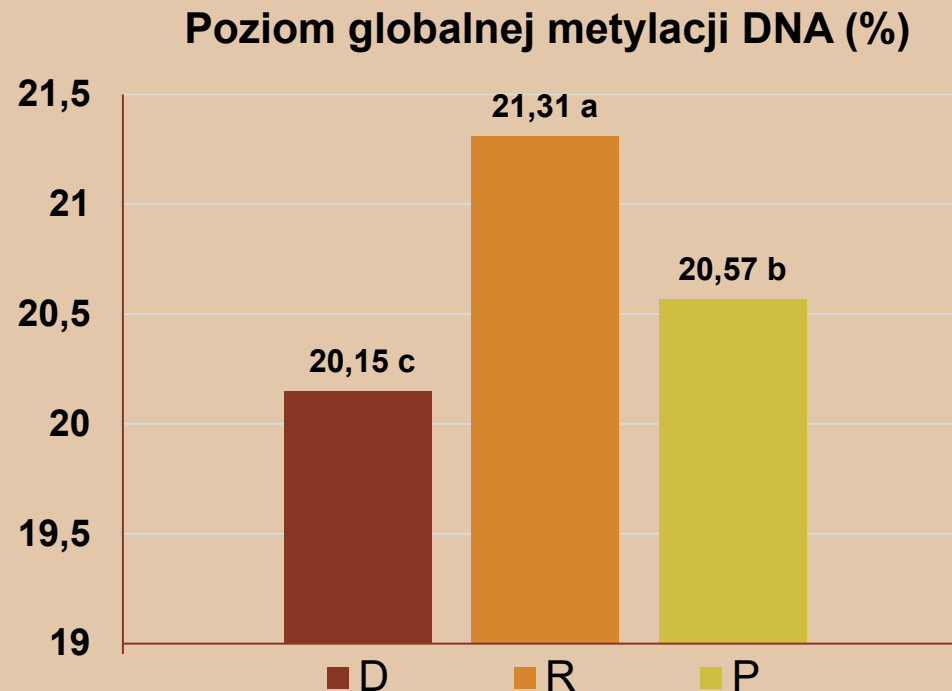


MATERIAŁ I METODY

- ❖ Zasoby literaturowe. Projektowanie starterów-program CLC Main Workbench 7.6.4;
- ❖ Analizy molekularne-technika Methyl-Sensitive Transposon Display (MSTD) oparta na metAFLP; DNA roślin jęczmienia jarego: 24 donorowych (D), 84 regenerantów (R), 96 potomstwa (P);
- ❖ Użyte enzymy restrykcyjne *Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*
- ❖ Utworzenie matryc „0-1”
 - matryca ***Acc65I-MseI*** zmienność **genetyczna i metylacyjna (A)**
 - matryca ***KpnI-MseI*** zmienność **sekwencyjna/genetyczna (K)**
 - ***Acc65I-MseI - KpnI-MseI*** zmienność **metylacyjna/epigenetyczna (M)**

Nazwa elementu mobilnego w genomie (nadrodzina/superfamily)	Nazwa startera
Ty1-copia (Autonomiczne LTR retrotranspozony)	BARE-1-5980
	BARE-1-C0700
Ty3-gypsy (Autonomiczne LTR retrotranspozony)	BAGY-1-C2043
	BAGY-1-C0651
	Sabrina-C0945
LARD (Nieautonomiczne LTR-retrotranspozony) (L arge R etrotransposon D erivative)	Sukkula E0228
	Sukkula 91673
TRIM (Nieautonomiczne LTR-retrotranspozony) (small non-autonomous Long Terminal Repeat Retrotransposons / T erminal R epeat Retrotransposons I n M iniature)	CAS AY16F
	CAS AY16R
	CAS 978
	CAS 979
CACTA (DNA Transpozony)	Balduin
	CASP-124R
	CASP-1F
	CASP-1R

WYNIKI RP-HPLC dla roślin donorowych, regenerantów i generatywnego potomstwa regenerantów jęczmienia

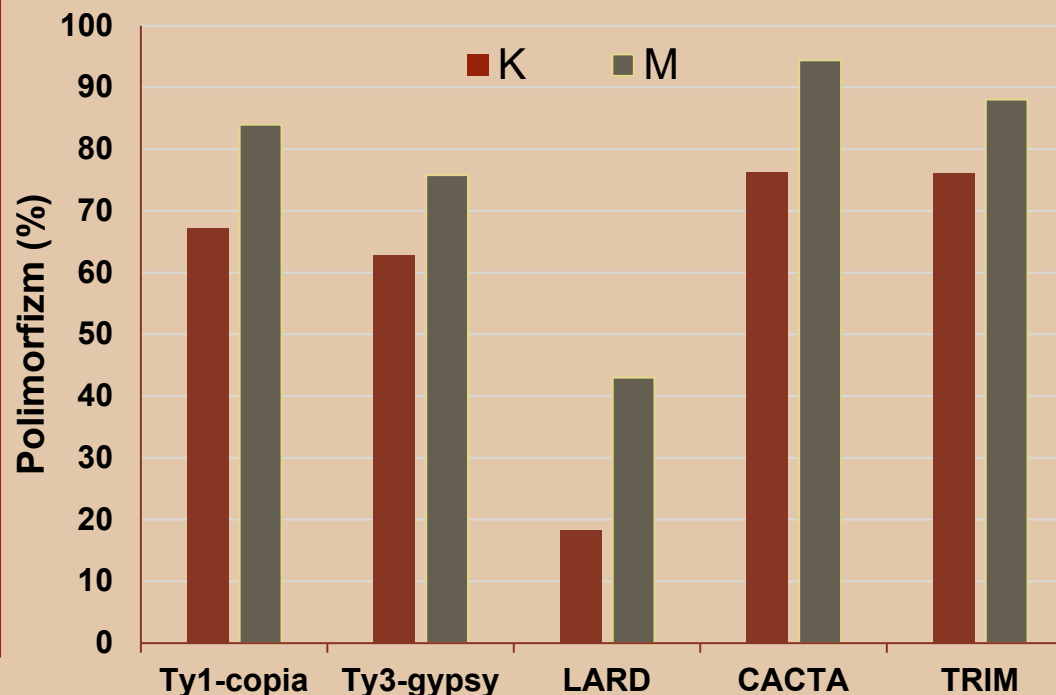


Poziom globalnej metylacji DNA dla roślin donorowych (D), regenerantów (R) oraz potomstwa generatywnego regenerantów (P). Wartości średnie na wykresie oznaczone tą samą literą różnią się istotnie ($F=73,264$; $p=0,0001$, $\alpha=0,05$); grupowanie wykonane testem Tukeya.

Obserwowano wzrost globalnej metylacji między roślinami donorowymi a regenerantami, a następnie nieznaczny spadek metylacji genomu po przejściu roślin przez cykl generatywny.

WYNIKI-rośliny donorowe jęczmienia

Charakterystyka molekularna roślin donorowych	System markerowy	
	metAFLP	MSTD
Liczba użytych starterów	7	20
Liczba fragmentów DNA	209	1233
Średnia ilość fragmentów DNA na parę starterów	30	62
Polimorficzne markery w <i>Kpn</i> / <i>Mse</i> I (zmiennosc sekwencyjna/genetyczna)	9,57%	66,74%
Polimorficzne markery w <i>Acc</i> 65I/ <i>Mse</i> I – <i>Kpn</i> I/ <i>Mse</i> I (zmiennosc metylacyjna/epigenetyczna)	15,31%	82,50%



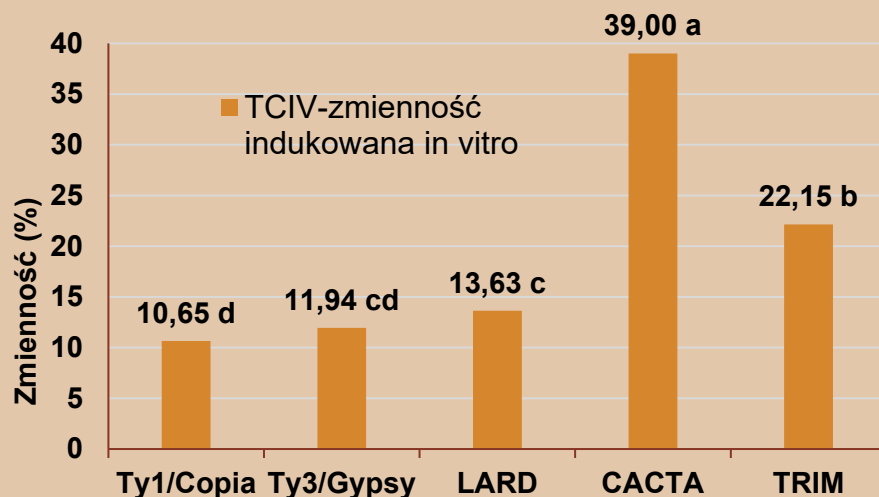
Rodziny elementów mobilnych

Poziom polimorfizmu dla 24 roślin donorowych jęczmienia na podstawie analizy MSTD wykorzystującej selektywne startery ukierunkowane na rodziny elementów mobilnych. K dane sekwencyjne z matrycy *Kpn*I/*Mse*I; M dane metylacyjne odczytane z matrycy *Acc*65I/*Mse*I-*Kpn*I/*Mse*I.

- Poziom zmienności oszacowany techniką metAFLP dla roślin donorowych stanowił informację o tle genetycznym wybranych roślin;
- Zmiany metylacyjne odnoszące się do badanych rodzin elementów mobilnych były wyższe niż zmiany dotyczące sekwencji DNA;
- W oparciu o dane dotyczące analizy MSTD wykonanej na DNA roślin wybrano materiał roślinny do dalszych badań;

WYNIKI-regeneranty jęczmienia

Charakterystyka molekularna generatywnego potomstwa regenerantów	System markerowy
	MSTD
Liczba użytych starterów	10
Liczba fragmentów DNA	384
Średnia ilość fragmentów DNA na parę starterów	38

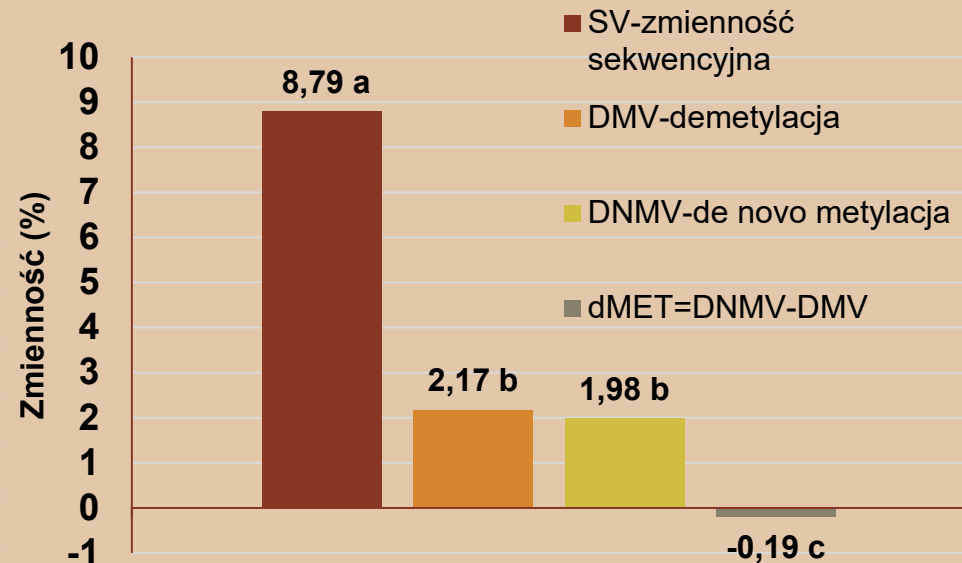


Rodziny elementów mobilnych

Średnie wartości zmienności indukowanej *in vitro* (TCIV) dla poszczególnych rodzin elementów mobilnych. Wartości średnie na wykresie oznaczone tą samą literą różnią się istotnie ($F=340,5835$; $p=0,0001$, $\alpha=0,05$); grupowanie wykonane testem Tukeya.

Bazując na danych molekularnych MSTD określono średni całkowity poziom zmienności indukowanej w kulturze *in vitro* (TCIV), który wyniósł 17,84%.

Charakterystyki MSTD



Średnie wartości charakterystyk MSTD dla wszystkich analizowanych rodzin elementów mobilnych u regenerantów jęczmienia. Wartości średnie na wykresie oznaczone tą samą literą różnią się istotnie ($F=499,745$; $p=0,0001$, $\alpha=0,05$); grupowanie wykonane testem Tukeya.

- Badane rodziny elementów mobilnych różniły się między sobą w ramach całkowitej zmienności indukowanej *in vitro*, rodzina CACTA wykazywała najwyższy poziom polimorfizmu.

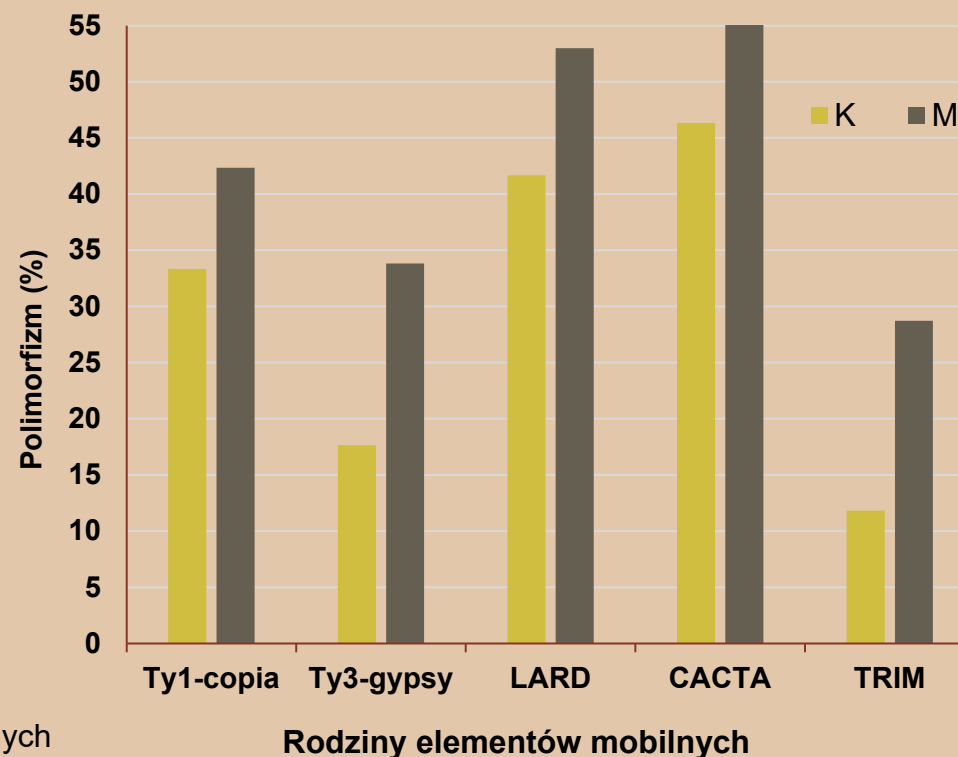
WYNIKI-potomstwo generatywne regenerantów jęczmienia

Charakterystyka molekularna roślin donorowych	System markerowy
	MSTD
Liczba użytych starterów	10
Liczba fragmentów DNA	276
Średnia ilość fragmentów DNA na parę starterów	27

Genotyp	K	M
D68	30,80%	42,75%
D69	26,45%	36,96%
D70	28,62%	42,39%
D72	24,25%	39,13%

Poziom polimorfizmu (%P) dla danych MSTD uzyskanych dla generatywnego potomstwa regenerantów pochodzącego z różnych genotypów (D68-D69). K-dane dotyczące zmienności sekwencyjnej uzyskane z matrycy *KpnI/MseI*. M-dane dotyczące zmian w metylacji DNA odczytane z matryc *Acc65I/MseI-KpnI/MseI*.

- Obserwowano różnice między generatywnym potomstwem regenerantów uzyskanych z różnych roślin donorowych.
- Wytypowane do analizy MSTD rodziny elementów mobilnych generowały różny poziom zmian w sekwencji i metylacji DNA.



Poziom polimorfizmu dla generatywnego potomstwa regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy na podstawie wyników MSTD z wykorzystaniem selektywnych starterów ukierunkowanych na rodziny elementów mobilnych. K-dane dotyczące zmienności sekwencyjnej uzyskane z matrycy *KpnI/MseI*. M-dane dotyczące zmian w metylacji DNA odczytane z matryc *Acc65I/MseI-KpnI/MseI*.

Osiągnięcia projektu (podsumowania/wnioski)

- Wybrana metoda pozyskiwania podwojonych haploidów (androgeneza w kulturach pylnikowych) pozwoliła uzyskać rośliny donorowe a następnie regeneranty oraz generatywne potomstwo regenerantów do dalszych analiz.
- Na podstawie danych literaturowych zaprojektowano startery do techniki MSTD oraz oceniono ich przydatność do szacowania poziomu polimorfizmu wśród roślin jęczmienia. Zaproponowana metoda okazała się skuteczna do badań.
- Wykonana w temacie badawczym analiza RP-HPLC określiła poziom globalnej metylacji DNA dla wszystkich badanych roślin. Obserwowano wzrost globalnej metylacji między roślinami donorowymi a regenerantami, a następnie nieznaczny spadek metylacji genomu po przejściu roślin przez cykl generatywny.
- Poziom zmienności oszacowany techniką metAFLP dla roślin donorowych stanowił informację o tle genetycznym wybranych roślin;
- Obserwowano różnice w poziomie zmienności między regenerantami oraz generatywnym potomstwem regenerantów uzyskanych z różnych roślin donorowych (efekt genotypu).
- Wytypowane do analizy MSTD rodziny elementów mobilnych generowały różny poziom zmian w sekwencji i metylacji DNA.
- Poziom zmienności genetycznej oraz zmian wzorów metylacji DNA u potomstwa generatywnego regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy pokazuje, że wyprowadzanie regenerantów tymi metodami jest obciążone wysokim stopniem zmienności, zmienność ta jest transmitowana do potomstwa generatywnego regenerantów.
- Wyprowadzenie wyrównanego materiału genetycznego metodami kultur *in vitro* może wymagać kilku cykli generatywnych stabilizujących różne typy zmienności. Liczba takich cykli nie jest ściśle zdefiniowana i prawdopodobnie zależy od genotypu.
- Badanie podstaw biologicznych zjawiska oraz możliwości wpływania na poziom zmienności mają znaczenie zarówno badawcze jak i praktyczne.

PUBLIKACJE

Manuskrypt pt: „Androgenic-induced transposable elements dependent sequence variation in barley”. W przygotowaniu do Plant Molecular Biology.

KONFERENCJE

- „The Mobile Genom. Genetic and Physiological Impacts of Transposable Elements.” 11-14.10.2017 Heidelberg EMBL Advanced Training Centre, Germany; Sprawozdanie 2017 strony: 9-11. „Retrotransposition and methylation changes revealed by MSTD in generative progeny of barley regenerant”.
- “Global Conference on Plant Science and Research in Valencia” 23-25.09.2019 r., Walencja (Hiszpania). Sprawozdanie 2018 strony: 4-7, sprawozdanie 2019 strony: 4-8 i 10-13. „Assessment of qualitative and quantitative changes in DNA sequence and methylation in barley regenerants based on MSTD”.