

INSTYTUT HODOWLI I AKLIMATYZACJI ROŚLIN
- PAŃSTWOWY INSTYTUT BADAWCZY
W RADZIKOWIE

SANDRA CICHORZ

Autoreferat rozprawy doktorskiej pt.:

**Charakterystyka cytogenetyczna i molekularna wybranych gatunków
z rodzaju *Miscanthus* Anderss.**

Praca doktorska wykonana
w Zakładzie Genetyki i Hodowli Roślin Korzeniowych
IHAR-PIB, Oddział w Bydgoszczy

Promotor:

dr hab. Maria Gośka prof. nadzw. IHAR-PIB

Recenzenci:

prof. dr hab. Anna Mikuła

Polska Akademia Nauk Ogród Botaniczny –
Centrum Zachowania Różnorodności Biologicznej w Powsinie

prof. dr hab. Rafał Barański

Uniwersytet Rolniczy im. Hugona Kołłątaja w Krakowie
Wydział Biotechnologii i Ogrodnictwa
Instytut Biologii Roślin i Biotechnologii

Radzików, 2018

WYKAZ PUBLIKACJI STANOWIĄCYCH ROZPRAWĘ DOKTORSKĄ

1. Cichorz Sandra, Gośka Maria, Litwiniec Anna (2014) *Miscanthus*: Genetic Diversity and Genotype Identification Using ISSR and RAPD Markers. *Molecular Biotechnology* 56: 911-924. doi: 10.1007/s12033-014-9770-0
2. Cichorz Sandra, Gośka Maria, Rewers Monika (2015) *Miscanthus*: Inter- and Intraspecific Genome Size Variation Among *M. × Giganteus*, *M. Sinensis*, *M. Sacchariflorus* Accessions. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* 57: 104-113. doi: 10.1515/abcsb-2015-0013
3. Cichorz Sandra, Gośka Maria, Mańkowski Dariusz R. (2018) *Miscanthus × giganteus*: regeneration system with assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* culture. *Industrial Crops and Products* 116: 150-161. doi: 10.1016/j.indcrop.2018.02.055

WPROWADZENIE

W ciągu ostatnich dwudziestu lat wieloletnie trawy z rodzaju *Miscanthus* Anderss. dołączyły do światowej czołówki roślin uprawianych na cele energetyczne. Naturalną strefą występowania powyższego rodzaju są subtropikalne, tropikalne i umiarkowane obszary Azji Południowo-Wschodniej oraz Wysp Pacyfiku. U omawianych roślin występuje fotosynteza typu C₄, co skutkuje wysoką wydajnością asymilacji CO₂ (Jeżowski 1999, Clifton-Brown i in. 2008, Clark i in. 2014, Iqbal i Lewandowski 2016, Clifton-Brown i in. 2017). Nawet w warunkach niskich temperatur pewne genotypy zachowują wysoką efektywność fotosyntezy (Głowacka i in. 2015). Uznaje się, że najwyższy potencjał do produkcji biomasy posiadają trzy gatunki, w tym: miskant chiński (*M. sinensis*), cukrowy (*M. sacchariflorus*) oraz olbrzymi (*M. × giganteus*). Przy czym ostatni z wyżej wymienionych – miskant olbrzymi (2n = 3x = 57), jako triploidalny mieszaniec międzygatunkowy, powstały w wyniku naturalnego krzyżowania diploidalnego miskanta chińskiego (2n = 2x = 38) z allotetraploidalnym miskantem cukrowym (2n = 4x = 76), wykazuje najwyższy

potencjał plonotwórczy, co jest efektem heterozji (Clifton-Brown i in. 2008, Nishiwaki i in. 2011, Sacks i in. 2013). Z uwagi na zaburzenie równowagi genomowej oraz zakłócenie prawidłowego rozwoju gametofitu żeńskiego i męskiego, na komercyjną skalę miskant olbrzymi rozmnażany jest wyłącznie wegetatywnie. Wpłynęło to na znaczne zawężenie puli genetycznej powyższego gatunku (Linde-Laursen 1993, Lafferty i Lelley 1994, Clifton-Brown i in. 2008, Słomka i in. 2012, Tamura i in. 2016). Jednym z rozwiązań mających na celu zwiększenie zróżnicowania genetycznego omawianych traw jest kolekcja i charakterystyka nowych genotypów pozyskanych ze środowiska naturalnego (Tamura i in. 2016). Natomiast nie ma pewności, że obiekty pochodzące z ekspedycji będą przystosowane do warunków klimatu umiarkowanego. Inne możliwości upatruje się w resyntezie mieszańców o ulepszonych cechach jakościowych poprzez dobór wyselekcjonowanych komponentów rodzicielskich. Sprzyja temu również zdolność do krzyżowania w obrębie powyższych gatunków (Deuter i Jeżowski 1998). Jednakże prowadzone prace hodowlane mające na celu poszerzenie puli genetycznej są na wczesnym etapie rozwoju i jak dotąd nie przyniosły oczekiwanych rezultatów (Clifton-Brown i in. 2008). Z uwagi na brak informacji dotyczących przynależności gatunkowej, dokładnego pochodzenia oraz charakterystyki zróżnicowania genetycznego gatunków z rodzaju *Miscanthus* dostępnych na polskim rynku, istotnego znaczenia nabiera identyfikacja i klasyfikacja materiału roślinnego. Dodatkowo, kluczowym etapem dla uzyskania wartościowego materiału rozmnożeniowego jest opracowanie wydajnej metody produkcji mikrosadzonek z potwierdzoną stabilnością genetyczną i epigenetyczną.

CEL BADAŃ

Hipoteza naukowa

1. Istnieje przypuszczenie, iż dostępna pula genetyczna miskanta olbrzymiego jest zawężona.
2. Miskant olbrzymi może efektywnie regenerować w kulturach *in vitro*, wykazując stabilność genetyczną i epigenetyczną podczas długoterminowego przechowywania.
3. Odmiany miskanta chińskiego mogą wykazywać istotne zróżnicowanie genetyczne.

Cel badań

Cytogenetyczna i molekularna charakterystyka zróżnicowania genetycznego w obrębie trzech gatunków z rodzaju *Miscanthus*: *M. × giganteus*, *M. sinensis* oraz *M. sacchariflorus*. Ocena zdolności regeneracyjnych oraz stabilności genetycznej i epigenetycznej miskanta olbrzymiego podczas długoterminowego rozmnażania w warunkach kultur *in vitro*.

Cele szczegółowe

1. Opracowanie metod identyfikacji oraz oceny zróżnicowania genetycznego ekotypów, klonów, odmian i gatunków rodzaju *Miscanthus* z wykorzystaniem markerów molekularnych ISSR oraz RAPD;
2. Analiza międzygatunkowego i wewnątrzgatunkowego zróżnicowania wielkości genomu miskanta z wykorzystaniem cytometrii przepływowej;
3. Weryfikacja przydatności metody pomiaru długości aparatów szparkowych do oceny stopnia ploidalności miskanta;
4. Opracowanie efektywnego systemu rozmnażania miskanta olbrzymiego w kulturach *in vitro* poprzez weryfikację właściwego składu pożywki i warunków prowadzenia kultury;
5. Ocena stabilności genetycznej i epigenetycznej miskanta olbrzymiego utrzymywanego długoterminowo w warunkach kultur *in vitro* za pomocą markerów molekularnych ISSR, RAPD oraz MS-ISSR.

MATERIAŁ I METODY

Materiał badawczy w publikacji nr 1 i nr 2 stanowiła kolekcja polowa IHAR-PIB Oddział w Bydgoszczy złożona z 18 genotypów rodzaju *Miscanthus*, obejmujących trzy gatunki: *M. × giganteus*, *M. sacchariflorus* oraz *M. sinensis* (Cichorz i in. 2014, 2015). Natomiast do opracowania wydajnej metody mikrorozmnażania *in vitro* w publikacji nr 3 użyto 2385 niedojrzałych kwiatostanów *M. × giganteus* (klon niemiecki) wyłożonych na pożywki indukcyjne. Zaś zmienność w długoterminowych kulturach *in vitro* oceniono z wykorzystaniem 4 roślin rodzicielskich (pięcioletnie

poletko doświadczalne IHAR-PIB) oraz 16 roślin *M. × giganteus* (klon niemiecki) utrzymywanych w kulturach *in vitro* odpowiednio od 2008, 2009, 2013, 2014 roku (Cichorz i in. 2018).

Metody badawcze w prezentowanych publikacjach obejmowały:

1. *Analizę molekularną kolekcji polowej*
 - 1.1 *Izolację DNA*
 - 1.2 *ISSR PCR*
 - 1.3 *RAPD PCR*
2. *Analizy cytogenetyczne kolekcji polowej*
 - 2.1 *Ocenę stopnia ploidalności za pomocą cytometrii przepływowej*
 - 2.2 *Oznaczenie wielkości genomu za pomocą cytometrii przepływowej*
 - 2.3 *Pomiar długości aparatów szparkowych*
 - 2.4 *Określenie liczby chromosomów*
3. *Optymalizację systemu regeneracji in vitro M. × giganteus*
 - 3.1 *Indukcję kalusa*
 - 3.2 *Rozmnażanie i regenerację pędów*
 - 3.3 *Ukorzenianie i regenerację roślin*
 - 3.4 *Aklimatyzację roślin*
4. *Analizę stabilności genetycznej i epigenetycznej M. × giganteus w kulturach in vitro oraz klonowanie, sekwencjonowanie i kontrolę produktów MS-ISSR ulegających metylacji*
5. *Analizy statystyczne*

WYNIKI

W publikacji nr 1 opracowano wiarygodne i powtarzalne profile DNA pozwalające na identyfikację osobniczą i gatunkową miskanta. Ponadto przeprowadzono ocenę zróżnicowania klonów, ekotypów oraz odmian trzech gatunków rodzaju *Miscanthus*: *M. × giganteus* (4 klony), *M. sinensis* (12 odmian) oraz *M. sacchariflorus* (2 ekotypy) z zastosowaniem markerów molekularnych ISSR i RAPD. Określono również stopień ploidalności poszczególnych osobników za pomocą cytometrii przepływowej.

W wyniku przeprowadzonych reakcji ISSR-PCR z wykorzystaniem 15 najbardziej polimorficznych starterów otrzymano łącznie 443 produkty, z czego 435 (98%) było polimorficznych. Liczba prążków generowanych przez jeden starter wynosiła od 12 do 40, zaś ich wielkość zawierała się w przedziale od 23 do 3365 pz. Najbardziej przydatne do fingerprintingu osobników miskanta okazały się startery: ISSR1, ISSR2, ISSR3. Dla porównania w analizach RAPD-PCR najwyższy polimorfizm wykazały startery: RAPD1, RAPD2, RAPD3, RAPD4. Drugi system markerów generował od 6 do 29 prążków, co łącznie wyniosło 155 produktów, z czego 145 (94%) stanowiły prążki polimorficzne w obrębie wszystkich genotypów, zaś wielkość produktów mieściła się w zakresie od 138 do 1613 pz.

Obydwa systemy markerów molekularnych pozwoliły na identyfikację osobniczą miskanta. Do tego celu wystarczyło użycie jednego startera ISSR (ISSR1) lub trzech starterów RAPD (RAPD1, RAPD2, RAPD4). Ponadto zastosowanie powyższych metod zweryfikowało klasyfikację genotypu błędnie oznaczonego jako *M. floridulus*, który prawidłowo przyporządkowano do gatunku *M. × giganteus*. Dla każdego z osobników miskanta olbrzymiego wytypowano unikalne produkty: jeden dla klonu niemieckiego, dwa dla klonu kanadyjskiego i angielskiego oraz pięć dla klonu kwiecistego.

W wyniku przeprowadzonych reakcji wytypowano produkty umożliwiające identyfikację gatunkową. Łącznie uzyskano 7 prążków (4 ISSR oraz 3 RAPD) występujących wyłącznie u wszystkich osobników miskanta olbrzymiego, zaś nieobecnych u pozostałych genotypów, 1 produkt (ISSR) charakterystyczny dla miskanta chińskiego oraz 8 (5 ISSR i 3 RAPD) typowych dla miskanta cukrowego.

Wartość współczynnika podobieństwa genetycznego wyznaczona na podstawie obydwu systemów markerów łącznie w przypadku *M. × giganteus* wyniosła 0,94. Nieco niższą wartość wykazały genotypy *M. sacchariflorus* – 0,82, zaś najniższą oszacowano dla odmian *M. sinensis* – 0,61. Wartość współczynnika podobieństwa genetycznego błędnie oznaczonego genotypu *M. floridulus* była najwyższa w odniesieniu do gatunku *M. × giganteus* i wyniosła 0,74. Powyższe wyniki miały swoje potwierdzenie w dendrogramach oraz na wykresie analizy PCoA, na podstawie których można stwierdzić, że wszystkie badane osobniki zostały pogrupowane w trzy główne skupienia, zgodnie z przynależnością gatunkową, z wyjątkiem *M. floridulus*, który występował w tym samym skupieniu co *M. × giganteus*. W obrębie gatunku miskanta

olbrzymiego najbardziej zbliżone genetycznie były klony niemiecki i kanadyjski. Klon angielski różnił się znikomą, zaś najbardziej oddalony okazał się klon kwiecisty. Ponadto analiza skupień wykazała, że miskant olbrzymi był bardziej zbliżony do miskanta cukrowego niż chińskiego.

Na podstawie analiz cytometrycznych stwierdzono, że osobniki miskanta olbrzymiego oraz odmiana 'Goliath' miskanta chińskiego były triploidami, natomiast pozostałe genotypy były diploidalne.

W publikacji nr 2 oceniono międzygatunkowe i wewnątrzgatunkowe zróżnicowanie zawartości jądrowego DNA u trzech gatunków miskanta: *M. × giganteus* (4 klony), *M. sinensis* (12 odmian) oraz *M. sacchariflorus* (2 ekotypy) z wykorzystaniem cytometrii przepływowej. Zweryfikowano wykorzystanie powyższego parametru do identyfikacji gatunkowej poszczególnych osobników. Na podstawie oszacowanej wielkości genomu monoploidalnego (1Cx) analizowanych genotypów określono możliwość wytypowania potencjalnych komponentów rodzicielskich z rodzaju *Miscanthus* użytych do krzyżowań. Oceniono przydatność pomiaru długości aparatów szparkowych do precyzyjnego wyznaczenia stopnia ploidalności roślin miskanta, która została potwierdzona oznaczeniem liczby chromosomów.

Dla wszystkich analizowanych osobników zawartość 2C DNA zawierała się w przedziale od 4,58 pg do 8,34 pg i umożliwiła weryfikację ich przynależności gatunkowej. Najwyższa wielkość genomu była obserwowana u triploidalnego miskanta chińskiego odmiany 'Goliath' (8,34 pg; $2n = 3x = 57$), który przypuszczalnie powstał w wyniku skrzyżowania diploidalnego i tetraploidalnego miskanta chińskiego. W przypadku triploidalnych genotypów miskanta olbrzymiego ($2n = 3x = 57$) (najprawdopodobniej krzyżówka diploidalnego miskanta chińskiego z tetraploidalnym miskantem cukrowym) średnia zawartość jądrowego DNA wyniosła 7,43 pg i istotnie różniła się od odmiany 'Goliath', co dodatkowo potwierdziło przypuszczenie o odmiennej kompozycji rodzicielskiej tych mieszańców. Pośrednie wartości uzyskano dla diploidalnych miskantów chińskich (5,52-5,72 pg; $2n = 2x = 38$), zaś istotnie niższe wartości obserwowano u diploidalnych ekotypów miskanta cukrowego (4,58 i 4,59 pg; $2n = 2x = 38$). Przeprowadzone analizy potwierdziły, że różnice w zawartości 2C DNA, a także wielkości genomu monoploidalnego (1Cx) między trzema gatunkami miskanta

są istotne statystycznie ($P < 0,01$). Natomiast istotne zróżnicowanie wewnątrzgatunkowe zaobserwowano wyłącznie w obrębie miskanta chińskiego. Odmiany o największym genomie: 'Sirene', 'Graziella' oraz 'Variegatus' ($5,72 \pm 0,04$ pg) miały o około 4% wyższą zawartość 2C DNA niż odmiana o najmniejszym genomie ('Malepartus' – $5,52 \pm 0,01$ pg).

Analiza wariancji długości aparatów szparkowych wykazała istotne różnice pomiędzy poszczególnymi osobnikami, zaś średnie wartości w obrębie gatunku miskanta olbrzymiego, chińskiego oraz cukrowego wyniosły odpowiednio: 30,88 μm , 27,10 μm , 25,05 μm . Najdłuższe aparaty szparkowe zaobserwowano u miskanta chińskiego 'Goliath' (33,62 μm), a najkrótsze u 'Gracillimus' (23,57 μm). Korelacja pomiędzy długością aparatów szparkowych, stopniem ploidalności oraz zawartością 2C DNA okazała się silna, zaś korelacja dla zawartości 2C DNA, stopnia ploidalności oraz liczby chromosomów okazała się bardzo silna. Biorąc pod uwagę brak istotnych różnic pomiędzy długością aparatów szparkowych triploidalnych genotypów miskanta olbrzymiego: 'Great Britain' (średnio 30,70 μm) oraz 'Canada' (średnio 29,67 μm), a diploidalnym miskantem chińskim 'Graziella' (średnio 29,96 μm) oznaczenie stopnia ploidalności na podstawie długości aparatów szparkowych bywa nieprecyzyjne i może prowadzić do błędnych wniosków.

W publikacji nr 3 opracowano efektywny system mikropropagacji miskanta olbrzymiego w kulturach *in vitro* obejmujący indukcję kalusa, regenerację i rozmnażanie pędów, ukorzenianie oraz aklimatyzację roślin, jak również zawarto ocenę wpływu długoterminowego utrzymywania powyższego gatunku w warunkach kultur *in vitro* na stabilność genetyczną i epigenetyczną z wykorzystaniem markerów ISSR, RAPD, MS-ISSR.

Różne stężenia i kombinacje regulatorów wzrostu (łącznie 40 wariantów) miały istotny wpływ na indukcję i wydajność regeneracji kalusa na pożywce MS. Tworzenie powyższej tkanki zaobserwowano po upływie 3 tygodni od inicjacji kultury, zaś morfogenezę oceniono po 6-8 tygodniach hodowli. Na fragmentach niedojrzałych kwiatostanów regenerowały także korzenie oraz sporadycznie pędy, co również było istotnie zależne od zastosowanej kombinacji regulatorów wzrostu. Na pożywce kontrolnej MS bez dodatku regulatorów wzrostu oraz na pożywkach MS zawierających 0,1; 0,5 oraz 1,0 $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP nie zaobserwowano regeneracji kalusa, natomiast

zwiększenie stężenia do $2,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP powodowało niewielki wzrost. Wzbogacenie pożywek indukcyjnych wyłącznie w auksynę ($2,5$ i $5,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D) poskutkowało niską wydajnością morfogenezy oraz wysokim procentem regeneracji korzeni (odpowiednio 26,29% oraz 35,62%). Uzupełnienie pożywek 2,4-D i BAP lub TDZ było nieodzowne do indukcji organogennego oraz kremowo-żółtego embriogennego kalusa o średnio zbitej i gruzelkowatej strukturze, a najwyższy stopień regeneracji uzyskano na pożywce z dodatkiem $5,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP i $5,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D (83,33%). Wariant ten uznano za najlepszy do inicjacji regeneracji kalusa w celu dalszej proliferacji pędów. Kombinacja $2,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ 2,4-D i $5,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP okazała się natomiast najlepsza do indukcji kalusa z przeznaczeniem do długoterminowego przechowywania w kulturach *in vitro*. Embriogeny kalus przenoszono następnie na pożywki regenerujące pędy. Stężenie i kombinacja regulatorów wzrostu istotnie wpłynęły na liczbę uzyskanych pędów, przy czym dodatek $5,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP do pożywki MS był najbardziej efektywny, a zregenerowane pędy wykazywały wigor oraz prawidłowy kolor i pokrój. Obecność w pożywce TDZ powodowała słaby wzrost pędów i ich witrifikację. Na efektywność indukcji korzeni również istotnie wpłynął dodatek regulatorów wzrostu. W trzecim tygodniu kultury najwyższy procent ukorzeniania (85,17%) uzyskano w obecności $3,0 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ IBA, zaś w piątym tygodniu 97% pędów było ukorzenionych. Zregenerowane rośliny aklimatyzowano do warunków szklarniowych i polowych z wydajnością 93%. Przez okres sześciu miesięcy otrzymano łącznie 7000 sadzonek.

Do oceny stabilności genetycznej i epigenetycznej użyto 4 genotypów matecznych pochodzących z kolekcji polowej oraz 16 genotypów utrzymywanych dłużej (2008/2009) oraz krócej (2013/2014) w kulturach *in vitro*. Charakterystykę genetyczną wykonano z użyciem 13 starterów ISSR oraz 9 starterów RAPD. Dla pierwszego systemu markerów molekularnych przeanalizowano 100 *loci*, z czego 8 (8%) było polimorficznych, zaś dla drugiego 77 *loci* z czego 6 (7,79%) było polimorficznych. Polimorfizm prążków wyniósł 0,45% zarówno dla metody ISSR (z 2000 produktów w obrębie wszystkich genotypów 9 było polimorficznych), jak i RAPD (z 1540 produktów 7 było polimorficznych). W celu wyeliminowania potencjalnych błędów w interpretacji wyników wyznaczono współczynnik błędu na poziomie *locus* (5,50%) oraz na poziomie produktu (0,82%). W obrębie materiałów matecznych nie odnotowano żadnych różnic we wzorach prążkowych, a w przypadku

trzech regenerantów: Reg. 11 (2013), Reg. 10 (2014) oraz Reg. 13 (2009) polimorfizm na poziomie *locus* wyniósł odpowiednio: 5,08%, 3,39% oraz 0,56%. Wartość współczynnika podobieństwa genetycznego powyższych osobników zawierała się w przedziale od 0,97 do 0,99, co świadczy o znikomych różnicach.

Zmiany metylacyjne genomu analizowano z zastosowaniem 15 wyselekcjonowanych starterów MS-ISSR, w rezultacie czego oceniono zmienność w obrębie 130 *loci*. Z wykorzystaniem powyższego systemu markerów uzyskano 4 warianty zdarzeń. Najczęściej (99 *loci*; 76,02%) występował typ I (1-1-1), który można interpretować jako brak sekwencji CCGG lub pełną metylację zewnętrznej cytozyny, skutkującą zablokowaniem trawienia przez enzymy *HpaII* oraz *MspI*. Całkowity brak metylacji powyższych sekwencji (typ IV, 1-0-0) wystąpił na poziomie 7,70%. Natomiast pełna metylacja wewnętrznej cytozyny (typ II, 1-1-0) występowała częściej (9,97%) niż hemimetylacja zewnętrznej cytozyny (1-0-1, typ III), która utrzymała się na poziomie 6,35%. Całkowita liczba zmetylowanych *loci* u roślin krócej i dłużej przebywających w kulturach *in vitro* wyniosła odpowiednio 16,71% oraz 16,66% i była nieco wyższa niż w przypadku roślin matecznych utrzymywanych w kolekcji polowej (14,81%). Częstotliwość występowania polimorfizmów w metylacji sekwencji CCGG między poszczególnymi regenerantami wyniosła od 0,77% do 3,08% (średnio 1,54%). Dziesięć prążków wykazujących odmienny status metylacji poddano klonowaniu i sekwencjonowaniu, zaś tożsamość ośmiu z nich potwierdzono za pomocą SCAR-PCR. Na podstawie analiz BLAST stwierdzono, iż różne typy sekwencji podlegają zmianom metylacyjnym. Dwa spośród analizowanych produktów (25%) były homologiczne do sekwencji sztucznego chromosomu bakteryjnego (BAC, ang. *Bacterial Artificial Chromosome*) mieszańca *Saccharum*, dwa do mRNA *Sorghum bicolor* i *Zea mays* oraz dwa do genomowej sekwencji *Oryza sativa* oraz *Sorghum spontaneum*. Jedna sekwencja (12,5%) wykazała homologię z sekwencją mikrostalitarną *Miscanthus sacchariflorus*, natomiast ostatnia nie była zbliżona z żadną sekwencją z GenBanku.

WNIOSKI

1. Opracowane warunki prowadzenia reakcji z markerami ISSR oraz RAPD pozwoliły na identyfikację wybranych klonów, ekotypów, odmian i gatunków *M. × giganteus*, *M. sinensis* oraz *M. sacchariflorus*.
2. Markery molekularne ISSR wykazały wyższy poziom polimorfizmu oraz szerszy zakres wielkości produktów, a tym samym okazały się bardziej efektywne do identyfikacji osobniczej i gatunkowej miskanta niż markery molekularne RAPD. Użycie 1 startera ISSR oraz 3 starterów RAPD było wystarczające do identyfikacji osobników miskanta należących do kolekcji polowej IHAR-PIB.
3. W obrębie analizowanej puli genetycznej miskanta olbrzymiego zaobserwowano bardzo niskie zróżnicowanie genetyczne, co najprawdopodobniej wskazuje na wspólne źródło pochodzenia trzech spośród czterech klonów. Ekotypy miskanta cukrowego wykazały relatywnie niskie zróżnicowanie, natomiast między odmianami miskanta chińskiego odnotowano duże zróżnicowanie genetyczne. Gatunek miskanta olbrzymiego wykazał większe podobieństwo genetyczne do miskanta cukrowego niż chińskiego.
4. Analizy cytometryczne potwierdziły istotne zróżnicowanie wielkości genomu miskanta na poziomie międzygatunkowym, a także w obrębie odmian miskanta chińskiego. Stwierdzono istotne różnice w zawartości 2C DNA oraz wielkości genomu monoploidalnego (1Cx) między trzema gatunkami miskanta. Wśród odmian miskanta chińskiego występowała istotna statystycznie wewnątrzgatunkowa zmienność w wielkości genomu na poziomie około 4%.
5. Różnice w wielkości genomu trzech gatunków miskanta umożliwiły identyfikację mieszańców i potwierdzenie odmiennych komponentów rodzicielskich w przypadku triploidalnych klonów miskanta olbrzymiego oraz miskanta chińskiego odmiany 'Goliath'.

6. Oznaczenie stopnia ploidalności na podstawie długości aparatów szparkowych bywa nieprecyzyjne i może prowadzić do błędnych wniosków.
7. Optymalizacja warunków indukcji kalusa, rozmnażania i ukorzenia pędów pozwoliła na opracowanie wydajnego systemu mikrorozmnażania miskanta olbrzymiego. Stwierdzono, że dodatek do pożywek indukcyjnych auksyny (2,4-D) oraz cytokinin (BAP lub TDZ) w odpowiedniej proporcji był niezbędny do efektywnego tworzenia embriogennego lub organogennego kalusa z niedojrzałych kwiatostanów miskanta olbrzymiego.
8. Miskant olbrzymi efektywnie regeneruje w kulturach *in vitro*, wykazując stabilność genetyczną i epigenetyczną podczas długoterminowego przechowywania. Jednakże podczas analiz zróżnicowania genetycznego warto zwrócić szczególną uwagę na rejony genomu bogate w powtórzenia: GACA, GATA, AG oraz CTC.

SPIS LITERATURY

- Cichorz S., Gośka M., Litwiniec A. (2014) *Miscanthus*: genetic diversity and genotype identification using ISSR and RAPD markers. *Mol Biotechnol* 56: 911-924
- Cichorz S., Gośka M., Rewers M. (2015) *Miscanthus*: inter- and intraspecific genome size variation among *M. × giganteus*, *M. sinensis*, *M. sacchariflorus* accessions. *Acta Biol Cracov Bot* 57: 104-113
- Cichorz S., Gośka M., Mańkowski D.R. (2018) *Miscanthus × giganteus*: regeneration system with assessment of genetic and epigenetic stability in long-term *in vitro* culture. *Ind Crop Prod* 116: 150-161
- Clark L.V., Brummer J.E., Głowacka K., Hall M.C., Heo K., Peng J., Yamada T., Yoo J.H., Yu C.Y., Zhao H., Long S.P., Sacks E.J. (2014) A footprint of past climate change on the diversity and population structure of *Miscanthus sinensis*. *Ann Bot-London* 114: 97-107

- Clifton-Brown J.C., Chiang Y.Ch., Hodkinson T.R. (2008) *Miscanthus*: Genetic Resources and Breeding Potential to Enhance Bioenergy Production. W: Genetic Improvement of Bioenergy Crops. Red. W. Vermerris. Springer, Gainesville, str. 273-293
- Clifton-Brown J.C., McCalmont J., Hastings A. (2017) Development of *Miscanthus* as a Bioenergy Crop. W: Biofuels and Bioenergy. Red. J. Love , J.A. Bryant. John Wiley & Sons, Chichester, str. 119-132
- Deuter M., Jeżowski S. (1998) Szanse i problemy hodowli traw z rodzaju *Miscanthus* jako roślin alternatywnych. Hodowla Roślin i Nasiennictwo 2: 45-48
- Głowacka K., Jørgensen U., Kjeldsen J.B., Kørup K., Spitz I., Sacks E.J., Long S.P. (2015) Can the exceptional chilling tolerance of C4 photosynthesis found in *Miscanthus × giganteus* be exceeded? Screening of a novel *Miscanthus* Japanese germplasm collection. Ann Bot-London 115: 981-990
- Iqbal Y., Lewandowski I. (2016) Biomass composition and ash melting behaviour of selected miscanthus genotypes in Southern Germany. Fuel 180: 606-612
- Jeżowski S. (1999) Miskant chiński (*Miscanthus sinensis* (Thunb.) Andersson) – źródło odnawialnych i ekologicznych surowców dla Polski. Zeszyty Problemowe Postępów Nauk Rolniczych 468: 159-166
- Lafferty J., Lelley T. (1994) Cytogenetic studies of different *Miscanthus* species with potential for agricultural use. Plant Breeding 113: 246-249
- Linde-Laursen I. (1993) Cytogenetic analysis of *Miscanthus* 'Giganteus', an interspecific hybrid. Hereditas 119: 297-300
- Nishiwaki A., Mizuguti A., Kuwabara S., Toma Y., Ishigaki G., Miyashita T., Yamada T., Matuura H., Yamaguchi S., Rayburn A.L., Akashi R., Stewart J.R. (2011) Discovery of natural *Miscanthus* (Poaceae) triploid plants in sympatric populations of *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan. Am J Bot 98: 154-159
- Sacks E.J., Juvik J.A., Lin Q., Stewart J.R., Yamada T. (2013) The gene pool of *Miscanthus* species and its improvement. W: Genomics of the Saccharinae, Plant Genetics and Genomics: Crops and Models. Red. A.H. Paterson. Springer Science + Business Media, New York, str. 73-100

- Słomka A., Kuta E., Plažek A., Dubert F., Żur I., Dubas E., Kopeć P., Żurek G. (2012) Sterility of *Miscanthus* × *giganteus* results from hybrid incompatibility Acta Biol Cracov Bot 54: 113-120
- Tamura K., Uwatoko N., Yamashita H., Fujimori M., Akiyama Y., Shoji A., Sanada Y., Okumura K., Gau M. (2016) Discovery of natural interspecific hybrids between *Miscanthus sacchariflorus* and *Miscanthus sinensis* in southern Japan: morphological characterization genetic structure, and origin. Bioenerg Res 9: 315-325