

Lp. w zał. do Rozporządzenia MRiRW: 12.

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

Kierownik zadania: **dr hab. P. Bednarek prof. IHAR-PIB**

Cel tematu badawczego 1

Uzyskanie roślin donorowych dla kilku gatunków zbóż (jęczmień, pszenica, pszenżyto), będących materiałem wyjściowym do kultur *in vitro*.

Materiały i metody

Wszystkie regeneranty, z których otrzymano rośliny donorowe (DH) wyprowadzono na drodze androgenezy w kulturze pylników. Do założenia kultur wykorzystano rośliny wyjściowe pochodzące z ziarniaków trzech gatunków zbóż:

- jęczmienia jarego - genotypy: 19dh/4 i 2dh/8
- pszenicy jarej - genotypy: P2/9 i P2/14
- pszenżyta ozimego - 28/2 i 32/1 i 47/4

Wyniki i dyskusja

W wyniku regeneracji na drodze kultur pylnikowych uzyskano regeneranty z roślin jęczmienia, pszenżyta i pszenicy po 24 szt dla każdego gatunku, będące podwojonymi haploidami. Rośliny te doprowadzono do dojrzałości a następnie zebrano nasiona. Uzyskane podwojone haploidy miały fenotyp identyczny z roślinami będącymi źródłem tkanek do regeneracji. Wyjątkiem była frakcja roślin albinotycznych, które w dużej ilości obserwowano u wszystkich gatunków. Mimo problemów związanych z albinizmem zastosowane metody regeneracji dla jęczmienia, pszenicy i pszenżyta pozwoliły na uzyskanie planowanej ilości regenerantów na drodze androgenezy.

Haploidyzacja roślin w warunkach kultur tkankowych jest od wielu lat stosowana w badaniach podstawowych oraz na szerszą skalę w pracach hodowlanych. Z jednej strony wprowadzanie do procesów hodowlanych form całkowicie homozygotycznych skraca czas otrzymywania nowych odmian, z drugiej strony formy takie są wykorzystywane w badaniach podstawowych np. do mutagenezy lub w pracach opartych na technikach markerów molekularnych.

U zbóż powszechną drogą uzyskiwania podwojonych haploidów są kultury pylnikowe lub kultury izolowanych mikrospor. Techniki te, wykorzystujące proces androgenezy, są zależne od genotypu, ponadto problemem jest także obecność regenerantów albinotycznych, które są efektem nieprawidłowości wynikających z wadliwej budowy plastydów. W prezentowanym zadaniu także zetknięto się z obecnością roślin albinotycznych, jednakże wyjściowa pula kłosów przygotowana do uzyskania pylników pozwoliła na otrzymanie założonej ilości zielonych regenerantów.

Wnioski

Zastosowane metody regeneracji dla jęczmienia, pszenicy i pszenżyta pozwoliły na uzyskanie planowanej ilości regenerantów na drodze androgenezy;

Cel tematu badawczego 2

Pozyskanie materiału genetycznego (genomowe DNA) z trzech odmian zbóż wybranych do analizy; sprawdzenie poziomu zmienności (epi)genetycznej między roślinami donorowymi;

Materiały i metody

Wysiano nasiona ze zregenerowanych roślin uzyskując po 100 siewek dla każdego gatunku (50 nasion x 2 genotypy jęczmienia, 50 nasion x 2 genotypy pszenicy i 33 nasiona x 3 genotypy pszenżyta). Do analizy wybrano po jednym genotypie dla każdego gatunku: jęczmień 2dh/8, pszenica P2/9, pszenżyto 28/2. Pulę roślin donorowych stanowiły te siewki, które uzyskano z nasion jednego kłosa regenerantów otrzymanych w poprzednim zadaniu. Docelowo wybrano po 24 rośliny donorowe dla każdego gatunku.

Z siewek zbóż zebrano liście. DNA pozyskiwano ze 100 mg tkanki za pomocą zestawu do izolacji firmy QIAGEN. Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie a czystość oraz integralność preparatów zweryfikowano elektroforetycznie w żelu agarozowym. Tak pozyskane preparaty DNA poddano analizie techniką met AFLP, wykonując kolejno: trawienie DNA, ligacje adapterów, wstępny PCR oraz selektywny PCR. Wizualizacje produktów PCR wykonywano radiograficznie. Analiza

wzorów prążkowych stanowi podstawę do szacowania zróżnicowania genetycznego między roślinami donorowymi.

Wyniki i dyskusja

Wykonano rozdziały metAFLP wykorzystując 13 par selektywnych starterów dla 24 roślin z każdego z wybranych gatunków zbóż uzyskując wzory fragmentów DNA wizualizowane autoradiograficznie. Amplifikowano odpowiednio 348 fragmentów DNA dla jęczmienia, 543 dla pszenicy oraz 460 dla pszenżyta. Średnio każda para starterów powieliła 27 fragmentów u jęczmienia, 42 u pszenicy i 35 fragmentów DNA u pszenżyta. Obserwowany polimorfizm w wyniku cięcia DNA jęczmienia enzymami *Acc65I* i *MseI* wynosił 5,17%, u pszenicy 3,86%, zaś u pszenżyta 3,04%. Analogiczne wyniki dla cięcia DNA enzymami *KpnI* i *MseI* wynosiły odpowiednio: 2,01% dla jęczmienia, 2,76% dla pszenicy oraz 0,87% dla pszenżyta. Po wyeliminowaniu roślin wnoszących największą zmienność w każdym gatunku, uzyskano następujący poziom zróżnicowania genetycznego w przypadku zastosowania enzymów *Acc65I* i *MseI*: dla jęczmienia 0,57%, 0,37% dla pszenicy i 0,65% dla pszenżyta. Podobne wartości zmienności obserwowano gdy DNA poddano cięciu enzymami *KpnI* i *MseI*: 0,57% dla jęczmienia, 0,37% dla pszenicy oraz 0,43% dla pszenżyta. Na podstawie danych molekularnych wykonano analizę skupień dla roślin donorowych wszystkich trzech gatunków zbóż. Analiza ta uwidoczniła, jednoznaczne grupowanie się danych dla obydwu par enzymów restrykcyjnych. Wynik taki świadczy o odrębności danych uzyskanych poprzez dwa zestawy enzymów restrykcyjnych. Jednocześnie na podstawie dendrogramu i danych molekularnych możliwe było wskazanie rośliny o najmniejszym zróżnicowaniu (epi)genetycznym. Wytypowano podstawową pulę roślin donorowych (32 rośliny), które posłużą do uzyskania regenerantów będących obiektem analizy w dalszych doświadczeniach. Wśród wytypowanych roślin donorowych zmienność nie przekraczała 1% niezależnie od badanego gatunku. Ponadto, uzyskane dane molekularne pozwolą na wykluczenie z analiz ilościowych markerów, które wśród regenerantów pochodzących od tej samej rośliny donorowej wykazywały zmienność identyfikowaną metodą metAFLP.

Wnioski

Wytypowane na podstawie danych metAFLP rośliny donorowe będące generatywnym potomstwem regenerantów uzyskanych na drodze androgenezy charakteryzują się minimalnym poziomem zmienności (epi)genetycznej i mogą być wykorzystane do dalszych badań.