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

Wyprowadzenie materiału badawczego dla jęczmienia, pszenicy i pszenżyta (regeneranty otrzymywane na drodze embriogenezy somatycznej i androgenezy) oraz analizy molekularne: ekstrakcja DNA i wstępne analizy metAFLP.

Materiał i metody

Uzyskanie regenerantów

Regeneranty zostały wyprowadzone na drodze embriogenzy somatycznej w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych oraz androgenezy w kulturach pylnikowych z roślin donorowych uzyskanych w ubiegłym roku projektu. Do założenia kultur wykorzystano rośliny donorowe trzech gatunków zbóż: jęczmienia jarego - genotyp: 2dh/8, pszenicy jarej - genotyp: P2/9 oraz pszenżyta ozimego – genotyp 28/2.

Odpowiednie pożywki indukujące zarówno dla procesu somatycznej embriogenezy jak i androgenezy wykonano w dziewięciu różnych wariantach ze względu na dodatek $CuSO_4$ (0,1 µM, 5 µM i 10 µM) i $AgNO_3$ (0 mg/l, 2 mg/l,. 10 mg/l). Dodatkowym czynnikiem różnicującym poszczególne warianty etapu indukcji embriogenezy somatycznej był czas (4, 5, 6 tygodni). Nie stosowano żadnego czynnika antymitotycznego do podwojenia garnituru chromosomowego u regenerantów pozyskiwanych na drodze kultur pylnikowych. Efektywność pozyskiwania podwojonych haploidów wyprowadzanych na drodze androgenezy określono, jako procentowy udział liczby podwojonych haploidów do liczby wszystkich zielonych regenerantów.

Analizy molekularne

Z siewek regenerantów 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 metAFLP, wykonując kolejno: trawienie DNA, ligację adapterów, wstępny PCR oraz selektywnych PCR z czterema parami selektywnych starterów: CpXpG-AGC/MCAC, CpXpX-TAA/MCGT, CpXpG-AGG/MCGT oraz CpG-GAC/MCGT. Wizualizacje produktów PCR wykonywano radiograficznie.

Wyniki i dyskusja

Uzyskanie regenerantów

Pozyskiwanie roślin w kulturach *in vitro* jest obarczone wieloma trudnościami wynikającymi z rodzaju eksplantatu, genotypu roślin donorowych, rodzaju podłóż hodowlanych czy też warunków prowadzenia hodowli *in vitro*. Mimo prób przełamania każdej z takich trudności i opracowania coraz lepszego i wydajniejszego systemu regeneracji problemem jest czasem brak pełnej jednorodności fenotypowej lub genetycznej uzyskanych roślin. Wprowadzenie systemu optymalizacji pozwalającego tak dobrać różne składniki pożywek lub inne parametry mające wpływ na poziom zmienności (epi)genetycznej indukowanej w kulturze tkankowej lub też ilość zielonych regenerantów pomogłoby w uzyskiwaniu roślin o pożądanych parametrach, czyli np. o najmniejszym lub największym poziomie zmienności (epi)genetycznej albo też skutkowałoby otrzymaniem dużej liczby regenerantów o podwojonym garniturze chromosomowym. Z danych literaturowych wynika, że obecność $AgNO_3$ i $CuSO_4$ w pożywce mogą mieć wpływ na wydajność uzyskiwania roślin metodami kultur *in vitro*. Wiadomo również, że takim czynnikiem może być czas utrzymania eksplantatów (niedojrzałych

zarodków zygotycznych oraz pylników) na pożywkach indukujących. Optymalizacja omawianych zmiennych może mieć istotne znaczenie dla obecnie stosowanych metod kultur *in vitro* i doprowadzić do uzyskania lepszych wydajności.

Aby otrzymać zaplanowane ilości regenerantów wyłożono na pożywki indukujące 2150 zarodków zygotycznych jęczmienia, 1974 pszenicy i 2120 pszenżyta z roślin donorowych. W celu uzyskania regenerantów na drodze androgenezy wyłożono 5590 pylników jęczmienia, 7900 pszenicy i 7200 pylników pszenżyta.

Proces somatycznej embriogenezy w kulturach niedojrzałych zarodków zygotycznych badanych gatunków zbóż pozwolił na otrzymanie w sumie 135 regenerantów po 45 regenerantów dla każdego gatunku. Uzyskana liczba regenerantów w późniejszych etapach pozwoli na przeprowadzenie zaplanowanego eksperymentu optymalizacyjnego opartego na danych molekularnych. Ta metoda regeneracji roślin z uwagi na wyjściowy eksplantat (niedojrzałe zarodki zygotyczne) będący tkanką diploidalną nie jest obciążona ryzykiem wynikającym z podwojenia garnituru chromosomowego czy też zjawiskiem albinizmu, stąd też nie obserwowano nieprawidłowości w trakcie otrzymywania regenerantów, nie stwierdzono również by obecność soli miedzi i srebra oraz czas miały widoczny wpływ na regenerowane rośliny. Uzyskany wynik potwierdzają dane prezentowane przez innych badaczy.

Proces androgenezy w kulturach pylnikowych skutkował uzyskaniem od 6 do 47 zielonych regenerantów w zależności od badanego gatunku i wariantu zastosowanej pożywki. Dla wszystkich badanych gatunków określono ilość zregenerowanych zielonych roślin przypadających na 100 wyłożonych pylników (reg/100 pyl) w zależności od rodzaju pożywki. Najwięcej zielonych regenerantów u jęczmienia obserwowano na pożywkach nr 6, 7, 8 odpowiednio 3,9; 4,4 i 2,26 reg/100 pyl. Dla pożywek 6 i 7 wartości te były czterokrotnie wyższe niż dla pożywki kontrolnej (1,2 reg/100 pyl). Regeneracja zielonych roślin w kulturach pylnikowych pszenicy pozwoliła na uzyskanie najwyższej ilości regenerantów na pożywce numer 8 (4,4 reg/100 pyl), przewyższając wartość kontrolną (1,4 reg/100 pyl). Otrzymywanie regenerantów pszenżyta również charakteryzowało się zmienną liczbą zielonych roślin, które udało się pozyskać. Najwięcej zielonych regenerantów uzyskiwano na pożywkach nr. 5, 7, 8, 9 (3,7; 4,1; 3,8; i 5,5 reg/100pyl). Wartości te były dwukrotnie wyższe niż liczba regenerantów uzyskiwanych w warunkach kontrolnych (2,2 reg/100pyl). Zastosowanie różnych kombinacji pożywek indukujących cechujących się wariantami stężeń siarczanu miedzi pokazało, że składnik ten może pozytywnie wpływać na regenerację zielonych roślin w przypadku kultur pylnikowych. Uzyskane wstępne dane sugerują, że optymalny zakres siarczanu miedzi, wynoszący od 5 do 10 µM, prowadził do lepszych wyników niż te, uzyskiwane w próbie kontrolnej, zmniejszając ilość roślin albinotycznych na korzyść zielonych regenerantów. Innym składnikiem często testowanym w pracach dotyczących poprawy wydajności uzyskiwania roślin w kulturach tkankowych jest azotan srebra. Dodawany do podłoży $AgNO_3$ pozytywnie wpływał na wydajność androgenezy. Pożywki suplementowane azotanem srebra w ilości od 2 do 10 mg/l pozwalały na uzyskanie wyższej liczby zielonych regenerantów w porównaniu z warunkami kontrolnymi.

Wśród regenerantów uzyskiwanych na drodze androgenezy obserwowano również rośliny albinotyczne. Dla tej drogi regeneracji bardzo ważne jest, aby rośliny podwoiły swoją liczbę chromosomów. W realizowanym zadaniu podwojenie przebiegało w sposób spontaniczny bez stosowania substancji antymitotycznych a efektywność tego procesu wynosiła od 16% dla pszenżyta, poprzez 25% dla pszenicy do 50% w przypadku jęczmienia. Wydajność podwojenia dla uzyskanych regenerantów nie odbiegała znacząco od danych spotykanych w literaturze (65-90% jęczmień, 15-68% pszenica i 6-82% pszenżyto).

Analizy molekularne

O ile, zmienność fenotypową można łatwo identyfikować o tyle, zmiany genotypowe, których podłoże może wynikać ze zjawisk epigenetycznych, wymagają specjalnie dedykowanych metod

molekularnych do ich wykrycia. Zmiany epigenetyczne, choć nie wynikają z mutacji w sekwencji DNA, tak jak one mogą się dziedziczyć w kolejnych pokoleniach generatywnych i mieć wpływ np. na poziom ekspresji genów czy organizację genomu. Stąd odpowiednia charakterystyka genetyczna i epigenetyczna eksplantatów/roślin donorowych, jak i w dalszej kolejności otrzymywanych regenerantów, jest podstawą do doboru materiałów roślinnych do prac badawczych oraz hodowlanych. Zaproponowana w niniejszym zadaniu metoda badawcza (metAFLP) pozwoliła na jednoczesne badanie zmian na poziomie sekwencji DNA (zmiany genetyczne) oraz metylacji DNA (zmiany epigenetyczne) u roślin uzyskiwanych drogą kultur tkankowych. Analizy molekularne obejmowały ekstrakcję genomowego DNA z uzyskanych regenerantów oraz przygotowanie prób DNA do techniki metAFLP, a dalej wykonanie wstępnych analiz techniką metAFLP z czterema parami selektywnych starterów do reakcji PCR: CpXpG-AGC/MCAC, CpXpX-TAA/MCGT, CpXpG-AGG/MCGT oraz CpG-GAC/MCGT. Amplifikowano od 80 fragmentów DNA u jęczmienia, 130 fragmentów DNA u pszenicy i 124 fragmenty DNA u pszenżyta. Średnio obserwowano od 20 fragmentów DNA u jęczmienia do 32 fragmentów DNA u pszenicy przypadających na parę starterów. Na podstawie wstępnej analizy metAFLP dobrano rośliny do analizy oraz sprawdzono jakość uzyskiwanych profili DNA w technice metAFLP. Co więcej, wytypowano pary selektywnych starterów do analiz przewidzianych w kolejnym roku realizacji tematu.

Wnioski

Regeneracja roślin jęczmienia, pszenicy oraz pszenżyta na drodze kultur niedojrzałych zarodków zygotycznych oraz kultur pylnikowych pozwoliła na uzyskanie wymaganej liczby regenerantów niezbędnych do dalszych etapów tematu badawczego.

Uzyskano materiał roślinny oraz zweryfikowano zastosowanie techniki metAFLP dla potrzeb optymalizacji metod regeneracji roślin na drodze embriogenezy somatycznej oraz androgenezy z wykorzystaniem analizy regresyjnej.

Zastosowanie soli srebra i miedzi w pożywkach indukujących w przypadku regeneracji roślin na drodze kultur pylnikowych może przyczynić się do zwiększenia wydajności metody. Należy oczekiwać, że takie podejście może również korzystnie wpłynąć na zmniejszenie proporcji roślin albinotycznych.