

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 potomstwa generatywnego dla regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy i androgenezy. Pozyskanie materiału genetycznego (genomowe DNA) z roślin potomnych i przygotowanie do analizy techniką metAFLP.

Materiał i metody

Regeneranty jęczmienia genotyp 2dh/8, pszenicy genotyp P2/9 i pszenżyta genotyp 28/2, pozyskane na drodze somatycznej embriogenezy i androgenezy były źródłem ziarniaków do uzyskania generatywnego potomstwa z następujących gatunków zbóż: jęczmień, pszenica i pszenżyto. Ziarniaki po zbiorze i okresie spoczynku poddano sterylizacji przez 15 min w 10 % podchlorynie sodu a następnie wyłożono na wilgotną bibułę w szalkach Petriego. Tak przygotowane szalki pozostały przez dobę w temperaturze 4°C, a następnie dobę w temperaturze pokojowej. Uzyskane siewki będące potomstwem generatywnym regenerantów przesadzono do płyt wypełnionych podłożem do pikowania. Gatunki ozime poddano jarowizacji (8 tygodni). Po osiągnięciu kilkunastu centymetrów siewki wysadzono do wiader i prowadzono do dojrzałości w warunkach szklarniowych oraz w przypadku gatunków jarych na polu.

Z kilkunastodniowych siewek pobrano po 100 mg liści do izolacji DNA. Ekstrakcję DNA wykonano z rozdrobnionego materiału zamrażanego w ciekłym azocie za pomocą zestawu do izolacji firmy QIAGEN (DNeasy Plant Mini Kit (250)) zgodnie z metodyką producenta. Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie (NanoDrop). Czystość oraz integralność preparatów zweryfikowano elektroforetycznie w żelu agarozowym. Kolejne etapy techniki metAFLP wykonano zgodnie z procedurą opracowaną przez Bednarka (2007) obejmującą:

- trawienie DNA enzymami *Acc65I* i *MseI* oraz *KpnI* i *MseI*;
- ligację adaptorów komplementarnych do uzyskanych fragmentów DNA;
- wstępny PCR z preselektywnymi starterami;
- przygotowano rozcieńczenia preparatów DNA do selektywnego PCR;

Wyniki

Uzyskanie potomstwa generatywnego regenerantów uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy i androgenezy

Aby otrzymać zaplanowane ilości roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów wysiano ok. 10% więcej nasion, niż oczekiwane liczebności roślin potomnych. Wysiano po 45 ziarniaków z regenerantów otrzymanych w obydwu typach kultur *in vitro* dla 3 badanych gatunków zbóż. Uzyskano 240 roślin potomnych.

Analizy molekularne

Analizy molekularne obejmowały ekstrakcję genomowego DNA z roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów oraz przygotowanie prób DNA do techniki metAFLP, a dalej wykonano wstępne analizy techniką metAFLP.

Z siewek potomstwa zebrano liście, a następnie wyekstrahowano genomowe DNA. Jakość wyizolowanego DNA sprawdzono w żelu agarozowym. Pozyskany DNA został następnie przygotowany do rozdziałów w technice metAFLP. Po wykonaniu trawienia, ligacji oraz pierwszej reakcji PCR tzw. „wstępny PCR” sprawdzono jakość otrzymanych produktów w żelu agarozowym.

Dyskusja

W prezentowanym zadaniu zaplanowano uzyskanie generatywnego potomstwa regenerantów pozyskiwanych dwoma metodami kultur *in vitro* dla trzech badanych gatunków zbóż. Wykonane prace hodowlane umożliwiły uzyskanie odpowiednich materiałów roślinnych oraz ekstrakcję preparatów DNA. Zastosowano standardowe metody hodowlane nie sprawiały większych kłopotów a realizowana profilaktyka (opryski itd) pozwoliła na wyprowadzenie potomstwa regenerantów bez obciążenia chorobami. Tak wyprowadzony materiał idealnie nadawał się do ekstrakcji DNA, również bez przeszkód wykonano wszystkie etapy metAFLP.

Wnioski/Podsumowania

Uzyskano reprezentatywną liczbę roślin będących generatywnym potomstwem regenerantów pozyskanych w poprzednim roku badań.

Podjęte prace pozwoliły na przygotowanie preparatów DNA do analiz molekularnych związanych z generatywnym potomstwem regenerantów.

Cel tematu badawczego 2

Określenie poziomu zmienności genetycznej i metylacyjnej techniką metAFLP dla roślin donorowych i regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta wyprowadzonych na drodze somatycznej embriogenezy oraz androgenezy w różnych warunkach kultur *in vitro* obejmujących suplementację AgNO_3 i CuSO_4 oraz różny czas indukcji procesów embriogenezy somatycznej oraz androgenezy.

Materiał i metody

Uzyskane w poprzednim roku badań preparaty DNA z regenerantów jęczmienia (90 roślin), pszenicy (90 roślin) i pszenżyta (90 roślin) oraz wybrane rośliny donorowe jęczmienia, pszenicy i pszenżyta, z których pozyskiwano regeneranty (10 roślin) zostały poddane analizie molekularnej techniką metAFLP. Wykonano reakcje selektywnego PCR za pomocą 8 par selektywnych starterów. W temacie wykorzystano następujące pary selektywnych starterów: CpXpX-TAA/MCGT, CpXpG-TTG/MCGT, CpXpX-ATT/MCAC, CpXpG-AGG/MCGT, CpXpG-AGA/MCGT, CpG-GGC/MCAC, CpXpG-AGC/MCAC, CpG-GCA/MCGT. Jeden z selektywnych starterów znakowano radioaktywnie fosforem γP^{32} w obecności kinazy T4 DNA. Analiza wzorów prążkowych DNA będzie stanowiła podstawę do szacowania zmienności epigenetycznej w kolejnym roku badań. Wykonano analizę skupień na bazie profili AFLP (po ich konwersji do postaci binarnej). Na podstawie uzyskanych wyników, wykreślono dendrogramy dla DNA każdego gatunku oraz każdej metody kultur *in vitro*, w której pozyskiwano regeneranty.

Wyniki

W analizie wykonano rozdziały metAFLP wykorzystując po 8 par selektywnych starterów dla 270 regenerantów jęczmienia, pszenicy i pszenżyta (po 90 regenerantów z danego gatunku) oraz 10 roślin donorowych uzyskując wzory fragmentów DNA wizualizowane autoradiograficznie. Najmniejszą liczbę amplifikowanych fragmentów DNA obserwowano u regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze androgenezy – 190, zaś najwięcej fragmentów (360) obserwowano u regenerantów pszenicy uzyskanych również w kulturach pylnikowych. Ilości fragmentów DNA detekowane dla regenerantów pszenżyta wynosiły od 248 do 282. Średnio każda para starterów powieliała od 23 fragmentów u jęczmienia do 45 u pszenżyta. Na podstawie danych molekularnych wykreślono dendrogramy, przedstawiające analizy skupień grupowania się danych ze względu na użyte enzymy restrykcyjne w analizie metodą metAFLP niezależnie od badanego gatunku. Regeneranty uzyskiwane metodą somatycznej embriogenezy wykazywały mniejsze zróżnicowanie niż regeneranty uzyskiwane w kulturach pylnikowych. U jęczmienia zaobserwowano skupianie się regenerantów pochodzących z

różnych warunków kultur *in vitro*. Wyniki analizy skupień dla pszenicy wykazywały podobny stopień zróżnicowania jak dla regenerantów jęczmienia, natomiast dane dla pszenżyta uzyskanego w warunkach kultur pylnikowych charakteryzowały się wyższym zróżnicowaniem dotyczącym zmienności genetycznej niż zmian sekwencyjnych i metylacyjnych.

Dyskusja

Uzyskiwane profile fragmentów DNA nie odbiegały od tych otrzymanych dla roślin donorowych w pierwszym roku badań. Zwiększenie puli badanych obiektów (po 45 regenerantów dla każdego gatunku i każdej z metod otrzymywania regenerantów) pozwoli na przeprowadzenie jakościowej analizy poziomu zmienności indukowanej w kulturach *in vitro*. Jakościowe szacowanie zmienności genetycznej oparte na analizie skupień potwierdziło odrębność danych molekularnych dla zastosowanych enzymów restrykcyjnych. Podwyższony poziom zmian (szczególnie identyfikowanych za pomocą *Acc65I/MseI* w przypadku kultur pylnikowych w porównaniu z kulturami niedojrzałych zarodków sugeruje, że regeneracja na drodze androgenerezy jest bardziej podatna na indukcję zmienności niż to ma miejsce w przypadku embriogenezy. Stwierdzono grupowanie się regenerantów pochodzących z różnych warunków *in vitro* w obrębie tych samych skupień, przy czym występowanie kilku takich skupień sugeruje, że zastosowane warianty kultur *in vitro* mają wpływ na poziom zmienności sekwencyjnej i wzorów metylacji DNA.

Wnioski

Zastosowanie wybranych uprzednio starterów do selektywnego namnażania DNA pochodzącego z regenerantów trzech gatunków zbóż, uzyskanych na drodze somatycznej embriogenezy i androgenerezy skutkowało otrzymaniem puli fragmentów DNA będących podstawą do szacowania zmienności indukowanej w kulturach *in vitro*. Na podstawie wytypowanych warunków kultur *in vitro*, obserwuje się zróżnicowanie między regenerantami na poziomie profili DNA, co należy interpretować, jako możliwość wpływania na poziom zmienności sekwencyjnej i metylacyjnej poprzez wybór odpowiedniego składu pożywki oraz czasu prowadzenia kultury *in vitro*. Niezależnie od badanego gatunku androgeneza wydaje się indukować wyższy poziom zmienności wśród regenerantów niż to ma miejsce w przypadku embriogenezy.