

Lp. w zał. Do Rozporządzenia MRiRW; 89.

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

Kierownik zadania: dr inż. Renata Orłowska

Cel tematu badawczego 1

Uzyskanie roślin donorowych jęczmienia na drodze androgenezy w kulturach pylnikowych. Rośliny donorowe będą źródłem eksplantatów do uzyskania regenerantów.

Materiał i metody

Do uzyskania roślin donorowych wykorzystano ziarniaki z trzech genotypów jęczmienia jarego 19dh/4, 2dh/8 i 7dh/3. Regeneranty uzyskano na drodze androgenezy w kulturach pylnikowych z genotypu 2dh/8. Z regenerantów zebrano ziarniaki i wysiano otrzymując rośliny donorowe będące generatywnym potomstwem podwojonych haploidów.

Wyniki

Finalnie uzyskano regeneranty z genotypu 2dh/8 charakteryzujące się identycznym fenotypem jak rośliny wyjściowe będące źródłem eksplantatów. Oprócz roślin zielonych obserwowano także rośliny albinotyczne. Nasiona z podwojonych haploidów wysiano uzyskując potomstwo generatywne podwojonych haploidów. Te rośliny (24 szt) są roślinami donorowymi do dalszych etapów eksperymentu.

Dyskusja

Podwojone haploidy (DH) stanowią chętnie wykorzystywany materiał nie tylko w pracach hodowlanych, skracając czas otrzymania nowej odmiany, ale także w badaniach podstawowych. Procedury pozyskiwania podwojonych haploidów, oparte na zjawisku androgenezy są znane dla wielu gatunków i pozwalają na efektywną produkcję takich roślin. Jednakże w przypadku zbóż efektywność otrzymywania linii DH w kulturach pylnikowych lub w kulturach izolowanych mikrospor jest obciążona zjawiskiem albinizmu, skutkującym powstawaniem regenerantów z defektem budowy plastydów. Mimo obecności roślin albinotycznych w niniejszym eksperymencie udało się uzyskać wymaganą liczbę płodnych podwojonych haploidów oraz zebrać z nich nasiona. Rośliny donorowe, które uzyskano z ziarniaków linii DH są takim materiałem, który pozwoli w dalszych etapach zadania na określenie poziomu zmienności genetycznej i metylacyjnej DNA, będąc punktem odniesienia do dalszych analiz molekularnych i wyliczeń statystycznych.

Wnioski/Podsumowania

Wybrana metoda pozyskiwania podwojonych haploidów (androgenesa w kulturach pylnikowych) pozwoliła uzyskać płodne regeneranty jęczmienia (genotyp 2dh/8), a z ich ziarniaków generatywne potomstwo - „rośliny donorowe” do dalszych analiz.

Cel tematu badawczego 2

Zaprojektowanie starterów do reakcji PCR do techniki MSTD oraz technik IRAP/REMAP. Wykonanie wstępnych rozdziałów techniką MSTD w celu sprawdzenia powtarzalności i stabilności profili prążkowych DNA.

Materiał i metody

MSTD

Opierając się na danych literaturowych wybrano elementy mobilne należące do klasy I i II (retrotranspozony i transpozony). Do zaprojektowania starterów wykorzystano program CLC Main Workbench v. 7.6.4. Materiałem roślinnym były 24 rośliny jęczmienia z genotypu 2dh/8 będące potomstwem generatywnym podwojonego haploida. Wykonano rozdziały techniką MSTD opartą na

metodzie metAFLP ze starterami ukierunkowanymi na elementy mobilne w genomie (BARE-1-C0700/CpG-GCA, BARE-1-5980/CpG-GCA, BAGY-1-1C2043/CpXpX-TAA, BAGY-1-CO651/CpG-GCA, Sabrina-C0945/CpG-GCA, Sukkula EO228/CpG-GCA, Sukkula 91673/CpG-GCA, Balduin/CpG-GCA, CASP-124-R/CpG-GCA, CASP-1R/CpG-GCA, CASP-1F/CpG-GCA, CAS AY 16R/CpG-GCA, CAS 978/CpXpG-AGA, CAS AY 16F/CpG-GCA, CAS 979/CpG-GCA).

Z uzyskanych autoradiogramów policzono fragmenty MSTD i utworzono matryce „0-1”, gdzie cyfra „1” oznaczała obecność prążka zaś „0” brak. Matryce sporządzono dla obydwu zestawów enzymów restrykcyjnych: *Acc65I-MseI* (zmienność genetyczna oraz metylacyjna); *KpnI-MseI* (zmienność genetyczna). Zestawienie obydwu matryc danych pozwoliło na wyekstrahowanie danych odnoszących się tylko do zmian w metylacji DNA- matryca „MET”.

Na podstawie matryc „0-1” oszacowano różnicowanie dotyczące zmian w metylacji oraz sekwencji DNA użytych roślin wykonując analizę skupień w programie XLSTAT ver 18.06 dla uzyskanych danych ze współczynnikiem podobieństwa Jaccarda;

IRAP/REMAP

Do analizy wykorzystano uprzednio wyizolowany DNA jęczmienia do techniki MSTD. Namnażanie genomowego DNA z 24 roślin jęczmienia prowadzono w obecności starterów ukierunkowanych na sekwencję elementu mobilnego (IRAP) lub ukierunkowanych na sekwencję elementu mobilnego i sekwencję mikrosatelitarną (REMAP).

Wyniki

MSTD

Wykonano rozdziały elektroforetyczne wykorzystując technikę MSTD z 15 parami selektywnych starterów. Analizie poddano DNA 24 roślin jęczmienia genotypu 2dh/8 otrzymując 938 polimorficznych fragmentów dla obydwu układów enzymów restrykcyjnych (*Acc65I/MseI* i *KpnI/MseI*). Do wstępnej analizy wybrano fragmenty DNA pochodzące z 5 selektywnych starterów i obserwowano polimorfizm na poziomie ok. 57%. Opierając się na danych molekularnych wykonano analizę skupień. Analiza ta wykazała odrębność dla obydwu par zastosowanych enzymów restrykcyjnych *Acc65I/MseI* vs. *KpnI/MseI*.

IRAP/REMAP

Wybrano do przetestowania 8 starterów CASP-1F, CASP-1R, CAS AY 16F, CAS AY 16R, BAGY1-C0651R, BAGY1-C2043, MICRO1, MICRO2. Po ustaleniu składu mieszanin reakcyjnych wykonano reakcje namnażania DNA wykorzystując profil gradientowy. Na podstawie uzyskanych obrazów (obecność lub brak produktu) dobrano profile temperaturowe dla poszczególnych starterów. W wyniku testowania dobrano warunki reakcji PCR dla 5 starterów w technikach IRAP/REMAP oraz sprawdzono te warunki wykonując reakcje PCR dla DNA 24 roślin jęczmienia.

Dyskusja

MSTD

Dane literaturowe podają wiele technik markerowych użytecznych do badania zmienności genetycznej i metylacyjnej u roślin. Wśród nich są takie, które wykorzystują także elementy mobilne (EM) w genomach roślinnych. Zaproponowana technika badawcza MSTD (*Methyl-Sensitive Transposon Display*) oparta na technice metAFLP z jednej strony umożliwi szacowanie zmian metylacyjnych, z drugiej dostarczy informacji dotyczących zmian genetycznych genomu spowodowanych ruchem elementów mobilnych w genomie. Wprowadzenie techniki MSTD do badań wymagało opracowania odpowiednich starterów do reakcji PCR opartych na elementach mobilnych. Jednocześnie ważne było przetestowanie zaprojektowanych starterów na DNA roślin jęczmienia i wstępne oszacowanie poziomu obserwowanej zmienności metylacyjnej i genetycznej.

Uzyskane dane molekularne wskazały na wysoki poziom polimorfizmu (63% *Acc65I/MseI* i 52% *KpnI/MseI*) między badanymi roślinami. Wydaje się, że obserwowany poziom polimorfizmu między testowanymi roślinami należy łączyć z aktywnością elementów mobilnych w genomie jęczmienia i należy się spodziewać podobnych wyników na puli roślin donorowych wyprowadzanych w tym zadaniu.

Analiza skupień wykonana dla danych molekularnych wykazała ich odrębność dla obydwu par zastosowanych enzymów restrykcyjnych. Taka informacja jest istotna ze względu na koncepcję techniki MSTD opartej na metodzie metAFLP wykorzystującej różnicę we wrażliwości na obecność metylowanej cytozyny w genomowym DNA użytych endonukleaz restrykcji. Tak zgrupowane dane pozwolą na wykonanie analizy ilościowej w dalszych etapach eksperymentu.

IRAP/REMAP

W zadaniu wybrano metody badawcze (IRAP/REMAP), które są z sukcesem stosowane u roślin w badaniach dotyczących polimorfizmu wynikającego z obecności elementów mobilnych w genomie. Techniki te mają na celu równolegle do wariantu MSTD określić poziom zmian indukowanych migracją poszczególnych nadrodzin elementów mobilnych (EM). W przeciwieństwie do metod bazujących na puli fragmentów restrykcyjnych (AFLP, SSAP, MSTD) gdzie badany jest polimorfizm wynikający z długości fragmentów zawartych między retrotranspozonomem a miejscem restrykcyjnym, techniki IRAP i REMAP wykorzystują genomowy DNA, a obserwowany polimorfizm jest wynikiem obecności lub braku produktu PCR amplifikowanego między dwoma EM (IRAP) lub między EM a sekwencją mikrosatelitarną (REMAP). W prezentowanym temacie istotne było dobranie warunków reakcji PCR dla nowosyntetyzowanych starterów opartych na sekwencjach EM w genomie. Uzyskane profile prążków DNA w warunkach testowych pozwoliły dobrać odpowiednie parametry reakcji PCR do przeprowadzenia analizy na większej liczbie osobników.

Wnioski/Podsumowania

- Na podstawie danych literaturowych zaprojektowano startery do reakcji PCR do techniki MSTD oraz technik IRAP/REMAP. Przeprowadzone testy techniką PCR pozwoliły dobrać odpowiednie warunki reakcji PCR dla technik IRAP/REMAP do dalszych analiz.
- Wstępne analizy wykonane techniką MSTD pozwoliły ocenić przydatność zaprojektowanych starterów oraz oszacować poziom polimorfizmu wśród roślin jęczmienia.

Cel tematu badawczego 3

Uzyskanie genomowego DNA z roślin donorowych jęczmienia do analiz techniką RP-HPLC. Wstępne określenie poziomu globalnej metylacji dla roślin donorowych techniką RP-HPLC.

Materiał i metody

Izolacja DNA

Izolację DNA prowadzono z 24 roślin donorowych jęczmienia. Ekstrakcja DNA została przeprowadzona za pomocą zestawu do izolacji DNA firmy QIAGEN zgodnie z metodyką producenta. Ilość DNA oszacowano spektrofotometrycznie (NanoDrop). Czystość oraz integralność preparatów zweryfikowano elektroforetycznie.

Analizy techniką RP-HPLC

W temacie zastosowano procedurę RP-HPLC opartą na pracach Johnstona i współpracowników (Johnston i in. 2005) oraz Havliša i Trbuška (Havliš i Trbušek 2002). Powierzchnię pików RP-HPLC uzyskano w $\mu\text{V/s}$. Dla każdej badanej próby globalną metylację genomowego DNA obliczono, jako iloraz zawartości 5-metyl-2'-deoksycytydyny (5mdC) przez sumę zawartości 2'-deoksycytydyny i 5-metyl-2'-deoksycytydyny oraz pomnożenie przez 100. Następnie policzono wartość średnią dla całej puli roślin donorowych.

Wyniki

Oszacowano ilość globalnej metylacji DNA u roślin donorowych jęczmienia będących generatywnym potomstwem podwojonego haploida uzyskanego na drodze androgenezy w kulturach pylnikowych. Analiza całkowitej metylacji cytydyny (5mdC) genomowego DNA wykonana metodą RP-HPLC wykazała, że średnio 20,11% ($\pm 0,3$) cytydyny uległo metylacji.

Dyskusja

Określanie poziomu zmian metylacyjnych u roślin otrzymywanych w kulturach *in vitro* może się odbywać przy pomocy różnych technik. W prezentowanym temacie badawczym określono poziom zmian metylacji genomowego DNA roślin donorowych jęczmienia genotypu 2dh/8 przy pomocy techniki RP-HPLC. Oszacowanie poziomu globalnej metylacji DNA u roślin donorowych jest bardzo ważne gdyż rośliny te będą dawcami eksplantatów do wyprowadzenia dużej puli regenerantów do dalszych prac w tym zadaniu i określenie tego parametru będzie punktem odniesienia do określenia wzrostu lub spadku metylacji genomowego DNA.

Wnioski/Podsumowania

Wykonana w temacie badawczym analiza RP-HPLC określiła poziom globalnej metylacji DNA dla 24 roślin donorowych jęczmienia.