

2

PRACOWNIA ANALIZ MOLEKULARNYCH

Michał Ronikier

Kalendarium

- 2001 Powstanie laboratorium analiz molekularnych przy Zakładzie Systematyki Roślin Naczyniowych i rozpoczęcie badań zmienności DNA w IB PAN.
- 2004 Zasadniczy rozwój pracowni związany z zaangażowaniem w projekt badawczy INTRA-BIODIV (6. Program Ramowy UE) i zakupem kapilarowego sekwencjonera automatycznego.
- 2011 Wyodrębnienie Pracowni Analiz Molekularnych IB PAN jako osobnej jednostki badawczej w IB PAN.
- 2012 Dalszy jakościowy rozwój zaplecza aparaturowego, organizacja platformy do sekwencjonowania nowej generacji (*Next Generation Sequencing*).

HISTORIA PRACOWNI

Pracownia Analiz Molekularnych jest najmłodszą jednostką naukowo-badawczą w Instytucie Botaniki PAN. Została utworzona w połowie 2011 roku w oparciu o wydzielenie zaplecza aparaturowego funkcjonującego wcześniej w ramach Zakładu Systematyki Roślin Naczyniowych. Początki rozwoju badań genetycznych w Instytucie wiązały się z organizacją podstawowego laboratorium, które zostało utworzone w 2000 roku z inicjatywy i przy wsparciu ówczesnego dyrektora Instytutu, prof. dr hab. Zbigniewa Mirka. Istotny udział w tych pracach mieli pracownicy Zakładu Systematyki Roślin Naczyniowych – Elżbieta Cieślak i Michał Ronikier, którzy przeszli odpowiednie szkolenia praktyczne (obsługa aparatury), jak i teoretyczne. Pierwotne, niewielkie stanowiska laboratoryjne podlegały

stopniowej reorganizacji i rozszerzaniu w miarę realizacji kolejnych projektów badawczych, częściowo w oparciu o indywidualne granty, a częściowo o centralne granty aparaturowe. W powiązaniu z nowymi inwestycjami i rosnącym doświadczeniem eksperymentalnym pracowników udoskonalano zaplecze sprzętowe i poszerzano spektrum dostępnych analiz.

Najważniejsze etapy rozwoju w pierwszym okresie związane były z realizacją w Instytucie dwóch projektów europejskich w ramach 6. Programu Ramowego: INTRABIODIV (2004–2006) i ECOCHANGE (2007–2012), zainicjowanych i koordynowanych przez dr Pierre'a Taberleta (Uniwersytet w Grenoble, Francja). Zespół badawczy w IB PAN odpowiedzialny był w nich m.in. za wykonanie kompleksowych analiz genotypowania. Dzięki finansowaniu tych projektów i komplementarnemu dofinansowaniu z Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego, możliwy był między innymi zakup czterokapilarowego sekwencjonera automatycznego ABI PRISM 3100-*Avant* (zmodernizowanego później do nowszej wersji ABI Prism 3130). Zorganizowane zostało również stanowisko do wysokowydajnej izolacji DNA w płytkach 96-dołkowych, co miało duże znaczenie dla efektywności prowadzonych badań populacyjnych na dużej liczbie prób. W konsekwencji powstało w pełni samodzielne zaplecze do analiz genetycznych, od izolacji po uzyskanie sekwencji DNA czy profilów genotypowania.

Utworzenie Pracowni Analiz Molekularnych, jako niezależnej jednostki, stanowiło jeden z aspektów restrukturyzacji podjętej w 2011 roku przez ówczesną Dyрекcję Instytutu (prof. dr hab. K. Wołowski i prof. dr hab. B. Godzik). Powstanie Pracowni miało na celu stymulację dalszego rozwoju nowoczesnych badań związanych z analizami zmienności DNA poprzez utworzenie profesjonalnego zaplecza laboratoryjnego dostępnego dla wszystkich zespołów badawczych Instytutu. Na podstawie procedury konkursowej, funkcja kierownika została powierzona dr Michałowi Ronikierowi, związanemu od początku z organizacją analiz genetycznych w IB PAN.

Po utworzeniu Pracowni podjęte zostały działania mające na celu jej dalszy rozwój. Wydzielono i wyposażono szereg stanowisk laboratoryjnych pozwalających na równoczesną pracę wielu osób. W ramach przyznanego przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego dofinansowania celowego na restrukturyzację w 2011 r. utworzono pierwsze stanowisko naukowo-techniczne. Została na nim zatrudniona mgr Marta Saługa (absolwentka biologii na Uniwersytecie Jagiellońskim), która w krótkim czasie biegle opanowała stosowane w Pracowni procedury laboratoryjne i aktywnie zaangażowała się zarówno w bieżące prace związane z funkcjonowaniem zaplecza badawczego, jak i w realizację projektów badawczych.

Dzięki dofinansowaniu przyznanemu w 2012 roku przez Ministerstwo Nauki i Szkolnictwa Wyższego na zakup aparatury oraz środkom z realizowanego w Pracowni grantu Polsko-Szwajcarskiego Programu Badawczego (por. Aneks II), możliwa była realizacja inwestycji, która otworzyła nowe możliwości technologiczne. Zorganizowano platformę sekwencjonowania nowej generacji (NGS – *Next Generation Sequencing*), której trzonem jest aparat Illumina MiSeq (por. też wykaz wyposażenia). Pracownia stała się tym samym pierwszą przyrodniczą jednostką badawczą w Polsce przystosowaną do prowadzenia analiz

z wykorzystaniem NGS, stanowiących najbardziej aktualny trend w światowych badaniach genetycznych. Technologia NGS pozwala na realizację bardzo kompleksowych analiz zmienności sekwencji DNA, obejmujących np. sekwencjonowanie małych genomów (np. chloroplastowych), analizy złożonych prób bioróżnorodności (np. tzw. metabarkoding prób środowiskowych), analizy transkryptomów czy kompleksowe genotypowanie populacji gatunków w oparciu o sekwencje setek loci.

Z punktu widzenia zamierzeń związanych z restrukturyzacją Instytutu, Pracownia Analiz Molekularnych posiada dwa zasadnicze aspekty swojej działalności naukowej: 1) jest odrębną jednostką badawczą skupiającą się na zastosowaniu analiz molekularnych w nowoczesnych badaniach botanicznych, a zarazem stanowi 2) ogólnoinstytutowe zaplecze techniczne – platformę badań molekularnych nad różnymi grupami roślin (rośliny naczyniowe, mszaki, glony) i grzybów (włączając porosty).

ORGANIZACJA LABORATORYJNEGO ZAPLECZA BADAWCZEGO

Jednym z zadań Pracowni jest organizacja i koordynacja efektywnego użytkowania zaplecza laboratoryjnego przez wszystkie zainteresowane grupy badawcze Instytutu, jak też w ramach realizowanej współpracy zewnętrznej. W swoim założeniu, jednostka ta pełni również rolę wspierającą dla powstawania interdyscyplinarnych grup badawczych integrujących badaczy z różnych zakładów w celu efektywnego wykorzystania możliwości analiz genetycznych.

Pracownia posiada dobrze wyposażone zaplecze badawcze obejmujące m.in. stanowisko do izolacji DNA o dużej przepustowości, kilka termocyklerów (w tym trzy umożliwiające prowadzenie reakcji w gradiencie temperatur), czterokapilarowy sekwencjoner automatyczny ABI Prism 3130, sekwencjoner nowej generacji Illumina MiSeq oraz rozbudowane wyposażenie peryferyjne (por. szczegółowy opis wyposażenia). Możliwości aparaturowe oraz doświadczenia Pracowni obejmują szerokie spektrum stosowanych technik analiz DNA, m.in. amplifikację DNA metodą PCR (*Polymerase Chain Reaction*), tradycyjne sekwencjonowanie DNA (metodą Sangera), masowe sekwencjonowanie DNA nowej generacji, genotypowanie AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) czy analizę regionów mikrosatelitarnych.

Już z perspektywy krótkiego okresu funkcjonowania Pracowni jako odrębnej jednostki (jeden rok), można stwierdzić, że nastąpił znaczący rozwój zainteresowania badaniami molekularnymi. Oprócz prowadzonych już wcześniej badań nad roślinami naczyniowymi, zainicjowane zostały m.in. prace nad glonami (Zakład Fykologii), grzybami (Zakład Mykologii) czy porostami (Zakład Lichenologii). Realizowana jest również przez Pracownię stała lub okresowa współpraca z grupami badawczymi spoza Instytutu (por. podrozdział o współpracy).

TEMATYKA BADAWCZA

Własna działalność naukowa Pracowni

Prowadzenie własnej działalności badawczej w oparciu o zastosowanie analiz molekularnych należy do głównych zadań Pracowni. W związku z tym, że jest to jednostka nowa i niewielka – personel obejmuje aktualnie jednego pracownika naukowego i jednego technicznego – zakres działalności naukowej jest zdeterminowany zainteresowaniami badawczymi kierownika Pracowni, które począwszy od pracy magisterskiej związane były z funkcjonowaniem i bioróżnorodnością ekosystemów wysokogórskich. Tematyka prac koncentruje się na zagadnieniach struktury bioróżnorodności i dynamiki jej zmian w czasie i przestrzeni, dla których podstawowym modelem biologicznym badań są organizmy ekosystemów zimnych (alpejskich i arktycznych). Działalność naukowa w tym zakresie skupia się wokół zainicjowanej i koordynowanej przez Pracownię interdyscyplinarnej grupy badawczej “Molecular Biogeography”. Poza tą główną osią tematyczną, Pracownia prowadzi również inne badania związane z zastosowaniem analiz genetycznych do rozwiązywania problemów przyrodniczych, m.in. z zakresu filogeografii, filogenetyki i ewolucji czy tzw. genetyki konserwatorskiej.

Biogeografia molekularna – badania wysokogórskiej bioty gór Europy ze szczególnym uwzględnieniem Karpat

W realizowanych projektach biogeograficznych techniki analiz molekularnych stosowane są do badań zmienności i dywergencji populacji organizmów środowisk zimnych o dysjunktywnych zasięgach. Umożliwiają one rekonstrukcję ich historii biogeograficznej i populacyjnych procesów genetycznych, m.in. w kontekście zmian klimatu (wpływu zmian historycznych oraz prób modelowania dynamiki przyszłych zmian w rozmieszczeniu i zmienności organizmów wysokogórskich). Pod względem geograficznym prace te obejmują zasięgi wysokogórskich i arktyczno-alpejskich gatunków roślin i grzybów, w szczególności koncentrując się na wyspowych siedliskach alpejskich Karpat i innych gór Europy Środkowej (Ryc. 1, 2).

Do najważniejszych zagadnień badawczych należy porównawcza filogeografia i analiza historii zasięgów wysokogórskich gatunków roślin i grzybów w górach Europy Środkowej (Karpaty, Alpy, Sudety, góry Półwyspu Bałkańskiego [np. 4265, 4381; por. też wcześniejsze prace w ramach Zakładu Systematyki Roślin Naczyniowych: 3895–3897] oraz w szerszej skali geograficznej (np. zasięgów cyrkumpolarnych) [4373]. Prowadzone są także szczegółowe badania wyspowych siedlisk alpejskich Karpat pod kątem ewolucji wysokogórskich gatunków roślin i grzybów, struktury i odrębności genetycznej populacji w Karpatach Zachodnich, Wschodnich i Południowych, a także identyfikacji obszarów o szczególnie wysokiej zmienności genetycznej populacji.

Opublikowano pierwsze szczegółowe analizy struktury genetycznej populacji przedstawicieli flory wysokogórskiej Karpat. Wyniki wskazują na długą izolację regionalnych grup populacji i historyczne znaczenie szeregu barier dla przepływu genów, takich jak główne



Ryc. 1. Rozpoczęty w 2012 r. grant finansowany w ramach Polsko-Szwajcarskiego Programu Badawczego dotyczy biogeografii molekularnej układu ekologicznego tworzonego przez *Dryas octopetala* L. i obligatoryjnie związanymi z nim saprobiontycznym grzybem i pasożytniczym motylem. Na zdjęciu populacja *D. octopetala* na Spitsbergenie Zachodnim, Archipelag Svalbard (Fot. M. Ronikier).

obniżenie śródkarpackie (Beskid Niski) czy dolina rzeki Olt w obrębie Karpat Południowych. Wyniki z opublikowanych prac dotyczące populacji karpaccich zostały zebrane w pierwszej przeglądowej pracy na temat filogeografii wysokogórskiej Karpat [4265].

Zebranie dostępnych danych pozwoliło stwierdzić, że historia biogeograficzna flory Karpat obejmuje zarówno procesy długiej izolacji i genetycznej dywergencji populacji w poszczególnych częściach łańcucha, jak i zdarzenia prawdopodobnej dyspersji dalekiego zasięgu. Przykład analizy filogeograficznej całego zasięgu wysokogórskiego jaskra *Ranunculus glacialis* L. wskazuje (w kontekście Karpat), że historia jednego gatunku może obejmować wielokrotną kolonizację i współistnienie linii genetycznych pochodzących ze stosunkowo niedawnej kolonizacji z liniami reliktowymi, które trwały w masywach karpaccich nawet przez szereg cykli klimatycznych czwartorzędu [4373]. Co ważne, badania filogeografii *R. glacialis* wskazują na dużą stabilność regionalnych grup genetycznych w górach strefy umiarkowanej. Świadczącą też o potencjalnie dużej odporności gatunków wysokogórskich na fluktuacje klimatyczne.

W ramach współpracy z Instytutem Botaniki UJ (dr Alina Stachurska-Swakoń) badania nad florą wysokogórską Karpat rozszerzono o analizy filogeograficzne gatunków zioło-roślowych, które stanowią ważny element flory piętra subalpejskiego w górach Europy



Ryc. 2. Zbiór materiałów populacyjnych do badań molekularnych – góry Komovi na pograniczu Czarnogóry i Albanii, 2009 (Fot. A. Ronikier).

[4381] (Stachurska-Swakoń et al. 2013). Do aktualnych nurtów badawczych w Pracowni należą również analizy szczegółowej struktury genetycznej populacji wysokogórskiej flory w mniejszej skali geograficznej, w szczególności Tatr, w kontekście jej historii oraz współcześnie zachodzących procesów populacyjnych w środowisku wysokogórskim (M. Ronikier, dane niepubl.).

Ważne aspekty kształtowania się zasięgów geograficznych, takie jak dynamika i zakres dyspersji, badane były na przykładzie wybranych gatunków roślin arktyczno-alpejskich w ramach zakończonego w 2012 r. projektu ECOCHANGE (por. Aneks II). Zastosowane zostały tu nowatorskie analizy pozwalające na oszacowanie przestrzennego zakresu dyspersji na podstawie markerów genetycznych. Był to jeden z elementów kompleksowego projektu poświęconego opracowaniu udoskonalonych projekcji zmian bioróżnorodności ekosystemów lądowych Europy w ramach modelowania wpływu prognozowanych zmian klimatycznych.

Rozwijając realizowane koncepcje badawcze, Pracownia stopniowo zmierza od prac nad pojedynczymi gatunkami czy grupami populacji ku kompleksowym projektom porównawczym. W badaniach nad biotą Karpat prowadzone są analizy mające na celu poznanie różnych aspektów biogeograficznych flory wysokogórskiej w oparciu o metody filogeografii porównawczej. W 2012 roku rozpoczęto również prace nad dwoma nowymi projektami dotyczącymi biogeografii układów ekologicznych związanych z *Dryas octopetala* L., jednym z kluczowych gatunków ekosystemów arktyczno-alpejskich. W ramach polsko-szwajcarskiego projektu DRYADE – “The fate of ecological interactions in a changing climate: using next-generation sequencing technologies to unravel adaptive and historical processes in a community of interrelated arctic-alpine organisms”, badana jest ewolucja i dynamika biogeograficzna powiązanych arktyczno-alpejskich układów ekologicznych. Wykorzystywanym modelem biologicznym jest *D. octopetala* oraz obligatoryjnie związane z tym gatunkiem organizmy: grzyb saprobiontyczny *Rhizomarasmius epidryas* (Kühner ex A.Ronikier) A.Ronikier & M.Ronikier oraz pasożytniczy motyl *Stigmella dryadella* O.Hofmann, 1868.

Z kolei w ramach grantu MNiSW pt. „Analiza uwarunkowań występowania grzybów arktyczno-alpejskich w górach strefy umiarkowanej” (koordynowanego przez dr Annę Ronikier z Zakładu Mykologii) badane są uwarunkowania występowania grzybów arktyczno-alpejskich oraz stopnia stałości powiązania z nimi arktyczno-alpejskich roślin mykoryzowych w kontekście zmian zasięgów. Podstawą tego projektu jest porównawcza analiza molekularna zbiorowisk grzybów mykoryzowych w reliktowych populacjach *D. octopetala* w piętrze leśnym Karpat w stosunku do wysokogórskich populacji tego gatunku.

We współpracy z Uniwersytetem w Lozannie (dr Nadir Alvarez) realizowane są w Pracowni również (w ramach pracy doktorskiej) badania mgr Tomasza Suchana nad genetyką koewolucyjnego, mutualistycznego układu ekologicznego *Trollius europaeus* – muchówki z grupy *Chiastocheta*, w kontekście uwarunkowań środowiska występowania badanych populacji (tzw. *landscape genetics*) w Karpatach, Sudetach, Alpach i Jurze.

Inne badania z zastosowaniem analiz zmienności DNA

W szerokim ujęciu obszar zainteresowań badawczych Pracowni obejmuje zastosowanie analiz genetycznych w rozwiązywaniu problemów z zakresu taksonomii, filogenezy i ewolucji, a także ekologii. Prowadzone są wieloaspektowe analizy zmienności genetycznej w kontekście bioróżnorodności ekosystemów oraz historycznych i współczesnych czynników kształtujących przestrzenny rozkład tej zmienności.

Badania prowadzone w ramach projektu INTRABIODIV (realizowanego jeszcze w ramach Zakładu Systematyki Roślin Naczyniowych) wykazały, na przykładzie modelowego układu wysokogórskiej flory Alp i Karpat, że bioróżnorodność na poziomie gatunkowym nie jest skorelowana z bioróżnorodnością na poziomie wewnątrzgatunkowym (genetycznym). Wskazuje to, że różne historyczne i współczesne czynniki mają znaczenie dla kształtowania się tych dwóch integralnych składników różnorodności biologicznej [4390].

W ramach prac z zakresu taksonomii i filogenezy, do najważniejszych długofalowych tematów należą badania ewolucyjno-taksonomiczne mieszańcowych taksonów w rodzaju *Potamogeton*, prowadzone we współpracy z dr hab. Joanną Zalewską-Gałosz (Instytut Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego). Zastosowanie analiz zmienności genetycznej ma kluczowe znaczenie dla dokładnej identyfikacji mieszańców, a także dla prób określenia ich ewolucyjnego znaczenia w populacjach [np. 4289, 4410]. W wyniku tych prac opisane zostały m.in. dwa nowe taksony mieszańcowe *Potamogeton* – *P. ×assidens* Z.Kaplan, Zalewska-Gał. & M.Ronikier oraz *P. maemetsiae* Zalewska-Gał. & M.Ronikier.

Zastosowanie analiz sekwencji DNA w kontekście filogenetycznym pozwoliło również na ustalenie właściwej pozycji taksonomicznej *Rhizomarasmus epidryas* (Kühner ex A.Ronikier) A.Ronikier & M.Ronikier, jednego z najbardziej typowych przedstawicieli mykobioty arktyczno-alpejskiej [4266].

PUBLIKACJE

Dorobek naukowy, który powstał w oparciu o wykorzystane możliwości analityczne obu laboratoriów molekularnych (Zakładu Systematyki Roślin Naczyniowych i PAM) obejmuje kilkadziesiąt publikacji i abstraktów konferencyjnych. W samej tylko Pracowni Analiz Molekularnych, w ciągu kilku miesięcy jej działalności jako odrębnej jednostki, opublikowanych zostało osiem prac naukowych, m.in. w najlepszych czasopismach z zakresu biogeografii, botaniki i ekologii, takich jak: *Ecology Letters*, *Molecular Ecology* czy *Taxon*.

WSPÓŁPRACA Z OŚRODKAMI KRAJOWYMI

Pracownia jest powiązana stałą współpracą przede wszystkim z Instytutem Botaniki Uniwersytetu Jagiellońskiego. W ramach wspólnej działalności naukowej realizowane są np. kompleksowe studia nad taksonomią i ewolucją ważnego dla ekosystemów słodkowodnych rodzaju *Potamogeton* L. (dr hab. J. Zalewska-Gałosz), badania nad filogeografią gatunków budujących subalpejskie zbiorowiska ziołoroślone w Karpatach (dr A. Stachurska-Swakoń) czy analizy różnorodności grzybów mikoryzowych powiązanych z *Dryas octopetala* L. (dr Piotr Mleczko). Okresowo nawiązywana jest również współpraca z innymi krajowymi ośrodkami badawczymi, takimi jak Uniwersytet im. A. Mickiewicza w Poznaniu czy SGGW w Warszawie.

WSPÓŁPRACA MIĘDZYNARODOWA

Działalność naukowa Pracowni opiera się w dużej mierze na współpracy międzynarodowej. Aktywna współpraca utrzymywana jest przede wszystkim z ośrodkami zajmującymi się zagadnieniami biogeografii i ekologii organizmów wysokogórskich. We współpracy z ośrodkami szwajcarskimi (Department of Ecology and Evolution, Université de Lausanne

i Research Unit Biodiversity and Conservation Biology, WSL Birmensdorf) realizowany jest od 2012 roku projekt finansowany przez Polsko-Szwajcarski Program Badawczy (por. Aneks II).

Bliską współpracę dotyczącą badań molekularnych flory wysokogórskiej Pracownia utrzymuje również z ośrodkami w Austrii (Institut für Botanik, Universität Innsbruck) i Francji (Laboratoire d'Ecologie Alpine, Université de Grenoble). Szczególnie ważna jest też współpraca z ośrodkami badawczymi w krajach karpaccich, przede wszystkim z Rumunią (Institutul de Cercetări Biologice i Grădina Botanică „Alexandru Borza” – Universitatea Babeş-Bolyai, Cluj-Napoca) i Słowacją (Botanický ústav SAV, Bratislava).

Odrębnym zagadnieniem są międzynarodowe badania terenowe obejmujące zbiory materiałów do badań genetycznych w wielu obszarach górskich Europy i świata. Wyprawy terenowe organizowane były m.in. we wszystkie części Karpat (Słowacja, Rumunia i Ukraina), góry Półwyspu Bałkańskiego (m.in. Bułgaria, Grecja, Macedonia, Czarnogóra, Serbia), Alpy (Austria, Francja, Szwajcaria, Włochy), Pireneje i góry Półwyspu Iberyjskiego (Francja i Hiszpania), Góry Półwyspu Skandynawskiego (Finlandia, Norwegia, Szwecja), Spitsbergen (archipelag Svalbard, Norwegia), Góry Skaliste (Ameryka Północna).

DZIAŁALNOŚĆ DYDAKTYCZNA I POPULARYZATORSKA

Pracownia realizuje zróżnicowaną działalność dydaktyczną, mimo że nie należy ona do głównych nurtów jej aktywności. Regularnie prowadzony jest cykl wykładów poświęconych zastosowaniu analiz DNA w badaniach botanicznych dla Międzynarodowego Studium Doktoranckiego PAN w Krakowie. W ramach umowy z Akademią Górniczo-Hutniczą w Krakowie prowadzony jest cyklicznie autorski kurs teoretyczno-laboratoryjny „Podstawy Analiz DNA” dla studentów Fizyki Medycznej AGH (we współpracy z dr E. Cieślak z Zakładu Systematyki i Fitogeografii Roślin Naczyniowych IB PAN). W Pracowni realizowane są również indywidualne szkolenia i staże. W roku 2012 staże takie na różnych poziomach kształcenia (skierowane do studentów lub doktorantów i programy doskonalenia zawodowego), trwające od miesiąca do pół roku, odbyło pięć osób z różnych ośrodków z Krakowa, Lublina i Wrocławia. Pracownia uczestniczy również w ogólnoinstitutowych imprezach popularyzujących naukę, takich jak Festiwal Nauki w Krakowie.

Metody analityczne i zaplecze aparaturowe Pracowni Analiz Molekularnych

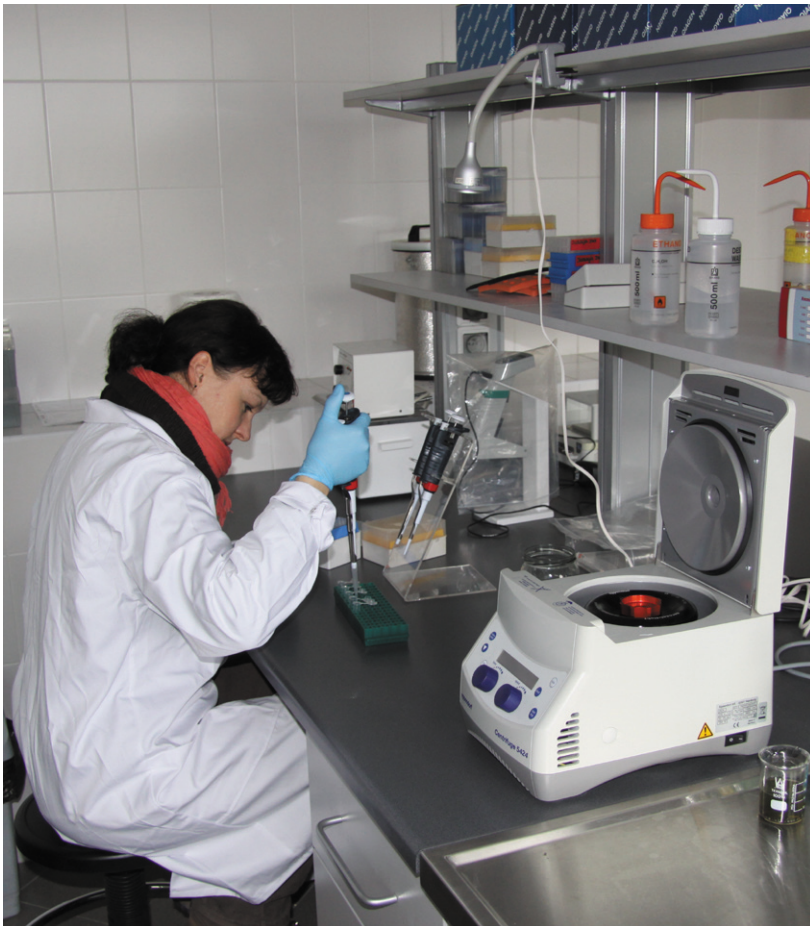
Pracownia dysponuje kompletną aparaturą niezbędną do realizacji analiz zmienności DNA na bazie wielu szeroko stosowanych technik badawczych. Izolacja całkowitego DNA genomowego z roślin i grzybów możliwa jest zarówno metodami opartymi na precipitacji (np. CTAB), na adsorpcji w kolumnach ze złożem krzemionkowym, jak i na wiązaniu na złożach magnetycznych. Możliwa jest izolacja DNA z pojedynczych próbek, jak również

w systemach o wysokiej przepustowości (płytki 96×). Do najważniejszych stosowanych metod analiz genetycznych należą:

- (1) genotypowanie AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*),
- (2) analiza loci mikrosatelitarnych,
- (3) sekwencjonowanie pojedynczych amplikonów DNA (metodą Sanger), opcjonalnie z klonowaniem DNA z zastosowaniem wektorów plazmidowych,
- (4) wysokowydajne sekwencjonowanie DNA nowej generacji (*Next-Generation Sequencing*) i analizy pochodne (np. genotypowanie w oparciu o markery *RAD*).

Pracownia jest podzielona na cztery strefy funkcjonalne (A, B, C, D), z których każda dysponuje odrębnym, kompleksowym wyposażeniem laboratoryjnym:

A. Strefa izolacji DNA (Ryc. 3). Stanowisko jest przystosowane do izolacji całkowitego DNA zarówno metodami opartymi na precipitacji (np. CTAB), na adsorpcji w kolumnach



Ryc. 3. Stanowisko do izolacji DNA z materiału biologicznego (Fot. M. Ronikier).



Ryc. 4. Stanowiska amplifikacji DNA (PCR) w Pracowni Analiz Molekularnych IB PAN (Fot. A. Ronikier).

ze złożem krzemionkowym oraz na wiązaniu na złożach magnetycznych. Możliwa jest izolacja DNA z pojedynczych próbek, jak również izolacja DNA w systemach o wysokiej przepustowości (płytki 96×). Wyposażenie stanowiska obejmuje m.in.:

- (1) wagę precyzyjną *Max WPS 210/C/2* (Radwag) z dokładnością odczytu do 1 mg, do odważania porcji materiału biologicznego do izolacji DNA,
- (2) homogenizatory *MM200* i *Tissue Lyser II* (Retsch) do wydajnego rozdrabniania materiału roślinnego do izolacji DNA lub RNA (z opcją dla pojedynczych próbek i płytek 96°×),
- (3) wirówka *Sigma 4-16K* do płytek 96× z chłodzeniem,
- (4) wirówka próżniowa *CentriVap Concentrator* (Labconco),
- (5) spektrofotometr *GeneQuant pro RNA/DNA Calculator* (Pharmacia – GE Healthcare).

B. Strefa przygotowywania reakcji enzymatycznych (Ryc. 4). Obejmuje szereg stanowisk do przygotowania reakcji trawienia DNA, amplifikacji DNA (reakcje PCR), itp. oraz termocyklery do inkubacji reakcji enzymatycznych w ściśle określonych warunkach cieplnych:

- (1) termocykler 96-dołkowy z gradientem *Veriti* (Applied Biosystems),
- (2) dwa termocyklery 96-dołkowe *GeneAmp PCR System 9700* (Applied Biosystems),

- (3) termocykler z dwoma niezależnymi blokami 48-dołkowymi *C1000* (BioRad),
- (4) termocykler 96-dołkowy z gradientem *PTC-200* (MJ Research),
- (5) blok grzewczy do próbek *CH-100* (Biosan).

C. Strefa sekwencjonowania DNA (Ryc. 5, 6). Umożliwia zarówno uzyskanie sekwencji pojedynczych fragmentów DNA, jak i masowe sekwencjonowanie dużych zestawów matryc DNA. Obejmuje dwie platformy do sekwencjonowania wraz z wyposażeniem peryferyjnym:

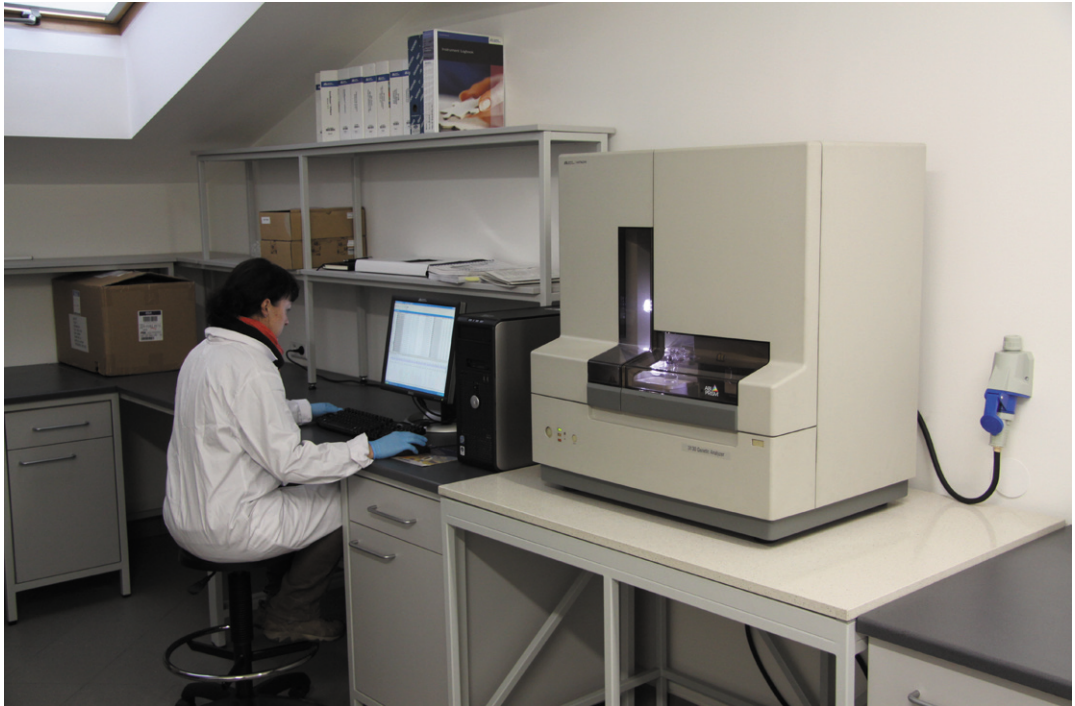
- (1) sekwencjoner 4-kapilarowy *ABI Prism 3130* (Applied Biosystems),
- (2) sekwencjoner nowej generacji *MiSeq Personal Sequencer* (Illumina),
- (3) fluorometr *Qubit 2.0* (Invitrogen),
- (4) aparat do automatycznego, precyzyjnego frakcjonowania DNA *Pippin Prep* (Sage Science).

D. Strefa elektroforezy DNA. Umożliwia przeprowadzenie rozdziału cząsteczek DNA w żelach elektroforetycznych agarozowych i poliakrylamidowych oraz wizualizację DNA i dokumentację wyników. Najważniejsze wyposażenie obejmuje:

- (1) zasilacz do elektroforezy *EPS 3501XL* (Amersham Biosciences),
- (2) zasilacz do elektroforezy *EPS-250* (CBS Scientific Company),
- (3) komory do elektroforezy agarozowej *SubCell GT* (Biorad),



Ryc. 5. Stanowisko sekwencjonowania DNA 'nowej generacji' – aparat Illumina *MiSeq* (Fot. M. Ronikier).



Ryc. 6. Stanowisko sekwencjonera kapilarowego ABI 3130 (Fot. M. Ronikier).

- (4) komorę do elektroforezy poliakrylamidowej Hoefer SE 600 z systemem kontroli temperatury Multitemp III (Amersham Biosciences),
- (5) zintegrowany system do wizualizacji i archiwizacji żeli elektroforetycznych obejmujący transiluminator, kamerę i komputer – *GeneGenius* (Syngene).

Oprócz wymienionej aparatury dedykowanej do poszczególnych stref pracy, podstawowe wyposażenie Pracowni obejmuje również:

- (1) zestawy pipet automatycznych o zmiennej nastawie, jedno- i wielokanałowych, mechanicznych i elektronicznych – Gilson, Matrix,
- (2) wirówki stołowe *Minispin, 5424, 5415D* (Eppendorf),
- (3) mieszadła mechaniczne (worteks) *Reax Top* (Heidolph),
- (4) wirówkę z wymiennymi rotorami i chłodzeniem *5804R* (Eppendorf),
- (5) łaźnie wodne *LW 102, MLL 147* do inkubacji mieszanin,
- (6) inkubator *BD53* (Binder),
- (7) inkubator z wytrząsaniem i regulacją temperatury *Incubator 1000 / Unimax 1010* (Heidolph),
- (8) komora laminarna do pracy w warunkach sterylnych *Lamil Plus 10*,
- (9) destylator wody *Rel 5* (Polna S.A.),
- (10) stacja dejonizująca do produkcji wody ultraczystej na potrzeby biologii molekularnej, typu I (18,2 MΩ/cm) – *Water Pro PS* (Labconco),

- (11) autoklaw *SterilClave 18B* (Cominox),
- (12) zamrażarki szafowe szufladowe, lodówko-zamrażarki, lodówki – Liebherr,
- (13) zamrażarki głębokiego zamrażania – Nuaire,
- (14) wytornica lodu *AF80* (Scotsman),
- (15) waga laboratoryjna *WPS 210/C* (Radwag),
- (16) mieszadło magnetyczne *VarioMag*.

LITERATURA

STACHURSKA-SWAKOŃ A., CIEŚLAK E., RONIKIER M. 2013. Phylogeography of a subalpine tall-herb *Ranunculus plataniifolius* (*Ranunculaceae*) reveals two main genetic lineages in the European mountains. *Botanical Journal of the Linnean Society* 171: 413–428.

BIOGRAMY

Pracownia Analiz Molekularnych IB PAN jest w chwili przygotowywania niniejszego opracowania jednostką w fazie organizacji; na tym początkowym etapie posiada jednego pracownika naukowego zajmującego się jej funkcjonowaniem i planami rozwoju.

Ronikier Michał (ur. 1974), dr, botanik, biogeograf; Zakład Systematyki Roślin Naczyniowych 2000–2011; Pracownia Analiz Molekularnych; kierownik Pracowni; 2011→; tematyka badawcza: zastosowanie analiz genetycznych w biogeografii, ekologii i systematyce, filogeografia roślin i grzybów wysokogórskich w Europie, struktura genetyczna, różnorodność i historia wysokogórskiej flory Karpat, badania populacji rzadkich i zagrożonych roślin górskich w Tatrzańskim Parku Narodowym, ekologia ekosystemów wysokogórskich.