

**Sprawozdanie z realizacji badań podstawowych na rzecz postępu biologicznego w produkcji roślinnej, finansowanych przez MRiRW w ramach zadania nr 23 "Analiza zmienności epigenetycznej indukowanej stresem suszy oraz ocena jej stabilności transgeneracyjnej w aspekcie tolerancji jęczmienia na stres niedoboru wody" w roku 2017.**

Metylacja cytozyny jest modyfikacją DNA odgrywającą istotną rolę w regulacji ekspresji genów. Całościowy profil metylacji cytozyny w genomie, określanej jako metylom DNA, może ulegać zmianom o charakterze dziedzicznym lub niedziedzicznym, określanym zbiorczo jako zmiany epigenetyczne w DNA. Indukowane czynnikami stresowymi zmiany epigenetyczne, a w konsekwencji zmiany w aktywności transkrypcyjnej genów, odgrywają istotną rolę w procesie odpowiedzi roślin na niekorzystne warunki środowiskowe. Długoterminowym celem wieloletniego projektu jest weryfikacja hipotezy zakładającej, że zmiany w metylacji DNA, indukowane podczas stresu suszy, mogą mieć pozytywną wartość adaptacyjną. W związku z tym zakłada się również, że indukcja nowych, korzystnych epialleli może być cennym narzędziem stosowanym w hodowli roślin.

W roku 2017 realizowano dwa tematy badawcze.

### **Temat badawczy 1**

**Globalne analizy metylomu roślin pokolenia EPI<sub>3</sub>, które są potomstwem roślin EPI<sub>2</sub> wyprowadzonych w warunkach kontrolowanego eksperymentu polowego w roku 2016, oraz analizy porównawcze metylomów pomiędzy wyprowadzonymi populacjami roślin.**

Podstawowym **celem tematu badawczego 1** było uzyskanie profili metylacyjnych genomu roślin pokolenia EPI<sub>3</sub>, które były potomstwem 6 populacji roślin EPI<sub>2</sub> wyprowadzonych w warunkach kontrolowanego eksperymentu polowego w roku 2016, oraz ocena poziomu zróżnicowania metylomu pomiędzy roślinami należącymi do tej samej populacji oraz pomiędzy wyprowadzonymi populacjami roślin. Ponadto, istotne było sprawdzenie, czy istnieje zależność pomiędzy doświadczeniem stresu w poprzednich pokoleniach a poziomem zróżnicowania metylomu roślin populacji potomnych i określenie zależności pomiędzy zróżnicowaniem metylomu i transkryptomu roślin będących potomstwem roślin doświadczających stresu suszy w poprzednich pokoleniach.

Materiał badań stanowiły rośliny jęczmienia jarego odmiany 'Karat' pokolenia EPI<sub>3</sub> będące potomstwem 6 populacji roślin pokolenia EPI<sub>2</sub> wyprowadzonych w roku 2016. Na potrzeby realizacji tematów badawczych realizowanych w roku 2017 zostało przeprowadzone **doświadczenie w warunkach polowych** w Stacjach Hodowli Roślin firmy Danko, w **3 lokalizacjach charakteryzujących się różnym reżimem wodnym i różnymi glebami** :

- **Modzurów** - średnioroczny poziom opadów powyżej 650 mm i wyższa średnioroczna temperatura w stosunku do pozostałych regionów kraju. Żyzne gleby (kl III) podnoszą znacząco plon poszczególnych gatunków zbóż. Dodatkowo występuje wysoka presja selekcyjna ze strony patogenów wywołujących choroby u zbóż.
- **Szelejewo** – optymalna lokalizacja dla uprawy zbóż jarych. Średnioroczny poziom opadów na poziomie 550 mm. Gleby żyzne (kl III i IV) o podłożu gliniastym, o dużej pojemności wodnej. Pozwala to na testowanie odmian zbóż pod względem właściwego wykorzystania warunków pogodowych.
- **Choryń/Kopaszewo** – lokalizacja, która umożliwia testowanie poziomu adaptacji systemu korzeniowego jak i całej rośliny do warunków chronicznego braku wody. Warunki środowiskowe podobne do lokalizacji Szelejewo, z tą różnicą, że znajdują się tam gleby bardzo przepuszczalne.

Rośliny hodowano w warunkach polowych w 3 powtórzeniach technicznych (po 3 poletka doświadczalne o powierzchni 5 m<sup>2</sup> każde w każdej z lokalizacji). Analiza

metylomu została przeprowadzona metodą MSAP-Seq (sekwencjonowanie fragmentów restrykcyjnych powstałych z użyciem metylacyjno-zależnego enzymu restrykcyjnego z użyciem metod sekwencjonowania następnej generacji, NGS; Chwialkowska i wsp., 2017).

## **Wyniki**

Zgodnie z założeniami przeprowadzono eksperymenty polowe polegające na wzroście roślin w warunkach naturalnych w 3 lokalizacjach w Polsce. Wobec uprawianych roślin przeprowadzono standardowe zabiegi agrotechniczne. W celu analiz metylomu, do analiz pobierano liść podflagowy z 5 pojedynczych roślin należących do każdej z 6 populacji roślin z każdego z 3 poletek doświadczalnych (5x6x3=90 roślin), przygotowano również dokumentację fotograficzną obrazującą stan i pokrój roślin, z których pobierany był materiał do analiz.

Biblioteki do analiz metodą MSAP-Seq przygotowano z wykorzystaniem zestawu NEXTFlex Rapid DNA-Seq Library Prep Kit for Illumina Sequencing (BIOO Scientific, Austin, USA). Jakość przygotowanych bibliotek określano za pomocą elektroforezy z wykorzystaniem zestawów Agilent High Sensitivity DNA kit.

Sekwencjonowanie metodą NGS zostało przeprowadzone w Centrum Analiz Genomowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, z użyciem sekwenatora NGS HiSeq 4000 (Illumina). Sekwencjonowano 24 biblioteki w pojedynczej ścieżce sekwenatora. Po sekwencjonowaniu przeprowadzono analizy jakości i ilości surowych odczytów i wykazano poprawne zsekwencjonowanie badanych bibliotek, zapewniające wymagane pokrycie miejsc metylowanych analizowanych metodą MSAP-Seq w genomie jęczmienia. W kolejnym etapie przeprowadzono analizy bioinformatyczne uzyskanych wyników sekwencjonowania z użyciem opracowanego w naszej grupie protokołu analitycznego i narzędzia MSEQER (<http://mseqer.us.edu.pl/mseqer/>).

W toku realizacji zadania uzyskano profile metylacyjne roślin pokolenia EPI<sub>3</sub>, które są potomstwem 6 populacji roślin EPI<sub>2</sub>, uprawianych w roku 2017 w warunkach polowych w trzech lokalizacjach w Polsce. Przeprowadzone analizy umożliwiły ocenę poziomu zróżnicowania metylomu pomiędzy roślinami należącymi do tej samej populacji oraz pomiędzy populacjami wyprowadzonymi w toku realizacji kilkuletniego projektu. Wykazano, że doświadczanie stresu suszy istotnie wpływa na zmiany w metylomie roślin jęczmienia. Zaobserwowano również, że poziom i charakter zmian zależy od stadium doświadczania stresu (susza w stadium siewki oraz susza w stadium mejozy). Przeprowadzone analizy wskazały więc na istnienie potencjalnych zależności pomiędzy stresem środowiskowym, zmianami w transkryptomie roślin oraz różnicami fenotypowymi obserwowanymi w warunkach polowych po kilkupokoleniowej ekspozycji roślin na stres niedoboru wody. Wydaje się więc, że utrwalone zmiany fenotypowe, często istotne z punktu widzenia hodowli roślin, mogą wynikać z utrwalonych zmian w metylomie roślin, spowodowanych stresem suszy.

## **Wnioski**

Przeprowadzone analizy umożliwiły kompleksową charakterystykę metylomu roślin, będących potomstwem roślin poddawanych wcześniej stresowi suszy. Wykazano przy tym, że zmiany w metylomie mogą nieść konsekwencje w postaci pozytywnego wpływu na fenotyp roślin, w szczególności na ważne cechy struktury plonu. W związku z tym wskazuje się na potencjalne wykorzystanie indukowanej zmienności metylacyjnej w programach hodowlanych jęczmienia.

## **Temat badawczy 2**

**Ocena struktury plonu populacji roślin pokolenia EPI<sub>3</sub> w warunkach polowych w stacjach hodowli roślin w trzech lokalizacjach w Polsce w celu określenia możliwości wykorzystania indukowanej zmienności epigenetycznej w hodowli roślin zbożowych.**

**Celem tematu badawczego 2** była charakterystyka cech struktury plonu roślin będących potomstwem populacji wyprowadzonych w różnych warunkach wzrostu (populacje doświadczające stresu oraz populacje, których pokolenia rodzicielskie hodowane były w warunkach kontrolnych) rosnących w warunkach polowych, oraz, na podstawie uzyskanych wyników, określenie możliwości wykorzystania indukowanej zmienności epigenetycznej w pracach hodowlanych roślin zbożowych.

Materiał badań stanowiły rośliny jęczmienia jarego odmiany 'Karat' pokolenia EPI<sub>3</sub> będące potomstwem 6 populacji roślin pokolenia EPI<sub>2</sub> wyprowadzonych w roku 2016, opisane w zadaniu badawczym nr 1. Rośliny hodowano w warunkach polowych w 3 powtórzeniach technicznych (po 3 poletka doświadczalne o powierzchni 5 m<sup>2</sup> każde w każdej z lokalizacji).

## **Wyniki**

Przeprowadzono eksperyment wzrostu roślin w warunkach polowych w trzech lokalizacjach w Polsce, w trzech powtórzeniach dla każdej z 6 populacji roślin (3x6x3 = 54 poletka doświadczalne). W celu realizacji zadania badawczego 2 przeprowadzono szereg analiz późniwych, dotyczących charakterystyki cech struktury plonu. W przeprowadzonych analizach brano pod uwagę: plon całkowity populacji roślin, masę 1000 ziaren oraz wielkość ziarniaków.

Przeprowadzone analizy całkowitego plonu roślin wykazały, że doświadczanie stresu suszy w poprzednich pokoleniach wpływa istotnie na plon roślin uprawianych w skali polowej. Porównując całkowity plon roślin będących potomstwem roślin poddawanych stresowi suszy w 2 lub 3 poprzednich pokoleniach w stosunku do roślin, będących potomstwem roślin, które nie były poddawane stresowi suszy, wykazano tendencje wzrostu plonu roślin, których poprzednie pokolenia doświadczały stresu. Obserwacja ta jest widoczna szczególnie w sytuacji, kiedy rośliny uprawiane są w optymalnych warunkach polowych (stacja Szelejewo) – w takich warunkach, prawie wszystkie populacje roślin, których pokolenia rodzicielskie doświadczały wcześniej stresu wykazywało wzrost wartości plonu w przedziale od 3,5% do 11%. Wykazano przy tym, że największy wzrost plonu dotyczy roślin, których poprzednie pokolenia doświadczały stresu suszy w stadium mejozy (susza późna). W sytuacji kiedy analizowane rośliny rosły w warunkach dużego dostępu do wody (Modzurów), parametr zwiększenia plonu nie był tak wyraźny jak w przypadku wzrostu w warunkach optymalnych, i dotyczył wyłącznie wzrostu plonu o 10% dla potomstwa roślin, które w pierwszych 2 pokoleniach doświadczały stresu suszy późnej. Przeprowadzone analizy wykazały również, że w przypadku, kiedy analizowane rośliny uprawiano w warunkach ograniczonego dostępu do wody (możliwa okresowa susza glebowa na glebach wysokoprzepuszczalnych), plon zwiększa się głównie u roślin, które doświadczyły stresu suszy głównie w ostatnim pokoleniu (wzrost wartości plonu o 11,5% w populacji C0C1S2). Co interesujące jednak, warunki takie powodowały spadek wartości plonu populacji roślin, które dwukrotnie doświadczały stresu suszy późnej (S10S11C2).

Przeprowadzone analizy późniwe dotyczące masy tysiąca ziaren analizowanych roślin wykazały, że doświadczanie stresu suszy w poprzednich pokoleniach pozytywnie wpływa na ten parametr fenotypowy. Zaobserwowano, że rośliny będące potomstwem roślin doświadczających stresu suszy, zarówno w stadium siewki jak i w stadium mejozy, wydaje nasiona o istotnie większej masie w sytuacji kiedy rośliny te wznoszą się w warunkach

optymalnych oraz w warunkach z okresowymi niedoborami wody (odpowiednio stacje w Szelejewie i w Choryni). Parametr masy 1000 ziaren zwiększa się średnio aż o 10% w przypadku roślin rosnących w warunkach niesprzyjających, natomiast w sytuacji kiedy rośliny rosą w warunkach optymalnych, obserwuje się średni wzrost masy 1000 ziaren o 4%. Wyniki te są bardzo zbliżone do wyników uzyskanych w poprzednim roku realizacji projektu, przeprowadzonych na znacznie mniejszą skalę w częściowo kontrolowanych warunkach polowych. W sytuacji, kiedy badane populacje rosły w warunkach wysokiego nawodnienia (stacja w Modzurowie), nie zaobserwowano wzrostu masy analizowanych ziarniaków.

### **Dyskusja i wnioski**

Przeprowadzone analizy fenotypowe roślin pokolenia Epi<sub>3</sub> wyprowadzonych w warunkach polowych w trzech lokalizacjach w Polsce, różniących się pod względem warunków klimatycznych i glebowych, wykazały i potwierdziły w stosunku do dotychczasowych obserwacji istnienie zależności pomiędzy doświadczaniem stresu suszy w pokoleniach rodzicielskich roślin jęczmienia a tolerancją na stres niedoboru wody u potomstwa.

Wykazano, że stres suszy zadany roślinom w stadium strzelania w źdźbło sprzyja uzyskiwaniu lepszych wyników pod względem plonu roślin, których poprzednie pokolenia doświadczały stresu. Obserwacja ta jest widoczna szczególnie w sytuacji, kiedy rośliny uprawiane są w optymalnych warunkach polowych (stacja Szelejewo). Wyniki te są zgodne z obserwacjami poczynionymi w poprzednim roku realizacji projektu. Podobnie wykazano, że wzrost roślin, których dwa poprzednie pokolenia poddawane były stresowi niedoboru wody w stadium strzelania w źdźbło powoduje uzyskiwanie gorszych wyników pod względem plonu, w przypadku gdy potomstwo tych roślin wzrasta ponownie w warunkach stresu. Podobnie stres doświadczany w poprzednich pokoleniach wpływa na istotny parametr plonowania jakim jest masa 1000 ziaren, w szczególności, kiedy rośliny uprawiane są w warunkach optymalnych, lub kiedy doświadczają okresowo niewielkiego niedoboru wody. Uprawa roślin w warunkach wysokiego nawodnienia generalnie nie wpływa w żaden sposób na plon roślin, które w poprzednich pokoleniach doświadczają stresu niedoboru wody.

Przeprowadzone analizy roślin pokolenia Epi<sub>3</sub> uprawianych w warunkach polowych wykazały istnienie zależności pomiędzy doświadczaniem stresu suszy w pokoleniach rodzicielskich roślin jęczmienia a tolerancją na stres niedoboru wody u potomstwa. Wykazano w szczególności, że w optymalnych warunkach glebowych i pogodowych, potomstwo roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody w stadium mejozy w dwóch i trzech poprzednich pokoleniach, charakteryzuje się istotnie lepszymi wynikami pod względem plonu niż potomstwo roślin, które nie doświadczyły stresu suszy. Stres suszy zadany roślinom, których trzy poprzednie pokolenia poddawane były stresowi niedoboru wody w stadium mejozy powoduje uzyskiwanie nieznacznie gorszych wyników pod względem całkowitego plonu (kompensacja dzięki wyższym wartościom masy 1000 ziaren). W związku z tym wydaje się, że wykorzystanie materiału siewnego roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody, szczególnie w stadium kłoszenia/mejozy, może mieć korzystny efekt dla plonu roślin uprawianych w warunkach optymalnych w kolejnym pokoleniu a tym samym wykazano, że istnieje możliwość wykorzystania indukowanej zmienności epigenetycznej w pracach hodowlanych roślin zbożowych.