

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 2018.

Metylacja cytozyny jest modyfikacją DNA odgrywającą istotną rolę w regulacji ekspresji genów. Całościowy profil metylacji cytozyny w genomie, określany 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 2018 realizowano dwa tematy badawcze.

Temat badawczy 1

Globalne analizy transkryptomu roślin pokolenia EPI₃, które są potomstwem roślin EPI₂ wyprowadzonych w warunkach kontrolowanego eksperymentu polowego w roku 2016, oraz analizy porównawcze transkryptomów pomiędzy wyprowadzonymi populacjami roślin.

Podstawowym celem realizacji tematu badawczego 1 było uzyskanie globalnych profili transkryptomicznych roślin pokolenia EPI₃, które są potomstwem 6 populacji roślin EPI₂ wyprowadzonych w warunkach kontrolowanego eksperymentu polowego w roku 2016.

Materiał badań stanowiły rośliny jęczmienia jarego odmiany 'Karat' pokolenia EPI₃ będące potomstwem 6 populacji roślin pokolenia EPI₂ wyprowadzonych w roku 2016. Rośliny hodowano w kontrolowanych warunkach szklarni WBiOŚ, w warunkach identycznych jak w roku 2015. W celu analizy transkryptomu badanych roślin, postępowano identycznie jak w poprzednich latach prowadzenia analiz RNA-Seq. Analiza RNA-Seq przeprowadzona została na matrycy mRNA oczyszczonego z frakcji rRNA i tRNA metodą deplecji z użyciem bibliotek anty-rRNA i anty-tRNA. Gotowe biblioteki połączono w równomolowych ilościach, po 6 próbek, a następnie przeprowadzono generowanie klastrów i zsekwencjonowano je w trybie sparowanych końców (PE) 2 × 76 pz, w Centrum Analiz Genomowych Uniwersytetu Medycznego w Białymstoku, z wykorzystaniem sekwenatora NGS HiSeq 4000 firmy Illumina. Na jednej ścieżce zsekwencjonowano 6 prób RNA-Seq.

Jakość uzyskanych danych sekwencyjnych była oceniana przed analizą oraz po każdym z jej etapów, za pomocą narzędzia FastQC (Babraham Institute, Cambridge, Wielka Brytania). W związku z wysoką jakością uzyskanych odczytów, zostały one poddane jedynie łagodnemu przycięciu i filtrowaniu. Odczyty zmapowano do genomu referencyjnego jęczmienia (ASM32608v1.31 – Ensembl Plants) za pomocą narzędzia STAR umożliwiającego mapowanie

z przerwami. Za pomocą wbudowanej opcji zliczano ilości odczytów mapujących się unikalnie do określonych genów. Zliczenia odczytów zostały znormalizowane za pomocą algorytmu narzędzia DESeq2. Analiza różnic w ekspresji genów pomiędzy próbami, była wykonywana również za pomocą narzędzia DESeq2. Dalszą analizę uzyskanych danych prowadzono z wykorzystaniem szeregu dedykowanych pakietów w środowisku R.

Wyniki

Przeprowadzono eksperyment związany ze wzrostem opisanych powyżej grup roślin w kontrolnych warunkach szklarniowych. Podczas eksperymentu kontrolowano warunki wilgotnościowe gleby w celu utrzymania stałego poziomu wilgotności wagowej gleby. Warunki eksperymentu (gleba, wilgotność gleby, temperatura i oświetlenie w szklarni oraz pora roku) były identyczne jak w latach poprzednich kompleksowego projektu, co gwarantuje możliwość porównania stanu transkryptomu analizowanych roślin między pokoleniami.

Przeprowadzone analizy jakości i ilości przygotowanych bibliotek potwierdziły poprawne przygotowanie prób do analiz metodą RNA-Seq. Wstępne analizy bioinformatyczne wykazały, że uzyskane wyniki umożliwiają dokładną analizę transkryptomów badanych roślin. Podczas przeprowadzonych analiz zyskano wysoki poziom unikalnie zmapowanych odczytów w obrębie wszystkich prób. Następnie, wyniki przeprowadzonych badań analizowano łącznie z innymi wynikami w ramach tematu badawczego 2.

Temat badawczy 2

Wielowymiarowe analizy bioinformatyczne i statystyczne danych uzyskanych w toku realizacji projektu w latach 2014-2018.

Celem tematu badawczego 2 była pełna, wielowymiarowa charakterystyka zmian w transkryptomie i metylomie roślin jęczmienia pokolenia EPI3 w stosunku do pokoleń poprzednich oraz pokolenia wyjściowego EPI0, charakterystyka oraz ocena odziedziczalności epialleli indukowanych w trakcie realizacji projektu w układzie kumulacyjnym (EPI0, EPI1, EPI2) w odniesieniu do epitypu wyjściowego EPI0 oraz, w konsekwencji, określenie możliwości wykorzystania indukowanej zmienności epigenetycznej w pracach hodowlanych roślin zbożowych oraz jej pełna charakterystyka molekularna i ocena wpływu na fenotyp.

Materiał analiz stanowiły wszystkie wyniki oraz surowe dane pochodzące z analiz molekularnych i fenotypowych, uzyskanych w latach 2014-2018. Na podstawie zebranych danych przeprowadzone zostały ponownie analizy porównawcze ekspresji genów oraz analizy porównawcze profili metylacyjnych roślin pokoleń EPI0-EPI3. Ponadto, przeprowadzono analizy oceny wpływu zmienności metylacyjnej na zmienność transkryptomyczną a także analizy koncepcyjne, wpływu zmienności transkryptomu na szlaki metaboliczne i fizjologię roślin, przejawiające się w zmianach fenotypu/plonu roślin.

W przeprowadzonych analizach wykazano, że doświadczanie stresu suszy w stadium mejozy ale też w stadium siewki indukuje szereg zmian w poziomie ekspresji genów. Aby określić stopień odziedziczalności wyindukowanych stresem niedoboru wody profili ekspresyjnych, przeprowadzono szereg analiz w wielu układach porównawczych. Wytypowano szereg genów zaangażowanych w kluczowe procesy odpowiedzi na warunki niedoboru wody w glebie,

jednakże odpowiedź na obydwa rodzaje suszy była zróżnicowana. Kompleksowe analizy porównawcze kilku pokoleń roślin badanych podczas całego projektu umożliwiły jednak wyciągnięcie znacznie istotniejszych wniosków. Co szczególnie interesujące, wykazano, że pewna część genów wykazujących zmieniony profil ekspresji pod wpływem stresu suszy, wykazywała jego odziedziczalność w kolejnym pokoleniu – w szczególności w przypadku roślin doświadczających suszy w stadium mejozy. W takim przypadku, odziedziczalność profilu ekspresji charakterystycznego dla odpowiedzi na stres, powodować może z założenia przygotowanie na wystąpienie tego stresu u roślin kolejnego pokolenia, a tym samym potencjalnie większą tolerancję na stres w momencie jego wystąpienia. Co ciekawe, przeprowadzone analizy wykazały, że wzrost kolejnych pokoleń roślin w optymalnych warunkach nawodnienia nie powoduje istotnego powrotu profili ekspresyjnych do stanu z początku eksperymentu (przed zadaniem jakiegokolwiek stresu).

W konsekwencji wytypowano pulę genów, których profil ekspresji jest stabilnie przekazywany w kolejnych pokoleniach, mimo braku czynnika indukującego w postaci stresu niedoboru wody. Analizy ontologii zidentyfikowanych genów umożliwiły charakterystykę procesów, które regulowane są przez te geny. Wykazano, że geny o obniżonym lub podwyższonym profilu ekspresji u wszystkich roślin analizowanych w latach 2015-2018 w stosunku do roślin kontrolnych z 2014 roku zaangażowane są głównie w transport transmembranowy i transport komórkowy jonów oraz metabolizm tłuszczów. Procesy te związane są z adaptacją do warunków niedoboru wody, w związku z czym możliwe jest stwierdzenie, że zaobserwowana stabilna indukcja zmian w ekspresji genów może pozytywnie wpływać na adaptację do warunków stresu w kolejnych pokoleniach roślin, a tym samym zwiększać ich produktywność w stosunku do roślin, u których taka indukcja nie wystąpiła.

Przeprowadzona analiza zmian w metylomach roślin wyprawdzanych w kolejnych latach kilkuletniego projektu, umożliwiła identyfikację regionów genomowych podlegających zróżnicowanej metylacji. Wykazano, że największa liczba zmian wystąpiła w potomstwie roślin, które w roku 2014 i 2015 wzrastały w warunkach kontrolnych a w roku 2016 przeszły suszą polową, w stosunku do roślin które w każdym eksperymencie wzrastały w warunkach kontrolnych, oraz w potomstwie roślin, które w roku 2014 i 2015 przeszły suszę późną a w roku 2016 wzrastały w warunkach kontrolnych, w stosunku do roślin które w każdym eksperymencie wzrastały w warunkach kontrolnych.

Analiza funkcji genów, w których zaszło najwięcej odziedziczalnych zmian metylacyjnych wyindukowanych stresem niedoboru wody, wskazuje na istotny udział indukowanych zmian metylacyjnych w regulacji procesów epigenetycznych związanych z modyfikacjami histonów, oraz procesami regulacji ekspresji genów na drodze miRNA. Jest to niezwykle ciekawa i oryginalna obserwacja, ponieważ sugeruje wpływ wyindukowanych zmian w metylomie na stabilizację zmian transkryptycznych.

Geny, których profile ekspresji i/lub metylacji podlegają stabilnej transmisji międzypokoleniowej mogą leżeć u podstaw procesów adaptacyjnych do warunków stresu. Biorąc pod uwagę wyniki analiz fenotypowych roślin poddanych różnym kombinacjom traktowań w kolejnych pokoleniach oraz stabilności transgeneracyjnej zmian wyindukowanych stresem niedoboru wody, które wskazują na stabilny charakter takich zmian, wydaje się, że wykorzystanie materiału siewnego roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody,

szczególnie w stadium kłoszenia/mejozy, może mieć korzystny efekt dla plonu roślin w kolejnym pokoleniu a cecha ta może mieć charakter stabilny. Wykazano, że u podstaw tego procesu może leżeć indukcja zmian w poziomie ekspresji kluczowych genów warunkowana częściowo - choć na niewielką skalę - modyfikacjami epigenetycznymi.

WNIOSKI KOŃCOWE

Biorąc pod uwagę wyniki analiz fenotypowych roślin poddanych różnym kombinacjom traktowań w kolejnych pokoleniach oraz stabilności transgeneracyjnej zmian wyindukowanych stresem niedoboru wody, które wskazują na stabilny charakter takich zmian, wydaje się, że wykorzystanie materiału siewnego roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody, szczególnie w stadium kłoszenia/mejozy, może mieć korzystny efekt dla plonu roślin w kolejnym pokoleniu a cecha ta może mieć charakter stabilny. Wykazano, że u podstaw tego procesu może leżeć indukcja zmian w poziomie ekspresji kluczowych genów warunkowana częściowo - choć na niewielką skalę - modyfikacjami epigenetycznymi. W konsekwencji wydaje uzasadnione stwierdzenie, że zmienność epigenetyczna może być wykorzystywana do generowania linii o korzystnych agronomicznie cechach a jej wykorzystanie może znaleźć zastosowanie w programach hodowlanych.