

**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 2016.**

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 2016 realizowano dwa tematy badawcze.

- **Temat badawczy 1**

**Globalne analizy transkryptomu jęczmienia roślin pokolenia EPI<sub>2</sub> (potomstwa roślin EPI<sub>1</sub>), oraz potomstwa roślin EPI<sub>0</sub> które w roku 2015 nie były poddawane stresowi suszy, z wykorzystaniem metody RNA-Seq oraz identyfikacja genów ulegających zróżnicowanej ekspresji w stosunku do pokolenia EPI<sub>0</sub> i EPI<sub>1</sub>.**

Podstawowym celem realizacji tematu badawczego 1 było sprawdzenie, czy stres suszy prowadzony w poprzednim pokoleniu prowadzi do zmian w transkryptomie potomstwa roślin, które przeszły stres suszy. Ponadto, istotne było określenie, czy przeprowadzanie roślin, których wcześniejsze pokolenie poddawane było stresowi suszy, przez warunki kontrolne (bez stresu suszy) powoduje powrót transkryptomu do stanu wyjściowego a tym samym określenie, czy zmiany w transkryptomie są utrzymywane mimo zniesienia warunków stresowych.

W celu realizacji tematu badawczego 1 przeprowadzono eksperyment oparty o globalne profilowanie transkryptomu z wykorzystaniem metody RNA-Seq dla 24 roślin. Analizom poddano po 6 roślin będących potomstwem roślin EPI<sub>1</sub> poddawanych wcześniej suszy w dwóch stadiach rozwojowych (susza wczesna i susza późna, w sumie 12 roślin), oraz po 6 roślin będących potomstwem roślin EPI<sub>1</sub>, które w roku 2015 nie były poddawane stresowi suszy, a są potomstwem roślin EPI<sub>0</sub> poddawanych w roku 2014 stresowi suszy w dwóch stadiach rozwojowych (susza wczesna i susza późna, w sumie 12 roślin). Podczas eksperymentu kontrolowano warunki wilgotnościowe gleby w celu utrzymania stałego poziomu 12% wilgotności wagowej gleby. Warunki eksperymentu (gleba, wilgotność gleby, temperatura i oświetlenie w szklarni oraz pora roku) były identyczne jak w roku 2014 i 2015 kompleksowego projektu, co gwarantowało możliwość porównania stanu transkryptomu analizowanych roślin między pokoleniami.

Przeprowadzone analizy umożliwiły kompleksową charakterystykę transkryptomu roślin, będących drugim pokoleniem roślin poddawanych wcześniej stresowi suszy. Na podstawie analiz wykazano, że rośliny, które są potomstwem roślin poddawanych stresowi suszy w dwóch następujących po sobie pokoleniach (Se0Se1C2 i SI0SI1C2), wykazują większe zróżnicowanie transkryptomu, niż rośliny które są potomstwem roślin poddawanych stresowi w jednym pokoleniu (Se0C1 i SI0C1). Zarówno w przypadku roślin poddawanych stresowi w stadium siewki (Se) jak i w fazie mejozy (SI) w dwóch następujących po sobie pokoleniach, obserwuje się wzrost liczby genów ulegających zróżnicowanej ekspresji w stosunku do roślin poddawanych stresowi w jednym pokoleniu o ok 500 genów (odpowiednio 959 vs 528 i 1121 vs 611). Wynik ten wskazuje na akumulacyjny charakter zmian indukowanych w transkrypcji roślin poddawanych stresowi w następujących po sobie pokoleniach a tym samym świadczy o zwiększeniu zmienności transkryptomu takich roślin.

Uzyskane wyniki wskazują na stabilność transgeneracyjną zmian w transkrypcji roślin, będących potomstwem roślin poddawanych stresowi, przy czym zmiany te dotyczą procesów zaangażowanych w adaptację roślin do niekorzystnych warunków środowiskowych, oraz procesów mogących mieć wpływ na produktywność roślin. Co bardzo istotne, stabilność transgeneracyjna wyindukowanych stresem zmian, w przypadku kiedy zmiany te dotyczą procesów mogących wpływać na adaptację kolejnych pokoleń do warunków stresowych, może mieć istotne znaczenie związane z wykorzystaniem indukowanej stresem zmienności o charakterze funkcjonalnym (zmienność epigenetyczna wpływająca na stan transkryptomu) w programach hodowlanych roślin uprawnych.

#### ▪ **Temat badawczy 2**

**Analizy fenotypowe parametrów wzrostu roślin i cech struktury plonu (liczba pędów, długość pędu, sucha masa, liczba kłosów, plon oraz masa 1000 ziaren) roślin pokolenia EPI<sub>2</sub> poddawanych stresowi w 2 stadiach rozwojowych i roślin tego pokolenia rosnących w warunkach kontrolnych oraz roślin kontrolnych w stresie suszy i w warunkach kontrolnych.**

Podstawowym celem realizacji tematu badawczego 2 było uzyskanie informacji nt. parametrów fenotypowych roślin rosnących w warunkach polowych w warunkach kontrolnych oraz charakterystyka i ocena zmian parametrów fenotypowych zachodzących pod wpływem stresu suszy u analizowanych roślin pokolenia EPI<sub>2</sub>S1 i EPI<sub>2</sub>S2. Dokonano również oceny wpływu traktowania stresem suszy roślin drugiego pokolenia (EPI<sub>1</sub>) na kondycję roślin pokolenia EPI<sub>2</sub>.

W celu realizacji tematu badawczego 2 przeprowadzono eksperyment wzrostu roślin w warunkach polowych, przy częściowym zadaszeniu namiotem foliowym, umożliwiającym kontrolę nawadniania roślin. Uzyskane warunki dały możliwość zastosowania stresu niedoboru wody w obrębie pierwszej grupy doświadczalnej poddawanej stresowi, przy czym rośliny drugiej grupy doświadczalnej, kontrolnej, były podlewane tak, aby nie doświadczały stresu suszy. Przeprowadzone doświadczenie polowe umożliwiło wyprowadzenie 634 roślin, które poddano następnie kompleksowym, późniejszym analizom fenotypowym. Analizowano 6 parametrów cech fenotypowych, obejmujących określenie liczby pędów, długości pędu,

suchej masy rośliny, liczby wytworzonych kłosów, całkowitego plonu z rośliny oraz masy 1000 ziaren z analizowanej grupy roślin. W rezultacie przeprowadzono 3804 pomiary parametrów cech fenotypowych analizowanych roślin.

Przeprowadzone analizy fenotypowe roślin pokolenia Epi2 wyprowadzonych w warunkach eksperymentu polowego wykazały istnienie potencjalnych zależności pomiędzy doświadczaniem stresu suszy w pokoleniach rodzicielskich roślin jęczmienia a tolerancją na stres niedoboru wody u potomstwa. Wykazano, że w warunkach normalnych potomstwo roślin, które doświadczyły stresu niedoboru wody w stadium mejozy w dwóch poprzednich pokoleniach, charakteryzuje się lepszymi wynikami pod względem suchej masy, plonu i masy 1000 ziaren niż potomstwo roślin, które nie doświadczyły stresu suszy. Stres suszy zadany roślinom, których dwa poprzednie pokolenia poddawane były stresowi niedoboru wody w stadium mejozy powoduje uzyskiwanie gorszych wyników pod względem liczby pędów i liczby kłosów, jednak tylko nieznacznie wpływa na obniżenie całkowitego plonu (kompensacja dzięki wyższym wartościom masy 1000 ziaren). Wykazano również, że stres suszy zadany roślinom w stadium siewki nie wywołuje tak istotnych zmian w mierzonych parametrach w kolejnych pokoleniach, jak stres zadany wcześniej w stadium kłoszenia. Wydaje się jednak sprzyjać nieco wyższemu plonowaniu (plon z rośliny oraz masa 1000 ziaren), w przypadku gdy potomstwo tych roślin wzrasta w warunkach normalnych. Biorąc pod uwagę wyniki analiz 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.