

Vererbung erworbener epigenetischer Muster auf Folgegenerationen in generativer Vermehrung

Die Ergebnisse – kurzgefasst

Es ist bekannt, dass epigenetische Markierungen durch verschiedene Umweltfaktoren beeinflusst und dann an folgende Generationen weitergegeben werden können. Hier haben wir den abiotischen Stress "Hitze" als Beispiel genommen, um seine Auswirkungen auf die epigenetischen Merkmale verschiedener Petunien-Genotypen zu untersuchen. Parallel haben wir auch reziproke Kreuzungen zwischen Gametophyten mit und ohne Hitzestress durchgeführt, um die Übertragungseigenschaften der beobachteten Phänotypen in generativer Vermehrung zu verstehen. Verschiedene mit Hitzestress (HS) verbundene Phänotypen, die in drei Petunien-Genotypen identifiziert wurden, zeigten ein pollen-assoziiertes Vererbungsmuster in den Nachkommen der Kreuzungen. Diese sind: (1) verzögerter Beginn des ersten echten Blattes bei *P. axillaris*, (2) fusionierte Kelchblätter bei *P. exserta* und (3) defekte "Miniaturblüte" bei *P. hybrida* 'Mitchell'. Die Häufigkeit dieser Phänotypen ist in den Kreuzungsgruppen mit HS-behandeltem Pollen höher als in den nicht HS-behandelten Kontrollen. Dies entspricht dem Modell, dass DNA-Methylierungen in Pollen durch maintenance DNA-Methyltransferasen weitgehend erhalten bleiben, wohingegen sie in der weiblichen Keimbahn durch DNA-Demethylasen großflächig entfernt werden (JULLIEN ET AL. 2012). Detaillierte Analysen auf epigenetischer Ebene sind für die Zukunft geplant, um zu klären, ob es zugrunde liegende epigenetische Markierungen gibt, die mit den beobachteten Phänotypen korrelieren.

Versuchsfrage und Versuchshintergrund

Abiotische Stressfaktoren wie Hitze werden im Zeitalter der globalen Erwärmung immer dominanter. Das Verständnis ihrer Einflüsse auf die Pflanzen auf epigenetischer Ebene ist jedoch noch nicht gut erforscht. Zwar wurden bereits mehrere Studien an Nachtschatten-Gewächsen wie Tomate durchgeführt (BENOIT ET AL. 2019), aber über Gartenbaupflanzen ist noch sehr wenig bekannt. *Petunia* als Nachtschatten-Modellpflanze für den Gartenbau, die gegenüber Tomate den Vorteil hat, dass sie größere farbige Blüten und kürzere Generationszeiten hat, ist bisher ebenfalls wenig untersucht. Es sollte überprüft werden, ob Phänotypen, die nach HS-Behandlung in den Stecklingsnachkommen auftraten (fusionierte Kelchblätter in Blüten von *P. exserta* sowie die Ausbildung fehlgebildeter Miniatur-Blüten in *P. hybrida* 'Mitchell') auch in generativer Vermehrung auf die Folgegenerationen übertragen werden können. Im Falle einer Weitergabe der HS-induzierten Phänotypen sollte ebenfalls überprüft werden, ob der Effekt andauert (und somit möglicherweise auf Mutationen oder HS-induzierten Transposon Rearrangements beruht) oder ob der Effekt reversibel ist (verschwindet, wenn der HS-Reiz nicht länger andauert). Eine Reversibilität des Effekts würde eine klare Tendenz zu einem epigenetischen Effekt aufzeigen, der in Folgeuntersuchungen molekular bestätigt werden soll. In diesem Fall soll nach reversiblen epigenetischen Markern gesucht werden, deren Induktion und Verschwinden mit der HS-Behandlung korrelieren.

Vererbung erworbener epigenetischer Muster auf Folgegenerationen in generativer Vermehrung

Ergebnisse im Detail

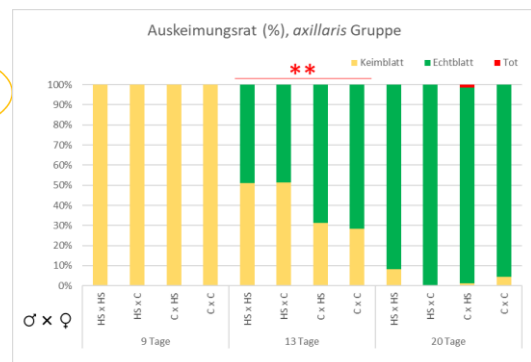
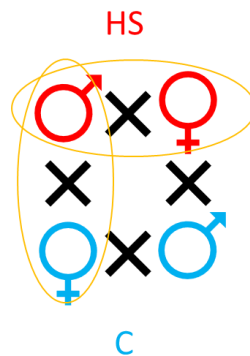
In der F1-Population von Selbstkreuzungen und Kreuzungen mit HS-behandeltem Pollen oder ohne HS wurden unterschiedliche Häufigkeiten von Phänotypen beobachtet. Es konnten in insgesamt drei Petunien-Genotypen verschiedene phänotypische Veränderungen, jeweils abhängig von der Hitzebehandlung der Pollen-Donorpflanzen identifiziert werden.

Zunächst wurden HS-behandelte und Kontrollpflanzen mit sich selbst bzw. reziprok HS und Kontrollpflanzen miteinander gekreuzt. Die resultierenden vier Gruppen an Kreuzungsnachkommen (♂ × ♀: HS × HS, HS × Kontrolle, Kontrolle × HS, Kontrolle × Kontrolle) wurden anschließend zur Keimung gebracht und bis zur Blüteninduktion regelmäßig bonitiert.

Während der regelmäßigen Bonituren haben wir zunächst eine Entwicklungsverzögerung des ersten echten Blattes in der *P. axillaris*-Kreuzungsgruppe festgestellt (Abbildung 1). Die F1-Populationen, an denen HS-Pollen beteiligt waren, wiesen 13 Tage nach der Keimung 50 % an Keimlingen ohne erstes echtes Blatt auf. Die Nachkommen, an denen Kontroll-Pollen beteiligt waren, zeigten an Tag 13 nach Keimung bereits zu 70 % erste echte Blätter. Zu einem späteren Zeitpunkt waren die Sämlinge nicht mehr unterscheidbar (Abbildung 1).



verzögerte Ausbildung erster echter Blätter
axillaris Gruppe



♂-♀	HS-HS	HS-C	C-HS	C-C
HS-HS		n.s.	**	**
HS-C	n.s.		*	**
C-HS	**	*		n.s.
C-C	**	**	n.s.	

Abbildung 1: Pollen-vermittelte Weitergabe des HS-induzierten Effekts der verzögerten Ausbildung erster echter Blätter nach Keimung in *P. axillaris*. Die Abbildung zeigt die Ausbildung echter Blätter an Tag 13 nach Keimung (grün). Die ausschließliche Anwesenheit von Keimblättern ist gelb markiert. Die Verzögerung in der Ausbildung erster echter Blätter korreliert mit Kreuzungen, in denen HS-behandelte Pollen beteiligt waren (Chi-Square, $\alpha=0.05$). Das Panel links unten zeigt die statistischen Einzelanalysen, wobei signifikante Unterschiede ausschließlich zwischen Gruppen mit HS-Pollen und Kontroll-Pollen messbar waren.

Neben der zuvor beschriebenen pollen-assoziierten Entwicklungsverzögerung in der *P. axillaris*-Kreuzungsgruppe, hatten wir in den Stecklingsnachkommen HS-behandelter *P. exserta* fusionierte Kelchblätter in Blüten gefunden. Die Nachkommen der zuvor beschriebenen Kreuzungsanalyse zeigten,

Vererbung erworbener epigenetischer Muster auf Folgegenerationen in generativer Vermehrung

dass dieser Phänotyp auch in generativer Vermehrung an die Folgegeneration weitergegeben wurde. Am Haupttrieb beobachteten wir eine höhere Häufigkeit fusionierter Kelchblätter in HS-Pollen-Kreuzungen. In der HS-Pollen Gruppe zeigten 50 % der Blüten fusionierte Kelchblätter, wobei es in der Kontroll-Pollen Gruppe nur 30 % waren (Abbildung 2). Manchmal war auch die Anzahl der Kelchblätter variabel. Zu einem späteren Zeitpunkt konnten wir bei den Seiten- oder Nebenzweigen keine derartigen Häufigkeitsunterschiede zwischen den Kreuzungen feststellen.

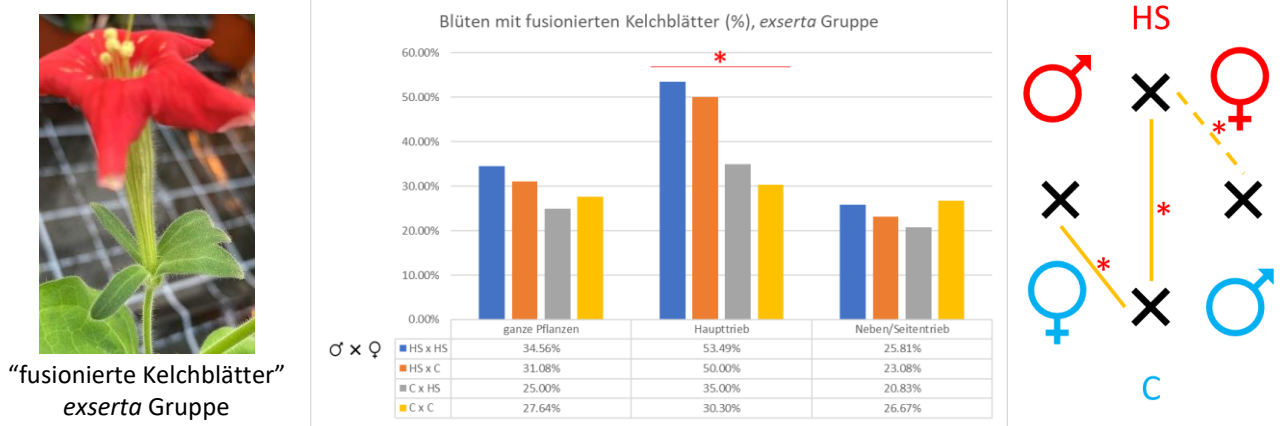


Abbildung 2: Pollen-vermittelte Weitergabe des HS-induzierten Effekts der fusionierten Kelchblätter in Blüten von *P. exserta*. Die Abbildung zeigt die Fusionierung der Kelchblätter an Haupttrieben (Mittel-Panell) von Jungpflanzen der nächsten Generation nach Kreuzung sowie darauffolgende Seitentriebe (rechtes Panell). Die Ausbildung fusionierter Kelchblätter korreliert mit Kreuzungen, in denen HS-behandelte Pollen beteiligt waren (ANOVA mit Dunn's test, $\alpha=0.05$). Auch hier waren signifikante Unterschiede ausschließlich zwischen Gruppen mit HS-Pollen und Kontroll-Pollen messbar.

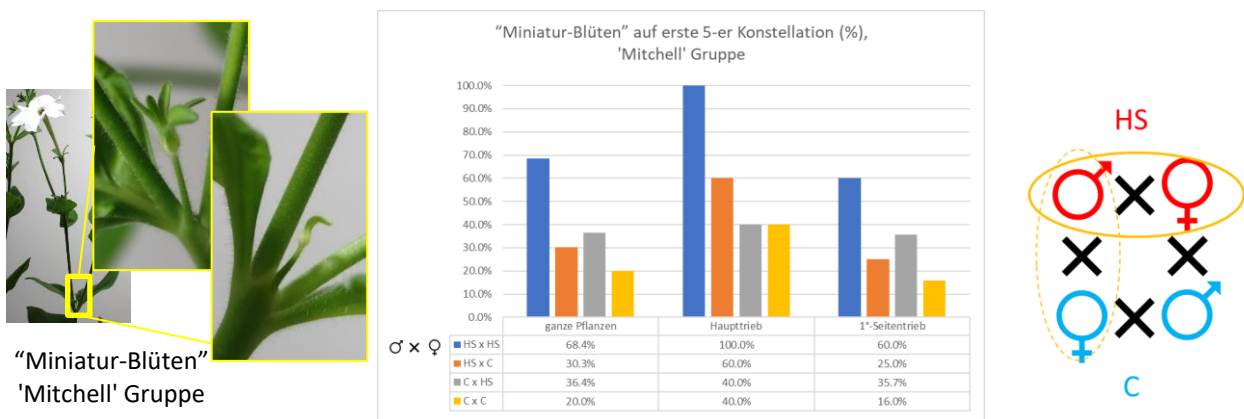


Abbildung 3: Pollen-vermittelte Weitergabe des HS-induzierten Effekts der Ausbildung fehlgebildeter Miniatur-Blüten *P. hybrida* 'Mitchell'. Die Abbildung zeigt das Erscheinen von Blüten-Fehlbildung an Haupttrieben (Mittel-Panell) von Jungpflanzen der nächsten Generation nach Kreuzung sowie darauffolgende Seitentriebe (rechtes Panell). Die Fehlbildung der ersten Blüte nach Überleitung von der vegetativen zur generativen Phase (erste 5-er Konstellation) korreliert mit Kreuzungen, in denen HS-behandelte Pollen beteiligt waren (HSxHS 100% n=4, HSxC 60% n=5).

Vererbung erworbener epigenetischer Muster auf Folgegenerationen in generativer Vermehrung

Der in den Stecklingsnachkommen HS-behandelter *P. hybrida* 'Mitchell' identifizierte Phänotyp der Ausbildung fehlgebildeter Miniatur-Blüten wurde ebenfalls an eine generativ vermehrte Folgegeneration weitergegeben. Die Blüte an der ersten 5er-Konstellation am Haupttrieb wies einen "Miniaturblüten"-Phänotyp auf, bei dem stattdessen eine defekte Blüte mit reduzierter Quirlbildung gebildet wurde (Abbildung 3). Die Blüten waren auch kleiner als normale Blüten. Ein solcher Phänotyp könnte ein Hinweis auf eine Fehl-/Deregulierung des Blütenstammzellenerhaltungsweges sein. Dieser Phänotyp war auf den Haupttrieb und dort nur auf die erste Blüte nach dem Übergang von der vegetativen zur generativen Phase beschränkt. Somit war die Anzahl der Beobachtungen für eine aussagekräftige Statistik zu gering. Dennoch konnten wir die Korrelation zwischen HS-Pollen und dem "Miniaturblüten"-Phänotyp in *P. hybrida* 'Mitchell' in seltenen Fällen bestätigen (Abbildung 3).

Die Abbildungen 1 bis 3 zeigen Schlüsselergebnisse der durchgeführten Kreuzungsanalyse, aus denen sich folgende wesentliche Erkenntnisse ableiten lassen:

- Die in den Stecklingsnachkommen HS-behandelter Pflanzen identifizierten Phänotypen wurden pollenassoziiert an eine generativ vermehrte Folgegeneration weitergegeben.
- Die Beobachtungen sind auf die Haupttriebe der Folgegeneration beschränkt und an späteren Seitentrieben nicht mehr signifikant angereichert. Daher gehen wir von einem schnell reversiblen, epigenetischen Effekt aus.
- Als Kontrolle für eine mögliche gametophytische Verzerrung wurde die Anzahl der Samen aus der kompletten Kapsel überprüft. Es gab keine signifikanten Unterschiede in der Samenmenge zwischen den HS-C-Behandlungskombinationen (2-Way ANOVA, $\alpha=0,05$).
- Auch die Keimungsraten der einzelnen Intra-Genotyp-Kreuzungen zeigten keine signifikanten Veränderungen zwischen den elterlichen Gametophyten mit verschiedenen HS-Kontroll-Behandlungskombinationen (Chi-Quadrat, $\alpha=0,05$).
- Daher gehen wir davon aus, dass die beobachteten Phänotypen pollenassoziiert vererbt werden.

Kultur- und Versuchshinweise

Sorten:

P. axillaris, *P. exserta* and *P. hybrida* 'Mitchell' stammen aus der FGK-Stammsammlung.

Pflanzung:

Jeweils zehn Stecklinge wurden von 3 Mutterpflanzen jedes Genotyps entnommen und 2 Wochen lang in 17-cm-Töpfen im Gewächshaus gezogen, bevor sie Phytokammern wärmebehandelt wurden. Während der Wachstumsphasen wurden die Pflanzen in Kurztagsbedingungen (10 Stunden Licht), 25°C

Vererbung erworbener epigenetischer Muster auf Folgegenerationen in generativer Vermehrung

am Tag / 22°C in der Nacht, Lichtintensität 100 $\mu\text{mol}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$ gezogen. Zur Induktion der Blüten wurden die Pflanzen 16 Stunden Licht gezogen.

Behandlungen:

Die Pflanzen wurden in insgesamt 2 aufeinanderfolgenden Runden mit Hitzestress konfrontiert. Die erste Runde bestand aus einer einwöchigen Hitze-/Kontrollbehandlung in Phytokammern, gefolgt von einer zweimonatigen Erholungsphase im Gewächshaus. Nach der Erholung wurden von der Pflanze der ersten Runde neue Stecklinge entnommen und für die zweite Runde der Wärmebehandlung erneut 2 Wochen lang herangezogen. Nach der Erholung der 2. Runde wurden die Pflanzen für die Blüte und die Kreuzungen in den Langtag (16 Stunden Licht) bei 25°C gebracht.

Während der Wärmebehandlung wurde die Temperatur schrittweise erhöht und abgekühlt, um den durch Sonnenlicht verursachten Hitzestress zu simulieren. Die Nachttemperatur wurde auf 22°C von 18 bis 8 Uhr eingestellt, während die Behandlungstemperatur auf 27-40-27°C mit einer Spitzentemperatur um 12:30-14:00 Uhr (Hitze) bzw. konstant 27°C (Kontrolle) eingestellt wurde.

Die Kreuzungen erfolgten reziprok, und die Selbstungen der in den Kreuzungen verwendeten Pflanzen wurden als Kontrolle durchgeführt.

Auswertungen:

Die Samenstände der gesamten Kapseln wurden unter dem Mikroskop überprüft, und die Anzahl der Samen wurde mit ImageJ gezählt.

Der Keimungstest der F1-Population wurde mit 100 Samen aus jeder Kapsel durchgeführt. Anschließend wurden 5 zufällig ausgewählte Sämlinge zur weiteren Phänotypisierung der Blütenstände übertragen.

Kritische Anmerkungen

Da die phänotypischen Änderungen in unserem Versuch auf die Haupttriebe der Jungpflanzen beschränkt sind, gehen wir einerseits von einem epigenetischen Effekt aus, andererseits erscheint eine Nutzbarkeit dieser Beobachtungen in der gärtnerischen Praxis noch weit entfernt. Interessant aus unserer Sicht ist die Pollen-assoziierte Weitergabe der HS-induzierten Phänotypen an die Folgegeneration. Um sie nutzbar zu machen, sind aber weitere Versuche nötig. Aus wissenschaftlicher Sicht ermöglicht diese Beobachtung Rückschlüsse auf die Weitergabe epigenetischer Veränderungen an Folgegenerationen, wobei andere Stressbedingungen noch getestet werden müssen. Es sollten sich nun molekularbiologische Analysen von DNA-Methylierung, Histon-Modifikationen und kleinen regulatorischen RNAs anschließen, um die beobachteten Effekte molekular erklären zu können.

Literatur:

BENOIT M, DROST H-G, CATONI M, GOUIL Q, LOPEZ-GOMOLLON S, BAULCOMBE D, ET AL. (2019) Environmental and epigenetic regulation of Rider retrotransposons in tomato. PLoS Genet 15(9): e1008370.

<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008370>

Vererbung erworbener epigenetischer Muster auf Folgegenerationen in generativer Vermehrung

JULLIEN PE, SUSAKI D, YELAGANDULA R, HIGASHIYAMA T, BERGER F, (2012) DNA methylation dynamics during sexual reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol.* 2012 Oct 9;22(19):1825-30.
doi: 10.1016/j.cub.2012.07.061.