



Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu

Zakład Biotechnologii

Zespół Bioinżynierii

Joanna Cerazy-Waliszewska

Wykorzystanie zmienności naturalnej i opracowanie metodyki modyfikacji genetycznych traw z rodzaju *Miscanthus* jako możliwości zwiększenia biomasy dla potrzeb produkcji paliw

STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

Promotor: prof. dr hab. Stanisław Jeżowski

POZNAŃ 2018

W dobie zbliżającego się kryzysu energetycznego wynikającego z nieustannie zwiększającego się popytu na energię, a także globalnego problemu związanego z zmianami klimatycznymi wywołanymi tzw. „efektem cieplarnianym” coraz częściej poruszany jest temat użycia alternatywnych metod pozyskiwania energii. W Polsce za największe potencjalne jej źródło uznaje się biomasę, na którą zapotrzebowanie z roku na rok wciąż rośnie. Dlatego też niezwykle istotne stało się poszukiwanie nowych, szybko rosnących gatunków roślin, które mogą konkurować z topniejącymi zapasami biomasy drzewnej, które dodatkowo będzie można z powodzeniem uprawiać na glebach niższych klas i nieużytkach rolnych. Z dotychczas przeprowadzonych badań wynika, że takimi roślinami mogą okazać się gatunki z rodzaju *Miscanthus*.

Trawy wieloletnie z rodzaju *Miscanthus* zostały sprowadzone do Europy w 1935 roku z Azji Wschodniej jako rośliny ozdobne. Pod koniec XX wieku rozpoczęto jednak doświadczenia nad zastosowaniem ich biomasy lignino- celulozowej jako surowca dla potrzeb bioenergii. Miskant jest rośliną, która doskonale radzi sobie na glebach lekkich i marginalnych, często zdegradowanych w wyniku działalności przemysłowej. Wciąż jednak pewnym problemem pozostaje jego wrażliwość (zwłaszcza sadzonek) na stresy abiotyczne, głównie długotrwałą suszę i bardzo niskie temperatury. Rodzaj *Miscanthus* obejmuje rośliny o typie fotosyntezy C4 cechujących się szybkim i dużym przyrostem biomasy dzięki dodatkowym mechanizmom wiązania CO₂. Dotychczas energię z biomasy miskanta uzyskiwano poprzez bezpośrednie spalanie peletu. Obecnie coraz większą wagę przykładają się do innych metod wykorzystania roślin np. produkcja biopaliw m.in. bioetanolu II generacji. Kaloryczność biomasy miskanta wynosi około 17 MJ/kg (kaloryczność węgla kamiennego 20-31 MJ/kg), a plon biomasy oscyluje między 10 a 25 ton/h w zależności od gatunku. Zawartość celulozy (około 50% suchej masy) będącej pozwala na uzyskanie 2-4 litrów bioetanolu z hektara. Pewnym ograniczeniem procesu fermentacji miskanta jest zawartość stosunkowo dużej ilości ligniny (ok. 25% suchej masy) w ścianie komórkowej. Niezwykle istotne okazuje się więc wyselekcjonowanie odmian najbardziej wydajnych energetycznie i cechujących się wysokim plonowaniem. Dodatkowo ciekawą alternatywą w uzyskiwaniu nowych form miskanta o interesujących nas cechach jest zastosowanie inżynierii genetycznej (GMO). Jednakże w tym przypadku ważne jest opracowanie skutecznej metody transformacji tych roślin, gdyż analizując dotychczasowe, znikome badania w tym kierunku nie można jednoznacznie stwierdzić o ich skuteczności i/lub wysokiej wydajności.

Celem niniejszej rozprawy doktorskiej było ustalenie fizjologicznych i morfologicznych markerów pozwalających scharakteryzować wybrane genotypy trzech gatunków miskanta: *Miscanthus sinensis* (genotypy MS-1, MS-16, MS-17), *Miscanthus sacchariflorus* (MSc2x, MSc4x) oraz *M. x giganteus* (MG-3, MG-4), a następnie wyselekcjonowanie genotypu o najlepszych parametrach dla celów energetycznych w szczególności dla produkcji bioetanolu II generacji. W wyniku

przeprowadzonych badań polowych określono, że cechy morfologiczne badanych roślin są zależne głównie od roku uprawy, na który składa się wiele czynników m.in. wiek roślin oraz warunki atmosferyczne. Parametrami wymiany gazowej fotosyntezy wykazującymi w największym stopniu zróżnicowanie genotypów miskanta są przewodnictwo szparkowe i międzykomórkowe stężenie CO₂. Pokazano również, że spośród badanych parametrów wymiany gazowej największy wpływ na plonowanie mają intensywność fotosyntezy netto, transpiracja oraz przewodnictwo szparkowe. Kolejnym etapem badań było określenie składu chemicznego biomasy miskanta (cukry oraz skład pierwiastkowy popiołu) oraz korelacja zawartości celulozy i ligniny z wydajnością fermentacji. Najwyższą wydajnością tj. ilością bioetanolu z jednostki biomasy, wyróżnia się Ms16, charakteryzujący się także najwyższym współczynnikiem korelacji między zawartością celulozy i wydajnością fermentacji.

Drugim etapem badań zawartych w niniejszej pracy było ustalenie markerów fizjologicznych i selekcja genotypów oraz porównanie rodzajów sadzonek miskanta (sadzonki *in vitro* oraz rizomowe) pod względem odporności na stres suszy. Uzyskane wyniki pozwoliły na postawienie wniosku, że sadzonki *in vitro* wykazują podobny do sadzonek rizomowych stopień tolerancji na deficyt wody, natomiast najlepszymi markerami fizjologicznymi pozwalającymi na scharakteryzowanie reakcji na zadany stres są stopień uwodornienia tkanek (RWC) oraz wyciek elektrolitów (EL).

Celem rozprawy doktorskiej było także opracowanie skutecznej i wydajnej metody modyfikacji genetycznej miskanta poprzez zastosowanie dwóch metod transformacji: za pomocą *Agrobacterium* oraz mikrobombardowania z użyciem dwóch wektorów pCAMBIA 1201 oraz zoptymalizowanym pod kontem zastosowania u roślin jednoliściennych pCAHGA. W wykonanych badaniach uzyskano transgeniczne linie miskanta charakteryzujące się niestabilnością genomu pod względem obecności transgenu. Co sugeruje, że metoda ta nie powinna być stosowana do transformacji miskanta. Natomiast uzyskana efektywność transformacji miskanta (1,25 – 11,25 %) za pomocą mikrobombardowania jest znacznie wyższa niż dotychczas opublikowane wyniki. Dodatkowo uzyskane rośliny charakteryzują się stabilnością pod względem obecności transgenu, również w kolejnych sezonach wegetacyjnych. Wyższa wydajność transformacji zoptymalizowanym wektorem pCAHGA w porównaniu z pCAMBIA1201 może być efektem wydajnej interakcji między promotorem pochodzącym z bliskiej filogenetycznie miskantowi kukurydzy, a czynnikami transkrypcyjnymi miskanta.

Opracowana w ramach niniejszej pracy metodyka transformacji jest bazą do podjęcia prób uzyskania transgenicznych linii miskanta o korzystniejszych cechach biomasy dla potrzeb produkcji bioetanolu,

jak: luźniejsza struktura ściany komórkowej, obniżona zawartość ligniny, a także podwyższona zawartość sacharozy.