

EPIGENETYCZNE MECHANIZMY REGULACJI ODPOWIEDZI ROŚLIN NA INDUKOWANY CIEMNOŚCIĄ PROCES
STARZENIA LIŚCIA JĘCZMIENIA JAKO NOWE PERSPEKTYWY W ZWIĘKSZANIU TOLERANCJI ROŚLI UPRAWNYCH
NA STRES

1. Hipoteza badawcza

Remodelowanie chromatyny poprzez post-translacyjne modyfikacje histonów, metylacja DNA oraz zależna od ATP reorganizacja nukleosomów przedstawiają powszechny mechanizm regulacji ekspresji genów. Badania epigenetyczne i epigenomiczne regulacji ekspresji genów w odpowiedzi na dane czynniki stresowe, a także specyfika tej regulacji u roślin uprawnych pozostaje zagadnieniem nierozpoznanym. Modyfikacje genetyczne są powszechnie wykorzystywane w celu poprawienia jakości i wydajności plonu, jednakże modyfikacje epigenetyczne stanowią w tej kwestii obiecującą alternatywę.

Jak dotąd, badania prowadzone przez autorkę niniejszego projektu, pozwoliły na opracowanie modelu obrazującego wczesne i późne zdarzenia podczas indukowanego ciemnością procesu starzenia liści jęczmienia (ang. dark-induced leaf senescence, DILS). Co więcej, badania wskazały krytyczne przedziały czasowe dla odwrócenia procesu starzenia, prowadzącego do fazy śmierci komórek liścia. Dotychczasowe prace badawcze pozwoliły ponadto wskazać najistotniejsze różnice transkryptomyczne pomiędzy DILS a starzeniem rozwojowym, do których zaliczyć można m.in. aktywne modyfikacje DNA w przypadku DILS. Na tej podstawie, można wnioskować o obecności dodatkowego, dotąd nie odkrytego, przełącznika molekularnego pomiędzy zdolnością komórek do przeżycia, a ich śmiercią, funkcjonującego w myśl prostej zasady "żyć albo umierać".

Wnioski z badań przyczyniły się do sformułowania obecnej **hipotezy badawczej**, która brzmi: **mechanizmy reorganizacji chromatyny w odpowiedzi na indukowane starzenie jako bodziec środowiskowy, kontrolują szybkość procesu starzenia liści poprzez: i) wprowadzenie liścia na drogę starzenia, (ii) kontrolowanie remobilizacji zależnej od starzenia, (iii) przekierowanie liścia ze starzenia w fazę śmierci.**

Celem projektu jest zatem uzyskanie nowej wiedzy na temat epigenetycznej regulacji indukowanego starzenia i oparta na danych empirycznych dyskusja nad możliwością wykorzystania tej wiedzy dla poprawy jakości i/lub wydajności upraw.

2. Metodyka

Aby poznać kompleksowe procesy epigenetyczne związane z DILS w jęczmieniu, funkcjonujące jako potencjalna strategia przeżycia lub śmierci komórki, a także jego rolę aklimatyzacyjną i zdolność dziedziczenia tych mechanizmów, analizie zostanie poddany zarówno mechanizm epigenetyczny DILS, jak i procesu starzenia rozwojowego (ang. developmental leaf senescence, DLS). Cel ten osiągnięty zostanie poprzez: **(i)** określenie zmian transkryptów genów związanych z metylacją DNA i modyfikacjami post-translacyjnymi histonów (PTM) podczas DILS i DLS, za pomocą TaqMan Real-Time qPCR; **(ii)** określanie stopnia kontroli DILS i DLS poprzez metylację DNA - z zastosowaniem sekwencjonowania o zmniejszonej reprezentacji mostków dwusiarczkowych (RRBS); **(iii)** określenie stopnia kontroli DILS i DLS poprzez modyfikacje histonów, wykorzystując mapowanie modyfikacji histonów i lokalizację białek wiążących DNA (Chip seq); **(iv)** przygotowanie transgenicznym linii jęczmienia z defektami w obrębie genów biorących udział w metylacji DNA i/lub modyfikacji histonów z zastosowaniem podejścia RNAi oraz profilowanie transkryptomu roślin typu dzikiego i transformantów, co pozwoli wnioskować o interakcji mechanizmów epigenetycznych z siecią metaboliczną, która organizuje DILS przy użyciu technik RNA-Seq, a następnie NGS. **(v)** Aby uzupełnić powyższą kwestię i dowiedzieć się, czy markery epigenetyczne w DILS są dziedziczone **(1)** mitotycznie (w ciągu jednego pokolenia) i/lub **(2)** mejotycznie (dziedziczenie międzypokoleniowe), w dalszych etapach projektu planuje się: (1-dziedziczenie mitotyczne) - ponowne zazielenienie liści w fazie starzenia indukowanego ciemnością przez wystawienie ich na działanie światła i mierzenie profilu metylacji DNA po ponownym zazielenieniu (jeżeli metylacja DNA zostanie zachowana, liście przejdą powtarzającą się inkubację w ciemności i poprzez fenotypowanie zostanie ocenione, czy starzenie jest opóźnione); (2-dziedziczenie mejotyczne) - zbieranie nasion z roślin, u których proces starzenia w ciemności został zainicjowany, a następnie ponownie eksponowano rośliny na działanie światła. W uzyskanym pokoleniu F1 zostanie dokonany pomiar profilu metylacji DNA i jeśli indukowane stresem epigenetyczne modyfikacje zostaną zachowane w F1, liście będą przechodzić powtarzającą się inkubację w ciemności, a następnie poprzez fenotypowanie zostanie ocenione, czy proces starzenia jest opóźniony.

3. Przewidywany wpływ na rozwój dziedziny naukowej

W świetle obecnych badań nad poprawą wydajności i jakości plonu, pogłębienie wiedzy nad epigenetycznymi regulatorami procesu starzenia indukowanego stresem, a także leżący u jego podstaw mechanizm molekularny, wydaje się mieć charakter priorytetowy. Zrozumienie mechanizmu regulatorów epigenetycznych i ich sieci regulacyjnych w tym procesie będzie potencjalnym narzędziem do dalszego wykorzystania w kierunku zrównoważonego rolnictwa (tzw. epibreeding). Ponadto pożądane jest opracowanie nowych strategii uprawnych, w których należy uwzględnić zmienność epigenetyczną. Wydaje się to jeszcze bardziej realistyczne biorąc pod uwagę rozwój technologii genomicznych i obniżanie kosztów sekwencjonowania nowej generacji.