

Nanocząstki chitozanu funkcjonalizowane dwuniciowym RNA jako nowa strategia ochrony roślin

Głównym celem projektu jest uzyskanie nowego systemu ochrony roślin przed patogenami w wyniku wzmocnienia dwóch natywnych cech chitozanu: aktywności antygrzybowej oraz zdolności do indukowania odpowiedzi immunologicznej w roślinach. Cel ten będzie osiągnięty dzięki wprowadzeniu do komórek patogena i do komórek rośliny nanocząstek chitozanu (ChNPs) sprzężonych z dwuniciowym RNA (dsRNA) zaprojektowanych tak aby indukowane procesy RNAi wywołały zamierzony skutek eliminacji patogena i wzmocnienia reakcji immunologicznej rośliny.

Projekt bazuje na trzech hipotezach: (1) Chitozan aktywuje geny i procesy warunkujące odporność nabytą rośliny. (2) Słaba aktywność antygrzybowa chitozanu zostanie wzmocniona w wyniku asocjacji ChNPs z cząsteczkami dsRNA zaprojektowanymi tak, aby zachodziła ukierunkowana degradacja wybranych transkryptów patogena. Asocjacja dsRNA z ChNPs poprawi stabilność cząsteczek dsRNA oraz ułatwi ich wprowadzenie do komórek patogena i komórek rośliny. (3) Końcowa efektywność ochrony rośliny przez dsRNA-ChNPs będzie efektem antygrzybowej aktywności chitozanu, jego zdolności do indukowania odporności nabytej oraz procesów RNAi aktywowanych przez dsRNA.

Badania zaplanowano w czterech pakietach (WP). Analiza transkryptomu jęczmienia (**WP1**) i transkryptomu *Fusarium graminearum* (*Fg*) (**WP2**) traktowanych chitozanem o określonych parametrach pozwoli zidentyfikować geny specyficznie regulowane w każdym z tych organizmów pod wpływem chitozanu. Wyniki pozwolą wskazać geny i procesy warunkujące antygrzybową aktywność chitozanu oraz geny i procesy odpowiedzialne za indukowanie odporności nabytej w roślinie. W **WP3** zaplanowano (1) szczegółową charakterystykę chitozanu uzyskanego z różnych źródeł, (2) uzyskanie ChNPs oraz kompleksów dsRNA-ChNPs oraz (3) fizykochemiczną charakterystykę uzyskanych kompleksów. WP3 będzie realizowany w zespole Dr M. Piątkowskiego na Politechnice Krakowskiej - eksperta w tej dziedzinie. W **WP4** zaplanowano wykorzystanie wyników WP1-WP3 do zaprojektowania i zbudowania systemu dsRNA-ChNPs, który po wprowadzeniu do komórek grzyba będzie go specyficznie eliminował, a po wprowadzeniu do komórek rośliny będzie wzmacniał odporność nabytą. Szczegółowe parametry kompleksów dsRNA-ChNPs będą ustalane z użyciem genów reporterowych: *AmCyan* w *Fg* oraz *PDS* w jęczmieniu. Skuteczność dsRNA-ChNPs będzie szacowana dzięki obserwacji fluorescencji *AmCyan* w komórkach *Fg* i fotooksydacji chlorofilu (efekt wyciszenia genu *PDS*) w komórkach jęczmienia. Eksperymenty z użyciem genów reporterowych pozwolą również ocenić stabilność dsRNA-ChNPs w warunkach podobnych do warunków polowych. Efektem projektu będzie (i) weryfikacja hipotez badawczych, (ii) nowa wiedza o genach i procesach indukowanych w *Fg* i w jęczmieniu po traktowaniu chitozanem, (iii) szczegółowe procedury syntezy ChNPs oraz budowania kompleksów dsRNA-ChNPs, (iv) szczegółowa fizykochemiczna charakterystyka chitozanu, ChNPs i kompleksów dsRNA-ChNPs. Należy podkreślić, że obydwa komponenty proponowanego systemu ochrony roślin tj. dsRNA oraz ChNPs są biodegradowalne nie powodują żadnego zanieczyszczenia środowiska. Co więcej, chitozan i otrzymane z niego produkty mają długą historię bezpiecznego użycia w medycynie i rolnictwie, w tym również w rolnictwie ekologicznym. Długoletnie doświadczenie wnioskodawcy (IHAR-PIB) w wykorzystaniu RNAi do celów genomiki funkcjonalnej roślin użytkowych i badaniach interakcji roślina-patogen oraz doświadczenie zespołu dr M. Piątkowskiego (Politechnika Krakowska) w badaniach chitozanu, ChNPs oraz biomedycznych aplikacjach tych biopolimerów są komplementarne w osiągnięciu kluczowych celów tego projektu. Strategia będąca efektem tego projektu może być łatwo adaptowana do innych roślin i innych patogenów szczególnie tam, gdzie nie są znane inne skuteczne środki ochrony roślin.