

Važnost epigenetike u prilagodbi organizama na izmijenjene okolišne uvjete i uloga epigenetike u procesu specijacij

Medvedec, Vala

Undergraduate thesis / Završni rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:954154>

Rights / Prava: [In copyright](#)/[Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-26**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)



Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Vala Medvedec

**Važnost epigenetike u prilagodbi organizama
na izmijenjene okolišne uvjete i uloga
epigenetike u procesu specijacije**

Završni rad

Zagreb, 2023.

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Vala Medvedec

**The importance of epigenetics in the
adaptation of organisms to changed
environmental conditions and the role of
epigenetics in the process of speciation**

Bachelor thesis

Zagreb, 2023.

Ovaj završni rad je izrađen u sklopu studijskog programa Znanosti o okolišu na botaničkom zavodu biološkog odsjeka Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu, pod mentorstvom izv. prof. dr. sc. Ivana Radosavljevića.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Sveučilište u Zagrebu
Prirodoslovno-matematički fakultet
Biološki odsjek

Završni rad

Važnost epigenetike u prilagodbi organizama na izmijenjene okolišne uvjete i uloga epigenetike u procesu specijacije

Vala Medvedec

Rooseveltov trg 6, 10000 Zagreb, Hrvatska

Djelovanjem evolucijskih mehanizama populacije su stekle karakteristike koje su im bile nužne za preživljavanje u određenom okolišu. Proces lokalne adaptacije koji se odvija kao posljedica promjena okolišnih uvjeta, dovodi do razvoja novih funkcionalnih karakteristika. Taj fenomen, poznat kao adaptivna divergencija, doprinosi bioraznolikosti, te može sudjelovati i u razvoju novih vrsta. Epigenetski mehanizmi su ključni u regulaciji ekspresije gena. Metilacija DNA i modifikacija histona utječu na strukturu kromatina čime se vrši kontrola transkripcije, što posljedično može utjecati i na fenotipske, fenološke, fiziološke i druge osobine. Mogućnost nasljeđivanja epigenetskih promjena kod biljaka utječe na proces adaptacije, te posljedično i samu evoluciju.

Za proučavanje epigenetskih mehanizama u biljaka koristi se više različitih metoda, a one modernije uglavnom su bazirane na bisulfitnoj konverziji nemetiliranog citozina u uracil, te sekvenciranju sljedeće generacije. Ovaj rad sadrži pregled odabranih istraživanja o važnosti epigenetike na evolucijske i adaptivne procese u biljkama. Raspravlja se o važnosti epigenetskih promjena u odgovoru biljaka na različite tipove okolišnog stresa, njihovoj ulozi u procesu hibridizacije, te transgeneracijskom prijenosu epigenetskih modifikacija, tzv. epigenetskom pamćenju.

Ključne riječi: (divergencija, prilagodba, metilacija DNA, struktura kromatina, ekspresija gena)
(19 stranica, 4 slike, 0 tablica, 20 literaturnih navoda, jezik izvornika: hrvatski)

Rad je pohranjen u Središnjoj biološkoj knjižnici

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivan Radosavljević

BASIC DOCUMENTATION CARD

University of Zagreb
Faculty of Science
Department of Biology

Bachelor thesis

The importance of epigenetics in the adaptation of organisms to changed environmental conditions and the role of epigenetics in the process of speciation

Vala Medvedec

Rooseveltova trg 6, 10000 Zagreb, Croatia

Through evolutionary mechanisms, populations have acquired traits necessary for survival in a particular environment. The process of local adaptation, driven by changes in environmental conditions, leads to the evolution of new functional traits. This phenomenon, known as adaptive divergence, contributes to biological diversity and may also play a role in the emergence of new species. Epigenetic mechanisms play a critical role in regulating gene expression. DNA methylation and histone modifications affect chromatin structure to control transcription, which in turn can affect phenotypic, phenological, physiological, and other traits. The inheritance of epigenetic modifications in plants affects the adaptation process and consequently evolution itself.

Various methods are used to study epigenetic mechanisms in plants, with modern methods mainly based on bisulfite conversion of unmethylated cytosine to uracil and next-generation sequencing. This paper reviews selected research on the importance of epigenetics for evolutionary and adaptive processes in plants. It discusses the importance of epigenetic changes in a plant's response to different types of environmental stress, their role in hybridization, and the transgenerational transmission of epigenetic changes, known as epigenetic memory.

Keywords: divergence, adaptation, DNA methylation, chromatin structure, gene expression
(19 pages, 4 figures, 0 tables, 20 references, original in: Croatian)
Thesis is deposited in Central Biological Library.

Mentor: izv. prof. dr. sc. Ivan Radosavljević

Sadržaj

| | |
|---|-----------|
| 1. UVOD | 1 |
| 2. METODE ISTRAŽIVANJA..... | 3 |
| 2.1. Vrste metoda..... | 4 |
| 2.1.1. Bisulfitno sekvenciranje cijeloga genoma..... | 4 |
| 2.1.2. epiGBS i BsRadSeq | 4 |
| 2.1.3. Cijepanje uz pomoć restrikcijskih enzima..... | 5 |
| 2.1.4. Imunoprecipitacija metilirane DNA | 6 |
| 2.1.5. Proučavanje metilacije posredovane RNA molekulama | 8 |
| 3. PREGLED ISTRAŽIVANJA | 9 |
| 3.1. Utjecaj metilacije DNA na razvoj heterofilije u vrste <i>Ilex aquifolium</i> | 9 |
| 3.1.1. Uvod i tijek istraživanja | 9 |
| 3.1.2. Rezultati | 10 |
| 3.2. Epigenetički aspekti u procesu hibridizacije biljnih vrsta | 11 |
| 3.2.1. Uvod i tijek istraživanja | 11 |
| 3.2.2. Rezultati | 12 |
| 3.3. Odgovor biljaka na okolišni stres i epigenetska memorija..... | 13 |
| 3.3.1. Uvod | 13 |
| 3.3.2. Odgovor na sušu..... | 14 |
| 3.3.3. Odgovor na fluktuacije u količini nutrijenata..... | 15 |
| 3.3.4. Odgovor na jako UV – zračenje | 15 |
| 4. ZAKLJUČAK | 16 |
| 5. LITERATURA..... | 17 |
| 6. ŽIVOTOPIS..... | 19 |

1. UVOD

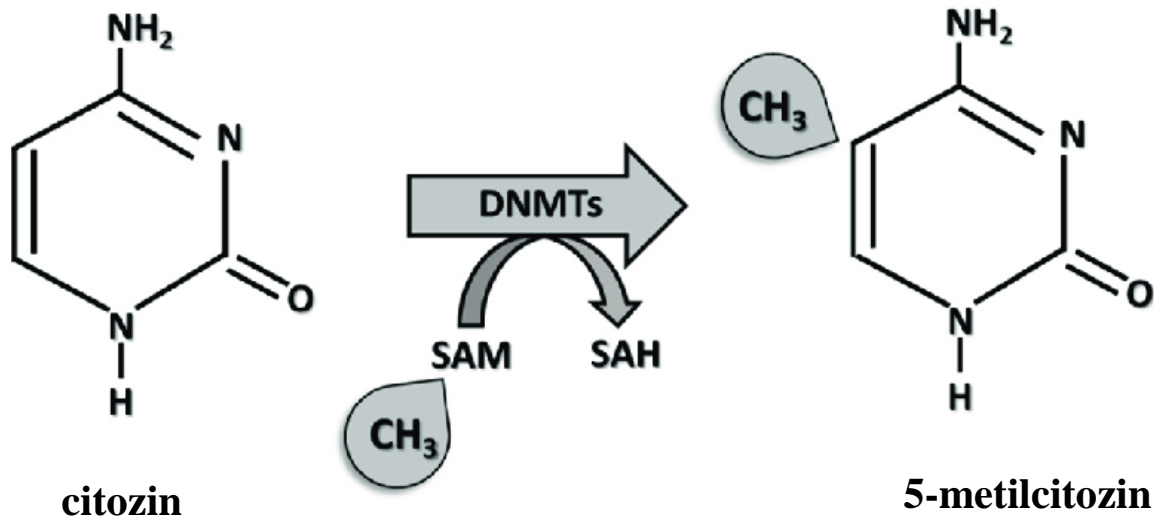
Svaku vrstu odlikuju fizičke i molekularne karakteristike koje ju čine jedinstvenom u odnosu na druge vrste. Djelovanjem brojnih evolucijskih mehanizama kroz dugi period vremena, populacije unutar vrsta zadržale su one osobine koje su se pokazale najučinkovitijima za njihovo preživljavanje u određenom okolišu. Stupanj prilagođenosti neke populacije na okolišne faktore kojima je izložena te njezin reproduktivni uspjeh u odnosu na druge populacije naziva se *fitness-om*. Svaka populacija koja je dobro prilagođena okolišu u kojem živi, razvila je karakteristike pogodne specifično za te uvjete okoliša. Drugim riječima, ukoliko bi došlo do nagle izmjene uvjeta, ta bi populacija izgubila svoju evolucijsku prednost. Proces prirodne selekcije koji ovisi o izmjeni okolišnih faktora zove se lokalna adaptacija (Kawecki i Ebert, 2004). Populacije iste vrste koje zauzimaju različite ekološke niše te su geografski i/ili reproduktivno izolirane razvijaju drugačije genotipove odnosno fenotipove, a koji im omogućuju najbolju prilagodbu na lokalne uvjete. Rezultat je nastanak dviju ili više različitih populacija iz jedne početne što se još naziva i adaptivna divergencija. Razdvajanje se odvija na genetičkoj razini na način da se iz početne populacije, koja je nosilac gena za više fenotipskih varijeteta, razvijaju dvije nove populacije, od kojih će svakom dominirati specifičan, te nerijetko i ekstreman fenotip u odnosu na izvorišnu populaciju (Rundle i Nosil, 2005). Lokalna adaptacija i adaptivna divergencija utječu na povećanje genetičke raznolikosti. Akumulacija promjena u genotipu, te posljedično fenotipu dviju ili više populacija iste vrste može dovesti i do njihove specijacije, tj. divergencije u zasebne vrste (Rundle i Nosil, 2005).

U eukariota je izvor svih informacija koje se nasljeđuju vertikalnim prijenosom gena i na temelju kojih se odvija divergentna selekcija, sadržan u molekuli DNA (Bender, 2004). Međutim, ona sama nije dovoljna kako bi se ostvario složeni proces specijacije. Za preciznu kontrolu ekspresije gena zaslužni su, između ostalog, i epigenetski mehanizmi. DNA je dugačka dvolančana molekula u obliku uzvojnice koja ima nekoliko strukturnih razina, a na višoj razini, zajedno s drugim elementima, tvori kromatin. Regije kromatina koje su rahlije pakirane predstavljaju eukromatin i na njima se vrši transkripcija, a geni u tim regijama su aktivni i ispoljeni u fenotipu. Kompaktniji i gušće pakirani kromatin je heterokromatin čije su promotorske regije skrivene i nedostupne RNA polimerazi te je transkripcija na tim mjestima spriječena. Ključni epigenetski mehanizam koji

modificira strukturu kromatina, a time i regulira transkripcijsku aktivnost i ekspresiju gena je metilacija DNA (Bender, 2004). To je proces kojim se metilna skupina veže za nukleotid citozin i to na petom C atomu pirimidinskog prstena. Donor metilne skupine je S-adenozil-metionin (SAM), a sinteza je katalizirana enzimom DNA metiltransferazom (DNMT) (Slika 1.). Metilacija se provodi nakon replikacije DNA u svrhu restrukturiranja određenog dijela kromatina u kompaktni heterokromatin kako bi se utišala aktivnost gena te regije. Gusto pakiranje heterokromatina ostvaruje se interakcijom metiliranog kraja citozina i DNA-vezajućih proteina koji prepoznaju metilirani kraj i s njim ostvaruju kovalentnu vezu. Jednom dovršena metilacija citozina nasljeđuje se na novo repliciranu DNA na jednom sestrinskom lancu. Zatim citozin metiltransferaza replicira postupak metilacije i na drugi lanac slijedeći uputu s prvog lanca. Time se formira epigenetska memorija te se postupak metilacije ponavlja svakom replikacijom DNA. Osim metilacije DNA, važnu ulogu u restrukturiranju kromatina imaju modifikacije histona. Histoni su oktamerni proteini koji su uz DNA glavni sastav kromatina i sastavljeni su od dvije podjedinice. Svaka podjedinica sastoji se od histona H2A, H2B, H3 i H4. Modifikacije histona odvijaju se na N-terminalnim slobodnim krajevima histona s argininom, lizinom ili serinom. Acetilacija histona H3 i H4 te metilacija lizina na histonu H3 na položaju 4 rezultira rahlijim pakiranjem kromatina i stvaranjem eukromatina. Deacetilacijom H3 i H4 te metilacijom lizina na položaju 9 na histonu H3 nastaje heterokromatin. Takav je mehanizam zajednički biljkama, životinjama i većini gljiva, iako još nije poznato kako se nakon diobe stanice te modifikacije repliciraju, kao što je to poznato u slučaju metilacije DNA (Bender, 2004).

Ono što je karakteristično samo biljkama je nasljeđivanje epigenetskih promjena nakon mejoze (Bender, 2004). Prijenos tih promjena iz generacije u generaciju može rezultirati selekcijom onih epigenetskih obilježja koja su se pokazala podobnima za dotične okolišne uvjete, a time epigenetika direktno utječe na adaptivnu divergenciju i evoluciju biljaka (Herrera i Bazaga, 2010). Danas se posebnim tehnikama i metodama produbljuju saznanja o epigenetici kao recentnoj disciplini. Ovaj rad sadrži pregled nekih od istraživanja na biljkama koja se bave epigenetskim mehanizmima i njihovim utjecajem na lokalnu adaptaciju, divergenciju, te u konačnici i specijaciju biljnih vrsta.

METILACIJA DNA



Slika 1. Shematski prikaz mehanizma metilacije DNA. DNA metiltransferaza (DNMT) prebacuju metilnu skupinu sa SAM (S-adenozilmetionin) molekule kao donora metilne skupine na 5. ugljikov atom citozinskog prstena u CpG dinukleotidu, čime nastaje 5-metilcitozin. Preuzeto i prilagođeno iz Ciechomska i sur. 2019

2. METODE ISTRAŽIVANJA

Na biljkama je jednostavnije provoditi istraživanja epigenetskih mehanizama nego na drugim eukariotima i do sada su iznesene već brojne spoznaje na tu temu (Bender, 2004). Istraživanja o važnosti epigenetskih modifikacija kod biljaka uglavnom podrazumijevaju detekciju metilacije DNA kao temeljnog epigenetskog mehanizma, te u manjoj mjeri i analizu histonskih modifikacija. Pritom se primjenjuju moderne tehnike sekvenciranja DNA za praćenje i visoku razlučivost metiliranih od nemetiliranih regija, čime se vrši karakterizacija epigenoma organizama (Spillane i McKeown, 2020), a koja je ključna za shvaćanje uloge metilacije u evolucijskim procesima adaptacije i divergencije (Trucchi i sur., 2016).

2.1. Vrste metoda

S obzirom na način otkrivanja metiliranih regija i histonskih modifikacija, koristi se nekoliko laboratorijskih metoda: 1) tretiranje natrijevim bisulfitom, 2) razlaganje kromatina uz pomoć restriksijskih enzima osjetljivih na metilirane nukleotide, 3) imunoprecipitacija kromatina uz sekvenciranje visoke propusnosti (chip-seq), te 4) proučavanje metilacije posredovane malim RNA molekulama (Yadav i sur., 2018)

2.1.1. Bisulfitno sekvenciranje cijeloga genoma

Ova metoda, poznata pod akronimom WGBS (eng. *Whole Genome Bisulfite Sequencing*), uključuje tretiranje cijeloga genoma od interesa natrijevim bisulfitom što potiče kemijsku pretvorbu nemetiranog citozina u uracil (Lister i sur., 2008). Citozin koji nije metiliran biti će zamijenjen uracilom, dok će istovremeno kod metiranog citozina ta pretvorba izostati. Na taj način omogućena je jednostavna detekcija metiliranih citozina, odnosno genomskih regija gdje se ona događa s ispod- ili iznadprosječnom učestalošću. Danas je uz moderne metode sekvenciranja (tzv. sekvenciranje buduće generacije, eng. *Next Generation Sequencing*; NGS) omogućeno sekvenciranje čitavog metiloma, odnosno prepoznavanje svih metiliranih citozina u genomu proučavanog organizma (Yadav i sur., 2018). Između ostalog, ovaj pristup omogućava proučavanje epigenetičke podloge fenotipskih razlika između populacija koje su u procesu divergencije, te danas predstavlja najviši standard u istraživanjima toga tipa. Nažalost, također zahtjeva i znatna financijska sredstva, te stoga često nije primjenjiv u manjim istraživanjima (Spillane i McKeown, 2020), već se najčešće koristi u istraživanjima ekonomski značajnih vrsta.

2.1.2. epiGBS i BsRadSeq

Ovim sličnim metodama, DNA od interesa se podvrgava postupku fragmentacije i NGS sekvenciranja, nakon čega slijedi bioinformatička obrada dobivenih podataka s ciljem detekcije regija genoma karakteriziranih iznadprosječnim razinama metilacije. U osnovi ovih postupaka nalazi se detekcija metiliranih citozina. Kroz specifične laboratorijske protokole, tijekom pripreme DNA uzoraka za sekvenciranje vrši se bisulfitna konverzija nemetiranog citozina u uracil, čime je omogućena njegova kasnije detekcija (Van Gurp i sur., 2016; Trucchi i sur., 2016). Zbog toga

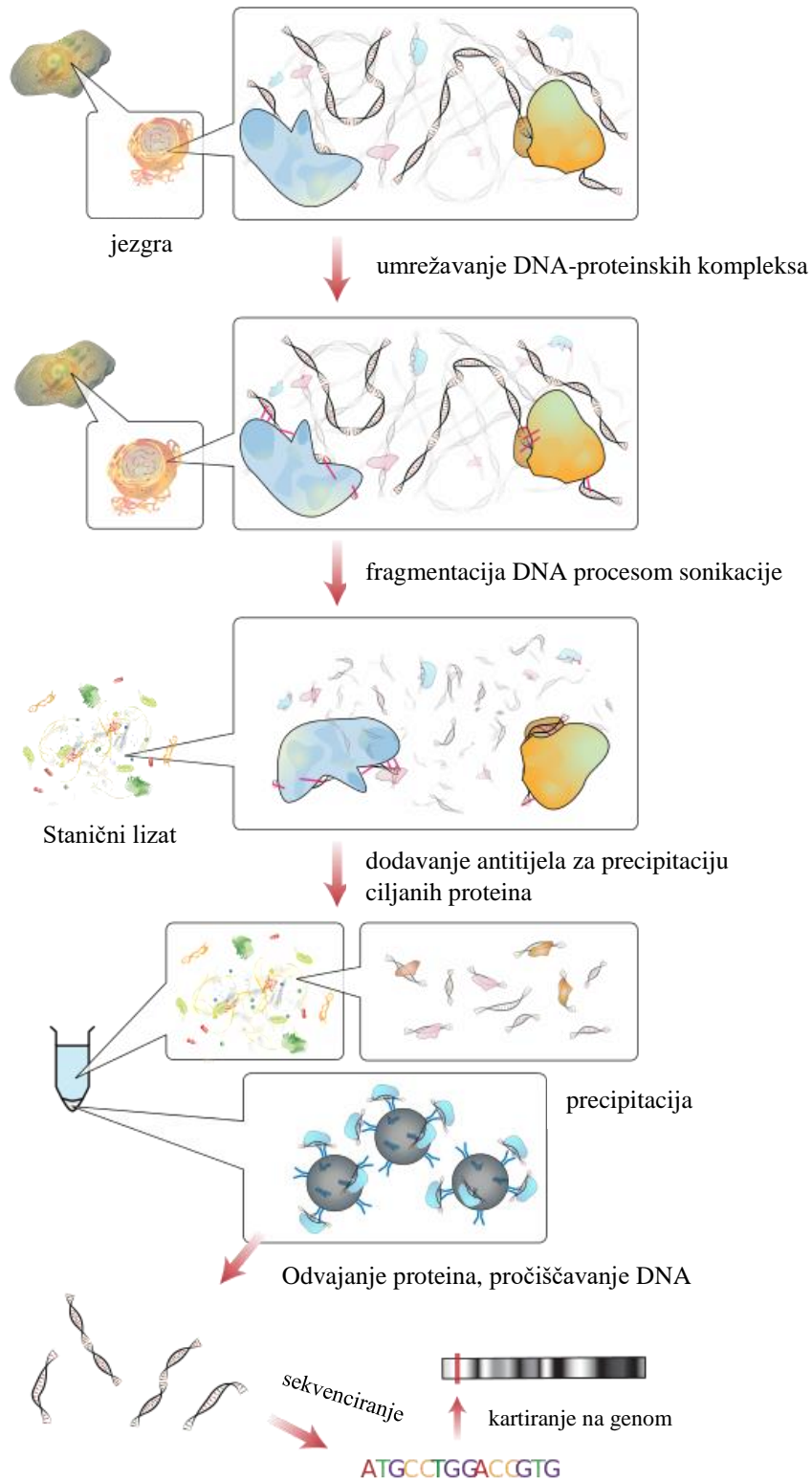
što analiza ovim metodama ne obuhvaća cijeli genom već samo njegov manji dio, one spadaju u tzv. RRBS skupinu laboratorijskih pristupa (eng. *Reduced Representation Bisulfite Sequencing*).

2.1.3. Cijepanje uz pomoć restrikcijskih enzima

Jedna od popularnih metoda istraživanja je i tzv. MSAP (engl. *Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism*) (Reyna-López i sur., 1997) kojom se može detektirati generalna razina metiliranosti genoma, bez da se pritom analizira cijeli genom. Pritom valja naglasiti da je pokrivenost genoma ovim pristupom još i manja od ranije spomenutih epiGBS i BsRadSeq metoda. MSAP je modifikacija metode AFLP (eng. *Amplified Fragment Length Polymorphism*) i koristi enzim EcoRI za rijetko cijepanje dvolančane DNA, a enzime HpaII i MspI za njezino često cijepanje. Specifičnost HpaII i MspI je u tome što su osjetljivi na metiliranost citozina, što u konačnici dovodi do nespecifičnog prepoznavanja razine metilacije citozina na u genomu. Iako za rezanje prepoznaju isti DNA motiv (5'-CCGG-3'), različitog su djelovanja koje ovisi o tome da li se metilirani citozin nalazi u 3'-5', ili 5'-3' lancu. Posljedično, pojavnost umnoženih regija nakon primjene EcoRI-HpaII i EcoRI-MspI kombinacija restrikcijskih enzima izravno će ovisiti o prisutnosti metiliranog citozina u enzim-specifičnim DNA regijama u kojima se provodi restrikcija. MSAP metoda je najprimjenjivija metoda u epigenetskim istraživanjima kod biljaka kojom se mogu uspješno diferencirati regije u genomu s obzirom na njihovo stanje metilacije DNA (Herrera i Bazaga, 2010). Istodobno, ova metoda ima određena ograničenja. Može detektirati metilaciju samo u CCGG regijama genoma, a ako su dva citozina metilirana na oba lanca ne može razlučiti razliku između takve metilacije i odsutnosti cijelog fragmenta (Herrera i Bazaga, 2010). Drugi ograničavajući faktor ove metode je relativno mali broj restrikcijskih enzima karakteriziranih potrebnim svojstvima (Spillane i McKeown, 2020). Bez obzira na navedene nedostatke, metoda je generalno pouzdana i ne zahtijeva značajne računalne kapacitete poput onih potrebnih za genomske studije, zbog čega je osobito popularna u ekološkim, evolucijskim i populacijsko (epi)genetičkim istraživanjima (Trucchi i sur., 2016). MSAP i AFLP često se koriste skupa u istraživanjima genetskih i epigenetskih razlika određene vrste jer su tehnički slične metode i jednostavno se uspoređuju rezultati (npr. Radosavljević i sur., 2019).

2.1.4. Imunoprecipitacija metilirane DNA

Struktura kromatina diktira ekspresiju gena koji se u toj regiji nalaze, pa se modifikacijom strukture kromatina može kontrolirati ekspresija gena. Stupanj kompaktnosti kromatina može se mjeriti tehnikom analize kromatinske imunoprecipitacije (ChIP) kojom se detektiraju točni položaji transkripcijskih faktora i drugih relevantnih proteina vezanih na DNA na razini genoma koji ukazuju na strukturu kromatina (Slika 2.). Najprije se DNA-proteinski kompleksi umreže, a zatim fragmentiraju procesom sonikacija ili upotrebom restriksijskih enzima. Na završetke DNA fragmenata se zatim vežu adapteri. Dodatkom antitijela specifičnih za dijelove kompleksa s modificiranim histonima, dolazi do njihove precipitacije i razdvajanja od DNA. Molekula DNA se izolira i sekvencira, tipično NGS pristupom. Kao rezultat dobivaju se sekvence DNA koje odgovaraju regijama genoma s kojima je ciljani protein povezan u istraživanom organizmu. Detektirana mjesta na DNA tipično uključuju mjesta vezanja enzima, transkripcijskih faktora, modificiranih histona, šaperona i nukleosoma čime se dobiva jasna slika svih DNA-proteinskih interakcija te uloga tih interakcija u ekspresiji gena te u odvijanju staničnih procesa (Yadav i sur., 2018).



Slika 2. Shematski prikaz tehnike analize kromatinske imunoprecipitacije (ChIP). Preuzeto i prilagođeno s https://en.wikipedia.org/wiki/Chromatin_immunoprecipitation

2.1.5. Proučavanje metilacije posredovane RNA molekulama

Mala interferirajuća RNA (siRNA – engl. Small Interfering RNA) uključena je u procese razvoja organizma, reakcije organizma na biotičke i abiotičke faktore u okolišu, te je povezana sa stabilnošću cjelokupnog genoma (Spillane i McKeown, 2020). Mehanizam je baziran na sposobnosti povezivanja siRNA s homolognim sekvencama mRNA pri čemu dolazi do njihove inaktivacije (Schramke i Allshire, 2003). Posljedično, kroz složene biokemijske mehanizme, siRNA omogućava metilaciju specifičnih regija DNA čime se ostvaruje direktan utjecaj na epigenom organizma. Zahvaljujući navedenome, siRNA čini sastavni dio skupa mnogo širih i složenijim biokemijskih procesa objedinjenih pod nazivom „DNA metilacija usmjerena RNA molekulama“ ili RdDM (engl. *RNA-directed DNA methylation*). Tipično, istraživanja ovih mehanizama nisu usmjerena prema analizi ekološko-adaptivnih i evolucijskih procesa, te stoga nisu od interesa u ovom pregledu.

3. PREGLED ISTRAŽIVANJA

U ovom će se poglavlju razmatrati odabrana istraživanja o utjecaju epigenetike na evolucijske i adaptivne procese u biljnim organizmima. Raspraviti će se rezultati istraživanja s ciljem boljeg razumijevanja uloge epigenetskih mehanizama u odvijanju evolucijski značajnih procesa.

3.1. Utjecaj metilacije DNA na razvoj heterofilije u vrste *Ilex aquifolium*

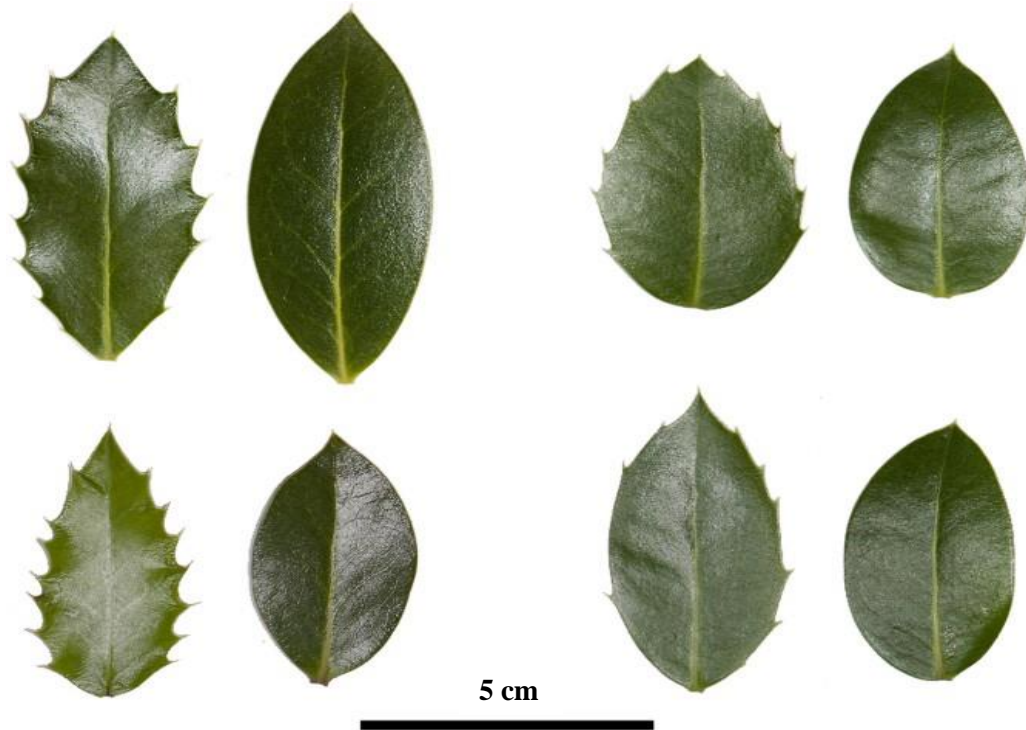
Informacije o istraživanju uloge metilacije DNA u razvoju heterofilije i Slika 3. preuzete su iz rada: Herrera, C.M. i Bazaga, P. (2013) 'Epigenetic correlates of plant phenotypic plasticity: DNA methylation differs between prickly and nonprickly leaves in heterophyllous *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae) trees: Heterophylly and DNA Methylation', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(3), str. 441–452.

3.1.1. Uvod i tijek istraživanja

Stabla vrste *Ilex aquifolium* odlikuje heterofilija, odnosno pojavnost različitih oblika listova na istoj jedinci. Točnije, radi se o fenotipskoj plastičnosti jer iako je prisutna na većini stabala, heterofilija nije obligatna karakteristika te vrste. Dva oblika lista koja se javljaju na heterofilnim jedinkama su zaglađeni i bodljikavi listovi. Uočeno je da su se na ograncima koji su bivali ugroženi herbivorima razvili bodljikavi oblici listova, a na zaklonjenim ograncima dominirali su glatki oblici. Fenotipski različiti listovi razlikovali su se i po rasporedu metiliranih sekvenci u genomu. S obzirom da su heterofilni listovi smješteni na istoj biljci, imaju identičnu genetsku podlogu, te tako predstavljaju idealan model za istraživanje utjecaja epigenetskih modifikacija na prilagodbu organizma specifičnim okolišnim uvjetima.

Vrsta *Ilex aquifolium* je zimzeleno stablo koje se prostire po sjevero-zapadnoj, središnjoj i južnoj Europi te sjevernoj Africi. Proučavana su stabla koja rastu u jugoistočnoj Španjolskoj. Za epigenetske analize prikupljene su grane s kombinacijom bodljikavih i glatkih listova sa stabala koja su imala preko 50% takvih grana u donjoj trećini krošnje. Reprezentativni uzorak parova takvih listova je prikazan na Slici 3. Listovi su sasušeni u papirnatim omotima u posudi sa silika-gelom. Nakon sušenja su smrvljeni u fini prah te je iz njih izolirana DNA. Za utvrđivanje

metiliranih regija genoma korištena je metoda MSAP. Pripremljena su dva alikvota za svaki uzorak lista te su se provele po dvije nezavisne MSAP analize radi što preciznijeg rezultata.



Slika 3. Četiri para bodljikavih i glatkih listova; parovi su rasli na istim granama i prikupljeni su s četiri različita stabla *Ilex aquifolium* u svrhu analize metilacije DNA.

3.1.2. Rezultati

Primijećena je velika diferencijacija između stabala iste vrste s obzirom na učestalost pojavljivanja bodljikavih listova. Bodljikavi su listovi uglavnom dominirali na ograncima koji su bili bliže tlu te na dijelovima krošnji gdje su bili uočeni tragovi hranjenja herbivora. Na stablima na kojima nije bilo vidljivih oštećenja djelovanjem herbivora, uglavnom su se razvili glatki listovi.

Rezultati su pokazali da je prisutnost MSAP markera primjetno veća na bodljikavim nego na glatkim listovima. Iz toga se može zaključiti da metilacija DNA na određenim regijama kromatina utječe na razvoj zaglađenih oblika lista, dok demetilacija potiče diferencijaciju lista u bodljikavi oblik. *Ilex aquifolium* razvija listove s čvršćim, dužim, ili gušćim bodljama kao odgovor na okolišne uvjete, odnosno aktivnost herbivora. Visinska granica krošnji do koje dominiraju

bodljikavi listovi je u korelaciji s visinom od 2.25 metara koliko iznosi vertikalni doseg najvišeg herbivora koji obitava na tom području – običnog jelena (*Cervus elaphus*). Raspored metilacije DNA u bodljikavim i glatkim listovima je dosljedan u svim uzorcima listova s različitih grana i stabala što potvrđuje pretpostavku da se radi o ciljanog epigenetskom mehanizmu prilagodbe vrste *Ilex aquifolium* na vanjske okolišne uvjete. Kako bi se potvrdili navedeni zaključci, u daljnjim se istraživanjima mogu provesti manipulacije nad metilacijom određenih regija u DNA molekuli bodljikavih i glatkih listova kako bi se pratile promjene u njihovim fenotipovima.

3.2. Epigenetički aspekti u procesu hibridizacije biljnih vrsta

Informacije o istraživanju hibridizacije biljnih vrsta preuzete su iz rada: Radosavljević, I., Bogdanović, S., Celep, F., Filipović, M., Satovic, Z., Surina, B., Liber, Z., 2019. Morphological, genetic and epigenetic aspects of homoploid hybridization between *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill. Sci. Rep. 9, 3276.

3.2.1. Uvod i tijek istraživanja

Porastom ljudske populacije javljala se i potreba za naseljavanjem novih prostora. Mnoge su biljne kulture ljudskom aktivnošću preseljene na nova staništa na koja nisu bile primarno prilagođene. Ukoliko su se našle u neposrednom kontaktu sa srodnom, autohtonom vrstom moglo je doći do procesa hibridizacije. Hibridizacija uključuje povezivanje genoma dviju srodnih vrsta što rezultira nastankom nove vrste koja je najčešće sterilna. Može nastati alopoliploidijom, tj. spajanjem čitavih roditeljskih genoma u novi, hibridni genom, ili može biti rezultat homoploidije, što znači da će nova vrsta imati jednak broj kromosoma kao i roditeljske vrste te će naslijediti kombinaciju roditeljskih gena. Hibridizacija ima bitnu ulogu u evoluciji, simpatričkoj specijaciji, a moguće i u izumiranju nekih vrsta. Hibridi nisu proizvod samo genetskih varijacija, već na njihovu evoluciju utječu i epigenetski mehanizmi koji mogu dovesti do nekih ključnih razlika između hibridnih i roditeljskih fenotipova.

Istraživanje se provodilo na otoku Visu gdje su se proučavale dvije vrste kadulje – dalmatinska kadulja (*Salvia officinalis* L.), te grčka kadulja (*Salvia fruticosa* Mill.) koje žive u simpatričkom odnosu. *S. fruticosa* nije autohtona vrsta, te se njezin areal proteže duž istočnih obala Sredozemlja. Istovremeno, prirodni areal *S. officinalis* se prostire duž istočnih obala Jadranskog mora, tako da

se otok Vis nalazi u njegovom samom središtu. Proučavana je hibridizacija tih dviju vrsta koja je moguća zahvaljujući preklapanju njihovih perioda cvjetanja na zapadnoj obali Visa. Tip hibridizacije je homoploidnog tipa s obzirom da obje vrste imaju 14 (2n) kromosoma u jezgri. Uočeno je mnoštvo varijeteta hibrida između te dvije vrste koji se razlikuju s obzirom na neke morfološke karakteristike. Cilj ovog istraživanja bilo je analizirati različite aspekte hibridizacije između ovih vrsta i to: morfološki aspekt kroz opsežnu morfometrijsku analizu, epigenetski primjenom MSAP metode, te genetski primjenom AFLP i mikrosatelitnih molekularnih biljega. Time bi se stekao uvid u genetsku strukturu istraživanih svojti, razinu protoka gena između roditeljskih vrsta (ako je prisutan), razinu metilacije hibridnih i roditeljskih genoma, te utjecaj okoliša na postojeće populacije.

3.2.2. Rezultati

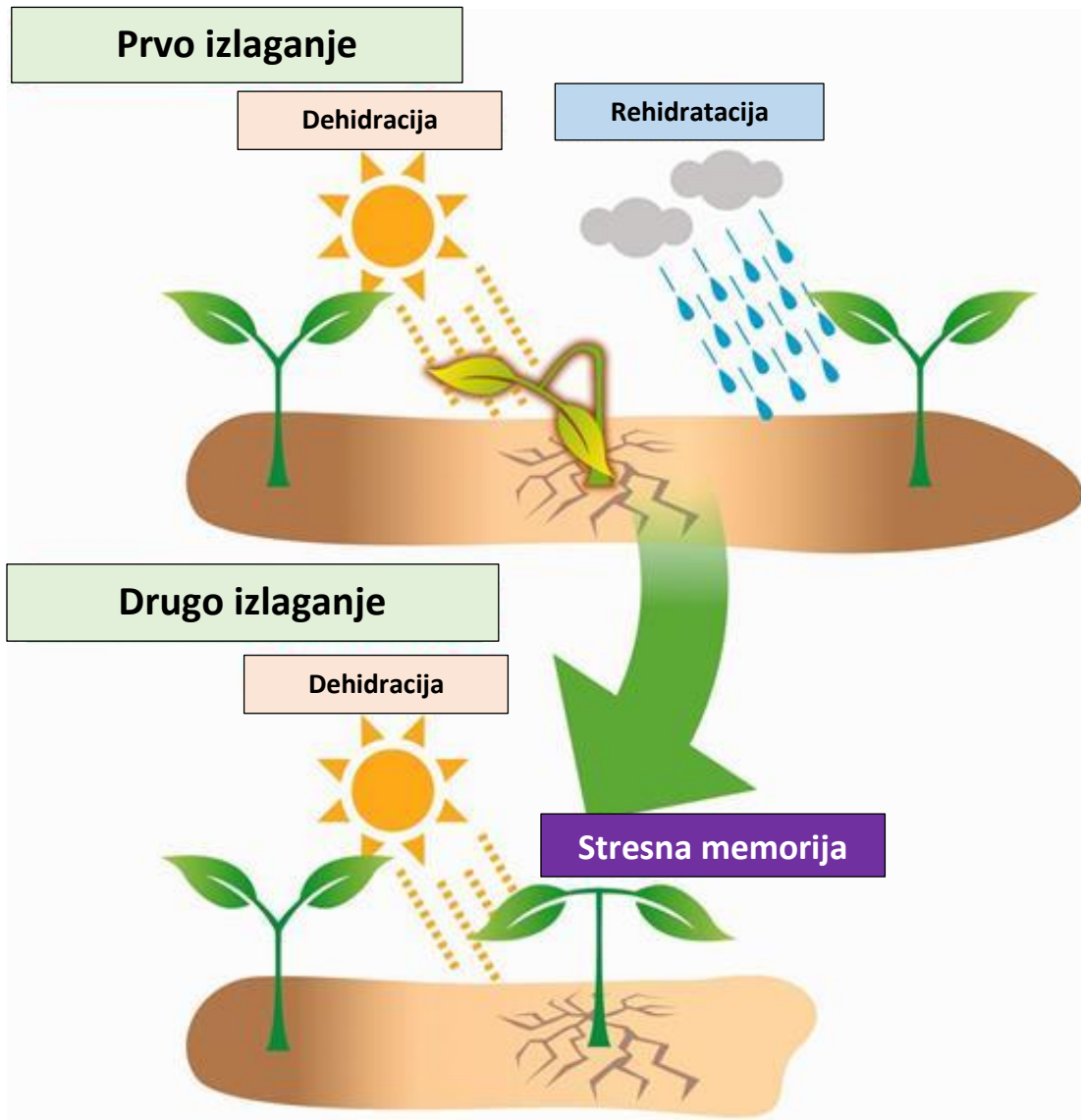
Što se tiče morfoloških karakteristika, uzorci *S. officinalis* imali su najviše uniformne osobine, hibridi su prepoznati kao intermedijerni oblici, dok su uzorci *S. fruticosa* fenotipski bili najvarijabilniji. To se može objasniti fenomenom fenotipske plastičnosti, a koji je očekivano pod značajnim utjecajem epigenetskih modifikacija. Kada se populacija nađe u izmijenjenom staništu, nove generacije jedinki poprimaju cijeli spektar različitih fenotipskih osobina kako bi se s vremenom putem prirodne selekcije zadržao onaj varijetet koji ima optimalno prilagođen fenotip za dotični okoliš. Morfološke karakteristike populacije *S. fruticosa* potvrđuju da se ona još uvijek prilagođavala novim uvjetima, dok je *S. officinalis* autohtona vrsta koja je već prošla proces lokalne adaptacije. Hibridne jedinice imale su i neke jedinstvene karakteristike koje su ih razlikovale od roditeljskih fenotipova, te su imale veću genetičku varijabilnost što je očekivana posljedica hibridizacijskog procesa. Najmanje razlike između genetičke i epigenetičke varijabilnosti pokazale su se kod *S. officinalis*, srednje u hibridnih jedinki, te najveće kod *S. fruticosa*. Takav rezultat ukazuje na dobru prilagođenost i minimalni stres vrste *S. officinalis*, a izražen stres u vrste *S. fruticosa*. Grčka kadulja koja je na ovom lokalitetu izložena za nju stresnim okolišnim uvjetima, prolazi kroz proces aktivnih epigenetskih promjena zahvaljujući čemu dolazi do pojave novih prilagodbi koje su detektirane u vidu izražene fenotipske plastičnosti. Rezultati su također pokazali da se većina epigenetskih promjena odvija na razini jedinice, a ne na razini populacije, te da epigenetska varijabilnost ne ovisi o genetskoj podlozi, odnosno da i vrlo ograničena genetska baza može producirati vrlo širok spektar epigenetskih i fenotipskih modifikacija.

3.3. Odgovor biljaka na okolišni stres i epigenetska memorija

U ovom će se odlomku raspraviti osnovni epigenetski mehanizmi adaptacije biljaka na različite stresne uvjete u okolišu, kao i mehanizam stresne memorije koji im osigurava brži odgovor i bolju reakciju na buduće stresore.

3.3.1. Uvod

Biljke su kao sesilni organizmi neposredno izložene promjenjivim uvjetima u okolišu. Na njihov rast i razvoj utječu varijacije abiotičkih parametara kao što su npr. intenzitet sunčevog zračenja, količina dostupne vode i nutrijenata, temperatura zraka i salinitet tla. Biotički čimbenici poput herbivora, insekata i patogenih mikroorganizama im također mogu predstavljati prijetnju. Kako bi opstale u varijabilnom staništu, biljke su razvile sofisticiran senzorni sustav i brojne signalne kaskade koje pokreću obrambene odgovore organizma u obliku ekspresije željenih gena (Kinoshita i Seki, 2014). Značajnu evolucijsku prednost osigurali su im mehanizmi epigenetske memorije čija je funkcija „zapamtiti“ proživljeni stresor te pripremiti organizam na znatno brži i snažniji odgovor u slučaju da se sličan stresor ponovi. Na Slici 4. je shematski prikaz funkcije stresne memorije na primjeru odgovora biljke na intenzivno UV zračenje i nedostatak vode. Epigenetska ili stresna memorija je uspostavljena metilacijom DNA i modifikacijom histona, što se u biljaka može prenijeti i na potomstvo te se tako osigurava trajna epigenetska prilagodba na stresne uvjete u okolišu (Miryeganeh, 2021).



Slika 4. Primjer djelovanja epigenetske (stresne) memorije u uvjetima suše i intenzivnog ultraljubičastog (UV) zračenja. Biljka pri prvoj pojavi takvih uvjeta nema razvijen mehanizam obrane i stoga dehidrira. Ako se rehidracijom uspije oporaviti, organizam zadrži uputu za oporavak, pa je pri idućim nepovoljnim uvjetima odgovor biljke brži i snažniji. Preuzeto i prilagođeno iz *Kinoshita i Seki, 2014*.

3.3.2. Odgovor na sušu

Na primjeru vrste *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. proučavano je kako signali za sušu utječu na modifikaciju kromatina te naposljetku na ekspresiju gena (Kinoshita i Seki, 2014). U sušnim se uvjetima u organizmu nakupljaju određeni transkripti (RD29A, RD20 i AtGOLS2), dok u stanju rehidracije njihove razine spadnu na bazalnu vrijednost. Usporedno s povećanjem broja

transkripta u stanju dehidracije organizma, raste količina RNA polimeraze II te se vrši acetilacija lizina na mjestu 9 u histonu H3 što direktno utječe na ekspresiju gena. Promjene na trimetil – histonu H3 na mjestu 4 na lizinu (H3K4me3) su u korelaciji s transkripcijskom aktivnošću. Taj kromatinski slijed i RNA polimeraza II mogli bi predstavljati epigenetsku memoriju jer je njihova razina u organizmu izrazito visoka u uvjetima suše, a također je u određenoj mjeri održana i u stanju rehidracije (Kim i sur., 2012).

3.3.3. Odgovor na fluktuacije u količini nutrijenata

Biljke su razvile posebne mehanizme kontrole unosa nutrijenata. Epigenetski mehanizmi koji sudjeluju u regulaciji količine unesenih nutrijenata u organizmu su metilacija DNA, modifikacije histona te histonske varijante. Modifikacija histona kao oblik regulacije nutrijenata razmotriti će se na primjeru dušika (N). Ukoliko je tlo bogato dušikom i biljka ga je unijela do razine zasićenja, u organizmu se pokreće negativna povratna sprega, tj. represija unosa dušika. Visoka koncentracija dušika je signal za represiju ekspresije gena za korijenov transporter dušika (NRT2.1). HNI9 (eng. *High-nitrogen-insensitive 9*) je ključni faktor u povećanju količine histona H3K27me3 na genu NRT2.1 što utišava njegovu transkripciju. Na taj se način modifikacijom post-translacijskog kromatina regulira unos dušika (Miryeganeh, 2021).

3.3.4. Odgovor na jako UV – zračenje

Istraživanja su pokazala da se u vrste *Arabidopsis thaliana* pri stresu uzrokovanom jakim UV-B zračenjem odvijaju automatske kromatinske izmjene i acetilacija histona radi utišavanja transgena i endogenih lokusa. Potvrđeno je da su kromatinske izmjene inducirane stresom od UV – zračenja nasljedne i detektirane su u iduće dvije generacije potomaka u manjem broju stanica. Vrsta *Artemisia annua* pri obrani od UV – zračenja proizvodi seskviterpen artemisinin koji se koristi u primarnoj terapiji malarije. Demetilacija DNA na promotorskom mjestu gena DBR2 potiče njegovu ekspresiju i obranu od UV – zračenja. Izlaganje vrste *Artemisia annua* UV-B – zračenju potaknulo je hipometilaciju DNA u cijelom njezinom genomu (Chang i sur., 2020).

4. ZAKLJUČAK

Epigenetske promjene u biljaka igraju posebno važnu ulogu u prilagodbi na izmijenjene okolišne uvjete, te time posredno na adaptivnu divergenciju i evoluciju zbog mogućnosti nasljeđivanja tih promjena iz generacije u generaciju, što nije slučaj kod drugih živih organizama. Biljke su razvile napredne epigenetske mehanizme prilagodbe upravo radi svog sesilnog načina života i stalne izloženosti promjenjivim okolišnim uvjetima.

Na primjeru heterofilije u vrste *Ilex aquifolium* opisano je kako okolišni podražaj, tj. aktivnost herbivora, izravno utječe na modifikaciju u DNA molekuli, koja se zatim odražava kao promjena u fenotipu listova.

U istraživanju hibridizacije između vrsta *S. officinalis* i *S. fruticosa* zaključeno je kako epigenetski mehanizmi doprinose diferencijaciji hibrida i roditeljskih svojti te kako se sve epigenetske promjene odvijaju na razini jedinke kao odgovor na okolišne čimbenike, a ne na razini populacije. U slučaju alohtone svojte koja se na promatranom lokalitetu suočava s tek marginalno odgovarajućim ekološkim uvjetima (*S. fruticosa*), potvrđeno je da u procesu adaptivne divergencije važnu ulogu igra fenotipska plastičnost, tj. sposobnost vrlo ograničene genske podloge da putem epigenetskih modifikacija producira veliki broj fenotipova u populaciji kako bi se prirodnom selekcijom izdvojili oni fenotipovi koji su najprilagođeniji specifičnim okolišnim uvjetima.

Epigenetska ili stresna memorija važna je u preživljavanju biljaka jer osigurava brz i jak odgovor na ponavljajuće stresne uvjete u okolišu. Kao i neke druge epigenetske promjene, stresna memorija može biti nasljedna u biljaka i time utjecati na njihove evolucijske i adaptivne procese.

Epigenetička istraživanja adaptivne divergencije i specijacije imaju još mnogo prostora za daljnji razvoj. Razumijevanjem temeljnih epigenetskih procesa na biljkama, stječe se uvid u slične mehanizme u drugim organizmima i čovjeku, otvaraju se mogućnosti manipulacije nad tim procesima u željene svrhe, te još mnoge druge prednosti.

5. LITERATURA

Bender, J. (2004) 'DNA METHYLATION AND EPIGENETICS', *Annual Review of Plant Biology*, 55(1), pp. 41–68.

Chang, Y. *i sur.* (2020) 'Epigenetic regulation in plant abiotic stress responses', *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(5), pp. 563–580.

Ciechomska, M., Roszkowski, L. and Maslinski, W. (2019) 'DNA Methylation as a Future Therapeutic and Diagnostic Target in Rheumatoid Arthritis', *Cells*, 8(9), p. 953.

Durán-Figueroa, N. and Vielle-Calzada, J.-P. (2010) 'ARGONAUTE9-dependent silencing of transposable elements in pericentromeric regions of Arabidopsis', *Plant Signaling & Behavior*, 5(11), pp. 1476–1479.

Herrera, C.M. i Bazaga, P. (2010) 'Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*', *New Phytologist*, 187(3), pp. 867–876.

Herrera, C.M. i Bazaga, P. (2013) 'Epigenetic correlates of plant phenotypic plasticity: DNA methylation differs between prickly and nonprickly leaves in heterophyllous *Ilex aquifolium* (Aquifoliaceae) trees: Heterophylly and DNA Methylation', *Botanical Journal of the Linnean Society*, 171(3), pp. 441–452.

Kawecki, T.J. i Ebert, D. (2004) 'Conceptual issues in local adaptation', *Ecology Letters*, 7(12), pp. 1225–1241.

Kim, J.-M. *i sur.* (2012) 'Transition of Chromatin Status During the Process of Recovery from Drought Stress in *Arabidopsis thaliana*', *Plant and Cell Physiology*, 53(5), pp. 847–856.

Kinoshita, T. i Seki, M. (2014) 'Epigenetic Memory for Stress Response and Adaptation in Plants', *Plant and Cell Physiology*, 55(11), pp. 1859–1863.

Lippman, Z. *i sur.* (2004) 'Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control', *Nature*, 430(6998), pp. 471–476.

Lister, R. *i sur.* (2008) ‘Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis’, *Cell*, 133(3), pp. 523–536.

Miryeganeh, M. (2021) ‘Plants’ Epigenetic Mechanisms and Abiotic Stress’, *Genes*, 12(8), p. 1106.

Radosavljević, I. *i sur.* (2019) ‘Morphological, genetic and epigenetic aspects of homoploid hybridization between *Salvia officinalis* L. and *Salvia fruticosa* Mill.’, *Scientific Reports*, 9(1), p. 3276.

Reyna-López, G.E., Simpson, J. i Ruiz-Herrera, J. (1997) ‘Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms’, *Molecular and General Genetics MGG*, 253(6), pp. 703–710.

Rundle, H.D. i Nosil, P. (2005) ‘Ecological speciation: Ecological speciation’, *Ecology Letters*, 8(3), pp. 336–352.

Schramke, V. i Allshire, R. (2003) ‘Hairpin RNAs and Retrotransposon LTRs Effect RNAi and Chromatin-Based Gene Silencing’, *Science*, 301(5636), pp. 1069–1074.

Spillane, C. i McKeown, P. (eds) (2020) *Plant Epigenetics and Epigenomics: Methods and Protocols*. New York, NY: Springer US (Methods in Molecular Biology).

Trucchi, E. *i sur.* (2016) ‘Bs RAD seq: screening DNA methylation in natural populations of non-model species’, *Molecular Ecology*, 25(8), pp. 1697–1713.

Van Gulp, T.P. *i sur.* (2016) ‘epiGBS: reference-free reduced representation bisulfite sequencing’, *Nature Methods*, 13(4), pp. 322–324.

Yadav, C.B. *i sur.* (2018) ‘Epigenetics and Epigenomics of Plants’, in R.K. Varshney, M.K. Pandey, and A. Chitikineni (eds) *Plant Genetics and Molecular Biology*. Cham: Springer International Publishing (Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology), pp. 237–261.

6. ŽIVOTOPIS

Ime i prezime: Vala Medvedec

Državljanstvo: hrvatsko

Obrazovanje: opća gimnazija (Tituš Brezovački, 2016.-2020., Zagreb), preddiplomski studij Znanosti o okolišu na Biološkom odsjeku Prirodoslovno-matematičkog fakulteta (2020.-2023., Zagreb).

Iskustva i vještine: odrađena laboratorijska stručna praksa u EUROFINS CROATIAKONTOLA d.o.o., engleski jezik u govoru i pisanju, vozačka dozvola B kategorije