



Epigenetička vs. genetička raznolikost prirodnih biljnih populacija: Studija slučaja hrvatskih endemičnih kadulja

Zlatko Šatović

Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet

e-mail: zsatovic@agr.hr

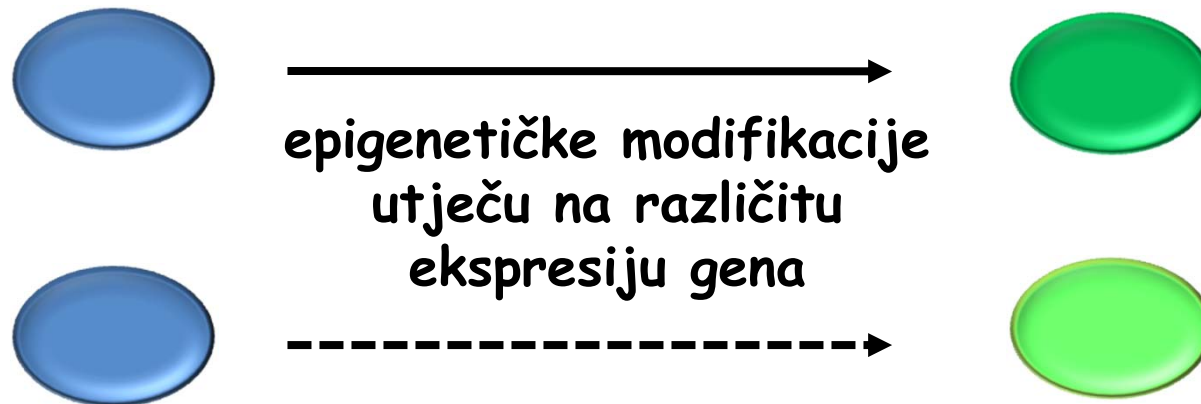
Zagreb, 19. prosinca 2012.

**Epigenetička vs. genetička raznolikost prirodnih biljnih populacija:
Studija slučaja hrvatskih endemičnih kadulja**

- (A) Epigenetika**
 - (B) Temeljna pitanja i hipoteze**
 - (C) Biljni materijal**
 - (D) Metode**
 - (E) Očekivani doprinos projekta**
-

(A) Epigenetika

- grana genetike koja proučava nasljedne promjene u ekspresiji i funkciji gena koje ne mogu biti objašnjene promjenama u nukleotidnoj sekvenci DNA



sve stanice imaju isti genom

- **genom**: skup informacija sadržan u sekvenci DNA

1 genom

svaki stanični tip ima specifičan epigenom

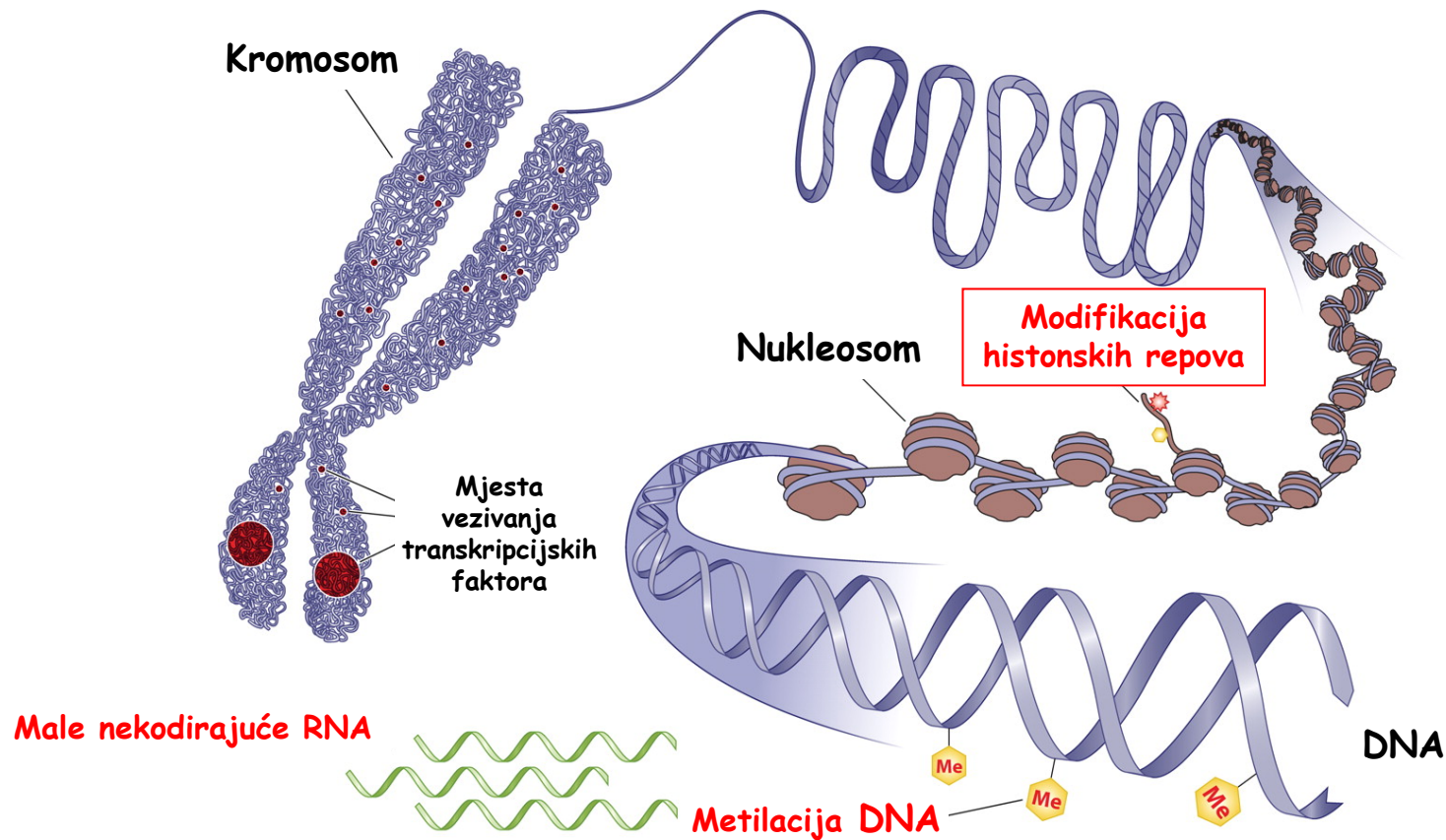
- **epigenom**: skup informacija sadržan u kromatinu koji utječe na transkripciju

>200 različitih epigenoma

Epigenetička informacija (1)

(1) Modifikacije histonskih repova

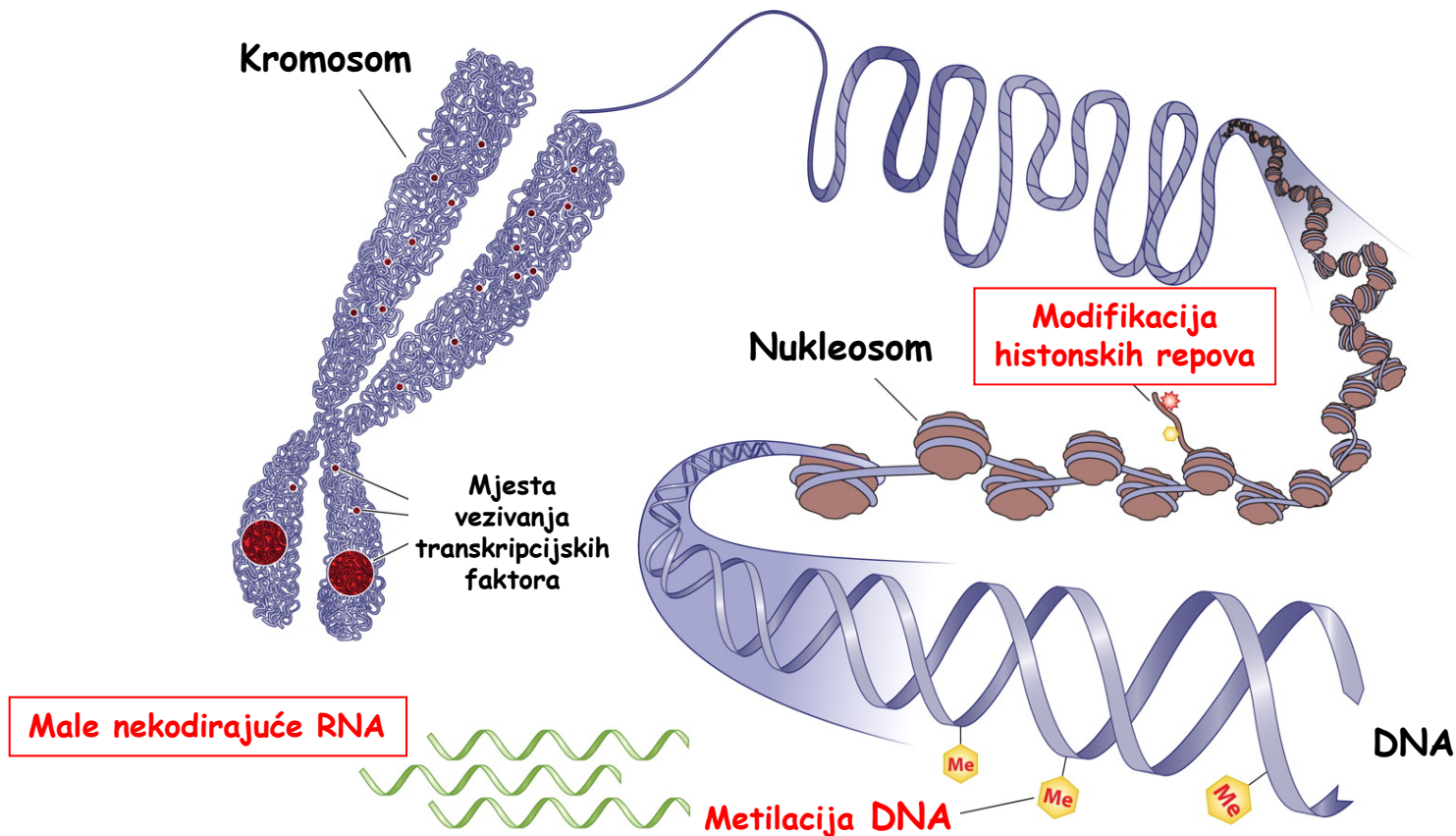
- modifikacija lizina i arginina u N-terminalnim repovima histona H3 i H4: acetilacija, metilacija, fosforilacija itd.



Epigenetička informacija (2)

(2) Djelovanje malih nekodirajućih RNA

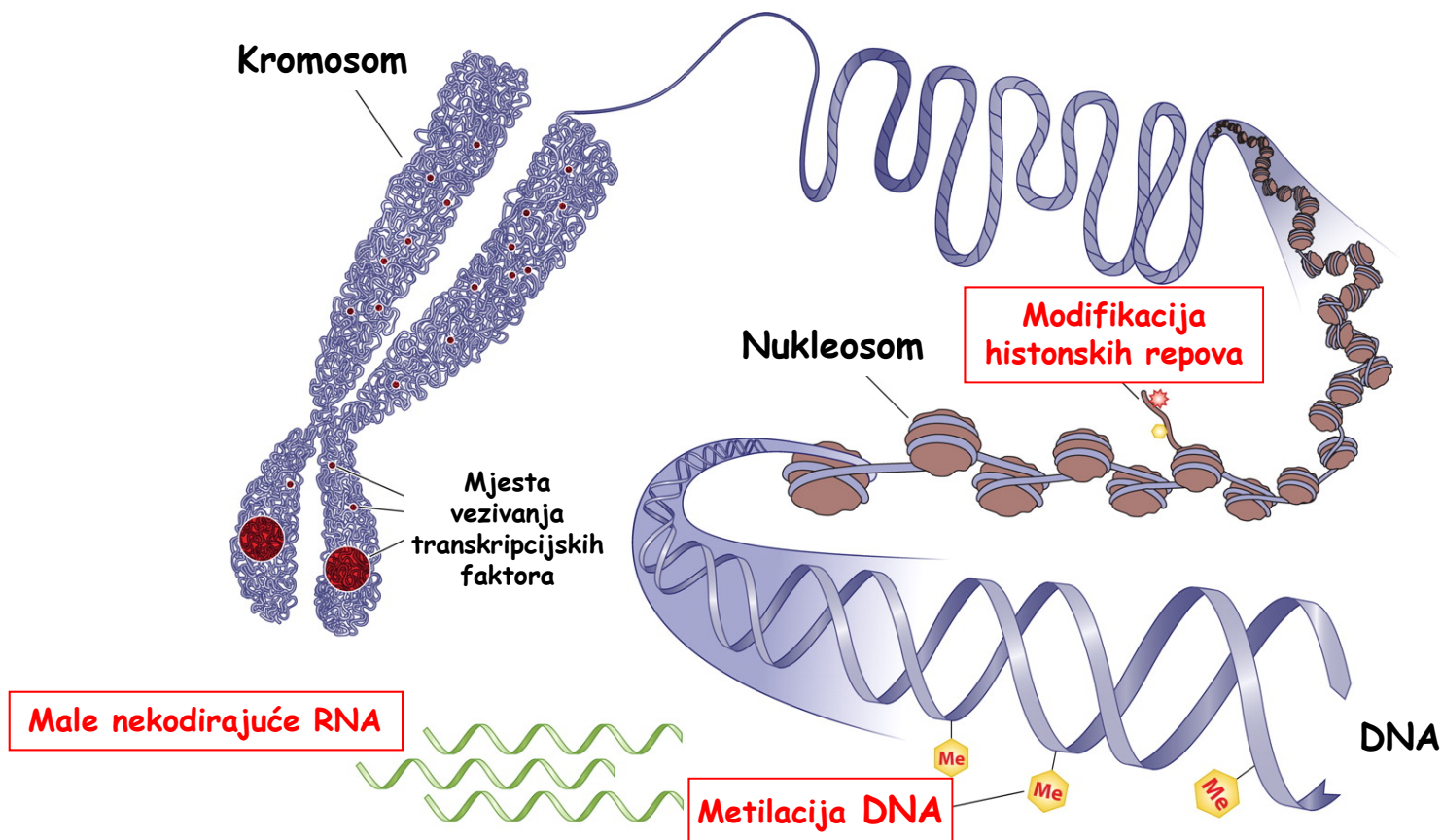
- ponavljajuća DNA se prepisuje u male nekodirajuće molekule RNA (*small interfering RNAs; siRNAs*): formiranje heterokromata



Epigenetička informacija (3)

(3) Metilacija DNA

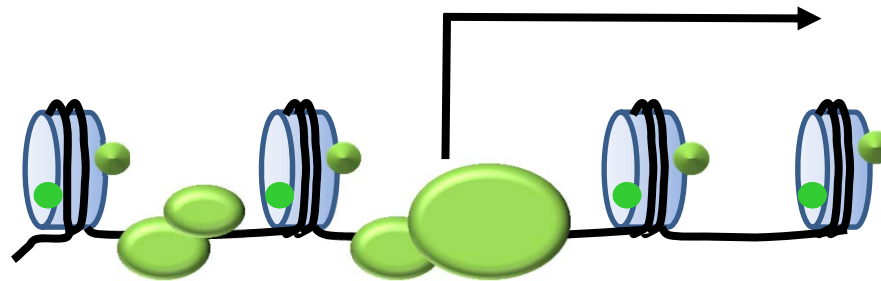
- dodatak metilne skupine na 5 C atom citozina



Epigenetički mehanizmi

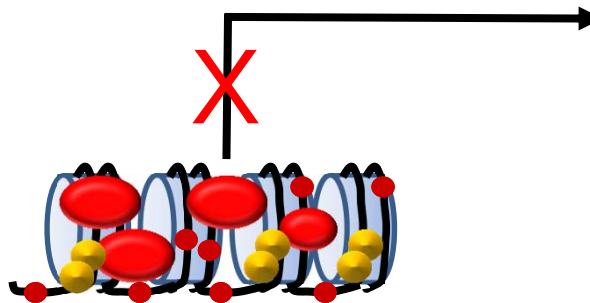
- epigenetički mehanizmi utječu na stanje kromatina
- otvoreno stanje kromatina: transkripcija omogućena

gen je aktivan



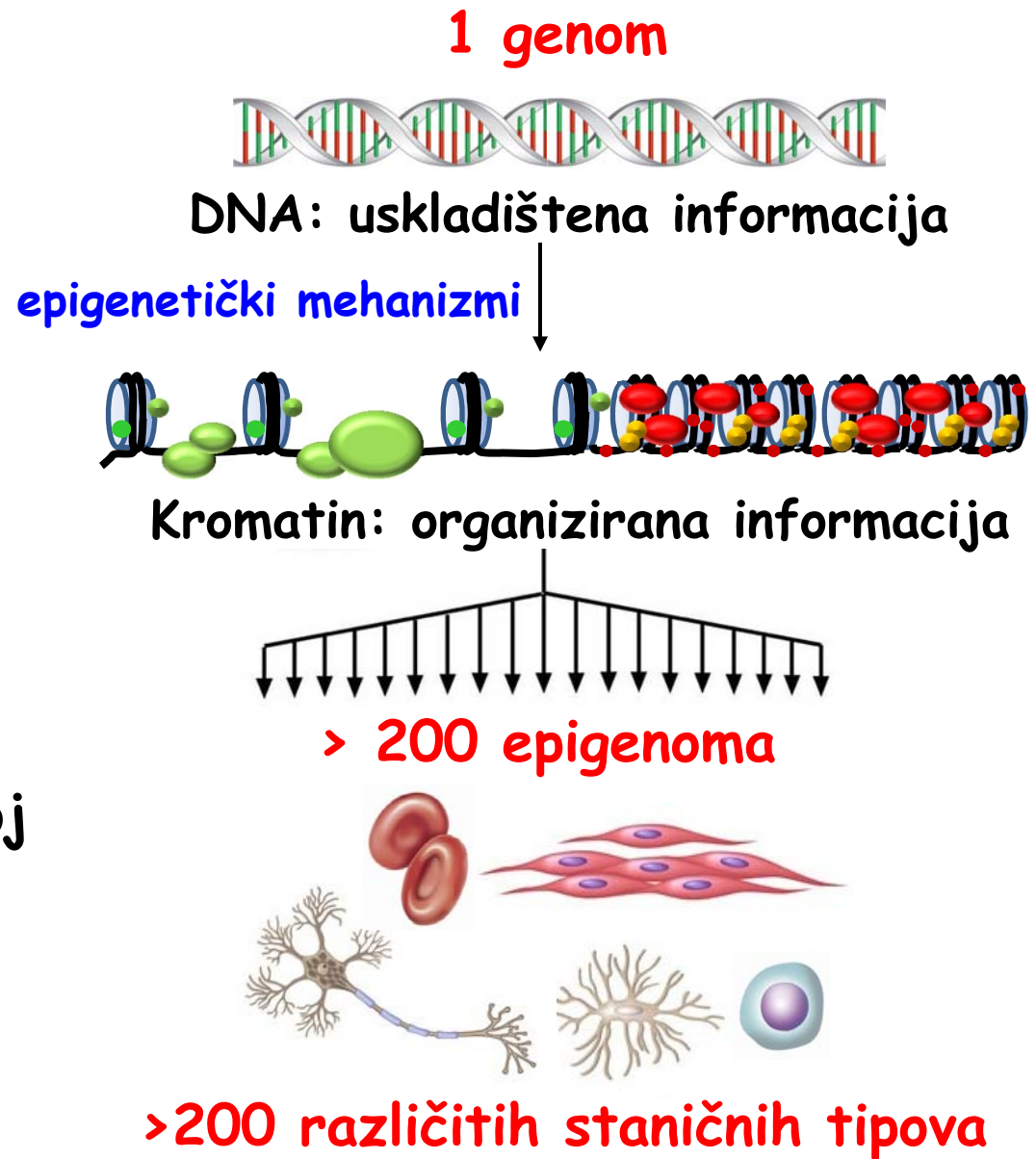
- zatvoreno stanje kromatina: transkripcija onemogućena

gen je utišan



Epigenetički kod

- epigenetička se informacija uspostavlja rano u embrionalnom razvoju i omogućava diferencijaciju stanica
- epigenetička se informacija prenosi kroz stanične diobe (mitoza)
- stanice zadržavaju svoj identitet



Genetički vs. epigenetički kod

- epigenetički mehanizmi su posrednik između gena i okoliša
 - epigenetička je informacija fleksibilna i reverzibilna
 - pod utjecajem je različitih čimbenika okoliša
 - ukoliko je određen čimbenik signal za promjenu određene epigenetičke informacije doći će do promjene u ekspresiji određenih gena
 - nakon prestanka djelovanja određenog čimbenika, prvobitno se stanje može ponovo uspostaviti
-

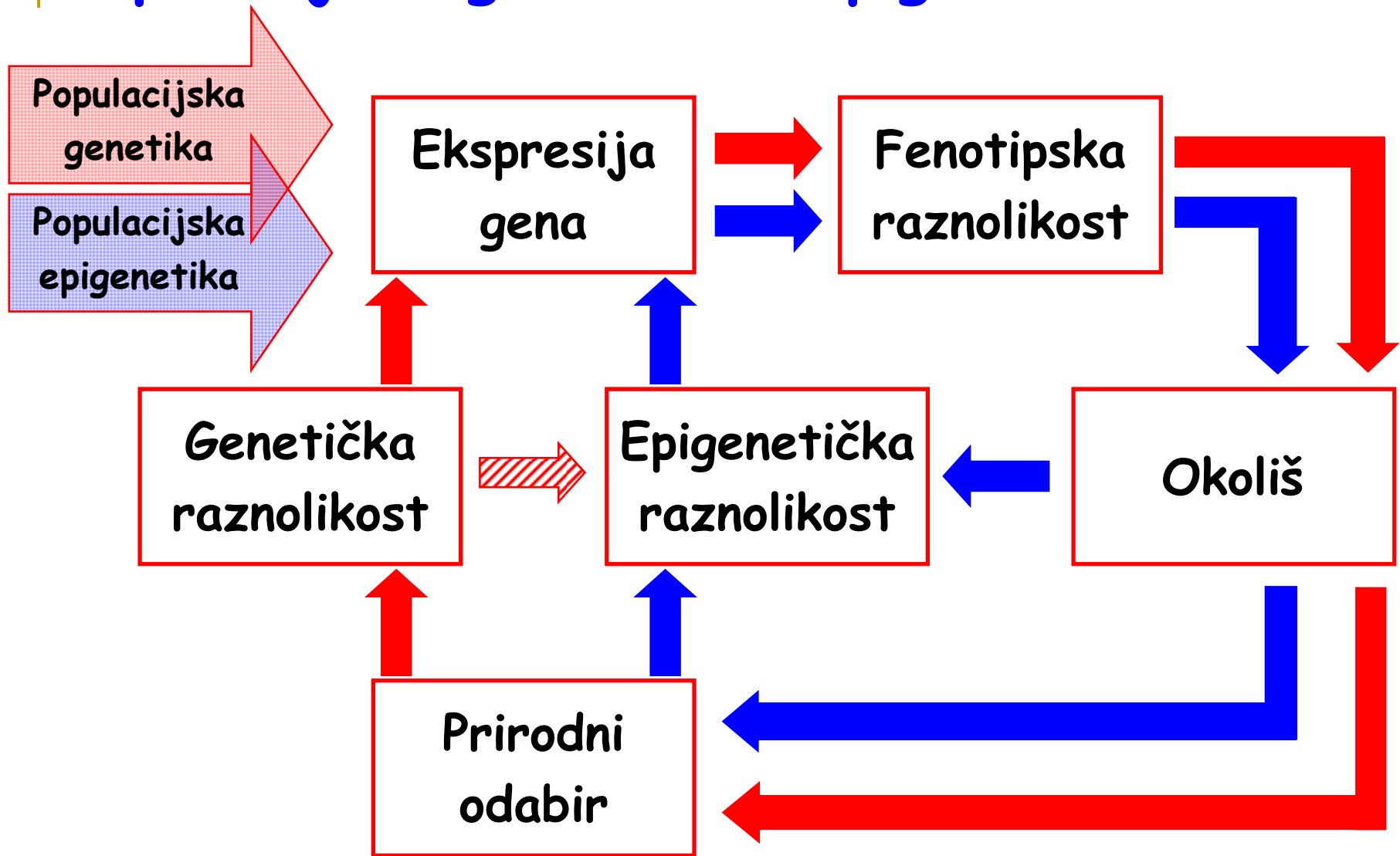
Transgeneracijsko nasljeđivanje

- epigenetičke se oznake u pravilu ne nasljeđuju
 - dva vala epigenetičkog reprogramiranja
 - (1) prilikom stvaranja gameta
 - (2) prilikom ranog embrionalnog razvoja
 - u rijetkim slučajevima epigenetičke se informacije mogu prenijeti i u sljedeću generaciju
-

Epigenetika, ekologija i evolucija

- (1) Epigenetičke se informacije mogu prenijeti i u sljedeću generaciju
 - (2) Raznolikost prirodnih populacija postoji ne samo na razini genoma već i epigenoma
 - (3) Epigenetska raznolikost utječe na fenotipsku raznolikost, a time i na prirodan odabir
 - (4) Epigenetske modifikacije su pod izravnim utjecajem okoliša
-

Populacijska genetika i epigenetika



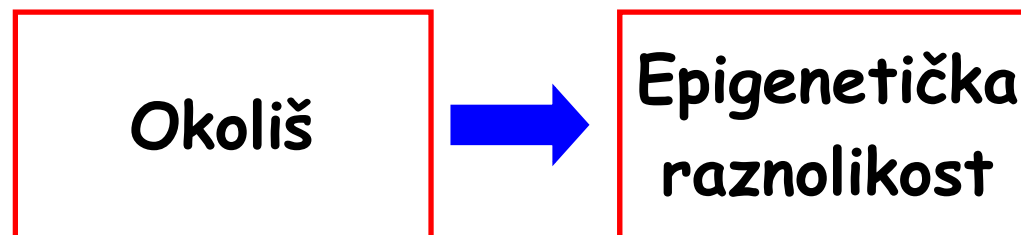
(B) Temeljna pitanja i hipoteze

- (1) Genetička/epigenetička raznolikost
unutar i između prirodnih populacija**
 - (2) Genetička/epigenetička raznolikost
i okolišni čimbenici**
 - (3) Genetička/epigenetička raznolikost
i genetsko usko grlo**
 - (4) Genetička/epigenetička raznolikost
i hibridne populacije**
-

Temeljna pitanja (1)

(1) Koja razina epigenetičke raznolikosti postoji u prirodnim populacijama, kako je ta raznolikost strukturirana unutar i između populacija i koji je odnos između epigenetičke i genetičke raznolikosti?

Hipoteza: Udio epigenetičke varijance objašnjen razlikama između populacija je znatno veći od udjela genetičke varijance između populacija.



Temeljna pitanja (2)

(2) Postoje li sustavni obrasci epigenetičke raznolikosti u odnosu na pojedine okolišne čimbenike?

Hipoteza: Povezanost između genetičkih/epigenetičkih biljega i okolišnih varijabli će se pokazati signifikantna:

(A) u slučaju mnogih okolišnih varijabli koje utječu na tijek prirodnog odabira;

(B) u slučaju mnogih epigenetičkih biljega, u slučaju adaptivnih genetičkih biljega, te niti u jednom slučaju pri analizi evolucijski neutralnih genetičkih biljega.

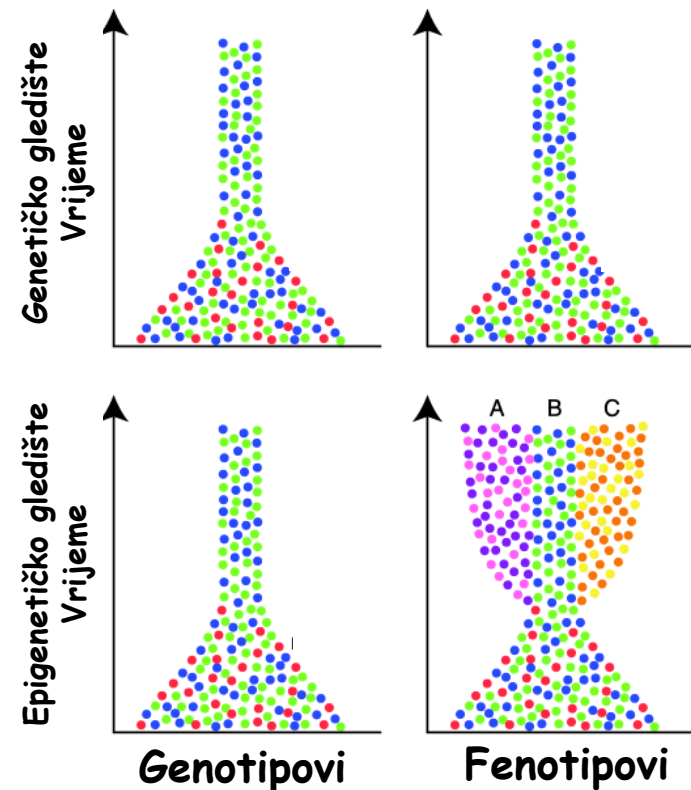


Temeljna pitanja (3)

(3) U čemu se razlikuju obrasci epigenetičke raznolikosti između vrsta koje se znatno razlikuju u genetičkoj raznolikosti?

Hipoteza: Epigenetička raznolikost populacija nije nužno u korelaciji s genetičkom raznolikošću.

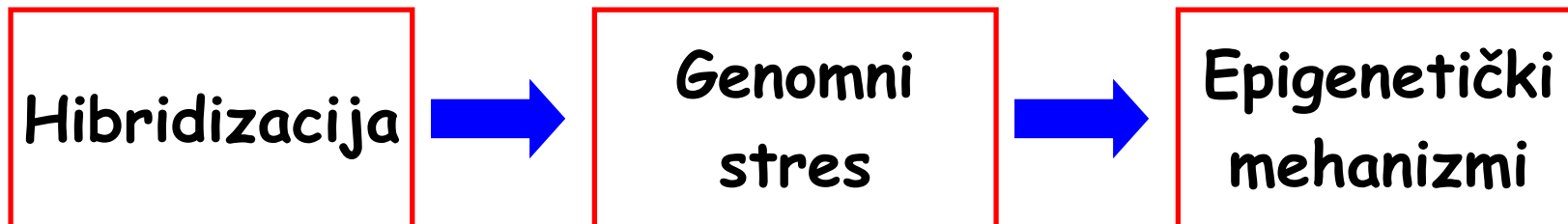
- smanjenje veličine populacije (genetsko usko grlo) može uzrokovati smanjenje genetičke raznolikosti, ali istovremeno dovesti do povećanja epigenetičke, pa time i fenotipske raznolikosti populacije



Temeljna pitanja (4)

(4) Pokazuju li prirodni hibridi različiti obrazac epigenetičke raznolikosti u odnosu na roditeljske vrste?

Hipoteza: Prirodni hibridi imaju znatno veću razinu epigenetičke raznolikosti u odnosu na roditeljske vrste.



(C) Biljni materijal

- (1) Ljekovita kadulja (*Salvia officinalis* L.)
 - (2) Kratkozupčasta kadulja (*S. brachyodon* Vandas.)
 - (3) Hibridna kadulja (*Salvia* × *auriculata* Mill.)
 - Ljekovita kadulja (*S. officinalis* L.)
 - × grčka kadulja (*S. fruticosa* L.)
-

(1) Ljekovita kadulja

- rasprostranjena duž sjevernog obalnog područja Sredozemlja s centrom na istočnoj obali Jadranskog mora

- uzorak: 25 populacija
~ 25 biljaka/populaciji

- ekozemljopisni pregled:

abiotiski čimbenici - reljef, klimatske varijable,
parametri staništa



(2) Kratkozupčasta kadulja

- stenoendem
- dva lokaliteta:
 1. Sv. Ilija, Pelješac
Hrvatska
 2. Orijen,
BiH/Crna Gora
- gotovo ugrožena vrsta
- mali broj i veličina populacija: genetsko usko grlo
- razmnažanje: generativno i vegetativno (vriježe)



(3) Hibridna kadulja (*S. x auriculata*)



S. officinalis *S. x auriculata* *S. fruticosa*

- grčka kadulja: u Hrvatskoj samo na Visu
- hibridi između ljekovite i grčke kadulje
 - poznati, ali samo u uzgoju
 - Vis: potvrđeni na morfološkoj razini
- cv. Newe Ya'ar No. 4: uzgoj u Izraelu

(D) Metode

(1) Epigenetički biljezi MSAP

- Polimorfizam umnoženih ulomaka osjetljivih na metilaciju
- *Methylation-Sensitive Amplified Polymorphism*

(2) Genetički biljezi AFLP

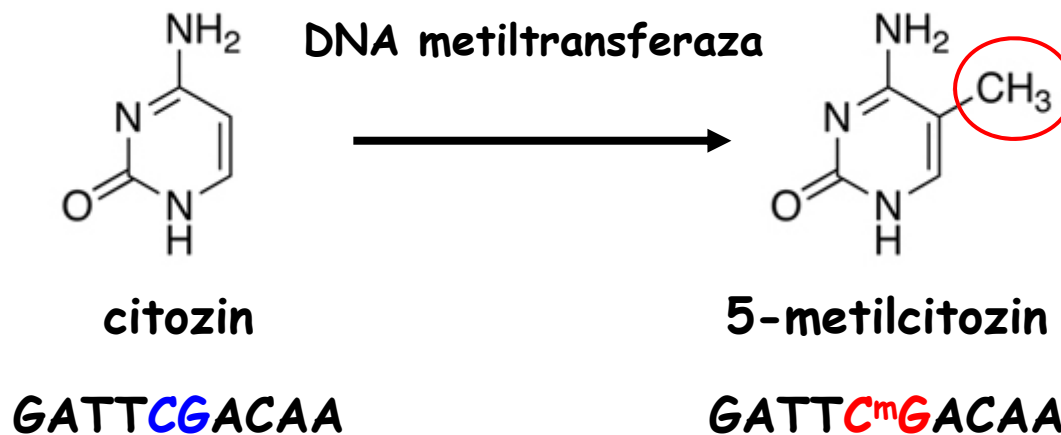
- Polimorfizam dužine umnoženih ulomaka
- *Amplified Fragment Length Polymorphism*

(3) Genetički biljezi SSR

- Ponavljajuće jednostavne sekvence (mikrosateliti)
 - *Simple Sequence Repeats (microsatellites)*
-

Epigenetički biljezi MSAP

- metilacija DNA: kovalentno vezanje metilne skupine na 5C atom citozina



- metilaciju kataliziraju enzimi DNA metiltransferaze
- najčešća mjesta metilacije kod biljaka:
CpG, CpNpG, CpNpN

Izoshizomerni restriksijski enzimi

- restriksijski enzimi: *HpaII* i *MspI*
- prepoznaju isto restriksijsko mjesto: *CCGG*

Tip metilacijskog događaja	Metiliranost sekvence	Aktivnost <i>HpaII</i>	Aktivnost <i>MspI</i>
I	<i>CCGG</i>	+	+
II	^{5m} <i>C</i> <i>CCGG</i>	+	-
III	<i>C</i> ^{5m} <i>C</i> <i>GG</i>	-	+
IV	^{5m} <i>C</i> ^{5m} <i>C</i> <i>GG</i>	-	-

(E) Očekivani doprinos projekta

(1) Znanstveni doprinos

- važnost epigenetičkih procesa u prirodnim populacijama, odnos između epigenetičke i genetičke raznolikosti, utjecaj okolišnih čimbenika na epigenetičku/genetičku strukturu
 - moguće ekološke i evolucijske posljedice epigenetičkih procesa dosad su uglavnom bile istraživane na modelnim odnosno kultiviranim biljnim vrstama, u kontroliranim uvjetima
 - vrlo je malo sustavnih istraživanja provedeno na prirodnim biljnim populacijama
-

(E) Doprinos

(2) Stručni doprinos

- očuvanje bioraznolikosti
 - bolje poznavanje različitih vrsta *Salvia* spp.
 - stanje populacija
 - prikupljanje herbarijskog materijala
 - očuvanje *ex situ*:
 - Kolekcija ljekovitog i aromatičnog bilja
- prikupljanje vrijednih informacija u svrhu izrade znanstveno utemeljenih programa zaštite prirode
- omogućavanje budućih programa oplemenjivanja bilja

Temelj za buduća istraživanja

- (1) Kako epigenetička raznolikost utječe na fenotipsku raznolikost (npr. sastav eteričnog ulja)?
 - (2) Kako bi se epigenetička raznolikost mogla iskoristiti u oplemenjivanju bilja?
 - (3) Je li moguće izazvati epimutacije (npr. stresni uvjeti) i tako povećati raznolikost ishodišnog biljnog materijala za oplemenjivanje?
-



Epigenetička vs. genetička raznolikost prirodnih biljnih populacija: Studija slučaja hrvatskih endemičnih kadulja

Projekt financira Hrvatska zaklada za znanosti

Projektni tim



Zlatko Šatović
Klaudija Carović-Stanko
Martina Grdiša

Jerko Gunjača

Sandro Bogdanović



Toni Nikolić
Zlatko Liber
Ivana Rešetnik
Ivan Radosavljević

Vlatka Zoldoš
Ivan Biruš
Tomislav Horvat
Vedrana Vičić



Marija Jug-Dujaković





Epigenetička vs. genetička raznolikost prirodnih biljnih populacija: Studija slučaja hrvatskih endemičnih kadulja



Zlatko Šatović
Sveučilište u Zagrebu, Agronomski fakultet
e-mail: zsatovic@agr.hr

Zagreb, 19. prosinca 2012.