

STRESZCZENIE

Epigenetyka to pojęcie odnoszące się do zmian w ekspresji genów, które są dziedziczne i indukowane przez metylację DNA, potranslacyjne modyfikacje histonów lub sncRNA, nie wynikające ze zmiany sekwencji DNA. Modyfikacje epigenetyczne oddziałują na ekspresję genów, co wpływa na rozwój i plastyczność fenotypową roślin w reakcji na czynniki zewnętrzne i wewnętrzne. Do niedawna jedyną znaną modyfikacją epigenetyczną DNA u organizmów eukariotycznych była 5-metylocytozyna. Rosnące zainteresowanie tematem oraz rozwój metod detekcji umożliwiło poznanie innych modyfikacji zasad azotowych, m.in. 4-metylocytozyny i 6-metyloadeniny. O ile jednak badania dotyczące występowania i roli 5mC u organizmów eukariotycznych są bardzo szeroko rozpowszechnione, o tyle analizy dotyczące 6mA są ograniczone. Mimo to, istnieją przesłanki wskazujące na potencjalną epigenetyczną rolę 6-metyloadeniny w genomach eukariotycznych. Zrozumienie mechanizmów epigenetycznych, będących odpowiedzią na zmiany środowiskowe, ma kluczowe znaczenie dla rolnictwa. W tym przeglądzie ukazano mechanizmy epigenetyczne, ze szczególnym uwzględnieniem metylacji adeniny u roślin, a także rolę zmienności epigenetycznej w epibreedingu, wpływającego na poprawę cech agronomicznych.

WPROWADZENIE

Zmienność epigenetyczna wpływa na procesy rozwojowe roślin i ich plastyczność fenotypową, w szczególności na adaptację do zmiennych warunków środowiskowych. Mechanizmy epigenetyczne w ostatnich latach stały się istotnym obiektem badań, ze względu na ważny wpływ na procesy takie jak: transkrypcja, replikacja oraz naprawa DNA. Transkrypcja genów jest regulowana na poziomie genetycznym (sekwencje regulatorowe) i epigenetycznym (upakowanie chromatyny i markery epigenetyczne). By zainicjować transkrypcję danego genu, chromatyna w tym miejscu musi być luźniejsza by umożliwić wiązanie czynników transkrypcyjnych (TF) i polimerazy RNA. Zatem to, czy gen jest aktywny transkrypcyjnie czy nie, zależy od stanu chromatyny w konkretnym genie. Na dostępność chromatyny dla czynników transkrypcyjnych wpływają różne mechanizmy, takie jak metylacja DNA, potranslacyjne modyfikacje histonów, mechanizmy remodelujące chromatynę, a także niekodujące RNA. Przy modyfikacjach DNA i histonów podejmuje się starania określenia funkcji występujących w danym obszarze wzorców. Poza badaniami podstawowymi podejmowane są również starania ingerencji w mechanizmy epigenetyczne w celu np. poprawy cech agronomicznych czy wydajności plonowania. W przypadku uprawy roślin szczególnie istotne jest występowanie dziedziczenia danej cechy fenotypowej. O ile dziedziczenie genetyczne jest bardzo dobrze poznane, to dziedziczenie epigenetyczne wciąż jest dość enigmatyczne. Wykazano, że metylacja DNA odgrywa kluczową rolę w transgeneracyjnym dziedziczeniu epigenetycznym. Wzorce modyfikacji mogą być przekazywane zarówno poprzez mitozę, jak i mejozę. Jednak ze względu na wiele niewiadomych, konieczne są dalsze badania w zakresie zasad dziedziczności zmian epigenetycznych [1]. Metylacja jest jedną z najczęściej badanych modyfikacji DNA. Najlepiej poznaną metylacją DNA jest 5-metylocytozyna (5mC), natomiast informacje na temat pozostałych modyfikacji takich jak: 4-metylocytozyna (4mC) i 6-metyloadenina (6mA) są bardzo ograniczone [2]). Metylacja adeniny występuje powszechnie u organizmów prokariotycznych, uczestnicząc np. u *Escherichia coli* w kontroli replikacji DNA, segregacji nukleoidów, naprawie niedopasowań czy regulacji transkrypcji. Niedawne badania potwierdziły jej obecność również u wielu eukariontów [2]. Jednak występowanie tej modyfikacji na poziomie podobnym do uszkodzeń zasad DNA budzi znaczne wątpliwości co do jej funkcjonalnego znaczenia. Dotychczasowe badania sugerują potencjalną rolę 6mA w wielu procesach. U roślin wykazano między innymi wpływ na ekspresję genów, rozwój osobniczy, cykl komórkowy, fotosyntezę oraz reakcję na stres środowiskowy [2,3]. Choć zarówno występowanie, jak i potencjalna rola 6mA wciąż jest kontrowersyjna.

mgr Klaudia Bernacka,
dr hab. Magdalena Achrem✉,
dr Anna Kalinka

Instytut Biologii, Uniwersytet Szczeciński

https://doi.org/10.18388/pb.2021_514

✉autor korespondujący: magdalena.achrem@usz.edu.pl

Słowa kluczowe: mechanizmy epigenetyczne, 6mA, 5mC, PTM, epibreeding

Wykaz stosowanych skrótów: DAM (ang. *DNA adenine methyltransferase*) – adeninowa metylotransferaza DNA; Dnmts (ang. *DNA methyltransferases*) – metylotransferazy DNA; HMT (ang. *histone methyltransferase*) – metylotransferaza histonowa; 5mC (ang. *5-methylcytosine*) – 5-metylocytozyna; 6mA (ang. *6-methyladenine*) – 6-metyloadenina; PTM (ang. *post-translational modification*) – potranslacyjne modyfikacje histonów; RdDM (ang. *RNA-directed DNA methylation*) – metylacja DNA zależna od RNA; RITS (ang. *RNA-induced transcriptional silencing*) – kompleks wyciszania transkrypcji indukowanego przez RNA; SAM (ang. *S-Adenosylmethionine*) – S-Adenozylo-metionina; sncRNA (ang. *small non-coding RNA*) – małe niekodujące RNA

Epibreeding roślin, czyli wykorzystanie zmienności epigenetycznej do rozwoju upraw, może mieć duże zastosowanie w agronomii. Zmienność epigenetyczna wpływa na plastyczność fenotypową roślin czyli zdolność genotypu/epigenotypu do tworzenia różnych fenotypów w zależności od warunków środowiskowych. Może obejmować zarówno zmiany morfologiczne, jak i fizjologiczne, które mogą zwiększać wydajność cechy o dużym znaczeniu agronomicznym. Epigenetyczne warianty o znaczeniu agronomicznym zidentyfikowano u wielu gatunków roślin uprawnych np. uzyskano rzepak o zmniejszonej zawartości tłuszczów, soję, dającą zwiększony plon czy karłowate fenotypy ryżu. Poprzez wpływ na epigenom można będzie w przyszłości zwiększyć tolerancję i zdolności adaptacyjne roślin i upraw [4].

EPIGENETYCZNA REGULACJA GENÓW

MECHANIZMY EPIGENETYCZNE

W jądrze komórkowym organizmu eukariotycznego cząsteczka DNA wymaga ścisłego upakowania, aby zmieścić się w jego ograniczonym obszarze. Upakowanie kwasu deoksyrybonukleinowego jest możliwe dzięki strukturze chromatyny, której podstawową jednostką jest nukleosom. Upakowane w chromatynie DNA musi być dostępne dla przebiegu procesów takich jak transkrypcja, replikacja oraz naprawa DNA, co jest możliwe dzięki dynamicznej naturze chromatyny. Czynniki powodujące modyfikację struktury i składu chromatyny mogą regulować procesy dotyczące DNA [5]. Modyfikacje opierające się na zmianie struktury chromatyny nie mają wpływu na sekwencję DNA, a mechanizmy je regulujące określa się jako mechanizmy epigenetyczne. W modulację struktury chromatyny zaangażowane są potranslacyjne modyfikacje histonów (PTM, takie jak acetylacja, metylacja, fosforylacja, ubikwitynacja, sumoilaacja czy rybozylacja), małe cząsteczki RNA (sncRNA) oraz metylacja DNA. Wśród mechanizmów epigenetycznych wpływających na strukturę chromatyny należy również wymienić remodelowanie chromatyny, w którym biorą udział głównie ATP-zależne kompleksy przebudowujące.

Ponadto, w regulacji epigenetycznej wykazuje się również istotne znaczenie występowania różnych wariantów histonów [5].

Modyfikacje potranslacyjne histonów

Modyfikacje potranslacyjne histonów, podobnie jak metylacja cytozyny w DNA, odpowiadają za regulację struktury chromatyny oraz regulację procesu transkrypcji (Tabela 1). Nanoszenie i usuwanie wzoru specyficznych modyfikacji potranslacyjnych w histonach odbywa się poprzez działanie odpowiednich enzymów [6].

Modyfikacje potranslacyjne histonów regulują wiele procesów takich jak transkrypcja, naprawa DNA, kondensacja i dekontensacja chromatyny podczas podziałów komórkowych, a także apoptoza. Należy tu podkreślić, że regulacja różnych procesów wynika z nałożenia różnych modyfikacji na różne aminokwasy histonów znajdujących się w określonym obszarze chromatyny. Zatem konkretny efekt wynika z nałożenia skomplikowanego wzorca modyfikacji potranslacyjnych. Stosuje się zapis tzw. „kodu histonowego”, który określa występowanie danej modyfikacji na danym histonie w danej reszcie aminokwasowej w powiązaniu z określonym procesem [7].

Zasugerowano dwa modele, mające na celu wyjaśnić nakładanie różnych modyfikacji na dany histon. Pierwszy z nich wskazuje, że przykładowo fosforylacja oraz acetylacja danego histonu rdzeniowego są procesami powiązаныmi jedynie przestrzenią, więc powstają i działają niezależnie. Zgodnie z modelem alternatywnym, zjawisko to ma się wiązać z synergicznie sprzężoną rekrutacją kinaz i acetylotransferaz histonowych. Szerzej informacje na temat funkcji PTM przedstawiono w artykule przeglądowym [6].

Mechanizm RNAi

Cząsteczki krótkiego niekodującego RNA (sncRNA) pełnią ważną rolę w regulacji genomu. Wśród tej frakcji krótkich RNA sklasyfikowano trzy główne klasy: krótkie

Tabela 1. Modyfikacje potranslacyjne histonów (na podstawie [7,10]).

Modyfikacja	Enzymy katalizujące modyfikacje	Modyfikowane histony	Rola	Enzymy usuwające modyfikacje
Acetylacja	acetylotransferazy histonowe – HAT	H3, H4	aktywacja transkrypcji, wyciszanie telomerów, naprawa DNA, składanie chromatyny	deacetylazy histonowe – HDAC
Metylacja	metylotransferazy histonowe – HMT	H2B, H3, H4	aktywacja, elongacja i represja transkrypcji	demetylazy histonowe – HDM
Fosforylacja	kinazy białkowe	H1, H3, H4, H2A/B	aktywacja i represja transkrypcji, mitoz, apoptoza, naprawa DNA	fosfatazy
Ubikwitynacja	odpowiedzialne za aktywację (E2), sprzężanie (E2) i przyłączanie (E3) ubikwityny	H2A, H2B	aktywacja transkrypcji, mejoza	enzymy deubikwitynujące – DUB/USP
SUMO-ilaacja	odpowiedzialne za aktywację (E2), sprzężanie (E2) i przyłączanie (E3) cząsteczki SUMO	H4, H2A, H3	represja transkrypcji	proteazy SUMO-specyficzne – SENP
ADP-rybozylacja	poli(ADP-rybozy) – PARP, transferazy mono-(ADP-rybozy)	H1, H2A, H2B	aktywacja transkrypcji	ADP-rybozyhydrolazy – ARH; glikohydrolazy – PAR (PARG)

interferujące RNA (siRNA), mikroRNA (miRNA) oraz RNA oddziałujące z PIWI (piRNA). miRNA jest to jednoniciowa cząsteczka kwasu rybonukleinowego o długości około 18-25 nt. Biogeneza miRNA u roślin rozpoczyna się od ekspresji genów MIR, zlokalizowanych w regionach międzygenowych. Geny te ulegają transkrypcji katalizowanej przez polimerazę RNA II do pri-miRNA. Pierwotne miRNA jest cięte przez RNazy DCL1 (ang. *Dicer-like 1*) w koordynacji z białkiem HYL1 (ang. *Hyponastic Leaves 1*). W wyniku aktywności nukleazy dochodzi do uwolnienia dupletu miRNA/miRNA*. Duplet jest podatny na degradację, przed którą chroni ją HEN1 (ang. *Hua-Enhancer 1*), należący do grupy wzmacniaczy HUA. W dalszym etapie duplety są transportowane do cytoplazmy przez HST (ang. *Hasty*). Finalnie nić miRNA dupletu jest selektywnie dołączana do białek efektorowych kompleksu wyciszania indukowanego RNA (RISC), który kontroluje potranskrypcyjną regulację genu. Głównym składnikiem RISC jest białko AGO (ang. *Argonaute*) wiążące miRNA. Efektem aktywności RISC może być represja translacji lub przecięcie docelowego matrycowego RNA. Wynik regulacji jest zależny od stopnia komplementarności między mikro- i matrycowym RNA dochodzi do przecięcia mRNA, jeśli częściowa – do zablokowania translacji (więcej na ten temat w artykule [8]).

Jednak regulacja na poziomie potranskrypcyjnym to nie jedyna funkcja sncRNA. Działanie i rola sncRNA jest również ściśle związana z regulacją epigenetyczną genomu. Poprzez współdziałanie z kompleksami białkowymi, w tym RITS (wpływa na znaczniki epigenetyczne chromatyny). Warto tu zaznaczyć istotność szlaku RdDM. RITS związany z miRNA/siRNA rekrutuje DRM2 (metylotransferazę 2), w celu zainicjowania metylacji *de novo* DNA przeprowadzanej przez MET1 (metylotransferaza DNA 1). Metylotransferaza 1 metyluje specyficzne motywy CG i CHG [9]. W szlak RdDM zaangażowane są Pol III, Pol IV i Pol V (Pol-poli-meraza RNA). Przy czym Pol III odpowiada za rekrutację Pol IV i Pol V. Pol IV generuje ssRNA i wiąże się z czynnikiem CLSY1 (ang. *SNF2-like chromatin-remodeling factor 1*) remodelującym chromatynę oraz SHH1 (ang. *Savadee Home-domain Homolog 1*), który w połączeniu z DTF1 (ang. *DNA transcription factor 1*) wykrywa metylację H3K9me2. Wykazano, że mutacje w genach kodujących białka Pol IV mogą powodować obniżenie poziomu siRNA oraz mogą prowadzić do globalnego spadku metylacji DNA. Szlak polega na kaskadowych procesach rekrutacji kolejnych białek, czego celem jest finalnie powstawanie zmetylowanych dupletów sncRNA, które następnie są transportowane do kompleksu RITS [9]. Zatem Komplex RITS pośredniczy w indukcji przekształcenia określonych regionów chromatyny do heterochromatyny.

Metylacja DNA

Metylacja cytozyny w DNA

Metylacja DNA jest katalizowana przez rodzinę Dnmts, które przenoszą grupę metylową z SAM do pozycji C5 reszty cytozyny (u roślin w kontekstach symetrycznych CG, CHG i niesymetrycznej CHH; H oznacza A, C lub T), co powoduje powstanie 5-metylocytozyny (5mC). Modyfikacja zachodzi przede wszystkim w regionach hetero-

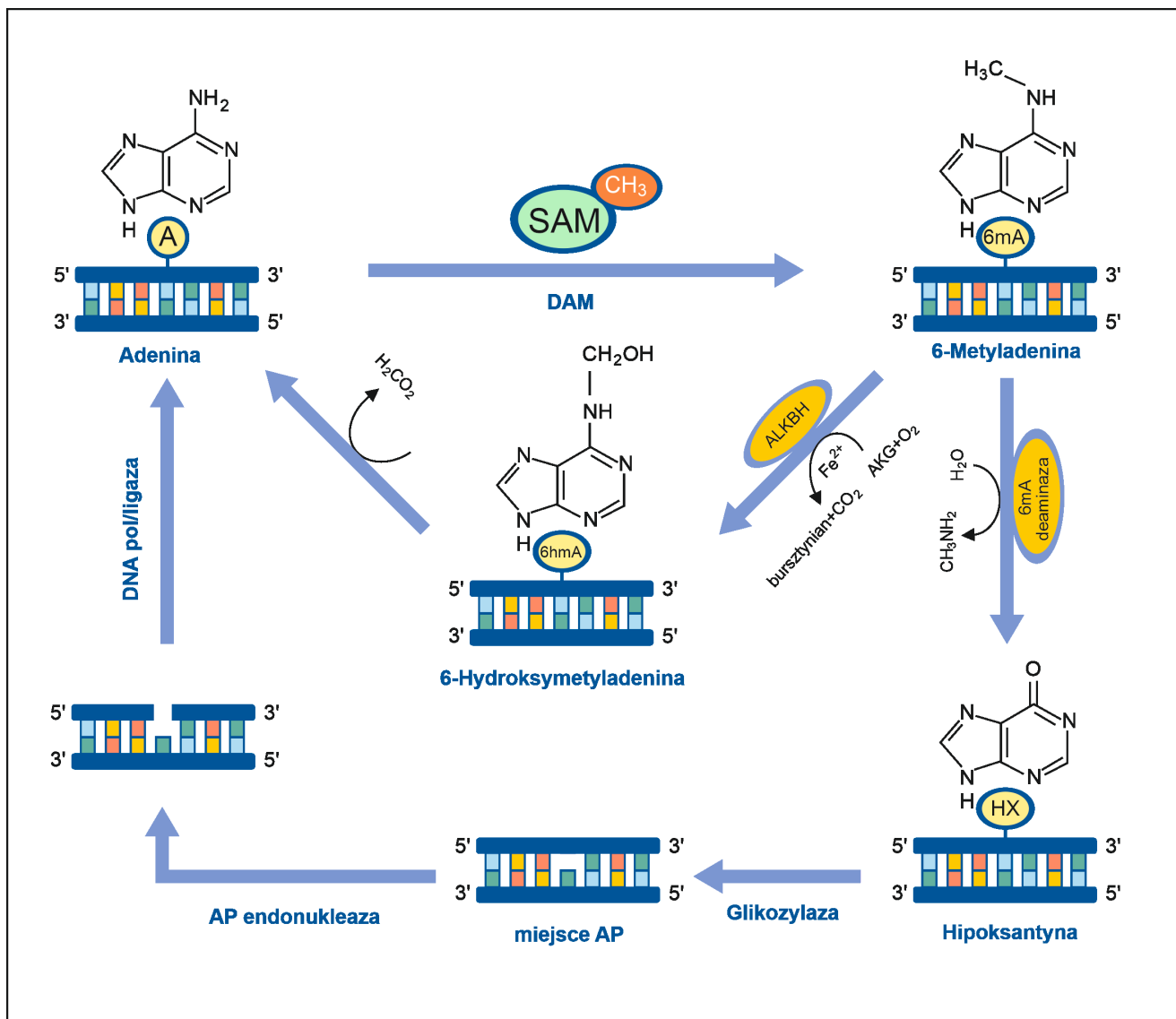
chromatynowych, bogatych w sekwencje repetytywne oraz genetyczne elementy ruchome. Wyróżnia się dwa główne rodzaje metylacji DNA: *de novo*, ukierunkowaną na niezmetylowane DNA oraz zachowawczą, która umożliwia kopiowanie istniejących już wzorców metylacji z nici matrycowej na potomną podczas replikacji [10]. Poprzez metylację *de novo* oraz aktywną demetylację wzorzec metylacji w ciągu rozwoju osobniczego ulega ciągłym zmianom. W procesie metylacji *de novo* czynny udział biorą dwie metylotransferazy DNA: Dnmt3a oraz Dnmt3b, natomiast w metylacji zachowawczej bierze udział Dnmt1. W konsekwencji działania enzymów Dnmt występuje określony wzór metylacji DNA, w pewnym stopniu modyfikowalny, który reguluje transkrypcję genów specyficzną dla tkanki. Metylacja DNA wiąże się głównie z wyciszaniem ekspresji sekwencji DNA, przy czym metylacja w sposób pośredni reguluje ekspresję genów poprzez rekrutację białek, biorących udział w represji genów lub/i hamowanie wiązania czynników transkrypcyjnych z DNA. Metylacja DNA doprowadza do wyciszenia elementów ruchomych, ale także bierze udział w regulacji ekspresji genów specyficzno-tkankowych oraz imprintingu. Mechanizm ten reguluje różnicowanie komórek oraz stabilność genomu pod wpływem stresu (a) biotycznego [10] (szerzej rolę 5-metylocytozyny i metody jej detekcji opisano w artykule przeglądowym [11]).

Wśród rzadkich modyfikacji epigenetycznych wyróżniamy intermediały powstające podczas aktywnej demetylacji 5mC. U ssaków 5-metylocytozyna może być hydroksylowana przez enzymy TET do 5hmC (5-hydroksymetylocytozyny) lub dalej utleniana do 5fC (5-formylocytozyny) i 5caC (5-karboksylocytozyny). 5mC oraz 5hmC mogą być deaminowane przez AID/APOBEC (deaminaza cytozyny) odpowiednio do 5mU (5-metyluracyl) i 5hmU (5-hydroksymetyluracyl). Glikozylazy TDG (glikozylaza tyminy) oraz SMUG1 (ang. *Single-strand-selective Monofunctional Uracil-DNA*) prowadzą ostatecznie do wstawienia cytozyny. Natomiast w proces demetylacji DNA u roślin nie są zaangażowane enzymy TET, zarówno obecność jak i rola intermediałów demetylacji 5mC u tych organizmów pozostaje kontrowersyjna (więcej na temat demetylacji u roślin w Active DNA demethylation in plants - [1])

Metylacja i demetylacja adeniny w DNA

Prócz metylacji cytozyny znana jest również metylacja reszty adeniny w DNA (N6-metyloadenina), która jest dobrze scharakteryzowaną modyfikacją u organizmów prokariotycznych. W ostatnim czasie odkryto ją również u organizmów eukariotycznych [2]. Jednak ze względu na to, że jest to jedno z najnowszych odkryć biologii molekularnej, zakres wiedzy o występowaniu i roli tej modyfikacji jest bardzo ograniczony. N6-metyloadenina jest odwracalną modyfikacją, polegającą na metylacji adeniny w azocie na pozycji 6.

DAM katalizuje metylację adeniny w obecności SAM (Ryc. 1). Metylacja obejmuje pierwszą resztę adeninową w obrębie sekwencji palindromowych (GATC) w substratach jedno- (ss) i dwuniciowych (ds) DNA. Najlepiej scharakteryzowaną domeną DAMT-1 jest MTA70 (Podjednostka 70 kDa metylotransferazy N6-adenozyny). Stwierdzono również, że metylotransferaza 4 (METTL4), pierwotnie uznana



Rycina 1. Schemat metylacji i demetylacji adeniny w DNA. A - adenina; SAM - S-Adenylo-metionina; 6mA - 6-metyloadenina; DAM - adeninowa metylotransferaza DNA; AP - miejsce apurynowe/apirymidynowe; ALKBH1 - enzym przeprowadzający demetylację 6mA poprzez oksydacyjną dealkilację N-metylowanych nukleotydów do 6-hydroksymetyladeniny (6hmA); NX - hipoksantyna; DNA pol - polimeraza DNA

za enzym modyfikacji m6A w RNA, może funkcjonować jako metylotransferaza DNA 6mA. Znany jest również enzym N6-metylotransferaza adeninowa (Wadmtaza, DAM), jednak aktywność tej metylotransferazy u roślin wyższych nie jest jeszcze w pełni scharakteryzowana. Niemniej jednak, udało się wyizolować z pszenicy Mg^{2+}/Ca^{2+} -zależne DAM. Wykazano również, że Wadmtaza rozpoznaje sekwencje heksanukleotydowe (TGATCA), ale nie sekwencje tetranukleotydowe (GATC). Metylacja w sekwencji TGATCA preferencyjnie zachodzi w ssDNA, natomiast w sekwencji GATC preferencyjnie zachodzi w dsDNA [12]. Wyróżnia się czynniki, biorące czynny udział w procesie odkładania się N6-metyloadeniny, wśród których zalicza się: czynnik splicingowy FIP37 (białko oddziałujące z FKBP12, o masie 37 kDa), białko VIR, HAKAI (ang. *E3 ubiquitin-protein ligase Hakaï*), ZC3H13 (ang. *Zinc Finger CCCH Domain-Containing Protein 13*), białka wiążące RNA (FPA) [13].

Proces demetylacji 6mA katalizowany jest przez białka z rodziny ALKB (białko naprawy alkilowanego DNA; homo-

log u ryżu - OsALKBH1), poprzez oksydacyjną dealkilację N-metylowanych nukleotydów do HO-6mA (hydroksymetyladeniny) [3]. Do tej rodziny należy między innymi demetylaza N6-metyloadeninowa 1 (NMAD-1), której funkcje potwierdza odwrotnie proporcjonalny stosunek poziomu 6mA do enzymu. Istnieje również alternatywny mechanizm demetylacji, który polega na przekształceniu N-6-metyloadeniny w adeninę przez deaminazę 6mA. Deaminaza przekształca 6mA do hipoksantyny, która następnie ulega odłączeniu przez glikozylazę. Wytworzone w ten sposób miejsce apurynowe zostaje naprawione enzymy endonukleazy AP, polimerazy DNA oraz ligazy DNA [2].

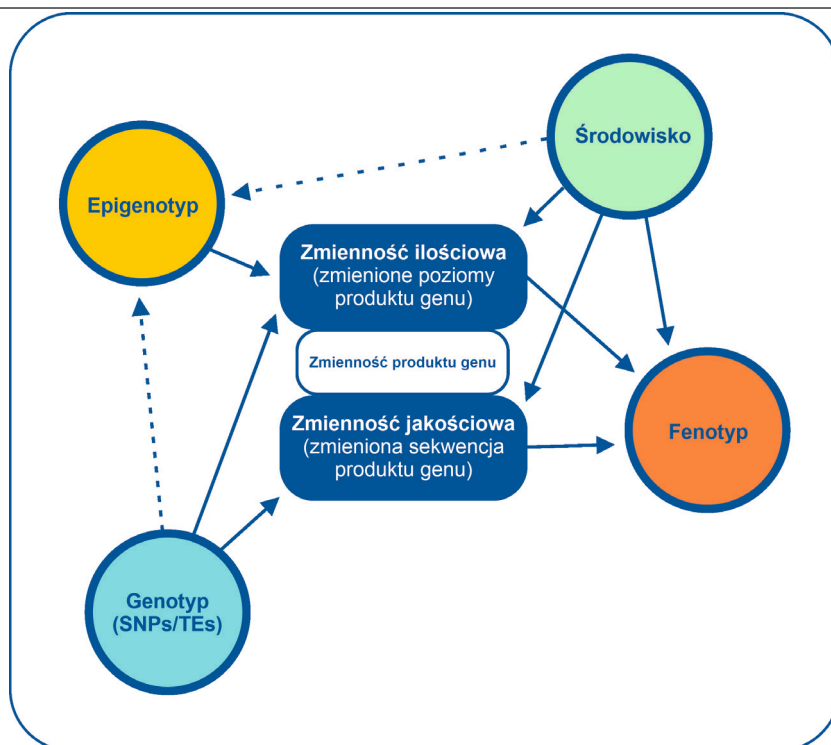
Wykazano, że 6mA wpływa na ekspresję genów u różnych gatunków roślin [14]. Stwierdzono, że poziom 6mA u organizmów eukariotycznych (0,000006-0,8%) jest znacznie niższy niż u prokariotów (0,002-2,7%) [15]. Co ciekawe, u roślin zaobserwowano wyższy poziom 6mA w mtDNA oraz chlDNA niż w jądrowym DNA [16]. U glonów z gatunku *Chlamydomonas reinhardtii* wykazano, że 84% wszystkich

genów jest naznaczone metylacją 6mA [17]. U *Arabidopsis thaliana* wykryto natomiast, że 80% globalnego poziomu modyfikacji w genomie zlokalizowana jest w eksonach [18]. U ryżu oraz alg, 6mA zlokalizowano w prawie 25% genach kodujących białka, 36% genów związanych z elementami ruchomymi oraz 14% elementach ruchomych [3]. Regiony heterochromatynowe wzbogacone w histony H2A.X okazały się dodatkowo skorelowane z obecnością modyfikacji 6mA [15]. N6-metyloadenina lokalizowana była głównie na wyspach ApT (obszary genomu o podwyższonej zawartości adeniny i tyminy) w pobliżu startu transkrypcji. Stwierdzono, również, że modyfikacja 6mA występuje w DNA łącznikowym pomiędzy nukleosomami [2]. Wykazano silne wzbogacenie 6mA w regionach pobliżu kodonów STOP oraz w genach – w regionach nieulegających translacji 3'. Zaobserwowano również niską częstotliwość występowania tej modyfikacji w pobliżu kodonu START [19].

Aktywność regulacyjna 6mA u roślin ma znaczenie w adaptacji tempa wzrostu w różnych organach do zmieniających warunków środowiskowych, w tym: wzorcach rozgałęzienia korzeni i łodyg, kształcie i rozmiarze liści oraz liczbie kwiatów. Prawdopodobna rola 6mA sprowadza się do regulacji transkrypcji przez modyfikację struktury chromatyny. Modyfikacje 6mA wykazują wyraźną tendencję gromadzenia się w TSS i wydają się być one skorelowane ze zwiększoną ekspresją genów. W niektórych roślinach modelowych 6mA działa jako komplementarny regulator epigenetyczny do 5mC, jednak w niektórych przypadkach, tak jak u grzybów oraz ryżu zaobserwowano ujemną zależność między tymi modyfikacjami [20]. Ostatnie badania, sugerują, że 6mA może pośredniczyć w ekspresji genów w odpowiedzi na bodźce. Analiza modyfikacji 6mA u ryżu wykazała również pozytywny związek między poziomem metylacji adeniny, a tolerancją na stres (a) biotyczny [3,20].

Lata rozwoju agrobiotechnologii doprowadziły do erozji różnorodności genetycznej roślin, jednak nie wpłynęło to negatywnie na różnorodność epigenetyczną, która okazała się znaczącym źródłem zmienności fenotypowej, mającej na celu poprawę jakości uprawy na wielu płaszczynach (Ryc. 2).

Poznanie genomów roślinnych przyczyniło się do wprowadzenia narzędzi takich jak badania asocjacyjne całego genomu (GWAS), które umożliwiło uchwycenie istotnej części dziedzicznej zmienności fenotypowej opartej na sekwencji genetycznej [21]. Znaczące jest jednak opracowanie nowych metod poszerzania wiedzy na temat źródła dziedzicznych zmienności fenotypowych, w celu uzupełnienia informacji o „brakującej odziedziczalności”. W obliczu globalnych zmian klimatycznych zwiększają się ograniczenia środowiskowe i wymagane jest by dostosować do nich roślinność uprawną. Wiele modyfikacji epigenetycznych charakterystycznych dla rozwoju osobniczego, które są stabilnie przekazywane podczas mitozy zazwyczaj nie jest przekazywane z pokolenia na pokolenie. Jednak jak wykazano, odpowiednie operowanie epigenetycznymi sieciami regulacyjnymi może usprawnić strategie hodowlane dla określonych cech agronomicznych [22]. Dlatego tak istotne jest zrozumienie integracji epigenetyki i doskonalenia upraw oraz zasad dziedziczności zmian epigenetycznych. Jeśli warianty są dziedziczne i wykazują predyspozycje do dziedziczenia zgodnie z prawami Mendla, to mogą być one powiązane z polimorfizmami pojedynczego nukleotydu (SNP) i zostać wychwycone, a także utrwalone zgodnie z strategiami opartymi na SNP. Jeśli jednak są one wrażliwe na zmiany środowiskowe i wykazują mniejszą stabilność niż warianty genetyczne, a wzorce dziedziczenia są niespecyficzne to nie



Rycina 2. Schemat synergicznego działania czynników zaangażowanych w kształtowanie się fenotypu.

mogą być one badane za pomocą narzędzi analitycznych. Utrudnienie w postaci braku stabilnego dziedziczenia może spowodować utratę zdolności przewidywania fenotypów w pokoleniach potomnych i zmniejszyć ich jednorodność. W fenotypie ujawnia się synergiczne działanie mechanizmów epigenetycznych [23].

Dynamiczne zmiany aktywacji i wyciszania genów, spowodowane interakcją między mechanizmami są wymagane do prawidłowego funkcjonowania komórek w różnicowanych warunkach środowiska, na wszystkich etapach rozwoju. Aby określone warianty epigenetyczne (epiallele) miały znaczenie w transmisji cech z pokolenia na pokolenie, muszą być stabilne i dziedziczne [24]. Co ważne, należy również przewidzieć wpływ konkretnych zmian epigenetycznych na fenotyp roślin.

Wydaje się, że najważniejszą rolę w transgeneracyjnym dziedziczeniu epigenetycznym odgrywa metylacja DNA, jednak w tym względzie istnieje wiele niewiadomych. Jeśli chodzi o przekazywanie wzorców metylacji DNA podczas podziałów komórek somatycznych jest to stosunkowo dobrze poznany proces. Znane są metylotransferazy zaangażowane w proces metylacji zachowawczej. Stwierdzono, że enzymy te są konieczne do utrwalenia wzorów metylacji DNA w całym cyklu życiowym rośliny, a utrata czy też zmniejszenie poziomu metylacji wskutek mutacji wyżej wspomnianych metylotransferaz, prowadzi do nieodwracalnej zmiany, która jest przekazywana potomkom przez wiele pokoleń. W wariantach kontekstowych CHG i CHH enzymami odpowiedzialnymi za metylację są DRM1/DRM2 oraz CMT3 (chromometylaza 3). Metylacja motywów CHG zależy od z metylacji H3K9me (metylacja lizyny 9 histonu H3) oraz H3K27me (metylacja lizyny 27 histonu 3). Oznacza to, że przekazanie wzoru metylacji DNA motywu CHG podczas replikacji, może, ale nie musi być zależne od istniejącego wcześniej wzoru metylacji CHG. Natomiast zachowanie metylacji CHH podczas replikacji (przez wykorzystanie semikonserwatywności tego procesu) jest teoretycznie nieosiągalne, ponieważ nowo zsyntetyzowana nić DNA posiada guaninę w pozycji komplementarnej do asymetrycznej cytozyny, więc co druga runda replikacji, będzie powodowała utratę pierwotnej metylacji przy danej cytozynie. To z kolei sugeruje, że aby metylacja CHH była zachowana, musi dochodzić do ciągłej aktywności metylacji typu *de novo*. W proces metylacji w tym przypadku konieczne jest wyznaczenie miejsc metylacji przez inne znaczniki epigenetyczne, takie jak dodatkowa metylacja w innych kontekstach sekwencyjnych, potranslacyjne modyfikacje histonów lub cząsteczki małego RNA. Metylotransferazy (DRM1/DRM2) zaangażowane w szlak RdDM, przeprowadzają metylację DNA *de novo* we wszystkich kontekstach cytozyny [25].

Nieco mniej wiadomo o dziedziczeniu mejotycznym wzorców metylacji. U zwierząt powszechnie w pierwotnych komórkach zarodkowych oraz na etapie wczesnego zarodka dochodzi do globalnej demetylacji. U roślin wykazano natomiast występowanie podobnego zjawiska, polegającego na demetylacji całego genomu zarówno w gametoficie żeńskim, jak i męskim na różnych etapach rozwoju osobniczego. Potwierdzono obecność takiego zjawiska na

etapie rozmnażania, rozwoju i kiełkowania nasion, a także dojrzewania owoców. Kluczowe znaczenie ma działanie glikozylaz DNA – DME (ang. *Demeter*; u ryżu ROS1; ang. *Repressor of silencing 1*), u pomidora SIDML2 (ang. *Solanum lycopersicum Demeter like 2*) i u kukurydzy DML2/3 (ang. *Demeter like 2 i 3*), których celem jest usunięcie metylowanych cytozyn. Metylacja DNA roślin jest ukierunkowana na TE oraz inne sekwencje repetytywne. Podstawową funkcją demetylacji DNA u roślin jest utrzymanie stabilności genomu poprzez przeciwdziałanie RdDM, w rezultacie czego metylacja nie rozprzestrzenia się na sąsiednie geny. Jednak w dalszym ciągu niepełnie wiadomo w jaki sposób dochodzi do przekazywania wzorców z pokolenia na pokolenie [1]. Jednak wiadomo, że dziedziczenie takie ma miejsce. Jak wykazano, może istnieć także zależność przekazywania specyficznych wzorów metylacji zależnie od linii komórek płciowych męskich lub żeńskich. Przykładowo, predyspozycję dziedziczenia zależnego od matki zidentyfikowano w badaniu modyfikacji sekwencji zlokalizowanych w pobliżu genów odpowiedzi na stres [26].

W trakcie gametogenezy dochodzi do piętnowania genomowego podczas epigenetycznego reprogramowania genomu. Podczas gametogenezy, podczas różnicowania się komórek macierzystych megaspor (KMM) obserwuje się wzrost aktywności szlaku RdDM oraz metylacji prowadzonej przez CMT3 przy jednoczesnym obniżeniu acetylacji (H3K9ac), co wskazuje na wyciszanie chromatyny. Ponadto, w komórkach macierzystych mikospor (KMMi) obserwowany jest wysoki poziom metylacji DNA w kontekście CG i CHG oraz niski w kontekście CHH [27]. Wykazano, że w trakcie gametogenezy żeńskiej oraz męskiej aktywność MET1 (metylotransferaza 1) jest konieczna do przekazania wzoru metylacji DNA podczas podziału komórek. Ekspresja piętnowanego genu (inaczej imprinting) ograniczona jest do allelu matczynego albo allelu ojcowskiego. Proces piętnowania genomowego oparty jest na szlaku demetylacji DNA z udziałem glikozylazy DME, skutkiem czego dochodzi do ekspresji genu na chromosomie pochodzącym od jednego z rodziców [27].

Chociaż modyfikacje histonów odgrywają znaczącą rolę w regulacji ekspresji genów, mechanizm przekazywania kodu histonowego przez mitozę oraz mejozę nie jest w pełni poznany, a nie wszystkie z modyfikacji są klasyfikowane jako dziedziczne. Najbardziej prawdopodobne jest, że metylacja lizyny, szczególnie w histonie H3 (H3K9me/H3K36me/H3K27me/H3K4me3) oraz ubikwitynacja histonu H2B (H2Bub1) są stabilnie utrzymywane [28]. Sugeruje się, że metylacja DNA w kontekście CG rekrutuje metylazy histonowe, które następnie doprowadzają do modyfikacji w heterochromatynowych loci. Z kolei jak wcześniej wspomniano metylacja H3K9 jest bezpośrednio związana z działaniem CMT3, w ten sposób tworząc samowzmacniającą się pętlę metylacji lizyny oraz metylacji DNA. Podczas badań, zaobserwowano segregację macierzystych białek histonowych na nowo replikowanych odcinkach DNA, w związku z czym rozwinęły się dwa modele wstawiania histonów. W modelu „konserwatywnym” podczas fazy S oktamerów histonów ulegają losowej segregacji do potomnych nici, a nowo syntetyzowane oktamerów uzupełniają luki. Model ten zakłada, że podczas kolejnych rund replikacji, modyfika-

Tabela 2. Wpływ wybranych regulatorów epigenetycznych na rośliny uprawne.

Regulatory		Efekt działania	Roślina	Referencje
H3K4me3, H3K436, H2Bub1, białka Trithorax	↑	regulacja aktywności genu FLC (ang. <i>Flowering Locus C</i>) → kwitnienie, owocowanie	rośliny ozime ryż pomidor	[28]
H3K27me3 białka PcG	↓			
H3K27me3, białka PcG	↑	regulacja aktywności genu FLC → wernalizacja	rośliny ozime ryż pomidor	[28]
H3K436, H3K4me3, H2Bub1, białka Trithorax	↓			
demetylacja DNA	↑	przeprogramowanie epigenomów w reakcji na stresy abiotyczne i biotyczne – w celu adaptacji do warunków środowiska	kukurydza (korzenie) ryż pomidor jabłoń	[31-34]
metylacja DNA	↓			
HATs, HDACs, białka z grupy PcG i Trithorax				
DME		rozwój zarodka i bielma; tolerancja na suszę.	jęczmień	[35,36]
ROS1		rozwój nasion	ryż	[37]
SIDML2		dojrzewanie owoców	pomidor	[38]
metylacja DNA	↑	jakość smaku dojrzałych owoców	pomidor	[39]
metylacja DNA	↑	akumulacja likopenu → czerwona barwa owoców;	pomidor	[38]
DME	↓	akumulacja antocyjanów → dojrzewanie owoców	jabłko	[40]
H3K27me2/3	↑	obrona przed patogenem	ryż	[41]
demetylacja DNA	↓			

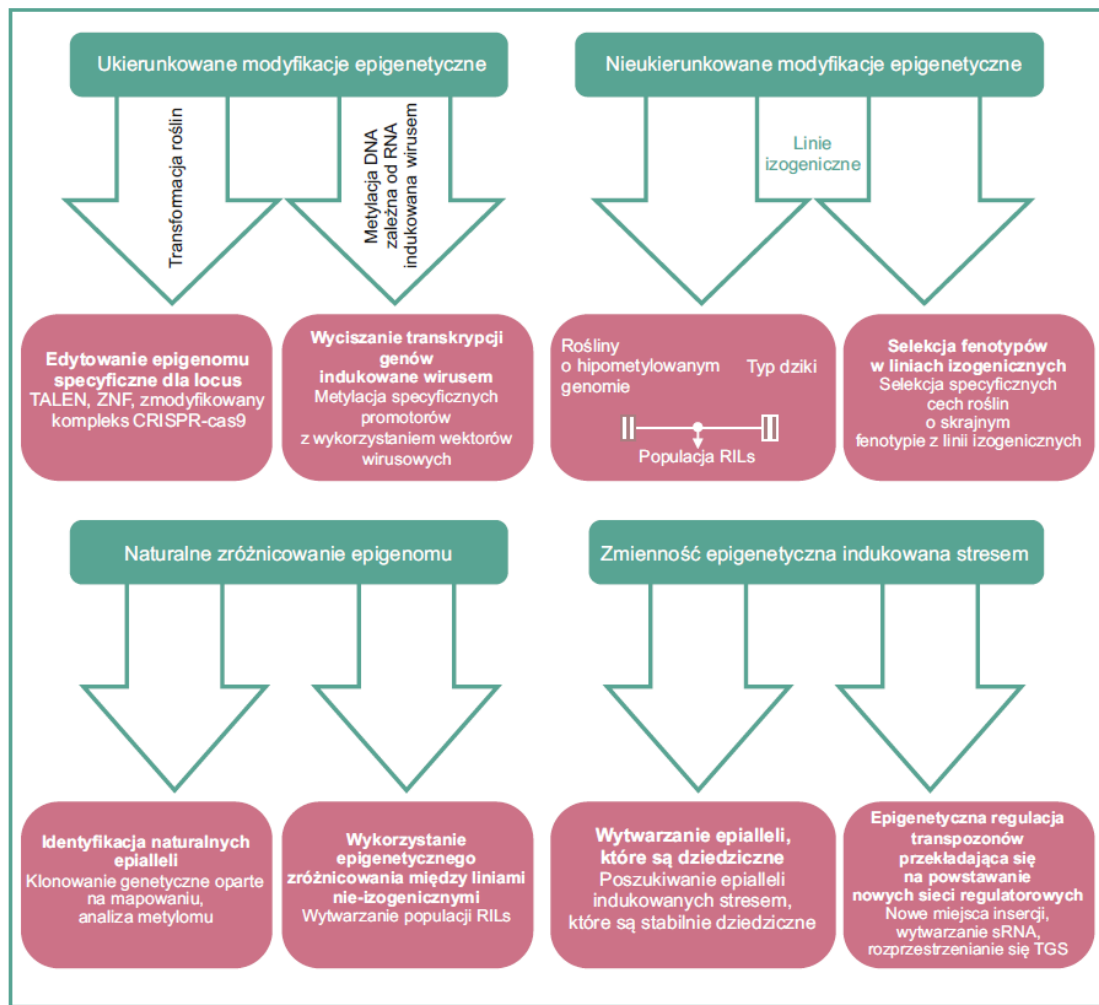
cje epigenetyczne histonów w danym obszarze chromaty-ny występowałyby w coraz mniejszej ilości, oznacza to, że aby zostały one stabilnie przekazywane, modyfikacje histonów na odziedziczonych nukleosomach muszą promować podobne modyfikacje na sąsiednich nukleosomach. Drugi model opiera się na „semikonserwatywności” wstawiania nukleosomów, w którym to tetramer (H3/H4)₂ mógłby zostać podzielony na dwa dimery. Dimer ten następnie stałby się matrycą do ponownego złożenia nowego nukleosomu z nowo zsyntetyzowanym dimerem H3/H4. Taki mechanizm umożliwiłby stabilne przekazywanie oraz promowanie modyfikacji histonowych podczas replikacji DNA. Na potwierdzenie tego modelu, wykazano, że warianty histonu H3-H3.1 oraz H3.3 tworzą dimer razem z histonem H4 w kompleksach wstawiających nukleosomy. Ponadto wykazano również, że histonowy chaperon CIA/ASF1 (ang. *CCG1 interacting factor A/anti-silencing function 1*) ma zdolność do rozszczepienia tetramery (H3/H4)₂ [29]. Wariant histonu H3.3 w przeciwieństwie do histonu H3, może być deponowany na aktywnie transkrybowane loci niezależnie od replikacji przez cały cykl komórkowy i może pośredniczyć w utrzymaniu się aktywnego stanu genu podczas podziałów komórkowych. Zaobserwowano, że „epigenetyczna pamięć” aktywnego stanu genu, zostaje zachowana niezależnie od nowych linii komórkowych, nawet po 24 mitotycznych podziałów komórkowych. Ponadto, nadekspresja dzikiego wariantu H3.3, korzystnie wpływała na efektywność przekazywania kodu histonowego [30].

Dziedziczne modyfikacje epigenetyczne pośrednio są zaangażowane w wiele procesów rozwojowych roślin (Tabela 2). Niektóre cechy epigenetyczne wykazują niezwykłą stabilność transgeneracyjną i dziedziczone są zgodnie z prawami Mendla. Inne cechy natomiast wykazują dziedzicze-

nie nie-mendelowskie, ze względu na metastabilną naturę alleli epigenetycznych. Wśród procesów rozwojowych najistotniejsze wydaje się być kwitnienie, gdyż jest to kluczowa zmiana rozwojowa dla sukcesu rozrodczego. W umiarkowanym klimacie do tego procesu konieczny jest okres zimna, zwany wernalizacją. Proces ten po raz pierwszy dał potwierdzenie stabilnej transmisji mechanizmów PTM (modyfikacja potranslacyjna) histonów, co było zaobserwowane jako kilkumiesięczna pamięć epigenetyczna komórek roślinnych, będąca przekazywana podczas mitozy komórek merystematycznych [42].

Z jednej strony, można w hodowli roślin wykorzystywać naturalną zmienność epigenetyczną, związaną z cechami kluczowymi dla upraw. Jednak istnieją również metody indukowania zmian epigenetycznych (Ryc. 3) [22].

Analiza dziedziczenia naturalnie występujących epialleli wymaga opracowania badań epigenomicznych, mających na celu powiązania ich możliwego związku z danymi cechami agronomicznymi. Badania takie są niewątpliwie trudne i pracochłonne, jednak ich wyniki są bardzo cenne. Modelowym przykładem naturalnie występujących epimutantów jest mutacja peloryczna u *Linaria vulgaris*, polegająca na odmiennej symetrii kwiatu. Wykryto, że ta zmiana fenotypowa, spowodowana jest hipermetylacją promotora, w efekcie czego dochodzi do wyciszenia genu, kodującego czynnik transkrypcyjny, istotny w regulacji symetrii kwiatu. Dziedziczność międzypokoleniowa tej epimutacji charakteryzuje się wysoką stabilnością, co potwierdziły badania, sugerujące że cecha może być utrzymywana przez prawie 300 lat [43]. U roślin uprawnych opisano różne epiallele, dające różne skutki fenotypowe (Tabela 3).



Rycina 3. Schemat źródeł epigenetycznego zróżnicowania hodowli roślin.

Tabela 3. Wpływ epialleli na fenotyp roślin użytkowych.

Epiallel	Cechy	Efekt	Roślina	Referencje
Epi-df	metylacja H2K4me3 promotora genu <i>OsFIE</i>	dziedziczna karłowatość	ryż	[44]
Epi-OsSPL14	obniżony poziom metylacji DNA w regionie promotora genu <i>OsSPL14</i>	duża ilość rozgałęzień wiechy i wyższy plon ziarna	ryż	[45]
Epi-cnr	hipermetylacja DNA promotora genu <i>CNR-SBP</i>	zaburzone dojrzewanie owoców	pomidor	[46]
Epi-QTL	metylacja DNA retrotranspozonu SINE (ang. <i>Short interspersed nuclear element</i>)	obniżona zdolność akumulacji witaminy E	pomidor	[47]
Epi-MYB	hipermetylacja DNA promotora <i>MYB10</i>	zmiana koloru skórki owoców	jabłoń, grusza	[40]

Indukowane warianty epigenetyczne dzielimy na ukierunkowane oraz nieukierunkowane. Docelowe zmiany epigenetyczne wymagają znajomości sekwencji. Obejmują one edycję epigenomu, którą z powodzeniem wykorzystuje się przy dodawaniu bądź usuwaniu znaczników epigenetycznych w określonym locus. W tym celu stosuje się nukleazy z motywem palca cynkowego (ZNF), nukleazy podobne do aktywatora transkrypcji (TALEN) oraz odpowiednio zmodyfikowane kompleksy CRISPR-Cas 9 [48]. Alternatywną metodą jest indukcja metylacji DNA wektorem wirusowym (VIGS, virus-induced gene silencing). Takie podejście umożliwia ukierunkowane zmiany metylacji DNA bez konieczności korzystania z systemów transformacji roślin [49]. Z kolei selekcja fenotypów prowadzona w liniach izoge-

nicznych (identycznych/bliźniaczych) pozwala na identyfikację nieukierunkowanej zmienności epigenetycznej [50]. Podjęto wiele prób generowania indukowanych epimutantów. Przykładowo, kielkujące nasiona ryżu poddano iniekcji inhibitorem metylacji DNA, ocalałe rośliny rozmnażano i hodowano. Uzyskane w ten sposób linie potomne wykazywały oporność na patogen bakteryjny *Xanthomas oryzae*. Spowodowane jest to faktem, iż specyficzny gen *Xa21G* został zdemetylowany przez co ulegał silnej ekspresji, przy czym u podatnych roślin gen ten był silnie zmetylowany i wyciszony. Wygenerowana epimutacja utrzymywała się przez dziewięć pokoleń [51]. W podobnym eksperymencie modyfikacji epigenetycznej u rzepaku, stwierdzono zwiększoną zawartość białka oraz kwasu linolowego w nasio-

nach. Poprzez cykliczną selekcję fenotypową izogenicznych linii *Brassica napus* uzyskano stabilne epigenotypy o zwiększonej efektywności metabolicznej [52]. Dzięki uzyskaniu epigenetycznych rekombinowanych linii zróżnicowanych ze względu na metylację DNA (epiRIL) znacznie poszerzyła się wiedza odnośnie powstawania i dziedziczenia epialleli. Tworzenie epiRIL polega na krzyżowaniu hipometylacyjnych mutantów z roślinami typu dzikiego - izogenicznych rodziców z rozbieżnymi metylomami DNA [53]. Badania prowadzono m.in. na epiRIL *A. thaliana*. Wykazano, że epiRIL charakteryzują się nie tylko mozaiką metylomów rodziców, ale także zawierają nowe wzorce metylacji, które są stabilnie dziedziczone przez kilka pokoleń. Podobnie wyniki uzyskano w przypadku soi [54]. Skrzyżowanie linii rodzicielskich o różnych profilach metylacji, spowodowało powstanie regionów DMR (regiony zmetylowane w sposób zróżnicowany), które były przekazywane zgodnie z prawami Mendla przez pokolenia. Opracowanie linii epiRIL u gatunków roślin uprawnych jest trudniejsze niż w przypadku roślin modelowych takich jak *A. thaliana*, ze względu na brak odpowiednich mutantów oraz dużą liczbę transpozono- wów w ich genomach, co powoduje niestabilność.

Wśród stosowanych form indukowania zmian epigenetycznych zalicza się również szczepienie. Pierwotnie szczepienia były wykorzystywane jako forma profilaktyki przed szkodliwymi skutkami patogenów glebowych, poprzez zroszenie się ze sobą poszczególnych części roślin (podkładki - roślina na której wykonywany był zabieg i zrazu - części rośliny, która jest przeznaczona do szczepienia). Obecnie zabieg jest szeroko stosowaną praktyką rolniczą, wykorzystywaną przy uprawie drzew owocowych, winogron oraz warzyw. Odpowiednio przygotowane podkładki zapewniać mogą nie tylko odporność na patogeny, ale także tolerancję na stres oraz zwiększoną jakość i wydajność hodowli. Obserwowane u *A. thaliana*, *Solanaceae* i *Cucurbitaceae*, zmiany epigenetyczne wywołane tą metodą dotyczyły głównie metylacji DNA i ekspresji miRNA oraz były one skorelowane ze zmianami w morfologii i profilu metabolicznym owoców [55,56]. W przypadku roślin z rodziny *Solanaceae* zastosowano szczepienie międzygatunkowe, w następstwie którego wykryto migrację miRNA oraz istotne zmiany w metylacji DNA. Stwierdzono, że globalny wzorzec metylacji u papryki, bakłażana oraz pomidora uległ stabilnej, dziedzicznej zmianie [56]. W przypadku latorośli melona oraz ogórka po heterotransplantacji z użyciem podkładek dyni, zaobserwowano transport siRNA i miRNA przez segmenty szczepienia oraz istotny wzrost poziomu metylacji DNA [55]. Biorąc pod uwagę powyższe dane, można stwierdzić że metody indukowanej zmienności epigenetycznej można z sukcesem wykorzystywać w celu generowania poprawy cech oraz zwiększenia wydajności hodowli roślin uprawnych.

PODSUMOWANIE

Ze względu na fakt, iż epigenetyka przyczynia się do zmienności fenotypowej, zrozumienie mechanizmów epigenetycznych może być kluczowe w wyjaśnieniu sposobów w jakie czynniki środowiskowe wpływają na fenotypy roślin [57]. Wykorzystanie epibreedingu może skutkować szerokim zakresem zmienności fenotypowej już w jednym

pokoleniu, a część z nich może okazać się dziedziczne [58]. Nowe epiallele mogą być wykorzystane szczególnie w hodowli tych roślin, które charakteryzują się niską zmiennością genetyczną. Mechanizmy epigenetyczne, takie jak metylacja DNA, modyfikacja histonów i snRNA, mogą przyczynić się do zwiększenia poziomu zmienności fenotypowej u roślin. Może być ona wykorzystana przez hodowców do uzyskania odmian, które będą odpowiednio dostosowane do zmieniających się warunków środowiska.

PIŚMIENNICTWO

- Parrilla-Doblas JT, Roldán-Arjona T, Ariza RR, Córdoba-Cañero D (2019) Active DNA demethylation in plants. *Int J Mol Sci* 20(19): 4683.
- Greer EL, Blanco MA, Gu L, Sendinc E, Liu J, Aristizábal-Corrales D, Hsu CH, Aravind L, He C, Shi Y (2015) DNA methylation on N6-adenine in *C. elegans*. *Cell* 161: 868-878
- Zhou C, Wang C, Liu H, Zhou Q, Liu Q, Guo Y (2018) Identification and analysis of adenine N6-methylation sites in the rice genome. *Nat Plants* 4: 554-563.
- Kakoulidou I, Avramidou EV, Baránek M, Brunel-Muguet S, Farrona S, Johannes F, Kaiserli E, Lieberman-Lazarovich M, Martinelli F, Mladenov V, Testillano PS, Vassileva V, Maury S (2021) Epigenetics for crop improvement in times of global change. *Biology (Basel)* 10(8): 766
- Chen P, Li G (2017) Structure and epigenetic regulation of chromatin fibers. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 82: 25-35
- Millán-Zambrano G, Burton A, Bannister AJ, Schneider R (2022) Histone post-translational modifications - cause and consequence of genome function. *Nat Rev Genet* 23(9): 563-580
- Jeusset LMP, McManus KJ (2019) Developing targeted therapies that exploit aberrant histone ubiquitination in cancer. *Cells* 8: 165
- Wang J, Mei J, Ren G (2019) Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation. *Front Plant Sci* 10: 360
- Movahedi A, Sun W, Zhang J, Wu X, Mousavi M, Mohammadi K, Yin T, Zhuge Q (2015) RNA-directed DNA methylation in plants. *Plant Cell Rep* 34(11): 1857-1862
- Vasseileva V, Hollwey E, Todorov D, Meyer P (2016) Leaf epidermal profiling as a phenotyping tool for DNA methylation mutants. *Genet Plant Physiol* 6 (1-2): 3-13
- Khodadadi E, Fahmideh L, Khodadadi E, Dao S, Yousefi M, Taghizadeh S, Asgharzadeh M, Yousefi B, Kafil HS (2021) Current advances in DNA methylation analysis methods. *Biomed Res Int* 2021: 8827516
- Kumar S, Mohapatra T (2021) Dynamics of DNA methylation and its functions in plant growth and development. *Front Plant Sci* 12: 596236
- Guo J, Tang HW, Li J, Perrimon N, Yan D (2018) Xio is a component of the *Drosophila* sex determination pathway and RNA N6-methyladenosinemethyltransferase complex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115: 3674-3679
- Karanthamalai J, Chodon A, Chauhan S, Pandi G (2020) DNA N⁶-Methyladenine modification in plant genomes-A glimpse into emerging epigenetic code. *Plants* 9(2): 247
- Wu TP, Wang T, Seetin MG, Lai Y, Zhu S, Lin K, Liu Y, Byrum SD, Mackintosh SG, Zhong M (2016) DNA methylation on N6-adenine in mammalian embryonic stem cells. *Nature* 532: 329-333
- Bochtler M, Fernandes H (2021) DNA adenine methylation in eukaryotes: Enzymatic mark or a form of DNA damage? *BioEssays* 43(3): e2000243
- Summerer D (2015) N(6)-methyladenine: A potential epigenetic mark in eukaryotic genomes. *Angew Chem Int Ed* 54: 10714-10716
- Xie SQ, Xing JF, Zhang XM, Liu ZY, Luan MW, Zhu, J (2020) N6-Methyladenine DNA modification in the woodland strawberry (*Fragaria vesca*) genome reveals a positive relationship with gene transcription. *Front Genet* 10: 1288
- Luo GZ, Macqueen A, Zheng G, Duan H, Dore LC, Lu Z (2014) Unique features of the m6A methylome in *Arabidopsis thaliana*. *Nat Commun* 5: 5630

20. Zhang Q, Liang Z, Cui X, Ji C, Li Y, Zhang P, Liu J, Riaz A, Yao P, Liu M, Wang Y, Lu T, Yu H, Yang D, Zheng H, Gu X (2018) N⁶-Methyladenine DNA methylation in japonica and indica rice genomes and its association with gene expression, plant development, and stress responses. *Mol Plant* 11(12): 1492-1508
21. Morrell PL, Buckler ES, Ross-Ibarra J (2011) Crop genomics: advances and applications. *Nat Rev Genet* 13(2): 85-96
22. Gallusci P, Dai Z, Génard M, Gauffretau A, Leblanc-Fournier N, Richard-Molard C, Vile D, Brunel-Muguet S (2017) Epigenetics for plant improvement: current knowledge and modeling avenues. *Trends Plant Sci* 22(7): 610-623
23. Springer NM (2013) Epigenetics and crop improvement. *Trends Genet* 29(4): 241-247
24. Eichten SR, Schmitz RJ, Springer NM (2014) Epigenetics: beyond chromatin modifications and complex genetic regulation. *Plant Physiol* 165: 933-947
25. Read A, Weiss T, Crisp PA, Liang Z, Noshay J, Menard CC, Wang C, Song M, Hirsch CN, Springer NM, Zhang F (2022) Genome-wide loss of CHH methylation with limited transcriptome changes in *Setaria viridis* DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE (DRM) mutants. *Plant J* 111(1): 103-116
26. Wibowo A, Becker C, Marconi G, Durr J, Price J, Hagemann J, Paparedy R, Putra H, Kageyama J, Becker J, Weigel D, Gutierrez-Marcos J (2016) Hyperosmotic stress memory in *Arabidopsis* is mediated by distinct epigenetically labile sites in the genome and is restricted in the male germline by DNA glycosylase activity. *Elife* 5: e13546
27. Niedojadło K, Bednarska-Kozakiewicz E (2022) Epigenetyczne mechanizmy generatywnego rozmnażania roślin okrytozalążkowych. *Adv Biochem* 68(1): 57-79
28. Kim DH, Sung S (2014) Genetic and epigenetic mechanisms underlying vernalization. *The Arabidopsis Book* 12: e0171
29. Tagami H, Ray-Gallet D, Almouzni G, Nakatani Y (2004) Histone H3.1 and H3.3 complexes mediate nucleosome assembly pathways dependent or independent of DNA synthesis. *Cell* 116(1): 51-61
30. Rowlands H, Dhavarasa P, Cheng A, Yankulov K (2017) Forks on the Run: can the stalling of DNA replication promote epigenetic changes? *Front Genet* 8: 86
31. González RM, Ricardi MM, Iusem ND (2013) Epigenetic marks in an adaptive water stress-responsive gene in tomato roots under normal and drought conditions. *Epigenetics* 8: 864-872
32. Zong W, Zhong X, You J, Xiong L (2013) Genome-wide profiling of histone H3K4-tri-methylation and gene expression in rice under drought stress. *Plant Mol Biol* 81: 175-188
33. Dai LF, Chen YL, Luo XD, Wen XF, Cui FL, Zhang FT, Zhou Y, Xie JK (2015) Level and pattern of DNA methylation changes in rice cold tolerance introgression lines derived from *Oryza rufipogon* Griff. *Euphytica* 205: 73-83
34. Kumar G, Rattan UK, Singh AK (2016) Chilling-mediated DNA methylation changes during dormancy and its release reveal the importance of epigenetic regulation during winter dormancy in apple (*Malus x domestica* Borkh.). *PLoS One* 11(2): e0149934
35. Kapazoglou A, Drosou V, Argiriou A, Tsafaris AS (2013) The study of a barley epigenetic regulator, HvDME, in seed development and under drought. *BMC Plant Biol* 13: 172
36. Van Oosten MJ, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ, Chinnusamy V (2014) The role of the epigenome in gene expression control and the epimark changes in response to the environment. *Crit Rev Plant Sci* 33(1): 64-87
37. Ono A, Yamaguchi K, Fukada-Tanaka S, Terada R, Mitsui T, Iida S (2012) A null mutation of ROS1a for DNA demethylation in rice is not transmissible to progeny. *Plant J* 71: 564-574
38. Liu J, Feng L, Li J, He Z (2015) Genetic and epigenetic control of plant heat responses. *Front Plant Sci* 6: 267
39. Zhang B, Tieman DM, Jiao C, Xu Y, Chen K, Fei Z, Giovannoni JJ, Klee HJ (2016) Chilling-induced tomato flavor loss is associated with altered volatile synthesis and transient changes in DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 113(44): 12580-12585
40. El-Sharkawy I, Liang D, Xu K (2015) Transcriptome analysis of an apple (*Malus x domestica*) yellow fruit somatic mutation identifies a gene network module highly associated with anthocyanin and epigenetic regulation. *J Exp Bot* 66(22): 7359-7376
41. Li T, Chen X, Zhong X, Zhao Y, Liu X, Zhou S (2013) Jumonji C domain protein JM1705-mediated removal of histone H3 lysine 27 trimethylation is involved in defense-related gene activation in rice. *Plant Cell* 25(11): 4725-4736
42. Iwasaki M, Paszkowski J (2014) Epigenetic memory in plants. *EMBO J* 33: 1-12
43. Zhang C, Hsieh T-F (2013) Heritable epigenetic variation and its potential applications for crop improvement. *Plant Breed Biotech* 1: 307-319
44. Qiu Y, Li Z, Walther D, Köhler C (2023) Updated phylogeny and protein structure predictions revise the hypothesis on the origin of MADS-box transcription factors in land plants. *Mol Biol Evol* 40(9): msad194
45. Kim SR, Ramos JM, Hizon RJM, Ashikari M, Virk PS, Torres EA, Nissila E, Jena KK (2018) Introgression of a functional epigenetic OsSPL14^{WFP} allele into elite indica rice genomes greatly improved panicle traits and grain yield. *Sci Rep* 8(1): 3833
46. Lai T, Wang X, Ye B, Jin M, Chen W, Wang Y, Zhou Y, Blanks AM, Gu M, Zhang P, Zhang X, Li C, Wang H, Liu Y, Gallusci P, Tör M, Hong Y (2020) Molecular and functional characterization of the SBP-box transcription factor SPL-CNR in tomato fruit ripening and cell death. *J Exp Bot* 71(10): 2995-3011
47. Quadrana L, Almeida J, Asís R, Duffy T, Dominguez PG, Bermúdez L, Conti G, Correa da Silva JV, Peralta IE, Colot V, Asurmendi S, Fernie AR, Rossi M, Carrari F (2014) Natural occurring epialleles determine vitamin E accumulation in tomato fruits. *Nat Commun* 5: 3027
48. Kungulovski G, Jeltsch A (2016) Epigenome editing: state of the art, concepts, and perspectives. *Trends Genet* 32: 101-113
49. Kasai M, Kanazawa A (2013) Induction of RNA-directed DNA methylation and heritable transcriptional gene silencing as a tool to engineer novel traits in plants. *Plant Biotechnol* 30: 233-241
50. Offermann S, Peterhansel C (2014) Can we learn from heterosis and epigenetics to improve photosynthesis? *Curr Opin Plant Biol* 19: 105-110
51. Akimoto K, Katakami H, Kim HJ, Ogawa E, Sano CM, Wada Y, Sano H (2007) Epigenetic inheritance in rice plants. *Ann Bot* 100(2): 205-217
52. Amoah S, Kurup S, Rodriguez Lopez CM, Welham SJ, Powers SJ, Hopkins CJ, Wilkinson MJ, King GJ (2012) A hypomethylated population of *Brassica rapa* for forward and reverse epigenetics. *BMC Plant Biol* 12: 193
53. Johannes F, Porcher E, Teixeira FK, Saliba-Colombani V, Simon M, Agier N (2009) Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genet* 5(6): e1000530
54. Cortijo S, Wardenaar R, Colomé-Tatché M, Gilly A, Etcheverry M, Labadie K, Caillieux E, Hospital F, Aury JM, Wincker P, Roudier F, Jansen RC, Colot V, Johannes F (2014) Mapping the epigenetic basis of complex traits. *Science* 343: 1145-1148
55. Avramidou E, Kapazoglou A, Aravanopoulos FA, Xanthopoulou A, Ganopoulos I, Tsaballa A, Madesis P, Doulis AG, Tsafaris A (2014) Global DNA methylation changes in Cucurbitaceae inter-species grafting. *Crop Breed Appl Biotechnol* 15: 112-116
56. Wu R, Wang X, Lin Y, Ma Y, Liu G, Yu X (2013) Inter-species grafting caused extensive and heritable alterations of DNA methylation in Solanaceae plants. *PLoS One* 8(4): e61995
57. Agarwal G, Kudapa H, Ramalingam A, Choudhary D, Sinha P, Garg V, Singh VK, Patil GB, Pandey MK, Nguyen HT, Guo B, Sunkar R, Niederhuth CE, Varshney RK (2020) Epigenetics and epigenomics: underlying mechanisms, relevance, and implications in crop improvement. *Funct Integr Genomics* 20(6): 739-761
58. Dalakouras A, Vlachostergios D (2021) Epigenetic approaches to crop breeding: current status and perspectives. *J Exp Bot* 72(15): 5356-5371

Epigenetics and the improvement of crop plants

Klaudia Bernacka, Magdalena Achrem✉, Anna Kalinka

Institute of Biology, University of Szczecin

✉corresponding author: magdalena.achrem@usz.edu.pl

Keywords: epigenetic mechanisms, 6mA, 5mC, PTM, epibreeding

ABSTRACT

Epigenetics is a term that refers to the changes in gene expression that are heritable and induced by DNA methylation, histones post-translational modifications, or sncRNA, not resulting from the DNA sequence rearrangements. Epigenetic modifications influence gene expression, and thus, the plasticity of plants' development and phenotype in response to external and internal factors. Until recently, the only known epigenetic modification of the DNA in eukaryotic organisms was 5-methylcytosine. The growing interest in epigenetics and the development of sensitive detection methods enabled the discovery of other modifications of the DNA nitrogenous bases, i.e., 4-methylcytosine and 6-methyladenine. However, whilst research on the 5mC distribution and role in eukaryotic organisms is widespread, analyses regarding 6mA are scarced. Nevertheless, there are indications of a potential epigenetic role of 6-methyladenine in eukaryotic genomes. Understanding epigenetic mechanisms, which are triggered in response to environmental changes, is crucial for agriculture. This review shows epigenetic mechanisms, with particular emphasis on adenine methylation in plants, as well as the role of epigenetic variation in epibreeding, affecting the improvement of agronomic traits.

