

FERRAMENTAS DE ENSINO DA BIOLOGIA VEGETAL™: NOTAS PARA AS AULAS TEÓRICAS

Introdução à Regulação Epigenética de Genes

A regulação epigenética é o processo pelo qual a atividade de um gene é modulada através de modificações covalentes do DNA, de histonas associadas ao DNA, ou da organização estrutural da cromatina em que está inserido. A utilização do termo regulação epigenética exige explicitamente que o estado do gene seja passível de ser herdado, ou seja, que possa ser estavelmente transmitido através de um ou mais ciclos mitóticos. Os mecanismos de regulação epigenética, muito provavelmente surgiram como mecanismos de defesa do genoma perante DNAs “parasitas”, transposões e vírus, mas os mecanismos epigenéticos também têm uma função importante ao nível da regulação da expressão de genes cruciais ao desenvolvimento e à resposta a fatores ambientais. Estudos genéticos têm identificado vias moleculares de modificação da cromatina e DNA subjacentes aos processos de regulação epigenética tendo as ferramentas de caracterização genómica revelado que têm uma presença universal e um papel crucial na regulação funcional do genoma. O DNA eucariótico está enrolado em torno de octâmeros de histonas altamente conservadas, uma estrutura proteica constituída por duas moléculas de cada uma das quatro histonas. O complexo histonas/DNA é denominado por nucleossoma. Os nucleossomas são empacotados uns sobre os outros de vários modos englobando proteínas adicionais que, no seu conjunto constituem a cromatina. A cromatina apresenta-se muito compactada durante a mitose tornando-se mais descompactada durante a interfase. Os estudos citogenéticos clássicos permitiram identificar regiões cromossómicas denominadas de heterocromatina que permanecem relativamente compactadas durante a interfase. A heterocromatina é constituída principalmente por DNA não-génico incluindo os centrómeros, regiões repetitivas em torno dos centrómeros (regiões pericentroméricas), cromatina ribossómica, elementos repetitivos e transposões. A eucromatina consiste em regiões ricas em genes que são menos compactadas sendo por isso mais acessíveis à transcrição. O DNA e as histonas na heterocromatina possuem modificações específicas de silenciamento. No seu conjunto, estas modificações (denominadas de marcas epigenéticas) estão associadas a uma forte compactação da cromatina resultando na repressão transcricional nessas regiões. As marcas epigenéticas também regulam alguns genes na eucromatina, em particular os envolvidos em transições críticas do desenvolvimento.

MARCAS EPIGENÉTICAS

Metilação do DNA

A metilação do DNA é uma marca epigenética importante em muitos organismos, incluindo as plantas. As DNA metiltransferases estão envolvidas na adição covalente de grupos metilo a citosinas, marcando assim o DNA sem interferir com o emparelhamento entre bases. A metilação do DNA silencia a expressão de genes interferindo com a ligação de complexos proteicos responsáveis pela transcrição (geralmente referidos, no seu conjunto, como maquinaria transcricional). As plantas possuem três tipos de DNA metiltransferases com diferentes especificidades de alvo e de funções. A METILTRANSFERASE 1 (MET1) mantém a metilação ao nível dos locais simétricos 5'-CG-3'

durante a replicação do DNA num processo que envolve a cópia de informação da cadeia molde para a cadeia sintetizada *de novo*. Os alvos da MET1 são principalmente transposões silenciadas e heterocromatina, mas a MET1 também mantém as marcas ao nível de alguns genes “imprinted” incluindo o MEA, descrito abaixo. A CROMOMETILASE 3 (CMT3) metila sequências ao nível 5' -CNG-3' e pode iniciar a metilação *de novo* do DNA em sítios com determinadas modificações de histonas. A “METILTRANSFERASE1 COM DOMÍNIOS REARRANJADOS” (DRM1) e DRM2 são proteínas intimamente relacionadas, com papel redundante ao nível da metilação de sequências não simétricas CHH (em que H pode ser um A, C, ou T). Estas sequências metiladas podem perder informação em cada ciclo de replicação do DNA, dado que uma cadeia molde não tem a citosina metilada. Portanto, as DRM1 e DRM2 requerem informação quanto aos alvos, que muitas vezes deriva da via de pequenos RNAs de interferência (siRNA). As CMT3, DRM1, e DRM2 são essencialmente necessárias ao nível da regulação da expressão de genes endógenos (ao contrário dos transposões), especialmente aqueles cuja mudança de atividade está associada a transições cruciais no desenvolvimento. É necessário que ocorra a mutação tripla destas três metilases para que seja possível detetar anomalias ao nível do desenvolvimento, indicando alguma redundância funcional das CMT3, DRM1 e DRM2.

Modificações das histonas

Nos nucleossomas, os monómeros histónicos expõem as caudas N-terminal, que estão sujeitas a modificações covalentes por ação de enzimas modificadoras das histonas. A acetilação das histonas pelas acetiltransferases de histonas está geralmente associada a um estado mais ativo da cromatina (isto é, a níveis mais elevados de transcrição); inversamente, a desacetilação de histonas está geralmente associada a um silenciamento transcricional de genes. A metilação de histonas pela ação das metiltransferases de histonas pode contribuir tanto para a ativação como para o silenciamento de genes, dependendo da posição da marca de metilação. A posição e a natureza das modificações das histonas e as consequências dessas modificações constituem no seu conjunto o código das histonas. As marcas das histonas são abreviadas e incluem o nome da histona, a posição da marca, e a natureza e número de marcas. Por exemplo, a marca epigenética H3K27me3 corresponde a uma trimetilação da Lis-27 (K) da histona H3. A H3K27me3 é uma marca de silenciamento conservada, principalmente ao nível de genes eucromáticos regulados pelo desenvolvimento. Outros exemplos de modificações de histonas bem conservadas incluem a H3K9me, geralmente associada a heterocromatina ou a genes silenciados, e a H3K4me que está associada a genes ativamente transcritos.

Existem muitos genes que codificam enzimas de modificação de histonas, e as funções específicas de cada um não estão completamente caracterizadas. A formação da marca H3K27me3 está intimamente associada à ação de um complexo proteico constituído por múltiplas subunidades com atividade de metiltransferase de histonas, o PRC2 (Complexo Repressivo Polycomb). Para além da formação da marca H3K27me, as plantas e os animais diferem na forma como é mediado o silenciamento de genes através do PRC2. Em animais, a marca H3K27me3 é depositada ao nível da histona 3 via Polycomb (PC), uma proteína com um cromodomínio que interfere com a transcrição através de um mecanismo ainda desconhecido. As plantas não codificam um ortólogo Pc, mas sim “de tipo HETERO Cromatina1” (LHP1), que é também uma proteína com um cromodomínio e que parece funcionar similarmente no que diz respeito à sua ligação à H3K27me3 estando envolvida na manutenção do silenciamento

de genes. Na regulação epigenética da vernalização a manutenção do estado silenciado do FLC após a vernalização requer a ação do complexo PRC2 e da LHP1.

As modificações das histonas afetam diretamente a estrutura do nucleossoma. Por exemplo, a acetilação das histonas enfraquece a atração entre o DNA e histonas, afrouxando a estrutura da cromatina facilitando assim o acesso da RNA polimerase. As modificações das histonas facilitam também as interações entre nucleossomas e outras proteínas não histônicas promovendo ou interferindo com a transcrição.

Algumas histonas têm variantes conservadas que afetam a expressão de genes. Por exemplo, a histona 2A tem uma variante, H2A.Z, que difere da H2A ao nível da região C-terminal. No seio dos nucleossomas, o complexo SWR1/SRCAP pode substituir a H2A pela H2A.Z. Esta substituição histônica está associada a elevados níveis de transcrição, possivelmente via inibição da metilação do DNA. A reativação da expressão do FLC durante a embriogénese requer a incorporação da variante H2A.Z nos nucleossomas perto do promotor do FLC. A presença da variante H2A.Z ao nível dos nucleossomas tem sido considerada importante na percepção de alterações ao nível da temperatura ambiental e mediação transcricional em resposta à temperatura e ainda ao nível da regulação da imunidade da planta. Existem três variantes da histona H3. O estabelecimento e manutenção dos centrómeros requerem a incorporação da variante específica centromérica CENH3. A H3.3 está associada a regiões com elevados níveis de expressão génica, enquanto a H3.1 está associada a regiões silenciadas do ponto de vista transcricional.

REGULAÇÃO EPIGENÉTICA DE PROCESSOS AO NÍVEL DA PLANTA

Regulação epigenética de transposões e elementos repetitivos

Uma fração considerável da maioria dos genomas (incluindo o humano) deriva de transposões. Muitas destas sequências derivadas de transposões não têm a capacidade de transposição ou de serem transcritas devido à presença de mutações acumuladas, mas outras são mantidas inertes apenas devido à existência de mecanismos epigenéticos de silenciamento. O DNA da maioria dos transposões é extensivamente metilado ao nível das bases CG; Esta é a forma de metilação do DNA mais estavelmente herdada dada a relativa simplicidade da sua manutenção, essencialmente através da atividade da MET1, durante a replicação do DNA. A DIMINUIÇÃO NA METILAÇÃO DO DNA (DDM1) é uma ATPase remodeladora da cromatina sendo também necessária à supressão da ativação de transposões. Nos mutantes *ddm1*, a perda de função *ddm1* leva a diversos fenótipos anormais e instáveis causados pela ação mutagénica de transposões ativados, resultando ainda num fenótipo mais dramático quando existe a dupla mutação *ddm1met1*. O silenciamento do conjunto completo de transposões no genoma requer a ação concertada das CMT3, DRM1 e DRM2 e das vias de metilação do DNA mediadas pelo RNA.

Só muito recentemente começamos a perceber a importância dos pequenos RNAs de interferência (siRNAs) na manutenção da metilação do DNA e no silenciamento de transposões. Os transcritos gerados pela RNA Polimerase II ou IV da região pericentromérica são convertidos em RNAs de cadeia dupla por uma RNA-polimerase dependente de RNA sendo subsequentemente clivados em pequenos RNAs de interferência (siRNAs) por ação de proteínas do tipo DICER. Estes siRNAs, quando ligados a proteínas ARGONAUTE (AGO), interagem com transcritos produzidos pela RNA polimerase V para dirigir as metilases DRM para as regiões

pericentroméricas, levando à metilação do DNA e silenciamento transcricional. Este mecanismo constitui uma forma robusta e específica de silenciamento de transposições, elementos repetitivos e genes, conforme descrito abaixo.

Regulação Epigenética da Floração

Um dos processos epigenéticos mais amplamente caracterizado relaciona-se com o controle do processo de floração. As angiospérmicas crescem vegetativamente até que determinados sinais endógenos e exógenos façam despoletar o início da fase reprodutiva do crescimento. O seu sucesso reprodutivo depende por um lado do fato da planta materna ter recursos suficientes disponíveis que permitam assegurar o desenvolvimento da semente, e por outro de condições ambientais suficientemente amenas, passíveis de sustentar a planta materna durante a floração e a maturação de sementes. Muitas plantas florescem na primavera, assegurando que a maturação das suas sementes possa ocorrer antes do inverno. Estas plantas geralmente crescem vegetativamente ao longo do inverno e florescem em resposta a mudanças de fotoperíodo na primavera. Para garantir que floresçam na primavera, estas plantas devem experimentar o frio do inverno para se tornarem competentes para florir, num processo denominado de vernalização. O período de frio pode ocorrer semanas ou meses antes da floração; a planta deve memorizar a vernalização ao longo de dezenas ou centenas de ciclos de replicação do DNA. O mediador da resposta da vernalização é o regulador da inibição da floração, "FLOWERING LOCUS C" (FLC).

O FLC codifica um fator de transcrição da caixa MADS que se liga e reprime o gene FT, o ativador chave da floração. Durante o crescimento vegetativo, o gene FLC é transcrito a um nível elevado. As marcas epigenéticas mantêm esta ativação transcricional, incluindo a acetilação da histona H4, a metilação das Lisina 4 e 36 da histona 3, e a incorporação da variante H2A.Z histona no nucleossoma. O tratamento prolongado de frio induz a expressão do gene VERNALIZATION INSENSITIVE3, o qual é um componente do complexo VRN2 PRC2, específico da vernalização. Este e outros complexos modificam as histonas ao nível do gene FLC, removendo as marcas de ativação, tais como a metilação da H3K4 e a acetilação da H4, e adicionando marcas de silenciamento, tais como a metilação da H3K9me e a tri-metilação da H3K27me3. A LHP1 associa-se ao FLC durante e após o tratamento de frio mantendo o seu estado silenciado e permitindo que o FT seja expresso e induza a floração.

A expressão de longos RNAs não-codificantes (lncRNAs) também contribui para o silenciamento, induzido pelo frio, do FLC. Em sistemas animais, tem sido referido que os lncRNAs podem funcionar como suporte ao recrutamento de complexos remodeladores da cromatina. Um lncRNA, denominado de COLDAIR, é codificado por um intrão do FLC e fisicamente interage com o complexo PRC2 no sentido de reprimir a expressão do gene FLC durante a vernalização. O COLDAIR coordena o enriquecimento na marca H3K27me3 ao nível da cromatina em torno do *locus* FLC, levando à repressão desta região genómica. A transcrição de um FLC anti-sentido lncRNA, COOLAIR, é induzida por temperaturas baixas. Embora a sua expressão seja consistente com um papel na vernalização, o seu papel preciso ainda é alvo de investigação.

Em *Drosophila*, a ação repressiva de proteínas do grupo "Polycomb" é antagonizada pela ação de proteínas do grupo "trithorax" (trxG), que ativam genes através da trimetilação ao nível da H3K4. Um antagonismo semelhante parece ocorrer em plantas, embora algumas das atividades do grupo trxG possam ocorrer através de proteínas não conservadas. Estudos genéticos têm revelado que a ativação transcricional do gene FLC requer a função trxG.

Programas de Desenvolvimento de Plantas

A regulação epigenética e a reprogramação de genes ocorrem ao longo do desenvolvimento da planta. De entre os genes epigeneticamente regulados incluem-se genes que codificam para fatores de transcrição, genes de microRNAs, e genes envolvidos na síntese e resposta às auxinas. Os mecanismos reguladores incluem a incorporação de variantes de histonas, alterações nos padrões de metilação do DNA, e deposição da marca H3K27me3 mediada pelo PRC2. Muitos genes específicos de tecidos e genes reguladores que são especificamente reprimidos em tecidos indiferenciados ou de proliferação são regulados pela ação de proteínas do grupo "Polycomb" e proteínas trxB. Por exemplo, centenas de genes de uma forma sincronizada adquirem ou perdem marcas H3K27me3 durante a transição do tecido de "callus" para a folha, do meristema caulinar apical para folha, ou do meristema radicular apical para as células diferenciadas da raiz. Assim, a progressão do desenvolvimento ao longo do ciclo de vida da planta, envolvendo inúmeras transições de desenvolvimento, é grandemente regulada através de uma reprogramação epigenética em larga escala da atividade de genes, em conjunto com outros mecanismos regulatórios bem descritos, tais como a produção e ativação de fatores de transcrição e a ação de pequenos RNAs.

Resposta Epigenética ao Stress

Atualmente existem evidências sólidas de que muitas respostas a stresses bióticos e abióticos envolvem variações epigenéticas. Vários estudos têm demonstrado a ocorrência de alterações epigenéticas em resposta ao stress ou no período de recuperação do stress, e outros estudos têm revelado que as respostas ao stress são alteradas em mutantes que apresentam deficiências ao nível da maquinaria epigenética. Por exemplo, um nível de humidade reduzida leva a um aumento da metilação e à diminuição do nível de expressão de genes super-reguladores ("master genes") essenciais ao desenvolvimento estomático, conduzindo à redução do número de estomas sendo esta uma resposta adaptativa à humidade reduzida. Similarmente, o stress de seca tem sido associado ao enriquecimento de marcas de histonas ativadoras, como a H3K4me3, ao nível de genes de resposta à desidratação. Estudos genómicos em larga escala têm revelado que os efeitos do stress ao nível do epigenoma podem ser de grande alcance. Por exemplo, foram encontradas alterações ao nível da metilação do DNA associadas a alterações na expressão de genes em resposta ao stress biótico. Muitos dos genes diferencialmente metilados estão envolvidos em respostas de defesa, no entanto, os transposões são também sítios de metilação diferencial. Neste sentido, é interessante notar que existem cada vez mais evidências de que a ativação de transposões induzida pelo stress pode ter significados funcionais específicos na resposta das plantas ao stress, através de vários mecanismos. A ativação de transposões pode aumentar a expressão de genes envolvidos na resposta ao stress que estejam localizados na sua proximidade. A ativação de um transposão Athila leva à produção de pequenos RNAs que por sua vez, regulam a expressão de um gene chave envolvido na tolerância ao stress. Para além disso, verificou-se que a ativação induzida pelo calor do transposão ONSEN pode em alguns cenários mutantes, levar a um aumento de transposição na geração seguinte. Algumas questões pertinentes incluem perceber o quão estável poderão ser as alterações epigenéticas induzidas pelo stress, se poderão ser transmitidas entre gerações, e em que medida podem afetar o desempenho e evolução da planta.

Regulação Epigenética de Genes “Imprinted”

Similarmente aos animais, as angiospérmicas reprogramam as marcas epigenéticas durante a reprodução. Os mecanismos de reprogramação evoluíram separadamente em mamíferos e angiospérmicas no entanto, podem funcionar de forma semelhante no que diz respeito ao silenciamento de transposões na geração seguinte. É também interessante verificar que ambos, mamíferos e angiospérmicas, silenciam seletivamente alguns genes de uma forma que está associada à origem parental, um fenômeno denominado de “*imprinting*”. A não-equivalência do genoma materno e paterno foi demonstrada pela introdução de núcleos de um óvulo e de um espermatozóide, ou dois óvulos ou dois espermatozoides numa célula anucleada. Apenas as células que continham ambos os genomas, materno e paterno, originaram embriões viáveis. Estudos posteriores mostraram que este efeito se deve ao silenciamento epigenético seletivo ao nível de certos alelos de “*imprinting*” em cada um dos genomas.

Nas angiospérmicas, a planta verde representa o esporófito diploide. A meiose conduz à formação de esporos haploides, que irão passar por um ou mais ciclos de divisão mitótica dando origem a um gametófito masculino haploide ou a um gametófito feminino. O gametófito feminino tem sete células, oito núcleos. A célula central binucleada irá dar origem ao endosperma; outra célula do gametófito feminino é a oosfera. O gametófito masculino (grão de pólen) produz uma célula que compreende um núcleo vegetativo e dois núcleos espermáticos haploides. Um dos núcleos espermáticos fertiliza a célula central originando o tecido do endosperma triploide, enquanto o outro fertiliza a oosfera dando origem ao zigoto.

MEDEA (MEA) codifica uma subunidade do complexo PRC2. MEA é um gene “*imprinted*”; Cruzamentos recíprocos geram uma descendência de fenótipos diferentes. A descendência que recebe via materna a perda de função do alelo *mea* morre, enquanto a descendência que o recebe via paterna irá apresentar um fenótipo do tipo selvagem. Este efeito ilustra bem um silenciamento epigenético seletivo. Em tecidos vegetativos e no pólen, o gene MEA é silenciado. Na célula central do gametófito feminino, as marcas de silenciamento (incluindo a metilação do DNA e histonas) são removidas, permitindo a expressão de MEA. Após a fertilização, o complexo PRC2, incluindo MEA, mantém o silenciamento do alelo paterno, garantindo a expressão apenas do alelo materno. A sequenciação de RNA em híbridos de linhas autopolinizadas (“*inbred*”) têm permitido identificar mais de 100 genes que apresentam efeitos relacionados com a origem parental em *Arabidopsis*, arroz e milho. Um pequeno número de genes são “*imprinted*” nas três espécies (as quais divergiram há mais de 100 milhões de anos) sugerindo que o “*imprinting*” desses genes possa conferir alguma vantagem seletiva.

Silenciamento de Genes em “*Trans*”

Tal como MEA, o gene FWA “*imprinted*” é silenciado durante o crescimento vegetativo e reativado no gametófito feminino. Foram identificados alelos FWA anormais que não são silenciados em tecidos vegetativos. Estes alelos expressos são idênticos ao FWA de tipo selvagem quanto à sequência de DNA, mas diferem no que diz respeito às suas marcas epigenéticas sendo por isso designados por epialelos. Os epialelos FWA não têm metilação do DNA ao nível de um elemento repetitivo perto do local de iniciação da transcrição; Esta hipometilação leva à expressão, em vez do silenciamento do gene, nos tecidos vegetativos. É muito interessante verificar que quando uma cópia do gene FWA é introduzida em plantas de tipo selvagem, via transformação mediada por *Agrobacterium tumefaciens*, o transgene adquire metilação sendo epigeneticamente silenciado *in vivo*, indicando que o

silenciamento do gene FWA endógeno é capaz de transmitir informação ao gene recentemente introduzido. No mutante *drm2*, o gene endógeno FWA permanece silenciado, no entanto o transgene introduzido não é silenciado, o que indica a necessidade de DRM2 para o silenciamento *de novo* do transgene introduzido.

Estudos posteriores têm mostrado o envolvimento dos siRNAs na metilação *de novo* do DNA, elucidando que a expressão do alelo FWA silencia o alelo introduzido através de um mecanismo de siRNA. É relevante notar que ambos os alelos FWA estão associados com siRNAs, mas apenas o alelo silenciado metilado é capaz do silenciamento em *trans*, indicando que, embora necessário, a produção de siRNA não é por si só suficiente para a metilação do DNA ao nível do FWA.

Um mecanismo similar baseado no RNA parece ser responsável por um evento genético involuntário denominado de paramutação. Na paramutação, um alelo de um gene pode alterar o estado epigenético de outro em *trans*. O exemplo clássico é o locus *b1* no milho (*Zea mays*), que codifica um fator de transcrição envolvido na síntese de pigmentos. O alelo B-I do tipo selvagem é transcrito a um nível elevado, e as plantas homocigóticas para o B-I apresentam elevada pigmentação. Num híbrido F1, o alelo B# está associado à paramutação (silenciamento) do alelo B-I, convertendo-o em B#; a planta F1 com menos pigmentação torna-se homocigótica para o alelo B# através de paramutação. O silenciamento paramutagênico requer a ação de uma RNA polimerase dependente de RNA e pensa-se que poderá envolver o mesmo tipo de via de metilação do DNA dependente de RNA como o silenciamento do alelo FWA.

Reposição do epigenoma

Após vernalização, a repressão transcricional do gene *FLC* é mantida ao longo de muitos ciclos mitóticos antes e durante a floração. Tal como muitos genes animais regulados epigeneticamente, o estado epigenético do *FLC* é repostado durante a reprodução. É ativamente silenciado durante a gametogênese sendo em seguida reativado durante a fertilização ou início da embriogênese, um processo que requer a contribuição do complexo SWR1 e a incorporação da variante H2A.Z associada à ativação transcricional. Este processo de reinicialização assegura que as plantas na próxima geração tenham de ser novamente vernalizadas antes da floração.

Recentemente, tem-se procurado decifrar as marcas epigenéticas ao nível genómico, utilizando metodologias de sequenciação massiva, imunoprecipitação da cromatina (ChIP) e abordagens de "micro-array" e os resultados sugerem que existe uma reprogramação epigenética considerável durante a reprodução das angiospérmicas. Em comparação com tecidos vegetativos, as marcas de heterocromatina e de metilação do DNA são muito reduzidas não apenas ao nível de genes "imprinted", mas ao nível da totalidade do genoma do endosperma. Existe também uma proliferação extensa de siRNAs resultantes da RNA Polimerase IV no endosperma em desenvolvimento. No núcleo vegetativo do pólen, mas não nos núcleos espermáticos, os transposões são ativadas e hipometiladas. De uma forma notável, o núcleo vegetativo e os genomas do endosperma não são incorporados no embrião; estes programas de desmetilação não ocorrem na célula ovo ou núcleo espermático que são os progenitores do zigoto. No seu conjunto, estes resultados são consistentes com um modelo em que a perda de silenciamento no núcleo vegetativo do pólen e no endosperma assegura a repressão de transposões no zigoto através da via de siRNA. Na medida em que os siRNAs se podem mover entre células a distâncias curtas, talvez os siRNAs induzidos pela ativação de transposões no núcleo vegetativo e

endosperma possam ser mobilizados para tecidos germinativos para iniciar e manter os controles epigenéticos de silenciamento.

MÉTODOS DE ANÁLISE DAS MARCAS EPIGENÉTICAS

Nucleases Sensíveis à Metilação

Muitas enzimas de restrição são sensíveis à metilação do DNA. A digestão de DNA genômico com enzimas de restrição sensíveis à metilação pode comparar-se com o DNA digerido por enzimas que reconhecem a mesma sequência (isoesquizómeros) mas que são insensíveis à metilação. As endonucleases que digerem especificamente DNA metilado (McrBC) podem também ser usadas para detetar regiões genômicas metiladas. Após a digestão, os produtos são processados por forma a caracterizar regiões específicas (gel de DNA e análise por PCR) ou analisar globalmente o genoma (hibridação com "microarray" e sequenciação de DNA).

Purificação por Afinidade de DNA Metilado

Os anticorpos que reconhecem a metilação ao nível da citosina são comercialmente disponíveis e podem ser usados para detetar DNA metilado através de purificação por afinidade ou por imunoprecipitação. Estes métodos permitem a obtenção de mapas genômicos evidenciando regiões ricas em metilcitosinas mas não permitem determinar com precisão os sítios exatos de metilação.

Análise de Metilação pelo Método de Sequenciação de DNA tratado com Bissulfito (BS)

Quando o DNA é tratado com bissulfito, as citosinas são desaminadas e convertidas em uracilo, enquanto que as citosinas metiladas são protegidas da desaminação não sendo portanto afetadas pelo tratamento químico com bissulfito. Para determinar o grau de metilação numa região, a sequência de uma amostra tratada com bissulfito deverá ser comparada com a de uma amostra não tratada. As citosinas conservadas nas amostras tratadas e não tratadas são aquelas que estavam metiladas; as citosinas não metiladas são lidas como timinas na amostra tratada com bissulfito e como citosinas na amostra controlo não tratada com bissulfito.

Análise de modificações de histonas

A imunoprecipitação da cromatina (ChIP) é uma técnica que permite analisar interações específicas entre proteína e DNA. O método ChIP foi inicialmente desenvolvido para identificar interações entre fatores de transcrição e os seus sítios de ligação ao DNA respetivos. No entanto, o fato de existirem anticorpos que se ligam especificamente a determinadas modificações de histonas tornou este método particularmente útil em estudos epigenômicos. A cromatina é fixada em ligação reticulada através do tratamento com formaldeído sendo depois convertida em fragmentos de aproximadamente 500 bp. Os anticorpos são usados para purificar a fração de cromatina que inclui

a modificação da histona de interesse. A ligação reticulada entre DNA e proteína é então revertida sendo o DNA purificado para análise por PCR, sequenciamento (ChIP-Seq), ou por hibridação com "microarray" (ChIP-chip).

Um método alternativo, DamID, envolve a expressão de uma proteína de ligação a histonas em fusão com Dam, uma sequência específica de DNA adenina metilase de *Escherichia coli*. A metilase Dam é especificamente recrutada para o sítio de ligação do seu parceiro de fusão, onde metila os locais próximos. A clivagem subsequente do DNA com uma enzima sensível à metilação permite que os sítios metilados sejam preferencialmente amplificados e purificados por PCR. Em plantas, este método tem sido utilizado para identificar a distribuição da proteína LHP1 ao nível da cromatina.

Métodos de Sequenciação de DNA de Última Geração

A combinação de métodos cada vez mais robustos de identificação de marcas epigenéticas com o desenvolvimento de métodos de sequenciação de última geração tem facilitado a compreensão da regulação epigenética. Durante muitos anos, as tecnologias de sequenciação do DNA focaram-se essencialmente em gerar fragmentos cada vez mais longos de informação sobre sequências partindo de moléculas individuais com o objetivo de facilitar a montagem de sequências genômicas. Recentemente, considera-se a importância de obter leituras de sequências mais curtas partindo de múltiplas moléculas em paralelo; Estes métodos referem-se à sequenciação em larga escala ("high-throughput") ou sequenciação em profundidade ("deep sequencing"). Por exemplo, a sequenciação massiva em paralelo do mRNA é um método importante para avaliar a abundância de transcritos ao nível de tecidos específicos e entre tecidos. A combinação da imunoprecipitação da cromatina (ChIP) com os métodos de sequenciação de última geração tem permitido decifrar a abundância de modificações específicas de histonas ao nível do genoma inteiro. A sequenciação em profundidade ("deep sequencing") é também uma ferramenta importante que permite analisar a acumulação de RNA ao nível de tecidos específicos e entre diferentes tecidos.

Existem diferentes tipos de sequenciação de última geração que partilham entre si a acessibilidade em termos de custo, paralelismo e velocidade. Por exemplo, a sequenciação Roche / 454 é uma tecnologia de síntese baseada em pirosequenciação, que utiliza a bioluminescência para detetar a libertação de pirofosfato pela incorporação de um nucleótido numa sequência estendida. Tal como a sequenciação convencional de didesoxilo, este método utiliza a DNA polimerase e um molde iniciador. A adição de trifosfato de desoxinucleótido ao iniciador de alongamento é quantificada pela emissão de luz; quando um trifosfato de desoxinucleótido se liga, o pirofosfato é libertado. O pirofosfato é então utilizado como um substrato na produção de ATP o qual é utilizado pela enzima luciferase para produzir luz. A emissão de luz é captada em tempo real por uma câmara CCD. Usando este método, mais de um milhão de moldes podem ser sequenciados de uma só vez.

Outras tecnologias de última geração incluem a terminação cíclica reversível (Illumina / Solexa e Helicos Biosciences), que utiliza uma tecnologia semelhante à sequenciação convencional via didesoxilo, mas com a característica adicional de que os terminadores podem ser revertidos para permitir ciclos adicionais de extensão do molde, eliminando a necessidade da separação eletroforética dos produtos. Para além de sequenciação por síntese, outros métodos, tais como a deteção de suporte de ligação de oligonucleótidos (SOLiD), dependem da

sequenciação via ligação de um oligonucleótido iniciador. Avanços recentes na sequenciação, tais como a síntese baseada numa única molécula (“Single Molecule Real Time sequencing –SMRT”) (SMRT) da Pacific Biosciences, que incorpora a sequenciação em tempo real por DNA polimerases em moldes de moléculas únicas de DNA. A adição de um único nucleótido é detetada através de um marcador fluorescente que é libertado após incorporação e que depois se difunde. Ao atuar sobre moléculas de DNA individuais, os métodos em tempo real melhoram substancialmente o comprimento das leituras e eliminam a necessidade de amplificação do molde.

Perspetivas Futuras

A compreensão dos mecanismos de regulação epigenética de genomas de plantas está a aumentar exponencialmente. No presente, as novas metodologias de análise das marcas epigenéticas ao nível genómico em plantas selvagens e mutantes têm permitido intersear diferentes marcas epigenéticas, nomeadamente, metilação do DNA, modificações de histonas e produção de pequenos RNAs de interferência (siRNA). À medida que compreendemos melhor os mecanismos envolvidos na regulação epigenética de genes, também ganhamos em termos de conhecimento ao nível de processos regulados por controlos epigenéticos, incluindo o papel da programação epigenética na formação de padrões de desenvolvimento. É também evidente o envolvimento de processos epigenéticos na resposta das plantas a agentes patogénicos e a stresses ambientais. As variantes naturais de *Arabidopsis thaliana* que evoluíram em ambientes diferentes são reveladoras do papel da regulação epigenética na adaptação ao ambiente e dos epialelos na seleção natural. Para além da *Arabidopsis*, os estudos epigenómicos em plantas são reveladores do envolvimento de processos epigenéticos ao nível da hibridação interespecífica e poliploidização e em plantas que possuem um grande número de transposões ativos como é o caso do milho. A regulação epigenética está portanto envolvida em múltiplos aspetos do desenvolvimento da planta desde a diferenciação celular à evolução e adaptação ao meio ambiente.

Mary Williams mwilliams@aspb.org ; Features Editor, The Plant Cell American Society of Plant Biologists c/o Plant Science Research Group University of Glasgow

Tradução: Ana Paula Santos (Instituto de Tecnologia Química e Biológica/UNL)

Revisão: José António Matos (Instituto Nacional de Investigação Agrária), Nelson Saibo (Instituto de Tecnologia Química e Biológica/UNL) e Cândido Pinto Ricardo (Instituto de Tecnologia Química e Biológica/UNL).

Bibliografia recomendada

(Esta é uma lista representativa de fontes que pretendem ajudar o leitor a aceder a um vasto conjunto de literatura. Pedimos desculpa antecipadamente a todos aqueles cujo trabalho não está incluído).

Artigos de Revisão

- Adrian, J., Torti, S., and Turck, F.** (2009). From decision to commitment: The molecular memory of flowering. *Mol. Plant* 2: 628–642. doi:10.1093/mp/ssp031.
- Alvarez-Venegas, R.** (2010). Regulation by polycomb and trithorax group proteins in Arabidopsis. *The Arabidopsis Book* 8: e0128, doi/ 10.1199/tab.0128.
- Beisel, C., and Paro, R.** (2011). Silencing chromatin: Comparing modes and mechanisms. *Nat. Rev. Genet.* 12: 123–135. doi:10.1038/nrg2932.
- Bemer, M., and Grossniklaus, U.** (2012). Dynamic regulation of Polycomb group activity during plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 523–529. doi:10.1016/j.pbi.2012.09.006.
- Bourc'his, D., and Voinnet, O.** (2010). A small-RNA perspective on gametogenesis, fertilization, and early zygotic development. *Science* 330: 617–622. doi:10.1126/science.1194776.
- Bucher, E., Reinders, J., and Mirouze, M.** (2012). Epigenetic control of transposon transcription and mobility in Arabidopsis. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 503–510. doi:10.1016/j.pbi.2012.08.006.
- Cedar, H., and Bergman, Y.** (2012). Programming of DNA methylation patterns. *Annu. Rev. Biochem.* 81: 97–117. doi:10.1146/annurevbiochem-052610-091920.
- Chan, S.W.-L., Henderson, I.R., and Jacobsen, S.E.** (2005). Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nat. Rev. Genet.* 6: 351–360. doi:10.1038/nrg1601.
- Chandler, V.L.** (2010). Paramutation's properties and puzzles. *Science* 330: 628–629. doi:10.1126/science.1191044.
- Chinnusamy, V., and Zhu, J.-K.** (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 133–139. doi:10.1016/j.pbi.2008.12.006.
- Creville´n, P., and Dean, C.** (2011). Regulation of the floral repressor gene FLC: The complexity of transcription in a chromatin context. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 38–44. doi:10.1016/j.pbi.2010.08.015.
- Deal, R.B., and Henikoff, S.** (2011). Histone variants and modifications in plant gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 116–122. doi:10.1016/j.pbi.2010.11.005.
- Djupedal, I., and Ekwall, K.** (2009). Epigenetics: Heterochromatin meets RNAi. *Cell Res.* 19: 282–295. doi:10.1038/cr.2009.13.

- Ekwall, K.** (2007). Epigenetic control of centromere behavior. *Annu. Rev. Genet.* 41: 63-81. doi:10.1146/annurev.genet.41.110306.130127.
- EPIC Planning Committee** (2012). Reading the second code: Mapping epigenomes to understand plant growth, development, and adaptation to the environment. *Plant Cell* 24: 2257–2261. doi:10.1105/tpc.112.100636.
- Farrona, S., Coupland, G., and Turck, F.** (2008). The impact of chromatin regulation on the floral transition. *Semin. Cell Dev. Biol.* 19: 560–573. doi:10.1016/j.semcdb.2008.07.015.
- Feil, R., and Berger, F.** (2007). Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends Genet.* 23: 192–199. doi:10.1016/j.tig.2007.02.004.
- Feng, S., and Jacobsen, S.E.** (January 11, 2011). Epigenetic modifications in plants: An evolutionary perspective. *Curr. Opin. Plant Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.12.002>.
- Feng, S., Jacobsen, S.E., and Reik, W.** (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330: 622–627. doi:10.1126/science.1190614.
- Furner, I.J., and Matzke, M.** (December 13, 2010). Methylation and demethylation of the Arabidopsis genome. *Curr. Opin. Plant Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.11.004>.
- Gehring, M., and Henikoff, S.** (2008). DNA methylation and demethylation in Arabidopsis. In *The Arabidopsis Book* 6: e0102. doi:10.1199/tab.0102.
- Grativol, C., Hemerly, A.S., and Ferreira, P.C.G.** (2012). Genetic and epigenetic regulation of stress responses in natural plant populations. *Biochim. Biophys. Acta* 1819: 176–185.
- Gutierrez-Marcos, J.F., and Dickinson, H.G.** (2012). Epigenetic reprogramming in plant reproductive lineages. *Plant Cell Physiol.* 53: 817–823. doi:10.1093/pcp/pcs052.
- Gutzat, R., and Mittelsten Scheid, O.** (2012). Epigenetic responses to stress: Triple defense? *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 568–573. doi:10.1016/j.pbi.2012.08.007.
- He, Y.** (2009). Control of the transition to flowering by chromatin modifications. *Mol. Plant* 2: 554–564. doi:10.1093/mp/ssp005.
- Henderson, I.R., and Jacobsen, S.E.** (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 447: 418–424. doi:10.1038/nature05917.
- Holec, S., and Berger, F.** (2012). Polycomb group complexes mediate developmental transitions in plants. *Plant Physiol.* 158: 35–43. doi:10.1104/pp.111.186445.
- Hollick, J.B.** (2012). Paramutation: A trans-homolog interaction affecting heritable gene regulation. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 536–543. doi:10.1016/j.pbi.2012.09.003.
- Ikeda, Y.** (2012). Plant imprinted genes identified by genome-wide approaches and their regulatory mechanisms. *Plant Cell Physiol.* 53: 809–816. doi:10.1093/pcp/pcs049.

- Jiang, J., Birchler, J.A., Parrott, W.A., and Dawe, R.K.** (2003). A molecular view of plant centromeres. *Trends Plant Sci.* 8: 570–575.
- Jullien, P.E., and Berger, F.** (2009). Gamete-specific epigenetic mechanisms shape genomic imprinting. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12: 637–642. doi:10.1016/j.pbi.2009.07.004.
- Kim, D.-H., and Sung, S.** (2012). Environmentally coordinated epigenetic silencing of FLC by protein and long noncoding RNA components. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 51–56. doi:10.1016/j.pbi.2011.10.004.
- Kim, J.-M., To, T.K., and Seki, M.** (2012). An epigenetic integrator: new insights into genome regulation, environmental stress responses and developmental controls by histone deacetylase 6. *Plant Cell Physiol.* 53: 794–800. doi:10.1093/pcp/pcs004.
- Köhler, C., and Hennig, L.** (2010). Regulation of cell identity by plant Polycomb and trithorax group proteins. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 20: 541–547. doi:10.1016/j.gde.2010.04.015.
- Köhler, C., and Villar, C.B.R.** (2008). Programming of gene expression by Polycomb group proteins. *Trends Cell Biol.* 18: 236–243. doi:10.1016/j.tcb.2008.02.005.
- Köhler, C., Wolff, P., and Spillane, C.** (2012). Epigenetic mechanisms underlying genomic imprinting in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 331–352. doi:10.1146/annurev-arplant-042811-105514.
- Lisch, D.** (2009). Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60: 43–66. doi:10.1146/annurev.arplant.59.032607.092744.
- Lisch, D.** (2012). Regulation of transposable elements in maize. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 511–516. doi:10.1016/j.pbi.2012.07.001.
- Martinez, G., and Slotkin, R.K.** (2012). Developmental relaxation of transposable element silencing in plants: Functional or byproduct? *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 496–502. doi:10.1016/j.pbi.2012.09.001.
- Matzke, M., Kanno, T., Daxinger, L., Huettel, B., and Matzke, A.J.** (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21: 367–376. doi:10.1016/j.ceb.2009.01.025.
- Mirouze, M., and Paszkowski, J.** (2011). Epigenetic contribution to stress adaptation in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 267–274. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.004.
- Mosher, R.A., and Melnyk, C.W.** (2010). siRNAs and DNA methylation: Seedy epigenetics. *Trends Plant Sci.* 15: 204–210. doi:10.1016/j.tplants.2010.01.002.
- Pien, S., and Grossniklaus, U.** (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in Arabidopsis. *Biochim. Biophys. Acta* 1769: 375–382.
- Pignatta, D., and Gehring, M.** (2012). Imprinting meets genomics: New insights and new challenges. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 530–535. doi:10.1016/j.pbi.2012.09.004.

- Richards, E.J.** (2011). Natural epigenetic variation in plant species: a view from the field. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 204–209. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.009.
- Roudier, F., Teixeira, F.K., and Colot, V.** (2009). Chromatin indexing in Arabidopsis: An epigenomic tale of tails and more. *Trends Genet.* 25: 511–517. doi:10.1016/j.tig.2009.09.013.
- Saze, H., and Kakutani, T.** (2011). Differentiation of epigenetic modifications between transposons and genes. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 81–87. doi:10.1016/j.pbi.2010.08.017.
- Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., and Nishimura, T.** (2012). DNA methylation in plants: Relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol.* 53: 766–784. doi:10.1093/pcp/pcs008.
- Schmitz, R.J., and Ecker, J.R.** (2012). Epigenetic and epigenomic variation in Arabidopsis thaliana. *Trends Plant Sci.* 17: 149–154. doi:10.1016/j.tplants.2012.01.001.
- Simon, S.A., and Meyers, B.C.** (2010). Small RNA-mediated epigenetic modifications in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2010.11.007>.
- Slotkin, R.K., and Martienssen, R.** (2007). Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* 8: 272–285. doi:10.1038/nrg2072.
- Song, J., Angel, A., Howard, M., and Dean, C.** (2012). Vernalization -A cold-induced epigenetic switch. *J. Cell Sci.* 125: 3723–3731. doi:10.1242/jcs.084764.
- Springer, N.M.** (2009). Small RNAs: How seeds remember to obey their mother. *Curr. Biol.* 19: R649–R651. doi:10.1016/j.cub.2009.06.049.
- Springer, N.M.** (2012). Epigenetics and crop improvement. *Trends Genet.* (in press).
- Staiger, D., Korneli, C., Lummer, M., and Navarro, L.** (2013). Emerging role for RNA-based regulation in plant immunity. *New Phytol.* 197: 394–404. doi:10.1111/nph.12022.
- Stam, M.** (2009). Paramutation: A heritable change in gene expression by allelic interactions in trans. *Mol. Plant* 2: 578–588. doi:10.1093/mp/ssp020.
- Su, Z., Han, L., and Zhao, Z.** (2011). Conservation and divergence of DNA methylation in eukaryotes: new insights from single base-resolution DNA methylomes. *Epigenetics* 6: 134–140. doi:10.4161/epi.6.2.13875.
- Wollmann, H., and Berger, F.** (2012). Epigenetic reprogramming during plant reproduction and seed development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15: 63–69. doi:10.1016/j.pbi.2011.10.001.
- Zhang, X.** (2008). The epigenetic landscape of plants. *Science* 320: 489–492. doi:10.1126/science.1153996.

Artigos fundamentais

- Alleman, M., Sidorenko, L., McGinnis, K., Seshadri, V., Dorweiler, J.E., White, J., Sikkink, K., and Chandler, V.L.** (2006). An RNA-dependent RNA polymerase is required for paramutation in maize. *Nature* 442: 295–298. doi:10.1038/nature04884.
- Autran, D., et al.** (2011). Maternal epigenetic pathways control parental contributions to Arabidopsis early embryogenesis. *Cell* 145: 707–719. doi:10.1016/j.cell.2011.04.014.
- Bastow, R., Mylne, J.S., Lister, C., Lippmann, Z., Martienssen, R.A., and Dean, C.** (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature* 427: 164–167. doi:10.1038/nature02269.
- Becker, C., Haggmann, J., Müller, J., Koenig, D., Stegle, O., Borgwardt, K., and Weigel, D.** (2011). Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature* 480: 245–249. doi:10.1038/nature10555.
- Bernatavichute, Y.V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E.** (2008). Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 3: e3156. doi:10.1371/journal.pone.0003156.
- Calarco, J.P., Borges, F., Donoghue, M.T., Van Ex, F., Jullien, P.E., Lopes, T., Gardner, R., Berger, F., Feijó, J.A., Becker, J.D., and Martienssen, R.A.** (2012). Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell* 151: 194–205. doi:10.1016/j.cell.2012.09.001.
- Choi, J., Hyun, Y., Kang, M.-J., Yun, H.I., Yun, J.-Y., Lister, C., Dean, C., Amasino, R.M., Noh, B., Noh, Y.-S., and Choi, Y.** (2009). Resetting and regulation of FLOWERING LOCUS C expression during Arabidopsis reproductive development. *Plant J.* 57: 918–931. doi:10.1111/j.1365-3113.2008.03776.x.
- Cokus, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C.D., Pradhan, S., Nelson, S.F., Pellegrini, M., and Jacobsen, S.E.** (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452: 215–219. doi:10.1038/nature06745.
- Costa, L.M., Yuan, J., Rouster, J., Paul, W., Dickinson, H., and Gutierrez-Marcos, J.F.** (2012). Maternal control of nutrient allocation in plant seeds by genomic imprinting. *Curr. Biol.* 22: 160–165. doi:10.1016/j.cub.2011.11.059.
- Deal, R.B., Topp, C.N., McKinney, E.C., and Meagher, R.B.** (2007). Repression of flowering in Arabidopsis requires activation of FLOWERING LOCUS C expression by the histone variant H2A.Z. *Plant Cell* 19: 74–83. doi:10.1105/tpc.106.048447.
- De Lucia, F., Crevillen, P., Jones, A.M., Greb, T., and Dean, C.** (2008). A PHD-Polycomb repressive complex 2 triggers the epigenetic silencing of FLC during vernalization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 16831–16836. doi:10.1073/pnas.0808687105.
- Downen, R.H., Pelizzola, M., Schmitz, R.J., Lister, R., Downen, J.M., Nery, J.R., Dixon, J.E., and Ecker, J.R.** (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: E2183–E2191. doi:10.1073/pnas.1209329109.

- Erhard, K.F., Jr., Stonaker, J.L., Parkinson, S.E., Lim, J.P., Hale, C.J., and Hollick, J.B.** (2009). RNA Polymerase IV functions in paramutation in *Zea mays*. *Science* 323: 1201–1205. doi:10.1126/science.1164508.
- Exner, V., Aichinger, E., Shu, H., Wildhaber, T., Alfarano, P., Cafisch, A., Gruissem, W., Köhler, C., and Hennig, L.** (2009). The chromodomain of LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN1 is essential for H3K27me3 binding and function during Arabidopsis development. *PLoS ONE* 4: e5335. doi:10.1371/journal.pone.0005335.
- Finnegan, E.J., and Dennis, E.S.** (2007). Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at FLC is not maintained in mitotically quiescent cells. *Curr. Biol.* 17: 1978–1983. doi:10.1016/j.cub.2007.10.026.
- Gehring, M., Bubb, K.L., and Henikoff, S.** (2009). Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science* 324: 1447–1451. doi:10.1126/science.1171609.
- Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.-F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B., and Fischer, R.L.** (2006). DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA Polycomb gene self-imprinting by allele specific demethylation. *Cell* 124: 495–506. doi:10.1016/j.cell.2005.12.034.
- Gehring, M., Missirian, V., and Henikoff, S.** (2011). Genomic analysis of parent-of-origin allelic expression in *Arabidopsis thaliana* seeds. *PLoS ONE* 6: e23687. doi:10.1371/journal.pone.0023687.
- Greenberg, M.V., Ausin, I., Chan, S.W., Cokus, S.J., Cuperus, J.T., Feng, S., Law, J.A., Chu, C., Pellegrini, M., Carrington, J.C., and Jacobsen, S.E.** (2011). Identification of genes required for *de novo* DNA methylation in Arabidopsis. *Epigenetics* 6: 344–354. doi:10.4161/epi.6.3.14242.
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.-P., Hoepfner, M.A., and Gagliano, W.B.** (1998). Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a Polycomb Group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280: 446–450. doi:10.1126/science.280.5362.446.
- Gutzat, R., Borghi, L., and Gruissem, W.** (2012). Emerging roles of RETINOBLASTOMA-RELATED proteins in evolution and plant development. *Trends Plant Sci.* 17: 139–148. doi:10.1016/j.tplants.2011.12.001.
- He, C., Chen, X., Huang, H., and Xu, L.** (2012). Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured *Arabidopsis* tissues. *PLoS Genet.* 8: e1002911. doi:10.1371/journal.pgen.1002911.
- Henderson, I.R., and Jacobsen, S.E.** (2008). Tandem repeats upstream of the *Arabidopsis* endogene SDC recruit non-CG DNA methylation and initiation siRNA spreading. *Genes Dev.* 22: 1597–1606. doi:10.1101/gad.1667808.
- Heo, J.B., Sung, S.** (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* 331: 76–79. doi:10.1126/science.1197349.
- Hsieh, T.-F., Ibarra, C.A., Silva, P., Zemach, A., Eshed-Williams, L., Fischer, R.L., and Zilberman, D.** (2009). Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science* 324: 1451–1454. doi:10.1126/science.1172417.
- Hsieh, T.-F., Shin, J., Uzawa, R., Silva, P., Cohen, S., Bauer, M.J., Hashimoto, M., Kirkbride, R.C., Harada, J.J., Zilberman, D., and Fischer, R.L.** (2011). Regulation of imprinted gene expression in *Arabidopsis* endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 1755–1762. doi:10.1073/pnas.1019273108.

Ikeda, Y., Kinoshita, Y., Susaki, D., Ikeda, Y., Iwano, M., Takayama, S., Higashiyama, T., Kakutani, T., and Kinoshita, T. (2011). HMG domain containing SSRP1 is required for DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 21: 589–596. doi:10.1016/j.devcel.2011.08.013.

Ito, H., Gaubert, H., Bucher, E., Mirouze, M., Vaillant, I., and Paszkowski, J. (2011). An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* 472: 115–119. doi:10.1038/nature09861.

Jean Finnegan, E., Bond, D.M., Buzas, D.M., Goodrich, J., Helliwell, C.A., Tamada, Y., Yun, J.Y., Amasino, R.M., and Dennis, E.S. (2011). Polycomb proteins regulate the quantitative induction of VERNALIZATION INSENSITIVE 3 in response to low temperatures. *Plant J.* 65: 382–391. doi:10.1111/j.1365-313X.2010.04428.x.

Kakutani, T., Jeddelloh, J.A., Flowers, S.K., Munakata, K., and Richards, E.J. (1996). Developmental abnormalities and epimutations associated with DNA hypomethylation mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 12406–12411. doi:10.1073/pnas.93.22.12406.

Kinoshita, Y., Saze, H., Kinoshita, T., Miura, A., Soppe, W.J.J., Koornneef, M., and Kakutani, T. (2006). Control of FWA gene silencing in *Arabidopsis thaliana* by SINE-related direct repeats. *Plant J.* 49: 38–45. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02936.x.

Lafos, M., Kroll, P., Hohenstatt, M.L., Thorpe, F.L., Clarenz, O., and Schubert, D. (2011). Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during *Arabidopsis* differentiation. *PLoSGenet.* 7: e1002040. doi:10.1371/journal.pgen.1002040.

Lippman, Z., et al. (2004). Role of transposable elements in heterochromatin and epigenetic control. *Nature* 430: 471–476. doi:10.1038/nature02651.

Lister, R., O'Malley, R.C., Tonti-Filippini, J., Gregory, B.D., Berry, C.C., Millar, A.H., and Ecker, J.R. (2008). Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell* 133: 523–536. doi:10.1016/j.cell.2008.03.029.

Manzano, C., Ramirez-Parra, E., Casimiro, I., Otero, S., Desvoyes, B., De Rybel, B., Beeckman, T., Casero, P., Gutierrez, C., and C Del Pozo, J. (2012). Auxin and epigenetic regulation of SKP2B, an F-box that represses lateral root formation. *Plant Physiol.* 160: 749–762. doi:10.1104/pp.112.198341.

March-Díaz, R., García-Domínguez, M., Lozano-Juste, J., León, J., Florencio, F.J., and Reyes, J.C. (2008). Histone H2A.Z and homologues of components of the SWR1 complex are required to control immunity in *Arabidopsis*. *Plant J.* 53: 475–487. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03361.x.

Mirouze, M., Reinders, J., Bucher, E., Nishimura, T., Schneeberger, K., Ossowski, S., Cao, J., Weigel, D., Paszkowski, J., and Mathieu, O. (2009). Selective epigenetic control of retrotransposition in *Arabidopsis*. *Nature* 461: 427–430. doi:10.1038/nature08328.

- Miura, A., Yonebayashi, S., Watanabe, K., Toyama, T., Shimada, H., and Kakutani, T.** (2001). Mobilization of transposons by a mutation abolishing full DNA methylation in *Arabidopsis*. *Nature* 411: 212–214. doi:10.1038/35075612.
- Mosher, R.A., Melnyk, C.W., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Studholme, D.J., and Baulcombe, D.C.** (2009). Uniparental expression of PolIV dependent siRNAs in developing endosperm of *Arabidopsis*. *Nature* 460: 283–287. doi:10.1038/nature08084.
- Mylne, J.S., Barrett, L., Tessadori, F., Mesnage, S., Johnson, L., Bernatavichute, Y.V., Jacobsen, S.E., Fransz, P., and Dean, C.** (2006). LHP1, the Arabidopsis homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN1, is required for epigenetic silencing of FLC. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 5012–5017. doi:10.1073/pnas.0507427103.
- Nodine, M.D., and Bartel, D.P.** (2012). Maternal and paternal genomes contribute equally to the transcriptome of early plant embryos. *Nature* 482: 94–97. doi:10.1038/nature10756.
- Pazhouhandeh, M., Molinier, J., Berr, A., and Genschik, P.** (2011). MSI4/FVE interacts with CUL4-DDB1 and a PRC2-like complex to control epigenetic regulation of flowering time in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 3430–3435. doi:10.1073/pnas.1018242108.
- Pien, S., Fleury, D., Mylne, J.S., Crevillen, P., Inze, D., Avramova, Z., Dean, C., and Grossniklaus, U.** (2008). ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates FLOWERING LOCUS C activation via histone 3 lysine4trimethylation. *Plant Cell* 20: 580–588. doi:10.1105/tpc.108.058172.
- Raissig, M.T., Baroux, C., and Grossniklaus, U.** (2011). Regulation and flexibility of genomic imprinting during seed development. *Plant Cell* 23: 16–26. doi:10.1105/tpc.110.081018.
- Ravi, M., and Chan, S.W.L.** (2010). Haploid plants produced by centromere-mediated genome elimination. *Nature* 464: 615–618. doi:10.1038/nature08842.
- Ronemus, M.J., Galbiati, M., Ticknor, T., Chen, J., and Dellaporta, S.L.** (1996). Demethylation-induced developmental pleiotropy in Arabidopsis. *Science* 273: 654–657. doi:10.1126/science.273.5275.654.
- Schmitz, R.J., Schultz, M.D., Lewsey, M.G., O'Malley, R.C., Urich, M.A., Libiger, O., Schork, N.J., and Ecker, J.R.** (2011). Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. *Science* 334: 369–373. doi:10.1126/science.1212959.
- Shi, L., Wang, J., Hong, F., Spector, D.L., and Fang, Y.** (2011). Four amino acids guide the assembly or disassembly of Arabidopsis histone H3.3-containing nucleosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 10574–10578. doi:10.1073/pnas.1017882108.
- Slotkin, R.K., Freeling, M., and Lisch, D.** (2005). Heritable transposon silencing initiated by a naturally occurring transposon inverted duplication. *Nat. Genet.* 37: 641–644. doi:10.1038/ng1576.
- Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdžić, M., Becker, J.D., Feijó, J.A., and Martienssen, R.A.** (2009). Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136: 461–472. doi:10.1016/j.cell.2008.12.038.

- Soppe, W.J.J., Jacobsen, S.E., Alonso-Blanco, C., Jackson, J.P., Kakutani, T., Koornneef, M., and Peeters, A.J.M.** (2000). The late flowering phenotype of *fwa* mutants is caused by gain-of-function epigenetic alleles of a homeo domain gene. *Mol. Cell* 6: 791–802. doi:10.1016/S1097-2765(05)00090-0.
- Stroud, H., Greenberg, M.V., Feng, S., Bernatavichute, Y.V., and Jacobsen, S.E.** (2013). Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis* methylome. *Cell* 152: 352–364. doi:10.1016/j.cell.2012.10.054.
- Stroud, H., Otero, S., Desvoyes, B., Ramírez-Parra, E., Jacobsen, S.E., and Gutierrez, C.** (2012). Genome-wide analysis of histone H3.1 and H3.3 variants in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 109: 5370–5375. doi:10.1073/pnas.1203145109.
- Sung, S., Amasino, R.M.** (2004). Vernalization in *Arabidopsis thaliana* is mediated by the PHD finger protein VIN3. *Nature* 427: 159–164. doi:10.1038/nature02195.
- Sung, S., He, Y., Eshoo, T.W., Tamada, Y., Johnson, L., Nakahigashi, K., Goto, K., Jacobsen, S.E., and Amasino, R.M.** (2006). Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1. *Nat. Genet.* 38: 706–710. doi:10.1038/ng1795.
- Swiezewski, S., Liu, F., Magusin, A., and Dean, C.** (2009). Cold-induced silencing by long antisense transcripts of an *Arabidopsis* Polycomb target. *Nature* 462: 799–802. doi:10.1038/nature08618.
- Tamada, Y., Yun, J.-Y., Woo, S.C., and Amasino, R.M.** (2009). ARABIDOPSIS TRITHORAX-RELATED7 is required for methylation of lysine4 of histone H3 and for transcriptional activation of FLOWERING LOCUS C. *Plant Cell* 21: 3257–3269. doi:10.1105/tpc.109.070060.
- Tricker, P.J., Gibbings, J.G., Rodríguez López, C.M., Hadley, P., and Wilkinson, M.J.** (2012). Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *J. Exp. Bot.* 63: 3799–3813. doi:10.1093/jxb/ers076.
- Tsukahara, S., Kobayashi, A., Kawabe, A., Mathieu, O., Miura, A., and Kakutani, T.** (2009). Bursts of retrotransposition reproduced in *Arabidopsis*. *Nature* 461: 423–426. doi:10.1038/nature08351.
- Turck, F., Roudier, F., Farrona, S., Martin-Magniette, M.L., Guillaume, E., Buisine, N., Gagnot, S., Martienssen, R.A., Coupland, G., and Colot, V.** (2007). *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *PLoS Genet.* 3: e86. doi:10.1371/journal.pgen.0030086.
- Wang, X., Elling, A.A., Li, X., Li, N., Peng, Z., He, G., Sun, H., Qi, Y., Liu, X.S., and Deng, X.W.** (2009). Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *Plant Cell* 21: 1053–1069. doi:10.1105/tpc.109.065714.
- Wood, C.C., Robertson, M., Tanner, G., Peacock, W.J., Dennis, E.S., and Helliwell, C.A.** (2006). The *Arabidopsis thaliana* vernalization response requires a Polycomb-like protein complex that also includes VERNALIZATION INSENSITIVE 3. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103: 14631–14636. doi:10.1073/pnas.0606385103.

- Xu, L., and Shen, W.-H.** (2008). Polycomb silencing of KNOX genes confines shoot stem cell niches in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 18: 1966–1971. doi:10.1016/j.cub.2008.11.019.
- Yelina, N.E., et al.** (2012). Epigenetic remodeling of meiotic crossover frequency in *Arabidopsis thaliana* DNA methyltransferase mutants. *PLoS Genet.* 8: e1002844. doi:10.1371/journal.pgen.1002844.
- Zhang, M., Zhao, H., Xie, S., Chen, J., Xu, Y., Wang, K., Zhao, H., Guan, H., Hu, X., Jiao, Y., Song, W., and Lai, J.** (2011). Extensive, clustered parental imprinting of protein-coding and noncoding RNAs in developing maize endosperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 20042–20047. doi:10.1073/pnas.1112186108.
- Zhang, W., Lee, H.-R., Koo, D.-H., and Jiang, J.** (2008). Epigenetic modification of centromeric chromatin: hypomethylation of DNA sequences in the CENH3-associated chromatin in *Arabidopsis thaliana* and maize. *Plant Cell* 20: 25–34. doi:10.1105/tpc.107.057083.
- Zhang, X., Clarenz, O., Cokus, S., Bernatavichute, Y.V., Pellegrini, M., Goodrich, J., and Jacobsen, S.E.** (2007a). Whole genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 5: e129.
- Zhang, X., Germann, S., Blus, B.J., Khorasanizadeh, S., Gaudin, V., and Jacobsen, S.E.** (2007). The *Arabidopsis* LHP1 protein colocalizes with histone H3 Lys27 trimethylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 14: 869–871. doi:10.1038/nsmb1283.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W.-L., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., and Ecker, J.R.** (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126: 1189–1201. doi:10.1016/j.cell.2006.08.003.
- Zhong, S., Fei, Z., Chen, Y.R., Zheng, Y., Huang, M., Vrebalov, J., McQuinn, R., Gapper, N., Liu, B., Xiang, J., Shao, Y., and Giovannoni, J.J.** (2013). Single-base resolution methylomes of tomato fruit development reveal epigenome modifications associated with ripening. *Nat. Biotechnol.* 31: 154–159. doi:10.1038/nbt.2462.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T., and Henikoff, S.** (2008). Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* 456: 125–129. doi:10.1038/nature07324.
- Zilberman, D., Gehring, M., Tran, R.K., Ballinger, T., and Henikoff, S.** (2007). Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. *Nat. Genet.* 39: 61–69. doi:10.1038/ng1929.

Artigos de metodologias

- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Martienssen, R., and Colot, V.** (2005). Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *Nat. Methods* 2: 213–218. doi:10.1038/nmeth0305-213.
- Germann, S., Juul-Jensen, T., Letarnec, B., and Gaudin, V.** (2006). DamID, a new tool for studying plant chromatin profiling *in vivo*, and its use to identify putative LHP1 target loci. *Plant J.* 48: 153–163. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02859.x.

- Liu, L., Li, Y., Li, S., Hu, N., He, Y., Pong, R., Lin, D., Lu, L., and Law, M.** (2012). Comparison of next-generation sequencing systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 251364.
- Mardis, E.R.** (2011). A decade's perspective on DNA sequencing technology. *Nature* 470: 198–203. doi:10.1038/nature09796.
- Orian, A.** (2006). Chromatin profiling, DamID and the emerging landscape of gene expression. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 16: 157–164. doi: 10.1016/j.gde.2006.02.008.
- Quail, M.A., Smith, M., Coupland, P., Otto, T.D., Harris, S.R., Connor, T.R., Bertoni, A., Swerdlow, H.P., and Gu, Y.** (2012). A tale of three next generation sequencing platforms: comparison of Ion Torrent, Pacific Biosciences and Illumina MiSeq sequencers. *BMC Genomics* 13: 341. doi:10.1186/1471-2164-13-341.
- Rodríguez, J.L., et al.** (2012). Basic procedures for epigenetic analysis in plant cell and tissue culture. *Methods Mol. Biol.* 877: 325–341. doi:10.1007/978-1-61779-818-4_25.
- Rusk, N., and Kiermer, V.** (2008). Primer: Sequencing– the next generation. *Nat. Methods* 5: 15. doi:10.1038/nmeth1155.
- Schmitz, R.J., and Zhang, X.** (2011). High-throughput approaches for plant epigenomic studies. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 130–136. doi:10.1016/j.pbi.2011.03.010.
- Shendure, J., and Ji, H.** (2008). Next-generation DNA sequencing. *Nat. Biotechnol.* 26: 1135–1145. doi:10.1038/nbt1486.
- Sucher, N.J., Hennell, J.R., and Carles, M.C.** (2012). DNA fingerprinting, DNA barcoding, and next generation sequencing technology in plants. *Methods Mol. Biol.* 862: 13–22. doi:10.1007/978-1-61779-6098_2.
- van Steensel, B.** (2005). Mapping of genetic and epigenetic regulatory networks using microarrays. *Nat. Genet.* 37: S18–S24. doi:10.1038/ng1559.
- Xiao, W.** (2012). Specialized technologies for epigenetics in plants. *Methods Mol. Biol.* 925: 231–247. doi:10.1007/978-1-62703-011-3_16.