

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Speciální chemicko-biologické obory
Molekulární biologie a biochemie organismů



Štěpán Mareš

Význam epigenetické variability v evoluci klonálních rostlin
Importance of epigenetic variability in evolution of clonal plants

Bakalářská práce

Vedoucí práce: Jan Pinc

Praha, 2020

Poděkování:

Rád bych poděkoval především svému školiteli Janu Pincovi za profesionalitu a velkou trpělivost, ochotu pomoci mi se vzniklými problémy a za cenné rady, které mi práci velmi ulehčily. Dále bych chtěl poděkovat rodičům a Jakubovi Žohovi, kteří se mnou psaní bakalářské práce a samotné studium dlouho prožívali a byli pro mne velkou oporou.

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval samostatně a že jsem uvedl všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce a ani žádná její část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze,

Podpis

Abstrakt

Klonální rostliny jsou díky své nízké genetické variabilitě a omezené schopnosti reagovat na okolní prostředí často považovány za slepou evoluční větev. Na druhou stranu řady studií z posledních let ukazují, že klonální rostliny jsou schopny reagovat na okolní prostředí pomocí epigenetických mechanismů, zejména methylace DNA. Epigenetická informace může být navíc u klonálních rostlin předána i do následujících generací (tzv. transgenerační paměť) a může tak zajistit lepší fitness následující klonální generace. Cílem této práce je shrnutí dosavadních poznatků o roli epigenetické variability v životě klonálních rostlin, které jsou známé svou omezenou genetickou variabilitou.

Klíčová slova: epigenetika, epigenetická variabilita, klonální rostliny, methylace DNA, transgenerační paměť

Abstract

Because of their low genetic variability and limited ability to respond to the changing environment, clonal plants are often considered an evolutionary dead end. On the other hand, numerous recent studies showed that clonal plants can react to the changing environment through epigenetic mechanisms, especially through DNA methylation. Moreover, epigenetic information in clonal plants can be transferred to future generations (so-called transgenerational memory). As a result, epigenetics can ensure better fitness of the next clonal generation. The aim of this work is to summarize the knowledge about the role of epigenetic variability in the life of clonal plants performing limited genetic variability.

Key words: epigenetics, DNA methylation, epigenetics variation, clonal plants, transgeneration memory

Obsah

1. Úvod	6
2. Epigenetické mechanismy	7
2.1. Methylace DNA	7
2.2. Modifikace histonů	9
2.3. RNA Interference.....	10
2.4. Ubiquitinace	10
2.5. Sumoylace.....	10
3. Metody využívané k detekci methylace DNA	11
3.2. Metoda HPLC	11
3.3. Metoda MSAP	12
3.4. Sekvenování ChIP.....	12
3.5. Bisulfidové sekvenování	13
3.6. Experimentální přístup	15
4. Význam epigenetické variability v evoluci a ekologii klonálních rostlin.....	16
4.1. Epigeneticky řízené vlastnosti.....	17
4.2. Příklady	18
4.2.1. Transgenerační paměť	18
4.2.2. Epigeneticky řízené vlastnosti	19
4.2.3. Epigeneticky řízená rostlinná adaptabilita.....	21
5. Diskuze.....	23
6. Závěr	24
7. Seznam literatury	25

1. Úvod

Rostliny jakožto přisedlé organismy se musí velmi často vyrovnávat s nepříznivými podmínkami okolí a musí na ně přímo reagovat, protože ze svých stanovišť nemohou migrovat jako někteří živočichové. U rostlin by tedy mělo docházet k určitým procesům, pomocí kterých dokážou reagovat na okolní prostředí. Mezi takové procesy by mohly patřit adaptace neboli schopnosti organismu přizpůsobit se prostředí. Tato schopnost je u rostlin většinou spojována s genetickou variabilitou, která v první řadě ovlivňuje fenotyp rostliny. Avšak u klonálních rostlin, u nichž zůstává genetická informace neměnná, musí docházet k jinému procesu, díky kterému se rostliny dokážou přizpůsobit. Jedna z možností by mohla být epigenetická variabilita (Stuefer et al. 2010).

Epigenetická variabilita je proměnlivost epigenetických vzorců, které jsou zprostředkovány různými mechanismy. Tyto mechanismy bychom mohli definovat jako mechanismy ovlivňující změnu genové exprese beze změny nukleotidové sekvence (Bird, 2002). Jednotlivé dědičné znaky, tedy projevy jednotlivých genů, nemusí být vázány pouze na sekvenci nukleových kyselin DNA či RNA, a přesto se ve fenotypu mohou projevit. Mezi tyto mechanismy bychom mohli zařadit například modifikace histonů (2.2), RNA interference (Fire et al. 1998), ubiquitinace (King et al. 2006), sumoylace (Geiss-Friedlander et al. 2007), či různé začleňování se malých RNA struktur (Volpe et al. 2002). Avšak mezi neznámější a momentálně nejlépe probádané epigenetické procesy patří methylace DNA. Methylace DNA může ovlivňovat schopnost rostlin reagovat na vnější podněty, jako jsou například reakce na patogeny či na abiotický stres (Cubas et al. 1999; Gao et al. 2010). Se změnou methylace DNA mohou přicházet i změny fenotypu. Tyto změny vzniklé v reakci na stresové podmínky se následně navíc mohou přenášet z generace na generaci pomocí specifických enzymů. Díky přenosu pak následující generace rostlin získává vlastnosti, které získaly již rostliny před nimi, a nové rostliny tedy mohou lépe reagovat na okolní podmínky (Verhoeven et al. 2010).

Ve své bakalářské práci jsem se rozhodl věnovat právě epigenetické variabilitě klonálních rostlin. V práci bych rád přiblížil rozdílné epigenetické mechanismy a krátce shrnul metody, jež nám mohou odhalit změny v methylačním vzorci. Dále se chci zaměřit na studie z posledních let, které se zabývají danou tematikou. Díky tomu bych pak rád poukázal na to, že epigenetika má v adaptaci klonálních rostlin danému

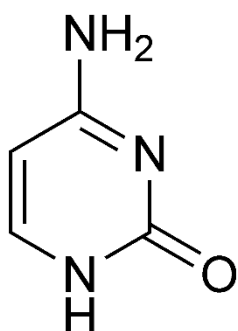
prostředí velký význam a že se epigenetická informace může přenášet z generace na generaci.

2. Epigenetické mechanismy

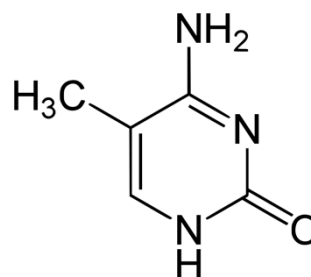
Epigenetické mechanismy jsou procesy, při kterých dochází k modifikacím DNA, avšak nedochází ke změnám v pořadí nukleotidů (Snustat et al. 2009).

2.1. Methylace DNA

Methylace DNA je jedním z nejznámějších epigenetických mechanismů ovlivňující genovou expresi (Razin and Riggs, 1980). Methylace DNA je rozšířena v různých stupních mezi všemi eukaryotickými organismy. Je zprostředkována přidáváním metylové skupiny na cytosin za vzniku 5-methylcytosinu (obr. č. 1) či na adenin za vzniku 6-methyladeninu (obr. č. 2). Takto methylované nukleotidy jsou pak inkorporovány do DNA templátu (Kim et al. 2009). Velké množství takto vzniklých methylací se však v průběhu meiozy vytrácí (Feng et al. 2011; Paszkowski and Grossniklaus, 2011). U rostlin jakožto u přisedlých organismů je obzvláště důležitá především methylace cytosinu, protože může ovlivnit fenotypovou plasticitu (Pigliucci, 2005).

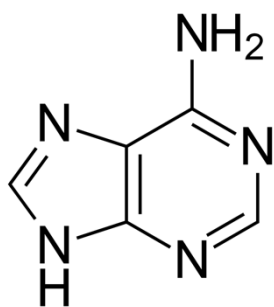


cytosin

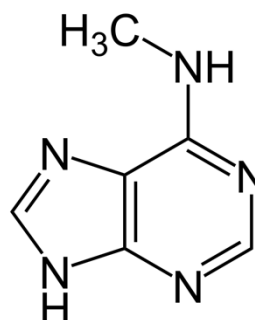


5-methylcytosin

obr. č. 1: Cytosin a 5-methylcytosin. Převzato a upraveno z Toronto Research Chemicals (www.trc-canada.com)



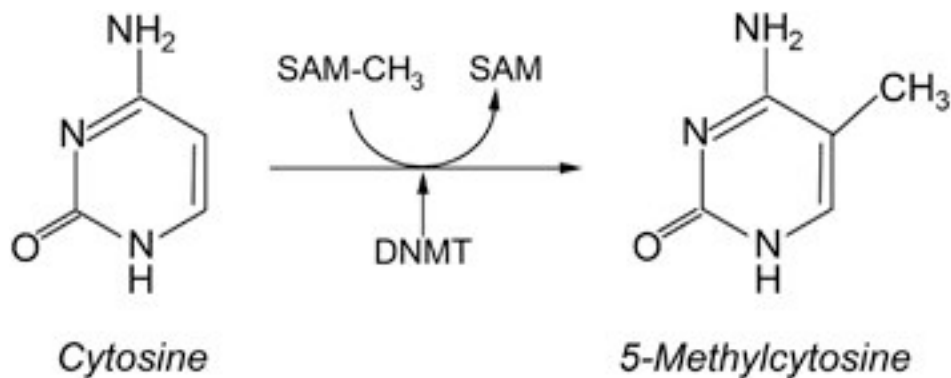
Adenine



6-methyladenin

obr. č. 2: Adenine a 6-methyladenin. Převzato a upraveno z Toronto Research Chemicals (www.trc-canada.com)

Za vznik a přenos methylace DNA jsou zodpovědné enzymy DNA methyltransferázy. DNA methyltransferáz je několik typů, které se liší podle své funkce a společně se podílejí na základní epigenetické transkripční paměti. DNA methyltransferázy obecně fungují tak, že přenášejí metylovou skupinu z S-adenosil-1-methioninu na pátý uhlík cytosinu za vzniku 5-methylcytosinu (obr. č. 3) (Finnegan et al. 1996).



Obr. č. 3: Změna Cytosinu na 5-methylcytosin za pomoci S-adenosil-1-methioninu. Převzato z Gibney a Nolan 2010

Mezi nejznámější typy DNA methyltransferáz patří například:

- a) DNA Methyltransferáza 1 (DNMT1) je zodpovědná za udržení methylace a je díky ní zajištěn přenos epigenetických vzorů. Tato methyltransferáza je také zodpovědná za přenos metylové skupiny během replikace na cytosin, který se nachází na dceřiném neboli nově vznikajícím vlákně. Přenos je pak uskutečněn podle vzoru vlákna stávajícího (Hermann et al. 2004).

- b) DNA Methyltransferáza 2 (DNMT2) zatím nemá jasně specifikovanou funkci, ale zdá se, že ovlivňuje metylaci tRNA. Dokázalo se totiž, že DNMT2 metyluje konkrétně 38. cytosin v tRNA. (Goll et al. 2006)
- c) *De novo* methyltransferáza (DNMT3) nepotřebuje ke své funkci již hemimethylovanou DNA. Je zodpovědná za nově vznikající methylace genomu. (Okano et al. 1999).

Míra methylace vzrůstá spolu s velikostí genomu vyšších rostlin. Vysvětlujeme to především větším množstvím nekódujících a repetitivních sekvencí či transponovatelných elementů, které jsou u rostlin většinou velmi hustě methylovány (Alonso et al. 2015).

Opakem methylace je demethylace, což je děj, při kterém dochází k odstranění metylové skupiny. Rozlišuje se aktivní a pasivní forma demethylace. Aktivní forma je nezávislá na replikaci DNA a odstraňuje metylovou skupinu přímo (Neidhart, 2015), kdežto pasivní demethylace probíhá při replikaci DNA, u níž je inhibována DNMT1 methyltransferáza. Inhibicí methyltransferázy nedochází ke vzniku nových methylací. Samotná inhibice může nastat například při použití 5-azacytidinu, což je jedno z demethylačních činidel, které je zodpovědné právě za inhibici DNMT1 (González et al. 2016).

2.2. Modifikace histonů

Histony podléhají různým změnám a posttranslačním modifikacím, jako jsou například acetylace, methylace či fosforylace. Acetylace a fosforylace histonů souvisí s kondenzací chromozomů (Struhl 1998).

Acetylaci histonů nacházíme v transkripčně aktivních úsecích genomu. Způsobuje vyrušení pozitivního náboje, což umožní uvolnění DNA z histonového oktameru a transkripci uvolněného úseku (Waterborg, 2002). Opakem acetylace je deacetylace, která vyvolá zvýšení pozitivního náboje a tím těsné navázání DNA zpět k histonům. Tento druh modifikací zapřičiňují enzymy histon acetyltransferázy a histon deacetylázy. Deacetylace histonů také souvisí s již zmiňovanou methylací DNA a přestavbou euchromatinu do inaktivní formy nazývané heterochromatin (Hublitz et al. 2009). Methylace histonů je přenos metylové skupiny na aminokyseliny histonových proteinů tvořící nukleosomy. Methylace histonů buď zvyšuje, či snižuje

transkripci genů, a to v závislosti na tom, které aminokyseliny podlely methylaci a kolik methylových skupin bylo připojeno (Reinberg et al. 2001).

2.3. RNA Interference

RNA interference je jev, při němž se molekula RNA váže na jinou molekulu nukleové kyseliny a brání tak její expresi (Snustad et al. 2009). V buňce vznikají malé úseky RNA označující se jako miRNA či siRNA. Tyto malé molekuly se poté mohou začlenit do ribonukleových částic za vzniku komplexu RISC. RISC komplexy se pak mohou navázat na úsek mRNA, který je komplementární k interferující RNA v komplexu RISC. Tímto procesem pak může docházet k degradaci mRNA nebo se může snížit její aktivita, čímž dojde k zabránění translace a k umlčení genu (Sharp, 2001; Slabý a Svoboda, 2011).

2.4. Ubiquitinace

Ubiquitin je malý protein nacházející se volně téměř v každé buňce. Jeho navázání k substrátu se nazývá ubiquitinace a předurčuje osud navázaných proteinů. Ubiquitin určuje proteiny k degradaci, dokáže změnit jejich lokalizaci a má vliv na jejich aktivitu. Jedná se tedy o posttranslační modifikaci (Glickman, 2002). Ubiquitinaci spojenou s DNA nacházíme především u histonů, kde se jedná o posttranslační modifikaci v rámci poškozeného úseku DNA. Tyto histony jsou pak ubiquitinované na různých místech, což s sebou nese různé změny, kterými jsou například podpora homologních rekombinací či transkripční umlčování (Uckelmann, 2017).

2.5. Sumoylace

SUMO proteiny neboli small-ubiquitin-like-modifier proteiny patří do rodiny proteinů, které se kovalentně vážou na jiné proteiny přítomné v buňkách. Sumoylace je tedy také posttranslační modifikace, která se podílí např. na apoptóze, na stabilitě proteinů při reakcích na stresové podněty či při buněčném transportu. Tyto malé proteiny jsou velmi podobné již zmiňovanému ubiquitinu, avšak SUMO proteiny neoznačují proteiny určené k degradaci (Wilkinson and Henley, 2010).

3. Metody využívané k detekci methylace DNA

Methylace DNA je jedna z nejméně prozkoumaných oblastí epigenetiky. Její význam při ekofyziologické odpovědi rostlin na okolní podmínky byl již mnohokrát demonstrován (Verhoeven et al. 2010; Bian et al. 2013; González et al. 2016; Preite et al. 2018). K detekci methylace DNA se u rostlin používá hned několik metod, které jsou představeny níže. Patří mezi ně například PCR (Polymerase Chain Reaction, polymerázová řetězová reakce), HPLC (High-Performance Liquid Chromatography, vysokoúčinná kapalinová chromatografie), MSAP (Methylation Sensitive Amplification Polymorphism, analýza polymorfismu citlivého na methylaci), experimentální demethylace, imunoprecipitace DNA methylace či celogenomové sekvenování.

3.1. Metoda PCR

Metoda PCR se pro detekci methylace musí specifikovat, a to tak, že je samotná DNA ze začátku metody ošetřena pomocí bisulfidu sodného, který zapříčiní změnu nemethylovaného cytosinu na uracil a zároveň ponechá 5-methylcytosin beze změny. Poté následuje samotná PCR metoda, při které jsou použity dva různé typy primerů. Primer je úsek nukleové kyseliny sloužící jako startovní pozice pro enzym DNA polymerázu při replikaci. U této metody PCR se používá jeden specifický enzym pro methylovanou DNA a druhý enzym pro nemethylovanou DNA. Amplifikované úseky pak vizualizujeme metodou elektroforetické separace na agaróze pomocí ethidium bromidu a UV záření. Ve výsledku pak máme vizualizované různé amplifikované úseky DNA a díky srovnání obou primerů tak můžeme určit methylační profil (Herman et al. 1996).

3.2. Metoda HPLC

Metoda HPLC neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie se může využít k detekci množství globálního methylovaného cytidinu v DNA (Wagner et al. 1981). Principem HPLC metody je digesce. Digestce je proces, při kterém dochází k rozštěpení DNA pomocí specifických chemických látek na jednotlivé nukleosidy a na základě toho pak dokážeme rozlišit množství nukleosidů obsahujících methylovaný a nemethylovaný cytidin. Při provádění této metody se DNA nejprve hydrolyzuje, a to buď chemicky nebo enzymaticky. Chemická hydrolyza je zprostředkována za pomoci kyselin, a to buď kyseliny chlorovodíkové (HCl) či kyseliny fluorovodíkové (HF) (Catania et al., 1987).

Látkami používanými se k enzymatické hydrolyze pak mohou být různé enzymy. Jedním z takových enzymů, který se dnes využívá, je například Nukleáza P1, díky níž vznikají deoxyribonukleosidy. Deoxyribonukleosidy jsou dále separovány pomocí kapilární elektroforézy. Globální obsah methylovaného cytidinu pak zjistíme pomocí spektrofotometrie, a to na základě absorbance jednotlivých nukleosidů v daném vzorku, který je následně srovnán se vzorkem standardním (Rozhon et al. 2008).

3.3. Metoda MSAP

Metoda MSAP, tedy modifikace AFLP (Polymorfismus délky amplifikovaných fragmentů), byla poprvé použita v roce 1997 (Reyna-Lopez et al., 1997). Tato metoda může být využita k detekci rozdílného methylačního profilu. Zahrnuje několik kroků a ve výsledků nám ukáže mnoho anonymních lokusů náhodně rozmístěných po genomu. Pro tyto lokusy jsme schopni zjistit stav jejich methylace. Prvním z kroků je restrikce, která zahrnuje rozštěpení DNA sekvence pomocí dvou endonukleáz. V této metodě se používají dvě endonukleázy pro stejné restrikční místo a každá z endonukleáz má jinou citlivost pro methylaci (Alonso et al. 2016). V tomto kroku dostáváme velké množství DNA fragmentů. Druhým krokem je ligace, kdy za přítomnosti enzymu ligázy T4 jsou ke všem vzniklým fragmentům připojeny adaptory. Tyto přetvořené fragmenty pak namnožíme přidáním specifických primerů za pomoci PCR. Díky specifickým primerům citlivých na methylaci DNA se však namnoží pouze část. Dalším krokem je pak redukce počtu amplifikovaných fragmentů. Pomocí dalších specifických primerů tak dostaneme množství, které jsme schopni snadno vizualizovat. Posledním krokem je samotná vizualizace. Vizualizace je umožněna pomocí fluorescenční značky na jednom z primerů. (Mingliang et al. 2000).

3.4. Sekvenování ChIP

Sekvenování ChIP se používá k určení vazebných míst na DNA pro různé proteiny či transkripční faktory. Specifická místa na vázaných proteinech DNA pak můžeme určit díky imunoprecipitaci, což je technika využívaná ke zkoumání interakce mezi proteinem a DNA. U metody se využívá specifických protilátek, které se vážou na histonovou modifikaci a tím imunoprecipitují fragmenty DNA obalené kolem histonu. Získáme tak pouze fragmenty, v nichž se nachází protein označený danou protilátkou. Tento protein je vázaný s DNA, kterou chceme sekvenovat (Park, 2009).

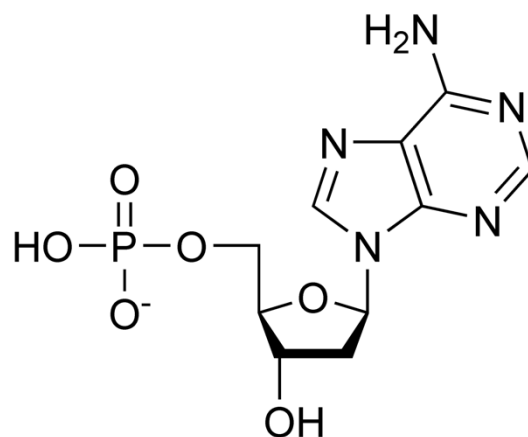
3.5. Bisulfidové sekvenování

Bisulfidové sekvenování je metoda, při které se DNA nejprve ošetří bisulfidem. Ošetření bisulfidem změní cytosin na uracil, avšak methylovaný cytosin 5-methylcytosin zůstává po ošetření nezměněn. Díky tomu nám konečná vizualizace ukáže pouze methylovaný cytosin (Chatterjee et al. 2012). Sekvenování samotné pak může probíhat několika způsoby. První ze způsobů je standardní dideoxy-sekvenování spolu s metodou PCR. Pomocí PCR metody, při níž jsou použity dva specifické primery, získáme fragmenty DNA. V těchto fragmentech jsou zbytky uracilu a thyminu amplifikovány jako thymin a zbytky 5-methylcytosinu jako cytosin. Takto získané produkty jsou pak dále sekvenovány (Frommer et al. 1992).

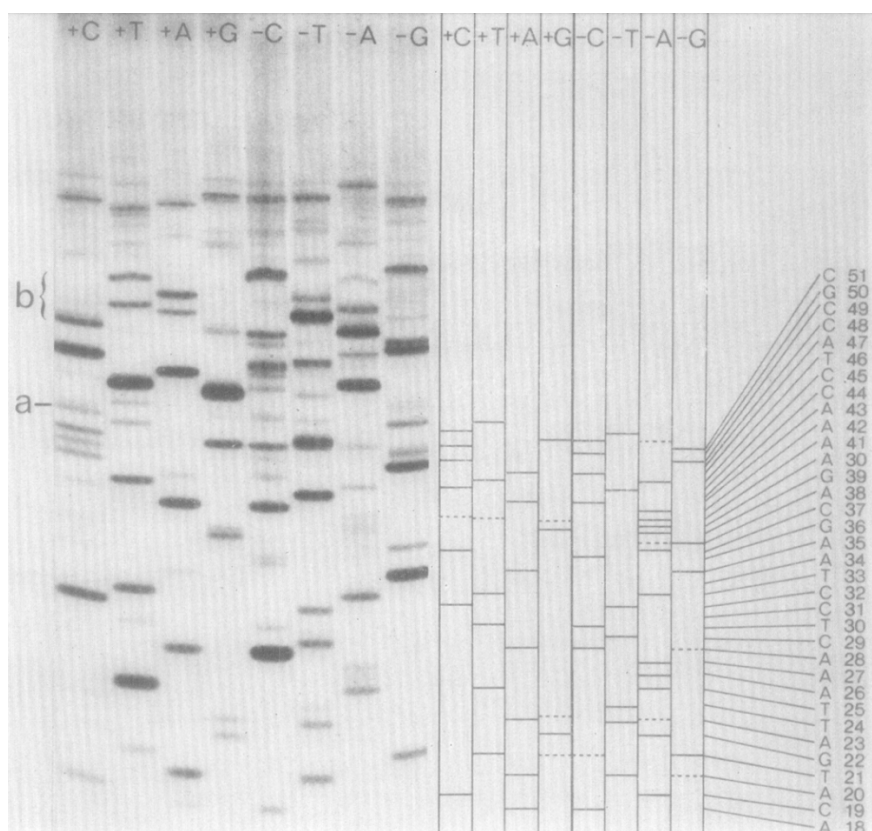
Způsobů sekvenování je několik. Jak již zaznělo, jednou z metod může být například metoda dideoxy-sekvenování. Toto sekvenování využívá procesu replikace vybrané sekvence. Určitá sekvence DNA řetězce se přidá do roztoku s primerem, DNA polymerázou a čtyřmi deoxynukleotidy (obr. č. 4). Roztok je poté rozdělen do 4 různých nádob, do kterých je přidán vždy jeden dideoxynukleotid. Dideoxynukleotid se vyznačuje tím, že nemá hydroxylovou skupinu -OH. Díky nepřítomnosti -OH skupiny se po jeho navázání na řetězec replikace zastaví. Výsledkem je pak roztok s různě dlouhými řetězci, které začínají primerem a končí dideoxynukleotidem. Roztoky jsou denaturovány a připraví se na gel. Následuje separace pomocí elektroforézy. Díky elektroforéze se jednotlivé řetězce seřadí podle délky, jelikož se různě dlouhé úseky pohybují odlišnou rychlostí a dostanou se v gelu různě daleko. Následuje vizualizace, dříve se používala radioaktivní vizualizace, v dnešní době se ovšem využívá fluorescenčních metod. Vizualizací získáme pruhy podle délky jednotlivých fragmentů DNA, zakončených vždy daným dideoxynukleotidem. Porovnáním jednotlivých sloupců s vizualizovanými pruhy (obr. č. 5) pak můžeme určit pořadí jednotlivých bází (Sanger et al. 1975).

Dalším typem sekvenování, které se používá po ošetření bisulfidem, je pyrosekvenování. To využívá začlenění nukleotidu do úseku DNA určeného k sekvenování. Začleňovaným nukleotidem může být například deoxyadenosintrifosfát. Tyto nukleotidy jsou pomocí DNA polymerázy začleněny do úseku DNA. Nově začleňovaný nukleotid odevzdává pyrofosfát a díky přítomnosti enzymu luciferáza emituje světlo, které jsme schopni zachytit. Pomocí záblesků světla jež zachytíme, vzniká tzv.

pyrogram. Z pyrogramu jsme pak schopni rozlišit pořadí jednotlivých nukleotidů, a navíc dokážeme rozeznat methylovaný cytosin (Nyrén et al. 1993).



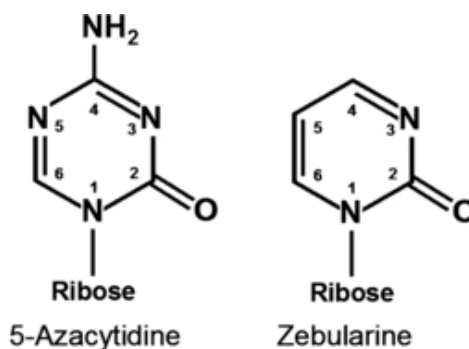
obr. č. 4: Deoxyadenosinmonofosfát. Převzato a upraveno z Toronto Research Chemicals (www.trc-canada.com)



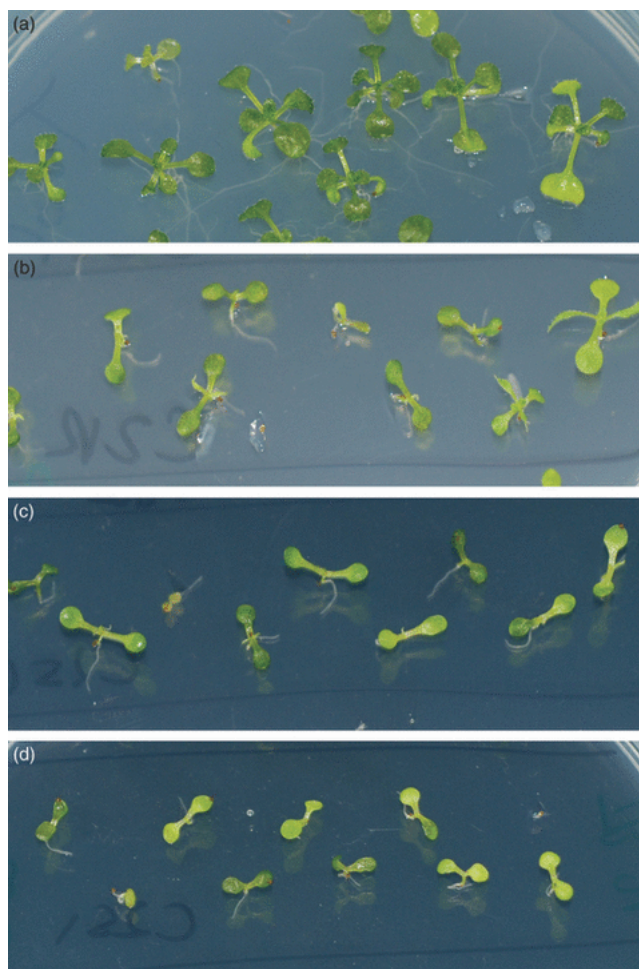
obr. č. 5: Radiograf s vizualizovanými pruhy, podle délky jednotlivých řetězců. Převzato a upraveno ze Sanger et al. 1997

3.6. Experimentální přístup

Dále můžeme roli methylace DNA u rostlin ověřit experimentálně pomocí aplikace demethylačních činidel, jako je například 5-azacytidin či zebularin (obr. č. 6) (Griffin et al. 2016). Tato metoda je jednoduchá a oproti molekulárním metodám levnější. Ošetření rostlin se provádí buď při klíčení semen (Kondo et al. 2006) nebo jsou rostliny pěstovány přímo na demethylačním čínidle (Yao et al. 2018) či se jednotlivé rostliny postříkují vodnými roztoky demethylačních činidel v určité koncentraci (Pinc unpubl). Očekáváme, že u ošetřených rostlin dojde ke snížení globálního množství methylace, což může vést ke změně fenotypových vlastností, a lze pozorovat i odlišnou reakci na vnější podnět v porovnání s rostlinami kontrolními (Bian et al. 2013; Wilschut et al. 2016). Snížení množství methylace můžeme potvrdit odebráním vzorků a jejich následnou analýzou pomocí některé z výše uvedených metod (Bossdorf et al. 2010). Demethylační čínidla však mohou mít i nežádoucí účinky. Při ošetření během klíčení může dojít k jeho zastavení, nebo mohou být mladé rostliny oslabeny natolik, že nepřežijí přesazení do substrátu (Puy et al. 2018; Pinc unpubl.). Dále pak může docházet i ke zhoršení fitness rostlin v raných stádiích. Rostliny mohou mít kratší kořeny či mnohem menší listy (obr. č. 7) v závislosti na zvolené koncentraci demethylačních činidel (Baubec et al. 2009).



obr. č. 6: demethylační čínidla 5-azacytidin a zebularin. Převzato a upraveno Cheng et al. 2003



obr. č. 7: Semenáčky *Arabidopsis thaliana* pěstované po dobu 14 dnů na médiu obsahující zebularin s 0 μM (a), 20 μM (b), 40 μM (c), nebo s 80 μM (d) koncentrací zebularinu. Snímky byly pořízeny 14 dní po vysetí. Převzato z Baubec et al. 2009

4. Význam epigenetické variability v evoluci a ekologii klonálních rostlin

Klonální rostlinou se rozumí taková rostlina, která se dokáže rozšířit či rozmnožit, aniž by u ní došlo k pohlavnímu procesu, tedy ke splnutí samčí a samičí gamety. Klonální rostliny pak můžeme rozdělit na dvě podskupiny. Na skupinu amixis, vegetativně se množící rostliny, kde klon vzniká pomocí vegetativních struktur. Rostlina tvoří např. šlahouny či jiné podobné rostlinné struktury, které jsou po oddělení od mateřské rostliny schopné samostatné existence. Druhou skupinou je skupina apomixis neboli rostliny apomiktické. U takových rostlin vzniká semeno bez oplození, jedná se tedy o nepohlavní rozmnožení semeny (Winkler 1908).

Klonální rostliny disponují velmi omezenou genetickou variabilitou, díky které by neměly být schopny rychle reagovat na měnící se podmínky. Podle teoretické představy by klonální rostliny měly být oproti rostlinám rozmnožujících se sexuálně slepou vývojovou uličkou. Avšak v některých případech tomu tak není a klonálně se rozmnožující rostliny mají širší areál rozšíření než jejich sexuálně se rozmnožující příbuzní. Tento jev nazýváme geografická parthenogeneze (van Valen 1973; Chapman et al. 1992). K tomuto jevu dochází především ve vysokých nadmořských výškách a ve vyšších zeměpisných šířkách (Hörandl 2009).

Položme si tedy otázku, jak je možné, že klonální rostliny jsou v některých případech úspěšnější oproti sexuálně se rozmnožujícím rostlinám? Mezi teorie, zabývající se touto otázkou můžeme zařadit například teorii metapopulací (Levins 1969), efekt červené královny (van Valen 1973), dále pak tzv. „frozen niche variation hypothesis“ (Vrijenhoek 1979) nebo tzv. „general-purpose genotype“ (Parker Jr. et al. 1977). Někteří vědci se také zabývají významem polyploidizace (Mayrose et al. 2011, Liu et al. 2012). Jiné studie však dokazují, že se klonálně rozmnožující rostliny dokáží přizpůsobit různým vnějším vlivům, a to především díky epigenetice, zejména díky methylaci DNA (Bian et al. 2013; Wilschut et al. 2016; Sáez-Laguna et al. 2014). Mluvíme o klonálně se rozmnožujících rostlinách, u kterých nedochází k procesu meiozy. Tyto rostliny si pravděpodobně mnohem snadněji zachovávají adaptace závislé na methylaci DNA, jelikož se methylace DNA díky nepřítomnosti meiozy z genomu neztrácejí (Feng et al. 2011; Paszkowski and Grossniklaus, 2011). Díky vzniklým adaptacím neboli nově získaným vlastnostem je rostlina odolnější a tyto vlastnosti může předat i na potomky. Tento proces pak klonálně se rozmnožujícím rostlinám umožňuje efektivně se vyrovnat s okolním prostředím (Stuefer et al. 2010).

4.1. Epigeneticky řízené vlastnosti

U rostlin může epigenetika ovlivnit hned několik základních rostlinných vlastností. Mezi ně patří například změny fenotypu (Gao et al. 2010) či odpověď rostlin na vliv abiotických či biotických stresů (Pascual et al. 2014). Konkrétněji pak může mít epigenetika vliv na dobu kvetení (Sung et al. 2004), dormanci semen (Nonogaki 2014), velikost či počet listů (Santamaría et al. 2011). Tuto tezi zároveň můžeme dokázat i na studiích zaměřujících se i na sexuálně se rozmnožující rostliny. Například u studie zkoumající rostlinu *Erodium cicutarium* (Geraniaceae) se zjistilo, že se po aplikaci

demethylačního činidla u ošetřených rostlin objevuje menší počet listů a listy jsou také menšího vzrůstu (Alonso et al. 2017)

4.2. Příklady

Význam epigenetické variability u klonálních rostlin byl zkoumán hned v několika studiích, které se zaměřují převážně na rostlinnou adaptabilitu či transgenerační paměť u klonálních rostlin nebo u rostlin s nízkou genetickou variabilitou.

4.2.1. Transgenerační paměť

Transgenerační paměť je jev, při kterém si klonální rostliny dokážou předat vlastnosti získané v průběhu života, jež jsou podmíněné změnou methylace DNA. Například ve studii Preite a kolektiv (2018), při níž byly použity dvě linie apomiktických pampelišek druhu *Taraxacum officinale* (Asteraceae), testovali, zda se reakce rostlin na stresové podmínky může odrazit v nárůstu methylace genomu. Dále pak prověřovali i transgenerační stabilitu, tedy zda se mohou změny v methylaci DNA indukované stresovými podmínkami přenášet z generace na generaci. Pampelišky byly vystaveny dvěma stresovým podmínkám. U rostlin, které byly podrobeny suchu, byl zjištěn mírný nárůst methylace, avšak nebyla pozorována transgenerační stabilita. Byl ovšem pozorován malý nárůst methylace DNA v průběhu tří generací. U rostlin vystavených účinkům kyseliny salicylové, která napodobuje účinky indukce napadení patogenem, byl pozorován nepřímý vliv na změnu methylace pouze u dalších generací, tedy u potomků ošetřených rostlin. To může svědčit spíše o složitější odpovědi na účinek kyseliny salicylové než o transgenerační stabilitě stresem ovlivněných změn methylované DNA. U rostlin ošetřených kyselinou salicylovou byl podobně jako u rostlin vystavených suchu pozorován nárůst celkové methylace DNA v průběhu generací. V tomto nárůstu u obou linií pampelišek mohou být obsaženy spontánní methylace DNA i methylace zděděné. Studie tedy dokazuje, že vliv stresových podmínek má za následek přímou změnu methylačního vzorce. V průběhu tří generací však byly pozorovány opakující se změny i u nestresovaných rostlin. Může se ale jednat i o jiné mechanismy změn methylace DNA (Preite et al. 2018).

Další studie na apomiktických pampeliškách *Taraxacum officinale* (Asteraceae) Koena J.F. Verhoevena (2010) dokazuje změnu methylačního profilu celého genomu

vyvolanou environmentálním stresem, která se přenesla na potomstvo. Pampelišky byly vystaveny stresovým podmínkám a poté byli jejich apomiktičtí potomci pěstováni za standardních podmínek. Následně byla provedena analýza pomocí MSAP, na základě které se ukázalo, že stresové podmínky indukují změnu methylace genomu. Tato změna byla pozorovatelná i v druhé generaci. Díky použití jednoho apomiktického klonu pak ze studie vyplývá, že změna methylace vyvolaná ekologickými vlivy v první generaci je přenositelná na druhou generaci. U apomiktického klonu totiž nedochází ke genetickým změnám. Výsledky dané studie tedy ukazují, že díky transgenerační paměti je ovlivněna i následující druhá generace. Tento jev může mít velký vliv v evoluci klonálních rostlin (Verhoeven et al. 2010).

Studie Richards a kolektiv (2012) se zaměřila na invazivní rostliny rostoucí na americkém ostrově Long Island jménem *Fallopia japonica* a *Fallopia bohemica* (Polygonaceae), u kterých genetická analýza ukázala velmi malou genetickou variabilitu. Křídlatky jsou totiž převážně klonálním druhem. I přes svoji nízkou genetickou variabilitu však dokázaly osídlit téměř celý ostrov, a to jak suchá stanoviště, tak slaniska. Rostliny vykazují na různých stanovištích odlišnou morfologickou variabilitu. Po sesbírání oddenků křídlatky z rozdílných stanovišť byly nově vznikající rostliny kultivovány za standardních podmínek. Společná kultivace pak ukázala, že rozdíly v methylaci DNA, které jsou způsobeny právě rozdílným prostředím, jsou velmi stabilní. Díky tomu je křídlatka odolným a úspěšným invazním druhem. Na základě výsledků studie pak vyplývá, že změna epigenetické variability je mnohdy velmi rychlá a změna v rámci genomu tak ovlivňuje rostlinu již za jejího života. Díky ustálení této variability následně ovlivňuje i její potomky. Význam epigenetické variability má poté velký vliv na rostliny s nízkou genetickou variabilitou, u nichž jim napomáhá přizpůsobit se různým stanovištím (Richards et al. 2012).

4.2.2. Epigeneticky řízené vlastnosti

Taraxacum officinale (Asteraceae) si jako objekt pozorování vybrala studie Wilschut a kolektiv (2016). Studie se zaměřuje na rozdílnou dobu kvetení způsobenou rozdílnou methylací DNA v přirozených populacích asexuálně se rozmnožujících pampelišek. Zkoumané rostliny vykazovaly rozdílnou dobu kvetení, která korelovala s rozdílným methylačním vzorcem. Tato změna byla pozorována i v druhé generaci rostlin při kultivaci za standardních podmínek. Výsledky tedy ukazují, že doba kvetení je řízena epigeneticky a tato změna v době kvetení pak může být předána i do dalších

generací, což opět naznačuje přítomnost transgenereční paměti. Zároveň také výsledky poukazují i na účinek zebularinu. U rostlin ošetřených demethylačním činidlem došlo k synchronizaci doby času kvetení (Wilschut et al. 2016).

Bian a kolektiv (2013) se ve své studii zaměřili na změnu celkové methylace v závislosti na různém množství dusíku dodávaného rostlině. Jako objekt pozorování zvolili klonální rostlinu *Hierochloe glabra* (Poaceae). Rostliny byly pěstovány za standardních podmínek v několika skupinách, rozdělených podle množství jim dodávaného dusíku. Poté byly rostliny analyzovány pomocí MSAP. Výsledky ukazují, že obsah methylovaného cytosinu se přidavkem dusíku snižoval, ale u kontrolních rostlin ke snížení nedocházelo. S celkovou úrovní methylace pak souviselo i několik fenotypových vlastností jako například množství pupenů, velikost oddenku či celková biomasa rostliny. Většina těchto vlastností byla negativně ovlivněna snížením celkové methylace DNA. S nárůstem dusíku docházelo k redukci pupenů, ke kratším stonkům či ke snížení celkové biomasy. Na základě těchto výsledků pak můžeme říci, že míra methylace má vliv na ekologicky důležité vlastnosti rostlin, dokonce má zvyšující se míra methylace DNA přímý vliv i na samotné asexuální rozmnožování, a tím i přímý vliv na adaptabilitu v rozdílných prostředích. Vyšší úroveň methylace DNA totiž zvyšuje produkci klonálních potomků. Zároveň může nutit rostlinu k produkci klonálních potomků také menší množství živin, aby nově vznikající potomci měli možnost najít a obsadit stanoviště s vyšším obsahem živin. Tento jev by mohl vysvětlovat i to, proč je právě *H. glabra* dominantním druhem na stepi Songnem Plain, na které jsou velké rozdíly v distribuci živin (Bian et al. 2013).

Studie Y. Zhang (2013) zabývající se dědičnou fenotypovou variabilitou a také změnou methylace ovlivněnou abiotickým stresem nám přináší hned několik podstatných výsledků. Pro studii byla vybrána rostlina *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae), která není primárně klonální rostlinou, avšak pro tuto studii byla zvolena inbrední linie s nízkou genetickou variabilitou. U takto vytvořených jedinců byly zkoumány změny v čase kvetení, změny výšky rostliny či změny celkové biomasy rostliny v závislosti na rozdílných podmínkách, kterým byly rostliny vystaveny. Vliv sucha ovlivnil všechny kontrolované fenotypové vlastnosti kromě doby kvetení. Na rozdíl od rostlin, které byly vystaveny zvýšenému množství živin, u nichž nedošlo téměř k žádným fenotypovým změnám. Z výsledků, které výzkum předkládá, vyplývá, že rozdíly v epigenetické variabilitě mají vliv na ekologicky podstatné vlastnosti rostlin. Rostliny jsou totiž geneticky shodné a liší se pouze v dědičných methylacích DNA.

Díky použití inbredních linií v experimentu tak nedochází ke změně genotypu. U rostlin však byla pozorována změna fenotypu. Lze odvodit, že fenotypové změny by měly být ovlivněny právě změnou v methyloci DNA. Tyto informace pak naznačují, že methyloci DNA může mít vliv na mikroevoluci rostlin (Zhang et al. 2013).

4.2.3. Epigeneticky řízená rostlinná adaptabilita

Ve studii Sáez-Laguna a kolektiv (2014) vybrali jako zkoumaný druh borovici *Pinus pinea* (Pinaceae). Borovice sice není klonálně se rozmnožící rostlinou, ale samotný pokus byl proveden na dospělých klonech dané rostliny. Tyto rostliny byly získány pomocí řízkování. Takto získané rostliny mají tedy shodnou genetickou informaci. Pěstované rostliny byly podrobeny analýze AFLP a MSAP. Na základě těchto analýz bylo ukázáno, že rostliny mají velmi nízkou genetickou variabilitu, ale i přesto je u rostlin pozorována velká fenotypová plasticita. Výsledky analýzy MSAP pak prokázaly velkou epigenetickou variabilitu. To poukazuje na to, že epigenetická variabilita může u borovic vést k vyšší fitness a může sloužit jako doplňující zdroj k nízké genetické variabilitě (Sáez-Laguna et al. 2014).

Studie González a kolektiv (2016) vybrala jako studovanou rostlinu *Trifolium repens* (Fabaceae). V první části pokusu byly rostliny pěstovány v několika skupinách a byly vystaveny různým úrovním sucha a kontrolním podmínkám. Část rostlin byla v průběhu pěstování ošetřena demethylačním činidlem 5-azacytidinem. Z těchto rostlin byly vytvořeny řízky, které byly dále pěstovány v druhé části experimentu. Tyto rostliny byly pěstovány již za standardních podmínek. Rostliny vystavené suchu v první části pokusu byly negativně ovlivněny v porovnání s rostlinami kontrolními. K většímu negativnímu dopadu pak docházelo při kombinaci sucha s ošetřením demethylačním činidlem. U druhé generace rostlin pocházejících od rostlin, jež byly vystaveny suchu, byly měřeny fenotypové vlastnosti, jako například počet postranních větví či velikost hlavního stolonu. Na základě měření vyplývá, že všechny měřené vlastnosti byly ovlivněny suchem, které zažila předchozí generace. Druhá generace ošetřených rostlin vykazovala jiný fenotyp než druhá generace rostlin z kontrolních podmínek. Výsledky studie tedy naznačují, že různé stresové podmínky, jako například různé intenzity sucha, mohou vyvolat různou odpověď a mohou tak mít vliv na účinky transgenerační paměti. Intenzivní a dlouhodobé sucho pak může mít dopad i na rostlinnou fyziologii. Díky tomu pak může docházet k přeskupení methylačního vzorce, což může mít za následek eliminaci transgeneračních účinků (Boyko et al. 2011). Výsledky pak poukazují i na

účinek 5-azacytidinu, jelikož po jeho použití se globální množství methylace DNA v průměru snížilo o 4,5% oproti rostlinám kontrolním (González et al. 2016).

Studie Foust a kolektiv (2016) se zaměřila na rostliny slanisek USA, konkrétně na rostlinu *Spartina alterniflora* (Poaceae) a *Borrchia frutescens* (Asteraceae). Obě tyto rostliny se rozmnožují klonálně pomocí oddenků a rostou na území s širokým spektrem environmentálních podmínek. Na základě analýzy AFLP byla objevena velmi vysoká genetická variabilita mezi jednotlivými populacemi obou zkoumaných rostlin. U obou rostlin ale genetická variabilita nebyla ovlivněna rozdílným prostředím. Na základě analýzy MSAP byla zjištěna i vysoká epigenetická variabilita, a to u obou druhů rostlin. Dále pak bylo na základě výsledků představeno, že u obou populací dochází k epigenetické diferenciaci k typu stanoviště. Souhrnně pak ze studie vyplývá, že v tomto případě epigenetická variabilita souvisí s prostředím, na rozdíl od variability genetické, která s prostředím nesouvisí. Tím můžeme dospět k závěru, že epigenetická variabilita odráží vliv okolního prostředí. Konkrétní vztahy se ale mezi epigenetickou variabilitou, genetickou variabilitou a prostředím u všech zkoumaných populací liší (Foust et al. 2016).

Studie Gao a kolektiv (2010) se zaměřila na rostlinu plevuňku *Alternanthera philoxeroides* (Amaranthaceae). Rostliny byly sesbírány ze svých vodních a suchozemských stanovišť. Takto získané rostliny byly společně kultivovány ve dvou rozdílných podmínkách imitujících vodní a suchozemské stanoviště. Tímto způsobem kultivace se ukázalo, že rostliny reagují na změnu podmínek, což se projevilo ve fenotypových vlastnostech i v methylačním vzorci. Rostliny pěstované ve vodním prostředí vykazovaly například tlustší stonky či delší internody bez ohledu na to, z jakého stanoviště pocházely. Na základě MSAP bylo prokázáno, že u rostlin pěstovaných v experimentální kultivaci došlo k epigenetickému přeprogramování. Z 278 polymorfních lokusů zjištěných u původních rostlin pomocí analýzy MSAP bylo zachováno pouze 62. Z toho vyplývá, že methylační vzorce jsou velmi flexibilní a jsou ovlivněny změnou prostředí. Pomocí AFLP metody lze také konstatovat, že rostliny mají shodnou genetickou informaci. Fenotyp rostlin tedy musel být ovlivněn změnou methylace DNA. U plevuňky nebyla nalezena transgenerační paměť, ale bylo dokázáno, že rostlinné reakce jsou velmi rychlé, což poukazuje na adaptabilitu klonálních rostlin (Gao et al. 2010).

5. Diskuze

Na základě předložených studií můžeme říci, že rostliny dokážou změnit methylační vzorce podle podmínek jim vystaveným a tím změnit i fenotyp a reagovat tak na podmínky, kterým byly vystaveny. Změnou methylace DNA dochází ke změnám rostlinných vlastností. Například studie Wilschut a kolektiv (2016) na pampeliškách poukazuje na to, že změna methylačního vzorce ovlivňuje čas kvetení dané rostliny. Jiná studie Bian a kolektiv (2013) pak ukazuje, že změna celkové methylace má vliv na fenotypové vlastnosti, a to například na množství pupenů či celkovou biomasu rostlin.

Se změnou v methylačním vzorci dochází u rostlin ke změně fenotypu i ke změně některých vlastností spojených s úspěšností rostliny. Rostlina může se změnou methylačního vzorce získávat vlastnosti, které jí mohou pomoci vyrovnat se s nepříznivým prostředím. Může se tedy adaptovat. Tyto adaptace jí mohou zajistit přežití ve stresových podmínkách. Právě rostlinnou adaptabilitu potom můžeme ukázat na výsledcích studie Sáez-Laguna a kolektiv (2014). Jejich studie se zaměřila na borovice, u kterých byla zjištěna vysoká epigenetická variabilita v kontrastu s velmi nízkou genetickou variabilitou. Rostlina je však velmi úspěšná a domnívám se, že za její adaptabilitu může právě změna methylace DNA. Zároveň studie González a kolektiv (2016) ukazuje, že rostliny ošetřené demethylačním činidlem a zároveň vystavené stresovým podmínkám ztrácejí schopnost včasné a dostatečně reagovat na vzniklé prostředí. Studie Gao a kolektiv (2010) ukazuje, že rostlina vykazuje změny v methylačním profilu a mění své fenotypové vlastnosti i v rámci jednoho životního cyklu. Na základě toho usuzuji, že epigenetické změny mohou být velmi rychlé. V některých případech by možná mohly být i rychlejší než mutace genetické, což částečně potvrzuje i studie na křídlatkách Richards a kolektiv (2012).

Studie Richards a kolektiv (2012) ale také poukazuje na přítomnost transgenerační paměti. Díky transgenerační paměti si rostliny mohou získané vlastnosti předat z generace na generaci a být tak i přes nízkou genetickou variabilitu velmi úspěšné. Transgenerační paměť, tedy předání methylačního vzorce z generace na generaci, dokazuje i studie na pampeliškách Verhoeven a kolektiv (2010) či studie Preite a kolektiv (2018), která byla provedena také na pampeliškách.

Na základě výše zmíněných příkladů usuzuji, že klonální rostliny, které mají velmi nízkou genetickou variabilitu, mohou tento deficit dorovnat pomocí změn v methylačním vzorci. Dále pak předpokládám, že díky absenci meiozy si mohou rostliny

mnohem snadněji předat vzniklé změny v methylačním vzorci. Jeden z dalších mých předpokladů je, že epigenetika ovlivňuje velké množství rostlinných vlastností a může tak mít vliv na základní rostlinné procesy a na samotný životní cyklus rostlin. Klonální rostliny se dokážou přizpůsobit stresovým podmínkám a dokážou obsadit rozsáhlá území i přes nízkou genetickou variabilitu. Zároveň takto získané vlastnosti mohou předat i na potomky a zajistit jim tak lepší startovní pozici. Domnívám se, že klonální rostliny by mohly kompenzovat velmi malou až nulovou variabilitu na genetické úrovni díky výše zmíněným vlastnostem a zároveň tak mohou konkurovat i rostlinám, které se rozmnožují sexuálně.

6. Závěr

Podle předložených studií se předpokládá, že změny v methylačním vzorci vytváří epigenetickou variabilitu, která s sebou nese změny fenotypu a změny ve schopnostech rostliny reagovat na okolní prostředí. Tyto vlastnosti mohou být navíc předány na následující generace. Epigenetické mechanismy pak mohou kompenzovat právě omezenou genetickou variabilitu klonálních rostlin, a to může být i jedním z důvodů, proč jsou úspěšné, někdy dokonce úspěšnější než sexuálně se rozmnožující rostliny (viz geografická parthenogeneze). Epigenetika je zatím málo prozkoumaná oblast, avšak i přes nedostatečné množství studií dospívám k závěru, že má velký význam v evoluci především klonálně se rozmnožujících rostlin.

7. Seznam literatury

Alonso, C., Pérez, R., Bazaga, P., Medrano, M. and Herrera, C.M. (2016) MSAP markers and global cytosine methylation in plants: a literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. *Molecular Ecology Resources*, **16**: 80-90

Alonso, C., Pérez, R., Bazaga, P., Medrano, M. and Herrera, C.M. (2017) Tissue-Specific Response to Experimental Demethylation at Seed Germination in the Non-Model Herb *Erodium cicutarium*. *Epigenomes* **1(3)**: 16

Baubec, T., Pecinka, A., Rozhon, W., & Mittelsten Scheid, O. (2009). Effective, homogeneous and transient interference with cytosine methylation in plant genomic DNA by zebularine. *The Plant Journal*, **57**: 542-554

Becker, C., Weigel, D. (2012) Epigenetic variation: origin and transgenerational inheritance. *Current Opinion in Plant Biology* **15**: 562–567

Bian, R., Nie, D., Xing, F., Zhou, X., Gao, Y., Bai, Z., Liu, B. (2013) Adaptational significance of variations in DNA methylation in clonal plant *Hierochloe glabra* (Poaceae) in heterogeneous habitats. *Australian Journal of Botany* **61**: 274-282

Bird, A. (1986) CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature* **321**: 209-213

Bird, A. (2002) DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes & development* **16**: 6-21

Borodovsky, A., Salmasi, V., Turcan, S., Fabius, A.W.M., Baia, G.S., Eberhart, C.G., Weingart, J.D., Gallia, G.L., Baylin, S.B., Chan, T.A., et al. (2013) 5-azacytidine reduces methylation, promotes differentiation and induces tumor regression in a patient-derived IDH1 mutant glioma xenograft. *Oncotarget* **4**: 1737–1747

Bossdorf, O., Arcuri, D., Richards, et al. (2010) Experimental alteration of DNA methylation affects the phenotypic plasticity of ecologically relevant traits in *Arabidopsis thaliana*. *Evolutionary Ecology* **24**: 541

Bourc`his, D. and Bestor, T.H. (2004) Meiotic catastrophe and retrotransposon reactivation in male germ cell lacking Dnmt3L. *Nature* **431**: 96-99

Boyko, A., and I. Kovalchuk. (2011) Genome instability and epigenetic modification—heritable responses to environmental stress? *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 260–266

- Catania, J., Keenan, B.C., Margison, G.P., Fairweather, D.S. (1987) Determination of 5-methylcytosine by acid hydrolysis of DNA with hydrofluoric acid. *Analytical Biochemistry* **167**: 347–51
- Cheng, J. C., Matsen, C. B., Gonzales, F. A., Ye, W., Greer, S., Marquez, V. E., Selker, E. U. (2003). Inhibition of DNA methylation and reactivation of silenced genes by zebularine. *Journal of the National Cancer Institute* **95**: 399-409
- Cubas, P., Vincent, C, Coen E. (1999) An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* **401**: 157–161
- Feil, R., Fraga, M., (2012) Epigenetics and the environment: Emerging patterns and implications. *Nature Reviews Genetics* **13**: 97–109
- Feng, S., Rubbi, L., Jacobsen, S. E., & Pellegrini, M. (2011). Determining DNA methylation profiles using sequencing. *High-Throughput Next Generation Sequencing* 223-238
- Fieldes, M.A., Amyot, L.M., (1999) Evaluating the potential of using 5-azacytidine as an epimutagen. *Canadian Journal of Botany* **77**: 1617–1622
- Finnegan, E. J., Peacock, W. J., Dennis E. S., (1996) Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National. Academy of Sciences USA* **93**: 8449–8454
- Finnegan, E.J. (2010) DNA methylation: A dynamic regulator of genome organization and gene expression in plants. *Plant Developmental Biology—Biotechnological Perspectives* **2**
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., Mello, C.C. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**: 806– 811
- Foust, C. M., Preite, V., Schrey, A. W., Alvarez, M., Robertson, M. H., Verhoeven, K. J. F., Richards, C. L. (2016) Genetic and epigenetic differences associated with environmental gradients in replicate populations of two salt marsh perennials. *Molecular Ecology* **25**: 1639-1652
- Frommer, M., McDonald, L. E., Millar, D. S., Collis, C. M., Watt, F., Grigg, G. W., Paul, C. L. (1992) A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **89**: 1827-1831

Gao, L., Gwng, Y., Li, B., Chen, J., Yang, J. (2010) Genome-wide DNA methylation alterations of *Alternanthera philoxeroides* in natural and manipulated habitats: implications for epigenetic regulation of rapid response to environmental fluctuation and phenotypic variation. *Plant, Cell and Environment* **33**: 1820–1827

Geiss-Friedlander, R., Melchior, F. (2007) Concepts in sumoylation: a decade on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **8**: 947-956

Glickman, M.,H., Ciechanover, A. (2002) The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews* **82 (2)**: 373–428

Gibney, E., Nolan, C.M. (2010) Epigenetics and gene expression. *Heredity* **105**: 4-13

Goll, M.G., Kirpekar, F., Maggert, K.A., Yoder, J.A., Hsieh, C.L., Zhang, X., Golic, K.G., Jacobsen, S.E., and Bestor, T.H. (2006) Methylation of tRNA^{Asp} by the DNA methyltransferase homolog Dnmt2. *Science* **311**: 395-398

González, A.P.R., Chrtek, J., Dobrev, P.I., Dumalasová, V., Fehrer, J., Mráz, P., Latzel, V. (2016) Stress-induced memory alters growth of clonal offspring of white clover (*Trifolium repens*). *American Journal Of Botany* **103**: 1567 – 1574

González, A.P.R., Preite, V., Verhoeven, K.J.F., Latzel, V. (2018) Transgenerational Effects and Epigenetic Memory in the Clonal Plant *Trifolium repens*. *Frontiers in Plant Science* **9**

Griffin, P. T., Niederhuth, C. E., Schmitz, R. J. (2016) A comparative analysis of 5-azacytidine-and zebularine-induced DNA demethylation. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, **6**: 2773-2780.

Halušková, J. (2010) Epigenetic Studies in Human Diseases (epigenetics/ human/ diseases / methylation / histone acetylation / miRNA / cancer). *Folia Biologica* **56**

Herman. J.G., Graff, J.R., Myöhänen, S., Nelkin, B.D., Baylin, S.B. (1996) Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 9821-9826

Hermann, A., Goyal, R, Jeltsch, A (2004) The Dnmt1 DNA-(cytosine-C5)-methyltransferase methylates DNA processively with high preference for hemimethylated target sites. *The Journal of Biological Chemistry* **279**

Hörandl, E. (2009) Geographical parthenogenesis: opportunities for asexuality. In *Lost sex*: 161-186

- Hublitz, P., et al. (2009) Mechanisms of transcriptional repression by histone lysine methylation. *International Journal of Developmental Biology* **53**: 335-354
- Chapman, G. P., Darlington, C. D. (1992) *Apomixis and evolution*. Cambridge University Press
- Chatterjee, A., Stockwell, P. A., Rodger, E. J., Morison, I. M. (2012) Comparison of alignment software for genome-wide bisulphite sequence data. *Nucleic acids research* **40**: 79
- Chinnusamy, V., Zhu, J.K., (2019) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 133–139
- Jeddeloh, J.A., Strokes, T.L. and Richards, E.J. (1999) Maintenance of genomic methylation requires a SWI2/SNF2-like protein. *Nature Genetics* **22**: 94-97
- Kim, J.K., Samaranayake, M., Pradhan, S. (2009) Epigenetic Mechanisms in Mammals. *Cellular and Molecular Life Sciences* **66**: 596-612
- King, R.C., Stansfield, W.D., Mulligan, P.K. (2006) *A Dictionary of Genetics*, Seventh Edition. Oxford University Press
- Kondo, H., Ozaki, H., Itoh, K., Kato, A., Takeno, K. (2006) Flowering induced by 5-azacytidine, a DNA demethylating reagent in a short-day plant, *Perilla frutescens* var. *crispa*. *Physiologia Plantarum* **127**: 130-137
- Kupferschmidt, K. (2013). A Lethal Dose of RNA. *Science*. **341**: 732–3
- Levins, R. (1969) Some demographic and genetic consequences of environmental heterogeneity for biological control. *Bulletin of the Entomological Society of America* **15**: 237–240
- Li, M., Hu, S., Shen, Z., He, X., Tao, S., Dong, L., Zhu, Y. (2009) High-performance capillary electrophoretic method for the quantification of global DNA methylation: application to methotrexate-resistant cells. *Analytical Biochemistry* **387**: 71–75
- Liu, H. M., Dyer, R. J., Guo, Z. Y., Meng, Z., Li, J. H., Schneider, H. (2012) The evolutionary dynamics of apomixis in ferns: a case study from polystichoid ferns. *Journal of Botany* 2012
- Lopez, M., Halby, L., Arimondo, P.B., (2016) DNA methyltransferase inhibitors: Development and applications. *DNA Methyltransferases - Role and Function* 431-473
- Mayrose, I., Barker, M. S., Otto, S. P. (2010) Probabilistic models of chromosome

- number evolution and the inference of polyploidy. *Systematic biology* **59**: 132-144
- Mingliang, X., Xiangqian, L. and Schuyler, K.S. (2000) AFLP-Based Detection of DNA Methylation. *Plant Molecular Biology Reporter* **18**: 361-368
- Neidhart, M., (2015) DNA Methylation and Complex Human Disease. Academic Press
- Nyrén, P., Pettersson, B., & Uhlén, M. (1993). Solid phase DNA minisequencing by an enzymatic luminometric inorganic pyrophosphate detection assay. *Analytical biochemistry* **208**: 171-175
- Nonogaki, H. (2014) Seed dormancy and germination—emerging mechanisms and new hypotheses. *Frontiers in Plant Science* **5**: 233
- Okano, M., Bell, D.W., Haber, D.A., and Li, E. (1999) DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell* **99**: 247-257
- Park, P. (2009) ChIP-seq: advantages and challenges of a maturing technology. *Nature Reviews Genetics* **10**: 669– 680
- Pascual, J., Cañal, M. J., Correia, B., Escandon, M., Hasbún, R., Meijón, M., Valledor, L. (2014) Can epigenetics help forest plants to adapt to climate change? *Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications* 125-146
- Paszkowski, J., U. Grossniklaus (2011) Selected aspects of transgenerational epigenetic inheritance and resetting in plants. *Current Opinion in Plant Biology* **14**: 195–203
- Pigliucci, M. (2005) Evolution of phenotypic plasticity: where are we going now? *Trends in Ecology & Evolution* **20**: 481– 486
- Preite, V., Oplaat, C., Biere, A., Kirschner, J., Van der Putten, W.H., Verhoeven, K.J.F. (2018) Increased transgenerational epigenetic variation, but not predictable epigenetic variants, after environmental exposure in two apomictic dandelion lineages. *Ecology and Evolution* **8**: 3047-3059
- Puy, J., Dvořáková, H., Carmona, C. P., de Bello, F., Hiiesalu, I., Latzel, V. (2018) Improved demethylation in ecological epigenetic experiments: testing a simple and harmless foliar demethylation application. *Methods in Ecology and Evolution*, **9**: 744-753
- Razin, A. and Riggs, A.D. (1980) DNA methylation and gene function. *Science* **210**: 604-610

- Reyna-López, G. A., Simpson, J., Ruiz-Herrera, J. (1997) Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Molecular and General Genetics* **253**: 703–710
- Richards, Ch.L., Schrey, A.W., Pigliucci, M. (2012) Invasion of diverse habitats by few Japanese knotweed genotypes is correlated with epigenetic differentiation. *Ekology letters* **15**: 1016-1025
- Rozhon, W., Baubec, T., Mayerhofer, J., Scheid, O. M., Jonak, C. (2008). Rapid quantification of global DNA methylation by isocratic cation exchange high-performance liquid chromatography. *Analytical biochemistry* **375**: 354-360
- Sáez-Laguna, E., Guevara, M-Á., Díaz, L-M., Sánchez-Gómez, D., Collada, C., Aranda, I., et al. (2014) Epigenetic Variability in the Genetically Uniform Forest Tree Species *Pinus pinea* L. *PLoS ONE* **9**
- Sanger, F., Coulson, A. R. (1975). A rapid method for determining sequences in DNA by primed synthesis with DNA polymerase. *Journal of molecular biology* **94**: 441-448.
- Santamaría, M. E., Rodríguez, R., Cañal, M. J., Toorop, P. E. (2011) Transcriptome analysis of chestnut (*Castanea sativa*) tree buds suggests a putative role for epigenetic control of bud dormancy. *Annals of Botany* **108**: 485-498
- Sharp, P.A., (2001) RNA interference. *Genes & Development* **15**: 485–490
- Slabý, O., Svoboda, M. (2012) *MikroRNA v onkologii*. Praha: Galén **17**: 324
- Snustad P.D., Simmons, M. J. (2009) *Genetika*. Brno: Masarykova univerzita **21**: 87
- Struhl, K. (1998) Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & development* **12**: 599-606
- Stuefer, J.F., Erschbamer, B., Huber, H., Suzuki, J. (2010) *Ecology and Evolutionary. Biology of Clonal Plants*
- Sung, S., Amasino, R. M. (2004) Vernalization and epigenetics: how plants remember winter. *Current Opinion in Plant Biology* **7**: 4-10
- Surani, M.A.H., Barton, S.C., and Norris, M.L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* **308**: 548–550

- Uckelmann, M., Sixma, T. K., (2017) Histone ubiquitination in the DNA damage response. Division of Biochemistry and Cancer Genomics Centre, Plesmanlaan **121**
- van Valen, L. (1973) A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* **1**: 1–30
- Verhoeven, K.J.F., Jansen, J.J., van Dijk, P.J., Biere, A. (2010) Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist* **185**: 1108-1118
- Verhoeven, K.J.F., van Gulp, T.P., (2012) Transgenerational effects of stress exposure on offspring phenotypes in apomictic dandelion. *PLoS ONE* **7**
- Volpe, T.A., Kidner, C., Hall, I.M., Teng, G., Grewal, S.I.S., and Martienssen, R.A. (2002) Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 lysine-9 methylation by RNAi. *Science* **297**: 1833–1837
- Vrijenhoek, R.C. (1979) Factors affecting clonal diversity and coexistence. *American Zoologist* **19**: 787–797
- Wagner, I., Capesius, I. (1981) Determination of 5-methylcytosine from plant DNA by high-performance liquid chromatography. *Biochimica et Biophysica Acta*, **654**: 52-56
- Waterborg, J.,H., (2002) Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochemistry and Cell Biology* **80**: 363-378
- Wilkinson, K. A., Henley, J. M. (2010) Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochemical Journal* **428**: 133-145
- Wilschut, R. A., Oplaat, C., Snoek, L. B., Kirschner, J., & Verhoeven, K. J. (2016) Natural epigenetic variation contributes to heritable flowering divergence in a widespread asexual dandelion lineage. *Molecular Ecology*, **25**: 1759-1768
- Wing, J., O'Connor, C. (2008) Sex Chromosomes in Mammals: X Inactivation. *Nature Education* **1**: 221
- Winkler, H. (1908). Über Parthenogenesis und Apogamie im Pflanzenreich. *Progressus Rei Botanicae* **2**: 293–454
- Yao, Y., Kovalchuk, I. (2018) Exposure to zebularine and 5-azaC triggers microsatellite instability in the exposed *Arabidopsis thaliana* plants and their progeny. *Biocatalysis and agricultural biotechnology* **13**: 38-45
- Zhang, Y., Fischer, M., Colot, V., Bossdorf, O. (2013) Epigenetic variation creates potential for evolution of plant phenotypic plasticity. *New Phytologist* **197**: 314–322

