

Tartu Ülikool
Loodus- ja tehnoloogiateaduskond
Ökoloogia ja Maateaduste Instituut
Botaanika osakond

Siimo Kangruoja

EPIGENEETIKA JA PÕLLUMAJANDUS

Bakalaureusetöö

Juhendaja: Silvia Pihu

Tartu 2015

Sisukord

Sissejuhatus.....	3
Ajalugu.....	4
Epigeneetilised mehhanismid	6
Histoonide modifikatsioonid	6
DNA muundamine	7
Epigenoomi uurimine	10
Epigeneetika kasutamine sordiaretuses.....	12
Somaklonaalne varieeruvus.....	13
Genoomivermimine.....	17
Hübriidisatsioon ja epigeneetika	18
Paramutatsioonid.....	19
Epigeneetiline vastus biotilisele stressile	20
Arutelu	22
Kokkuvõte.....	24
Summary	25
Tänuavaldused	26
Lisad.....	27
Kasutatud kirjandus	29

Sissejuhatus

Epigeneetika on teadusharu, mis uurib mitootiliselt ja meiootiliselt pärandatavaid muutusi geeni ekspressioonis, mis ei hõlma muutusi DNA järjestuses (Chuang and Jones, 2007). Definitsiooni järgi ei kuulu epigeneetika sünteetilise evolutsiooniteooria alla, mille järgi pärandub informatsioon ainult DNA kaudu. Uusimad teadustööd näitavad epigeneetika olulisust organismide arengulistest ja evolutsioonilistest protsessides.

Epigeneetiliste mehhanismide uurimine on oluline, sest aitab mõista, kuidas toimub organismide paindlik ning kiire evolutsioon. Palju on seda uuritud inimeste kontekstis, kus epigeneetika aitab mõista näiteks vähi ja vaimsete häirete tekkepõhjuseid. Viimasel ajal on hakatud epigeneetikat uurima ka taimede kontekstis.

Käesoleva töö eesmärgiks on anda kirjandusel põhinev ülevaade epigeneetilistest mehhanismidest ning nende kasutusvõimalustest taimede aretamisel.

Käesolevas töös esinevate protsesside kirjeldamisel on kasutatud mudeltaimena valdavalt harilikku müürlooka (*Arabidopsis thaliana*). Kuid võimalusel on näitena kasutatud ka olulisemaid põllukultuure.

Töö eesmärgini jõudmiseks on püstitatud järgmised ülesanded:

- määratleda epigeneetika mõiste,
- anda lühiülevaade epigeneetika ajaloost,
- kirjeldada peamisi epigeneetilisi mehhanisme,
- anda ülevaade epigeneetika mõjust põllumajanduse arengule
- teha järeldused epigeneetika edasistest kasutusvõimalustest

Ajalugu

Epigeneetika termini lõi C. H. Waddington, ühendades 1942. aastal epigeneesi (organismi areng viljastamisest surmani) ja geneetika (Choudhuri, 2011; Kinoshita and Jacobsen, 2012). Selle terminiga kirjeldas ta bioloogia haru, mis uurib interaktsioone geenide ning nende produktide vahel, mis mõjutavad fenotüübi arengut (Diez et al., 2014). 1957. aastal defineeris T. H. Huxley epigeneetika ümber, kui teaduse, mis kirjeldab kudede ja organite diferentseerumist (Haig, 2004). Läbi aastate ning erinevate avastuste on iga termini kasutaja proovinud seda siduda enda uuritava bioloogiaharuga. Seetõttu on terminile omistatud palju erinevaid definitsioone.

Paljudest definitsioonidest on esile tõusnud kaks. Molekulaarbioloogide jaoks on epigeneetika „teadus, mis uurib mitootiliselt ja/või meiootiliselt pärandatavaid muutusi geeni funktsioonis, mida ei saa seletada muutustega DNA järjestustes” (Riggs et al., 1996). Nende jaoks hõlmaksid epigeneetilised mehhanismid peamiselt DNA metülatsiooni ja histoonide modifitseerimist (Haig, 2004). Samas kui funktsionaalse morfoloogia uurijad kirjeldaksid epigeneetikat kui “kõiki interaktsioone rakkude ja nende toodetud produktide vahel, mis viivad morfogeneesi ja diferentseerumiseni” (Herring, 1993 p. 472; Haig, 2004).

Erinevaid epigeneetilise mehhanisme, mis on aluseks epigeneetikale, on palju, kuid kõige rohkem on kajastust saanud DNA metülatsioon, histoonide modifitseerimine ning mittekodeerivad RNA-d.

Esimene teadustöö DNA metüleerimise mehhanismi kohta ilmus 1950. aastal, kui Wyatt kirjeldas selle toimumist prokarüootides (Wyatt, 1950; Minarovits and Niller, 2012). Esimene hüpotees selle rollist eukarüootides tekkis alles 1964. aastal, kui Srinivasan ja Borek pakkusid välja, et DNA metüleerimine kaitseb organismi võõra DNA eest (Srinivasan and Borek, 1964; Doerfler and Böhm, 2006). Paar aastat hiljem püstitati hüpotees, et DNA metülatsioon võib esile tuua mutatsioone, mis on vajalikud organismi arenguks, see aga ei sobinud John Gurdoni poolt 1962. aastal avaldatud kloonimiskatsete tulemustega, mis eitasid võimalust, et DNA-d muundatakse organismi arengu käigus (Gurdon, 1962; Morange, 2013). Eelnev hüpotees tõusis päevakorda uuesti 1975. aastal, mil ilmus kaks artiklit, mis pakkusid, et DNA metülatsioon on seotud transkriptsiooni regulatsiooniga (Doerfler & Pöhm, 2006). Nagu umbes kümme aastat

varem, puudusid ka siis eksperimentaalsed tõendid selle hüpoteesi paikapidavuse kohta, kuid bakterite restriktasid hiljutine avastus ning nende sarnasus eukariotide metüleerimismehhanismiga muutis hüpoteesi usutavamaks, lõplikult kinnitust sai hüpotees alles 80ndatel, mil avastati DNA metülatsioon imetajates (Morange, 2013).

Histoonide modifikatsioonide uurimine algas umbes 50 aastat tagasi atsetüülümismehhanismi avastamisega (Mersfelder and Parthun, 2006). Alguses oli teadlaste fookus pigem translatsiooni järgse muundamise mehhanismide tundmisel, mitte epigeneetiliste mehhanismide toimel ning nende mõjudel (Choudhuri, 2011). Alles hiljem avastati histoonide seos kromatiini struktuurimuutustega ning selle mõjuga geeni ekspressiooni häälestamisele (Mersfelder and Parthun, 2006; Choudhuri, 2011). Tänapäevaks on see tõusnud keskele kohale epigeneetika mõistmises.

Epigeneetilised mehhanismid

Histoonide modifikatsioonid

Histoonide translatsiooni järgsete modifikatsioonide alla kuuluvad: atsetüülimine, metülatsioon, fosforüleerimine, ubikvitineerimine ja sumoülatsioon (Iwasaki and Paszkowski, 2014).

Atsetüülimiseks nimetatakse histooni N-terminaalses otsas asuvale lüsiinile (K-le) atsetüül rühma lisamist (Van Oosten et al., 2014). Histoonide atsetüülimist viivad läbi histooni atsetüültransferaasid, nende eemaldamist aga histoonide deatsetülaasid (Wang et al., 2014). Atsetüülimine tõstab DNA transkriptsiooni, kuna vähendab histooni ja DNA vahelist afiinsust (Struhl, 1998). Lisaks tõmbab atsetüülimine ligi bromodomeeni sisaldav ATP-st sõltuvat SWI/SNF kromatiini ümberkujundavaid komplekse, mis "lõdvendavad" kromatiini ning seeläbi tõstavad transkriptsiooni (Van Oosten et al., 2014). Deatsetüleerimine aga viib geeni vaigistamiseni (Yuan et al., 2013).

Metüleerimiseks nimetatakse metüülrühma lisamist N-terminaalsele lüsiinile või arginiinile, see toimub histoonide H2A, H2B, H3 ja H4 puhul (Van Oosten et al., 2014). Selle protsessi eest vastutavad lüsiini ja arginiini metüültransferaasid ning nende eemaldamist viivad läbihistooni demetülaasid (Liu et al., 2010). Üldjuhul on H3K4 (kolmandat tüüpi histooni neljas lüsiin) ja H3K36 metüleeritud aktiivsetes geenides, samas kui H3K9, H3K27 ja H4 K20 metülatsiooni seostatakse transkriptsiooniliselt allasurutud ja vaigistatud kromatiini regioonidega (Xu et al., 2008). Metüleeritud histoonide mõju transkriptsioonile võib sõltuda ka metüleerituse astmest, mis lüsiini puhul võib varieeruda mono-, di- või tri-metüleeritud lüsiini ning arginiini puhul mono- või di-metüleeritud histooni vahel (Liu et al., 2010). Histooni metüleerimisel sõltub positiivne või negatiivne mõju geeni ekspressioonile metüleeritud lüsiini asukohast ja teistest histooni modifikatsioonidest (Yuan et al., 2013).

Fosforüleerimiseks nimetatakse seriinile või treoniinile fosfaatrühma lisamist ning see toimub histoonides H2A, H2B, H3 ja H4. Selle mõju transkriptsiooni aktiivsusele sõltub teistest olemasolevatest histooni modifikatsioonidest, nagu atsetüülimine ja metüleerimine (Van Oosten et al., 2014)

Sumoülatsioon on ubikvitiini taolise valgu (SUMO) lisamine histooni C-terminaalsesse otsa (Mazur and van den Burg, 2012). Selle protsessi tagajärjel ei saa toimuda atsetüülimist, mille tõttu seostatakse seda protsessi üldiselt transkriptsiooni allasurumisega (Van Oosten et al., 2014).

Lisaks histoonide erinevatele translatsioonijärgsetele muundamistele mõjutab histooni omadusi ka nukleotiidi järjestus millelt seda transkribeeritakse. Müürloogal on kokku 39 histooni kodeervat geeni, mida saab jagada "kanoonilisteks", enamikel neist puuduvad intronid ja nad on konserveerunud ning neid sünteesitakse nukleosoomis ainult DNA replikatsiooni käigus. Teiseks rühmaks on histooni teisendid, mida toodetakse terve rakutsükli käigus (Zhu et al., 2012). Sarnaselt modifitseeritud histoonidele ei paikne nad rakus juhuslikult, vaid kindlates lookustes, kromatiini struktuurides või ühise transkriptsiooni all olevates alades (Zhu et al., 2012).

Histooni erinevad modifikatsioonid ja teisendid on andnud alust "histooni koodi" hüpoteesi püstitamiseks, mille järgi määravad erinevad histoonid transkriptsiooni erinevalt (Grant-Downton and Dickinson, 2005). Kahjuks puudub ühtne arusaam, kas termin käib histooni teisendite, modifitseerimise või mõlema koosmõju kohta (Rando, 2012).

DNA muundamine

DNA metülatsioon mängib olulist rolli genoomi verimises, geenide vaigistamises ning osaleb paljukorduseliste järjestuste allasurumises (Du et al., 2014). Erinevalt loomadest toimub taimedel metüleerimine lisaks CG järjestusele ka CHG (H on C, T või A) ja CHH järjestuste puhul (Van Oosten et al., 2014). Prokariotides toimub ka DNA metüleerimine, kuid selle ülesandeks on kaitsta bakterit viiruste eest ja eristada sünteesitud DNA ahelat vanast ahelast ning see ei oma teadaolevalt regulatoorset kontrolli geenide üle (He et al., 2011). Pealesihtmärkjärjestuste genoomis erineb ka metüleerituse ulatus, olles selgroogsetel 3-5% tsütosiini jääkidest (Clark et al., 1995), taimedel on see sõltuvalt liigist 6-25% (Rabinowicz et al., 2005). Eksisteerib ka erandeid, näiteks mudelorganismides nagu pärm (*Saccharomyces cerevisiae*) ja äädikakärbes (*Drosophila melanogaster*) puudub DNA metülatsioon peaaegu täielikult (Tatarinova et al., 2013).

Erinevatel DNA metüleerimissaitidel on erinev metüleerituse aste ja erinevad ülesanded. Maisil (*Zea mays*) on CG saitidest metüleeritud 95,4%, CHG saitidest 70,9%, kuid CHH saitidest

ainult 1,2% (West et al., 2014). Metüleerituse tase võib varieeruda 100 aluspaariste genoomijuppide võrdlusel umbes 10 korda. Nii alades, kus esineb väga vähe või väga palju DNA metüleerimist, on rohkem histoonide metüleerimist, võrreldes keskmiselt metüleeritud DNA-ga aladega (West et al., 2014).

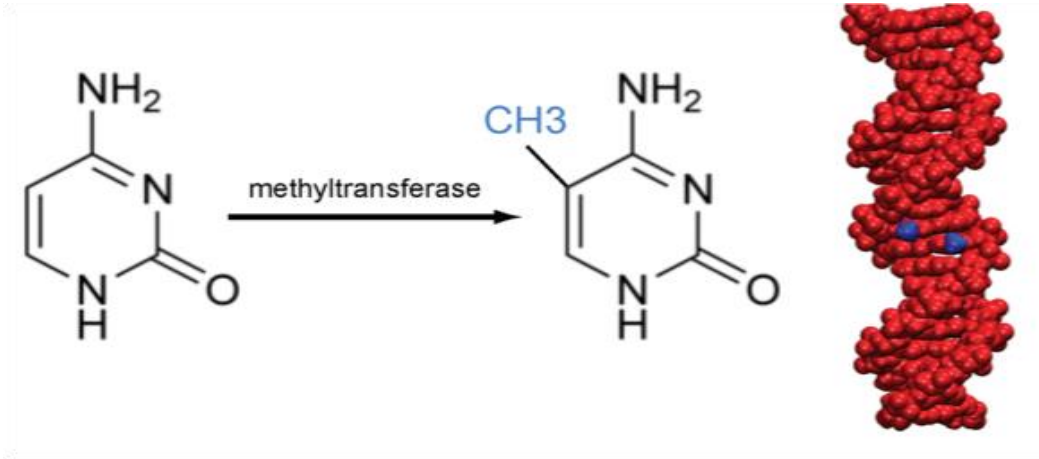
Näiteks geenid, mis sisaldavad palju CG järjestusi omavad suuremat ekspressiooni varieeruvust, ning neil on rohkem TATA-järjestusi (''eukariootsete geenide konserveerunud promootorijärjestus, mis määrab transkriptsiooni algussaidi'') (Heinaru, 2012 p. 1079; Tatarinova et al., 2013). Samas kui väiksema CG sisaldusega geenid kontrollivad üldiselt raku eluks hädavajalikke protsesse. Kahjuks pole veel kindlalt teada, miks CG saitide rikkad geenid pole rohkelt metüleeritud, selle põhjuseks võivad olla erinevad mehhanismid, mida kasutatakse CG saitide rikkaste ja vaeste geenide ekspressiooni kontrolliks (Tatarinova et al., 2013).

Lisaks kõigele eelnimetatule mängib tsütosiini metüleerimises rolli ka nukleotiidide järjestus, kus metülatsiooni sait asub (lisa 2). Näiteks erineb CG metüleeritus erinevate 7 aluspaarili pikkuste saitide võrduses (kus metüleeritud tsütosiin oli viies nukleotiid) kuni 13 korda, CHG järjestuse puhul kuni 11 korda ning CHH puhul varieerus metüleerituse tõenäosus erinevate saitide võrdluses kuni 900 korda (Cokus et al., 2008).

Metülatsiooni viivad läbi tsütosiini metüültransferaasid, mis paigutavad metüülrühma S-adenosüül metioniinilt (SAM) tsütosiini 5' süsinikule (Joonis 1) (Garg et al., 2014) Metüültransferaase saab jagada kolme rühma: metüültransferaasid (MET), kromometüültransferaasid (CMT) ja domeeni ümberpaigutavad metüültransferaasid (DRM) (Garg et al., 2014).

Metüültransferaasid säilitavad CG metülatsiooni taset heterokromatiini regioonides, milles on paljukorduselised järjestused, transposoonid ja geenid (Garg et al., 2014). Praeguseks on taimedel teada neli CG metüültransferaasi kodeerivat geeniperekonda : MET1, MET2a, MET2b ja MET3 (Fukui, 2005) . Kõige uuritum neist on MET1, mille analoog loomades on Dnmt1, see on vajalik näiteks õigeaegseks õitsemiseks, embrüogeneesiks ning idanemisvõimeliste seemnete arenguks (Watson et al., 2008; Huang et al., 2014). Peale sellele osaleb eespool nimetatud geeni poolt kodeeritud valk kas otseselt või kaudselt CHH järjestuste metüleerimises (Watson et al., 2014). CG saitide säilitamise jaoks on vaja MET1 valgul: kromatiini ümberkujundamise valku vähendatud DNA metüleerimiseks (DDM1), kolme SRA domeeni omavat metüleeritud

tsütosiiniga seostumisvõimelist valku ja metüleerimise teiseid (VIM1-3) (Vanyushin and Ashapkin, 2011). Teiste geenide kohta puudub piisav informatsioon, et teha põhjanevaid järeldusi (Fukui, 2005).



Joonis 1 DNA metüleerimine (<http://www.ks.uiuc.edu/Research/methylation/> järgi) Loomades esinev DNMT, mis on taimedes esineva MET-i analoog, poolt läbi viidud DNA metülatsiooni kujutamine (Garg et al., 2014).

Kromometülaasid (CMT) viivad läbi CHG ja CHH järjestuste *de novo* (uute kohtade) metüleerimist (Garg et al., 2014; Watson et al., 2014). Kõige rohkem on uuritud kromometülaasi CMT3, mille peamine ülesanne on viia läbi CHG metülatsiooni, kombineerudes histooni metüültransferaasidega SU(VAR) 3-9 homologid 4-6 (SUVH4-6) (Watson et al., 2014). Lisaks töötab antud valk ka CHH metülatsiooni säilitajana, kuid aktiivsus on 7 korda väiksem võrreldes CHG metüleerimisega (Du et al., 2012). CMT3 on võimeline ära tundma H3K9me, ning samas tunneb H3K9 metüleerimise eest vastutav SUVH4 ära ka metüleeritud CHH ja CHG järjestusi. Selle tõttu need protsessid võimendavad teineteist (Du et al., 2014).

Domeeni ümberkorraldavad metüültransferaasid (DRM) viivad läbi RNA poolt juhutatud DNA metülatsiooni rada (RdDm) ning säilitavad metülatsiooni asümmeetrilistes CHH järjestustes (Kumar et al., 2013; Sanchez and Paszkowski, 2014). Antud raja sihtmärgiks on enamasti paljukorduselised järjestused heterokromatiinis, üle genoomi laiali olevad transposoonid ning nendega seotud regioonid eukromatiinis (Watson et al., 2014). DRM2 ja tema väheaktiivse homoloogi DRM1 poolt läbiviidud *de novo* metülatsiooni juhivad 24 nukleotiidi pikkust siRNA-

d (Liu et al., 2014; Watson et al., 2014). Protsess algab, kui dicer-ensüümi poolt toodetud siRNA-d seonduvad Agronaut valguga, mis värbab paljude ensüümide seas ka DRM-e ja histooni modifitseerivad ensüüme, ning seob need sihtmärk DNAGA (Kumar et al., 2013; Vriet et al., 2015).

Metüleerimine ei ole ainuomane tsütosiinile, vaid toimub ka adeniinil (Vanyushin, 2005a). Bakterites on adeniini metüleerimine täiesti tavaline, ning selle kontrolli all on virulentsus-geenid (Heithoff et al., 1999). Taimedes esineb seda vähe ning selle peamine ülesanne on osaleda mitokondriaalse DNA paljundamisel, kuid lisaks toimub adeniini metüleerimist ka TGATCA järjestuse puhul (Vanyushin, 2005a; Ratel et al., 2006). Protsessi läbiviivatest ensüümidest on praeguseks teada ainult N6-adeniini DNA metüültransferaas (Vanyushin and Ashapkin, 2011). Pole veel kindlalt teada selle modifikatsiooni mõju geeni ekspressioonile, kuid tõenäoliselt on sellel repressiivne toime (Ratel et al., 2006).

DNA metüleerimine kutsub esile veel ühe huvitava fenomeni, milleks on metüleeritud tsütosiini üleminek tümiiniks, selle tagajärjel kaob kontroll geeni ekspressiooni üle (Vanyushin, 2005b). Seda põhjustab metülatsiooni-saidi kadumine, sest tsütosiin asendub tümiiniga (Tatarinova et al., 2013).

Epigenoomi uurimine

Vaatamata sellele, et DNA metülatsioon ei jäta otsesest jälge genoomi saab seda siiski erinevate meetoditega uurida. Üheks olulisemaks neist on naatriumbisulfaadi abil DNA modifitseerimine, mille läbi muutub metüleerimata tsütosiinid uratsiiliks. PCR käigus paljundatakse metüleerimata tsütosiinid tümidiiniks ja metüleeritud tsütosiinid muudetakse tsütosiiniks (Shen and Waterland, 2007). Neid on siis vastavalt võimalik sekveneerimisel tuvastada.

Kõrgefektiivne vedelik-kromatograafia võimaldab hinnata, kui suur osa genoomist on metüleeritud. Antud meetod ei anna aga mingisugust ülevaadet metülatsiooni mustri kohta (Osabe et al., 2014).

Metülatsiooni tundlik võimendatud polümorfism (*methylation-sensitive amplified polymorphism*) on edasiarendatud PCR. Meetodis kasutatavate kahe praimerid kinnitumiskohad

sõltuvad DNA metülatsioonimustrist, seda saab aga ära kasutada et võrrelda Antud uurimismeetod võimaldab võrrelda kahte uuritavat epigenoomi ning ei vaja eelnevaid genoomi uuringuid. Seda saab kasutada uurides metülatsiooni muutusi organismi arenedes või võrreldes kahte taime (Herrera and Bazaga, 2010).

Kasutada saab ka vanemaid meetodeid, nagu *northern blotting*, mis võimaldab mõõta mRNA kontsentratsiooni. Mille kaudu saab hinnata geenide ekspressiooni taset.

Histoonide ja muude DNAGA seotud valkude uurimiseks kasutatakse kromatiini immuunosadestamist (ChIP). Antud meetodi puhul kasutatakse esmalt formaldehüüdi, et siduda valgud nende sihtmärkjärjestus-DNAGA. Järgmises sammuna lõhutakse DNA juppideks ning antikehade abil puhastatakse lahusest välja uuritavad valgud koos nendele seondunud DNAGA. Selle meetodi üheks suurimaks puuduseks on antikeha-spetsiifilisus (Szyf, 2005; Miguel and Marum, 2011).

Vähemlevinud meetodeid on tõenäoliselt veel ja see valdkond areneb pidevalt.

Epigeneetika kasutamine sordiaretuses

Erinevad viisid epigeneetika kasutamiseks

Epigeneetika töötab lahendust mitmetele probleemidele sordiaretuses. Nimetatud teadusharu arendades oleks võimalik vähendada taime koekultuurides tekkivaid geneetilisi ja epigeneetilisi mutatsioone, mis vähendavad rakuliini elujõulisust ning selle kaudu kloonimise efektiivsust. (Kaepler et al., 2000). Mutatsioonide tekkesagedus sõltub taimeliigist, rukki (*Secale cereale*) kloonimisel on 50-73% tütarakkudest vähemalt üks muutus metülatsiooni muustris (Linacero et al., 2011). Need mutatsioonid ei ole juhuslikud, ning teatud fenotüüpidel on suurem esinemissagedus (Linacero et al., 2011). Kohvipuu (*Coffea arabica*) kloonimisel on nähtud somaklonaalset varieeruvust (kloonimisel tekkev varieeruvus, mida põhjustavad epigeneetilised ja geneetilised mutatsioonid) umbes 1% järglastest ning kõige sagedamini avalduvad need kitsalehelise ja kääbus-vormina (Bobadilla Landey et al., 2013).

Teiseks võivad epigeneetilised mehhanismid osaleda ka transgeenide allasurumises. Erinevalt prokarüootidest on soontaimedes suurem tõenäosus, et transgeen kutsub esile enda ja homologse piirkonna inaktivatsiooni, seda protsessi nimetatakse transgeeni poolt esilekutsutud transkripsiooni järgseks geeni vaigistamiseks (S-PTGS) (Shin et al., 2014). Nimetatud protsessi põhjustab transgeense lookuse pealt ebanormaalse RNA sünteesi, millele RNA-sõltuv RNA polümeraas sünteesib komplementaarse ahela, järgmisena lõikab dicer-ensüüm need kaheaahelised RNA-d 21-24 nukleotiidi pikkusteks siRNA-deks (Jauvion et al., 2012; Shin et al., 2014). Need lühikesed RNA jupid võivad osaleda nii RNA interferentsi (RNAi), kui DNA metülatsiooni suunamises (Jauvion et al., 2012). Peale eelmainitu võib somaklonaalset varieeruvust esile kutsuda ka eukarüootse raku võime dünaamiliselt muuta kromatiini kondensatsiooni astet, mis põhineb histoonide modifitseerimisel (Strenkert et al., 2013).

Kolmandaks oleks epigeneetika abil võimalik teha läbimurre abiootilise stressi resistentsete taimede loomises (Mittler and Blumwald, 2010). Lähituleviku perspektiivis on tähtis taimede võime taluda kõrgemaid temperatuure, sest prognooside järgi tõuseb aasta keskmine päevane temperatuuri maksimum selle sajandi keskpaigaks umbes 1 – 3°C ning sajandi lõpuks umbes 2 – 5°C (Bokszczanin and Fragkostefanakis, 2013). Vajadust stressitaluvuse tõstmise järele suurendab ka asjaolu, et enamuse hetkel kasutatavatest sortidest on aretatud stabiilse kliimaga

perioodil, mille tõttu on saagi stabiilsus tulevikus küsitav. Üks võimalikest lahendustest on õhulõhede täiendav kontroll. Müürlooga peal tehtud katsed on näidanud, et õhuniiskus määrab ära kui suur on õhulõhede tihedus. Madal suhteline õhuniiskus kutsub esile siRNA-de poolset õhulõhe arenguks vajalike *FAMA* ja *SPEECHLESS (SPCH)* lookuste transkriptsiooni allasurumist (Tricker et al., 2012). Seda protsessi viib läbi RdDM mehhanism ning epigeneetiline mälu kestab vähemalt ühe põlvkonna (Kinoshita and Seki, 2014). Lisaks eelmainitule saaks kasutada ka kuumastressi puhul ekspresseeritavaid gene. Seni on selliseid leitud ainult müürloogal, mille geen *dmr1-3 allasuruja (SDC)* aktiveerub peale 3h 37°C juures ning aitab taimel taastuda kuumastressist (Sanchez and Paszkowski, 2014). Eelnimetatud mehhanism võimaldab kontrollida kuumastressi vastu sisestatud transgeenne, kuid see vajab veel uurimist. Lisaks tuleb silmas pidada ka kliimasoojenemisega kaasnevat väiksemat õhuniiskust ning kõrgemat CO₂ taset (Doheny-Adams et al., 2012).

Vaatamata paljudele võimalustele mida epigeneetika pakub on sellel ka puuduseid. Valdkonna teadmiste rakendamine vajab suurt eeltööd genoomi tundmises, sest ainuüksi kuumastressi olemasolul tõusis müürloogal umbes 1500 geeni ekspressioon vähemalt 2 korda. (Bokszczanin and Fragkostefanakis, 2013). Mudelorganismi uurimisel on nähtud ka, et päranduvate DNA metülatsiooni mutatsioonide tekkesagedus on 10⁻⁴ kuni 10⁻⁵ metülatsiooni polümorfismi iga CG saidi kohta aastas, mis on aga oluliselt suurem geneetilisest mutatsioonisagedusest, mis on 10⁻⁸ – 10⁻⁹ aluspaari vahetust põlvkonna kohta (Springer, 2013; Shi and Lai, 2015). Ühest küljest lihtsustab epimutatsioonide suur tõenäosus selle uuringuid, kuid teisest küljest pole see koos paramutatsioonidega; interaktsioon geeni kahe alleeli vahel, mille puhul üks alleel muudab pärandatavalt teist alleeli (Kumar et al., 2013); eriti soovitatav protsess põllumajanduses, kus sordi tunnused on vaja hoida konstantselt samad.

Somaklonaalne varieeruvus

Somaklonaalne varieeruvus on defineeritud, kui fenotüübiline varieeruvus, mis on kas geneetilise või epigeneetilise päritoluga, ning esineb somaatiliste kloonide puhul (Miguel and Marum, 2011). Sinna alla kuuluvad kõrvalekalded nagu kromosomaalsed ümberkorraldused

(deletsiooid, duplikatsioonid, inversioonid ja translokatsioonid), mõnikord isegi aneuploidsus ja polüploidsus (Bobadilla Landey et al., 2013).

Rakkude kloonimiseks rakukultuuris on kaks võimalust:

- Rakkude kasv läbi sekundaarse embrüogeneesi, mis hõlmab esmalt rakkude dediferentseerumist millele järgneb nende kasvu võimendamine läbi sekundaarne pungumise (*adventitious budding*).
- Embrüonaalne suspensioon (*embryogenic suspension*), mis soosib kiiret embrüonaalsete rakkude paljunemist enne embrüo eristumist.

Tööstuses on kasutamiseks sobilik ainult viimane variant, kuna esimese variandi suurenenud jagunemiskiirusega kaasneb suurenenud genoomi ja epigenoomi ebastabiilsus. Selle üheks põhjuseks on liiga kiire rakujagunemine, mis on tingitud liiga kõrgest kasvuhormoonide kontsentratsioonist (Bairu et al., 2006; Bobadilla Landey et al., 2013). Näiteks 2,4-D (sünteetiline auksiin) 1.36 µM kontsentratsiooni ja 6-kuuse embrüogeenilise perioodi puhul on somaatilise vareeruvus umbes 0,74%, 4.52 µM 2,4-D kontsentratsiooni ja 12-kuuse perioodi puhul tõuseb see 25% juurde (Bobadilla Landey et al., 2013).

Somaklonaalse varieeruvuse tuvastamiseks on mitmeid erinevaid võimalusi: morfoloogia, füsioloogia, biokeemia, valgud, mikrosatelliidid jne. Kuid hetkel puudub veel meetod, mis võimaldaks seda tuvastada kiirelt, odavalt ja suuremahuliselt erinevate arengustaadiumite puhul (Kumar et al., 2011).

Teisest küljest saab tekkivat varieeruvust sordiaretuses ära kasutada. Protsessi raskendab küll asjaolu, et teatud mutatsioonidel on suurem tekketõenäosus kui teistel (Joonis 2), näiteks kõige tihedamini ilmes kohvipuu istikutel kitsalehine, kirju ja kääbus-vorm (Bobadilla Landey et al., 2013). Taime kasvuhormoonide mõju somaklonaalse varieeruvuse tõusule on erinevatele taimeliikide puhul on raske ennustada. Erinevalt kohvipuust pole banaani (*Musa acuminata*) rakukultuurides tsütokiniini kontsentratsiooni suurendades somaklonaalse varieeruvuse tõusu täheldatud (Bairu et al., 2011; Bobadilla Landey et al., 2013). Somaklonaalse varieeruvuse hindamiseks on Cote, Teisson, & Perrier loonud valemi:

$$\%V = [1 - (1 - p)^n] \times 100,$$

kus %V väljendab mitu protsenti on erineva fenotüübiga isendeid, p on oodatav varieerumine ($1 - p$, tähistab eeldatavat tõenäosust saada sama fenotüübiga järglane) ja n tähistab jagunemistsüklite arvu. Valemist saab järeldada, et erineva fenotüübiga isendite arv tõuseb eksponentsiaalselt koos paljunemistsüklite arvu kasvuga (Cote et al., 2001).



Joonis 1 Välikatsetes avastatud kohvipuu erinevad fenotüübid. A, normaalse fenotüübiga taim; B, kitsalehine; C, kirju; D, normaalne fenotüüp; E, kääbus; F, ümmarguste lehtedega (Bullata) fenotüüp (Bobadilla Landey et al., 2013).

Hoolimata raskustest on soovitud fenotüübi saavutamiseks mitmeid viise, kuna sama fenotüüpi võivad põhjustada mitmed erinevad mutatsioonid. Näiteks soolatalerantsust taimedes võib saavutada mitme erineva mehhanismi abil:

1. Na⁺ ionide rakust väljaheitmine transporterite abil.
2. Osmootse rõhu muutmine, läbi sahharoosi, glütserooli ja/või betaiinide kontsentratsiooni tõusu.
3. Makromolekulide kaitse (soolastress põhjustab hapniku radikaalide tekke, mis lõhuvad valke, nukleiinhappeid ja rasvu) ja membraani transpordi süsteemide muutmine.
4. AtNHX1 ja AtAVP1 geenid, mille ekspressiooni suhe võib määrata raku võime Na⁺ ionide lukustamiseks vakuooli (Arzani, 2008).

Kuid vaatamata sellele on soolaterantsete taimede liine suudetud luua väga vähe (Cuartero et al., 2006).

Tabel 1 (Arzani, 2008 järgi). Võrreldud on soolaterantseid turaani nisu (*Triticum turgidum*) genotüüpe, mis on saadud erinevate meetoditega: ITG - *in vitro* (katseklassis toodetud mutageneesi tagajärjel saadud) soolaterantne genotüüp; ISG - *in vitro* soola tundlik genotüüp; FTG (põllul aretatud soola tolerantne genotüüp); FSG (katseväljalt aretatud soolaterantne taim). Katses oli mulla soolsus 150 mM NaCl, mida tähistab “soolane”. Normaalse soolsusega pinnast tähistab “mage”. SDS (Sodium dodetsüülsulfaat) kasutatakse, valkude eraldamiseks ning see näitab jahu kvaliteeti läbi tema valgulise koostise (Arzani, 2008).

Genotüüp	Saak (%) soolane/mage	Biomass (%) soolane/mage	Valgu koostis (%) soolane/mage	Kuiv gluteeni sisaldus (%)	(SDS) settimise hulk (%)
Prion-1 (ITG)	75	55	118	103	188
Dipper-6 (ITG)	69	50	115	89	135
Dipper-6 (ITG)	60	54	120	110	149
Massara-1 (ISG)	81	64	111	119	207
Srn/Vic (FTG)	66	47	118	122	150
PI40098 (FTG)	70	51	114	108	167
Aj/.../Gan (FTG)	58	28	118	105	214
Lund-6 (FSG)	71	51	131	107	144
keskmine	69	50	118	108	166

Vaatamata võimalikele riskidele ning uurimist vajavatele nüanssidele pakub rakukultuurides taimede kasvatamine ka mitmeid eeliseid. Näitena võib välja tuua: paljunemise kiirus, sõltumatus geograafilisest asukohast ja kliimast, haigusvabade isendite saamine, väiksem varieeruvus kui traditsiooniliselt kasvatatud taimedes (see sõltub liigist ning kasvatamistingimustest) ja väiksemad kulud (Kumar et al., 2011). Eriti kasulik on rakukultuure kasutada teatud puude puhul, näiteks perekond tamm (*Quercus spp*). Tamme paljundamisel on muidu palju piiranguid sest neil on madal seemnetoodang (head seemneaastad ainult iga 3-5 aasta tagant) ja raskuseid traditsioonilise vegetatiivse paljundamisega (Wilhelm, 2000). Eelnimetatud võimaluste tõttu ei saa kõrvale jätta epigeneetika potentsiaali põllumajandus.

Genoomivermimine

Genoomi vermimine on reguloorne mehhanism, mille tagajärjel toimub geenide vaigistamine sõltuvalt sellest, kummalt vanemalt nad pärinevad. Taimedel avastati see 1970ndatel uurides maisi ja loomadel 1980ndatel (Feil and Berger, 2007). Erineva arengutee tõttu on geenide vaigistamise kontroll taime- ja loomariikides erinev. Loomadel kontrollitakse gene pigem kromosoomi piirkondade kaupa, samas kui taimedel toimub see spetsiifilise geeni tasemel (Feil and Berger, 2007).

Kõige olulisem on genoomi vermimise roll seemnete arengus, kus ema- ja isapoolsete geenide avaldumise muster määrab ära seemnete arengu, sealhulgas endospermi oma (Curtis and Grossniklaus, 2008). Siinjuures tuleb mainida, et erinevatel vanematel on erinevad paljunemisstrateegiad. Arvatakse, et emasorganism soovib saada võimalikult palju elujõulisi järglasi, samas kui isasorganismi huvi on saada võimalikult suuri ja elujõulisi järglasi (Pires, 2014). Seda näitas katse, kus isasliinilt pärinevate geenide ekspressiooni suurendamine viis suurema endospermi tekkeni, samal ajal kui tõstetud emasliini ekspressioon vähendas keskmist endospermi suurust (Feil and Berger, 2007).

Genoomi verimise nähtust põhjustab peamiselt DNA metüleerimine ja histooni modifikatsioonid. DNA metülatsiooni eest hoolitseb eelnimetatud MET1, mille funktsioon on hoida isasliinilt pärinev genoom metüleeritud ning selle läbi vaigistatud. DNA demetülaas DEMETER eemaldab enne viljastamist emapoolsetes endospermi arengut määravates geenides metüülrühmad (Pires, 2014). Isasliinilt pärineva genoomi vaigistamist viljastamisel on näha geenid, mis kodeerib viljastamist mittevajavate seemnete moodustumist (FIS) ja *Medea* geenide puhul, mille ekspressiooni peale viljastamist suudeti tuvastada ainult emaliini genoomist (Curtis and Grossniklaus, 2008).

Hübriidsatsioon ja epigeneetika

Hübriidiseerimine on erinevate tüvede, sortide, liikide või erinevatest perekondadest pärinevate isendite ristamine (Ng et al., 2012). Põhjus, miks seda põllumajanduses kasutatakse, on heteroos ehk hübriidjõud (hübriidide suurem kohasus, kui nende homosügootidest vanematel), mis väljendub suurema biomassi, kasvukiiruse ja/või viljakusena (Chen, 2010). Esimesena kirjeldas seda nähtust 1876. aastal oma raamatus C. Darwin (Darwin, 1876)

Kui hübriidiseerimisele järgneb kromosoomi kahekordistumine, mille tagajärjel tekivad geneetiliselt stabiilsed allopolüploidid ("polüploid, millel on kahest või enamast liigist pärit geneetiliselt erinevad kromosoomikomplektid" (Heinaru, 2012 p. 968)), siis kinnistuvad vähemalt osad heteroosi nähtused jäädavalt (Ng et al., 2012). Hübriidi elujõulisus tuleneb asjaolust, et hübriidi geeniekspressioon ei ole alati kahe vanema keskmine, vaid võib olla sellest oluliselt suurem või väiksem. See aga muudab hübriidiseerimise tulemuse ennustamise keeruliseks (Birchler et al., 2005). Kuigi inimeste poolt tehtud hübriidid pole tihti elujõulised, on see täiesti tavaline protsess looduses, hinnanguliselt on vähemalt 4% õistaimedest tekkinud allopolüploidisuse tulemusena (Nasrallah et al., 2007).

"Hübriidide kokkusobimatust vaadeldakse üldiselt kui negatiivset epistaatilist ("Mittealleelsete geenide produktide vastastikmõju" (Heinaru, 2012 p. 989)) interaktsiooni kahe alleeli vahel, mis ei põhjusta negatiivset kohasust nende vanematel" (Lafon-Placette and Köhler, 2015). Väikesed mittekodeerivad RNAd on erineval tasemel konserveerunud, näiteks siRNAd on

suures mahus varieeruvad liikide vahel, samas kui miRNA-d ja ta-siRNA-d on enamalt jaolt konserveerunud. Tihti esineb ekspressiooni varieerumist lähedalt suguluses olevate liikide, hübriidide ja allopolüploidide vahel (Ng et al., 2012). Näiteks müürloogal ja tema sõsarliigil *Arabidopsis lyrata*, mis lahkesid 10 miljoni aasta eest, erineb umbes 24-32% miRNA lookustest (Ng et al., 2012).

Hübriidide elujõulisust võib piirata ka "genoomi šokk", mille puhul aktiveeruvad transponeerivad elemendid ja toimub genoomi ümberkorraldamine (Ng et al., 2012).

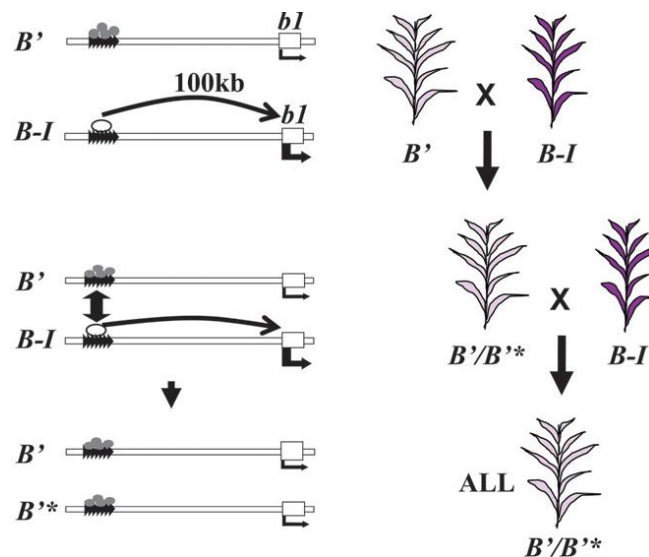
Paramutatsioonid

Paramutatsioon on interaktsioon geeni kahe alleeli vahel, mille puhul üks alleel muudab pärandatavalt teist alleeli (Kumar et al., 2013). Paramutatsioonid kuuluvad epigeneetika alla, kuna on päranduvad. Muutus fenotüübis on lihtsasti vaadeldav ning selle põhjus on DNA metüleerimine, milles mängivad olulist rolli geeni järel olevad kordusjärjestused (Chandler and Alleman, 2008).

Paramutatsiooni poolt mõjutatud geene saab jagada kolmeks: paramutageensed, paramuundatavad (paramutable) ja neutraalseteks (ei osale paramutatsioonides) (Grant-Downton and Dickinson, 2005). Paramutatsiooni poolt muudetud geen võib seda muutust edasi anda või pöörduda tagasi para-muudetavasse olekusse (Springer, 2013).

Nähtuse avastaja on Alexander Brink, kes uuris 1950ndatel pärandatavaid muutusi maisis, ning nimetas antud fenomeni oma pöörduva loomuse tõttu paramutatsiooniks, et eristada seda klassikalisest mutatsioonist (Chandler et al., 2000). Praeguseks on maisil avastatud ainult paar paramutatsiooniga mõjutatavat geeni, mis annavad taimele erineva värvi (Arteaga-Vazquez and Chandler, 2010). Maisil avastatud paramutatsiooni süsteemil on järgmised omadused: paramutatsiooniga muudetud geen pärandub stabiilselt edasi järgmisesse põlvkonda, järgmises põlvkonnas muutub paramutatsiooni läbiteinud alleel paramutageenseks ja paramutatsioon ei kutsu esile muutusi DNAs (Arteaga-Vazquez and Chandler, 2010). Näiteks *b1* geeni paramutatsioonis osalemise määravad geeni promootorjärjestusest umbes 100 000 nukleotiidi

eespool asuvad 853nt pikkused tandemjärjestused, mida neutraalsel alleelil esineb üks ning paramutatsiooni võimega alleelil seitse (Joonis 3; Arteaga-Vazquez and Chandler, 2010).



Joonis 3 –Paramutageenne järjestus, mis muudab paramuudetava endasarnaseks, metüleerides eespool asuvaid tandemjärjestusi ning selle edasikandumisest järgmistesse põlvkondadesse. B' on paramutageenne ja B-I on paramuundatav ning B'* on paramutageenseks muutunud paramuundatav järjestus (Chandler and Alleman, 2008).

Epigeneetiline vastus biotilisele stressile

Biotilise stressi tekitajad on erinevad herbivoorid, viirused, bakterid ja seened. Seemne arengut toetab rohkem emasorganism ning tema poolt läbikogetud stress jätab kiirema stressivastuse kaudu jälje järgmistesse põlvkonda. Antud nähtust võivad põhjustada varuained, hormoonid, toksiinid või teised embrüos asuvad ained (Latzel et al., 2014). Selle ärakasutamiseks põllumajanduses tuleks seemnetaimedele luua võimalikult sarnane keskkond vajaliku põllumaaga.

Hüpoteesi emastaimede kogemuse edasikandumisest toetab ka merimänni (*Pinus pinaster*) peal tehtud katse, kus paremates tingimustes kasvatatud emastaime järglastel oli seene *Fusarium circinatum* poolt tekitanud nekroos 16% väiksem kui halbades tingimustes kasvanud emastaime järglastel. Selle tulemuse puhul on arvestatud ka seemne suuruse erinevust, mis on tingitud emastaimede erinevatest ressurssidest (Vivas et al., 2013).

Jasmoniinhape (JA) on taimehormoon, mille üks paljudest ülesannetest on reguleerida taime vastust mehaanilistele ja herbivooride poolt põhjustatud vigastustele (Cheong and Choi, 2003). JA-d kodeeriva geeni ekspressiooni kutsuvad esile nii mehaaniline kahjustus, metüüljasmoniinhape (hormoon, mille kaudu taimed annavad edasi herbivoori "häiret"), kui ka taimekahjuri poolt tekitatud otsesed vigastused (Rasmann et al., 2012).

Erinevat tüüpi vigastus suurendab järgmise põlvkonna kahjuri resistentsust erineva efektiivsusega (Xu et al., 2015). Väikse-kapsaliblika (*Pieris rapae*) rööviku mass oli 40% võrra väiksem, kui eelnev generatsioon oli langenud sama putukaliigi ohvriks (Xu et al., 2015). Kui aga eelnev generatsioon polnud otsest putukakahjustust kogenud, vaid omistas tugevdatud kaitsereaktsiooni MeJA kaudu, oli rööviku suurus ainult 27% väiksem võrreldes kontrollrühma keskmisega (Xu et al., 2015). Eelmises põlvkonnas olnud mehaaniline kahjustus aga ei aidanud müürlooka herbivoori vastu. Tuleb mainida, et edasi antud tugevam kaitsevastus on enamasti herbivoorispetsiifiline (Xu et al., 2015), ning säilib veel kuni kaks põlvkonda peale kahjuriga kokkupuutumist (Rasmann et al., 2012). Kuigi täpne mehhanism on teadmata, ei pärandu tugevam reageering edasi seemnetesse kõrge hõlmasuure hormoonide kontsentratsiooni kujul, vaid tõenäoliselt siRNAde kaudu (Rasmann et al., 2012), kus need mõjutavad HDA1 perekonna gene, mis kodeerivad histooni deasetülaase (Demetriou et al., 2009; Alvarez et al., 2010),.

Bakterirünnaku vastaste kaitsemehhanismide aktiveerumiseks peab toimuma DNA demetüülatsioon. Efekti nähti, kui uuriti müürlooga mutantide kaitse efektiivsust taimepatogeeni *P. syringae* vastu, kellel puudus CG metüülatsiooni sest esines mutatsioonid met1-3 metüültransferaasides või CG väliste saitide metüülatsiooni võime, kuna esinesid mutatsioonid, mis takistasid järgnevate ensüümide töötamist: ddc (mutant, millel puudub töötav drm1, drm2 ja cmt3 ensüüm), drm1-2, drm2-2 ja cmt3-11, (lisa 1) (Downen et al., 2012). Erineva spetsiifilisusega kaitsemehhanismid on erinevalt metüleeritud, näiteks reageerib taim CHH ja CG metüülatsiooni muutusega juhul kui tunneb salitsüülhappe, virulentse või avirulentse bakteri olemasolu (Downen et al., 2012). Samas ainult virulentse bakteri poolt toimunud koloniseerimisel muutub CHH metüülatsiooni muster (Downen et al., 2012). Veel tuleb mainida, et salitsüülhappe lisamisel toimus 4,4-4,7 korda rohkem metüleerimist kui bakteri olemasolul. Tõenäoliselt põhjustab seda asjaolu, et salitsüülhappel on organismis mitu rolli ning selle üleekspressioon tagajärjel tekib kääbus-fenotüüp (Downen et al., 2012).

Arutelu

Epigeneetika on teadusharu, mis uurib mitootiliselt ja meiootiliselt pärandatavaid muutusi geeni ekspressioonis, mis ei hõlma muutusi DNA järjestuses. Epigeneetika mõiste on vana, kuid epigeneetika kui eraldiseisev teadusharu on noor, selle tõttu puudub terminitel ühtne definitsioon. Näiteks kasutatakse terminit epigeneetika, et kirjeldada igasugust histoonide translatsioonijärgset muundamist ning DNA metüleerimist, keskendumata aga nende pärandumisele.

Epigeneetilise pärandumise tõestamine võib esmapilgul tunduda lihtsa ja vähekulukana, sest selleks peab mõjutama ainult emastaime. Selle tagajärjel on tihti võimalik näha tugevamat ja kiiremat stressivastust järgnevatel generatsioonides. Kahjuks ei saa ilma põhjalike uuringuteta kindel olla, et pärandumine toimub läbi epigeneetiliste mehhanismide. Selleks, et veenduda, kas tegemist on tõesti epigeneetiliste pärandumismehhanismidega on vajalik genoomi ja epigenoomi sekveneerimine ning RNA või valkude kontsentratsiooni mõõtmine. Kuid põhjalik uurimine on aeganõudev ning kogutud andmete haldamine keeruline, sest pole teada seos genotüübi ja fenotüübi vahel. Selle pärast on täpset mehhanismi teadmata raske hinnata, kas päranduv fenotüüp on oma kiire tekke ja paari põlvkonna pikkuse eluea tõttu epigeneetiline. Selle tuvastamiseks saab kasutada RIL liine, mis on geneetiliselt samasugused, kuid erinevad oluliselt epigenoomi tasemel.

Metülatsioonimustrite mõõtmiseks on mitmeid variante, kuid enamus neist põhinevad bisulfaat meetodil ning arengud toimuvad peamiselt selle täiustumises. Histoonide uurimine põhineb valkude immuunosadestamisel, mille puuduseks on immuunvalkude spetsiifilisus ja nende toomise keerukus (<http://www.biotechniques.com/news/Future-Methods-for-Epigenetic-Studies/biotechniques-322348.html>).

Samuti puudub piisav teave DNA metülatsiooni läbiviivate ensüümide täpsema toime kohta, sest siiani pole avaldatud piisavalt uurimustöid, kus kirjeldatakse ensüümi poolt eelistatud järjestusi. Selle tõttu pole aga võimalik hinnata, kui palju on ensüümide eelistus kujundanud metülatsioonimustrit või isegi evolutsiooni suunda.

Epigeneetika ja geneetika eristamine on kohati keeruline, sest epigeneetika kontrollib metüleerimise kaudu transposoonide aktiivsust (He et al., 2011), transposoonid omakorda suudavad

tekitada muutusi genoomis. Seda on eriti näha somaklonaalse varieeruvuse juures, kus epigenoomi mutatsioonide tõttu vabanenud transposoonid tekitavad muutusi genoomis.

Epigeneetiliste mehhanismide poolt tõstetud kohasus avaldab mõju ka geneetilisele evolutsioonile, mille tõttu võiks see huvi pakkuda evolutsiooni uurijatele (Diez et al., 2014). Vaatamata sellele, et tõenäoliselt ei jäta epigenoom oma kordades suurema mutatsioonisageduse tõttu (Shi and Lai, 2015) nii head jälge järgnevasse põlvkondadesse kui geneetilised mutatsioonid, on see siiski väga oluline evolutsiooni mõistmisel.

Enamus epigeneetika vallas tehtud uuringuid keskenduvad demetülatsioonile ning selle poolt põhjustatud vähi tekkele inimesel, mis esmapilgul tundub taimedest väga kauge. Kuid uusi meetodeid saaks suuremas osas rakendada ka taimede uurimises. Näiteks tehnilised uuendused naatrium bisulfaadi meetodi edasiarendamisel, mis võimaldaksid kiiremat ja täpsemat sekveneerimist. Kahjuks ei saa neid uuendusi kasutada histoonide uurimisel, sest antud valgud erinevad oluliselt erinevate riikide vahel.

Kokkuvõte

Epigeneetika pakub palju võimalusi põllumajandusele, et ületada erinevaid biotilisi ja abiotilisi stressoreid, mis on piiravaks faktoriks taimede saagikusele. Arvestades kliimamuutuse olulist kiirenemist lähitulevikus võivad epigeneetilise muundamised olla heaks lahenduseks.

Käesoleva töö eesmärgiks oli anda ülevaade erinevatest epigeneetilistest mehhanismidest, mis osalevad taime arengus või füsioloogilistes protsessides ning mida saaks ära kasutada põllukultuuride aretamisel.

Lõputöös anti ülevaade epigeneetika mõistest ja ajaloost. Töös käsitleti erinevaid epigeneetilisi mehhanisme nagu histoonide translatsioonijärgne modifitseerimine ja DNA metüleerimine. Vaadeldi erinevaid põllumajanduses olulisi epigeneetiliste mehhanismide poolt kontrollitud mehhanisme nagu somaklonaalne varieeruvus, genoomi vermimine, hübriidisatsioon, paramutatsioonid ning resistentsus abiotilise ja biotilisele stressile.

Lõputööle tuginedes saab teha järgmised järeldused:

- Epigeneetikal on oluline koht põllumajanduse arengus, sest epigeneetilised mehhanismid aitaks muuta põllumajandustaimed efektiivsemateks ressursi kasutajateks ning võimaldaks muuta nad vastupidavamaks keskkonnamuutustele. Kuid selle realiseerimiseks on vaja paremat ülevaadet genoomi ja epigenoomi toimimisest ning omavahelistest mõjudest.
- Epigeneetilisi meetodeid, mis on välja arendatud meditsiinis kasutamiseks, saaks tõenäoliselt rakendada ka taimede uurimisel, sh põllumajanduslikel eesmärkidel.

Summary

Epigenetics and agriculture

Epigenetics offers a lot of opportunities in agriculture to overcome different biotic and abiotic stressors that can be limiting for harvest. Considering models that predict acceleration of climate change, epigenetics might be one of the solutions in agriculture.

The aim of this work is to give a summary of different epigenetic mechanisms, that influence developmental and physiological processes and could be harnessed for improvement of plants in agriculture.

This paper involves a brief overview of epigenetical terms and history. It covers different epigenetical mechanisms such as histone post-translation modifications and DNA methylation. The different agriculturally important processes that include epigenetic mechanisms are explained and discussed more thoroughly, for example somaclonal variation, genomic imprinting, hybridization, paramutations and resistance to abiotic and biotic stressors.

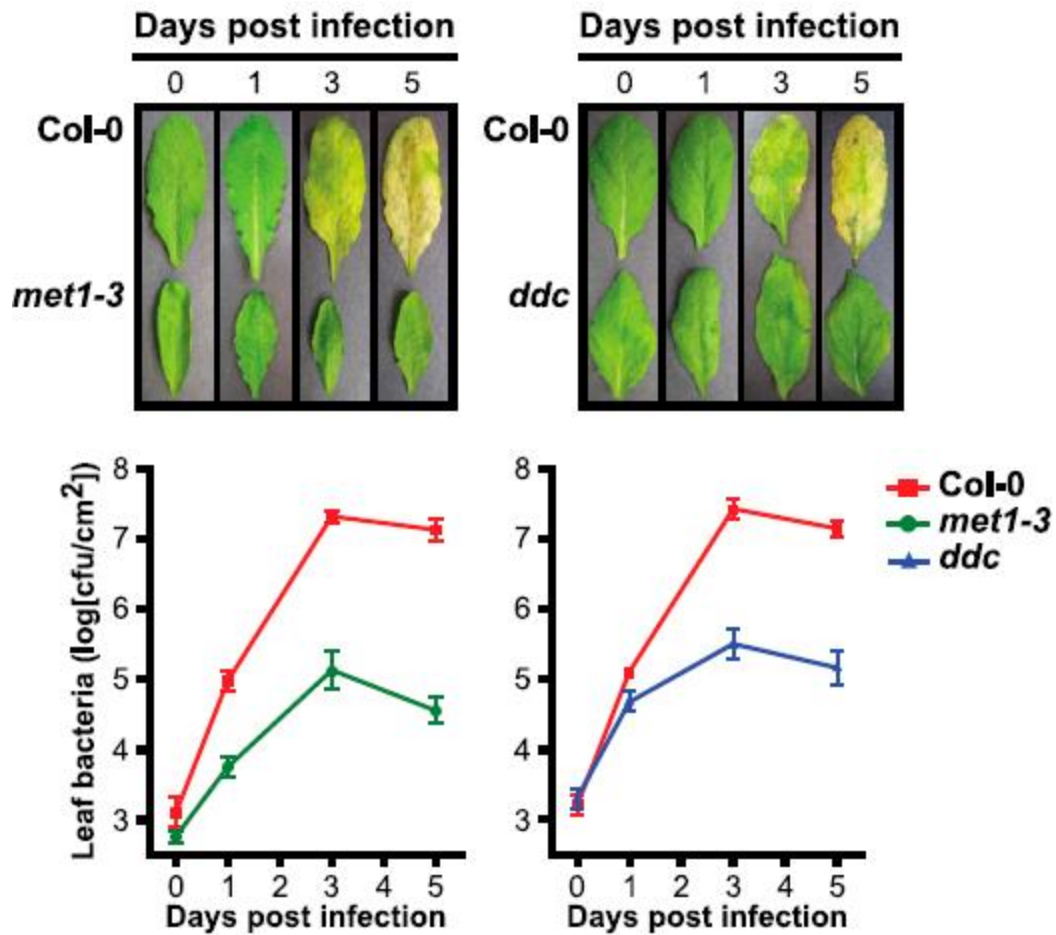
Based on this thesis the following conclusions can be drawn:

- Epigenetics has an important part in the development of agriculture. It could increase the efficiency of resource use and make plants more resistant to climate change. To harness that potential there is a need for more research on the links between genome and epigenome.
- Different epigenetic methods developed in medicine could possibly be used to investigate plants as well. The gained knowledge could also be used for agricultural purposes.

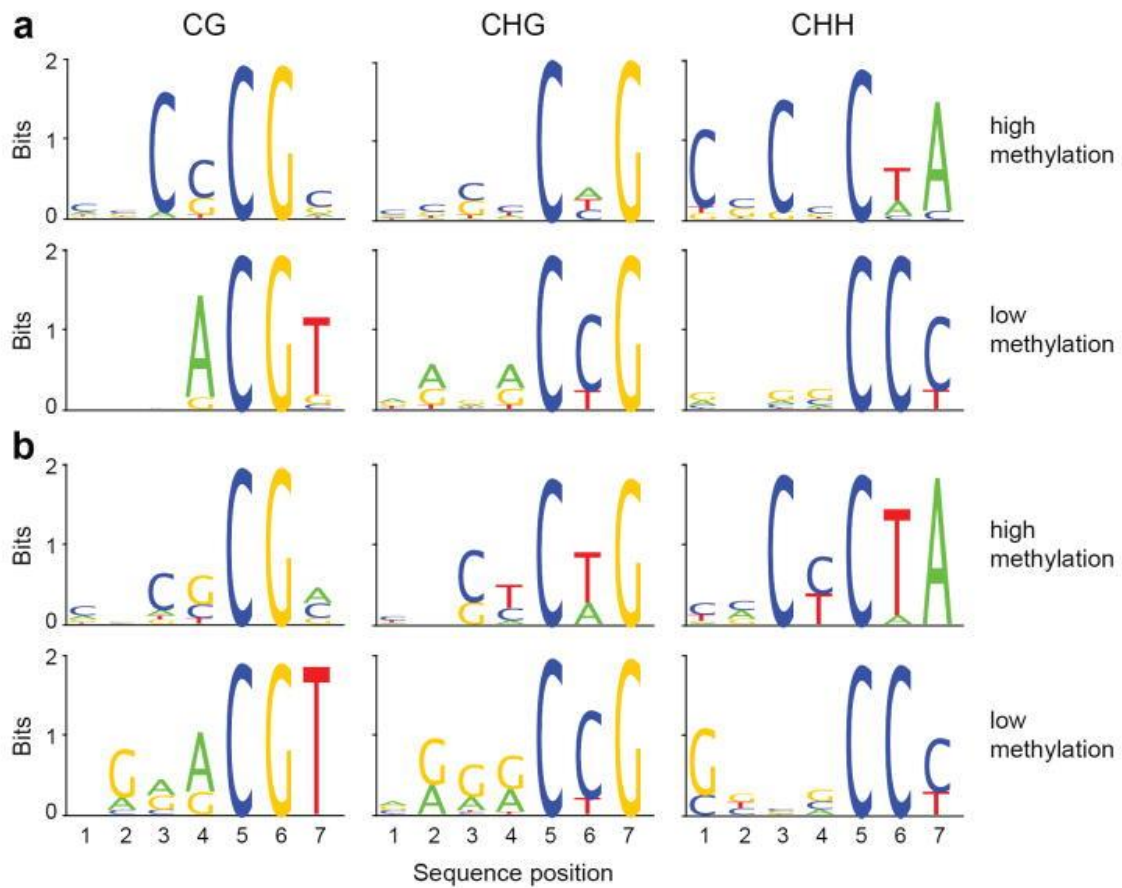
Tänuavaldused

Sooviksin tänada oma juhendajat Silvia Pihu abi eest töö valmimisel ja dr Inga Hiiesalut abistavate kommentaaride ja nõuannete eest.

Lisad



Lisa 1 Ülemistel piltidel on *P. syringae* poolt nakatatud müürlooga lehed ning all pool kvantifitseeritud katsetulemused, mis näitavad kontrolli (*Col-0*) ja mutantide (*met1-3* ja *ddc*) erinevat resistentsust antud patogeenile (Downen et al., 2012).



Lisa 2 Kujutatud erinevaid järjestusi mille puhul toimub metüleerimine ning nende tekkesagedust (Cokus et al., 2008).

Kasutatud kirjandus

ALVAREZ, M.E., F. NOTA, AND D. A. CAMBIAGNO. 2010. Epigenetic control of plant immunity. *Molecular Plant Pathology* 11: 563–576.

ARTEAGA-VAZQUEZ, M.A., AND V.L. CHANDLER. 2010. Paramutation in maize: RNA mediated trans-generational gene silencing. *Current Opinion in Genetics and Development* 20: 156–163. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2010.01.008>.

ARZANI, A. 2008. Improving salinity tolerance in crop plants: A biotechnological view. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 44: 373–383.

BAIRU, M.W., A.O. AREMU, AND J. VAN STADEN. 2011. Somaclonal variation in plants: Causes and detection methods. *Plant Growth Regulation* 63: 147–173.

BAIRU, M.W., C.W. FENNELL, AND J. VAN STADEN. 2006. The effect of plant growth regulators on somaclonal variation in Cavendish banana (Musa AAA cv. “Zelig”). *Scientia Horticulturae* 108: 347–351.

BOBADILLA LANDEY, R., A. CENCI, F. GEORGET, B. BERTRAND, G. CAMAYO, E. DECHAMP, J.C. HERRERA, ET AL. 2013. High Genetic and Epigenetic Stability in Coffea arabica Plants Derived from Embryogenic Suspensions and Secondary Embryogenesis as Revealed by AFLP, MSAP and the Phenotypic Variation Rate. *PLoS ONE* 8: .

BOKSZCZANIN, K.L., AND S. FRAGKOSTEFANAKIS. 2013. Perspectives on deciphering mechanisms underlying plant heat stress response and thermotolerance. *Frontiers in plant science* 4: 315. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3750488&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

CHANDLER, V., AND M. ALLEMAN. 2008. Paramutation: epigenetic instructions passed across generations. 178 (4): 1839–1844.

- CHEEN, Z.J. 2010. Molecular mechanisms of polyploidy and hybrid vigor. *Trends in Plant Science* 15: 57–71.
- CHEONG, J.J., AND Y. DO CHOI. 2003. Methyl jasmonate as a vital substance in plants. *Trends in Genetics* 19: 409–413.
- CHOUDHURI, S. 2011. From Waddington’s epigenetic landscape to small noncoding RNA: some important milestones in the history of epigenetics research. *Toxicology mechanisms and methods* 21: 252–74. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21495865> [Accessed November 4, 2014].
- CHUANG, J.C., AND P. A JONES. 2007. Epigenetics and microRNAs. *Pediatric research* 61: 24R–29R. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17413852> [Accessed November 10, 2014].
- CLARK, S.J., J. HARRISON, AND M. FROMMER. 1995. CpNpG methylation in mammalian cells. *Nature genetics* 10: 20–27.
- COKUS, S.J., S. FENG, X. ZHANG, Z. CHEN, B. MERRIMAN, C.D. HAUDENSCHILD, S. PRADHAN, ET AL. 2008. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* 452: 215–219.
- COTE, F.X., C. TEISSON, AND X. PERRIER. 2001. Somaclonal Variation Rate Evolution in Plant Tissue Culture : *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 37: 539–542.
- CUARTERO, J., M.C. BOLARÍN, M.J. ASÍNS, AND V. MORENO. 2006. Increasing salt tolerance in the tomato. *Journal of Experimental Botany* 57: 1045–1058.
- CURTIS, M.D., AND U. GROSSNIKLAUS. 2008. Molecular control of autonomous embryo and endosperm development. *Sexual Plant Reproduction* 21: 79–88.
- DARWIN, C. 1876. *The Effects of Cross & Self-Fertilisation in the Vegetable Kingdom*. London.

- DEMETRIOU, K., A. KAPAZOGLU, K. BLADENOPOULOS, AND A.S. TSAFTARIS. 2009. Epigenetic chromatin modifiers in barley: II. characterization and expression analysis of the HDA1 family of barley histone deacetylases during development and in response to jasmonic acid. *Plant Molecular Biology Reporter* 28: 9–21.
- DIEZ, C.M., K. ROESSLER, AND B.S. GAUT. 2014. Epigenetics and plant genome evolution. *Current opinion in plant biology* 18: 1–8. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24424204> [Accessed July 11, 2014].
- DOERFLER, W., AND P. BÖHM. 2006. DNA Methylation: Basic Mechanisms: 301 (Current Topics in Microbiology and Immunology). In *DNA Methylation: Basic Mechanisms: 301 (Current Topics in Microbiology and Immunology)*, 324. Springer Berlin Heidelberg.
- DOHENY-ADAMS, T., L. HUNT, P.J. FRANKS, D.J. BEERLING, AND J.E. GRAY. 2012. Genetic manipulation of stomatal density influences stomatal size, plant growth and tolerance to restricted water supply across a growth carbon dioxide gradient. 547–555. Available at: <http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2011.0272>.
- DOWEN, R.H., M. PELIZZOLA, R.J. SCHMITZ, R. LISTER, J.M. DOWEN, J.R. NERY, J.E. DIXON, AND J.R. ECKER. 2012. Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109: E2183–E2191.
- DU, J., L.M. JOHNSON, M. GROTH, S. FENG, C.J. HALE, S. LI, A. A VASHISHT, ET AL. 2014. Mechanism of DNA methylation-directed histone methylation by KRYPTONITE. *Molecular cell* 55: 495–504. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25018018> [Accessed November 13, 2014].
- DU, J., X. ZHONG, Y. V BERNATAVICHUTE, H. STROUD, S. FENG, E. CARO, A. A VASHISHT, ET AL. 2012. Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell* 151: 167–80. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3471781&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 17, 2014].

- FEIL, R., AND F. BERGER. 2007. Convergent evolution of genomic imprinting in plants and mammals. *Trends in Genetics* 23: 192–199.
- FUKUI, K. 2005. Plant Epigenetics. Annual Plant Reviews, Volume 19. Blackwell Publishing, Oxford.
- GARG, R., R. KUMARI, S. TIWARI, AND S. GOYAL. 2014. Genomic survey, gene expression analysis and structural modeling suggest diverse roles of DNA methyltransferases in legumes. *PLoS ONE* 9: .
- GRANT-DOWNTON, R.T., AND H.G. DICKINSON. 2005. Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany* 96: 1143–1164.
- GURDON, J.B. 1962. The developmental capacity of nuclei taken from intestinal epithelium cells of feeding tadpoles. *Journal of embryology and experimental morphology* 10: 622–640.
- HAIG, D. 2004. The (Dual) Origin of Epigenetics. LXIX: .
- HE, X.-J., T. CHEN, AND J.-K. ZHU. 2011. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell research* 21: 442–465. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cr.2011.23>.
- HEINARU, A. 2012. “Geneetika” õpik kõrgkoolile. Tartu Ülikooli Kirjastus, Tartu.
- HEITHOFF, D.M., R.L. SINSHEIMER, D. A LOW, AND M.J. MAHAN. 1999. An essential role for DNA adenine methylation in bacterial virulence. *Science (New York, N.Y.)* 284: 967–970.
- HERRERA, C.M., AND P. BAZAGA. 2010. Epigenetic differentiation and relationship to adaptive genetic divergence in discrete populations of the violet *Viola cazorlensis*. *New Phytologist* 187: 867–876.
- HERRING, S.W. 1993. Formation of the Vertebrate Face: Epigenetic and Functional Influences. *American Zoologist* 34: 472–483.

- HUANG, J., H. WANG, W. LIANG, X. XIE, AND G. GUO. 2014. Developmental expression of Arabidopsis methyltransferase genes MET1, DRM2, and CMT3. *Molecular Biology* 48: 681–687. Available at: <http://link.springer.com/10.1134/S0026893314050057>.
- IWASAKI, M., AND J. PASZKOWSKI. 2014. Epigenetic memory in plants. *The EMBO journal* 33: 1987–98. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25104823>.
- JAUVION, V., M. RIVARD, N. BOUTELLER, T. ELMAYAN, AND H. VAUCHERET. 2012. RDR2 partially antagonizes the production of RDR6-dependent siRNA in sense transgene-mediated PTGS. *PLoS ONE* 7: 7–12.
- KAEPPLER, S.M., H.F. KAEPPLER, AND Y. RHEE. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology* 43: 179–188.
- KINOSHITA, T., AND S.E. JACOBSEN. 2012. Opening the door to epigenetics in PCP. *Plant & cell physiology* 53: 763–5. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3530370&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 16, 2014].
- KINOSHITA, T., AND M. SEKI. 2014. Epigenetic Memory for Stress Response and Adaptation in Plants. 55: 1859–1863.
- KUMAR, P.A., T. MOHAPATRA, T.R. SHARMA, R. BHATTACHARYA, P.K. DASH, N.C. GUPTA, AND A.K.U. SOLANKE. 2011. Biotechnology and crop improvement. *Indian Journal of Agricultural Sciences* 81: 787–800.
- KUMAR, S., R. KUMARI, V. SHARMA, AND V. SHARMA. 2013. Roles, and establishment, maintenance and erasing of the epigenetic cytosine methylation marks in plants. *Journal of Genetics* 92: 629–666.
- LATZEL, V., Š. JANEČEK, J. DOLEŽAL, J. KLIMEŠOVÁ, AND O. BOSSDORF. 2014. Adaptive transgenerational plasticity in the perennial *Plantago lanceolata*. *Oikos* 123: 41–46.

- LINACERO, R., J. RUEDA, E. ESQUIVEL, A. BELLIDO, A. DOMINGO, AND A.M. VAZQUEZ. 2011. Genetic and epigenetic relationship in rye, *Secale cereale* L., somaclonal variation within somatic embryo-derived plants. *Development* 130: 6201–6208.
- LIU, C., F. LU, X. CUI, AND X. CAO. 2010. Histone methylation in higher plants. *Annual review of plant biology* 61: 395–420.
- LIU, Z.W., C.R. SHAO, C.J. ZHANG, J.X. ZHOU, S.W. ZHANG, L. LI, S. CHEN, ET AL. 2014. The SET Domain Proteins SUVH2 and SUVH9 Are Required for Pol V Occupancy at RNA-Directed DNA Methylation Loci. *PLoS Genetics* 10: .
- MAZUR, M.J., AND H. A. VAN DEN BURG. 2012. Global SUMO Proteome Responses Guide Gene Regulation, mRNA Biogenesis, and Plant Stress Responses. *Frontiers in Plant Science* 3: 1–11.
- MERSFELDER, E.L., AND M.R. PARTHUN. 2006. The tale beyond the tail: histone core domain modifications and the regulation of chromatin structure. *Nucleic acids research* 34: 2653–62. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1464108&tool=pmcentrez&rendertype=abstract> [Accessed November 11, 2014].
- MIGUEL, C., AND L. MARUM. 2011. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: Somaclonal variation and beyond. *Journal of Experimental Botany* 62: 3713–3725.
- MINAROVITS, J., AND H.H. NILLER. 2012. Patho-Epigenetics of Disease. *In* Patho-Epigenetics of Disease, 466.
- MITTLER, R., AND E. BLUMWALD. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives. *Annual review of plant biology* 61: 443–462.
- MORANGE, M. 2013. What history tells us XXXII. The long and tortuous history of epigenetic marks. *Journal of Biosciences* 38: 451–454. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s12038-013-9354-3> [Accessed November 16, 2014].

- NG, D.W.K., J. LU, AND Z.J. CHEN. 2012. Big roles for small RNAs in polyploidy, hybrid vigor, and hybrid incompatibility. *Current Opinion in Plant Biology* 15: 154–161. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.pbi.2012.01.007>.
- VAN OOSTEN, M.J., R. A BRESSAN, J.-K. ZHU, H.J. BOHNERT, AND V. CHINNUSAMY. 2014. The role of the epigenome in gene expression control and the epimark changes in response to the environment. *Critical Reviews in Plant Sciences* 33: 64–87. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/07352689.2014.852920> \n<http://www.tandfonline.com/doi/pdf/10.1080/07352689.2014.852920>.
- OSABE, K., J.D. CLEMENT, F. BEDON, F. A PETTOLINO, L. ZIOLKOWSKI, D.J. LLEWELLYN, E.J. FINNEGAN, AND I.W. WILSON. 2014. Genetic and DNA methylation changes in cotton (*Gossypium*) genotypes and tissues. *PloS one* 9: e86049. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3896429&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.
- PIRES, N.D. 2014. Seed evolution: Parental conflicts in a multi-generational household. *Biomolecular Concepts* 5: 71–86.
- RABINOWICZ, P.D., R. CITEK, M. A. BUDIMAN, A. NUNBERG, J. A. BEDELL, N. LAKEY, A.L. O'SHAUGHNESSY, ET AL. 2005. Differential methylation of genes and repeats in land plants. *Genome Research* 15: 1431–1440.
- RANDO, O.J. 2012. Combinatorial complexity in chromatin structure and function: Revisiting the histone code. *Current Opinion in Genetics and Development* 22: 148–155. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.gde.2012.02.013>.
- RASMANN, S., M. DE VOS, C.L. CASTEEL, D. TIAN, R. HALITSCHKE, J.Y. SUN, A.A. AGRAWAL, ET AL. 2012. Herbivory in the Previous Generation Primes Plants for Enhanced Insect Resistance. *PLANT PHYSIOLOGY* 158: 854–863.
- RATEL, D., J.L. RAVANAT, F. BERGER, AND D. WION. 2006. N6-methyladenine: The other methylated base of DNA. *BioEssays* 28: 309–315.

- RIGGS, A.D., R.A. MARTIENSSSEN, AND V.E.A. RUSSO. 1996. Epigenetic Mechanisms of Gene Regulation. *In* 692. Cold Spring Harbor Monograph Archive, Plainview, N.Y.
- SANCHEZ, D.H., AND J. PASZKOWSKI. 2014. Heat-Induced Release of Epigenetic Silencing Reveals the Concealed Role of an Imprinted Plant Gene. *PLoS Genetics* 10: e1004806. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pgen.1004806>.
- SHI, J., AND J. LAI. 2015. Patterns of genomic changes with crop domestication and breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 24: 47–53. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369526615000096>.
- SHIN, M.R., M. NATSUUME, T. MATSUMOTO, M. HANAOKA, M. IMAI, K. IJIMA, S.I. OKA, ET AL. 2014. Sense transgene-induced post-transcriptional gene silencing in tobacco compromises the splicing of endogenous counterpart genes. *PLoS ONE* 9: .
- SPRINGER, N.M. 2013. Epigenetics and crop improvement. *Trends in Genetics* 29: 241–247. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.009>.
- SRINIVASAN, P.R., AND E. BOREK. 1964. Enzymatic Alteration of Nucleic Acid Structure: Enzymes put finishing touches characteristic of each species on RNA and DNA by insertion of methyl groups. *Science* 145: 548–553.
- STRENKERT, D., S. SCHMOLLINGER, AND M. SCHRODA. 2013. Heat shock factor 1 counteracts epigenetic silencing of nuclear transgenes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Nucleic Acids Research* 41: 5273–5289.
- STRUHL, K. 1998. Histone acetylation and transcriptional regulatory mechanisms. *Genes & development* 12: 599–606.
- SZYF, M. 2005. DNA methylation and cancer therapy.
- TATARINOVA, T., E. ELHAIK, AND M. PELLEGRINI. 2013. Cross-species analysis of genic GC3 content and DNA methylation patterns. *Genome Biology and Evolution* 5: 1443–1456.

- TRICKER, P.J., J. GEORGE, GIBBINGS, RODRÍGUEZ, LÓPEZ, M. CARLOS, P. HADLEY, AND M.J. WILKINSON. 2012. Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *Journal of Experimental Botany* 63: 3799–3814.
- VANYUSHIN, B.F. 2005a. Adenine methylation in eukaryotic DNA. *Molecular Biology* 39: 473–481.
- VANYUSHIN, B.F. 2005b. Enzymatic DNA methylation is an epigenetic control for genetic functions of the cell. *Biochemistry (Moscow)* 70: 488–499.
- VANYUSHIN, B.F., AND V. V ASHAPKIN. 2011. DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et biophysica acta* 1809: 360–368. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.04.006>.
- VIVAS, M., R. ZAS, L. SAMPEDRO, AND A. SOLLA. 2013. Environmental Maternal Effects Mediate the Resistance of Maritime Pine to Biotic Stress. *PLoS ONE* 8: .
- VRIET, C., L. HENNIG, AND C. LALOI. 2015. Stress-induced chromatin changes in plants: of memories, metabolites and crop improvement. *Cellular and Molecular Life Sciences* 1261–1273. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/s00018-014-1792-z>.
- WANG, Z., H. CAO, F. CHEN, AND Y. LIU. 2014. The roles of histone acetylation in seed performance and plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* 84: 125–133. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0981942814002952>.
- WATSON, M., E. HAWKES, AND P. MEYER. 2014. Transmission of Epi-Alleles with MET1-Dependent Dense Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* 9: e105338. Available at: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0105338>.
- WATSON, M., E. JALIGOT, T. BEULÉ, AND E.J. FINNEGAN. 2008. Transmission of Epi-Alleles with MET1-Dependent Dense Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Experimental Botany* 59: 3271–3281.

- WEST, P.T., Q. LI, L. JI, S.R. EICHTEN, J. SONG, M.W. VAUGHN, R.J. SCHMITZ, AND N.M. SPRINGER. 2014. Genomic distribution of H3K9me2 and DNA methylation in a maize genome. *PLoS ONE* 9: .
- WILHELM, E. 2000. Somatic embryogenesis in oak (*Quercus* spp.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant* 36: 349–357. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24683182> [Accessed November 10, 2014].
- WYATT, G.R. 1950. Occurrence of 5-methylcytosine in nucleic acids. *Nature* 166: 237–238.
- XU, L., Z. ZHAO, A. DONG, L. SOUBIGOU-TACONNAT, J.-P. RENOU, A. STEINMETZ, AND W.-H. SHEN. 2008. Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and cellular biology* 28: 1348–1360.
- XU, S., W. ZHOU, S. POTTINGER, AND I.T. BALDWIN. 2015. Herbivore associated elicitor-induced defences are highly specific among closely related *Nicotiana* species. *BMC Plant Biology* 15: . Available at: <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/15/2>.
- YUAN, L., X. LIU, M. LUO, S. YANG, AND K. WU. 2013. Involvement of histone modifications in plant abiotic stress responses. *Journal of Integrative Plant Biology* 55: 892–901.
- ZHU, Y., A. DONG, AND W.H. SHEN. 2012. Histone variants and chromatin assembly in plant abiotic stress responses. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms* 1819: 343–348. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.07.012>.

Interneti allikad

Theoretical and Computational Biophysics Group.

[<http://www.ks.uiuc.edu/Research/methylation/>]. 21. mai 2015

Biotechniques

[<http://www.biotechniques.com/news/Future-Methods-for-Epigenetic-Studies/biotechniques-322348.html>] 24. mai 2015

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Siimo Kangruoja

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose
Epigeneetika ja põllumajandus,

mille juhendaja on Silvia Pihu,

1.1.reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;

1.2.üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas
digitaalarhiivi DSpace´i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete
kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartus, **25.05.2015**