UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

MARIA GABRIELA FONTANETTI RODRIGUES

ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA DE SELEÇÕES DE FIGUEIRA (*Ficus carica* L.) POR MSAP E SEQUENCIAMENTO

Ribeirão Preto
2015

MARIA GABRIELA FONTANETTI RODRIGUES

**ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA DE SELEÇÕES DE FIGUEIRA
(*Ficus carica* L.) POR MSAP E SEQUENCIAMENTO**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutor em Genética

Orientadora: Profa. Dra. Silvana Giuliatti

Ribeirão Preto
2015

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Rodrigues, Maria Gabriela Fontanetti.

Análise da metilação do DNA de seleções de figueira (*Ficus carica* L.) por MSAP e sequenciamento/ Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues; orientadora Silvana Giuliatti. - Ribeirão Preto, 2015.

133 p. il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, Programa de Pós-graduação em Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, 2015.

Orientadora: Giuliatti, Silvana

Título em inglês: Analysis of fig (*Ficus carica* L.) selections DNA methylation by MSAP and sequencing.

1.Figo. 2.Alterações Epigenéticas. 3.Radiação Gama. 4.Bissulfito de Sódio. 5.ELISA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues

Análise da metilação do DNA de seleções de figueira (*Ficus carica* L.) por MSAP e sequenciamento.

Tese apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Genética.

Data da defesa ____/____/____

Banca examinadora

Profa. Dra. Silvana Giuliatti

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____ Assinatura _____

DEDICO...

À minha amada filha Beatriz
e aos meus pais Luzia e
Rogério.

Agradecimentos

Primeiramente à Deus por estar ao meu lado, me iluminando, me ajudando em todas as minhas conquistas e me dando forças para sempre seguir em frente.

À minha amiga, professora e orientadora Dra. Silvana Giuliatti por ter acreditado em mim e me apoiado em todas as decisões, não só profissionais, mas também de vida. Também ao meu co-orientador Prof. Dr. Antônio Baldo Geraldo Martins.

À Fundação de Amparo a Pesquisa de Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão da bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro para a realização desta pesquisa.

Ao amigo de todas as horas Carlos José Ono pelo auxílio na realização das análises moleculares, e à professora Dra. Bianca Waleria Bertoni pela permissão para que as mesmas fossem efetuadas na Universidade de Ribeirão Preto - UNAERP. Assim como às amigas da UNESP de Jaboticabal, Larissa e Daniele.

À professora Dra. Ester Silveira Ramos por abrir as portas de seu laboratório de epigenética e por todo apoio e aprendizado dados a mim, bem como ao professor Dr. Antônio Figueira do CENA/USP.

Ao meu grande parceiro profissional e de vida Murilo Racy Soares, pelo incansável apoio, compreensão, carinho e presença ao longo do período de elaboração deste trabalho.

Aos membros da banca pelas críticas construtivas e pelas sugestões, fundamentais para meu crescimento profissional.

Aos amigos do Grupo de Bioinformática pela ajuda e momentos de alegria.

Agradeço também a ajuda e apoio de todos os amigos e colegas, pessoas que após esses quatro anos me impossibilitam de citar nomes sem esquecer injustamente de alguém, que tornaram esse tempo de estudo muito mais agradável e divertido, dando sentido às palavras companheirismo e amizade. Muito obrigada a todos!!!!!!

“A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

RESUMO

RODRIGUES, M.G.F. **Análise da metilação do DNA de seleções de figueira (*Ficus carica* L.) por MSAP e sequenciamento.** 2015. 133 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

Os programas de melhoramento de figueira (*Ficus carica* L.) por métodos convencionais tais como cruzamentos dirigidos, para a obtenção de novos cultivares, são inviáveis em muitos países, como no Brasil, principalmente pela pequena variabilidade genética encontrada, e pela dificuldade de obtenção de plantas originadas pela fusão de gametas, uma vez que a vespa *Blastophaga psenes*, responsável pela polinização natural, não existe no país. Desse modo, o melhoramento genético, com o uso de mutagênicos, se torna uma linha de pesquisa importante para a melhoria da cultura, sendo necessário reunir informações sobre essa espécie, principalmente, em relação à sua variabilidade genética, para que projetos de propagação e manejo adequados sejam realizados. Diante do exposto, o objetivo do presente trabalho foi verificar a existência de variabilidade epigenética devido à metilação do DNA em seleções irradiadas de figueiras, entre si e quando comparadas ao principal cultivar comercial, Roxo-de-Valinhos, utilizando as técnicas de MSAP e ELISA, e posterior sequenciamento do DNA, tratado com bissulfito de sódio, para detecção do posicionamento das regiões polimórficas, analisado por ferramentas de bioinformática. Amostras do DNA genômico foram duplamente digeridas com a enzima *HpaII* (sensível à metilação) ou com o seu isoesquizomero *MspI* (não sensível à metilação), juntamente com a enzima *EcoRI*. Foram testadas 14 combinações de *primers* e obteve-se 87.9%, 10.1% e 2.0%, respectivamente, de regiões não metiladas CCGG, regiões metiladas CmCCGG e regiões hemimetiladas hmCCGG, de um total de 553 produtos de amplificação, demonstrando que a técnica MSAP é eficiente para detecção de sítios diferencialmente metilados no material genômico estudado, evidenciando sua divergência epigenética. Com o sequenciamento do DNA isolado desses sítios diferencialmente metilados, foi possível verificar diferentes padrões de metilação nos mesmos pelo sequenciamento dos DNAs tratados com bissulfito de sódio, em regiões codificadoras de genes regulatórios do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, além de terem sido encontrados no DNA mitocondrial dos tratamentos, o qual regula o fornecimento de energia em forma de ATP para as plantas, estando intimamente relacionado com o desenvolvimento das mesmas, justificando os diferentes fenótipos encontrados, tanto nos frutos, quanto no crescimento das plantas que sofreram estresse devido à exposição à radiação gama. Pela técnica de imunoquímica (ELISA), utilizando anticorpos anti 5-mC, foram observadas diferenças significativas pelo teste de Tukey, a 95 % de confiabilidade, no conteúdo global de metilação dos DNAs dos tratamentos, indicando que este fator abiótico foi responsável pelas alterações no epigenoma das plantas. Como o material utilizado como controle se encontrou também metilado, uma possível desmetilação dos materiais genômicos pode ser a responsável pela variação fenotípica entre os tratamentos. Diante disso, o estudo futuro da expressão gênica entre os tratamentos torna-se uma estratégia de extrema importância para o entendimento dos complexos sistemas regulatórios, levando à identificação de genes de interesse agrônomo para a cultura da figueira, possibilitando a sua manipulação subsequente e propagação de cultivares melhorados para fins comerciais.

Palavras-chave: figo, alterações epigenéticas, radiação gama, bissulfito de sódio, ELISA.

ABSTRACT

RODRIGUES, M.G.F. **Analysis of fig (*Ficus carica* L.) selections DNA methylation by MSAP and sequencing.** 2015. 133p. Thesis (PhD) - School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2015.

The fig tree (*Ficus carica* L.) breeding programs by conventional methods such as directed crosses, in order to obtain new cultivars, are unworkable in many countries, as in Brazil, mainly by small genetic variability found, and by the difficulty for obtaining plants originated from the fusion of gametes, since the wasp *Blastophaga psenes*, responsible for natural pollination, doesn't exist in the country. In this way, the genetic breeding, with the use of mutagenic, becomes an important research line for the improvement of culture, being necessary to gather information about this species, mainly in relation to its genetic variability, for perform propagation projects and appropriate management. Given the above, The objective of this study was to verify the existence of epigenetic variability due to DNA methylation in irradiated fig selections, with each other and when compared to the main commercial cultivar, Roxo-de-Valinhos, using MSAP and ELISA techniques, and subsequent DNA sequencing, treated with sodium bisulfite, for detection of the position of the polymorphic regions, analyzed by bioinformatics tools. Samples of genomic DNA were double-digested with the *HpaII* enzyme (sensitive to methylation) with its isoschizomer *MspI* (insensitive to methylation), together with the *EcoRI* enzyme. Fourteen primer combinations were tested and it was obtained 87.9%, 10.1% e 2.0%, respectively, unmethylated CCGG, methylated CmCCGG and hemimethylated regions hmCCGG, from a total of 553 amplification products, displaying, the MSAP technique, efficient for detection of differentially methylated sites in the genomic material studied, demonstrating their epigenetic divergence. With the sequencing of DNA isolated of these differentially methylated sites, it was possible to verify different patterns of methylation in them by sequencing the DNA treated with sodium bisulfite, in coding regions of regulatory genes of the development and fruits ripening, besides they have been found in the mitochondrial DNA of treatments, which regulates the supply of energy in ATP form for the plants, being closely related to their development, justifying the different phenotypes found in both fruits and plant growth that suffered stress due to exposure to gamma radiation. By the technique of immunochemistry (ELISA), using 5-mC antibodies, significant differences were observed by Tukey test, at 95% of trustworthiness, in the global content methylation of the treatments DNA, indicating that this abiotic factor was responsible for the changes in the epigenome of the plants. Since the material used as control was found also methylated, a supposed demethylation of the genomic material may be responsible for phenotypic variation among treatments. Considering this, future study of gene expression between treatments becomes an extreme important strategy for understanding the complex regulatory systems, leading to the identification of genes with agronomic interest for the fig culture, allowing its subsequent manipulation and propagation of improved cultivars for commercial purposes.

Keywords: figs, epigenetic alterations, gamma radiation, sodium bisulfite, ELISA.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Quantificação dos DNAs das amostras de figueira, em espectrofotômetro.	44
TABELA 2. Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise de MSAP, com suas respectivas combinações.	46
TABELA 3. Procedimento de colorimetria por foto revelação das placas de poliacrilamida.	48
TABELA 4. Oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir de fragmentos epigeneticamente polimórficos de DNA de seleções de figueira.	52
TABELA 5. Oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir de fragmentos epigeneticamente polimórficos de DNA de seleções de figueira, modificado para bissulfito de sódio.	56
TABELA 6. Valores de absorbância do DNA de diferentes tratamentos de figueira irradiados, obtidos pelo teste de ELISA com anticorpos anti 5-mC e sua respectiva análise de variância.	83
TABELA 7. Características de produção e qualidade dos frutos em figueiras cv Roxo-de-Valinhos.	113

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Esquema do sequenciamento de DNA tratado com bissulfito de sódio para identificação da 5-metil-citosina (5-mC), adaptado de Hayatsu, (2008).....	35
FIGURA 2. Interpretação dos resultados do sequenciamento de regiões metiladas modificadas por bissulfito de sódio, adaptado de Li e Tollefsbol, 2011.	38
FIGURA 3. Gel de poliacrilamida contendo bandas de tamanhos compatíveis aos esperados pelos <i>primers</i> utilizados no DNA genômico de figueira. Os números de 1 a 6 representam a ordem dos <i>primers</i> utilizados conforme tabela 1. PM = peso molecular.....	52
FIGURA 4. Produtos da amplificação das combinações 1 e 2 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (<i>Ficus carica</i> L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.....	63
FIGURA 5. Produtos da amplificação das combinações 3 e 4 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (<i>Ficus carica</i> L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.....	64
FIGURA 6. Produtos da amplificação das combinações 5 e 6 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (<i>Ficus carica</i> L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.....	65
FIGURA 7. Produtos da amplificação das combinações 7 e 8 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (<i>Ficus carica</i> L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.	66
FIGURA 8. Produtos da amplificação das combinações 9 e 10 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (<i>Ficus carica</i> L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.....	67
FIGURA 9. Produtos da amplificação das combinações 11 e 12 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (<i>Ficus carica</i> L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.....	68
FIGURA 10. Produtos da amplificação das combinações 13 e 14 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (<i>Ficus carica</i> L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.....	69
FIGURA 11. Bandamento polimórfico observado da amplificação das combinações 3 e 4 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (<i>Ficus carica</i> L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.	70

FIGURA 12. Alinhamento dos pontos de CpG entre a sequência original do <i>contig</i> 1 com as sequências do DNA tratado com bissulfito de sódio das diferentes seleções irradiadas de figueira. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. A sequência “BSF” é proveniente do <i>primer sense</i> 5’-3’ e “BSR” do <i>primer anti-sense</i>	73
FIGURA 13. Alinhamento dos pontos de CpG entre a sequência original do <i>contig</i> 2 com as sequências do DNA tratado com bissulfito de sódio das diferentes seleções irradiadas de figueira. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. A sequência “BSF” é proveniente do <i>primer sense</i> 5’-3’ e “BSR” do <i>primer anti-sense</i>	74
FIGURA 14. Alinhamento dos pontos de CpG entre a sequência original do <i>contig</i> 3 com as sequências do DNA tratado com bissulfito de sódio das diferentes seleções irradiadas de figueira. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. A sequência “BSF” é proveniente do <i>primer sense</i> 5’-3’ e “BSR” do <i>primer anti-sense</i>	74
FIGURA 15. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> 2 com as sequências de referência do banco de dados do NCBI, produzido pelo programa computacional BLAST.	76
FIGURA 16. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> 4 com as sequências de referência do banco de dados do NCBI, produzido pelo programa computacional BLAST.	78
FIGURA 17. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> 6 com as sequências de referência do banco de dados do NCBI, produzido pelo programa computacional BLAST.	78
FIGURA 18. Alinhamento dos pontos de metilação do <i>contig</i> 2 entre o DNA do tratamento controle “Roxo-de-Valinhos e de seleções irradiadas de figueira, tratado com bissulfito de sódio, pelo programa computacional QUMA. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.....	80
FIGURA 19. Resultado do alinhamento do <i>contig</i> 1 com as sequências de referência do banco de dados do NCBI, produzido pelo programa computacional BLAST.	81
FIGURA 20. Alinhamento dos pontos de metilação do <i>contig</i> 1 entre o DNA do tratamento controle “Roxo-de-Valinhos e de seleções irradiadas de figueira, tratado com bissulfito de sódio, pelo programa computacional QUMA. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.....	82
FIGURA 21. Alinhamento dos pontos de metilação do <i>contig</i> 3 entre o DNA do tratamento controle “Roxo-de-Valinhos e de seleções irradiadas de figueira, tratado com bissulfito de sódio, pelo programa computacional QUMA. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.....	83
FIGURA 22. Tratamento 1 = “Roxo-de-Valinhos” (Controle).....	110
FIGURA 23. Tratamento 2 = Seleção Irradiada 440	110
FIGURA 24. Tratamento 3 = Seleção Irradiada 433.	111
FIGURA 25. Tratamento 4 = Seleção Irradiada 189	111
FIGURA 26. Tratamento 5 = Seleção Irradiada 214.	112
FIGURA 27. Tratamento 6 = Seleção Irradiada 301.	112

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1. Origem, Dispersão e Importância Econômica da Cultura	19
2.2. Descrição da planta.....	21
2.3. Melhoramento Genético e Indução de Mutação.....	24
2.3.1. Radiação Gama	27
2.4. Epigenética e Metilação do DNA.....	30
2.5. Bioinformática.....	35
3. OBJETO DE ESTUDO E HIPÓTESE.....	40
4. OBJETIVO... ..	42
5. MATERIAL E MÉTODOS.....	43
5.1. Local	43
5.2. Análise Molecular.....	43
5.2.1. Extração do DNA.....	43
5.2.2. MSAP	45
5.3. Sequenciamento.....	48
5.3.1. Isolamento do DNA alvo	48
5.3.2. Clonagem e Sequenciamento do DNA alvo	49
5.3.3. Obtenção dos <i>primers</i>	51
5.3.4. Sequenciamento do DNA genômico	53
5.4. Bissulfito de Sódio.....	56
5.4.1. Obtenção dos <i>primers</i>	56
5.4.2. Modificação do DNA e Sequenciamento	56
5.5. Análise <i>in silico</i>	58
5.6. ELISA	59
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	61
6.1. MSAP.....	61
6.2. Análise <i>in silico</i>	72
6.3. ELISA	83
7. CONCLUSÃO.....	87
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	88
APÊNDICE I – Fotos e características agrônomicas dos frutos das seleções de figueiras utilizadas como objeto de estudo do presente trabalho	110

APÊNDICE II – Artigo Científico Publicado, Referente às Análises Moleculares da Presente Tese	114
APÊNDICE III – Manuscrito Científico Submetido à Revista <i>Plant Physiology and Biochemistry</i> , Referente à Análise de Metilação Global da Presente Tese	125

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é o maior produtor de figo (*Ficus carica* L.) da América do Sul, onde se destacam três estados produtores: Rio Grande do Sul, com sua produção destinada à indústria, São Paulo, com a produção de frutos para mesa, e Minas Gerais, com frutos tanto para mesa como para indústria (PEREIRA e NACHTIGAL, 1999). Todavia, o cultivo da figueira baseia-se, exclusivamente, na plantação de um único cultivar, o Roxo-de-Valinhos, que é caracterizado pelo elevado vigor e produtividade.

Os programas de melhoramento de figueira, por métodos convencionais, para a obtenção de novos cultivares são inviáveis em muitos países, como o Brasil, por exemplo, pela pequena variabilidade genética encontrada e pela dificuldade de obtenção de plantas originadas pela fusão de gametas, uma vez que a vespa *Blastophaga psenes*, responsável pela polinização natural, devido às condições climáticas, não existe no país (FERREIRA *et al.*, 2009). Como no Brasil, a ficicultura está toda implantada com um único cultivar, o “Roxo-de-Valinhos”, que produz frutos sem sementes, o uso de mutagênicos torna-se uma alternativa interessante para o melhoramento da cultura.

De acordo com Coimbra *et al.* (2004), a técnica de indução de mutação por irradiação tem sido empregada em programas de melhoramento de plantas. Diferentes doses de radiação podem estimular diversos processos biológicos e têm sido amplamente usadas em diferentes campos, incluindo a produção de plantas mutantes úteis para o melhoramento de culturas por meio de alterações alélicas ao nível do DNA, com a obtenção de variações genéticas (WANG *et al.*, 2010).

Entretanto, quando ocorrem variações relacionadas com a regulação gênica, em resposta a algum estímulo, que persistem mesmo após a remoção desse estímulo, e são

perpetuadas por propagação assexuada, sem envolver mudanças permanentes no genótipo, caracteriza-se uma variação epigenética, ou seja, um conjunto das modificações nucleares herdadas e que modulam a expressão gênica, mas não envolvem modificações da sequência de DNA (BORÉM, 1997).

A metilação do DNA é um tipo de modificação química do DNA e, como tal, é o mecanismo epigenético mais bem definido, sendo associado com a expressão gênica em numerosas espécies de plantas (KAEPPLE *et al.*, 2000). Esse fenômeno compreende em uma ligação covalente ao DNA, estável, e ocorre pela inserção de um grupo metil (CH₃) no carbono 5 de citosinas em dinucleotídeos CpG (citosina-*phosphate*-guanina) ou de sequências CpHpG (H = adenina - A, timina - T, guanina - G) (LAIRD, 2010).

Estudos recentes têm revelado algumas modificações epigenéticas que afetam importantes características agronômicas (HAUBEN *et al.* 2009; MARTIN *et al.* 2009; MANNING *et al.* 2006), sugerindo a importância da epigenética para a ciência na agricultura. Entretanto, não há informações sobre expressão gênica pela regulação epigenética em figueira, incluindo também outras culturas que também não tiveram o sequenciamento do seu genoma completo.

Para analisar o padrão de metilação do DNA, uma ferramenta bastante utilizada é a técnica MSAP (*Methylation-sensitive amplified polymorphism* - PCR sensível à metilação com *primers* arbitrários), desenvolvida por Reyna-López *et al.* (1997), uma adaptação do AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphisms*) (VOS *et al.*, 1995). Baseia-se na amplificação seletiva do DNA e comparação entre os fragmentos gerados por duas enzimas de restrição *MspI* e *HpaII*, que distinguem entre sequências metiladas e não metiladas. Ambas as enzimas clivam as sequências CCGG, porém não há clivagem pela *HpaII* se a citosina do dinucleotídeo central CG for metilada (MAMPUMBU, 2006).

De acordo com Frommer (1992), vários estudos mostraram que a metilação de citosina em um único dinucleotídeo CpG dentro dos sítios de reconhecimento de um fator de transcrição é suficiente para bloquear sua ligação ao DNA e para inibir a transcrição. Portanto, para determinar o papel da metilação de citosina em mecanismos de regulação específicos *in vivo*, tornou-se importante conhecer o estado de metilação de dinucleotídeos CpG no DNA genômico.

Para tanto, protocolos de sequenciamento genômico têm sido desenvolvidos para verificar o estado da metilação de genes dentro de regiões selecionadas, gerando mapas exatos de metilação de DNA único, a partir de moléculas individuais de DNA genômico, tratado com bissulfato de sódio, indicando a posição de cada 5-metilcitosina (FROMMER, 1992).

Entretanto, com relação ao estado de metilação do DNA, além das análises específicas de uma sequência, as principais técnicas utilizadas podem ser divididas em abordagens globais amplas no genoma. Nesse contexto, têm sido utilizados métodos que dão uma informação sobre o nível global de metilação dos DNAs genômicos, por meio de ensaios baseados em imunoquímica, como o teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), que permite um rápido processamento de múltiplas amostras. Essa metodologia, por meio de anticorpos sensíveis à metilação do DNA (anti 5-metil citosina - 5-mC), marcados com uma molécula fluorescente, que reconhecem e se ligam a uma região alvo, permite visualizar e detectar mudanças espaciais na metilação dessas regiões específicas por meio de leitura de comprimento de onda (GUERRERO-PRESTON *et al.*, 2010).

Estudos realizados com figueiras, por Rodrigues *et al.* (2009) e Rodrigues *et al.* (2012a), mostraram que, a partir de estacas do cultivar “Roxo-de-Valinhos”, irradiadas com raios-gama, na dose de 30 Gy, foi possível selecionar plantas em função das suas características morfológicas únicas e divergentes do controle, com seleções superiores ao “Roxo-de-Valinhos” quanto às características avaliadas. Dentre as características selecionadas

estão o formato alongado dos frutos; o pedúnculo alongado, facilitando a colheita e aumentando a vida de prateleiras dos frutos; frutos grandes; e frutos grandes com ostíolo fechado, diminuindo a incidência de pragas e evitando a depreciação dos mesmos com possíveis rachaduras na casca. Em trabalho posterior, essas seleções foram submetidas à análise molecular utilizando as técnicas RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) e AFLP, as quais não evidenciaram polimorfismo entre as mesmas (RODRIGUES *et al.*, 2012b).

Diante da grande variação fenotípica encontrada entre os tratamentos de figueira e pela não detecção de polimorfismo genético entre eles, este trabalho apresenta como hipótese a ocorrência de variação epigenética nas plantas analisadas em decorrência da exposição das gemas que originaram as seleções, à radiação gama alterando entre outros, o processo de transcrição de RNA e, conseqüentemente, a expressão gênica dessas plantas, justificando as divergências morfológicas observadas, sem alterações na composição do seu DNA.

Com isso, o objetivo do presente trabalho foi verificar a existência de variabilidade epigenética, devido aos diferentes padrões e conteúdo de metilação do DNA, em seleções de figueira originadas de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama, entre si e quando comparadas ao controle, “Roxo-de-Valinhos”, utilizando a técnica MSAP; posterior sequenciamento do DNA tratado com bissulfito de sódio, para detecção do posicionamento das regiões epigeneticamente polimórficas; e a técnica de imunodeteção ELISA com anticorpos anti 5-metilcitosina.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Origem, Dispersão e Importância Econômica da Cultura

A figueira, uma das mais antigas frutíferas cultivadas no mundo, é originária do Sul da Arábia, de onde foi difundida para a Europa e, posteriormente, para a América. Outras fontes indicam ser a figueira oriunda da Ásia Menor, mais especialmente da Cária. Sabe-se que a figueira foi, inicialmente, cultivada pelos árabes e judeus, em regiões semi-áridas, no sudeste da Ásia. Os próprios árabes levaram a figueira para a Península Ibérica, onde foi difundida para a África, América e Europa, junto com seus primeiros colonizadores (SOUZA *et al.*, 2007).

Arqueólogos israelenses descobriram que a figueira foi a primeira planta domesticada pelo homem, há 12 mil anos. O figo tira o posto do trigo e da cevada, domesticados há 11 mil anos na Turquia e na Síria e que eram considerados as espécies vegetais cultivadas há mais tempo. Ou seja, a agricultura surgiu pelo menos mil anos mais cedo. Kislev *et al.* (2006), relatam que estudaram nove figos secos inteiros e mais 313 drupéolas (a polpa da fruta) no sítio arqueológico de Gilgal 1, abandonado há 11 mil anos, a 12 km ao norte de Jericó, na Cisjordânia, território palestino. Até então, pensava-se que o figo tinha sido domesticado há 6.500 anos, mas testes revelaram que as frutas eram quase 5.000 anos mais antigas. Os figos encontrados são da espécie *Ficus carica* (a mesma consumida hoje) e pertencem a uma variedade que se forma e amadurece sem polinização, com sementes estéreis (CORRADINI, 2006).

Em 1532, Martim Afonso de Souza introduziu a figueira no Brasil. Em 1585, São Paulo já produzia figos, entre outras culturas, porém, foi com a imigração de europeus que a

cultura teve maior impulso no Brasil, principalmente, por parte dos italianos que, chegando a São Paulo, trouxeram a maior parte dos cultivares. Cita-se que a partir de 1920 é que realmente iniciou-se o cultivo comercial de figueiras no Brasil.

Na década de 1970, a região de Valinhos apresentava cerca de 2 milhões de pés de figueira, 500 produtores e cerca de 1.000 hectares. Na década de 1980, houve uma queda da área plantada com essa cultura, reduzindo para cerca de 300 mil plantas, 110 produtores e 230 hectares, devido à grande ocorrência de doenças e a concorrência com outras espécies frutíferas (SOUZA *et al.*, 2007). Quadro este revertido com o início do programa de produção integrada de frutas, que começou a ser aplicada ao figo no ano de 2004, ampliando a região produtora de figos, apresentando cerca de 3.000 hectares a partir de 2000.

No Brasil, os principais Estados produtores de figo são Rio Grande do Sul, Minas Gerais e São Paulo, sendo juntos responsáveis por cerca de 90% da produção brasileira (IBGE, 2011). No Rio Grande do Sul, a região produtora mais importante da fruta é a de Pelotas, com produção quase totalmente dirigida para o processamento industrial nas inúmeras fábricas locais. Em Minas Gerais, destacam-se as áreas produtoras ao redor de Poços de Caldas, Andradas e Guaxupé, cujas colheitas encontram colocação nas fábricas da região, muitas delas de caráter familiar, ou são enviadas para serem processadas nas indústrias paulistas de conservas. No Estado de São Paulo, que em 2010 produziu cerca de 5 mil toneladas (IBGE, 2011), os municípios produtores de maior importância são os de Valinhos, Campinas, Louveira e Bragança Paulista, com a principal produção voltada para mesa, destinada tanto ao mercado interno quanto ao externo (FRANCISCO *et al.*, 2005).

O figo está entre as vinte principais frutas exportadas pelo Brasil e vem mantendo a terceira posição no *ranking* de volume comercializado entre as frutas de clima temperado, com 900 toneladas, ficando atrás apenas da maçã, com 153 mil toneladas, e da uva, com 28,8 mil toneladas (IBGE, 2011). Neste sentido, o Brasil se coloca como maior produtor e o

segundo maior exportador de figo *in natura* no mundo, superado apenas pela Turquia (FAO, 2012).

Segundo Fachinello *et al.* (2011), a cultura da figueira apresentou crescimento significativo nos últimos anos, incrementando em 45,72% o volume produzido, 116,16% na quantidade e 404,03% no valor exportado, sendo os principais países importadores do figo brasileiro: a Holanda, a França, a Alemanha e o Reino Unido (FAOSTAT, 2011).

Além de sua expressão econômica e participação na complementação da dieta alimentar, a ficicultura é caracterizada como atividade de pequenas áreas, contribuindo para a sobrevivência da propriedade agrícola familiar, de grande importância para o equilíbrio social da população rural.

2.2. Descrição da planta

A figueira comum, *Ficus carica* L., pertence à família *Moraceae* e apresenta um número diplóide (2n) de cromossomos igual a 26, com um genoma de tamanho aproximado de 356 Mpb (milhões de pares de bases) (OHRI e KHOSHOO, 1987). A família *Moraceae* inclui 60 gêneros e mais de 2.000 espécies entre árvores, arbustos, trepadeiras e pequenas ervas. O gênero *Ficus* compreende cerca de 1.000 espécies, algumas das quais produtoras de frutos comestíveis, dividido em 48 subgêneros com base em características que diferenciam os agrupamentos de espécies (PEREIRA e NACHTIGAL, 1999). Acrescentam os autores que a espécie *Ficus carica* L. pertence ao subgênero *Eusyce* que é caracterizado por ter somente flores unissexuais e ginodioicismo. Algumas das espécies deste subgênero assemelham-se à *F. carica* na forma de crescimento, nas folhas e nos frutos.

No Estado de São Paulo existem cerca de 25 cultivares de figueira, entre eles o Roxo de Valinhos, Pingo de Mel, Verdone Longa, Adriático, Bonatto, Brunswick, Genoveza,

Nóbile e Korfu, entre outros, dos quais o único cultivado, comercialmente, é o “Roxo-de-Valinhos”, que não mostrou diferenças em relação ao Brown Turkey introduzido no Brasil em 1941, identificado por alguns autores como San Piero (PEREIRA e NACHTIGAL, 1999).

O “Roxo-de-Valinhos” é do tipo comum, de grande valor econômico, caracterizando-se pela sua rusticidade, vigor e produtividade. É o cultivar que melhor tem se adaptado ao sistema de poda drástica usada nas principais regiões produtoras, mantendo, por isso, um porte arbustivo e a frutificação somente em ramos do ano (CORREA e BOLIANI, 1999). A árvore possui crescimento amplo que pode atingir até 4 metros de altura, caule tortuoso de casca cinzenta e lisa, com ramos frágeis. Flores muito pequenas desenvolvem-se no interior da chamada fruta do figo, quando ainda verde. Segundo Medeiros (2002), a planta caracteriza-se por apresentar folhas grandes com cinco lobos maiores e dois menores; cor verde escuro; textura compacta, um tanto rija; margem crenada; sino peciolar em forma de lira e pecíolo longo. As gemas frutíferas e vegetativas aparecem nos ramos, junto às axilas das folhas, durante a estação de crescimento.

A espécie *F. carica* é ginodióica, havendo duas formas distintas de plantas: o caprifigo, que é monóico, e o figo comum, que é pistilado. As flores da figueira crescem no interior de um receptáculo mais ou menos suculento, pomologicamente chamado de sicônio, que nada mais é do que o próprio figo. A fruta, comumente chamada de figo, não é um fruto, mas uma infrutecência (sicônio). O orifício existente no sicônio é denominado ostíolo (PEREIRA e NACHTIGAL, 1999).

As flores do figo são pequenas, pediceladas, hipóginas e unisexuais com perianto simples pentapartido. Existem três tipos de flores: as pistiladas (femininas) com estilo curto, as pistiladas (femininas) com estilo longo e as estaminadas (masculinas). Ambas as flores pistiladas são simples, carpeladas e com um estigma bifido. As flores pistiladas de estilo curto apresentam um ovário globoso e um estilo com cerca de 0,70mm de comprimento, sendo

adaptadas à ovoposição da vespa do figo (*Blastophaga psenes*). As flores de estilo longo apresentam um ovário mais ou menos ovóide ou elipsóide e o estilo com 1,75mm de comprimento, não adaptado à ovoposição da vespa. As flores pistiladas são férteis e, após a polinização e singamia, desenvolvem o fruto verdadeiro do figo. As flores estaminadas são mais longo-pediceladas que as flores pistiladas e apresentam perianto pentapartido, cinco estames e vestígios pistilares (PEREIRA e NACHTIGAL, 1999).

Os frutos verdadeiros das figueiras são os aquênios, que se formam pelo desenvolvimento dos ovários. Os aquênios normais apresentam um embrião envolvido pelo endosperma e pelo tegumento. Os figos não polinizados podem apresentar aquênios com o ovário esclerificado, porém ocos. A parte suculenta do figo comestível consiste, principalmente, de tecido parenquimatoso dos órgãos florais, cujas células se tornam maiores e armazenam substâncias de reserva. Quando ocorre a formação de sementes, essas apresentam tamanho em torno de 1,5 a 2,0 mm e a forma de uma esfera, podendo-se encontrar cerca de 2.000 sementes por fruto em alguns cultivares. O número e o tamanho das sementes são características importantes na seleção de variedades em vários países (PEREIRA e NACHTIGAL, 1999).

Os frutos do cultivar Roxo-de-Valinhos podem ser utilizados para o consumo *in natura* quando maduros ou industrializados verdes, inchados e maduros ou rami. A desvantagem dessa variedade é apresentar frutos com o ostíolo muito aberto e com facilidade para ocorrer rachaduras quando maduros, o que favorece o ataque de pragas e, principalmente, de doenças.

Segundo Pereira e Nachtigal (1999), os frutos dessa variedade apresentam casca com coloração roxo-violácea escura, alcançando até 7,5cm de comprimento e 60 a 90 gramas de peso. São de formato oblongo-piriforme, de pescoço curto e grosso, praticamente sem limite de separação com o corpo do receptáculo. Apresentam a superfície levemente sulcada, ostíolo

grande e aberto, com brácteas roxo-avermelhadas típicas, mesmo nos figos verdes. A película é espessa, porém tenra, com pontuações visíveis, mudando de tonalidade à medida que a maturação avança. A polpa mostra coloração róseo-avermelhada característica, com cavidade central, sucosa, macia e de sabor agri-doce agradável.

2.3. Melhoramento Genético e Indução de Mutação

Os programas de melhoramento de figueira por métodos convencionais, tais como cruzamentos dirigidos, para a obtenção de novos cultivares são inviáveis em muitos países, como no Brasil, por exemplo, pela pequena variabilidade genética encontrada e pela dificuldade de obtenção de plantas originadas pela fusão de gametas, uma vez que a vespa *Blastophaga psenes*, responsável pela polinização natural, devido às condições climáticas, não existe no país (FERREIRA *et al.*, 2009). Com isso, a seleção e recuperação de um genótipo que associe as características básicas do cultivar original e as que se pretendiam introduzir, tornam-se muito difícil, podendo o uso de mutagênicos, trazer bons resultados.

Como citado por Tulmann Neto *et al.* (1999), mutagênicos físicos (diferentes tipos de radiações) e químicos podem ser utilizados *in vivo* ou *in vitro* no melhoramento de plantas, aumentando a variabilidade genética e permitindo a obtenção de genótipos de interesse.

O uso de mutagênicos em frutíferas pode ter vários objetivos, tais como: aumento da variabilidade genética em cultivares já adaptadas, de forma que se permita a alteração de uma ou poucas características (porte compacto, resistência a doenças, coloração, precocidade, etc.) sem outras alterações no genótipo; quebra de ligações gênicas de características indesejáveis; revelar e tornar homogêneas quimeras existentes e tornar mutantes estáveis; supressão de incompatibilidade em cruzamento entre parentais distantes e produção de sexualidade transitória em apomíticas (LAPINS, 1983; DONINI e MIKE, 1984).

De acordo com Bermúdez-Caraballosa *et al.* (2010), a técnica de indução de mutação por irradiação, empregada em programas de melhoramento de plantas, é indicada para cultivares elites e é adequada para resistência à doenças ou características agronômicas governadas por um ou poucos genes, uma vez que conserva as outras características do fenótipo original. Desse modo, a mutação por irradiação pode ser utilizada com o objetivo de modificar algumas características para que se tornem úteis ao homem por meio de alterações genômicas e epigenômicas.

Segundo dados da FAO/IAEA (2009), três mil e cem variedades foram obtidas por meio de indução de mutação e dessas, aproximadamente 50% foram desenvolvidas pelo uso direto dos mutantes. O Brasil tem registrado na IAEA dez mutantes, sendo duas variedades de arroz, três de feijão, duas de trigo e três de Crisântemo (FAO/IAEA, 2009).

Países da Ásia e Europa são os que mais contribuem para o aumento desse banco de cultivares, ocupando o primeiro e o segundo lugar no melhoramento por mutagênese, respectivamente. A América Latina está em quinto lugar. Em uma análise geral percebe-se que 45% dos mutantes estão associados a grãos e cereais (aveia, arroz, trigo e feijão) (FAO/IAEA, 2009).

Quanto ao número de materiais a serem tratados, depende de vários fatores. Para o caso de gemas axilares, por exemplo, citam-se números que variam de algumas dezenas até 7.000 (TULMANN NETO *et al.*, 1990). Donini e Micke (1984) citam casos de sucesso em que foram irradiadas 800 gemas axilares, selecionando mutantes em 4.000 plantas da geração seguinte (M1V2). Os mesmos autores citam que para a obtenção de porte compacto em cereja, a frequência de mutantes foi de 1 para 1.000 ramos M1V2, enquanto que para a característica nectarina em pêssogo a frequência foi de 1 para 10.000 ramos M1V2. Como é difícil estimar a frequência de mutantes para determinada característica, a recomendação geral é que, se possível, o trabalho inclua grandes populações, com número de acessos acima de

300 indivíduos. Grandes populações podem também ter a vantagem de permitir a seleção de vários mutantes com o mesmo fenótipo, permitindo que após os ensaios de campo seja selecionado, dentre eles, o genótipo mais vantajoso do ponto de vista de estabilidade e outras características (SPIEGEL ROY, 1990).

A probabilidade de obtenção de mutantes aumenta em função do tamanho da estrutura meristemática tratada com o mutagênico, mas, principalmente, em função do número de células presentes no meristema. Durante o tratamento mutagênico de ápices caulinares, a existência de primórdios de gemas axilares em diferentes estádios ontogenéticos, com diferentes números de células, possibilita a ocorrência de diferenças na frequência e no tamanho dos setores mutados, observados em ramos derivados destes primórdios (DONINI e MICKE, 1984).

Como discutido anteriormente, existem várias razões que tornam a figueira uma cultura atrativa para o uso de indução de mutação. Apesar disso, existem poucos trabalhos em que essa alternativa tenha sido utilizada. Spiegel Roy (1990) cita que em figueira, gemas dormentes foram irradiadas com raios-gama e a LD50 (dose que causa 50% de letalidade) foi determinada com 25 Gy. Entretanto, para cada genótipo deve-se fazer um ensaio preliminar antes do início da pesquisa. Akhund-Zade (1981) tratou com raios-gama (doses de 50 a 100 Gy) estacas com gemas axilares, obtendo mutantes de porte compacto e mutantes precoces, os quais foram submetidos a ensaios de produção, sendo um deles (Bol) liberado para os produtores. Em outro trabalho russo, um mutante de figo (variedade Bolinzhir) foi obtido após a irradiação com as mesmas dosagens de raios-gama (50 a 100 Gy), conforme relata Kerkadze (1987).

2.3.1. Radiação Gama

Agentes mutagênicos têm sido utilizados para ampliar a variabilidade genética de muitas espécies vegetais (MICKE e DONINI, 1993). Nos anos 60, dezenas de novas variedades obtidas por indução de mutação foram liberadas aos agricultores (MICKE *et al.*, 1990). Visando a seleção de mutantes, vários métodos para a condução de populações provenientes de tratamentos com mutagênicos são estudados. Mutações induzidas e cruzamentos artificiais têm sido relatados, separadamente, em muitos trabalhos, com a finalidade de ampliar a variabilidade genética em diferentes espécies cultivadas, porém poucos autores discutem comparativamente a utilização dessas técnicas no melhoramento (KONZAK e MIKAELSEN, 1977).

Mutagênese é um poderoso instrumento na biologia das plantas para indução de variabilidade genética para um grande número de culturas, principalmente devido ao fato de que a tecnologia é simples e relativamente barata para executar, aplicável a todas as espécies de plantas e igualmente utilizável em pequena e grande escala (SWAMINATAN, 1995; SIDDIQUI e KHAN, 1999).

A frequência e a saturação de mutações podem ser reguladas por meio da variação da dose dos agentes mutagênicos (MENDA *et al.*, 2004, JANDER *et al.*, 2003). Agentes mutagênicos podem induzir a diferentes extensões de lesões genômicas, variando desde mutações de bases do DNA até inserções ou deleções de fragmentos inteiros (KIM *et al.*, 2006; MACKENZIE *et al.*, 2005). Em plantas, a resposta a agentes mutagênicos físicos e químicos é espécie-específico e em grande parte desconhecida para a maioria das espécies (GILCHRIST e HAUGHN, 2005).

A radiação gama pode ser considerada como um dos principais indutores de mutação e de aberrações cromossômicas estruturais (PIMENTEL, 1990), sendo seus efeitos

influenciados por diversos fatores. Entre esses fatores, podem ser citadas as condições de armazenamento após a irradiação (BROCK e FRANKLIN, 1966), o teor de água do material a ser submetido à irradiação (CONGER e CARABIA, 1972), o genótipo dos indivíduos (KILLION e CONSTANTIN, 1972; BAHL e GUPTA, 1982), o modo de exposição do material (IQBAL e ZAHUR, 1975), a presença de algumas substâncias químicas (KUMAR, 1991), a fase do ciclo celular (GUDKOV e GRODZINSKY, 1982), a dosagem de radiação (SANTOS, 1993), o grau de ploidia dos cromossomos (BROCK, 1980), a temperatura das células (SMITH, 1958), o conteúdo de DNA por genoma haplóide (PLEWA *et al.*, 1983) e o nível de oxigênio (BUMP *et al.*, 1982).

A radiação gama, uma onda eletromagnética curta, já é utilizada em escala comercial há mais de 40 anos, contando hoje com mais de 150 plantas operacionais espalhadas pelo mundo. Os raios-gama possuem alta energia e poder de penetração, sendo também chamados de energia ionizante, pois quando atravessam um objeto provocam a ionização dos átomos que o constituem. Esse efeito tem diversas aplicações benéficas como a esterilização e redução da carga microbiana de um produto e a modificação estrutural de alguns materiais. É medido por meio da dose aplicada, ou seja, a quantidade de energia absorvida pelo produto; para cada aplicação existe uma dose recomendada. O processo de irradiação baseia-se na exposição de produtos a uma fonte de radiação eletromagnética ionizante (raios-gama Cobalto- 60) (EMBRARAD, 2010).

A quantidade de energia envolvida no processo é desprezível e não provoca elevação de temperatura, podendo ser classificado como um processo frio. Como a interação da energia (ondas eletromagnéticas) ocorre apenas com elétrons orbitais e não com núcleos dos átomos, o processo não deixa resíduo, não induz a radioatividade e não necessita de quarentena. Os produtos submetidos ao processo de irradiação (exposição aos raios-gama) podem ser utilizados, imediatamente, após o processo (LUCA, 2010).

A quantidade de radiação absorvida pelos produtos durante o processo de irradiação é denominada dose e tem como unidade, no Sistema Internacional, o Gray (Gy), que corresponde à absorção de energia equivalente a um Joule por quilograma de material. Uma vez estabelecidos os critérios de dose e configuração de carga para um determinado produto, é definido o tempo de exposição do mesmo às fontes de radiação, passando esse a ser a única variável controlada no processo (EMBRARAD, 2010).

A radiação ionizante provoca mudanças na estrutura macromolecular dos materiais que levam a alterações nas propriedades físicas e químicas dos mesmos. Os efeitos da radiação nos materiais irradiados surgem devido à formação de radicais livres, e esses se formam pela dissociação de ligações de valência primária, por exemplo, C-C, C-H ou C-O em radicais; assim, alterações na estrutura da molécula acarretam em alterações nas suas propriedades. Como em qualquer tratamento, a interação do agente da ação (radiação gama) com o produto deve ser avaliada numa etapa inicial de investigação. Essa avaliação visa identificar qual a faixa de dose de radiação adequada para viabilidade do processo e, basicamente, consiste em expor amostras do produto a doses crescentes e avaliar os efeitos provocados pela radiação (EMBRARAD, 2010).

Maluszynski, (2001) relata que os raios-gama têm sido o mutagênico a partir do qual mais variedades têm sido liberadas, diretamente, via mutações, ou indiretamente, pelo uso de mutantes em cruzamentos. As vantagens dos raios-gama são a dosimetria acurada, razoável reprodutibilidade e a alta e uniforme penetração em sistemas multicelulares. Por meio do uso da radiação gama obteve-se mutantes, com características de maior produtividade, precocidade, menor porte e maior resistência a pragas, que foram utilizados na obtenção de novas variedades de diversas espécies de interesse agrônomo. Resende (2005), que trabalhou com bananeiras Pacovan (AAB) e Pacovan Ken (AAAB), identificou que doses de

20 e 30 kGy foram as mais indicadas para induzir mutação visando a redução do porte nessas cultivares, em razão da redução de 50% no número médio de gemas.

No Brasil, Santos *et al.*, (1997), trabalhando com doses de raio-gama em estacas de figo “Roxo-de-Valinhos”, verificaram que 30 Gy nesse caso, seria a dosagem máxima suportada pela planta, a fim de provocar mutações, sem alterar sua viabilidade.

2.4. Epigenética e Metilação do DNA

Atualmente, a capacidade de decifrar completamente todo o código genético de um organismo tem gerado muitas informações sobre a organização dos genes e a estrutura dos cromossomos. Mas, o simples sequenciamento de um genoma não explica como esses genes atuam e regulam a execução de todas as funções dentro de um organismo. A genômica tem se esforçado para entender a regulação dos genes ao caracterizar os padrões de expressão, tanto em homeostase, como em situações de estresse. Quando a interação genoma e expressão do gene (ou fenótipo) não se comporta conforme esperado, pode-se explicar pela epigenética. (FRAGA, 2005).

De acordo com Jablonka e Raz (2009), epigenética é o estudo de mudanças herdáveis (tanto por mitose quanto por meiose) na expressão gênica que não está associada às mudanças na própria sequência desses genes. Portanto, a variação epigenética representa um conjunto de eventos moleculares responsável pela modulação da expressão gênica, sem alterações na sequência do DNA (BIRD, 2007). Essas variações podem ser induzidas em resposta a algum estímulo, que podem persistir após sua remoção, sem envolver mudanças permanentes no genótipo (BORÉM, 1997).

Apesar de o termo estar sendo utilizado desde 1940, apenas recentemente essa área adquiriu a sua atual definição. Muitos processos envolvidos no desenvolvimento de um

organismo podem ser atribuídos ao campo da epigenética, bem como paramutações, silenciamento gênico, *imprinting* parental, entre outros (KUBOTA *et al.*, 2011). Alterações no conteúdo epigenético envolvem uma série de eventos, tais como RNAs *non-coding*, modificações de histonas, remodelação da cromatina, metilação do DNA e de fatores de transcrição, tanto *enhancers* como repressores (JONES e SUNG, 2014).

A metilação do DNA é o marcador epigenético mais bem caracterizado, associada a elementos transponíveis de silenciamento e a genes de *imprinting* genômico em plantas (LISCH, 2009; HENDERSON e JACOBSEN, 2008; RANGWALA e RICHARDS, 2007; SAZE e KAKUTANI, 2007; KATO *et al.*, 2003; OKAMOTO e HIROCHIKA, 2001).

A metilação consiste na transferência de grupos metil a algumas das bases citosinas do DNA situadas prévia e contiguamente a uma guanina; como ao carbono número 5 do anel de pirimidina de citosina (DODGE *et al.*, 2002; HAINES *et al.*, 2001).

Em procariontes, a metilação do DNA fornece uma maneira de proteger o DNA da digestão por suas próprias enzimas de restrição que são projetadas para eliminar o DNA estrangeiro. Em eucariotos superiores, a metilação do DNA funciona como outro nível de regulação gênica. De acordo com Bernstein *et al.* (2007), esse tipo de variação epigenética tem sido associada à regulação da expressão gênica, defesa do genoma, diferenciação celular, inativação da cromatina e *imprinting* genômico, mostrando uma distribuição não-aleatória pelo genoma.

Além disso, pode aumentar as variações das características quantitativas porque muitos genes podem ser afetados, simultaneamente (PHILLIPS *et al.*, 1990). De acordo com Jain (2001), o aumento na metilação *in vitro*, potencialmente, agrava a atividade e a regulação do gene.

As plantas superiores são, predominantemente, metiladas no dinucleotídeo CpG e no trinucleotídeo CpXpG sob a forma de 5-metilcitosina (FINNEGAN *et al.* 1998). A metilação

do DNA ocorre, principalmente, dentro do dinucleotídeo CpG simétrico, ou *clusters* CpG, muitas vezes referida como "ilhas" CpG que estão localizadas nas regiões promotoras dos genes (MAEDA e HAYASHIZAKI, 2006). Também, verificou-se que em plantas a metilação do DNA pode ser localizada em áreas de transcrição ativa, como regiões codificadoras de genes (SUZUKI e BIRD, 2008).

A capacidade de quantificar e detectar metilação do DNA de forma eficiente e precisa é essencial para o estudo da epigenética em casos como a expressão gênica, doenças genéticas e muitos outros aspectos importantes da biologia. Até o presente momento, uma série de métodos foi desenvolvida para quantificar a metilação do DNA, tais como eletroforese capilar de alto desempenho e PCR (*Polymerase Chain Reaction*) sensível à metilação com *primers* arbitrários. Atualmente, a técnica mais utilizada é o método do bissulfito de sódio (ASHWELL e ANGEL, 2010).

A técnica MSAP (*Methylation-sensitive amplified polymorphism* - PCR sensível à metilação com *primer* arbitrários), desenvolvida por Reyna-López *et al.*, (1997), uma adaptação do AFLP (VOS *et al.*, 1995), provou ser uma poderosa ferramenta para a análise do estado de metilação do DNA. Baseia-se na amplificação seletiva do DNA e comparação entre os fragmentos gerados por duas enzimas de restrição *MspI* e *HpaII*, que distinguem entre sequências metiladas e não metiladas. Ambas as enzimas clivam as sequências CCGG, porém, não há clivagem pela *HpaII* se a citosina do dinucleotídeo central CG estiver metilada (MAMPUMBU, 2006).

Sua aplicação foi utilizada para o estudo de metilação CpG no sítio CCGG no genoma de cultivares de arroz (ASHIKAWA, 2001; XIONG *et al.*, 1999) e banana (BAURENS *et al.*, 2003); para caracterizar as alterações de metilação associados com micropropagação de banana (PERAZA-ECHEVERRIA *et al.*, 2001) e maçã (LI *et al.*, 2002); para analisar a variação somaclonal de óleo de palma (MATTHES *et al.*, 2001) e vernalização do trigo

(SHERMAN e TALBERT, 2002); analisar o padrão de metilação da citosina durante a germinação de sementes de pimentão (PORTIS *et al.*, 2004); para investigar a resistência de arroz ao crestamento bacteriano (SHA *et al.*, 2005); para identificar os genes, diferencialmente metilados em tomate após infecção pelo vírus TYLCSV (MASON, 2008); entre os diferentes estágios de desenvolvimento em *Arabidopsis thaliana* (RUIZ-GARCIA *et al.*, 2005), e entre *Arabidopsis lyrata* e seus progenitores (BEAULIEU *et al.*, 2009).

Joyce e colaboradores (2002) determinaram a metilação de citosina do DNA, em microplantas desenvolvidas *in vitro*, com diferentes morfologias foliares, por meio de marcador AFLP, empregando enzimas de restrição sensíveis à metilação para testar a hipótese de que a metilação do DNA poderia ser usada para caracterizar diferenças entre os tratamentos.

Além da análise dos padrões de metilação do DNA, o estudo do conteúdo epigenético representado no DNA por meio de sua metilação global pode ser realizado por meio de ensaios de imunocoloração, utilizando anticorpos sensíveis de metilação do DNA para encontrar e ligar-se às regiões metiladas, permitindo a utilização de abordagens de microscopia óptica para observar mudanças espaciais na metilação do DNA (ZLUBOVA *et al.*, 2001), bem como abordagens baseadas em imunoquímica, como o teste de ELISA (GUERRERO-PRESTON *et al.*, 2010).

Entretanto, a comparação da expressão gênica de genótipos com contraste fenotípico proporciona o desenvolvimento de novos estudos voltados à identificação e caracterização dos genes envolvidos. O conhecimento da localização desses genes do genoma aumenta a utilidade de marcadores moleculares, permitindo a identificação dos genes envolvidos no controle de uma característica específica de interesse (SASAKI e BURR, 2000).

De acordo com Fraga *et al.* (2002), desde que a metilcitosina foi encontrada no DNA genômico, essa alteração epigenética tornou-se um centro de atração científica, especialmente

por causa de sua relação com o silenciamento de genes. Em conjunto com as técnicas MSAP e ELISA, que se destinam a produzir informações qualitativas e quantitativas, respectivamente, sobre a metilação do DNA genômico, esforços mais recentes focam-se no estudo do estado de metilação de sequências específicas de DNA para se determinar o papel da metilação da citosina em mecanismos específicos de regulação *in vivo*. Nesse sentido, o sequenciamento em larga-escala de DNA, associado a posteriores análises de bioinformática, permite identificar padrões de metilação do DNA para um mesmo loco em diferentes tecidos, órgãos, indivíduos ou espécies, fornecendo o melhor tipo de dado para o estudo das características de interesse encontradas.

Protocolos de sequenciamento genômico têm sido desenvolvidos para verificar o estado da metilação de genes dentro de regiões selecionadas, utilizando vários procedimentos suplementares para melhorar o sinal da sequência sob investigação, gerando mapas exatos únicos de metilação de DNA a partir de moléculas individuais de DNA genômico, indicando a posição de cada 5-metilcitosina (FROMMER, 1992).

Desenvolvida por Frommer *et al.* (1992) e por Clarck *et al.* (1994), o sequenciamento de DNA tratado com bissulfito de sódio é uma técnica amplamente empregada em pesquisas em epigenética. Baseia-se na capacidade do bissulfito de sódio (NaHSO_3) em gerar íons bissulfito (HSO_3^-) que convertem a citosina não metilada em uracilas, por meio de desaminação, enquanto citosinas metiladas são protegidas da conversão. Durante a amplificação via PCR são produzidos polinucleotídeos, nos quais os resíduos de citosina representam os resíduos de 5-mC no DNA original metilado, como mostra a Figura 1 (SCHAEFER *et al.*, 2009; SMITH *et al.*, 2009; HAYATSU, 2008).

FIGURA 1. Esquema do sequenciamento de DNA tratado com bissulfito de sódio para identificação da 5-metil-citosina (5-mC), adaptado de Hayatsu, (2008).

O rendimento do sequenciamento bissulfito de sódio mostra resolução ótima de dados, mas esse método tem sido limitado na cobertura de genomas relativamente pequenos (FERNANDEZ *et al.*, 2012). Com o avanço de criação de programas para estudo de presenças de ilhas CpG, das técnicas e das tecnologias para sequenciamento, o estado de metilação do segmento de DNA é, então, determinado pela comparação do DNA tratado com bissulfito de sódio com o DNA não tratado, que é realizada pelas análises computacionais de bioinformática.

2.5. Bioinformática

Como as tecnologias para o mapeamento de metilação do DNA são cada vez mais disponíveis em laboratórios não especializados, há uma necessidade crescente de ferramentas de fácil uso que facilitam a manipulação e análise de DNA metilado em grande escala de dados.

O alinhamento de sequências tratadas com bissulfito de sódio necessita, principalmente, levar em consideração a diminuição seletiva de Cs não metiladas. Para tanto, duas abordagens alternativas foram desenvolvidas: programas de alinhamento específicos, como BSMAP (Xi e Li, 2009), GSNAP (WU e NACU, 2010), Last (FRITH *et al.*, 2012), Pash (COARFA *et al.*, 2011), RMAP (SMITH *et al.*, 2009), RRBSMAP (XI *et al.*, 2012), segemehl (OTTO *et al.*, 2012) e QUMA (KUMAKI *et al.*, 2008), que substituem as citosinas da sequência do DNA genômico por letras chaves; e programas de alinhamento de três letras, como Bismark (KRUEGER *et al.*, 2011), BRAT (HARRIS *et al.*, 2012; HARIS *et al.*, 2010), BS-Seeker (CHEN *et al.*, 2010) e MethylCoder (PEDERSEN *et al.*, 2011), que simplificam o alinhamento de bissulfito de sódio, convertendo todos os C em Ts, fazendo o alinhamento exclusivamente em um alfabeto de três letras (isto é, A, G e T) usando um alinhador padrão.

Dentro deste contexto, os programas de alinhamento específicos são os mais utilizados, pois há uma maior cobertura do genoma, uma vez que mantêm os níveis de metilação do DNA. Isso porque os programas de alinhamento de três letras retiram os Cs restantes da sequência tratada com bissulfito de sódio, e assim, diminui a complexidade da sequência, de tal modo que uma maior percentagem de leituras é descartada devido a posições de alinhamento ambíguas (BOCK, 2012).

Entretanto, de acordo com Xi e Li, (2009), o mapeamento do genoma tratado com bissulfito de sódio para leitura com o genoma de referência é um grande desafio para os programas de análises de dados.

Essa dificuldade se deve primeiramente devido ao aumento significativo do espaço de busca em relação à sequência de referência inicial, pois as duas fitas de DNA, que seriam complementares entre si, passam a ser quatro sequências divergentes após o tratamento com bissulfito de sódio. Segundo, devido à reduzida complexidade da sequência modificada por bissulfito de sódio, uma vez que as novas sequências serão ricas em timina e pobres em

citossina. Além disso, as identidades entre a sequência tratada e a sequência de referência são diminuídas devido aos alinhamentos assimétricos da citossina metilada com a timina, que antes também era uma citossina, porém não metilada.

Utilizando da premissa geral de que todas as posições de C no genoma, onde a assimetria de transição C/T pode ocorrer, já são conhecidas e podem ser usadas para orientar o mapeamento das leituras modificadas pelo bissulfito de sódio, é feito um mascaramento do nucleotídeo T nas leituras modificadas pelo bissulfito de sódio como C (ou seja, a conversão de bissulfito de sódio reversa) apenas nas leituras de C na referência original, mantendo todos os outros "Ts" na leitura de bissulfito de sódio inalterado. Desse modo, o estado de metilação do DNA pode ser interpretado por comparação computacional dos resultados do sequenciamento com a sequência original de DNA. Basicamente, todas as citosinas não metiladas convertidas em timina na leitura dos *reads* e a presença de um pico de C indicam a presença de 5-metil-citosina (5-mC) no genoma. E, de acordo com Li e Tollefsbol (2011), se houver a presença de dois picos, tanto C quanto T, isso indica uma metilação parcial ou conversão incompleta pelo bissulfito de sódio. As proporções de 5-mC para C podem ser interpretadas por meio da análise da área quadrada relativa destas duas bandas, como podem ser observadas na Figura 2.

Segundo Zilberman *et al.* (2007), sendo a metilação do DNA a grande responsável na regulação transcricional do genoma, bem como no direcionamento da deposição de outras marcas epigenéticas e remodelação da cromatina, a regulação epigenética na expressão genética torna-se um complexo mecanismo de interações, sendo sua localização nos genes de fundamental importância no entendimento do funcionamento dos mesmos.

FIGURA 2. Interpretação dos resultados do sequenciamento de regiões metiladas modificadas por bissulfito de sódio, adaptado de Li e Tollefsbol, 2011.

No geral, um pouco mais do que 20% do genoma de *Arabidopsis* é metilado, com elementos transponíveis (ETs) e repetições de DNA que representam a maior fração de sequências metiladas (BILICHAK *et al.*, 2012). No caso dos genes, que são expressos de um modo tecido-específico, são principalmente metilados nas regiões promotoras, estando, essa posição de metilação, relacionada ao silenciamento gênico. Ao mesmo tempo, a metilação de regiões codificadoras normalmente não resulta no silenciamento de genes (COKUS *et al.*, 2008; ZANG *et al.*, 2006). Os genes que apresentam metilação dentro da sua sequência de codificação exibem níveis moderados de expressão e são menos propensos a ter a expressão tecido-específica, sendo, portanto, a metilação das regiões codificadoras responsável pelo nível de expressão daquele gene (FENG e JACOBSEN, 2011).

Para tanto, várias ferramentas desenvolvidas pela bioinformática permitem o acesso e análise dos dados. A ferramenta mais popular de comparação de sequências de DNA com os bancos de dados genômicos é o programa computacional BLAST ou *Basic Local Alignment Search Tool* (ALTSCHUL *et al.*,1990). Por meio de uma busca por similaridade, esse algoritmo compara uma sequência de DNA qualquer com todas as sequências genômicas contidas no banco de dados do NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), permitindo, assim, a determinação das posições dos genes nele contidos.

3. OBJETO DE ESTUDO E HIPÓTESE

Em trabalho desenvolvido anteriormente na Faculdade de Engenharia, Câmpus de Ilha Solteira, da Universidade Estadual Paulista - FEIS/UNESP, foram levadas para a cidade de Piracicaba/SP - ao Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP) - 450 estacas de figueira “Roxo-de-Valinhos” com 40 cm de comprimento. Essas foram irradiadas com raios-gama, na dose de 30Gy, com a taxa de dose de 238 Gy/h, no irradiador tipo Gamma Cell, à 10 cm do ápice de cada estaca. As estacas foram enraizadas (formaram uma nova planta) e as gemas irradiadas deram origem a ramos que foram podados por 6 vezes consecutivas e, somente nesse momento, é que foram retiradas estacas desses ramos, para a instalação da segunda etapa do referido trabalho.

Das 450 plantas iniciais, Rodrigues *et al.*, 2012a, foram selecionadas 5 plantas devido às suas características morfológicas únicas e divergentes do controle “Roxo-de-Valinhos”, descritas a seguir, e que podem ser visualizadas no Apêndice 1:

- 01 - Cultivar Roxo-de-Valinhos: controle
- 02- Seleção “Roxo-de-Valinhos” - 440 (irradiada): Fruto alongado
- 03- Seleção “Roxo-de-Valinhos” - 433 (irradiada): Pedúnculo longo
- 04- Seleção “Roxo-de-Valinhos” - 189 (irradiada): Fruto grande com ostíolo pequeno
- 05- Seleção “Roxo-de-Valinhos” - 214 (irradiada): Fruto grande
- 06- Seleção “Roxo-de-Valinhos” - 301 (irradiada): Fruto alongado e grande

Estas cinco seleções foram multiplicadas vegetativamente em local protegido do tipo telado, com irrigação do tipo nebulização intermitente, e foram levadas a campo para serem comparadas com o cultivar Roxo-de-Valinhos em plantio comercial.

Todas as características observadas, inicialmente, se mantiveram constantes e as seleções 189, 214 e 301 foram superiores ao “Roxo-de-Valinhos” quanto às avaliações realizadas, mostrando-se seleções com potencial para serem caracterizadas como novos cultivares (RODRIGUES *et al.*, 2009).

Posteriormente, no laboratório do Departamento de Biologia Aplicada à Agropecuária da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias/ UNESP – Câmpus de Jaboticabal – SP, em parceria com a Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP, análises moleculares foram realizadas com marcadores moleculares RAPD e AFLP para verificar a existência de polimorfismo entre os tratamentos, utilizando estas cinco seleções de plantas irradiadas tidas como mutantes, comparando-se os resultados entre si e entre o cultivar Roxo-de-Valinhos, utilizado como parâmetro para efeito de controle.

Rodrigues *et al.*, 2012b verificaram que as seleções de figueira (*Ficus carica* L.) não diferiram entre si e entre o cultivar Roxo-de-Valinhos em relação ao genótipo, ou seja, não houve detecção de polimorfismo pelas técnicas dos marcadores moleculares utilizados.

Entretanto, sabe-se que a variação epigenética representa um conjunto de eventos moleculares responsável pela modulação da expressão gênica, sem alterações na sequência do DNA, podendo ocorrer em resposta a estímulos, sendo a metilação do DNA o mecanismo epigenético mais comumente estudado.

Diante da grande variação fenotípica encontrada entre os mutantes de figueira e pela não detecção de polimorfismo genético entre eles, este trabalho apresenta a hipótese de que há a ocorrência de variação epigenética nas plantas analisadas em decorrência da exposição das gemas que originaram as seleções à radiação gama, alterando o processo de transcrição de RNA e, conseqüentemente, a expressão gênica dessas plantas, justificando as divergências morfológicas observadas, sem alterações na composição do seu DNA.

4. OBJETIVO

O objetivo do presente trabalho foi verificar a existência de variabilidade epigenética devido à metilação do DNA em seleções irradiadas de figueiras, entre si e quando comparadas ao principal cultivar comercial, Roxo-de-Valinhos, utilizando-se as técnicas de ELISA e MSAP, e posterior sequenciamento do DNA, tratado com bissulfito de sódio, para detecção do posicionamento das regiões polimórficas, analisado por ferramentas de bioinformática.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Local

As cinco seleções, previamente descritas, utilizadas para extração do DNA no Laboratório de Biologia Aplicada à Agropecuária, da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal (FCAV/UNESP), se encontram na Fazenda de Ensino, Pesquisa e Produção da mesma instituição.

As técnicas utilizadas para análises moleculares e *in silico* desses materiais, para a comparação entre a testemunha e as possíveis seleções metiladas, foram realizadas no Laboratório de Bioinformática do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP, em parceria com o Laboratório de Epigenética e Reprodução do mesmo Departamento e instituição, e com o Laboratório de Biotecnologia de Plantas Medicinais da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP.

5.2. Análise Molecular

5.2.1. Extração do DNA

A extração de DNA total genômico dos tecidos vegetais foi realizada segundo técnica descrita por Lodhi *et al.* (1994), com modificações descritas a seguir: 0,1 g de folhas novas e limpas de cada amostra foi macerado em nitrogênio líquido e homogeneizado em tubos de microcentrífuga de 2,0 ml, contendo 1,0 ml de Tampão de Extração (2% CTAB, 1,4 M NaCl, 0,2% 2-βmercaptoetanol, 20 mM EDTA, 100 mM TRIS-HCl-pH 8,0).

Após 25 minutos de incubação a 60°C foram adicionados 1,0 ml de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), centrifugando por 15 minutos a 10.000 rpm a 23°C. Em um novo tubo, o sobrenadante foi transferido, ao qual se adicionou 500 µl de NaCl 5 M e 2 volumes de etanol absoluto. Após incubação a -80°C por 5 minutos, centrifugou-se a 6.000 rpm por 5 minutos a 4°C e depois a 10.000 rpm por 5 minutos a 4°C. Em seguida, o *pellet* formado foi lavado em 1,0 ml de etanol (70%), posto para secar e ressuspendido em 100 µl de TE. Após o *pellet* ter dissolvido totalmente, esse foi tratado com 20 µl de RNase, incubado a 37°C por 20 minutos.

A quantificação e a qualidade das amostras, apresentadas na Tabela 1, foram realizadas com auxílio de espectrofotômetro (*NanoDrop 2000 – Thermo Scientific*), tendo-se medido a absorbância de cada amostra em contraste com uma amostra de H₂O destilada, nos comprimentos de onda de 260 e 280 nm (SAMBROOK *et al.*, 1989). Razão entre 1,8 e 2,0 é considerada ideal, sendo que valores inferiores a 1,8 indicam excesso de proteínas e valores superiores a 2,0 indicam excesso de solventes orgânicos (FERREIRA e GRATTAPAGLIA, 1998).

TABELA 1. Quantificação dos DNAs das amostras de figueira, em espectrofotômetro.

<i>Tratamentos</i>	<i>260nm</i>	<i>280nm</i>	<i>260nm/280nm</i>	<i>280nm/260nm</i>	<i>Proteína µg/ml</i>	<i>DNA µg/ml</i>
1	0,8229	0,4354	1,8899	0,5291	1.2583	2057.6257
2	1,5232	0,7884	1,9321	0,5176	2.3116	3808.8093
3	0,8728	0,4650	1,8768	0,5328	1.3378	2182.4248
4	0,8936	0,4607	1,9399	0,5155	1.3543	2234.5039
5	0,9984	0,5166	1,9327	0,5174	1.5150	2496.5195
6	0,5539	0,2944	1,8816	0,5315	0.8483	1385.1537

5.2.2. MSAP

Digestão: duas reações de digestão foram realizadas ao mesmo tempo para cada amostra de DNA genômico. Na primeira reação 250 ng de DNA genômico foi digerido com 5U da enzima de restrição *EcoRI* (*New England Biolabs*) e 5U da enzima de restrição não sensível à metilação *MspI* (*New England Biolabs*) em um volume final de 20 µl.

A segunda reação de digestão foi realizada utilizando-se a enzima de restrição sensível à metilação *HpaII* (*New England Biolabs*) no lugar de seu isoesquizômero *MspI*. As reações de digestão foram incubadas em termociclador modelo PTC-100 (*MJ Research Inc*) e submetidas a um ciclo de 37°C por 2 horas. Posteriormente, os fragmentos gerados foram ligados às sequências adaptadoras específicas complementares às extremidades clivadas pelas duas enzimas.

Ligação dos Adaptadores: foram retirados 3,67 µl da reação de digestão e acrescentados 1 µl de tampão da T₄ DNA ligase, 40 unidades da enzima T₄ DNA ligase, 5 pmole do adaptador para o corte da *EcoRI* (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5') e 50 pmoles do adaptador para o corte da *HpaII/MspI* (5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'/3'-AGTACTCAGGACGAGC-5'). As amostras foram incubadas em termociclador por 1 hora a 37°C e 2 horas a 25°C.

Amplificação Pré-Seletiva: ao produto da ligação foram acrescentados 0,5 µl da mistura dos *primers* pré-seletivos: *primer* E+A (5'-GACTGCGTACCAATTC+A-3') e *primer* HM+C (5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG+C-3'), 0,4 µl dNTPs 2,5 mM, 1 µl 10X *Buffer Mg Free* (Promega), 0,6 µl MgCl₂ (25 mM) e 0,5 µl Taq DNA polimerase (5 unidades/µl) (Promega). As amostras foram colocadas no termociclador com o seguinte programa: 20 ciclos com 30 segundos a 94°C (desnaturação), 1 minuto a 56°C (pareamento) e 1 minuto a 72°C (extensão).

Os produtos amplificados na reação pré-seletiva foram diluídos 20 vezes em tampão TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0).

Amplificação Seletiva: na amplificação seletiva MSAP-PCR foi adicionado 1,0 µl *EcoRI* + (X oligo) (25 ng/µl), 1,2 µl *HpaII/MspI* + (X oligo) (25 ng/µl), 0,4 µl dNTPs 2,5 mM, 2,0 µl 10X Buffer Mg Free (Promega), 1,2 µl MgCl₂, (25 mM), 0,5µl Taq DNA polimerase (5 unidades/µl) (Promega) e 1,5 µl de DNA pré-amplificado.

As combinações de *primers* utilizadas estão descritas na Tabela 2 mostrada a seguir, com um total de 14 combinações:

TABELA 2. Relação de oligonucleotídeos iniciadores utilizados para análise de MSAP, com suas respectivas combinações.

<i>Combinação</i>	<i>Primer EcoRI + A</i>	<i>Primer HM+C</i>
1	E+ AG	HM+ CAT
2	E+ AT	HM+ CAG
3	E+ AGT	HM+ CTC
4	E+ AG	HM+ CTA
5	E+ AA	HM+ CGT
6	E+ ATC	HM+ CAG
7	E+ AC	HM+ CTT
8	E+ ATT	HM+ CG
9	E+ AGT	HM+ CAT
10	E+ AGT	HM+ CTA
11	E+ AC	HM+ CAG
12	E+ AT	HM+ CTA
13	E+ AG	HM+ CTT
14	E+ AA	HM+ CG

A amplificação seletiva foi realizada de acordo com a seguinte programação: 94°C por 2 minutos, 94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 11 vezes (94°C por 30 segundos, 65°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto), 94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto, 22 vezes (94°C por 30 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 1 minuto) e 72°C por 2 minutos, armazenando os produtos de amplificação a -20°C.

Preparo das placas com gel de poliacrilamida: na placa de base, após ter sido limpa 2 vezes com álcool 95%, foi espalhado 1,5 ml de *Repel-silane* para o gel não grudar. Na placa de coloração, na qual o gel deve ficar afixado, foi aplicada uma solução contendo 1,0 ml de álcool 95%, 5,0 µl de ácido acético glacial e 5,0 µl de *Bind-silane*.

Eletroforese: Após a secagem do gel de poliacrilamida, foi realizada uma pré-corrida de 1 hora, a 50 °C com uma corrente de 80 W. O resultante de cada reação foi misturado a 8 µl de *Loading buffer* (10 ml formamida deionizada, 200 µl de EDTA (0,5 M) pH 8,0, 10 mg de bromofenol blue e 10 mg de *xylene cyanol*).

A seguir, as amostras foram desnaturadas a 95°C por 5 minutos e, imediatamente, transferidas para gelo. Como padrão de peso molecular utilizou-se o *ladder* de 50 bp desnaturado, juntamente com as amostras.

Os produtos MSAP foram separados em gel desnaturante de poliacrilamida 6%, preparado com 120 ml de matriz de poliacrilamida (252 g de uréia, 36 g de acrilamida e 1,8 g de bisacrilamida), 120 µl de TEMED e 800 µl de APS (95 mg/ml), com tampão TBE 1X. A eletroforese foi realizada em corrente constante de 80 W e temperatura máxima de 50°C por 4 horas.

Coloração e Visualização: O gel foi corado com solução de nitrato de prata (SANGUINETTI *et al.*, 1994), seguindo protocolo descrito na Tabela 3; e a visualização dos resultados das amostras, após a eletroforese, foi realizada com leitura visual e foto documentação.

TABELA 3. Procedimento de colorimetria por foto revelação das placas de poliacrilamida.

<i>Etapa</i>	<i>Solução</i>	<i>Tempo</i>
Fixação	2670ml H ₂ O destilada 30 ml ácido acético glacial 300ml etanol absoluto	10 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	1 minuto
Pré-tratamento	3000 ml H ₂ O destilada 45 ml ácido nítrico	3 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	1 minuto
Impregnação	3000 ml H ₂ O destilada 6g nitrato de prata	25 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	2 x 30 segundos
Revelação	4000 ml H ₂ O destilada 120g sódio carbonato anidro 2160µl formaldeído	Até a visualização das bandas
Bloqueio	2850 ml H ₂ O destilada 150 ml ácido acético glacial	5 minutos
Lavagem	H ₂ O destilada	1 minuto

5.3. Sequenciamento

5.3.1. Isolamento do DNA alvo

Após a visualização do padrão de metilação de seleções de figueira por marcadores moleculares MSAP - onde se considerou padrão de metilação de DNA quando as bandas presentes oriundas da reação *EcoRI*+*MspI* estavam ausentes na reação *EcoRI*+*HpaII*, indicando que a citosina interna estava metilada (5'-CmCGG-3'), e o contrário, quando as bandas presentes na reação *EcoRI*+*HpaII*, ausentes em *EcoRI*+*MspI*, indicam que a citosina externa da cadeia de DNA foi metilada (5'-mCCGG-3'), evento considerado como estado de hemimetilação (MCCLELLAND *et al.*, 1994) - as bandas de cada fragmento apresentado com diferente padrão de metilação e de interesse foram recortadas do gel de poliacrilamida com a utilização de lâmina de bisturi estéril e foram transferidas para microtubos de PCR.

A cada tubo adicionou-se 50 µl de tampão da enzima Taq DNA polimerase utilizada previamente nas reações de amplificação, diluída para uma concentração de 1 vez. Para obter o fragmento de DNA presente no pedaço de poliacrilamida recortado, os tubos foram aquecidos em termociclador a 95°C por 20 min (SANGUINETTI *et al.*, 1994). Após a eluição das bandas de interesse, os tubos foram submetidos ao congelador a -80°C por 30 min ou até o congelamento de líquido a fim de solidificar a poliacrilamida remanescente.

Como verificação do procedimento efetuado, os fragmentos de DNA foram re-amplificados utilizando-se os mesmos pares de *primers* utilizados anteriormente para amplificação. A reação de PCR foi realizada por 35 ciclos com 30 segundos a 94 °C (desnaturação), 30 segundos a 56 °C (pareamento) e 1 minuto a 72 °C (extensão).

A reprodutibilidade de cada fragmento foi detectada em gel de agarose a 2% para comprovação da correta amplificação dos DNAs purificados, os quais foram repurificados com a utilização do Kit de extração de DNA de gel de agarose (*Genejet gel extraction kit* – Fermentas), seguindo recomendações do fabricante, obtendo assim um material puro e livre de contaminantes.

5.3.2. Clonagem e Sequenciamento do DNA alvo

Com os fragmentos alvos isolados, esses foram submetidos à clonagem utilizando o vetor *pGEM®-T Easy Vector System I* (Promega, Alemanha) na razão de 3:1 (inserto:vetor), de acordo com as recomendações do fabricante, e inseridos em células de *E. coli* (cepa DH10β) quimicamente competentes.

Para a obtenção do DNA plasmidial foi utilizado o *NucleoSpin® Plasmid* kit (MACHEREY-NAGEL, Alemanha) que remove os contaminantes, tais como sais, metabólitos e componentes celulares macromoleculares solúveis. Nessa metodologia o DNA

plasmidial se liga à coluna de sílica e é eluído sob condições de baixa força iônica com tampão levemente alcalino, de acordo com as instruções do fabricante.

Após a quantificação e qualificação dos DNAs extraídos, esses foram diluídos para uma concentração final de 100 ng/μl e submetidos ao processo de sequenciamento em um equipamento ABI PRISM™ 377 (Applied Biosystems, CA, USA), no Centro de Recursos Biológicos e Biologia Genômica (CREBIO), da Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias de Jaboticabal FCAV/UNESP, utilizando nas reações o *primer* universal *M13 Reverse* (Promega).

Os cromatogramas gerados pelo sequenciador foram analisados no programa computacional PHRED (EWING e GREEN, 1998; EWING *et al.*, 1998), com relação a sua qualidade; e no programa cross_match, que se encontra inserido no pacote do PHRED, a fim de se eliminar o vetor, para obtenção de sequências com qualidade e limpas. Após esta etapa, as sequências de mesma repetição foram alinhadas pelo programa computacional CAP3 (HUANG, 1999) para obtenção dos *contigs*, que se encontram descritos a seguir, em formato FASTA:

```
>Contig1
ATGAGTCCTGCTCGGCTCTATTGGCGGATGGATAACGCCCCTCACTCTGCCATGAGAACAAAGAAA
GCCGCACTATCTCCTTGACAGCTTTGCCCGCCGCCCTTCGGTGGTATAGTAGGATGGATAGCAAAGC
CGCCTTCGGCCCTTCGCTTAGTAAGCCCCTCTTCGAGCCTCTACTGAATTGGTACGCAGTCA

>Contig2
TCGTACACTAAAAGCCGTTCTTCTACTCCTTTAGAGTACCCGAGTAAGGGAACAAGATTCCGGTGC
TTGATCTTCCCGATAGTTTCCATTTCAGCTGTGAATTGGTACGCAGTCA

>Contig3
ATGAGTCCTGCCCCTTTTAGAGGCATGGACGCTCAGAAATTAGCTCGATGGGCGTGAATTGGTACG
CAGTCA

>Contig4
ATGAGTCCTGCCCCTTTAAACACTCAGGTGCAAGATAGCCTCTCGTTCCTCTCATTGTTGTCAGTAC
TCGACTGAATTGGTACGCAGTCAATCC

>Contig5
GGAGAGCAAGTAAAAATTTCTTTCCAACCTTAATTAATTCATTAATGATGTAATTAAATCAAAGTG
AGCCCATGTCATCCACCTTTAGGCTTGCTTGGCTCCTTTTCTTAATATACAGTCCCTTTTAAAGTTAA
CACAGGTATTTCCAATACTGAATTGGTACGCAGTCA

>Contig6
ATGAGTCCTGCCCCTTAGATGAAGGAGGCAACAGAAGATTGCTGGGAGGAAAGGTACAGTTGAAA
AATATACGTGCATGGTCTTTTGCCATCCTTTGCGGTGAATTGGTACGCAGTCA
```

5.3.3. Obtenção dos *primers*

A partir dos *contigs* obtidos no sequenciamento realizado, o desenho dos iniciadores foi realizado no programa computacional *Primer3* (UNTERGRASSER *et al.*, 2012). Nesse programa foram estabelecidas algumas condições de forma a favorecer a funcionalidade dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados. O item “Produto de PCR” permite estabelecer o tamanho desejado para o produto da reação, que nesse caso foi selecionado entre 50 e 400 pb.

O item “Tamanho de iniciador” permite estabelecer o intervalo desejado para o tamanho do oligonucleotídeo a ser desenhado, entre 15 e 30 pb. Já a “T_m” se refere à temperatura média de fusão do iniciador gerado, estando relacionada à especificidade do mesmo no momento da amplificação, que foi entre 55°C a 65°C. A “Porcentagem de CG” está relacionada com a concentração das bases Citosina e Guanina na sequência dos iniciadores gerados, interferindo na temperatura de pareamento dessas no momento da reação, considerando 45 a 55%.

A estabilidade dos oligonucleotídeos iniciadores desenhados, nas condições de reação, foi verificada pelo programa computacional *GeneRunner* (versão 3.05 – sob licença livre da Hastings Software, 1994), disponível para *download* em <http://www.generunner.net/>, a fim de minimizar estruturas secundárias como: *hairpins*, *self* e *hetero-dimers*.

A nomenclatura dada aos *primers* desenhados segue a ordem: Letra C com o número da combinação de *primers* MSAP dos quais ele foi proveniente, seguido da quantidade de pares de bases que aquela banda representou no gel de poliacrilamida, seguindo, portanto, a ordem: C3180, C7180, C780, C1080, C10180 e C10130. A sequência dos oligos iniciadores desenhados encontra-se a seguir, na Tabela 4.

TABELA 4. Oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir de fragmentos epigeneticamente polimórficos de DNA de seleções de figueira.

<i>Contig</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequência Forward 5'-3'</i>	<i>Sequência Reverse 5'-3'</i>
1	C3180	GCTCTATTGGCGGATGGATA	GCTCGAAGAGGGGCTTACTA
2	C7180	TCGTACACTAAAAGCCGTTCTTC	ACTGCGTACCAATTCACAGC
3	C780	TGAGTCCTGCCCCTTTTAGA	GCCCATCGAGCTAATTTCTG
4	C1080	TGCCCCTTTAAACACTCAGG	TGCGTACCAATTCAGTCGAG
5	C10180	GCAAGTAAAAATTTCTTTCCAACC	TGACTGCGTACCAATTCAGTAT
6	C11130	TGAGTCCTGCCCCTTAGATG	GTACCAATTCACCGCAAAGG

A partir desses *primers* desenhados, testes foram feitos para otimizar as reações de PCR visando a confirmação das sequências obtidas no DNA genômico, o que pode ser constatado a seguir, na Figura 3.

FIGURA 3. Gel de poliacrilamida contendo bandas de tamanhos compatíveis aos esperados pelos *primers* utilizados no DNA genômico de figueira. Os números de 1 a 6 representam a ordem dos *primers* utilizados conforme tabela 1. PM = peso molecular.

5.3.4. Sequenciamento do DNA genômico

Muitos genomas foram sequenciados para projeto de estudo de alta qualidade usando eletroforese capilar *Sanger* ou, mais recentes, dados de sequências de curta leitura e técnicas de montagem do genoma inteiro. No entanto, até mesmo os melhores projetos de genomas contêm lacunas e outras imperfeições, devido a limitações nos dados de entrada e às técnicas utilizadas para construir projetos de montagens, podendo, entretanto, contar com genomas de referência para obter êxito.

No caso da figueira, um genoma de referência não está disponível em bancos de dados públicos para que possa ser utilizado com modelo para a montagem dos inúmeros curtos *reads* gerados, e, desse modo, o sequenciamento de todo o seu DNA genômico se torna inexequível com a utilização das técnicas de sequenciamento descritas anteriormente.

Visando solucionar este problema, com o objetivo de se estender as sequências alvo diferencialmente metiladas dos tratamentos de figueira irradiadas, submeteu-se o DNA genômico do tratamento controle “Roxo-de-Valinhos” para ser sequenciado na empresa **DNA Link USA, Inc**, utilizando a tecnologia de sequenciamento de terceira geração ***Pacific Biosciences SMRT*** (*Single Molecule Real Time*), a qual proporciona longos *reads* de leitura, diminuindo a necessidade de um genoma de referência para a montagem dos *contigs*, devido a sua capacidade de ler o comprimento de uma única molécula, em tempo real, sem a etapa de amplificação.

O sequenciamento do DNA genômico gerou 65.041 *reads* com uma média de tamanho de 3.802 pb cada, totalizando o sequenciamento de 247.295.766 pb. Esses longos *reads* foram armazenados no banco de dados local no programa computacional BLAST, a fim de utilizá-los para alinhamento com os *contigs* obtidos dos fragmentos de DNA diferencialmente metilados.

Como resultado do alinhamento local feito no programa BLAST, utilizando os *long reads* gerados como banco de dados, com os *contigs*, tornou-se possível a expansão de duas sequências obtidas pelos fragmentos do DNA diferencialmente metilados para a construção de *primers* modificados, a serem utilizados na amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio. No caso do *contig* 1, sete *long reads* foram alinhados como sendo de mesma sequência. Já no caso do *contig* 5, foi feito o alinhamento com cinco *long reads*. Essas sequências de mesma repetição foram alinhadas pelo programa computacional CAP3 (HUANG, 1999) para obtenção dos novos *contigs*, com tamanho estendido.

As regiões utilizadas para construção de novos *primers* para amplificar novamente essas regiões, pelo método de sequenciamento de Sanger, encontram-se descritas a seguir, em formato FASTA onde, destacado em *itálico* e *sublinhado*, encontram-se os *primers* e, em **negrito**, a sequência do *contig* original que foi ampliado.

Contig 1

```
>CCGTTAGGTGGCTCTTTACTCCCTCAAGACTTGCTTCTTATTTTTCTTCCAGCCCCCTTCATCCCCTTTTATAT
CCAATTAGGGAGCTAACGAGCTAAGGCAGCCTCCGCCTCCGGAAGAAAGTCCCCGCAGGTCCCTTTTTTCC
GCCTTTGATCCGCTAACTCATGAGGCAAAAGCCGCCCTCATGGCAGGCATATGAGCGGAGTCTTCACTAAA
AAGCCGGTTGCTATTGGCGGATGGATAACGCACCTCACTCTGGCCATGAGAACAAAAGAAAAGGCGCACTA
TCTTCCTTTGCAGGCTTTGGCCCTGTGCCGCCCTTCGGGTGGTATAGTAGGATGGATAGCAAAAGCCGCGCTT
CGGTCCCTTCGCTTTAGGTAAGGGCCCCCTCTTCGAGCCTTCTACTGAATTCCGCTCCGCCCCGGTCCTTAGTAG
CGTTGACAAAGGTCAACCGTGAGGCCTAACAAAAGACATCCAAGAAGGTTGACTTTGTCAACTTCCTTGCTTT
GTGTCGTTGACAAGGAGAACCAGCCAACCCCTGTTGTTGATAGAAGAGCCTTACCGGGCCCGCCCTTTTATA
GCTCCAGCGACTGTTGTCCATGGAAAAGAGAGTTTTGGTTTTCTGTCAAAGAAGCCATGCTTAACACAGCCTTT
ATAGCGTTAGGAAAGGGCATTGAGCCGCGCTCTAACTAAATTAAGGGGTAAGCGGCCCGTACTCTCTCTT
CTGGTGGATACG
```

Contig 5

```
>AATCAATGGTGGACGAAAAGCCGAAGATTGACCCCAAAAAGTCAAAGAAAAGACCGTAATGGCAAAACAAT
CTACAGTATAAATTACTACTGTAACGAGCGTGTTTTAATGAATATAATACTGATATGTTCTCAGAATTGCATCC
CACCAAGAAATCAAGGCACATTAATTAGGATATCTTGAGCAACGTGCTGTTTCAAGTTATGAAAGAAAATTCT
TATACAGTTCATAAATTACCACAGATGCAACTCTTTGCGACTGCAGTTCAATTAACAATAACTGCTGTATAAG
TAAATTCCAGTTATTGGAATACTGTGTTAACTTAAAAAATGGACGTAATATAGCAAAAGAGACAAACA
AAGCTTCAACTATAGCTTACCTCACTTAACCTTTTCTTTATGACATCATTTTCTATAATTTAAGAAAATTTGAA
GTAAATTTGGCTAGATTAATACCTAGGGTGGCCGCCACATTGTCTCCAATTTGTGATGATTGTCTTGCTTCTTT
TTGGGCACAAATCCATTAGCAAAAATTTTCCAACCTCTATAAATAAGGGGTGGGCATTATTCACAAAAATTGGA
AAAGCTGCTAACACTTTGGCCAATTTTCTCTACCAATCCGGACTTGTGAGGAGAAAAGAAAGAATTTTCAAA
CCCTTAGAGTGTTATAGAGCTTAGTGGAGGGTCGTTTTATGGGTTGGAGAACAAGCAAAAGTTTGAAAAAA
ATTTGTAACCCTTGTTGGCAAAGGAGGGCCGGTTTGCAAGGAAATTACCAAGGAGGAAGAGCCAAGC
```

A partir dos novos *primers* gerados, realizou-se o sequenciamento dessas sequências ampliadas, utilizando o kit *DNA Sequencing Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Life Technologies): 200 ng do produto de PCR, 2 µl de *BigDye Terminator* (v.3.1), 1µl de oligonucleotídeos F/R (2,5µM), utilizados separadamente, 2 µl de Tampão 5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0, 10 mM MgCl₂), água milli-Q filtrada para completar o volume de 10 µl de reação.

O programa para a PCR de sequenciamento foi composto dos seguintes ciclos: 95°C por 1 min; 25 vezes a 95°C por 10 s, 51°C por 5 s e 60°C por 4 min. O fragmento de DNA amplificado foi precipitado e submetido à eletroforese de sequenciamento em um equipamento automático *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems) no Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP).

As novas sequências geradas foram submetidas a alinhamento no programa computacional CAP3, obtendo-se, desta forma, sequências *consensus* mais longos, que se encontram a seguir, em formato FASTA:

>Contig1Sanger

```
AGAGAGAGTACGGGCCCTTACCCTTAATTTAGTTTAGACGCGGCTCGAATGCCTTTACGCTATAGGCTGTGTTA
AGCATGCTTCTTTGACAGAAAACAACTCTTTTCCATGACAACAGTCGCGACTATAAAGGGCGGGGCGGTAA
GCTCTCTATCAACAACAGGGGGGCTGTTCTCTTTGTCAACGCTACTAAGGACCGGGGCGAGCGGAATTCAGTAGAG
GGATGTCTTTGGTTAGGCTCGGTTGACTTTGTCAACGCTACTAAGGACCGGGGCGAGCGGAATTCAGTAGAG
GCTCGAAGAGGGGCTTACTAAGCGAAGGGCCGAAGGCGGCTTTGCTATCCATCCTACTATACCACCGAAGGG
CGGCAGGCAAAGCTGCAAGGAGATAGTGCGGCTTTCTTTGTTCTCATGGCAGAGTGAGGGGCGTTATCCATCC
GCCAATAGAACCGGCTTTTAGTGAAGATCCGCTCATATGCTGCATGAGGGGCGGCTTTGCTCATGAGTTAGCG
ATCAAGCGGAAAAGGACCTGCGGGCTTCTTCCGGAGCGGAGCTGCCTTGCTCGTAGCTCCCTAATTGATATA
AAAGGGGATGAAGGGTGAAAGAAAAATAAGAAGCAAGTCTTGAGGGAGTAAAAGAGACCCCTAACGG
```

>Contig5Sanger

```
AAACGATATGTTTAGAATTTAGATCCCCATACCCAATCAAGCGCATTAAATTGGGATATCTTGGGCCAAGGGG
GTTCAAGTTATAAGAAAATTTTATACAGTTTATAATTTCCAGATGAATTTGGGCTGCAGTTCAAAAAACCAA
TACTGTGTATAAGGGAATCCAGTATTGAAAAATTTGTGTTAGCTTAAAAATGGGCTGTGTTTTAAAAAAAG
AGCCAAACGAGCCTTAAAAAGGGTTACATCATGCCCTTTGAATTTTGACATCATACTTCATTAAAAAATTTG
GGAAAAATATTTCTTGCTCCCAAGGAGGAAGAGCCAAG
```

5.4. Bissulfito de Sódio

5.4.1. Obtenção dos *primers*

Para construção de *primers* a serem utilizados nas reações de amplificação do DNA tratado com bissulfito de sódio, Li e Dahiya (2002), desenvolveram um programa chamado *MethPrimer*, que se baseia especificamente na conversão do DNA pelo bissulfito de sódio.

Para desenhar os *primers* para o DNA modificado, as sequências originais foram inseridas no programa, o qual gerou as sequências modificadas, considerando os dinucleotídeos das ilhas CpG metilados e a conversão das citosinas não-metiladas em timina (LI e DAHIYA, 2002).

A nomenclatura dada aos *primers* desenhados foi as iniciais BS (Bissulfito de Sódio), seguido da numeração do *contig* de que foi proveniente, os quais se encontram na Tabela 5, a seguir.

TABELA 5. Oligonucleotídeos iniciadores desenhados a partir de fragmentos epigeneticamente polimórficos de DNA de seleções de figueira, modificado para bissulfito de sódio.

<i>Primer</i>	Sequência <i>Forward</i> 5`-3`	Sequência <i>Reverse</i> 5`-3`
BS1	TAGGTTGTGTTAAGTATGTT	TATATCAATTAAAAAACTAC
BS2	GTTTTTTTATTTTTTTTAGAGTATT	TTCACAATAAAAATAAAAACTA
BS3	ATGAGTTTTGTTTTTTTAGAGGTA	TAACTACGTACCAATTTCAC
BS4	ATGAGTTTTGTTTTTTTA	TACGTACCAATTCAATC
BS5	TATGTTTAGAATTTAGAT	ATATCAAAATTCAAAAAAAA
BS6	ATGAGTTTTGTTTTTTAGATGAAGG	TAACTAATACCAATTTCACC

5.4.2. Modificação do DNA e Sequenciamento

O DNA total de cada tratamento foi submetido a tratamento com bissulfito de sódio, utilizando o *EpiTect Bisulfite Kit* (Qiagen), de modo a converter as citosinas não metiladas em

uracila, permanecendo as citosinas metiladas inalteradas, de acordo com as instruções do fabricante: em 20 µl de cada amostra foi adicionado 85 µl da mistura de bissulfito de sódio e 35 µl do tampão de proteção ao DNA, correspondendo a um volume de 140 µl de solução final. As misturas foram realizadas à temperatura ambiente (25°C) e, posteriormente, foram submetidas à desnaturação e incubação de aproximadamente 5h para a modificação do DNA em termociclador.

Em seguida, as amostras foram centrifugadas brevemente e todo material foi transferido para uma coluna *EpiTec spin* e centrifugadas à rotação máxima (10.000 x g) por 1 minuto. O eluato foi descartado e foram adicionados 500 µl de tampão BW para lavar a coluna a qual foi centrifugada à rotação máxima por 1 minuto e o líquido sob a coluna foi desprezado. Foram adicionados 500 µl de tampão BD para a dessulfonação das amostras sob incubação por 15 minutos à temperatura ambiente (25°C). Em seguida, a coluna foi centrifugada por um minuto à rotação máxima e o eluato foi descartado. Para a remoção de qualquer resíduo líquido das amostras, a coluna foi centrifugada à rotação máxima (10.000 x g) por um minuto e incubada por 5 minutos a 56°C. Desta forma houve a remoção de sais de bissulfito de sódio e químicos utilizados no processo de conversão que podem inibir reações de PCR e sequenciamento. As colunas foram transferidas para um novo tubo de 1,5 ml, onde foram adicionados 20 µl de tampão EB para eluição do DNA e armazenadas em *freezer* a uma temperatura de -20°C.

Os DNAs tratados com bissulfito de sódio foram amplificados por meio da técnica de PCR, utilizando os *primers* modificados, de modo a amplificar as regiões diferencialmente metiladas de interesse para este estudo, conforme reação: 2,5 µl Tampão AmpliTaq Gold® 10X, 1,5 µl MgCl₂ (25mM), 0,5 µl dNTP, 0,5 µ de cada iniciador modificado para bissulfito de sódio (*forward* e *reverse*) e 0,1 µl de AmpliTaq Gold® DNA Polymerase (Applied Biosystems®).

Após ciclagem de 95°C por 10 min, 60 vezes (94°C por 45 s, T *annealing* °C por 45 s e 72°C por 45 s) e uma extensão final de 10 min a 72°C, utilizou-se 5 µl do produto para reamplificação dos fragmentos de interesse, segundo reação e ciclos: 2,5 µl Tampão 10X, 1,0 µl de MgCl₂, 0,5 µl de dNTPs, 0,5 µl de cada iniciador modificado para bissulfito de sódio (*forward* e *reverse*) e 0,2 µl de Taq DNA Polimerase, recicladas nas mesmas condições anteriores, porém com 35 vezes de repetição de amplificação do *template*.

Com confirmação visual da amplificação correta das bandas, realizada em gel de poliacrilamida a 8%, as reações foram submetidas ao sequenciamento direto do produto de PCR, conforme o protocolo: 200 ng do produto de PCR, 2 µl de *Big Dye Terminator* (v 3.1), 1 µl de oligonucleotídeos F/R (2,5µM), utilizados separadamente, 2 µl de Tampão 5X (400 mM Tris-HCl, pH 9,0, 10 mM MgCl₂) e água milli-Q para completar o volume de 10 µl de reação.

O programa para a PCR de sequenciamento foi composto de 95°C por 1 min; 25 vezes a 95°C por 10 s, 51°C por 5 s e 60°C por 4 min. Após precipitação, as reações foram submetidas à eletroforese de sequenciamento em um equipamento *ABI Prism 3130 Genetic Analyzer* (*Applied Biosystems*) no Núcleo de Serviços em Biotecnologia (NSB) da Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto (FUNDHERP/HC/FMRP/USP).

5.5. Análise *in silico*

A qualidade dos *reads* gerados pelos cromatogramas foi analisada pelo programa computacional PHRED (EWING *et al.*, 1998; EWING e GREEN, 1998) e, após a obtenção das sequências de qualidade, com o alinhamento dos pontos de metilação pelo programa *Multalin* (CORPET, 1988), realizou-se a comparação das sequências tratadas com bissulfito de sódio com as sequências de referências, utilizando-se o programa computacional QUMA - *QUantification tool for Methylation Analysis* (KUMAKI *et al.*, 2008).

Localizados os posicionamentos dos dinucleotídeos CpG metilados no DNA de cada tratamento, as sequências *consensus* obtidas foram submetidas à busca por similaridade pelo programa BLAST (ALTSCHUL *et al.*,1990), para comparação das mesmas no banco de dados NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), a fim de identificar possíveis genes reguladores, ou regiões promotoras de genes reguladores em que essas metilações estão inseridas, justificando as diferenças fenotípicas encontradas entre os tratamentos de figueira irradiados.

5.6. ELISA

O teste de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), metodologia essencialmente baseada no uso de anticorpos sensíveis à 5-mC., foi utilizado para realizar a quantificação relativa de metilação global entre os DNAs genômicos dos tratamentos de figueira irradiada. Tal procedimento foi realizado utilizando-se o *Imprint DNA Methylation Quantification kit* (Sigma), usando tiras com poços pré-tratados com reagente ligante de DNA metilado, e utilizando um anticorpo de captura sensível a metilação do DNA e um anticorpo de detecção, permitindo a detecção colorimétrica da quantidade relativa de metilação do DNA em relação ao controle positivo, que apresenta um DNA 100% metilado.

Após a diluição das amostras de DNA a uma concentração de 50ng/μl, 4μl de cada DNA foi misturado a 26μl de solução fixadora de DNA metilado, totalizando 6 reações de 30μl cada, que foram transferidas para cada poço, bem como o branco, que apresentou água ultrapura ao invés de DNA e o controle positivo, que apresentou DNA metilado fornecido no kit utilizado.

Depois de 60 minutos de incubação a 37°C, acrescentou-se, em cada poço, 150μl de solução de bloqueio, e voltou-se a incubar os poços por mais 30 minutos a 37°C. Passado o

período de incubação, as soluções, juntamente com o DNA, foram removidos, e cada poço foi lavado 3 vezes com solução de lavagem diluída para 1X.

Adicionou-se então, em cada poço, 50 µl de anticorpo de captura, diluído em uma concentração de 1:1000, e incubou-se os mesmos por 60 minutos à temperatura ambiente (25°C). Após o período de incubação, removeu-se o anticorpo de captura, efetuou-se a lavagem de cada poço, com 150 µl de solução de lavagem diluída, por 4 vezes, e adicionou-se 50 µl de anticorpo de detecção, diluído em uma concentração de 1:1000, e incubou-se novamente à temperatura ambiente, por 30 minutos.

Após este período, efetuou-se a remoção do anticorpo de detecção, e cada poço foi lavado novamente por 5 vezes. E, finalmente, longe da luz, adicionou-se em cada poço, 100 µl de solução reveladora, incubando por 1-10 minutos, antes de adicionar 50 µl da solução de parada.

A absorbância da solução contida nos poços foi realizada em um comprimento de onda de 450nm em equipamento a *PowerWav XS Microplate Reader* (Biotek). E, após as leituras dos valores brutos, a fórmula utilizada para obtenção dos valores corrigidos foi: $[(A_{450} \text{ Amostra} - A_{450} \text{ Branco}) / (A_{450} \text{ DNA Controle metilado} - A_{450} \text{ Branco})] \times 100$.

Após o procedimento, feito em duplicata, as diferenças no DNA metilado entre os cultivares foram avaliadas com uma Análise de Variância (ANOVA), pelo programa computacional SISVAR (FERREIRA, 2011), a fim de se verificar a significância estatística entre os diferentes valores. Análises *post-hoc* foram realizadas com o teste de Tukey a 95 % de confiabilidade.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. MSAP

No presente estudo as análises MSAP foram aplicadas para investigar a existência de regiões com padrões diferenciais de metilação em plantas selecionadas de figueira, a fim de detectar polimorfismo entre elas, caracterizando sua distinção epigenética.

Para a análise, considerou-se padrão de metilação de DNA quando bandas presentes oriundas da reação *EcoRI*+*MspI* estavam ausentes na reação *EcoRI*+*HpaII*, indicando que a citosina interna estava metilada (5'-CmCGG-3'), podendo ser observado nos indicativos das setas em preto nas Figuras 4 a 10. O contrário, com bandas presentes na reação *EcoRI*+*HpaII*, ausentes em *EcoRI*+*MspI*, podendo ser observado nos indicativos das setas em vermelho nas Figuras 4 a 10, indicam que a citosina externa da cadeia de DNA foi metilada (5'-mCCGG-3'), evento considerado como estado de hemimetilação (MCCLELLAND *et al.*, 1994).

Perfil de DNA amplificados por MSAP, empregando 14 combinações de *primers*, foi gerado a partir do DNA genômico de seleções de figueira, derivadas originalmente de estacas do cultivar Roxo-de-Valinhos, provenientes de gemas irradiadas com raio-gama. Dos 14 pares de *primers* testados, foi obtido um total de 553 fragmentos amplificados, dos quais 56 apresentaram padrão de metilação diferencial entre os tratamentos, podendo ser observado nas Figuras 4 a 10, onde, os sítios não metilados CCGG (bandas comuns às duas enzimas), CmCGG metilação simétrica (bandas presentes apenas na digestão com *MspI*, mas não em *HpaII*), e locais hemimetilados hmCCGG – DNA, que se apresenta metilado em apenas uma fita (bandas presentes em DNA digerido por *HpaII*, mas não em *MspI*) representaram, respectivamente, 88%, 10% e 2% dos produtos de amplificação total.

Proporções semelhantes de sítios CCGG metilados foram encontrados pela mesma abordagem por Ashikawa (2001) em arroz (16,3% de metilação simétrica), por Peraza-Echeverria *et al.* (2001) em plantas micropropagadas de banana com 23%, e por Jaligot *et al.* (2004), obtendo 14,7% de metilação simétrica e 4,1% de sítios hemimetilados em dendezeiro.

A metilação do DNA é uma importante modificação que afeta a expressão gênica pelas regulações epigenéticas. De acordo com Bernstein *et al.* (2007), esse tipo de variação epigenética tem sido associada à regulação da expressão gênica, à defesa do genoma, diferenciação celular, inativação da cromatina e *imprinting* genômico.

É conhecido que no DNA de plantas, a metilação de citosina leva a repressão de genes, provocando alterações na transcrição genética sem necessidade de que se produza uma alteração na sequência do DNA, sendo um dos mecanismos responsáveis pela plasticidade fenotípica (HEPBURN *et al.*, 1987; QUEMADA *et al.*, 1987).

Esse silenciamento gênico pode reprimir diretamente a transcrição pelo bloqueio da ligação de ativadores de transcrição de sequências-alvo; e indiretamente, uma vez que existem proteínas que reconhecem o DNA metilado e recrutam co-repressores que iniciam a formação de cromatina repressiva (KLOSE e BIRD, 2006).

Com relação ao polimorfismo observado entre os tratamentos, nota-se que há uma variação no padrão de metilação, podendo ser observado nas combinações de iniciadores 3, 7, 10 e 11, apresentado em destaque com um círculo nas Figuras 5, 7, 8 e 9, respectivamente. Essa variação sugere que os indivíduos são diferentes epigeneticamente um do outro, podendo ser cada tratamento considerado como uma variedade distinta de figueira, principalmente no que se diz respeito ao tratamento 4, que apresentou-se superior ao cultivar Roxo-de-Valinhos em todas as características fenotípicas avaliadas (Figura 25 e Tabela 7 – Apêndice I).

FIGURA 4. Produtos da amplificação das combinações 1 e 2 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

FIGURA 5. Produtos da amplificação das combinações 3 e 4 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de-Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

FIGURA 6. Produtos da amplificação das combinações 5 e 6 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de-Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

FIGURA 7. Produtos da amplificação das combinações 7 e 8 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de-Valinhos; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

FIGURA 8. Produtos da amplificação das combinações 9 e 10 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de-Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

FIGURA 9. Produtos da amplificação das combinações 11 e 12 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

FIGURA 10. Produtos da amplificação das combinações 13 e 14 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliacrilamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

Contudo, em todos os sítios metilados, observou-se que o cultivar Roxo-de-Valinhos, utilizado como controle, apresentou-se também metilado, exceto na combinação 10. Com o controle metilado e alguns indivíduos não metilados, sugere-se o processo contrário à metilação desse material genômico, conhecido como desmetilação do DNA, sendo esse um possível agente responsável pela variação fenotípica entre as plantas, o que pode ser observado, como exemplo, na Figura 11.

FIGURA 11. Bandamento polimórfico observado da amplificação das combinações 3 e 4 de marcadores do tipo MSAP de amostras de indivíduos de figueira (*Ficus carica* L.) originados de estacas provenientes de gemas irradiadas com raio-gama e do cultivar Roxo-de-Valinhos, resolvidos em gel de poliácridamida. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

A metilação da citosina no DNA é generalizada em eucariotos, entretanto, existe uma enorme variação em sua abundância e distribuição genômica e nos sinais que visam a metilação *de novo* e o processo inverso de desmetilação ativa em sequências específicas (FURNER e MARJORI, 2010).

A desmetilação do DNA é o processo reverso à metilação e também é um processo reversível. A desmetilação de DNA pode ocorrer passivamente pela falta de metilação na manutenção durante vários ciclos de replicação ou como um processo ativo na ausência de replicação (PONFERRADA-MARÍN *et al.*, 2010; ZHU, 2009).

Desmetilação ativa tem emergido como um importante mecanismo no genoma de plantas para modulação do padrão de metilação. Essa desmetilação ativa poderia ser realizada, quer pela quebra termodinamicamente desfavorável da ligação carbono-carbono que liga a pirimidina ao seu grupo de metil, ou por um processo de reparação, levando a substituição da base m5C por C e a alterações na expressão de genes (BIRD, 2002; KRESS *et al.*, 2001).

Proteção contra a metilação *de novo* por proteínas ou cromatina pode garantir que a metilação do DNA nunca atinja um domínio de sua sequência. Domínios não metilados também podem surgir de forma ativa e remover a modificação do DNA. De acordo com Barreto *et al.* (2007), trabalhando com proteína nuclear envolvida na manutenção da estabilidade do genoma, concluíram que a sua expressão está diretamente ligada com a desmetilação ativa de DNA, ativando genes silenciados. Estudos recentes sobre metilação no desenvolvimento de sementes de *Arabidopsis* mutantes obtiveram evidências de perda de metilação nos sítios CG no endosperma (GEHRING, *et al.*, 2009; HSIEH *et al.*, 2009). Coletivamente, esses estudos sugerem que a mutação está envolvida em desmetilação ativa do genoma maternal, que dá origem ao endosperma, resultando em aumento da produção de siRNA nesse tecido (MOSHER *et al.*, 2010; MOSHER *et al.*, 2009;).

De acordo com Boyko e Kovalchul (2010), a regulação da expressão gênica medida por siRNA desempenha um papel fundamental no desenvolvimento, e processos fisiológicos e relacionados ao estresse em plantas. Ademais, a existência de um conjunto de estresse induzido apoia o possível envolvimento desses siRNA no estabelecimento de marcas epigenéticas, uma vez que em plantas essa regulação epigenética é responsável pelas respostas da mesma ao ambiente, tais como estresses bióticos e abióticos (HAUSER *et al.* 2011; PECINKA *et al.*, 2010).

Além disso, modificações no conteúdo epigenético interferem na dinâmica da cromatina, transitando entre os estados de eucromatina e heterocromatina. A remodelação da cromatina e a organização nuclear estão envolvidas também na resposta de plantas ao estresse (KIM *et al.*, 2010), e já foi visto que esse estresse pode afetar a disposição espacial da cromatina (SANTOS *et al.*, 2011), interferindo diretamente na plasticidade fenotípica de organismos de forma individual, uma vez que a cromatina quando apresenta sua densidade alterada, influencia o acesso de proteínas aos sítios de ligação no DNA, incluindo transcriptases de RNA e vários fatores de transcrição, modulando, assim, a expressão do gene (MAHFOUZ, 2010; PECINKA *et al.* 2010).

Associado a esse fato, na combinação 7, observada na Figura 9, uma única banda hemimetilada polimórfica foi observada em dois sítios, podendo a posição da metilação estar associada a regulação da expressão gênica nos indivíduos estudados. Clark e colaboradores (1997) demonstraram, em células de mamíferos, que a metilação da citosina externa bloqueava a ligação de certos elementos com seus sítios correspondentes, inibindo sua função.

6.2. Análise *in silico*

Das seis regiões selecionadas com polimorfismo epigenético pela técnica MSAP, após os desenhos do *primers* modificados para DNA tratado com bissulfito de sódio, foi possível otimizar reações com os *contigs* 1, 2 e 3, os quais geraram material de qualidade suficiente para submissão ao processo de sequenciamento direto de produto de PCR.

Os alinhamentos dos pontos de metilação entre a sequência original e as sequências tratadas com bissulfito de sódio, para cada região diferencialmente metilada dos tratamentos de figueira irradiados, encontram-se nas Figuras 12 a 14.

FIGURA 12. Alinhamento dos pontos de CpG entre a sequência original do *contig 1* com as sequências do DNA tratado com bissulfito de sódio das diferentes seleções irradiadas de figueira. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. A sequência “BSF” é proveniente do *primer sense* 5’-3’ e “BSR” do *primer anti-sense*.

```

Contig2 TCGTATATTA AAAGTCGTTT TTTTATTTTT TTAGAGTATT CGAGTAAGGG AATAAGATT CCGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA ATTGGTACGT AGTTA
5BSR2 TCGTATATTA AAAGTCGTTT TTTTATTTTT TTAGAGTATT CGAGTAAGGG AATAAGATT CCGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA ATTGGTACGT AGTTA
3BSF2 TCGTATATTA AAAGTCGTTT TTTTATTTTT TTAGAGTATT CGAGTAAGGG AATAAGATT CCGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA ATTGGTACGT AGTTA
4BSF2 TA AAAGTCGTTT TTTTATTTTT TTAGAGTATT CGAGTAAGGG AATAAGATT CCGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA ATTG
2BSR2 TTAGTTTT TTAGAGTATT CGAGTAAGGG AATAAGATT CCGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA ATTGGTA
3BSR2 GTATT CGAGTAAGGG AATAAGATT CCGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA A
6BSF2 GTATT CGAGTAAGGG AATAAGATT TGGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA A
4BSR2 TATT CGAGTAAGGG AATAAGATT CCGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA A
6BSR2 TAGGG AATAAGATT TGGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA ATTGGTACGT
1BSF2 AGAGTATT CGAGTAAGGG AATAAGATT TGGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TT
5BSF2 AGGG AATAAGATT CCGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA A
1BSR2 GG AATAAGATT TGGTGTTCGA TTTTTCGAT AGTTTTATT TTAGTTGTGA A
2BSF2 TTA AAAGTCGTTT TTTTATTTTT TTAGAGTATT CGAGTAAGGG AATAAGATT CG

```

FIGURA 13. Alinhamento dos pontos de CpG entre a sequência original do *contig 2* com as sequências do DNA tratado com bissulfito de sódio das diferentes seleções irradiadas de figueira. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. A sequência “BSF” é proveniente do *primer sense* 5’-3’ e “BSR” do *primer anti-sense*.

```

1 73
Contig3 ATGAGTTTTG TTTTTTTTAG AGGTATG-GA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGCGTGAAT TGGTACGTAG TTA
1BSR3 ATGAGTTTTG TTTTTTTTAG AGGTATG-GA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGTGTGAAT TGGTACGTAG TTA
4BSR3 ATGAGTTTTG TTTTTTTTAG AGGTATG-GA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGTGTGAAT TGGTACGTAG TTA
5BSR3 ATGAGTTTTG TTTTTTTTAG AGGTATG-GA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGTGTGAAT TGGTACGTAG TTA
1BSF3 ATGAGTTTTG TTTTTTTTAG AGGTATG-GA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGTGTGAAT TGGTACGTAG TTA
6BSR3 ATGAGTTTTG TTTTTTTTAG AGGTATG-GA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGTGTGAAT TGGTACGTAG TTA
5BSF3 GTTTTG TTTTTTTTAG AGGTATG-GA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGTGTGAAT TGGTATGTAG TT
4BSF3 G TTTTTTTTAG AGGTATG-GA TGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGTGTGAAT TGGTATGTAG TTA
3BSF3 TTTTTTTTAG AGGTATG-GA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGTGTGAAT TGGTACGTAG TTA
2BSR3 TTTTAG AGGTATGCGA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGTGTGAAT TGGTACGTAG TTA
3BSR3 TTAG AGGTATG-GA TGTTTAGAAA TTAGTTGAT GGGCGTGAAT TGGTACGT
2BSF3 TTTTTTTTAG AGGTATGCGA CGTTTAGAAA TTAGTTGAT GG

```

FIGURA 14. Alinhamento dos pontos de CpG entre a sequência original do *contig 3* com as sequências do DNA tratado com bissulfito de sódio das diferentes seleções irradiadas de figueira. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301. A sequência “BSF” é proveniente do *primer sense* 5’-3’ e “BSR” do *primer anti-sense*.

Utilizando-se o critério de qualidade do programa computacional PHRED, as diferenças observadas entre os *primers forward* e *reverse* de mesmo tratamento foram solucionadas, gerando sequências *consensus* para análise de comparação em banco de dado público NCBI, pelo programa computacional BLAST, que utiliza o valor de *E-value* para gerar alinhamentos significativos.

O *E-value*, ou valor esperado, representa o número de diferentes alinhamentos com pontuação equivalente ou melhor do que a pontuação bruta (S) que está prevista para ocorrer em uma pesquisa de banco de dados por acaso. Quanto menor o *E-value*, mais significativa é a pontuação e o alinhamento (FASSLER e COOPER, 2011).

O resultado do alinhamento local do *contig 2* obtido das regiões diferencialmente metiladas, com o banco de dados do NCBI, produziu alinhamento significativo com a região codificadora do receptor de brassinosteróide (BRI1) de diversos cultivares de plantas, dentre eles o morango (CHAI *et al.*, 2013) e o tabaco (MALINOWSKI *et al.*, 2009), como pode ser observado na Figura 15, que apresenta a posição do alinhamento com as sequências de referência do banco de dados, sua pontuação e o valor de *E-value*.

FIGURA 15. Resultado do alinhamento do *contig 2* com as sequências de referência do banco de dados do NCBI, produzido pelo programa computacional BLAST.

Os brassinosteróides têm sido descritos em monocotiledôneas e dicotiledôneas, bem como em algas, briófitas, pteridófitas e gimnospermas (BAJGUAZ, 2009; VARDHINI *et al.*, 2006; FUJIOKA *et al.*, 1996), ocorrendo em maior concentração em tecidos jovens que em tecidos adultos (MANDAVA, 1988). Inclusive, algumas pesquisas indicam que existe interação entre brassinosteróides e auxinas, sendo assim, esses dois hormônios responsáveis pela modulação da expressão de genes envolvidos nos mesmos processos fisiológicos (NEMHAUSER *et al.*, 2004).

Brassinosteróides (BR'S) são fito-hormônios que desempenham um papel muito importante em vários aspectos fisiológicos das plantas, incluindo alongamento e divisão celular, diferenciação vascular, florescimento, desenvolvimento do pólen e fotomorfogênese (CLOUSE, 2011). Alguns estudos mostram também que estão envolvidos no desenvolvimento da polpa e amadurecimento dos frutos de tomate (LISSO *et al.*, 2006; VIDYA VARDHINI e RAO, 2002), bagas de uva (SYMONS *et al.*, 2006) e pepino (FU *et al.*, 2008).

Em tomate, observou-se que os BRs têm aplicação em discos do pericarpo, elevando os níveis de licopeno e diminuindo os teores de clorofila, indicando que os BRs aceleram o amadurecimento dos frutos do tomateiro e senescência (VIDYA VARDHINI e RAO, 2002). No caso do morango, o estudo de diferentes estágios de desenvolvimento e composição dos frutos mostrou que houve aumento da expressão do receptor BRI 1 nos receptáculos e , mais claramente, durante o amadurecimento (BOMBARELY *et al.*, 2010).

O alinhamento local dos *contigs* 4 e 6 obtidos das regiões diferencialmente metiladas, com o banco de dados do NCBI, também produziu alinhamento significativo com a região codificadora de lecitina tipo G S-receptora semelhante à proteína serina/quinase-treonina de várias espécies vegetais, como a tamareira, banana, beterraba e umezeiro, com seus respectivos números de acesso no NCBI: XM_008777554.1, XM_009384383.1, XM_010667916.1 e XM_008248083.1, como pode ser observado nas Figuras 16 e 17.

FIGURA 16. Resultado do alinhamento do *contig* 4 com as sequências de referência do banco de dados do NCBI, produzido pelo programa computacional BLAST.

FIGURA 17. Resultado do alinhamento do *contig* 6 com as sequências de referência do banco de dados do NCBI, produzido pelo programa computacional BLAST.

As plantas podem receber e reconhecer diversos estímulos ambientais por meio de várias classes de receptores, sendo a percepção e transdução desses sinais regulados fortemente pelos chamados receptores semelhantes à proteína quinase (RLKs) (SHIU e BLEECKER, 2001a).

Os RLKs são codificados por uma família de múltiplos genes, que representa uma das maiores famílias de genes no genoma de *Arabidopsis*, compreendendo pelo menos 610 membros (SHIU e BLEECKER, 2001b), e com cerca de 1.130 membros em arroz (SHIU *et al.*, 2004).

De acordo com os mesmos autores, os RLKs participam em uma variada gama de processos em resposta a hormônios vegetais e estímulos ambientais, e estão envolvidas na regulação de diversas mudanças fisiológicas nas plantas como a auto-incompatibilidade, desenvolvimento do pólen e do endosperma (BOUWMEESTER e GOVERS, 2009), detecção do brassinosteróides em *Arabidopsis* (TANG, 2008; KIM, 2009) e resistência a queda das flores prematuramente, estresse e doenças. Além disso, em algodão, os genes que codificam proteínas quinases têm sido relatados, principalmente, na regulação do desenvolvimento de fibras (ZHAO *et al.*, 2013).

As respostas adaptativas de plantas são governadas pela ligação contínua entre a parede celular e a membrana plasmática, sendo a lecitina, o grupo de RLKs que apresenta maior potencial para fazer essa ligação, pois contém lecitina extracelular, que é conhecida por ligar vários carboidratos, podendo ser distinguida em 3 tipos: G, C e L, estando o tipo G relacionado no reconhecimento do pólen e na defesa das plantas ao estresse (BOUWMEESTER e GOVERS, 2009).

O figo é um fruto de coloração roxo-avermelhada, tanto na casca como no interior dos sicônios, e variações de coloração de intensidade de vermelho foram observadas nos tratamentos estudados, os quais sofreram estresse por meio da radiação gama, e como os receptores de brassinosteróides, responsáveis pela pigmentação dos frutos, controlados pelos receptores de quinase, encontram-se diferencialmente metilados a intensidade na expressão dos mesmos faz com que sejam candidatos interessantes para explicar os fenótipos observados, conforme demonstra a Figura 18, onde os símbolos X, círculo aberto e círculo fechado representam, respectivamente, ponto de metilação sem dado, CpG não metilado e CpG metilado.

FIGURA 18. Alinhamento dos pontos de metilação do *contig* 2 entre o DNA do tratamento controle “Roxo-de-Valinhos” e de seleções irradiadas de figueira, tratado com bissulfito de sódio, pelo programa computacional QUMA. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

Além disso, o *contig* 1, que foi ampliado, produziu alinhamentos significativos com o DNA mitocondrial das seguintes espécies vegetais: tulipeiro (RICHARDSON *et al.*, 2013), mamona (RIVAROLA *et al.*, 2011), melancia (ALVERSON *et al.*, 2010), melão (RODRIGUEZ-MORENO *et al.*, 2011), erva-sal (GREWE *et al.*, 2014), mamão (RICE *et al.*, 2008) e tabaco (SUGIYAMA *et al.*, 2005), entre outros, conforme Figura 19.

FIGURA 19. Resultado do alinhamento do *contig 1* com as sequências de referência do banco de dados do NCBI, produzido pelo programa computacional BLAST.

As mitocôndrias fornecem energia em forma de ATP por meio da fosforilação oxidativa em quase todas as células eucarióticas (MOWER *et al.*, 2012), desempenhando um papel muito importante no crescimento e desenvolvimento das plantas. Em comparação com seus homólogos em animais e fungos, o genoma mitocondrial das plantas apresenta características únicas, como grandes e drásticas variações no tamanho (KUBO e NEWTON, 2008), dinâmica estrutural (OGIHARA *et al.*, 2005), taxa pontual de mutações extremamente baixa (SLOAN *et al.*, 2012) e incorporação de DNA exógeno (TANAKA *et al.*, 2012).

Os genomas mitocondriais, na sua grande maioria (acima de 90%), são não-codificantes e a maior parte dessas sequências é desconhecida (ALVERSON *et al.*, 2010); entretanto, codificam alguns genes, bem como algumas proteínas ribossomais e subunidades dos complexos da fosforilação oxidativa (RICHARDSON *et al.*, 2013).

Os *contigs* 3 e 5 não produziram alinhamentos significativos quando comparados com o banco de dados do NCBI, apresentando resultados de pontuação menor que 40 e de *E-value* maior do que 3.0 para plantas; entretanto, a análise entre os possíveis pontos de metilação do *contig* 3 entre os tratamento apresentou polimorfismo, conforme Figura 21.

FIGURA 21. Alinhamento dos pontos de metilação do *contig* 3 entre o DNA do tratamento controle “Roxo-de-Valinhos e de seleções irradiadas de figueira, tratado com bissulfito de sódio, pelo programa computacional QUMA. As numerações de 1 a 6 referem-se aos fenótipos: 1-“Roxo-de Valinhos”; 2-PI 440; 3-PI 433; 4-PI 189; 5-PI 214 e 6-PI 301.

6.3. ELISA

Os valores de absorbância do DNA de diferentes tratamentos de figueira irradiados, obtidos pelo teste de ELISA com anticorpos anti 5-mC e sua respectiva análise de variância podem ser visualizados na Tabela 6.

TABELA 6. Valores de absorbância do DNA de diferentes tratamentos de figueira irradiados, obtidos pelo teste de ELISA com anticorpos anti 5-mC e sua respectiva análise de variância.

<i>Tratamento</i>	<i>Absorbância 450nm Primeira análise</i>	<i>Absorbância 450nm Segunda análise</i>	<i>Quantificação relativa de DNA metilado (%)</i>
1	0.615	0.661	16.62 ab
2	0.637	0.811	18.75 a
3	0.370	0.479	10.99 b
4	0.714	0.886	20.74 a
5	0.670	0.900	20.29 a
6	0.835	1.115	25.21 a
Controle positivo	3.586	4.109	100
CV %	-	-	5.61

Médias seguidas de mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey para um nível de 95 % de confiabilidade.

De acordo com as análises de variância, para um nível de 95 % de confiabilidade, há diferença estatística na porcentagem de DNA metilado entre os tratamentos avaliados. A análise *post-hoc* das médias revelou que o tratamento 3 apresenta seu DNA global menos metilado em relação às demais médias, não sendo, porém, diferente estatisticamente, do tratamento “Roxo-de-Valinhos” controle não irradiado, como pode ser observado na Tabela 6.

Pode-se observar que o controle apresentou um nível global de metilação menor do que os tratamentos que foram irradiados, revelando que a irradiação foi um fator externo capaz de alterar esses padrões nas plantas em questão, inclusive, no processo de desmetilação do DNA. A hipo e a hipermetilação do DNA de plantas durante condições de estresse ambiental causado por frio, calor e/ou salinidade, são conhecidos como moduladores da transcrição do genoma (BOYKO e KOVALCHUK, 2011; CHINNUSAMY e ZHU, 2009).

Kim e colaboradores (2013), trabalhando com diferentes doses de radiação gamma em *Arabidopsis thaliana*, observaram que houve uma diminuição na metilação do DNA conforme aumento da dose. Os resultados indicaram que a radiação na dosagem de 200 Gy foi positivamente relacionada com a diminuição substancial do silenciamento de genes transcricionais, provavelmente por indução de hipometilação genômica.

De acordo com os resultados obtidos com técnica para análise do conteúdo de metilação global do DNA de figueiras irradiadas, observa-se que os efeitos da radiação não afetaram de maneira homogênea os genomas das diferentes seleções. Entretanto, a desmetilação de partes do genoma torna-se uma justificativa, uma vez que as principais bandas polimórficas foram observadas nessa condição.

Em *Arabidopsis thaliana*, a metilação do DNA como uma marca repressiva é frequentemente associada com a expressão de repetições transcricionalmente inativas, como sequências repetitivas, *transposons* e heterocromatina (ZHU *et al.*, 2007; ZHANG *et al.*, 2006).

Os *loci* de DNA metilados estão frequentemente acompanhados de pequenos RNAs de interferência (RNAi) (LISTER *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2006). Aproximadamente, um terço dos *loci* de DNA metilados são ricos em RNAi que regulam funções da heterocromatina, desempenhando uma importante função na metilação do DNA, controlando as suas propriedades de silenciamento (JONES e SUNG, 2014; GREWAL e RICE, 2004; LIPPMAN e MARTIENSSEN, 2004).

Estudos em toda ordem do genoma de *Arabidopsis* sugeriram que a maioria das sequências genômicas não codificadas são capazes de gerar transcritos de RNA. Ambos RNAi e longos RNA *no-coding* estão envolvidos na metilação do DNA (WIERZBICKI *et al.*, 2008).

Esses RNAs diretamente relacionados com a metilação do DNA são reconhecidos como mecanismo geral de silenciamento transcricional em plantas. Eles estão envolvidos em vários fenômenos epigenéticos, que incluem o silenciamento de transgene, a supressão de *transposons*, *imprinting* gênico, e paramutação (LAW *et al.*, 2010; ZARATIEGUI *et al.*, 2007; HERR *et al.*, 2005; XIE *et al.*, 2004). Também atuam na regulação gênica, especialmente daqueles genes flanqueados por *transposons* e outras sequências repetitivas (HE *et al.*, 2011).

Enquanto a metilação do DNA pode ser estabelecida e mantida, a desmetilação do DNA também ocorre em plantas e animais. Quando as vias de metilação são inativadas, a metilação do DNA é diluída após a replicação do mesmo, levando à desmetilação passiva do DNA. Em outros casos, entretanto, a metilação do DNA é removida pelas vias de desmetilação ativa do DNA. Desmetilação do DNA ativa ou passiva podem simultaneamente reduzir a metilação do DNA durante alguns estágios específicos do desenvolvimento (ZHANG *et al.*, 2006). No caso de células de mamíferos, a desmetilação do DNA ou a hipometilação do genoma após sua exposição à radiação iônica tem sido frequentemente

reportada (MA *et al.*, 2010; KOVALCHUK e BAULCH, 2008; POGRIBNY *et al.*, 2005; TAWA *et al.*, 1998; KALINICH, CATRAVAS e SNYDER, 1989).

O genoma de plantas superiores compreende muitos elementos transponíveis que potencialmente perturbam a sua estabilidade. Em plantas, metilação do DNA geralmente ocorre nesses elementos transponíveis. Perdas da metilação do DNA em mutantes dos genes responsáveis por ela levam à interrupção do silenciamento transcricional de elementos transponíveis e outras sequências de DNA repetitivas, podendo gerar diferentes fenótipos (HE *et al.*, 2011).

7. CONCLUSÃO

A técnica MSAP foi eficiente para detecção de sítios diferencialmente metilados no material genômico estudado, evidenciando sua divergência epigenética.

Os diferentes padrões de metilação foram encontrados em regiões codificadoras de genes regulatórios do desenvolvimento e amadurecimento dos frutos, além que terem sido encontrados no DNA mitocondrial dos tratamentos, os quais regulam o fornecimento de energia em forma de ATP para as plantas, estando intimamente relacionados com o desenvolvimento das mesmas, justificando os diferentes fenótipos encontrados, tanto nos frutos, quanto no crescimento das plantas que sofreram estresse devido à exposição à radiação gama.

Foram observadas diferenças no conteúdo global de metilação dos DNAs das diferentes seleções de figueiras irradiada com raios-gama, indicando que este fator abiótico foi responsável pelas alterações no epigenoma das plantas, sendo estes dados pioneiros na ficicultura. Como o material utilizado como controle se encontrou também metilado, uma possível desmetilação dos materiais genômicos polimórficos pode ser o responsável pela variação fenotípica entre os tratamentos.

Diante disso, o estudo futuro da expressão gênica entre os tratamentos torna-se uma estratégia de extrema importância para o entendimento dos complexos sistemas regulatórios, levando à identificação de genes de interesse agrônômico para a cultura da figueira, possibilitando a sua manipulação subsequente e propagação de cultivares melhorados para fins comerciais.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKHUND-ZADE, I.M. Radiation mutagenesis in subtropical crops. **Teor. Prikl. Aspekty Radiata Biol. Tekhnol.**, p.50-51, 1981.

ALTSCHUL, S.F.; GISH, W.; MILLER, W.; MYERS, E.W.; LIPMAN, D.J. Basic local alignment search tool. **Journal Molecular Biology**. v. 215, p.403-410, 1990.

ASHIKAWA, I. Surveying CpG methylation at 5-CCGG in the genomes of rice cultivars. **Plant Mol. Biol.** v. 45, p. 31-39, 2001.

ASHWELL, C.M.; ANGEL, R. Nutritional genomics: a practical approach by early life conditioning with dietary phosphorus. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v. 39, p. 268-278, 2010.

ALVERSON, A.J.; WEI, X.X.; RICE, D.W.; STERN, D.B.; BARRY, K.; PALMER, J.D. Insights into the evolution of mitochondrial genome size from complete sequences of *Citrullus lanatus* and *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae). **Mol. Biol. Evol.** v. 27, p.1436–1448, 2010.

BAHL, J.R.; GUPTA, P.K. Chlorophyll mutations in mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). **Theoretical and Applied Genetics**, v. 63, p. 23-26, 1982.

BAJGUAZ, A. Isolation and characterization of brassinosteroids from algal cultures of *Chlorella vulgaris* Beijerinck (Trebouxiophyceae). **J. Plant Physiol**, v. 166, p.1946-1949, 2009.

BARRETO, G.; SCHAFER, J.M.; DIRK, S.; SWAMINATHAN, V.H.; DODERLEIN, G.; MALTRY, N.; WU, W.; LYKO, F.; NIEHRS, C. Gadd45a promotes epigenetic gene activation by repress-mediated DNA demethylation. **Nature**, v. 445, p.671-675, 2007.

BAURENS P.; BONNOT F.; BIENVENU D.; CAUSSE S.; LEGAVRE T. Using SD-AFLP and MSAP to assess CCGG methylation in the banana genome. **Plant. Mol. Biol**, v. 21, p.339–348, 2003.

BEAULIEU, J.; JEAN, M.; BELZILE, F. The allotetraploid *Arabidopsis thaliana*–*Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants. **Mol Genet Genomics**, v. 281, p.421–435, 2009.

BERMÚDEZ-CARABALLOSO, I.; GARCÍA, L.R.; VEITÍA, N.; TORRES, D.; PADRÓN, Y.; ROMERO, C.; ORELLANA, P. Mutant plantains (*Musa* spp.) with height reduction obtained by *in vitro* mutagenesis. **Euphytica**, v.176, p.105-112, 2010.

BERNSTEIN, B.R.; MEISSNER, A.; LANDER, E.S. The mammalian epigenome. **Cell**. v.23, p.69-81, 2007.

BILICHAK, A.; ILNYSTKYY, Y.; HOLLUNDER, J.; KOVALCHUK, I. The progeny of *Arabidopsis thaliana* plants exposed to salt exhibit changes in DNA methylation, histone modifications and gene expression. **PLoS One**, v. 7, p. e30515, 2012.

BIRD, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. **Genes**, n. 16, v. 1, p. 6–21, 2002.

BIRD, A. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, p. 396-398, 2007.

BOCK, C. Analysing and interpreting DNA methylation data. **Nature Reviews**, v.13, p. 705-719, 2012.

BOMBARELY, A.; MERCHANTE, C.; CSUKASI, F.; CRUZ-RUS, E.; CABALLERO, J.L.; MEDINA-ESCOBAR, N.; BLANCO-PORTALES, R.; BOTELLA, M.A.; MUNOZ-BLANCO, J.; SANCHEZ-SEVILLA, J.F.; VALPUESTA, V. Generation and analysis of ESTs from strawberry (*Fragaria 9 ananassa*) fruits and evaluation of their utility in genetic and molecular studies. **BMC Genomics**, v. 11, p.503, 2010.

BORÉM, A. **Melhoramento de Plantas**. Viçosa:UFV, 1997.

BOUWMEESTER, K.; GOVERS, F. *Arabidopsis* L-type lectin receptor kinases: phylogeny, classification, and expression profiles. **Journal of Experimental Botany**, v. 60, p. 4383-4396, 2009.

BOYKO, A.; KOVALCHUK, I. Genome instability and epigenetic modification – heritable responses to environmental stress? **Curr Opin Plant Biol**, v.14, p.1-7, 2011.

BOYKO, A.; KOVALCHUK, I. Transgenerational response to stress in *Arabidopsis thaliana*. **Plant Signaling e Behavior**, v. 5, p.995–998, 2010.

BROCK, R.D. Mutagenesis and crop improvement. In: CARLSON, P. S. **Biology of crop productivity**, New York, Academic Press, p.383-409, 1980.

BROCK, R.D.; FRANKLIN, I.R. The effect of desiccation, storage and radiation intensity on mutation rate in tomato pollen. **Radiation Botany**, v. 6, p. 171-179, 1966.

BUMP, E.A.; YU, N.Y., BROWN, J.M. Radiosensitization of hypoxic tumor cells by depletion of intracellular glutathione. **Science**, v. 217, p. 544-545, 1982.

CHAI, Y.; ZHANG, Q.; TIAN, L.; LI, C.; XING, Y.; QIN, L.; SHEN, Y. Brassinosteroid is involved in strawberry fruit ripening. **Plant Growth Regul**, v.69, p.63–69, 2013.

CHANG, K; HSU, C.; LIU, S.; SU, C.; YEN, C.; LEE, M.; CHEN, K.; HO, T.; HUNG, D.; WU, C.; LU, T.; SU, Y.; CHEN, Y. HUANG, C. Cadmium Induces Apoptosis in Pancreatic β -Cells through a Mitochondria-Dependent Pathway: The Role of Oxidative Stress-Mediated c-Jun N-Terminal Kinase Activation. **PLoS One**, 2013.

CHEN, P. Y.; COKUS, S. J.; PELLEGRINI, M. BS Seeker: precise mapping for bisulfite sequencing. **BMC Bioinformatics** , v.11, p.203, 2010.

CHINNUSAMY, V.; ZHU, J.K. Epigenetic regulation of stress responses in plants. **Curr Opin Plant Biol**, v.12, p. 133-139, 2009.

CLARK, S.J.; HARRISON, J.; MOLLOY, P.L. Sp binding is inhibited by mCpmCpGmethylation. **Gene**, n.195, p. 67-71, 1997.

CLARK, S.J.; HARRISON, J.; PAUL, C.L.; FROMMER, M. High sensitivity mapping of methylated cytosines. **Nucleic Acids Res**, v. 22, n. 15, pg. 2990-2997, 1994.

CLINFTON, S.W.; MINX, P.; FAURON, C.M.; GIBSON, M.; ALLEN, J.O.; SUN, H.; THOMPSON, M.; BARBAZUK, W.B.; KANUGANTI, S.; TAYLOE, C.; MEYER, L.; WILSON, R.K.; NEWTON, K.J. Sequence and comparative analysis of the maize MB mitochondrial genome. **Plant Physiology**, v. 136, n. 3, p. 3486-3503, 2004.

CLOUSE, S.D. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. **Plant Cell**, v. 23, p.1219–1230, 2011.

COARFA, C.; YU, F.; MILLER, C.A.; CHEN, Z.; HARRIS, R.A.; MILOSAVLJEVIC, A. Pash 3.0: a versatile software package for read mapping and integrative analysis of genomic and epigenomic variation using massively parallel DNA sequencing. **BMC Bioinformatics**, v. 11, p.572, 2011.

COIMBRA, J.L.M.; CARVALHO, F.I.F.; OLIVEIRA, A.C. Genetic variability in populations of oat induced by chemical and physical mutagenic agents. **Crop Breeding And Applied Biotechnology**, Viçosa, v.4, p.48-56, 2004.

COKUS, S.J.; FENG, S.; ZHANG, X.; CHEN, Z.; MERRIMAN, B.; HAUDENSCHILD, C.D.; PRADHAN, S.; NELSON, S.F.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S.E. Shotgun bisulphite sequencing of the Arabidopsis genome reveals DNA methylation patterning. **Nature**, v.452, p.215–219, 2008.

CONGER, B.V.; CARABIA, J.V. Modification of the effectiveness of fission neutrons versus 60 CO gamma radiation in barley seeds by oxygen and seed water content. **Radiation Botany**, Great Britain, v. 12, p. 411-420, 1972.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering, **Nucl. Acids Res.**, v. 16, n.22, p. 10881-1089, 1988.

CORRADINI A.P. **Figo da Palestina redefine dada inicial da agricultura**. Colaboração para o Jornal Folha de São Paulo. 2006.

CORREA, L.S.; BOLIANI, A.C. **Cultura da figueira, do plantio à comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP, 1999. p.259.

DIAMOND, M.; MCCABE, P.F. Mitochondrial regulation of plant programmed cell death. **Plant Mitochondria**, pp. 439–465, 2011.

DODGE, E.; RAMSAHOYE, B. H.; WO, Z. G.; OKANO, M.; LI, E. Methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. **Gene**, n.289, p.41–48, 2002.

DONINI, B; MICKE, A. Use of mutations in improvement of vegetatively propagated crops. In: REGIONAL SEMINAR ON THE UTILIZATION OF INDUCED MUTATIONS FOR CROP IMPROVEMENT FOR COUNTRIES IN LATIN AMERICA, 1., LIMA, 1982. **Induced Mutations for crop improvement in Latin America**. Vienna: IAEA, p.79-98, 1984.

EMBRARAD - Empresa Brasileira de Radiação. **Processo de Irradiação (Aplicação: modificação de materiais)**. Disponível em: [http<www.embrarad.com.br>](http://www.embrarad.com.br). Acesso em novembro de 2010.

EWING, B.; GREEN, P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. II. Error probabilities. **Genome Research**, v.8, p. 186-194, 1998.

EWING, B.; HILLIER, L.; WENDL, M.C.; GREEN, P. Based-calling of automated sequencer traces using phred. I. Accuracy assessment. **Genome Research**, v.8, p. 175-185, 1998.

FENG, S. E JACOBSEN, S.E. Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective. **Current Opinion in Plant Biology**, v.14, p.179-186, 2011.

FERNANDEZ, A.F.; ASSENOV, Y.; MARTIN-SUBERO, J.I.; BALINT, B.; SIEBERT, R.; TANIGUCHI, H.; YAMAMOTO, H.; HIDALGO, M.; TAN, A.; GALM, O.; FERRER, I.; SANCHEZ-CESPEDES, M.; VILLANUEVA, A.; CARMONA, J.; SANCHEZ-MUT, J.V.; BERDASCO, M.; MORENO, V.; CAPELLA, G.; MONK, D.; BALLESTAR, E.; ROPER, S.; MARTINEZ, R.; SANCHEZ-CARBAYO, M.; PROSPER, F.; AGIRRE, X.; FRAGA, M.F.; GRAÑA, O.; PEREZ-JURADO, L.; MORA, J.; PUIG, S.; PRAT, J.; BADIMON, L.; PUCA, A.A.; MELTZER, S.J.; LENGAUER, T.; BRIDGEWATER, J.; BOCK, C.; ESTELLER, M. A DNA methylation fingerprint of 1628 human samples. **Genome Res**, v. 22, n. 2, p. 407-19, 2012.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia** (UFLA), v. 35, n.6, p. 1039-1042, 2011.

FERREIRA, E.A.; PASQUAL, M.; TULMANN NETO, A. *In Vitro* sensitivity of fig plantlets to gamma ray. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 66, n.4, 2009.

FERREIRA, M.E.; GRATTAPAGLIA, D. **Introdução ao uso de marcadores moleculares em análise genética**. 3. ed. Brasília:EMBRAPA-CENARGEN, 220p. 1998.

FINNEGAN, E. J.; GINGER R. K.; PEACOCK W. J.; DENNIS E. S. DNA methylation in plants. **Plant Mol. Biol**, v. 49, p. 223–247, 1998.

FOOD AGRICULTURAL ORGANIZATION - FAO/IAEA. **Mutant Varieties databases**. Disponível em: <<http://www.iaea.org/MDV/>>. Acesso em: 17 dez 2009.

FRAGA, M.F., ESTELLER, M. DNA methylation: a profile of methods and applications. **Biotechniques**, v. 33, p. 632-649, 2002.

FACHINELLO, J. C.; PASA, M. S.; SCHMTIZ, J. D.; BETEMPS, D. L. Situação e perspectiva da fruticultura de clima temperado no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, volume especial, p. 109-120, 2011.

FAO. **Crops Production: FAOSTAT, 2010.** Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: 22 dez. 2012.

FAO. **FAOSTAT: production-crops.** Disponível em: <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567#ancor>. Acesso em: 06 jun. 2011.

FASSLER, J.; COOPER, P. **BLAST® Help.** U.S. National Library of Medicine, 2011.

FRAGA, M.F.; BALLESTAR, E.; PAZ, M.F. *et al.* Epigenetic differences arise during the lifetime of monozygotic twins. **Proceedings of the National Academy of Sciences USA**, v.102, p.106-109, 2005.

FRANCISCO, V.L.F.S.; BAPTISTELLA, C.S.L.; FAGUNDES, P.R.S. **A cultura do figo em São Paulo.** Instituto de Economia Agrícola, 2005.

FRITH, M. C., MORI, R.; ASAI, K. A mostly traditional approach improves alignment of bisulfite-converted DNA. **Nucleic Acids Res.** v.40, p.100, 2012.

FROMMER, M.; MCDONALD, L. E.; MILLAR, D. S.; COLLIS, C. M.; WATT, F.; GRIGG, G. W.; MOLLOY, P. L.; PAUL, C. L. A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 89, p. 1827–1831, 1992.

FU, F.Q.; MAO, W.H.; SHI, K.; ZHOU, Y.H.; ASAMI, T.; YU, J.Q. A role of brassinosteroids in early fruit development in cucumber. **J Exp Bot**, v. 59, p.2299–2308, 2008.

FUJIOKA, S.; CHOI, Y.H.; TAKATSUTO, S.; YOKOTA, T.; CHORY, J.; SAKURAI, A. Identification of castasterone, 6-deoxocastasterone, typhasterol and 6- deoxotyphasterol from the shoots of *Arabidopsis thaliana*. **Plant Cell Physiol**, v.37, p.1201-1203, 1996.

FURNER, I.J.; MARJORI, M. Methylation and demethylation of the *Arabidopsis* genome. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 14, p. 1-5, 2010.

GEHRING, M.; BUBB, K.L.; HENIKOFF, S. Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. **Science**, v. 324, p.1447-1451, 2009.

GILCHRIST, E.J.; HAUGHN, G.W. TILLING without a plough: a new method with applications for reverse genetics. **Curr. Opin. Plant Biol**, v. 8, p. 211-215, 2005.

GREWAL, S.I.S.; RICE, J.C. Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, p. 230–238, 2004.

GREWE, F.; EDGER, P.P.; KEREN, I.; SULTAN, L. PIRES, J. C.; OSTERSETZER-BIRAN, O.; MOWER, J.P. Comparative analysis of 11 Brassicales mitochondrial genomes and the mitochondrial transcriptome of *Brassica oleracea*. **Mitochondrion**, v. 14, p. 82-88, 2014.

GUDKOV, I.N.; GRODZINSKY, D.M. Cell radiosensitivity variation in synchronously-dividing root meristems of *Pisum sativum* L. and *Zea mays* L. during the mitotic cycle. **Internacional Journal of Radiation Biology**, v. 41, p.401-409, 1982.

GUERRERO-PRESTON, R.; GOLDMAN, L.R.; BREBI-MIEVILLE, P.; ILI-GANGAS, C.; LEBRON, C.; WITTER, F.R.; APELBERG, B.J.; HERMÁNDEZ-ROYSTACHER, M.; JAFFE, A.; HALDEN, R.U. Global DNA hypomethylation is associated with in utero exposure to cotinine and perfluorinated alkyl compounds. **Epigenetics**, v. 5, p. 539-546, 2010

HAINES, T. R.; RODENHISER, D. I.; AINSWORTH, P. J. "Allele-Specific Non-CpG Methylation of the Nf1 Gene during Early Mouse Development". **Developmental Biology**, n.240, p.585–598, 2001.

HANDA, H. The complete nucleotide sequence of RNA editing content of the mitochondrial genome of rapessed (*Brassica napus* L.): comparative analysis of the mitochondrial genomes of rapessed and *Arabidopsis thaliana*. **Nucleic Acids Research**, v. 31, p. 5907-5916, 2003.

HARRIS, E. Y.; PONTS, N.; LE ROCH, K. G.; LONARDI, S. BRAT-BW: efficient and accurate mapping of bisulfite-treated reads. **Bioinformatics**, v. 28, p.1795–1796, 2012.

HARRIS, E. Y.; PONTS, N.; LEVCHUK, A.; ROCH, K. L.; LONARDI, S. BRAT: bisulfite-treated reads analysis tool. **Bioinformatics**, v. 26, p.572–573, 2010.

HAUBEN, M.; HAESSENDONCKX, B.; STANDAERT, E.; VAN DER KELEN, K.; AZMI, A.; AKPO, H.; VAN BREUSEGEM, F.; GUISEZ, Y.; BOTS, M.; LAMBERT, B.; LAGA, B.; DE BLOCK, M. Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through artificial selection to increase yield. **Proc Natl Acad Sci**, v.106, p. 20109–20114, 2009.

HAUSER, M.T.; AUFSATZ, W.; JONAK, C.; LUSCHNIG, C. Transgenerational epigenetic inheritance in plants. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v.1809, p.459–468, 2011.

HAYATSU, H. Discovery of bisulfite-mediated cytosine conversion to uracil, the key reaction for DNA methylation analysis — A personal account. **Proc. Jpn. Acad. Ser. B. Phys. Biol. Sci.**, v. 84, n. 8, p. 321-330, 2008.

HE, X.; CHEN, T.; ZHU, J. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. **Cell Research**, v. 21, n. 3, 2011.

HENDERSON IR, JACOBSEN SE. Tandem repeats upstream of the Arabidopsis endogene SDC recruit non-CG DNA methylation and initiate siRNA spreading. **Genes**, v. 22, p. 1597-1606, 2008.

HENG, S.; WEI, C.; JING, B.; WAN, Z.; WEN, J.; YI, B.; MA, C.; TU, J.; FU, T.; SHEN, J. Comparative analysis of mitochondrial genomes between the hau cytoplasmic male sterility (CMS) line and its iso-nuclear maintainer line in Brassica juncea to reveal the origin of the CMS-associated gene orf288. **BMC Genomics**, v. 15, p. 322, 2014.

HEPBURN, A.G.; BELANGER, F.C.; MATTHEIS, J.R. DNA methylation in plants. **Developmental Genetics**, v.8, p.475-493, 1987.

HERR AJ, JENSEN MB, DALMAY T, BAULCOMBE DC. RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. **Science**; v. 308, p.118-120, 2005.

HSIEH, T.F.; IBARRA, C.A.; SILVA, P.; ZEMACH, A.; ESHED-WILLIAMS, L.; FISCHER, R.L.; ZILBERMAN, D. Genome-wide demethylation of Arabidopsis endosperm. **Science**, v. 324, p.1451-1454, 2009.

HUANG, Z.; ZHANG, W.; FANG, H.; ZHENG, M.; WANG, X.; XU, J.; CHENG, H.; GONG, G.; WANG, W.; DIRKSEN, R.T.; SHEU, S.S. Response to “A critical evaluation of cpYFP as a probe for superoxide.” **Free Radic. Biol. Med.** v.51, p.1937–1940, 2011.

HUANG X. CAP3: A DNA Sequence Assembly Program. **Genome Research**. v. 9, p.868-877, 1999.

IBGE. **Censo agropecuário 2009: lavoura permanente e temporária**. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br/estadosat/perfil.php?sigla=rs>>. Acesso em: 6 jun. 2011.

IQBAL, J. e ZAHUR, M.S. Effects of acute gamma irradiation and developmental stages on growth and yield of rice plants. **Radiation Botany**, v.15, p. 231-240, 1975.

JABLONKA, E.; RAZ, G. Transgenerational epigenetic inheritance: prevalence, mechanisms, and implications for the study of heredity and evolution. **The Quarterly Review of Biology**, v. 84, p. 131–176, 2009.

JAIN, S.M. Tissue culture-derived variation in crop improvement. **Euphytica**, v.118, p.153-166, 2001.

JALIGOT E, BEULÉ T, BAURENS FC, BILLOTTE N, RIVAL A. Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the “mantled” variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). **Genome**, v. 47, p. 224-228, 2004.

JANDER, G.; BAERSON, S.R.; HUDAK, J.A.; GONZALEZ, K.A.; GRUYS, K.J.; LAST, R.L. Ethylmethanesulfonate saturation mutagenesis in *Arabidopsis* to determine frequency of herbicide resistance. **Plant Physiol**. v. 131, p.139-146, 2003.

JONES, A.L.; SUNG, S. Mechanisms Underlying Epigenetic Regulation in *Arabidopsis thaliana*. **Inegr Comp Biol**, v.54, n.1, p.:61-67, 2014.

JOYCE, S.M.; CASSELLS, A.C. Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v.20, p.125-137, 2002.

KAEPPLER, S. M.; KAEPPLER, H. F.; RHEE, Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. **Plant Molecular Biology**, v. 43, n. 2-3, p. 179-188, 2000.

KALINICH JF, CATRAVAS GN, SNYDER SL. The effect of gamma radiation on DNA methylation. **Radiat Res**, v.117, p. 185-197, 1989.

KATO M, TAKASHIMA K, KAKUTANI T. Epigenetic control of CACTA transposon mobility in *Arabidopsis thaliana*. **Genetics**, v.168, p. 961-969, 2004.

KERKADZE, I.G. Radiation mutagenesis in subtropical crops. **Radiatsionnyi Mitogenez-I-Ego-Rol-V-Evolutsii-I-Selektsii**, p. 231-254, 1987.

KILLION, D.D.; CONSTANTIN, M.J. Gamma irradiation of corn plants: effects of exposure, exposure rate, and developmental stage on survival, height, and grain yield of two cultivars. **Radiation Botany**, v. 12, p. 159-164, 1972.

KIM, J.E.; LEE, M.H.; CHO, E.J.; KIM, J.H CHUNG, B.Y.; HONG, J. Characterization of Non-CG Genomic Hypomethylation Associated with Gamma- Ray-Induced Suppression of CMT3 Transcription in *Arabidopsis thaliana*. **Radiation Research**, v.180, n.6, p.638-648, 2013.

KIM, J.M.; TO, T.K.; NISHIOKA, T.; SEKI, M. Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. **Plant, Cell e Environment**, v.33, p. 604–611, 2010.

KIM, T.W.; GUAN, S.; SUN, Y.; DENG, Z.; TANG, W.; SHANG, J.X.; BURLINGAME, A.L.; WANG, Z.Y. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. **Nat. Cell Biol.** v.11, p. 1254–1260, 2009.

KIM, Y.; SCHUMAKER, K.S.; ZHU, J.K. EMS mutagenesis of *Arabidopsis*. **Meth. Mol. Biol.** v. 323, p. 101-103. 2006.

KISLEV, M.E.; HARTMANN, A.; YOSEF, O.B. Early domesticated fig in the Jordan Valley. **Science**, v. 312, n.5778, p.1372-1374, 2006

KLOSE, R.J.; BIRD, A.P. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci**, v. 31, n.2, p. 89-97, 2006.

KONZAK, C.F.; MIKAELSEN, K. Selecting parents and handling the M1-M3 generations for the selection of mutants. In: INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. **Manual on mutation breeding**. Vienna, p. 125-138, 1977.

KOVALCHUK O, BAULCH JE. Epigenetic changes and nontargeted radiation effects – Is there a link? **Environ Mol Mutagen**, v. 49, p. 16-25, 2008.

KRESS, C.; THOMASSIN, H.; GRANGE, T. Local DNA demethylation in vertebrates: How could it be performed and targeted? **FEBS Letters**. vol. 494, p.135–140, 2001.

KRUEGER, F.; ANDREWS, S. R. Bismark: a flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. **Bioinformatics**, v. 27, p.1571–1572, 2011.

KUBO, T.; NEWTON, K.J. Angiosperm mitochondrial genomes and mutations. **Mitochondrion**, v. 8, p.5–14, 2008.

KUBO, T.; NISHIZAWA, S.; SUGAWARA, A.; ITCHODA, N.; ESTIATI, A.; MIKAMI, T. The complete nucleotide sequence of the mitochondrial genome of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) reveals a novel gene for tRNA (Cus) (GCA). **Nucleic Acids Research**, v. 28, p. 2571-2576, 2000.

KUBOTA, T., MIYAKE, K., HIRASAWA, T. **Epigenetic Modifications: Genetic Basis of Environmental Stress Response**. In: Fundamental Aspects of DNA Replication, (Ed.), p. 259-263, 2011.

KUMAKI, Y.; ODA, M.; OKANO, M. QUMA: quantification tool for methylation analysis. **Nucleic Acids Res**, v. 36, p.170–175, 2008.

KUMAR, G. Modification of radiation induced genetic damage and impaired DNA synthesis by thiourea treatment in *Solanum incanum* L. **Cytologia**, v. 56, p. 117-123, 1991.

LAIRD, P.W. Principles and challenges of genome-wide DNA methylation analysis. **Nature Review Genetics**, v.11, p.191-203, 2010.

LAPINS, K.O. Mutation breeding. In: MOORE, J.N.; JANICK, J. (Eds.). **Methods in fruit breeding**. West Lafayette: Purdue Press, p. 74-99, 1983.

LAW JA, JACOBSEN SE. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. **Nature Rev Genet**; v. 11, p. 204-220, 2010.

LI, L.C.; DAHIYA, R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. **Bioinformatics**. v.18, n.11, p.1427-31, 2002.

LI, R.; LI Y.; KRISTIANSEN K.; WANG J. SOAP: short oligonucleotide alignment program. **Bioinformatics**.v.24, n.5, p.713, 2008.

LI, X.; XU, M.; KORBAN, S. S. DNA methylation profiles differ between field- and in vitro-grown leaves of apple. **J. Plant Physiol**. v.159, p.1229-1234, 2002.

LIPPMAN, Z.; MARTIENSSEN, R.A. The role of RNA interference in heterochromatic silencing. **Nature**, v. 431, p.364–370, 2004.

LISCH, D. Epigenetic regulation of transposable elements in plants. **Annu Rev Plant Bio**, v.60, p. 43-66, 2009.

LISSO, J.; ALTMANN, T.; MUSSIG, C. Metabolic changes in fruits of the tomato dx mutant. **Phytochemistry**, v.67, p.2232–2238, 2006.

LISTER R, O'MALLEY RC, TONTI-FILIPPINI J, *et al.* Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in Arabidopsis. **Cell**; v. 133, p. 523-536, 2008.

LODHI, M. A.; YE, G.; WEEDEN, N.F.; REISCH, B.I. A simple and efficient method for DNA extraction from grapevine cultivars and *Vitis species*. **Plant Molecular Biology Reporter**, Dordrecht, v.12, n.1, p.6-13, 1994.

LUCA, G.C. **Esterilização de Embalagens por Radiação**. Disponível em: [http<engenhariaarquitectura.com.br>](http://engenhariaarquitectura.com.br). Acesso em novembro de 2010.

MA S, LIU X, JIAO B, YANG Y, LIU X. Low-dose radiation-induced responses: Focusing on epigenetic regulation. **Int J Radiat Biol**, v. 86, p. 517-528, 2010.

MACKENZIE, J.L.; SAADÉ, F.E.; LE, Q.H.; BUREAU, T.E.; SCHOEN, D.J. Genomic mutation in lines of *Arabidopsis thaliana* exposed to ultraviolet-B radiation. **Genetics**, v. 171, p. 715-723, 2005.

MAEDA, N.; HAYASHIZAKI, Y. Genome-wide survey of imprinted genes. **Cytogenetic Genome Research**, v.113, p.144-152, 2006.

MAHFOUZ, M.M. RNA-directed DNA methylation: mechanisms and functions. **Plant Signaling e Behavior**, v.5, p. 806–816, 2010.

MALINOWSKI, R.; HIGGINS, R.; LUO, Y.; PIPER, L.; NAZIR, A.; BAJWA, V.S.; CLOUSE, S.D.; THOMPSON, P.R.; STRATMANN, J.W. The tomato brassinosteroid receptor BRI1 increases binding of systemin to tobacco plasma membranes, but is not involved in systemin signaling. **Plant Mol Biol**, v. 70, n.5, p. 603-616, 200.

MALUSZYNSKI, M. Officially released mutant varieties – the FAO/IAEA Database. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, Dordrecht, v.65, p.175-177, 2001.

MAMPUMBU, A. R. **Condensação cromatínica e metilação de DNA investigadas em abelhas *Melipona quadrifasciata* e *Melipona rufiventris* (Hymenoptera, Apoidea)**. 2006 – Tese de Doutorado - UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS/UNICAMP, Campinas – SP, 2006.

MANDAVA, N.B. Plant growth-promoting brassinosteroid. **Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol.** v.39, p.23-52, 1988.

MANNING, K.; TOR, M.; POOLE, M.; HONG, Y.; THOMPSON, A.J.; KING, G.J.; GIOVANNONI, J.J.; SEYMOUR, G.B. A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. **Nat Genet**, v.38, p.948–952, 2006.

MARTIN A, TROADEC C, BOUALEM A, RAJAB M, FERNANDEZ R, MORIN H, PITRAT M, DOGIMONT C, BENDAHDANE A. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. **Nature**, v. 46, p. 1135-1138, 2009.

MARTIN, A.; TROADEC, C.; BOUALEM, A.; RAJAB, M.; FERNANDEZ, R.; MORIN, H.; PITRAT, M.; DOGIMONT, C.; BENDAHDANE, A. A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. **Nature**, v.461, p.1135–1138, 2009.

MASON, G.; NORIS, E.; LANTERI, S.; ACQUADRO, A.; ACCOTTO, G.P.; POTIS, E. Polymorphism (MSAP) in Identifying Genes Involved in Tomato Response to Tomato Yellow Leaf Curl Sardinia Virus. **Plant Mol Biol**. v. 26, p. 156–173, 2008.

MATTHES, M.; SINGH, R.; CHEAH, S.C.; KARP, A. Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerates revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. **Theoretical and Applied Genetics**, v. 102, p. 971–979, 2001.

MCCLELLAND, M.; NELSON, M.; RASCHKE, E. Effect of sitespecific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases, **Nucleic Acids Res.** v. 22, p. 3640–3659, 1994.

MEDEIROS, A.R.M. **Figueira (*Ficus carica* L.) do plantio ao processamento caseiro**. Pelotas: Embrapa, 2002. 16p. (Circular técnica, 35).

MENDA, N.; SEMEL, Y.; PELED, D.; ESHED, Y.; ZAMIR, D. *In silico* screening of a saturated mutation library of tomato. **Plant J**, v.38, p.861-872, 2004.

MICKE, A., DONINI, B. **Plant Breeding**: Principles and prospects. London: Chapman e Hall. Cap.4: Induced mutations: p. 152-162, 1993.

MICKE, A; DONINI, B.; MALUSZYNSKI, M. **Induced mutations for crop improvement**. Viena: International Atomic Energy Agency, p. 41, 1990.

MOSHER, R.A. Maternal control of Pol IV-dependent siRNAs in Arabidopsis endosperm. **New Phytol**, v. 186, p.358-364, 2010.

MOSHER, R.A.; MELNYK, C.W.; KELLY, K.A.; DUNN, R.M.; STUDHOLME, D.J.; BAULCOMBE, D.C. Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of Arabidopsis. **Nature**, v.460, p.283-286, 2009.

MOWER, J.P.; SLOAN, D.B.; ALVERSON, A.J. Plant mitochondrial genome diversity: the genomics revolution. In: JONATHAN, F.W.; JOHANN, G.; JAROSLAV, D.; ILIA, J.L. **Plant Genome Diversity**, v. p. 123–144, 2012.

NEMHAUSER, J.L.; MOCKLER, T.C.; CHOR, J. Interdependency of brassinosteroid and auxin signalin in Arabdopsis. **PLoS Biol**, v. 2, p.258-268, 2004.

NOTSU, Y.; MASOOD, S.; NISHIKAWA, T.; KUBO, N.; AKIDUKI, G.; NAKAZONO, M.; HIRAI, A.; KADOWAKI, K. The complete sequence of the rice (*Oryza sativa* L.) mitochondrial genome: frequent DNA sequence acquisition and loss during the evolution of flowering plants. **Mol Genet Genomics**, v. 268, p. 434–445, 2002.

OGIHARA, Y.; YAMAZAKI, Y.; MURAI, K.; KANNO, A.; TERACHI, T.; SHIINA, T.; MIYASHITA, N.; NASUDA, S.; NAKAMURA, C.; MORI, N.; TAKUMI, S.; MURATA, M.; FUTO, S.; TSUNEWAKI, K. Structural dynamics of cereal mitochondrial genomes as revealed by complete nucleotide sequencing of the wheat mitochondrial genome. **Nucleic Acids Res**, v. 33, p. 6235-6250, 2005.

OHRI, D.; KHOSHOO, T.N. Nuclear DNA contents in the genus *Ficus* (Moraceae). **Plant Systematics and Evolution**, v.156, p.1–4, 1987.

OKAMOTO H, HIROCHIKA H. Silencing of transposable elements in plants. **Trends Plant Sci**, v.6, p. 527-534, 2001.

OTTO, C.; STADLER, P. F.; HOFFMANN, S. Fast and sensitive mapping of bisulfite-treated sequencing data. **Bioinformatics**, v. 28, p.1698–1704, 2012.

PECINKA, A.; DINH, H.Q.; BAUBEC, T.; ROSA, M.; LETTNER, N.; MITTELSTEN SCHEID, O. Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in Arabidopsis. **The Plant Cell**, v.22, p. 3118–3129, 2010.

PEDERSEN, B.; HSIEH, T. F.; IBARRA, C.; FISCHER, R. L. MethylCoder: software pipeline for bisulfite-treated sequences. **Bioinformatics**, v. 27, p.2435–2436, 2011.

PELLNY, T.K.; VAN AKEN, O.; DUTILLEUL, C.; WOLFF, T.; GROTEN, K.; BOR, M.; DE PAEPE, R.; REYSS, A.; VAN BREUSEGEM, F.; NOCTOR, G.; FOYER, C.H. Mitochondrial respiratory pathways modulate nitrate sensing and nitrogen-dependent regulation of plant architecture in *Nicotiana sylvestris*. **Plant J**, v. 54, p. 976-992, 2008.

PERAZA-ECHEVERRIA S, HERREEA-VALENCIA VA, JAMES-KAY A. Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). **Plant Sci**, v. 161, p.359-367, 2001.

PEREIRA, F.M.; NACHTIGAL, J.C. Botânica, biologia e cultivares de figueira. In: CORRÊA, L. de S.; BOLIANI, A.C. **Cultura da figueira do plantio a comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP. p. 25-36, 1999.

PHILLIPS, R.L.; KAEPLER, S.M.; PESCHKE, V.M. Do we understand somaclonal variation? In: **VII International Congress on Plant Tissue Cell Culture Proceedings**. Kluwer, Dordrecht, p. 131-141, 1990.

PIMENTEL, M.C.G. **Indução de aberrações cromosômicas estruturais em milho (*Zea mays* L.) por radiação gama**. Viçosa, 1990. 86p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - UFV, 1990.

PLEWA, M.J.; DOWD, P.A.; SCHY, W.E.; WAGNER, E.D. Induced forward mutation at the *yg2* locus and a comparison with the ABCW relationship. **Maize Genetics Cooperation Newsletter**, Columbia, v. 57, p. 147-149, 1983.

POGRIBNY I, KOTURBASH I, TRYNDYAK V, HUDSON D, STEVENSON SM, SEDELNIKOVA O, *et al.* Fractionated low-dose radiation exposure leads to accumulation of DNA damage and profound alterations in DNA and histone methylation in the murine thymus. **Mol Cancer Res**, v. 3, p. 553-561, 2005.

PONFERRADA-MARÍN, M.I.; MARTÍNEZ-MACÍAS, M.I.; MORALES-RUIZ, T.; ROLDÁN-ARJONA, T.; ARIZA, R.R. Methylation-independent DNA binding modulates specificity of Repressor of Silencing 1 (ROS1) and facilitates demethylation in long substrates. **J Biol Chem**. v.285, n.30, p. 23032–23039, 2010.

PORTIS, E.; ACQUADRO, A.; COMINO, C.; LANTERI, S. Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). **Plant Sci**, v. 166, p. 169-178, 2004.

QUEMADA, H.; ROTH, E.J.; LARK, K.G. Changes in methylation of tissue cultured soybean cells detected by digestion with the restriction enzymes *Hpa* II and *Msp* I. **Plant Cell Reports**, v. 6, p.63-66, 1987.

RANGWALA SH, RICHARDS EJ. Differential epigenetic regulation within an Arabidopsis retroposon family. **Genetics**, v. 176, p. 151-160, 2007.

RESENDE, J.C.F. **Melhoramento da bananeira (*Musa* spp.) utilizando indução de mutação com raios gama e variação somaclonal para a redução da altura de plantas.** (2005). 155p. Tese (Doutorado) - Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2005

REYNA-LOPEZ, G.E.; SIMPSON, J.; RUIZ-HERRERA, J. Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphism. **Mol. Gen. Genet.** v. 253, p. 703-710, 1997.

RICE, D.W.; SAW, J.J.; YU, Q.Q.; FENG, Y.Y.; WANG, W.L.; WANG, L.L.; ALAM, M.M.; PALMER, J.D. The chloroplast and mitochondrial genomes of papaya. **Genome Res.**, 2008.

RICHARDSON, A.O.; RICE, D.W.; YOUNG, G.J.; ALVERSON, A.J.; PALMER, J.D. The “fossilized” mitochondrial genome of *Liriodendron tulipifera*: Ancestral gene content and order, ancestral editing sites, and extraordinarily low mutation rate. **BMC Biol**, v. 11, p. 29, 2013.

RIVAROLA, M.; FOSTER, J.T.; CHAN, A.P.; WILLIAMS, A.L.; RICE, D.W.; LIU, X.Y.; MELAKE-BERHAN, A.; CREASY, H.H.; PUIU, D.; ROSOVITZ, M.J.; KHOURI, H.M.; BECKSTROM-STERMBERG, S.M.; ALLAN, G.J.; KEIM, P.; RAVEL, J.; RABINOWICZ, P.D. Castor bean organelle genome sequencing and worldwide genetic diversity analysis. **PLoS One**, v. 6, e21743, 2011.

RODIRGUES, M.G.F.; CORRÊA, L.S.; SANTOS, P.C.; TULMANN NETO, A. Seleção de Clones de Figueira cv. Roxo-de-Valinhos Formados por Gemas Irradiadas. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 604-611, 2012a.

RODRIGUES, M.G.F.; MARTINS, A.B.G.; DESIDERIO, J.A.; BERTONI, B.W.; ALVES, M.C. Genetic Characterization Of Fig Tree Mutants By Molecular Markers. **Genetics and Molecular Research**, v.11, n.3, p. 1990-1996, 2012b.

RODRIGUES, M.G.F.; CORREA, L.S.; BOLIANI, A.C. Caracterização de mutantes da cv. Roxo-de-Valinhos e comportamento de cultivares de figueiras. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 31, n.3, 2009.

RODRÍGUEZ-MORENO, L.; GONZÁLEZ, V.M.; BENJAK, A.; MARTÍ, M.C.; PUIGDOMÈNECH, P.; ARANDA, M.A.; GARCIA-MAS, J. Determination of the melon chloroplast and mitochondrial genome sequences reveals that the largest reported mitochondrial genome in plants contains a significant amount of DNA having a nuclear origin. **BMC Genomics**; v. 12, p. 424, 2011.

RUIZ-GARCIA, L.; CERVERA, M.T.; MARTINEZ-ZAPATER, J.M. DNA methylation increases throughout Arabidopsis development. **Planta**, v.222, p.301–306, 2005

SAMBROOK, J.; MANIATIS, T.; FRITSH, E.F. **Molecular cloning: a laboratory manual**. 2.ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989.

SANDHU, A.P.S.; ABDELNOOR, R.V.; MACKENZIE, S.A. Transgenic induction of mitochondrial rearrangements for cytoplasmic male sterility in crop plants. **Proc Natl Acad Sci**, v.104, p.1766–1770, 2007.

SANGUINETTI, C.J.; DIAS-NETO, E.; SIMPSON, A.J.G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. **Biotechniques**, v.17, p.915-919, 1994.

SANTOS AP, FERREIRA L, MAROCO J, OLIVEIRA MM: Abiotic Stress and Induced DNA Hypomethylation for Rice rDNA Loci. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 132, n. 4, p. 297-303, 2011.

SANTOS, M.V.F.D.L. **Resposta à radiação gama em sementes de milho (*Zea mays* L.) sob a influência de agentes físicos e químicos**. Viçosa, (1993). 131p. Dissertação (Mestrado em Genética e Melhoramento) - UFV, 1993.

SANTOS, P. C.; CORREA, L. S.; TULMANN NETO, A.; BOLIANI, A. C. Sensitividade de estacas de figo a radiação gama. **Revista Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, v.20, n.3, p.150, 1997.

SASAKI, T.; BURR, B. International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. **Curr. Opin. Plant Biol**, v.3, p.138–141, 2000.

SAZE H, KAKUTANI T. Heritable epigenetic mutation of a transposonflanked Arabidopsis gene due to lack of the chromatin-remodeling factor DDM1. **EMBO J**, v. 26, p. 3641-3652, 2007.

SCHAEFER, M.; POLLEX, T.; HANNA, K.; LYKO, F. RNA cytosine methylation analysis by bisulfite sequencing. **Nucleic Acids Res**, v. 37, n.2, p. e12, 2009.

SHA, A.H.; LIN, X.H.; HUANG, J.B.; ZHANG, D.P. Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. **Mol Genet Genomics**. v. 273, p. 484-90, 2005.

SHERMAN, J. D.; TALBERT, L. E. Vernalization-induced changes in the methylation pattern of winter wheat. **Genome**, v. 45, p. 253-260, 2002.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Plant receptor-like kinase gene family: diversity, function, and signaling. **Sci Signal Transduction Knowledge Environ**, v.113, re 22, 2001a.

SHIU, S.H.; BLEECKER, A.B. Receptor-like kinases from Arabidopsis form a monophyletic gene family related to animal receptor kinases. **Proc Natl Acad Sci**, v. 98, p. 10763–10768, 2001b.

SHIU, S.H.; KARLOWSKI, W.M.; PAN, R.; TZENG, Y.H.; MAYER, K.F.; LI, W.H. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. **Plant Cell**, v.16, n.5, p.1220-1234, 2004.

SIDDIQUI, B.A.; KHAN, S. **Breeding in Crop Plants: Mutations and *in Vitro* Mutation Breeding**. Viena, 1st ed., 1999.

SMITH, Z.D.; GU, H.; BOCK, C.; GNIRKE, A.; MEISSNER, A. High-throughput bisulfate sequencing in mammalian genomes. **Methods**, v. 48, n. 3, p. 226-232, 2009.

SMITH, A.D.; CHUNG, W., HODGES, E.; KENDALL, J.; HANNON, G.; HICKS, J.; XUAN, Z.; ZHANG, M.Q. Updates to the RMAP short-read mapping software. **Bioinformatics**, v. 25, p.2841–2842, 2009.

SMITH, H.H. Radiation in the production of useful mutations. **The Botanical Review**, v. 24, p. 1-24, 1958.

SLOAN, D.B.; ALVERSON, A.J.; CHUCKALOVCAK, J.P.; WU, M.; MCCAULEY, D.E.; PALMER, J.D.; TAYLOR, D.R. Rapid evolution of enormous, multichromosomal genomes in flowering plant mitochondria with exceptionally high mutation rates. **PLoS Biol**, v.10, e1001241, 2012.

SOUZA, O.P.; MELO, B.; MANCIN, C.A. **A Cultura da figueira**. Disponível em: <<http://www.fruticultura.iciag.ufu.br>> . Acesso em: 08 dez. 2007.

SPIEGEL-ROY, P. Economic and agricultural impact of mutation breeding in fruit trees. **Mutation Breeding Review**, v.5, n.1, p. 26p, 1990.

SUGIYAMA, Y.; WATASE, Y.; NAGASE, M.; MAKITA, N.; YAGURA, S. HIRAI, A.; SUGIURA, M. The complete nucleotide sequence and multipartite organization of the tobacco mitochondrial genome: comparative analysis of mitochondrial genomes in higher plants. **Mol Genet Genomics**, v. 272, p. 603–615, 2005.

SUZUKI, M.M.; BIRD, A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. **Nature Reviews Genetics**, v. 9, p. 465–476, 2008.

SWAMINATAN, M.S. The detection of induced mutations. In: FAO/IAEA division of atomic energy in food and agriculture. **Manual on Mutation Breeding**, p.138–141, 1995.

SYMONS, G.M.; DAVIES, C.; SHAVRUKOV, Y.; DRY, I.B.; REID, J.B.; THOMAS, M.R. Grapes on steroids: brassinosteroids are involved in grape berry ripening. **Plant Physiol**, v. 140, p.150–158, 2006.

TANAKA, Y.; TSUDA, M.; YASUMOTO, K.; YAMAGISHI, H.; TERACHI, T. A complete mitochondrial genome sequence of Ogura-type male-sterile cytoplasm and its comparative analysis with that of normal cytoplasm in radish (*Raphanus sativus* L.). **BMC genomics**, v. 13, p. 352, 2012.

TANG, W.; KIM, T.W.; OSES-PRIETO, J.A.; SUN, Y.; DENG, Z.; ZHU, S.; WANG, R.; BURLINGAME, A.L.; WANG, Z.Y. BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in Arabidopsis. **Science**, v. 321, p. 557–560, 2008.

TAWA R, KIMURA Y, KOMURA JI, MIYAMURA Y, KURISHITA A, SASAKI MS, *et al*. Effects of X-ray irradiation on genomic DNA methylation levels in mouse tissues. **J Radiat Res**, v. 39, p. 71–278, 1998.

TULMANN NETO A, ANDO A, MENDES BMJ: **Ampliação da variabilidade genética em algumas frutíferas através da indução de mutações “in vivo” e “in vitro”**. In: Primeiro Simpósio Latino-Americano sobre Recursos Genéticos de Espécies Hortícolas. Campinas: Fundação Cargil; p.148-169, 1990.

TULMANN NETO, A., *et al.* Aspectos sobre o Melhoramento da Figueira (*Ficus carica* L.). In: CORRÊA, L. de S.; BOLIANI, A.C. **Cultura da figueira do plantio a comercialização**. Ilha Solteira: FAPESP. p. 25-36, 1999.

TURNER, B.M. **Chromatin and gene regulation mechanisms in epigenetics**. Oxford: Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company, 284p, 2001.

UNSELD, M.; MARIENFELD, J.R.; BRANDT, P.; BRENNICKE, A. The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. **Nat Genet**, v. 15, p. 57–61, 1997.

UNTERGRASSER A, CUTCUTACHE I, KORESSAAR T, YE J, FAIRCLOTH BC, REMM M, ROZEN SG. Primer3 - new capabilities and interfaces. **Nucleic Acids Research**, v. 40, p.115, 2012.

VARDHINI, B.V.; ANURADHA, S.; RAO, S.S.R. 2006. Brassinosteroids-New class of hormone with potential to improve crop productivity. **Indian J. Plant Physiol**, v.11, p.1-12, 2006.

VIDYA VARDHINI, B.; RAO, S.S. Acceleration of ripening of tomato pericarp discs by brassinosteroids. **Phytochemistry**, v. 61, p.843–847, 2002.

VOS, P.; HOGERS, R.; BLEEKER, M.; REIJANS, M.; LEE, T. van de; HORNES, M.; FRIJTERS, A.; POT, J.; PELEMAN, J.; KUIPER, M.; ZABEAU, M. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. **Nucleic Acids Research**, v.21, p.4407-4414, 1995.

WANG, Y.; CHU, P.; YANG, Q.; CHANG, S.; CHEN, J.; HU, M.; GUAN, R. Complete Mitochondrial Genome of *Eruca sativa* Mill. (Garden Rocket). **PLoS One**, v. 9, n. 8, e105748, 2014.

WANG, H.; FENG, Q.; ZHANG, M.; YANG, C.; SHA, W.; LIU, B. Alteration of DNA methylation level and pattern in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) pure-lines and inter-line F1 hybrids following low-dose laser irradiation. **J Photochem Photobiol B**, v. 99, n.3, p.:150-153, 2010.

WIERZBICKI AT, HAAG JR, PIKAARD CS. Non-coding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. **Cell**, v. 135, p.635-648, 2008.

WU, T. D.; NACU, S. Fast and SNP-tolerant detection of complex variants and splicing in short reads. **Bioinformatics**, v. 26, p.873–881, 2010.

XI, Y.; BOCK, C.; MÜLLER, F.; SUN, D.; MEISSNER, A.; LI, W. RRBSMAP: a fast, accurate and userfriendly alignment tool for reduced representation bisulfite sequencing. **Bioinformatics**, v. 28, p.430–432, 2012.

XI, Y; LI, W. BSMAP: whole genome bisulfite sequence MAPping program. **Bioinformatics**.v. 10, p. 232, 2009.

XIE Z, JOHANSEN L K, GUSTAFSON A M, *et al.* Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. **PLoS Biol**, v 2. 2004.

XIONG, L.Z.; XU, C.G.; SAGHAI-MAROOF, M.A.; ZHANG, Q. Patterns of cytosine methylation in an elite rice hybrid and its parental lines, detected by a methylation-sensitive amplification polymorphism technique. **Mol. Gen. Genet.** v. 261, p. 439-446, 1999.

ZARATIEGUI M, IRVINE DV, MARTIENSSEN RA. Noncoding RNAs and gene silencing. **Cell**, v.128, p.763-776, 2007.

ZHANG, X.; YAZAKI, J.; SUNDARESAN, A.; COKUS, S.; CHAN, S.W.; CHEN, H.; HENDERSON, I.R.; SHINN, P.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S.E.; ECKER, J.R. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. **Cell**; v.126, p.1189-1201, 2006.

ZHANG, X.; YAZAKI, J.; SUNDARESAN, A.; COKUS, S.; CHAN, S.W.; CHEN, H.; HENDERSON, I.R.; SHINN, P.; PELLEGRINI, M.; JACOBSEN, S.E.; ECKER, J.R. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *arabidopsis*. **Cell**. v. 126, p. 1189–1201, 2006.

ZHAO, J.; GAO, Y.; ZHANG, Z.; CHEN, T.; GUO, W.; ZHANG, T. A receptor-like kinase gene (GbRLK) from *Gossypium barbadense* enhances salinity and drought-stress tolerance in *Arabidopsis*. **BMC Plant Biology**, v. 13, p. 110, 2013.

ZHU, J.; KAPOOR, A.; SRIDHAR, V.V.; AGIUS, F.; ZHU, J.K. The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in *Arabidopsis*. **Curr Biol**, v.17, p.54-59, 2007.

ZHU, J.K. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. **Annu Rev Genet**. v.43, p.143-66, 2009.

ZILBERMAN, D.; GEHRING, M.; TRAN, R. K.; BALLINGER, T.; HENIKOFF, S. Genome-wide analysis of *Arabidopsis thaliana* DNA methylation uncovers an interdependence between methylation and transcription. **Nat. Genet**, v.39, p.61-69, 2007.

ZLUVOVA, J., JANOUSEK, B., AND VYSKOT, B. Immunohistochemical study of DNA methylation dynamics during plant development. **J Exp Bot**, v. 52, p. 2265–2273, 2001.

APÊNDICE I – Fotos e características agronômicas dos frutos das seleções de figueiras utilizadas como objeto de estudo do presente trabalho.

FIGURA 22. Tratamento 1 = “Roxo-de-Valinhos” (Controle)

FIGURA 23. Tratamento 2 = Seleção Irradiada 440

FIGURA 24. Tratamento 3 = Seleção Irradiada 433.

FIGURA 25. Tratamento 4 = Seleção Irradiada 189

FIGURA 26. Tratamento 5 = Seleção Irradiada 214.

FIGURA 27. Tratamento 6 = Seleção Irradiada 301.

TABELA 7. Características de produção e qualidade dos frutos em figueiras cv Roxo-de-Valinhos.

<i>Tratamentos</i>	<i>Nº Frutos/ planta</i>	<i>Massa/ fruto</i>	<i>Massa/ Planta</i>	<i>Produtividade t/ha</i>	<i>Comprimento dos frutos</i>	<i>Diâmetro dos frutos</i>	<i>Sólidos Solúveis °Brix</i>	<i>Acidez Titulável %</i>
		g			cm			
1	22,00 b	38,56 b	815,49 bc	2,27 bc	5,30 a	4,17 ab	12,74 a	0,15 a
2	17,00 d	21,75 c	369,36 d	0,99 d	4,43 a	3,33 c	9,50 b	0,13 a
3	18,67 cd	35,67 b	671,23 cd	1,79 cd	5,06 a	4,03 bc	10,84 ab	0,13 a
4	30,00 a	44,24 ab	1342,44 a	3,76 a	4,77 a	4,47 ab	12,48 ab	0,14 a
5	20,33 bc	43,40 ab	884,69 bc	2,36 bc	4,63 a	4,53 ab	11,94 ab	0,13 a
6	23,33 b	43,83 ab	1018,58 b	2,72 ab	4,70 a	4,37 b	12,41 ab	0,14 a
CV (%)	16,43	10,97	16,87	16,86	15,91	4,09	9,27	7,31

Médias nas colunas seguidas de mesma letra na vertical, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância.

APÊNDICE II – Artigo Científico Publicado no Ano de 2013, Referente às Análises
Moleculares da Presente Tese

Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms in mutant figs

M.G.F. Rodrigues¹, A.B.G. Martins², B.W. Bertoni³, A. Figueira⁴ and S. Giuliatti¹

¹Departamento de Genética, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brasil

²Departamento de Produção Vegetal, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Jaboticabal, SP, Brasil

³Departamento de Biotecnologia de Plantas, Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, SP, Brasil

⁴Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, SP, Brasil

Corresponding author: M.G.F. Rodrigues

E-mail: gabrielafontanetti@hotmail.com

Genet. Mol. Res. 12 (3): 2267-2280 (2013)

Received August 21, 2012

Accepted December 14, 2012

Published July 8, 2013

DOI <http://dx.doi.org/10.4238/2013.July.8.8>

ABSTRACT. Fig (*Ficus carica*) breeding programs that use conventional approaches to develop new cultivars are rare, owing to limited genetic variability and the difficulty in obtaining plants via gamete fusion. Cytosine methylation in plants leads to gene repression, thereby affecting transcription without changing the DNA sequence. Previous studies using random amplification of polymorphic DNA and amplified fragment length polymorphism markers revealed no polymorphisms among select fig mutants that originated from gamma-irradiated buds. Therefore, we conducted methylation-sensitive amplified polymorphism analysis to verify the existence of variability due to epigenetic DNA methylation among these mutant selections compared to the main cultivar ‘Roxo-de-Valinhos’. Samples of

genomic DNA were double-digested with either *HpaII* (methylation sensitive) or *MspI* (methylation insensitive) and with *EcoRI*. Fourteen primer combinations were tested, and on an average, non-methylated CCGG, symmetrically methylated CmCGG, and hemimethylated hmCCGG sites accounted for 87.9, 10.1, and 2.0%, respectively. MSAP analysis was effective in detecting differentially methylated sites in the genomic DNA of fig mutants, and methylation may be responsible for the phenotypic variation between treatments. Further analyses such as polymorphic DNA sequencing are necessary to validate these differences, standardize the regions of methylation, and analyze reads using bioinformatic tools.

Key words: DNA methylation; Molecular marker; Mutation analysis; Plant breeding; Epigenetic inheritance

INTRODUCTION

Brazil is the major producer of figs (*Ficus carica*) in South America, and three States are noteworthy for their fig production: Rio Grande do Sul for fig production for industrial purposes, São Paulo for *in natura* fig production, and Minas Gerais for fig production for both industrial and *in natura* purposes. Fig tree cultivation in Brazil is based exclusively on a single cultivar, 'Roxo-de-Valinhos', which is characterized by high vigor and productivity (Pereira and Nachtigal, 1999).

Fig tree improvement programs that use conventional procedures to obtain new cultivars are rare in many countries, especially owing to 1) the low genetic variability associated with fig trees and 2) the difficulty in obtaining plants via gamete fusion, as the wasp *Blastophaga psenes*, which is responsible for the natural pollination of fig trees, is not found in Brazil because of the weather conditions (Ferreira et al., 2009).

Epigenetic variation describes molecular events responsible for the modulation of gene expression without changes in DNA sequences (Bird, 2007). These variations may be induced in response to stimuli and may persist after the removal of a stimulus, being inherited via vegetative propagation without permanent changes in the genotype (Borém, 1997). The main known cause of epigenetic change is methylation, which is the addition of methyl groups to cytosine bases in DNA located before and near guanine bases (Haines et al., 2001; Dodge et al., 2002). According to Bernstein et al. (2007), this type of epigenetic variation has been associated with the regulation of gene expression, genome defense, cellular differentiation, chromatin inactivation, and genomic imprinting.

The methylation-sensitive amplified polymorphism (MSAP)-polymerase chain reaction (methylation-sensitive arbitrarily primed polymerase chain reaction) technique developed by Reyna-López et al. (1997) is an adaptation of amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis and has proven to be a powerful tool for analyzing DNA methylation. The MSAP technique has been applied to study CpG methylation in the genomes of rice (Ashikawa, 2001) and banana (Baurens et al., 2003); to characterize methylation changes associated with micropropagated banana (Peraza-Echeverria et al., 2001) and apple (Li et al., 2002); to analyze the somaclonal variation of palm oil (Matthes et al., 2001); to analyze wheat vernal-

ization (Sherman and Talbert, 2002); to analyze the degree of cytosine methylation during the germination of sweet pepper seeds (Portis et al., 2004); to investigate the resistance of rice to bacterial blight (Sha et al., 2005); to investigate genes differentially methylated in tomato after tomato yellow leaf curl Sardinia virus infection (Mason et al., 2008); and to examine various stages of development in *Arabidopsis thaliana* (Ruiz-Garcia et al., 2005) and among *A. lyrata* and its parent species (Beaulieu et al., 2009).

Joyce and Cassells (2002) determined the cytosine methylation status of DNA in *in vitro*-developed microplants with various leaf morphologies by using AFLP marker analysis with methylation-sensitive restriction enzymes to test the hypothesis that DNA methylation could be used to characterize differences between treatments. While attempting to improve fig trees, Rodrigues et al. (2012a) used cuttings of the cultivar 'Roxo-de-Valinhos' irradiated with gamma rays at a dose of 30 Gy to show that plants could be selected based on unique morphological characteristics that differed from those of controls. The selected characteristics included elongated fruit shape; elongated peduncle, which facilitates harvesting and increases the shelf life of fruits; large fruit size; and large fruit with a closed ostiole, which reduces the incidence of agricultural pest infestation and prevents fruit depreciation.

However, polymorphisms in these irradiated selections were not identified in fig samples evaluated using random amplification of polymorphic DNA and AFLP analyses, that is, genetic modification was absent, suggesting that epigenetic changes caused by gamma irradiation occurred between treatments (Rodrigues et al., 2012b). Given these findings, the aim of this study was to verify the existence of variability related to epigenetic DNA methylation of mutant fig selections by comparing them with the primary commercial cultivar 'Roxo-de-Valinhos' using MSAP analysis.

MATERIAL AND METHODS

The experiment was conducted at Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (São Paulo, Brazil) in partnership with Universidade de Ribeirão Preto using the leaves of 5 fig selections. The specimens consisted of cuttings irradiated with gamma rays at the Energy Nuclear Center in Agriculture (Piracicaba, Brazil). Five irradiated plants considered to be mutants were used (Rodrigues et al., 2012a); these selections were compared to one another and to the cultivar 'Roxo-de-Valinhos', which served as a control.

Young leaves without spots or perforations were collected and washed under running water, and their veins were removed. The extraction of total genomic DNA from plant tissues was performed according to a modified cetyltrimethylammonium bromide technique.

To detect MSAP, we performed two digestions simultaneously for each sample of genomic DNA. In the 1st reaction, 250 ng genomic DNA was digested using the One-Phor-All Buffer (Amersham Pharmacia Biotech) containing 5 U *EcoRI* restriction enzyme (New England Biolabs®, Inc.) and 5 U *MspI*, a methylation-insensitive restriction enzyme (New England Biolabs®, Inc.), in a final volume of 20 µL. The 2nd digestion was conducted using the methylation-sensitive restriction enzyme *HpaII* (New England Biolabs®, Inc.) instead of the *MspI* isoschizomer. The DNA fragments were digested and ligated to *EcoRI* (5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'/3'-CATCTGACGCATGGTTAA-5') and *HpaII/MspI* adapters (5'-GATCATGAGTCCTGCT-3'/3'-AGTACTCAGGACGAGC-5') using T4 DNA ligase (New England Biolabs®, Inc.). The binding reaction was performed at 23°C for 3 h.

After pre-amplification using the pre-selective primers E+1 (5'-GACTGCGTACCAATTC+A-3') and HM+1 (5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG+C-3'), the primers E+3 (5'-GACTGCGTACCAATTC+ANN-3') and HM+3 (5'-ATCATGAGTCCTGCTCGG+CNN-3'), where NN can be AC, AG, CA, CT, CC, CG, GC, or GG, were used for selective amplification following the protocols of Reyna-López et al. (1997). The selective amplification reactions were performed in a thermocycler with the following program: 12 cycles of 94°C for 30 s, 65°C for 30 s, and 72°C for 1 min; 22 cycles of 94°C for 30 s, 56°C for 30 s, and 72°C for 1 min; and a final extension at 72°C for 2 min. The 14 primer combinations used are shown in Table 1.

Table 1. Combinations of primers used for MSAP analysis.

Combination	Primer <i>EcoRI</i> + A	Primer HM + C	Combination	Primer <i>EcoRI</i> + A	Primer HM + C
1	E + AG	HM + CAT	8	E + ATT	HM + CG
2	E + AT	HM + CAG	9	E + AGT	HM + CAT
3	E + AGT	HM + CTC	10	E + AGT	HM + CTA
4	E + AG	HM + CTA	11	E + AC	HM + CAG
5	E + AA	HM + CGT	12	E + AT	HM + CTA
6	E + ATC	HM + CAG	13	E + AG	HM + CTT
7	E + AC	HM + CTT	14	E + AA	HM + CG

The selective amplification products were separated on 6% polyacrylamide gels, and the bands were visualized with silver nitrate. Visualization of the samples after electrophoresis was performed with visual reading followed by photo-documentation of the plates.

In the plate analysis, methylation of the internal cytosine (CmCCGG 5'-3') was indicated when bands present in the *EcoRI* + *MspI* reaction were absent in the *EcoRI* + *EcoRII* reaction (Figures 1-3, black arrows). When bands present in the *EcoRI* + *HpaII* reaction were absent in the *EcoRI* + *MspI* reaction (see Figures 1-3, red arrows), the external cytosine of the DNA chain was methylated (5'-mCCGG-3'), which was considered hemimethylation (McClelland et al., 1994).

RESULTS

In the present study, MSAP analyses were performed to investigate the existence of regions with methylation patterns that differed between polymorphisms in mutant fig plants, thus characterizing their epigenetic distinction. Profiles of DNA amplified through MSAP analysis using 14 primer combinations were generated from the genomic DNA of selected fig mutants, which were originally derived from cuttings of the 'Roxo-de-Valinhos' cultivar after their buds were irradiated with gamma rays.

A total of 553 amplified fragments were obtained, 56 of which displayed different methylation patterns between treatments. Of the 14 pairs of primers tested, 100% exhibited polymorphic bands after digestion with the 2 enzymes tested, demonstrating that differential methylation occurred in the genomic material tested as shown in Figures 1-7. Unmethylated CCGG (bands common to both enzymes), symmetrically methylated CmCCGG (bands present in DNA digested with *MspI* but not with *HpaII*), and hemimethylated hmCCGG (bands present in DNA digested with *HpaII* but not with *MspI*) comprised 88, 10, and 2% of the total amplification products, respectively.

Figure 1. Amplification products using primer combinations 1 and 2 for fig mutants (*Ficus carica* L.) irradiated with gamma rays and the control ‘Roxo-de-Valinhos’ on 6% polyacrylamide gels. Numbers 1-6 refer to the following genotypes: lane 1 = ‘Roxo-de-Valinhos’; lane 2 = PI 440; lane 3 = PI 433; lane 4 = PI 189; lane 5 = PI 214; lane 6 = PI 301.

Figure 2. Amplification products using primer combinations 3 and 4 for fig mutants (*Ficus carica* L.) irradiated with gamma rays and the control ‘Roxo-de-Valinhos’ on 6% polyacrylamide gels. Numbers 1-6 refer to the following genotypes: lane 1 = ‘Roxo-de-Valinhos’; lane 2 = PI 440; lane 3 = PI 433; lane 4 = PI 189; lane 5 = PI 214; lane 6 = PI 301.

Figure 3. Amplification products using primer combinations 5 and 6 for fig mutants (*Ficus carica* L.) irradiated with gamma rays and the control ‘Roxo-de-Valinhos’ on 6% polyacrylamide gels. Numbers 1-6 refer to the following genotypes: lane 1 = ‘Roxo-de-Valinhos’; lane 2 = PI 440; lane 3 = PI 433; lane 4 = PI 189; lane 5 = PI 214; lane 6 = PI 301.

Genetics and Molecular Research 12 (3): 2267-2280 (2013)

©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

Figure 4. Amplification products using primer combinations 7 and 8 for fig mutants (*Ficus carica* L.) irradiated with gamma rays and the control ‘Roxo-de-Valinhos’ on 6% polyacrylamide gels. Numbers 1-6 refer to the following genotypes: lane 1 = ‘Roxo-de-Valinhos’; lane 2 = PI 440; lane 3 = PI 433; lane 4 = PI 189; lane 5 = PI 214; lane 6 = PI 301.

Genetics and Molecular Research 12 (3): 2267-2280 (2013)

©FUNPEC-RP www.funpecrp.com.br

Figure 5. Amplification products using primer combinations 9 and 10 for fig mutants (*Ficus carica* L.) irradiated with gamma rays and the control ‘Roxo-de-Valinhos’ on 6% polyacrylamide gels. Numbers 1-6 refer to the following genotypes: lane 1 = ‘Roxo-de-Valinhos’; lane 2 = PI 440; lane 3 = PI 433; lane 4 = PI 189; lane 5 = PI 214; lane 6 = PI 301.

Figure 6. Amplification products using primer combinations 11 and 12 for fig mutants (*Ficus carica* L.) irradiated with gamma rays and the control ‘Roxo-de-Valinhos’ on 6% polyacrylamide gels. Numbers 1-6 refer to the following genotypes: lane 1 = ‘Roxo-de-Valinhos’; lane 2 = PI 440; lane 3 = PI 433; lane 4 = PI 189; lane 5 = PI 214; lane 6 = PI 301.

Figure 7. Amplification products using primer combinations 13 and 14 for fig mutants (*Ficus carica* L.) irradiated with gamma rays and the control 'Roxo-de-Valinhos' on 6% polyacrylamide gels. Numbers 1-6 refer to the following genotypes: lane 1 = 'Roxo-de-Valinhos'; lane 2 = PI 440; lane 3 = PI 433; lane 4 = PI 189; lane 5 = PI 214; lane 6 = PI 301.

Similar proportions of symmetrical methylated CCGG sites have been observed using approaches described by Ashikawa (2001) for rice (16.3%), Peraza-Echeverria et al. (2001) for micropropagated banana plants (23%), and Jaligot et al. (2004) for palm specimens. Jaligot et al. (2004) observed symmetrically methylated and hemimethylated sites in 14.7 and 4.1% of palm specimens, respectively.

Regarding the polymorphisms among treatments, a variation in the methylation pattern, which occurred with primer combinations 3, 7, 10, and 11, was observed, as displayed in focus by circles in Figures 2,4,5, and 6. This variation suggests that the individuals studied are epigenetically different from one another, as each treatment resulted in a distinct variety of fig, particularly with regards to treatment 4, which was superior to the 'Roxo-de-Valinhos' cultivar in all phenotypic characteristics evaluated (Rodrigues et al., 2009).

However, 'Roxo-de-Valinhos', which served as a control, was also methylated at all methylation sites using every combination except 10. The presence of the methylated sites in the control and some unmethylated individuals suggests a process of methylation in the genomic material referred to as DNA demethylation. This process is an inverse process to methylation and is reversible.

Accordingly, with combination 7, a single hemimethylated polymorphic band was observed in 2 sites, and these sites may be the positions of methylation associated with the regulation of gene expression in the subjects studied. Clark et al. (1997) showed that, in mammalian cells, the methylation of external cytosine blocked the binding of certain elements with their corresponding sites and inhibited their function. Therefore, these bands of interest should be investigated in further studies.

DISCUSSION

DNA methylation is an important modification that affects gene expression through epigenetic regulation involving phenotypic variation and some important agronomic characteristics (Manning et al., 2006; Hauben et al., 2009; Martin et al., 2009). In plant DNA, cytosine methylation leads to gene repression, altering genetic transcription without changing the DNA sequence; consequently, this phenomenon is one of the mechanisms responsible for phenotypic plasticity (Hepburn et al., 1987; Quemada et al., 1987).

Such gene silencing can occur in two ways: directly, whereby DNA methylation alters the binding sites of transcription factors, and indirectly, whereby binding proteins associate with methylated DNA and recruit co-repressors to establish environmental repression of chromatin (Klose and Bird, 2006).

DNA demethylation can occur both passively via the lack of methylation during several cycles of replication and actively in the absence of replication (Zhu, 2009; Ponferrada- Marín et al., 2010). Active demethylation has emerged as an important mechanism in plant genomes for modulating methylation patterns. Active demethylation may be carried out by either breaking thermodynamically unfavorable carbon-carbon bond links to pyrimidine methyl groups or through a repair process, leading to the replacement of the base m5C with C and change in gene expression (Kress et al., 2001; Bird, 2002).

The methylation of cytosine in DNA is generalized in eukaryotes; however, enormous variation occurs in its abundance and genomic distribution and points to *de novo* methylation and an inversion process of active demethylation of specific sequences (Furner and Matzke,

2011). Protection against *de novo* methylation by proteins or chromatin ensures that DNA methylation never reaches a DNA sequence domain. Unmethylated domains can also exist in an active form and remove DNA modification. Working with nuclear proteins involved in the maintenance of genome stability, Baker et al. (2007) concluded that this nuclear proteins expression is directly linked with the active demethylation of DNA, resulting in the activation of epigenetically silenced genes. Recent studies of methylation in seed development in *Arabidopsis* mutants have reported evidence of loss of methylated CG sites in the endosperm (Gehring et al., 2009; Hsieh et al., 2009). Collectively, these studies suggest that mutation is involved in active demethylation of the maternal genome, giving rise to the endosperm and increasing small interfering RNA production in this tissue (Mosher et al., 2009; Mosher, 2010).

Concluding, the MSAP technique was effective for detecting differentially methylated sites in the genomic material studied, revealing their genetic/epigenetic divergence. Methylation at some sites in the control suggested that the demethylation of genomic polymorphic materials may be responsible for phenotypic variation among different treatments. Bisulfite sequencing should be performed to verify whether these methylation events occur in regulatory genes and therefore to clarify whether methylation and active demethylation are involved in gene regulation.

ACKNOWLEDGMENTS

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo with a Master's scholarship to M.G.F. Rodrigues.

REFERENCES

- Ashikawa I (2001). Surveying CpG methylation at 5'-CCGG in the genomes of rice cultivars. *Plant Mol. Biol.* 45: 31-39.
- Baker DE, Harrison NJ, Maltby E, Smith K, et al. (2007). Adaptation to culture of human embryonic stem cells and oncogenesis *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 25: 207-215.
- Baurens P, Bonnot F, Bienvenu D, Causse S, et al. (2003). Using SD-AFLP and MSAP to assess CCGG methylation in the banana genome. *Plant Mol. Biol.* 21: 339-348.
- Beaulieu J, Jean M and Belzile F (2009). The allotetraploid *Arabidopsis thaliana*-*Arabidopsis lyrata* subsp. *petraea* as an alternative model system for the study of polyploidy in plants. *Mol. Genet. Genomics* 281: 421-435.
- Bernstein BE, Meissner A and Lander ES (2007). The mammalian epigenome. *Cell* 128: 669-681.
- Bird A (2002). DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* 16: 6-21.
- Bird A (2007). Perceptions of epigenetics. *Nature* 447: 396-398.
- Borém A (1997). Melhoramento de Plantas. UFV, Viçosa.
- Clark SJ, Harrison J and Molloy PL (1997). Sp1 binding is inhibited by (m)Cp(m)CpG methylation. *Gene* 195: 67-71.
- Dodge E, Ramsahoye BH, Wo ZG, Okano M, et al. (2002). Methylation of MMLV provirus in embryonic stem cells: CpG versus non-CpG methylation. *Gene* 289: 41-48.
- Ferreira EA, Pasqual M and Tulmann Neto A (2009). *In vitro* sensitivity of fig plantlets to gamma rays. *Sci. Agric. Piracicaba* 66: 540-542.
- Furner IJ and Matzke M (2011). Methylation and demethylation of the *Arabidopsis* genome. *Curr. Opin. Plant Biol.* 14: 137-141.
- Gehring M, Bubb KL and Henikoff S (2009). Extensive demethylation of repetitive elements during seed development underlies gene imprinting. *Science* 324: 1447-1451.
- Haines TR, Rodenhiser DI and Ainsworth PJ (2001). Allele-specific non-CPG methylation of the Nf1 gene during early mouse development. *Dev. Biol.* 240: 585-598.
- Hauben M, Haesendonckx B, Standaert E, Van Der Kelen K, et al. (2009). Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through artificial selection to increase yield. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106: 20109-20114.
- Hepburn AG, Belanger FC and Mattheis JR (1987). DNA methylation in plants. *Dev. Genet.* 8: 475-493.

- Hsieh TF, Ibarra CA, Silva P, Zemach A, et al. (2009). Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science* 324: 1451-1454.
- Jaligot E, Beule T, Baurens FC, Billotte N, et al. (2004). Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the mantled variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq). *Genome* 47: 224-228.
- Joyce SM and Cassells AC (2002). Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. *Plant Cell Tiss. Org.* 70: 125-137.
- Klose RJ and Bird AP (2006). Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. *Trends Biochem. Sci.* 31: 89-97.
- Kress C, Thomassin H and Grange T (2001). Local DNA demethylation in vertebrates: how could it be performed and targeted? *FEBS Lett.* 494: 135-140.
- Li X, Xu M and Korban SS (2002). DNA methylation profiles differ between field- and *in vitro*-grown leaves of apple. *J. Plant Physiol.* 159: 1229-1234.
- Manning K, Tor M, Poole M, Hong Y, et al. (2006). A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat. Genet.* 38: 948-952.
- Martin A, Troadec C, Boualem A, Rajab M, et al. (2009). A transposon-induced epigenetic change leads to sex determination in melon. *Nature* 461: 1135-1138.
- Mason G, Noris E, Lanteri S, Acquadro A, et al. (2008). Polymorphism (MSAP) in identifying genes involved in tomato response to tomato yellow leaf curl sardinia virus. *Plant Mol. Biol. Rep.* 26: 56-173.
- Matthes M, Singh R, Cheah S-C and Karp A (2001). Variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) tissue culture-derived regenerants revealed by AFLPs with methylation-sensitive enzymes. *Theor. Appl. Genet.* 102: 971-979.
- McClelland M, Nelson M and Raschke E (1994). Effect of site-specific modification on restriction endonucleases and DNA modification methyltransferases. *Nucleic Acids Res.* 22: 3640-3659.
- Mosher RA, Melnyk CW, Kelly KA, Dunn RM, et al. (2009). Uniparental expression of PolIV-dependent siRNAs in developing endosperm of *Arabidopsis*. *Nature* 460: 283-286.
- Mosher RA (2010). Maternal control of Pol IV-dependent siRNAs in *Arabidopsis* endosperm. *New Phytol.* 186: 358-364.
- Peraza-Echeverria S, Herrera-Valencia VA and Kay A (2001). Detection of DNA methylation changes in micropropagated banana plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci.* 161: 359-367.
- Pereira FM and Nachtigal JC (1999). Botânica, Biologia e Cultivares de Figueira. In: Cultura da Figueira do Plantio a Comercialização (Corrêa LS and Boliani AC, eds.). 1st edn. FAPESP, Ilha Solteira, 25-36.
- Ponferrada-Marín MI, Martínez-Macias MI, Morales-Ruiz T, Roldan-Arjona T, et al. (2010). Methylation-independent DNA binding modulates specificity of Repressor of Silencing 1 (ROS1) and facilitates demethylation in long substrates. *J. Biol. Chem.* 285: 23032-23039.
- Portis E, Acquadro A, Comino C and Lanteri S (2004). Analysis of DNA methylation during germination of pepper (*Capsicum annuum* L.) seeds using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP). *Plant Sci.* 166: 169-178.
- Quemada H, Roth EJ and Lark KG (1987). Changes in methylation of tissue cultured soybean cells detected by digestion with the restriction enzymes *HpaII* and *MspI*. *Plant Cell Rep.* 6: 63-66.
- Reyna-López GE, Simpson J and Ruiz-Herrera J (1997). Differences in DNA methylation patterns are detectable during the dimorphic transition of fungi by amplification of restriction polymorphisms. *Mol. Gen. Genet.* 253: 703-710.
- Rodrigues MGF, Correa LS and Boliani AC (2009). Caracterização de mutantes da cv. Roxo-de-Valinhos e comportamento de cultivares de figueiras. *Rev. Bras. Fruticult.* 31: 771-777.
- Rodrigues MGF, Correa LS, Tulmann Neto A and Santos PC (2012a). Seleção de clones de figueira cv. Roxo-de-Valinhos formados por gemas irradiadas. *Rev. Bras. Fruticult.* 34: 1-8.
- Rodrigues MG, Martins AB, Desiderio JA, Bertoni BW, et al. (2012b). Genetic characterization of fig tree mutants with molecular markers. *Genet. Mol. Res.* 11: 1990-1996.
- Ruiz-García L, Cervera MT and Martínez-Zapater JM (2005). DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development. *Planta* 222: 301-306.
- Sha AH, Lin XH, Huang JB and Zhang DP (2005). Analysis of DNA methylation related to rice adult plant resistance to bacterial blight based on methylation-sensitive AFLP (MSAP) analysis. *Mol. Genet. Genomics* 273: 484-490.
- Sherman JD and Talbert LE (2002). Vernalization-induced changes of the DNA methylation pattern in winter wheat. *Genome* 45: 253-260.
- Zhu JK (2009). Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* 43: 143-166.

APÊNDICE III – Manuscrito Científico Submetido à Revista *Plant Physiology and Biochemistry*, Referente à Análise de Metilação Global da Presente Tese.

Submissions Being Processed for Author Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues, Ph.D.

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links	PLAPHY-D-14-00937	DNA global methylation analysis of irradiated fig selections	Dec 22, 2014	Dec 23, 2014	Under Review

Page: 1 of 1 (1 total submissions) Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

DNA GLOBAL METHYLATION ANALYSIS OF IRRADIATED FIG SELECTIONS

Maria Gabriela Fontanetti Rodrigues^{1*}, Murilo Racy Soares¹, Ester Silveira Ramos¹, Silvana Giuliatti¹

E- mail: gabrielafontanetti@usp.br; murilors@usp.br; esramos@fmrp.usp.br;
silvana@fmrp.usp.br

¹ University of Sao Paulo Medical School - University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP,
Brazil

*Corresponding author: gabrielafontanetti@usp.br

Abstract

The fig tree (*Ficus carica* L.) is a fruit of great importance worldwide, ranking among the top twenty fruits exported by Brazil. Due to particular features in its floral structure, classical plant breeding procedures that involve hybridization is not possible. Thus, the genetic improvement through the use of mutagens becomes an important line of research for the fig improvement. Five fig selections presenting interesting agronomic features were generate. However, it was not possible to identify genetic modifications associated to mutants by molecular markers. Once DNA modifications were not identified, it was proposed that phenotypes could be resulted of epigenetic modifications. DNA methylation is the most well understood epigenetic modification associated to switch on or off of the genes. After epigenetic polymorphism were identified by molecular markers MSAP, this study aims at quantifying methylated DNA of fig selections irradiated with gamma rays comparing with the commercial cultivar “Roxo-de-Valinhos” through global methylation analysis by Imprint Methylated DNA Quantification kit. By the technique of immunochemistry (ELISA), using 5-MC antibodies, significant differences were observed by Tukey test, at 95% of reliability, in the global content methylation of the treatments DNA, indicating that this abiotic factor was responsible for the changes in the epigenome of the plants. Since the material used as control was found also methylated, a supposed demethylation of the polymorphic genomic material may be responsible for phenotypic variation among treatments. The results have been revealed that irradiation is an external factor capable of altering epigenetic patterns.

Keywords: epigenetics, methylation content, mutation induce, *Ficus carica*.

1. Introduction

Epigenetic content changes involve DNA methylation, modification of histones and regulators RNA [1]. In plants, epigenetic regulation is responsible for the development, differentiation and plant responses to the environment, such as biotic and abiotic stress [2-4], being the DNA methylation one of epigenetic markers associated with silencing transposable elements and genomic imprinting genes [5-10].

Epigenetic content modifications interfere in the dynamics of chromatin, transitioning between the state of euchromatin, active, and heterochromatin, inactive or silenced. The chromatin when presenting its density changed, influence the access of any protein to the binding sites in the DNA, including RNA transcriptases and various transcription factors, thus modulating gene expression. [3, 11].

Chromatin dynamics involve transition between eu and heterochromatic states thus, allowing or denying gene transcription, by modifying epigenetic markers. These epigenetic modifications consist of alterations in key points in the molecules that constitute the chromatin, namely in the loose aminoacid chains found in the histones, and in the DNA bases

themselves, more commonly in the position 5 of the pyrimidine ring of the cytosines, which can be methylated. Chromatin remodeling and nuclear organization has been also involved in plant response to stress [12], and it has already been shown that stress can affect chromatin spatial disposition [13], interfering directly into the individual plasticity of an organisms' phenotype.

The improvement programs of fig trees using conventional procedures in order to obtain new cultivars are rare in many countries, such as Brazil, especially due to the little genetic variability and to the difficulties in obtaining plants from gametes fusion once the wasp *Blastophaga psenes*, responsible for the natural pollinating, is not found in Brazil [14]. Thus, the mutagenic genetic improvement becomes an important field of research for the crop improvement; gathering information on this species, especially regarding its genetic variability is, therefore, made necessary so that appropriate propagation and management projects are made.

Low doses of radiation can stimulate various biological processes and has been widely used in different fields including the production of mutant plants useful for the improvement of crops [15]. From fig cuttings of the cultivar "Roxo-de-Valinhos", irradiated with gamma rays at a dose of 30 Gy [16], it was possible to select plants due to their unique and divergent morphology characteristics, and agronomic interest [17].

However, the irradiated fig selections subjected to molecular analysis, using RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) and AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) techniques, polymorphism was not evidenced among them, i.e., genetic modification was not observed, suggesting character epigenetic changes between treatments due to gamma radiation [18]. After identifying epigenetic polymorphism by molecular markers MSAP (*Methylation-sensitive amplification polymorphism*) [19], the present study aimed to quantify methylated DNA from irradiated fig selections comparing them with the commercial cultivar 'Roxo-de-Valinhos' through analysis of global DNA methylation and chromatin state.

2. Materials and Methods

The experiment was conducted at Epigenetics and Reproduction Laboratory of Medicine School of Ribeirão Preto (São Paulo, Brazil), in partnership with Cytogenomics and Epigenetics Laboratory of Superior School of Agriculture “Luiz de Queiroz”, using leaves of five fig selections. The specimens consisted of cuttings irradiated with gamma rays at the Energy Nuclear Center in Agriculture (Piracicaba, Brazil). Five irradiated plants of interest were used [17]; these selections were compared to one another and to the cultivar ‘Roxo-de-Valinhos’, which served as a control.

2.1. Relative quantification of global DNA methylation

Young leaves without spots or perforations were collected and washed under running water, and their veins were removed. The extraction of total genomic DNA from plant tissues was performed according to a modified cetyltrimethylammonium bromide technique.

The quantification of global DNA methylation was performed by the Imprint DNA Methylation Quantification kit (Sigma), following the manufacturer’s instructions. This kit functions similarly to an ELISA plate assay, using strips of well which have been pre-treated with binding methylated DNA, and using a DNA methylation sensitive capture antibody and detection antibody allowing colorimetrically detection of relative amounts of DNA methylation at an absorbance of 450nm.

Differences in the DNA methylation between treatments were evaluated with a one-way Analysis of Variance (ANOVA). Prior to the analysis, the percentage of methylation was log transformed in order to validate assumptions of the ANOVA performed. Post-hoc analysis was performed with Tukey test for a 95% level of confidence.

3. Results and Discussion

To find out whether the plasticity of DNA methylation is related to stress caused by irradiation, we investigated the global DNA methylation of the treatments, by using the Imprint™ Methylated DNA Quantification technology (Sigma-Aldrich), which allows looking at the spatial distribution of 5- methylcytosine sites to detect methylated cytosines.

According to the variance analyzes, F test for a 95% level of confidence, indicates that there is a statistical difference in the percentage of methylated DNA among the treatments. A

post-hoc analysis of the averages showed that treatment 3 presents its global less methylated DNA, than any other medium, is not, however, statistically different, of the treatment non-irradiated control "Roxo-de-Valinhos". (Table 1).

TABLE 1: Values of absorbance obtained by ELISA test and its corresponding analysis of variance.

Treatment	Absorbance at 450nm First analysis	Absorbance at 450nm Second analysis	Relative quantification of methylated DNA (%)
1	0.615	0.661	16.62 ab
2	0.637	0.811	18.75 a
3	0.370	0.479	10.99 b
4	0.714	0.886	20.74 a
5	0.670	0.900	20.29 a
6	0.835	1.115	25.21 a
Methylated DNA Control	3.586	4.109	-
CV %	-	-	5.61

Means followed by the same letter do not differ by Tukey test for a 95% level of confidence.

It can be observed that the unirradiated control showed a global methylation level lower than treatments that were irradiated, revealing that the radiation is an external factor capable of altering these patterns in the plants in question, including DNA demethylation. The hypo and hypermethylation of DNA in plants during conditions of environmental stress caused by cold, heat and / or salinity, are known as modulators of transcription of the genome [20, 21].

Physical (different types of radiation) and chemical mutagens can be used *in vivo* or *in vitro* in plant breeding, increasing genetic variability and allowing to obtain genotypes of interest [22]. In fig, dormant buds were irradiated with gamma-rays and the LD50 (dose causing 50% lethality) was determined as 25 Gy, however, for each genotype should make a preliminary test before the research [23]. Cuttings with axillary buds were treated with gamma rays (dose 50-100 Gy), obtaining small mutants and earliness mutants, which were tested for production, being one of them (Bol) released to producers [24].

In *Arabidopsis thaliana*, using different doses of gamma radiation, there was observed a decrease in DNA methylation according to the increase in dose. The results indicated that

the radiation dose at 200 Gy was positively related to the substantial reduction in the transcriptional silencing genes, probably due to induction of genomic hypomethylation [25].

According to the results of global DNA methylation content analysis in irradiated figs, it is observed that the effects of radiation did not affect homogeneously the genomes of different selections. However, the demethylation of parts of the genome becomes a probable cause, since the main polymorphic bands were observed in this condition [19].

DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* as a repressive mark is often associated with the expression of transcriptionally inactive repetitions as repetitive sequences, transposons and heterochromatic [26, 27]. The methylated DNA loci are often followed by small interfering RNAs (RNAi) [27, 28]. Approximately one third of methylated DNA loci are rich in RNAi that regulate heterochromatin functions, playing an important role in DNA methylation, controlling their properties of silencing [1, 29, 30].

In the present work, mainly by observing the treatment 3 apparently the radiation caused a disturbance in the silencing system. This breaks the equilibrium certainly caused an increase in expression of these satellite sequences, forcing the RNAi system to an expression control. This recruitment of silencing system to a great extent the genome may have caused an imbalance in the silencing coding and/or promoters regions of genes, namely a strong demethylation of these sequences.

While DNA methylation can be established and maintained, the DNA demethylation also occurs in plants and animals. When methylation pathways are inactivated, DNA methylation is diluted after replication, leading to the passive DNA demethylation. In other cases, however, DNA methylation is removed by the process of active DNA demethylation. Active or passive DNA demethylation can simultaneously reduce DNA methylation at some specific developmental stages [27].

The genome of superior plants contains many transposable elements that potentially disturb the stability of the genome. In plants, DNA methylation usually occurs in these transposable elements. Loss of DNA methylation in mutants genes responsible for its leads to disruption of transcriptional silencing of transposable elements and other repetitive DNA sequences, generating different phenotypes [31].

4. Conclusion

Differences in the DNA methylation content of the different selections of fig irradiated with gamma rays were observed, indicating that this abiotic factor was responsible for the changes in the epigenome of the plants, generating different phenotypes, being this data pioneers in fig crop.

5. Competing interests

The author(s) declare that they have no competing interests

6. Acknowledgements

Research supported by Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) with a PhD's scholarship to M.G.F. Rodrigues.

The Post Graduate Program in Genetics of University of Sao Paulo Medical School.

Dra. Fabiani Gai Frantz and the Post Graduate Student Luana Silva Soares for the support in ELISA analysis.

7. Authors' contributions

Rodrigues, MGF carried out the DNA extraction, ELISA assay and performed the statistical analysis; Soares, MR participated in the ELISA assay and statistical analysis; Ramos, ES participated in the design of the study and Giuliatti, S. participated in its design and coordination.

8. References

1. Jones AL, Sung S (2014) Mechanisms Underlying Epigenetic Regulation in *Arabidopsis thaliana*. Integr Comp Biol 54:61-67.
2. Hauser MT, Aufsatz W, Jonak C, Luschnig C (2011) Transgenerational epigenetic inheritance in plants. Biochimica et Biophysica Acta 1809:459-468.
3. Pecinka A, Dinh HQ, Baubec T, Rosa M, Lettner N,; Mittelsten Scheid O (2010) Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in *Arabidopsis*. The Plant Cell 22:3118-3129.
4. Tittel-Elmer M, Bucher E, Broger L, Mathieu O, Paszkowski J, Vaillant I (2010) Stress-induced activation of heterochromatic transcription. PLoS Genet 6(10): e1001175.

5. Lisch D (2009) Epigenetic regulation of transposable elements in plants. *Annu Rev Plant Bio* 60:43-66.
6. Henderson IR, Jacobsen SE (2008) Tandem repeats upstream of the *Arabidopsis* endogene SDC recruit non-CG DNA methylation and initiate siRNA spreading. *Genes* 22:1597-1606.
7. Rangwala SH, Richards EJ (2007) Differential epigenetic regulation within an *Arabidopsis* retroposon family. *Genetics* 176:151-160.
8. Saze H, Kakutani T (2007) Heritable epigenetic mutation of a transposonflanked *Arabidopsis* gene due to lack of the chromatin-remodeling factor DDM1. *EMBO J*, 26:3641-3652.
9. Kato M, Takashima K, Kakutani T (2004) Epigenetic control of CACTA transposon mobility in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* 168:961-969.
10. Okamoto H, Hirochika H (2001) Silencing of transposable elements in plants. *Trends Plant Sci* 6:527-534.
11. Mahfouz, M.M (2010) RNA-directed DNA methylation: mechanisms and functions. *Plant Signaling & Behavior* 5:806-816.
12. Kim JM, To TK, Nishioka T, Seki M (2010) Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant, Cell & Environment* 33:604-611.
13. Santos AP, Ferreira L, Maroco J, Oliveira MM (2011) Abiotic Stress and Induced DNA Hypomethylation for Rice rDNA Loci. *Cytogenetic and Genome Research* 132(4):297–303.
14. Ferreira EA, Pasqual M, Tulmann Neto A (2009) *In vitro* sensivity of fig plantlets to gamma rays *Scientia Agricola* 66(4): 540-542.
15. Wang H, Feng Q, Zhang M, Yang C, Sha W, Liu B (2010) Alteration of DNA methylation level and pattern in sorghum (*Sorghum bicolor* L.) pure-lines and inter-line F1 hybrids following low-dose laser irradiation. *J Photochem Photobiol B* 99(3):150–153.
16. Santos PC, Correa LS, Tulmann Neto A, Boliani AC (1997) Sensitividade de estacas de figo a radiação gama. *Revista Brasileira de Genética* 20(3):150.
17. Rodrigues MGF, Corrêa LS, Santos PC, Tulmann Neto A (2012) Seleção de Clones de Figueira cv. Roxo-de-Valinhos Formados por Gemas Irradiadas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 34(2):604-611.
18. Rodrigues MGF, Martins ABG, Desiderio JA, Bertoni BW, Alves MC (2012) Genetic Characterization of Fig Tree Mutants by Molecular Markers. *Genetics and Molecular Research* 11(3):1990-1996.

19. Rodrigues MGF, Martins ABG, Bertoni BW, Figueira A, Giuliatti S (2013) Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms in mutant figs. *Genetics and Molecular Research* 12(3):2267-2280.
20. Boyko A, Kovalchuk I (2011) Genome instability and epigenetic modification – heritable responses to environmental stress? *Curr Opin Plant Biol* 14:1-7.
21. Chinnusamy V, Zhu JK (2009) Epigenetic regulation of stress responses in plants. *Curr Opin Plant Biol* 12:133-139.
22. Tulmann Neto A, Ando A, Mendes BMJ (1990) Ampliação da variabilidade genética em algumas frutíferas através da indução de mutações “in vivo” e “in vitro”. In: Primeiro Simpósio Latino-Americano sobre Recursos Genéticos de Espécies Hortícolas. Campinas: Fundação Cargil 1: 148-169.
23. Spiegel-Roy P (1990) Economic and agricultural impact of mutation breeding in fruit trees. *Mutation Breeding Review* 5:26.
24. Akuhund-Zade IM (1981) Radiation mutagenesis in subtropical crops. *Teor.Prikl.Aspekty Radiata Biology Technology* 10-12:50-51.
25. Kim JE, Lee MH, Cho EJ, Kim JH, Chung BY, Hong J (2013) Characterization of Non-CG Genomic Hypomethylation Associated with Gamma- Ray-Induced Suppression of CMT3 Transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Radiation Research* 180(6):638-648.
26. Zhu J, Kapoor A, Sridhar VV, Agius F, Zhu JK (2007) The DNA glycosylase/lyase ROS1 functions in pruning DNA methylation patterns in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 17:54-59.
27. Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, Ecker JR (2006) Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126:1189-1201.
28. Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, Ecker JR (2008) Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell* 133:523-536.
29. Grewal SIS, Rice JC (2004) Regulation of heterochromatin by histone methylation and small RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 16:230-238.
30. Lippman Z, Martienssen RA (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* 431:364-370.
31. He X, Chen T, Zhu J (2011) Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research* 21(3): 442–465.