

O Papel da Epigenética na Diversidade Vegetal e Suas Implicações para o Uso dos Recursos Fitogenéticos

João Dimas Garcia Maia, Patrícia Silva Ritschel e Vera Quecini

Introdução

O termo “epigenética” foi criado por Conrad H. Waddington, nos anos de 1940, referindo-se ao estudo da ação conjunta de genes, pertencentes a determinado genótipo, na determinação do fenótipo (WADDINGTON, 1942). Foi inicialmente concebido para abranger aspectos relativos ao que chamamos atualmente de “biologia do desenvolvimento”. O primeiro a usar o termo “epigenética” com sentido próximo ao atual foi Lederberg, ao descrever a informação genética não contida na sequência do DNA (LEDERBERG, 1958). A primeira descrição das modificações químicas do DNA e da cromatina como processos “epigenéticos” é encontrada em Holliday (1979). A descoberta do envolvimento da metilação no controle da expressão gênica de amplas regiões genômicas permitiu o reconhecimento desse processo como um dos principais mecanismos da epigenética (LEWIN, 1998). Em plantas, a função de pequenos RNAs (do inglês, *small RNA* – sRNA) como determinantes da especificidade para o estabelecimento de modificações epigenéticas foi demonstrada em um conjunto de estudos de virologia e engenharia genética conduzidos a partir dos anos de 1970 (BOND; BAULCOMBE, 2014). Atualmente, os avanços tecnológicos permitiram a associação dos sRNAs à manutenção dos padrões transgeracionais de metilação, determinação de fenótipos herdáveis em resposta a estresses e na interação entre genomas em híbridos e poliploides (GROSZMANN *et al.*, 2013).

O principal paradigma da genética é a correspondência entre as variações herdáveis encontradas nos indivíduos e as diferenças nas respectivas sequências de DNA, sugerindo que os fenótipos transmitidos para as gerações futuras são decorrência direta da sequência de DNA. Atualmente, se aceita que os estados epigenéticos exercem papel adicional como fonte de variabilidade fenotípica. As evidências mais recentes demonstram que fatores genéticos e epigenéticos atuam simultaneamente, com predominância da genética, para controlar a variabilidade herdável, a adaptação e a evolução das plantas superiores.

A epigenética refere-se às alterações na expressão gênica e no fenótipo celular, transmitidas de forma estável durante a mitose e, ou, meiose, sem a ocorrência de modificações na sequência subjacente de DNA. Nessas situações, as alterações na atividade dos genes são decorrentes de modificações químicas no próprio DNA ou na cromatina, como metilação de resíduos de citosina e acetilação de histonas (Figura 45.34).

As alterações químicas que causam as marcas epigenéticas podem ser acrescentadas e removidas, assim um gene afetado por estados epigenéticos estará presente em formas distintas, denominadas epialelos, que correspondem à sequência não modificada, à sequência silenciada por marcas epigenéticas e à forma reativada pela remoção das marcas.

Mecanismos moleculares envolvendo pequenos RNAs são responsáveis pela transmissão dos estados epigenéticos entre as gerações em plantas superiores (Figura 45.34). O RNA, que exhibe alterações em sua expressão em resposta a fatores endógenos e exógenos, tem função central no controle dos estados epigenéticos, intermediando as respostas do genoma estável às condições variáveis do ambiente.

Para a conservação de recursos fitogenéticos é importante distinguir a plasticidade fenotípica reversível da variação epigenética. Estados epigenéticos dependentes de dado contexto genômico podem

ser considerados uma consequência direta da variabilidade genética. Assim, a conservação da variabilidade genética também contribui para a manutenção de marcas epigenéticas. Para espécies de propagação clonal, maior importância tem sido atribuída à variação epigenética nos processos adaptativos em relação àquela nas espécies de reprodução sexual (VERHOEVEN; PREITE, 2013). Na reprodução assexual, a frequência de remoção de marcas epigenéticas é menor, devido à ausência da meiose, predispondo a um aumento na contribuição da variabilidade epigenética herdável na determinação do fenótipo (VERHOEVEN; PREITE, 2013). A possibilidade de regulação da expressão de genes pela introdução ou remoção de modificações bioquímicas nos mecanismos epigenéticos pode contribuir com entendimento da herdabilidade de caracteres quantitativos e fenômenos de interação gênica (GROZSMANN *et al.*, 2013; SPRINGER, 2013). A regulação epigenética também pode representar o mecanismo pelo qual é possível transmitir a influência do ambiente para células-filha ou para a progênie.

Neste texto serão discutidos os fatores que desencadeiam as alterações epigenéticas, os mecanismos moleculares envolvidos em seu estabelecimento, manutenção e remoção, e as implicações na conservação de recursos fitogenéticos.

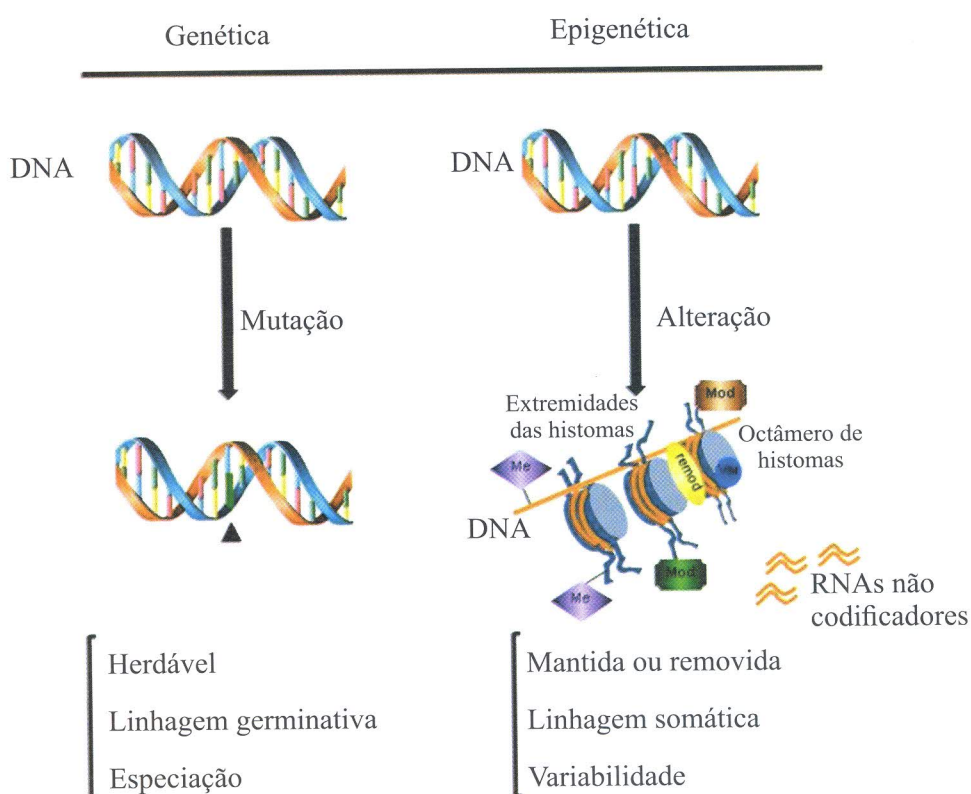


Figura 45.34 - Resumo das principais características da genética e da epigenética. Na genética, ocorrem mutações herdáveis (triângulo preto) na sequência do DNA. Na epigenética, ocorrem modificações químicas no DNA e das histonas (Me, metilação e Mod, outras alterações bioquímicas, como acetilação, desacetilação, glicosilação, ubiquitinação etc.), ação de fatores de remodelagem da cromatina (remod), ocupação de octâmeros por variantes das histonas (Var) e produção de RNAs não codificadores.

Mecanismos Epigenéticos

No sentido mais amplo, a informação epigenética é aquela responsável pela variabilidade fenotípica não explicada por diferenças na sequência do DNA. Os mecanismos moleculares considerados efetores das alterações epigenéticas incluem as proteínas metaestáveis (prions), metilação de bases nitrogenadas no DNA, modificações na cromatina e populações de sRNAs (BOND; BAULCOMBE, 2014; HALFMANN *et al.*,

2010). Metilação do DNA

Em plantas, a alteração epigenética mais frequente é a adição e remoção de grupos metil na extremidade 5' de resíduos de citosina no DNA, convertendo-a em 5-metilcitosina (5mC). Os resíduos de citosina podem ser metilados em três tipos de sequência: CG, CHG e CHH, em que H pode representar A, C, ou T. Nas sequências simétricas CG e CHG, a metilação pode simplesmente ser copiada durante a replicação do DNA, enquanto nas sequências CHH, não simétricas, a metilação tem que ser reestabelecida a cada novo ciclo de replicação do DNA (SAHU *et al.*, 2013).

A metilação pode ocorrer em resíduos de citosina localizados nas regiões dos promotores e nas sequências codificadoras dos genes e, frequentemente, leva à redução na atividade gênica. Maiores informações estão apresentadas em Sahu *et al.*, 2013 e Vanyushin e Ashapkin, 2011.

As enzimas que catalisam a transferência de resíduos metil para o DNA pertencem a categorias funcionalmente distintas: metiltransferase 1 (MET1), cromometilase 3 (CMT3) e metilase com domínios rearranjados (DRM) (Figura 45.35.a). A atividade da MET1 está preferencialmente associada à manutenção da metilação simétrica das citosinas CG (SAHU *et al.*, 2013). A enzima CMT3 é responsável pela metilação da sequência CHG, principalmente em regiões centroméricas de DNA repetitivo e em elementos transponíveis (Figura 45.35.a). A atividade DRM requer duas metiltransferases; DRM1 e DRM2, que catalisam a metilação de novo em ilhas CHH (Figura 45.35.a). A metilação de resíduos de citosina no DNA vegetal é essencial para a supressão da expressão gênica (VANYUSHIN; ASHAPKIN, 2011).

A metilação da extremidade 6' de resíduos de adenina (6mA) também ocorre no genoma nuclear e mitocondrial das plantas, e modificações em seus níveis e regulação causam alterações fenotípicas em várias espécies vegetais (VANYUSHIN; ASHAPKIN, 2011).

O grau de metilação do DNA nas plantas é regulado por processos fisiológicos, de desenvolvimento e de estresse, que controlam a atividade das DNA metiltransferases e desmetilases. Enquanto a metilação é dependente da atividade enzimática, a desmetilação do DNA pode ocorrer de forma passiva, após a replicação, ou ativa, pela remoção de resíduos 5mC. O assunto pode ser aprofundado em Bond e Baulcombe, 2014.

Os sRNAs estão envolvidos no controle da metilação do DNA dirigida por RNA (RdDM,) (BOND; BAULCOMBE, 2014). Resumidamente, os sRNAs são sintetizados a partir de regiões de DNA metilado ou regiões com sequência em repetições inversas, pela ação das RNA polimerases (Pol) dependentes de RNA, PolIV e PolIII, respectivamente (Figura 45.35a). Os sRNAs provenientes da ação da PolIV são sintetizados na forma de fita simples (ssRNA) e convertidos em fita dupla (dsRNA) pela ação da RNA polimerase 2 dependente de RNA (RDR2). As regiões de repetições invertidas no DNA transcritas pela PolIII originam dsRNAs, processados pela endonuclease DICER-LIKE 3 (DCL3) e pela metiltransferase HUA ENHANCER1 (HEN1), que adiciona um grupo metil na extremidade 2'-OH do nucleotídeo final na região 3'. Os dsRNAs processados são carregados aos complexos ARGONAUT 4, 6 e 9 (AGO 4, 6, 9), que interagem com a subunidade maior da PolV via repetições localizadas na extremidade carboxila da Nuclear RNA POLYMERASE1 (NRPE1). O complexo proteico associado ao siRNA é recrutado às sequências homólogas de DNA, dirigindo a metilação dessa região pela DRM2 (Figura 45.35.a). Outras variações da via de estabelecimento de metilação são descritas em Bond e Baulcombe, 2014.

Manutenção e Herança da Metilação do DNA

As enzimas DNA metiltransferases são responsáveis pela cópia da metilação para o resíduo de citosina na molécula-filha durante a replicação do DNA em regiões de sequência simétrica. O processo de manutenção das modificações bioquímicas associadas ao DNA envolve também as marcas epigenéticas ligadas às proteínas histona dos nucleossomos.

A enzima metiltransferase CMT3 contém domínio capaz de se associar ao resíduo de lisina dimetilado na histona 3. A alteração nessa proteína é catalisada por KRYPTONITE (KYP), levando à repressão

da transcrição gênica (BOND; BAULCOMBE, 2014). Os padrões de metilação nas ilhas CG são mantidos pela MET1, que atua de modo independente dos sRNAs. A manutenção da metilação em sequências CHH é dependente da iniciação por sRNAs. Após o desencadeamento do processo de manutenção da metilação, o mecanismo é semelhante ao descrito para o estabelecimento da marca epigenética, ou seja, dependente da atividade da enzima DRM2 e direcionado pelos sRNAs-AGO para os complexos proteicos PoIV e transcritos alvo (Figura 45.35a).

Os mecanismos de manutenção dos padrões de metilação são essenciais para a transmissão e integridade da informação epigenética. Os mecanismos dependente e independente de RdDM operam como dois ciclos autoalimentados e associados pela presença de DNA metilado (BOND; BAULCOMBE, 2014). A transmissão transgeracional das marcas epigenéticas requer que a condição bioquímica de determinado loco no parental seja transmitida para a progênie. A manutenção das modificações é exclusivamente dependente do ciclo 1, enquanto a transmissão depende do ciclo 2 ou da operação conjunto dos ciclos 1 e 2 (Figura 45.35.b).

Em milho e em alguns outros organismos, a transmissão de marcas epigenéticas pode ocorrer pelo mecanismo alternativo de RdDM denominado “paramutação”. Na paramutação, um loco produtor de sRNA, denominado “paramutagênico”, induz a metilação e, conseqüentemente, o silenciamento de um loco homólogo “paramutável”, localizado em outro cromossomo (HOLLICK, 2012). O alelo paramutagênico *b1* de milho dirige a metilação de um grupo de sequências repetitivas consecutivas numa região potenciadora de transcrição, localizada a 100 quilobases (Kb) do loco-alvo no alelo paramutável. O estado silenciado do alelo paramutado é transmitido para a progênie e o loco adquire a competência para silenciar outro alelo, num processo dependente de sRNA (HOLLICK, 2012). Na paramutação, há a transmissão das marcas epigenéticas entre alelos (SOPPE *et al.*, 2000). Outra particularidade da paramutação é sua dependência de sRNAs para a manutenção do silenciamento (HOLLICK, 2012). O efeito transgeracional da paramutação, sua manutenção e as interações alélicas envolvidas são possivelmente dependentes do mecanismo representado pelo ciclo 2 (45.35.b).

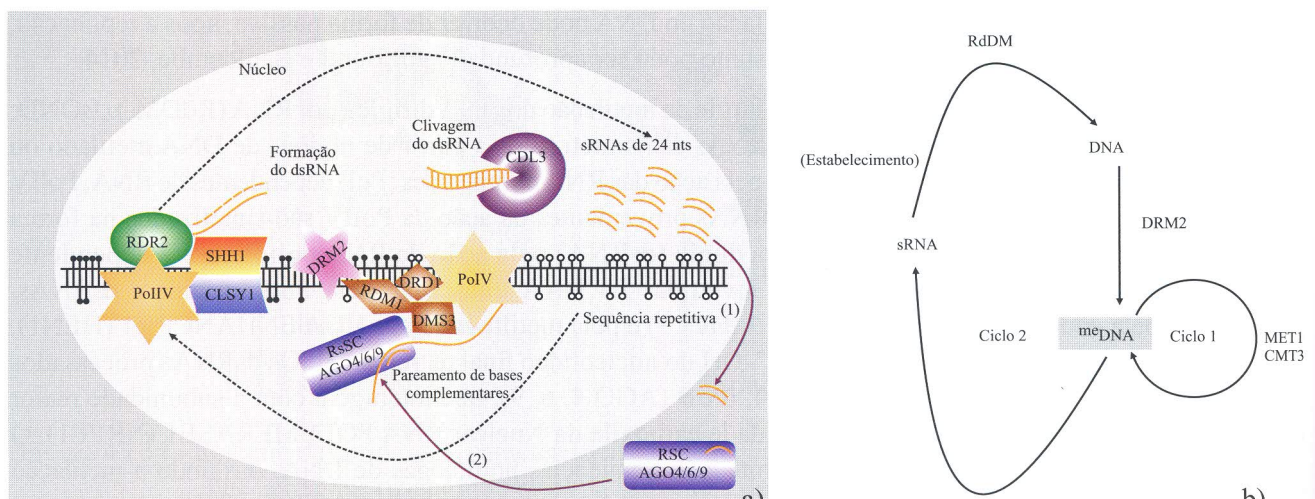


Figura 45.35 - Representação esquemática dos mecanismos de estabelecimento, manutenção e transmissão da metilação do DNA em plantas. a) Modelo proposto para a metilação do DNA dirigida por RNA (RdDM) nas plantas, e b) Modelo autoalimentado da manutenção da metilação do DNA nas plantas. A descrição detalhada dos mecanismos está disponível em Bond e Baulcombe, 2014.

Modificações na Estrutura da Cromatina

Nos núcleos eucarióticos, o DNA é encontrado numa estrutura altamente compactada com conjuntos de proteína, denominada cromatina. A estrutura básica da cromatina pode ser induzida à formação de níveis estruturais superiores em resposta a fatores endógenos de desenvolvimento e fatores exógenos temporais ou ambientais (GENTRY; HENNING, 2013). O nível de estrutura da cromatina regula a acessibilidade aos

fatores de transcrição e outras proteínas responsáveis pelos processos biológicos do DNA, envolvidos na expressão e transmissão da informação genética.

A estrutura da cromatina é controlada por mecanismos epigenéticos, como a metilação do DNA, as modificações bioquímicas das proteínas histonas, a remodelagem da cromatina dependente de adenosina trifosfato (ATP), a presença de variantes das histonas e regulação por sRNAs (GENTRY; HENNING, 2013). A extremidade N terminal das histonas pode sofrer vários tipos de modificações pós traducionais, incluindo acetilação, metilação, ubiquitinação, fosforilação e sumoilação. Esse conjunto de modificações bioquímicas é responsável pelo armazenamento da “memória epigenética” da célula, na forma de um “código de histonas”, que determina a estrutura da cromatina e a expressão da informação genética contida no DNA. Em geral, a acetilação das histonas está associada à ativação transcricional, enquanto a metilação de resíduos de lisina pode resultar em ativação ou repressão transcricional, dependendo da posição do resíduo e do tipo de modificação (revisão em YUAN *et al.*, 2013).

A acetilação das histonas é um processo reversível, catalisado por histona acetiltransferases (HATs) e desacetilases (HDACs) (revisão em GENTRY; HENNING, 2013; YUAN *et al.*, 2013). As histonas também podem metiladas nos resíduos de lisina e arginina, pela atividade das histona-lisina metiltransferases (HKMTs) e proteína arginina metiltransferases (PRMTs). Os radicais metil podem ser removidos por histona desmetilases (HDMs). As enzimas HKMT e PRMT são caracterizadas pela presença do domínio SET. Nas plantas, as proteínas com domínio SET estão envolvidas em vários processos biológicos controlados epigeneticamente, incluindo respostas a estresses, florescimento, determinação do destino celular, morfogênese foliar, organogênese floral, *imprinting* parental e desenvolvimento da semente (revisão em YUAN *et al.*, 2013).

A cromatina também pode ser remodelada em processos dependentes da energia derivada de adenosina trifosfato (ATP) (GENTRY; HENNING, 2013). Os fatores que remodelam a cromatina com o consumo de ATP nas plantas empregam proteínas do complexo SWI/SNF. Os complexos de remodelagem da cromatina agem em conjunto com outros grupos de proteínas com capacidade de modificação de sua estrutura, como o complexo POLYCOMB (GENTRY; HENNING, 2013).

As modificações epigenéticas na estrutura da cromatina podem ser transientes ou estáveis. Vários estresses bióticos e abióticos causam modificações temporárias na estrutura da cromatina; porém, com a remoção do agente estressor, a arquitetura original é restaurada rapidamente (PECINCKA; MITTELSTEN SCHEID, 2012). Ao contrário, algumas modificações na estrutura da cromatina são responsáveis pela “memória celular”, nas quais o estado modificado pode permanecer por toda a vida da planta.

Estrutura do Genoma

Na agricultura, os principais processos que têm capacidade de alterar a estrutura do genoma e, conseqüentemente, afetar as marcas epigenéticas são a heterose (ou vigor híbrido) e a duplicação de genomas completos (ou poliploidização).

Heterose

A heterose ou vigor híbrido pode ser definida como a maior produtividade e biomassa da progênie híbrida em comparação aos parentais. Nos híbridos, a expressão gênica é regulada pelas interações entre os sistemas de informação epigenética dos dois parentais e seus genomas. Descobertas recentes sugerem que os mecanismos moleculares que controlam essas interações dependem de várias vias que modulam o estado de metilação do DNA, afetando a expressão gênica (revisão em GROZSMANN *et al.*, 2013). As modificações nas histonas, que causam alterações nos padrões de expressão gênica, também podem contribuir com a regulação epigenética do vigor híbrido nas plantas.

Duplicação do Genoma Completo

A presença de mais de dois conjuntos cromossômicos dentro do núcleo de uma célula é denominada poliploidia, e este fenômeno é comum no reino vegetal. Evidências recentes, obtidas a partir de várias linhas de pesquisa, sugerem que 60-70% das angiospermas apresentam origem poliploide. O aumento na quantidade de genomas por célula altera o balanço entre as interações regulatórias e redes de controle da expressão gênica, funcionando como agente remodelador do genoma (NG *et al.*, 2012). As evidências atuais sugerem que fatores epigenéticos contribuem com a plasticidade de regulação da expressão gênica, proporcionando novas vias de diversificação funcional e evolução de características adaptativas em poliploides.

Implicações da Epigenética para a Conservação dos Recursos Fitogenéticos

A informação epigenética desempenha função importante na regulação da expressão gênica ao longo do desenvolvimento, nas respostas ao ambiente e na variabilidade natural. Portanto, as marcas epigenéticas podem contribuir com as estratégias do melhoramento vegetal pela identificação e seleção de estados epigenéticos mais favoráveis, desenvolvimento de novos epialelos, regulação da expressão de genes exógenos e herança não Mendeliana (SPRINGER, 2013).

A variabilidade genética em regiões genômicas distintas daquelas em que as marcas epigenéticas estão localizadas também pode afetar as modificações bioquímicas em determinados epialelos e elementos transponíveis. Assim, no contexto do germoplasma vegetal, as interações epigenéticas afetam a expressão de determinadas características fenotípicas. As técnicas de conservação do germoplasma vegetal podem influenciar o estado epigenético, como a alta frequência de variabilidade epigenética detectada em plantas submetidas ao cultivo *in vitro* (revisão em MIGUEL; MARUM, 2011).

Considerações Finais

A variabilidade epigenética dos recursos fitogenéticos é particularmente interessante para espécies de propagação clonal, por permitir a exploração da variabilidade alélica e a formação de novas combinações epigenéticas sem necessidade de recombinação.

As condições epigenéticas também podem colaborar com o aumento da variabilidade em materiais com base genética estreita ou pequena disponibilidade de germoplasma. A promoção da manifestação da variabilidade em regiões genômicas com limitações de recombinação pode ser induzida por modificações epigenéticas, levando ao surgimento de novas combinações entre alelos e epialelos, mesmo na ausência de recombinação, resultando na formação de novos haplótipos.

O conhecimento dos fatores epigenéticos na variabilidade disponível nos recursos epigenéticos pode contribuir para a identificação e seleção de epigenomas favoráveis, desenvolvimento de novos epialelos e controle das alterações na expressão gênica. Assim, informações sobre o conhecimento de aspectos básicos da regulação e manutenção das marcas epigenéticas no genoma vegetal podem contribuir para o desenvolvimento de metodologias para uso e conservação de epigenomas.