



Variabilidad epigenética en plantas y evolución

Ricardo w. Masuelli y Carlos F. Marfil

Instituto de Biología Agrícola Mendoza (IBAM), Facultad de Ciencias Agrarias,
Universidad Nacional de Cuyo.
*A. Brown 500 (M5528AHB) Chacras de Coria, Mendoza e Instituto Nacional de Tecno-
logía Agropecuaria, E. E. A. La Consulta, Argentina.*

rmasuelli@fca.uncu.edu.ar

ABSTRACT

Interspecific hybridization is an important mechanism in angiosperm evolution. Hybridization induces a shock in the genome resulting in genetic and epigenetic changes. Epigenetic changes generate new allelic variants called epialleles with morphological, physiological and ecological consequences, relevant for the plant evolution. Epialleles constitute a new source of variation potentially reversible that produces flexible genotypes with adaptation to changing environmental conditions. The aim of this review is to summarize the known epigenetic mechanisms in plants and analyze the possible connections with interspecific hybridization and plant evolution.

Key words: Epigenetics, evolution, variability

RESUMEN

Uno de los mecanismos más importantes en la evolución de las plantas es la hibridación interespecífica. Este mecanismo induce cambios en el genoma que abarcan tanto alteraciones genéticas como epigenéticas. Estudios recientes muestran que los cambios epigenéticos generan variantes alélicas llamadas "epialelos" que pueden tener consecuencias morfológicas, fisiológicas y ecológicas de importancia en la evolución de las plantas. Los epialelos constituyen una nueva fuente de variabilidad que se suma a la variabilidad genética. Desde un punto de vista evolutivo la variabilidad generada por mecanismos epigenéticos amplía la variabilidad genética ya que aparecen nuevos epialelos que pueden ser seleccionados en poblaciones naturales. Además, las variantes epialélicas son potencialmente reversibles y generarían fenotipos más flexibles capaces de adaptarse a ambientes cambiantes. El objetivo de la presente revisión es describir los mecanismos epigenéticos conocidos y analizar su relación con la hibridación interespecífica y su influencia en la evolución de las plantas.

Palabras clave: Epigenética, evolución, variabilidad

INTRODUCCIÓN

Un concepto central del neodarwinismo es que sin variabilidad no es posible la evolución. Para que la selección natural actúe es imprescindible que exista variabilidad genética; si la variación genética de determinada población disminuye y aumenta la homocigosis, ésta se dirigiría a un camino evolutivo sin salida. Sin embargo, las poblaciones tienen en general un alto grado de heterocigosis. Una de las principales fuentes de variabilidad son las mutaciones genéticas al azar que dan lugar a cambios heredables en las secuencias de nucleótidos. Las variantes alélicas que se originan dentro de una población por mutaciones y que se recombinan en la meiosis dan lugar a fenotipos que son la base de la microevolución adaptativa. Por otro lado, es llamativo como genomas que comparten más del 90% de sus secuencias, como el del hombre y el chimpancé, presenten fenotipos tan diferentes. Recientes avances en el área de la biología y genética molecular han demostrado que existe otra fuente de variación llamada epigenética. La epigenética es el estudio de cambios heredables en la expresión y función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia de ADN (Richards, 2006). Se encontró que la variación heredable no necesariamente se basa en cambios de secuencias, sino que existen cambios heredables en la expresión génica en total ausencia de variabilidad genética. Una característica fundamental del fenómeno epigenético es que está influenciado por el ambiente y un mismo genotipo puede mostrar fenotipos alternativos. Diferentes estreses pueden inducir cambios epigenéticos en un individuo, en plantas se mencionan, entre otros, el ataque de patógenos, el cultivo *in-vitro* y la hibridación interespecífica (McClintock, 1984). El objetivo de la presente revisión es describir los mecanismos epigenéticos y analizar su relación con la hibridación interespecífica así como su influencia en la evolución de las plantas.

MECANISMOS EPIGENÉTICOS

Se han descrito diferentes mecanismos relacionados con el fenómeno epigenético, tales como: metilación de citocinas, modificación de histonas (acetilación y metilación) y micro y pequeños ARNs de interferencia. El mecanismo más común

en plantas es la metilación en la posición 5' del anillo de citosina (5mC), los motivos que predominantemente se encuentran metilados son dinucleótidos CG y trinucleótido CNG (siendo N cualquiera de los cuatro nucleótidos) (Martienssen y Colot, 2001). Su distribución en el genoma no es al azar y varía dependiendo del tejido y el estado de desarrollo de la planta. Las enzimas ADN metiltransferasas catalizan la formación de 5mC por transferencia del grupo metilo de la S-adenosil metionina a las citosinas del ADN (Colot y Rossignol, 1999) (Figura 1A). Se reconocen dos tipos de ADN metiltransferasas: a) las de "de novo", que añaden grupos metilo a sitios no metilados de la doble hebra de ADN y b) las de "mantenimiento", que metilan sitios en base a 5mC de una hebra molde. En *Arabidopsis thaliana* las enzimas cromometilasa 3 (CMT3) y metiltransferasa 1 (MET1) son las responsables de metilar los sitios CNG y CG, respectivamente (Kankel *et al.*, 2003). Tanto CMT3 como MET1 se encargan de mantener los patrones de metilación luego de la replicación del ADN, reconociendo cadenas hemimetiladas (5mCG/CG ó 5mCNG/CNG) e incorporando grupos metilo en las citosinas no metiladas. De esta manera los patrones de metilación se heredan tanto mitótica como meióticamente.

La metilación del ADN está directamente relacionada con el silenciamiento génico, las regiones del ADN altamente metiladas en general se encuentran silenciadas. Se demostró que anulando los genes *CMT3* y *MET1* se desmetila el genoma activándose elementos transponibles y genes que se encontraban silenciados. Estos estudios mostraron que la pérdida de metilación produce aberraciones tales como cambios morfológicos en hojas y flores, así como en el tiempo de floración.

En plantas un proceso del desarrollo controlado epigenéticamente, es el de vernalización: la promoción de la floración por exposición de una plántula a un período de baja temperatura. La expresión de *FLC*, el gen clave que media esta respuesta, es reprimida por modificación de histonas en *A. thaliana*. La supresión de *FLC* en plantas vernalizadas está asociada con una disminución en la acetilación de la histona H3 y con un incremento en la metilación de las lisinas 9 y 27 (Bastow *et al.*, 2004). El proceso de utilización de marcas pre-existentes que guían la incorporación de nuevas marcas, descrito para el mantenimiento de la metilación, también

es aplicable para la maquinaria de modificación de histonas. La isoforma de la histona H3 que está metilada en la lisina 9, una modificación distintiva de la cromatina silenciada, recluta lisina 9 histonas metiltransferasas a través de proteínas intermediarias. Este mecanismo asegura que las marcas de histonas apropiadas sean añadidas a los nuevos nucleosomas que se van incorporando a las hebras sintetizadas tras un evento de replicación del ADN.

Los cambios en la metilación del ADN afectan la estructura de la cromatina y *vice versa*, sugiriendo que las dos principales marcas bioquímicas propias del estado silenciado de la cromatina se refuerzan mutuamente (Figura 1 B). La 5mC sirve como una guía para el establecimiento y el mantenimiento de otros códigos epigenéticos, como son las modificaciones postraduccionales de las proteínas histónicas que empaquetan el ADN en los nucleosomas. La metilación del ADN ha sido asociada con la desacetilación de la histona H3 y con la metilación de esta histona en la lisina 9 (Gendrel *et al.*, 2002), y a partir de complejos proteicos con actividad de histonas desacetilasas o histonas metiltransferasas se han aislado ADN metiltransferasas (Fuks *et al.*, 2003). Finalmente, la conexión entre la metilación del ADN y la estructura de la cromatina se ve reforzada por el hecho de que la mutación en la proteína remodeladora de la cromatina DDM1 (*Decreased DNA Methylation 1*) provoca una marcada reducción en la metilación del ADN (Brzeski y Jerzmannowski, 2003).

En los últimos años, pequeños ARNs no codificantes han recibido especial atención por controlar múltiples fenómenos epigenéticos (Bernstein y Allis, 2005). La interferencia asociada a ARN (iARN) es un proceso de silenciamiento postranscripcional de genes, muy conservado evolutivamente, por lo que un ARN induce la degradación secuencia-específica de secuencias de ARNm (siARNs, de doble cadena, exógenos) o la represión de la traducción (miARNs, ARNs cortos, endógenos, codificados en el genoma). Estudios recientes demuestran que ARNs pequeños, generados por la maquinaria del ARN de interferencia, pueden dirigir la metilación de citosinas y la modificación de histonas asociadas con la quiescencia transcripcional de regiones genómicas particulares (Wassenegger, 2005). Por otro lado, si bien la actividad de silenciamiento génico postranscripcional mediada por miARNs no puede con-

siderarse de naturaleza epigenética, por no ejercer efectos de silenciamiento a largo plazo y porque no se ha podido determinar su herencia a través de las divisiones celulares, su expresión diferencial tiene efectos fenotípicos sin alterar la secuencia lineal de nucleótidos.

Las interacciones entre las vías moleculares descritas, al establecer y/o reforzar diferentes estados epigenéticos sobre secuencias idénticas de ADN, alteran la afinidad de unión de proteínas que median la activación transcripcional. De esta forma, las modificaciones epigenéticas a nivel del ADN y de los nucleosomas afectan la expresión génica y, en definitiva, el fenotipo.

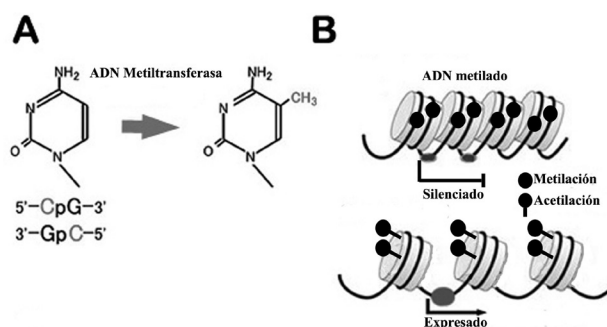


Figura 1. **A.** Agregado del grupo metilo al carbono 5' de la citosina. **B.** Pasaje del estado de cromatina condensada y silenciada, por desacetilación de histonas e hipermetilación del ADN, al estado descondensado y activado en el que la cromatina está desmetilada y acetilada.

EPIALELOS Y VARIACIÓN NATURAL

Los estudios sobre epigenética son recientes; en los últimos años las técnicas de biología molecular han permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos responsables de los fenómenos epigenéticos. Diversos estudios sobre mutantes naturales en plantas como tomate (*Solanum lycopersicum*), maíz (*Zea mays*), *A. thaliana* han demostrado que los fenotipos observados tienen bases epigenéticas. Al comparar secuencias de alelos salvajes y mutantes se comprobó que eran idénticas, sin embargo el número y distribución de los grupos metilo en dichas secuencias variaban y explicaban los diferentes fenotipos observados; a estas mutaciones se las llama "epimutaciones" y a las variantes alélicas "epialelos". En plantas, a diferencia de lo que sucede en los animales en quienes, durante la

gametogénesis, se borran los patrones parentales de metilación y se establecen nuevos patrones, en general los patrones se transmiten en forma estable de generación en generación. Las ADN metiltransferasas de mantenimiento se encargan de incorporar los grupos metilo durante la replicación del ADN y por lo tanto los epialelos son tanto meiótica como mitóticamente estables (Kakutani, 2002).

En plantas se han encontrado varios epialelos estables de ocurrencia natural. Un ejemplo interesante es el mutante Pelórica de *Linaria vulgaris*, descrito por Carl Linnaeus en 1744, donde la simetría bilateral de la flor cambia a una simetría radial en el mutante (Gustafsson, 1979). Cubas et al. (1999) demostraron que el mutante era un epialelo del gen *Lcyc*, que controla la simetría dorsoventral de la flor, el cual estaba altamente metilado y silenciado en el mutante. Esta modificación era heredable y el grado de metilación del gen *Lcyc* se correlacionaba con el fenotipo de la flor, de tal manera que las plantas tipo salvaje estaban parcialmente metiladas, mientras que las pelóricas e intermedias estaban altamente metiladas. Esta epimutación no era totalmente estable presentando reversiones y cierta inestabilidad somática, una misma planta podía tener una rama con flores pelóricas y otra con flores intermedias. Esta es una característica importante de las epimutaciones que la diferencian de las mutaciones genéticas que son estables durante el ciclo de vida de un individuo. El mutante en tomate *Cnr* (*Colorless non-ripening*) produce frutos sin color y pericarpio harinoso. Manning et al. (2006) descubrieron que era una epimutación que apareció en la variedad Liberto de tomate en forma natural. El epialelo *Cnr* en Liberto estaba hipermetilado en la zona promotora del gen y se encontraba silenciado. Al igual que en el caso del epialelo *Lcyc*, la epimutación *Cnr* presenta reversiones con cambios de color en el mismo fruto. Se han descrito otros epialelos naturales en plantas, tales como el alelo *PI* que altera la pigmentación en maíz (Hollick et al., 1995), el silenciamiento del gen *pai2* que afecta la biosíntesis de triptófano (Bender y Fink, 1995; Melquist et al., 1999) y el gen *bal* que produce enanismo y aumento de la resistencia a patógenos en *A. thaliana* (Stokes et al., 2002). Los ejemplos citados indican que los epialelos tienen características distintivas de las mutaciones génicas y que constituyen un fenómeno de importancia desde el punto de vista evolutivo.

La metilación global de citosinas puede ser inferida indirectamente usando enzimas de restricción sensibles a la metilación. El tratamiento con los isoesquizómeros *HpaII* y *MspI*, que reconocen sitios 5'-CCGG-3', y posterior ligamiento de adaptadores y amplificación por PCR (*MSAP- Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism*) o hibridación con sondas específicas (*Southern blots*) se usan normalmente para monitorear el nivel de metilación dentro del genoma. Estudios recientes utilizando estas técnicas demostraron que dentro de poblaciones naturales de plantas existe variabilidad en los patrones de metilación (Cervera et al., 2002; Riddle y Richards, 2002). Marfil et al. (2009), estudiando una población natural de *Solanum ruiz-lealii*, observaron escasa variabilidad genética medida por AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) y demostraron que plantas que tenían menos de un 4% de variabilidad genética presentaban un 28% de variabilidad epigenética. En algodón se encontraron altos niveles de polimorfismo de metilación que excede el polimorfismo medido por RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) (Keyte et al., 2006). De la misma manera, (Riddle y Richards, 2002) determinaron que, mientras la variación entre líneas de *Arabidopsis* era mínima, la variación natural para los sitios metilados era significativamente superior. T

HIBRIDACIÓN INTERESPECÍFICA Y SHOCK GENÓMICO

El genoma está sometido a estreses de diferentes tipos. McClintock (1984) propuso el término estrés genómico para referirse a todas aquellas respuestas no programadas a un cambio inusual que conduce a una reestructuración extensiva del genoma. McClintock se refiere básicamente a cuatro causas de estrés: 1) cultivo de tejidos, 2) ataque de patógenos, 3) contaminantes de varios tipos y 4) cruzamientos interespecíficos.

La hibridación interespecífica tanto a nivel diploide (homoploide) como poliploide (aloploiploide) es un mecanismo importante en la evolución y especiación de las angiospermas (Hegarty y Hiscock, 2005).

La unión en un núcleo híbrido de dos genomas diferentes promueve una serie de remodelaciones del genoma, tanto genéticas como epigenéticas. Una forma de determinar el origen híbrido es utilizar

marcadores moleculares, donde marcadores específicos de las especies parentales pueden ser identificados en el híbrido. Sin embargo, estudios recientes demuestran que tanto los híbridos diploides como poliploides experimentan remodelaciones genéticas y epigenéticas que pueden llevar a la aparición de nuevos fragmentos o la desaparición de marcadores parentales en el híbrido. En híbridos poliploides entre *A. thaliana* y *A. arenosa* se observó inestabilidad fenotípica, cambios en la expresión génica y en los patrones de metilación (Comai, 2000; Madlung *et al.*, 2002). En autopoliploides sintéticos de *Paspalum* y *Eragrostis* se detectaron remodelaciones genéticas y alteraciones en la expresión de genes (Martelotto *et al.*, 2005; Mecchia *et al.*, 2006). En híbridos sintéticos entre *Solanum kurtzianum* y *S. tuberosum* se encontraron reestructuraciones genéticas detectadas por AFLP y cambios epigenéticos, específicamente en los patrones de metilación, en híbridos F1 y retrocruzas (Marfil *et al.*, 2006).

Una de las consecuencias más interesantes de la hibridación, como disparador del “shock genómico”, es la activación y movilización de elementos transponibles (ET), tales como transposones y retrotransposones. Se observó una activación masiva de ET en híbridos entre especies de *Helianthus* (Ungerer *et al.*, 2006). Trabajando con cruzamientos intergenéricos en arroz, se ha descrito una amplia activación de ET acompañada de inestabilidades epigenéticas (Wang *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 1999). No se conocen los mecanismos que podrían activar a los ET, sin embargo es posible que por efecto de la hibridación se remuevan o remodelen marcas epigenéticas en regiones promotoras y como consecuencia se produzca una movilización masiva de estos. Michalak (2009) afirma que la activación de ET se encuentra íntimamente ligada a la regulación epigenética y de pequeños ARNs. La mayoría de los elementos repetitivos en el ADN eucariota moderadamente repetitivo está compuesto por ETs. En general la actividad de transposones es desfavorable y posiblemente tanto la metilación del ADN como los pequeños ARNs surgieron como mecanismos de control y represión de estos elementos.

EPIGENÉTICA Y EVOLUCIÓN

En híbridos sintéticos y naturales de *Solanum* se encontró que: a) plantas que presentaban flores anormales compartían un patrón de metilación similar, el cual a su vez era diferente al de las plantas con flores normales, b) la desmetilación química de plantas con flores normales daba lugar a flores anormales, c) ciertas secuencias eran particularmente sensibles a remodelar su metilación (Marfil *et al.*, 2006; Marfil *et al.*, 2009). Estos resultados muestran que en poblaciones naturales de papa se pueden estar generando variaciones epigenéticas por efecto de la hibridación. La Figura 2 ilustra como a través de un shock genómico por hibridación se producen alteraciones epigenéticas que dan lugar a variaciones fenotípicas que, en el caso de las especies de papa, pueden estar sujetas a la acción de la selección natural al tener la posibilidad de mantenerse por reproducción clonal (tubérculos) por varias generaciones. Este proceso podría dar lugar a la generación de nuevas formas, ecotipos o especies.

La hibridación induce una serie de cambios tanto genéticos como epigenéticos en el genoma, estando algunos de estos mediados por elementos transponibles (Chase *et al.*, 2010). Estos cambios resultan en la generación de epialelos que son metaestables (eventualmente reversibles) y potencialmente influenciados por el ambiente; es innegable que este tipo de variación epigenética heredable tiene implicancias relevantes en la evolución de las poblaciones naturales. Las novedades fenotípicas generadas como: a) cambios en el tiempo de floración, b) alteraciones en las estructuras florales (simetría de la flor, color de la flor, aberraciones florales, etc), c) disminución en la fertilidad de polen, conducirían a un aislamiento reproductivo de los híbridos en relación a las especies progenitoras; si la planta híbrida poseyera cierta fertilidad podrían establecerse como una nueva especie. Sin embargo, no se cuenta con suficiente información para evaluar como la selección natural actúa sobre este tipo de epialelos, que pueden potencialmente responder a cambios ambientales y revertir su fenotipo.

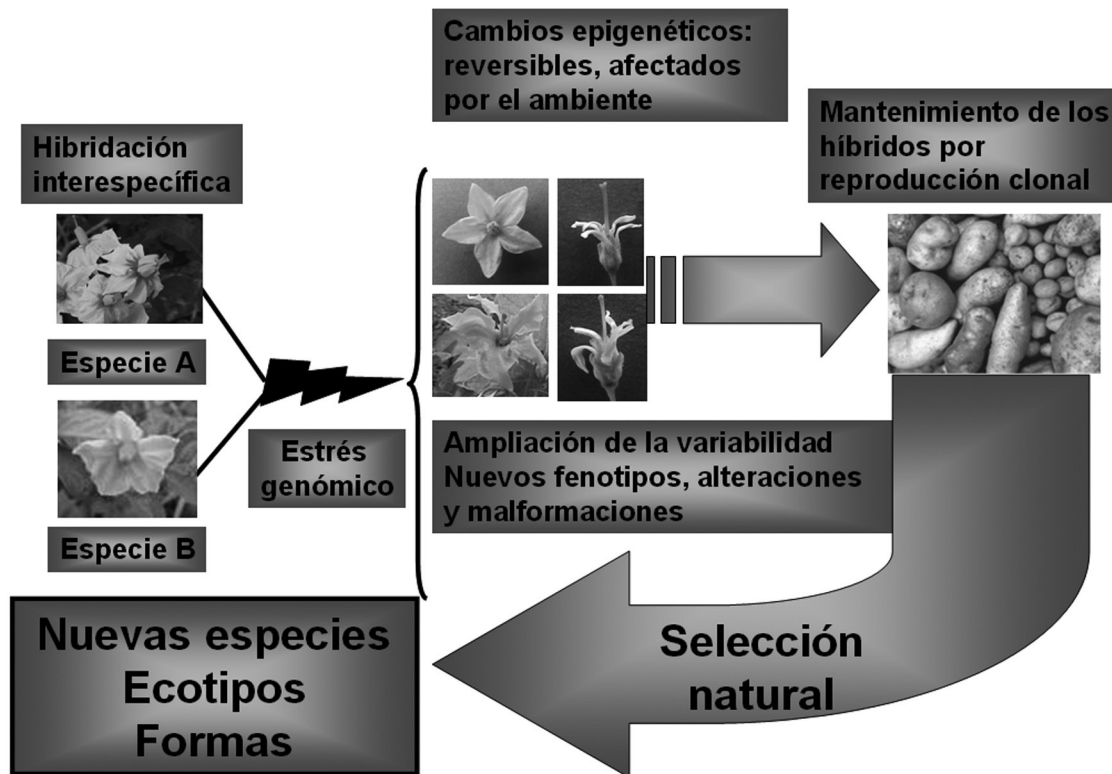


Figura 2. Modelo hipotético de evolución epigenética en el que por efecto de la hibridación interespecífica en *Solanum* se induce un shock genómico que produce cambios epigenéticos. Estos cambios dan lugar a fenotipos nuevos sobre los que puede actuar la selección natural, originando nuevas especies.

BIBLIOGRAFÍA

- Bastow, R., Mylne, J.S., Lister, C., Lippman, Z., Martienssen, R.A. and Dean, C. (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of *FLC* by histone methylation. *Nature* 427: 164–167.
- Bender, J., Fink, G. R. (1995) Epigenetic control of an endogenous gene family is revealed by a novel blue fluorescent mutant of *Arabidopsis*. *Cell* 83: 725-734.
- Bernstein, E., Allis, C.D. (2005). RNA meets chromatin. *Genes Dev* 19: 1635-1655.
- Brzeski, J. and Jerzmanowski, A. (2003). Deficient in DNA methylation 1 (*DDM1*) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J Biol Chem* 278, 823–828.
- Cervera, M. T., Ruiz-García, L., Martínez-Zapater, J. M. (2002) Analysis of DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* based on methylation-sensitive AFLP markers. *MGG* 268: 543-552.
- Chase, M., Paun, O., Fay, M. (2010) Hybrid matic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* geneization and speciation in angiosperms: a role for pollinator shifts. *BMC Biology* 8: 45.
- Colot, V., Rossignol, J. L. (1999) Eukaryotic DNA methylation as an evolutionary device. *BioEssays* 21: 402-411.
- Comai, L. (2000) Genetic and epigenetic interactions in allopolyploid plant. *PMB* 43: 387-399.

- Cubas, P., Vincent, C., Coen, E. (1999) An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature* 401: 157-161.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Deplus, R., Kouzarides, T. (2003) The DNA methyltransferases associate with HP1 and the SUV39H1 histone methyltransferase. *Nucleic Acids Res* 31:2305-2312.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V., Martienssen, R.A. (2002) Dependence of heterochromatin DDM1. *Science* 267:1861-1863.
- Gustafsson, A. (1979) Linnaeus peloria: the history of a monster. *Theor Appl Gen* 54: 241-248.
- Hegarty, J. M., Hiscock, S. J. (2005) Hybrid speciation in plants: new insights from molecular studies. *New Phytologist* 165: 411-423.
- Hollick, J. B., Patterson, G. I., Coe-Jr., E. H., Cone, K. C., Chandler, V. L. (1995) Allelic interactions heritably alter the activity of a maize pl allele. *Genetics* 141: 709-719.
- Kakutani, T. (2002) Epi-alleles in plants: Inheritance of epigenetic information over generations. *Plant Cell Physiol* 43: 1106-1111.
- Kankel, M. W., Ramsey, D. E., Stokes, T. L., Flowers, S. K., Haag, J. R., Jeddloh, J. A., Riddle, N. C., Verbitsky, M. L., Richards, E. J. (2003) Arabidopsis MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics* 163: 1109-1122.
- Keyte, A. L., Percifield, R., Liu, B., Wendel, J. F. (2006) Intraspecific DNA Methylation Polymorphism in Cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *J Hered* 97: 444-450.
- Liu, B., Piao, H., Zhao, F., Liu, Z., Huang, B. (1999) DNA methylation changes in rice induced by *Zizania latifolia* (Griseb.) DNA introgression. *Hereditas* 131: 75-78.
- Madlung, A., Masuelli, R. W., Watson, B., Reynolds, S. H., Davison, J., Comai, L. (2002) Remodeling of DNA methylation and phenotypic and transcriptional changes in synthetic Arabidopsis allotetraploids. *Plant Physiol* 129: 733-746.
- Manning, K., Tor, M., Poole, M., Hong, Y., Thompson, A. J., King, G. J., Giovannoni, J. J., Seymour, G. B. (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat Genet* 38: 948-952.
- Marfil, C., Camadro, E., Masuelli, R. (2009) Phenotypic instability and epigenetic variability in a diploid potato of hybrid origin, *Solanum ruiz-lealii*. *BMC Plant Biology* 9: 21.
- Marfil, C. F., Masuelli, R. W., Davison, J., Comai, L. (2006) Genomic instability in *Solanum tuberosum* x *Solanum kurtzianum* interspecific hybrids. *Genome* 49: 104-113.
- Martelotto, L. G., Ortiz, J. P. A., Stein, J., Espinoza, F., Quarín, C. L., Pessino, S. C. (2005) A comprehensive analysis of gene expression alterations in a newly synthesized *Paspalum notatum* autotetraploid. *Plant Sci* 169: 211-220.
- Martienssen, R. A., Colot, V. (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. *Science* 293: 1070-1074.
- McClintock, B. (1984) The significance of responses of the genome to challenge. *Science* 226: 792-801.
- Mecchia, M. A., Ochogavía, A., Selva, J. P., Laspina, N., Felitti, S., Martelotto, L., Spangenberg, G., Echenique, V., Pessino, S. C. (2006) Genome polymorphisms and gene differential expression in a 'back-and-forth' ploidy-altered series of weeping lovegrass (*Eragrostis curvula*). *J Plant Physiol* 164: 1051-1061.
- Melquist, S., Luff, B., Bender, J. (1999) Arabidopsis PAI gene arrangements, cytosine methylation and expression. *Genetics* 153: 401-413.
- Michalak, P. (2009) Epigenetic, transposon and small RNA determinants of hybrid dysfunctions. *Heredity* 102: 45-50.
- Richards, E.J. (2006) Inherited epigenetic variation - revisiting soft inheritance. *Nat Rev Genet* 7:395-401.
- Riddle, N. C., Richards, E. J. (2002) The control of natural variation in cytosine methylation in Arabidopsis. *Genetics* 162: 355-363.
- Stokes, T. L., Kunkel, B. N., Richards, E. J. (2002) Epigenetic variation in Arabidopsis disease resistance. *Genes Dev* 16: 171-182.
- Ungerer, M. C., Strakosh, S. C., Zhen, Y. (2006) Genome expansion in three hybrids sunflower species is asso-

ciated with retrotransposon proliferation. *Curr Biol* 16: 876-873.

Wang, H., Chai, Y., Chu, X., Zhao, Y., Wu, Y., Zhao, J., Ngezahayo, F., Xu, C. G., Liu, B. (2009) Molecular characterization of a rice mutator-phenotype derived from an incompatible cross-pollination reveals trans-generational mobilization of multiple transposable elements and extensive epigenetic instability. *BMC Plant Biology* 9: 63.

Wassenegger, M. (2005) The rol of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* 122:13-16.

- Received **20/05/2010**

- Accepted **29/08/2011**