

Zmiany ilościowe metylacji DNA indukowane przez światło monochromatyczne u regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze androgenезy

Quantitative changes in DNA methylation induced by monochromatic light in barley regenerants obtained by androgenesis

Patrycja Siedlarz, Sławomir Bany, Krystyna Rybka ✉

Zakład Biochemii i Fizjologii Roślin

Instytut Hodowli i Aklimatyzacji Roślin- Państwowy Instytut Badawczy, 05-870 Radzików

✉ k.rybka@ihar.edu.pl

Zmiany metylacji DNA to jeden z najlepiej poznanych mechanizmów epigenetycznej regulacji ekspresji genów, który w procesie indukowanej androgenезy związany jest z przeprogramowaniem rozwoju haploidalnych mikrospor w kierunku wytworzenia zarodków, w skutek ekspozycji pylników w kłosach a następnie kultur pylnikowych na czynniki stresowe. Celem przeprowadzonych badań było sprawdzenie hipotezy, czy zastosowanie światła monochromatycznego w trakcie indukowanej androgenезy może być związane ze zjawiskami epigenetycznymi. Badania przeprowadzono na roślinach DH jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) uzyskanych na drodze androgenезy modyfikowanej przez światło monochromatyczne: niebieskie, zielone i czerwone. Ilościową ocenę wpływu światła na stopień metylacji DNA wykonano za pomocą RP-HPLC porównując DNA regenerantów uzyskanych w standardowych, kontrolnych, warunkach (ciemność) z DNA regenerantów uzyskanych z wykorzystaniem światła. Stwierdzono, że różnice w ilości zmetylowanej cytydyny w porównaniu do kontroli wynoszą odpowiednio 0,40%, 0,16% i -0,55%, dla światła niebieskiego, czerwonego i zielonego, przy poziomie całkowitej metylacji genomu 21,32-21,52%. Zmiany całkowitej metylacji genomu jęczmienia zachodzące pod wpływem światła monochromatycznego zastosowanego na etapie formowania kalusa w procesie androgenезy w kulturach pylnikowych, oznaczone za pomocą RP-HPLC, są istotne aczkolwiek nieduże.

Słowa kluczowe: RP-HPLC, *Hordeum vulgare* L., LED, cytidine

Changes in DNA methylation are one of the best known mechanisms of epigenetic regulation of gene expression, which in the process of induced androgenesis is associated with reprogramming of haploid microspores development towards the formation of embryos, as a result of exposure of anthers in ears and then anthers culture in vitro to stress factors. The aim of the study was to test the hypothesis of whether the use of monochromatic light during induced androgenesis might be associated with epigenetic phenomena. The experiments were carried out on DH plants of spring barley (*Hordeum vulgare* L.) obtained by androgenesis modified by monochromatic light: blue, green and red. A quantitative evaluation of the effect of light on the degree of DNA methylation was performed using RP-HPLC for the comparison of regenerants obtained under standard, control conditions (darkness) with those obtained with light usage. The differences in the amount of methylated cytidine in comparison to the control were: 0.40%, 0.16% and -0.55%, for blue, red and green light, respectively. The level of global genomic DNA methylation from control plants was in the range 21.32-21.52%. Methylation changes in response to monochromatic light used during callus formation in anthers culture, determined by RP-HPLC, are significant although small.

Key words: RP-HPLC, *Hordeum vulgare* L., LED, cytidine

Wstęp

Metylacja DNA to, zachodząca podczas fazy S cyklu komórkowego, modyfikacja kwasu dezoksyrybonukleinowego przebiegająca pod wpływem metylotransferaz DNA, specyficznych względem zasad azotowych: cytozyny bądź adeniny wchodzących w skład nukleotydów: dezoksycytydyny (dC) i dezoksyadenozyny (dA). Polega ona

na przyłączaniu grup metylowych (-CH₃) głównie do piątego atomu węgla w pierścieniu pirymidynowym oraz rzadziej na metylacji grup NH₂⁺ znajdujących się bądź przy 4 atomie węgla cytozyny bądź przy 6 atomie węgla adeniny (zasady purynowej). Metylacja występująca w dinukleotydach CpG i trinukleotydach CpXpG, gdzie X oznacza A, T, C określana jest jako metylacja symetryczna, natomiast w sekwencjach CpXpX,

jako niesymetryczna. Donorem grupy metylowej jest 5'-adenozynometionina a produktami reakcji są: 5-metyl-2'-deoksycytydyna (5mdC), główny produkt reakcji metylacji DNA a także N₄-metylo-deoksycytydyna oraz N₆-metylo-deoksyadenozyna. Zawartość 5mdC jest warunkowana zarówno przez enzymatycznie katalizowaną reakcję metylacji jak i demetylacji, która to może przebiegać w sposób pasywny bądź aktywny. Do demetylacji pasywnej dochodzi w trakcie replikacji, której nie towarzyszy metylotransferaza-1 (DNMT1) co skutkuje brakiem metylacji zachowawczej (Guz i in., 2010). Natomiast demetylacja aktywna katalizowana jest przez dwufunkcyjne glikozylazy DNA z rodziny DEMETER w trakcie naprawy błędów replikacyjnych (Li i in. 2018), jest także związana z modyfikacjami histonów i najprawdopodobniej, niekodującego RNA (Parrilla-Doblas i in., 2019, Zhang i in., 2012). U ssaków ilość 5mdC w stosunku do całkowitej ilości dC wynosi 3-4%, co w proporcji do wszystkich nukleozydów stanowi 0,75-1%. (Guz i in., 2010). Ocenia się, że u ssaków 70-80% dinukleotydów CpG w całym genomie jest zmetylowanych (Law i Jacobsen, 2010). W roślinach ilość zmetylowanej cytydyny w genomie wynosi 20-30% (Finnegan i in., 1998). U *Arabidopsis thaliana* obserwuje się poziom metylacji CpG, CpXpG i CpXpX odpowiednio około 24%, 6,7% i 1,7% (Law i Jacobsen, 2010). Stopień metylacji DNA zmienia się wraz z wiekiem tkanek, a metylacja niezwiązana z wyspami CpG jest charakterystyczna dla różnicujących się komórek (Peredo i in., 2006).

Proces androgenezy *in vitro*, któremu poddaje się haploidalne mikrospory pozwala na przeprogramowanie ich rozwoju z gametofitowego, prowadzącego do powstania funkcjonalnych ziaren pyłku, na sporofitowy, w wyniku którego uzyskiwane są zarodki a z nich rośliny. Proces ten związany jest ze zmianami metylacji genomowego DNA. Aczkolwiek aspekty regulacji epigenetycznej zarówno rozwoju zarodków jak i chorób nowotworowych są dość dobrze poznane u ssaków (Guz i in., 2010), to sposób resetowania wzorów metylacyjnych DNA roślinnego pozostaje w dużej mierze niezbadany. Zmiany wzorów metylacyjnych genomowego DNA w tkankach roślinnych mogą pojawiać się pod wpływem stresów środowiskowych i są związane z systemem sygnałnym indukowanym w komórkach przez zmiany potencjału oksydacyjno-redukcyjnego (Bednarek i Orłowska, 2020). Wykazano, że zmiany te są specyficzne dla poszczególnych gatunków, a nawet różnią się w obrębie genotypów (Karan i in., 2012). Również regeneracja roślin w kulturach *in vitro* indukuje zmienność w poziomie metylacji

DNA. Zależy ona od systemu otrzymywania regenerantów, genotypu roślin donorowych, eksplantatu, składu pożywki a także czasu trwania kultury. Do czynników które potencjalnie mogą wpływać na metylację DNA możemy zaliczyć również światło. Stwierdzono, że ilość metylowanej cytydyny w DNA regenerantów DH jęczmienia uzyskanych w procesach androgenezy jak i somatycznej embriogenezy rośnie w porównaniu do rośliny donorowej natomiast w genomie pszenżyta – maleje (Machczyńska i in., 2014; Orłowska i in., 2016). Jednakże jeżeli zostanie przeprowadzony kolejny cykl generatywny jeden lub więcej, to w kolejnych pokoleniach otrzymywanych w ten sposób ilość 5mdC stabilizuje się. Zmianom ilościowym towarzyszą zmiany wzorów metylacyjnych (Bednarek i Orłowska, 2020; Machczyńska i in., 2014; Niedziela, 2018; Orłowska i in., 2016).

Ilościową analizę zmian metylacji genomu można prowadzić za pomocą chromatografii cieczowej RP-HPLC (Reversed Phase-High Performance Liquid Chromatography). Metoda RP-HPLC była stosowana do analizy zmian poziomu metylacji DNA roślin zbożowych znajdujących się pod wpływem stresu abiotycznego (Niedziela, 2018) oraz w badaniach wpływu kultur *in vitro* na regeneranty jęczmienia (Orłowska i in., 2016) i pszenżyta (Machczyńska i in., 2014). Celem obecnej pracy było sprawdzenie, czy modyfikacja procesu androgenezy w kulturach pylnikowych *in vitro*, polegająca na zastosowaniu światła monochromatycznego na etapie indukcji kalusa, wpływa na zmiany poziomu metylacji genomowego DNA regenerantów.

Material i Metody

Materiał do badań stanowił DNA z liści regenerantów jęczmienia jarego (*Hordeum vulgare* L.) genotypu 2dh/8, uzyskanych w kulturach pylnikowych prowadzonych w różnych warunkach oświetleniowych na etapie formowania kalusa na pożywce indukującej. Regeneranty były uprawiane w platach, w fitotronie, w temperaturze 18/14°C i fotoperiodzie 16/8h dzień/noc. DNA izolowano z liści roślin w stadium krzewienia. Stopień ploidalności uzyskanych regenerantów określono przy użyciu cytometru przepływowego CyFlow Ploidy Analyser (Sysmex Polska Sp. z o. o.). Sposób realizacji tego etapu doświadczenia i jego szczegółowe wyniki są przedmiotem odrębnej publikacji (Siedlarz i in., 2020). Grupę badaną stanowił DNA regenerantów uzyskanych w wyniku androgenezy *in vitro* modyfikowanej w fazie indukcji kalusa przez światło monochromatyczne LED: niebieskie 454,63 nm, zielone 525,95 nm

i czerwone 630,84 nm a grupę kontrolną DNA regenerantów uzyskanych w standardowych warunkach, tj. przebiegającej w ciemności fazie indukcji kalusa (Orłowska i in., 2016, Bednarek i Orłowska, 2020, Siedlarz i in., 2020). DNA izolowano z par regenerantów uzyskanych z pylników tego samego kłosa: 10 w warunkach kontrolnych i 10 w warunkach modyfikowanych światłem. W sumie 60 prób DNA zostało wyizolowanych z liści roślin w fazie krzewienia za pomocą zestawu DNasy Mini Prepkit (Qiagen GmbH, Hilden, Niemcy), zgodnie z metodą producenta. Stężenie oraz czystość DNA oznaczono przy użyciu spektrofotometru UV-Vis NanoDrop 2000c/2000 (Thermo Scientific, USA). Jakość prób zweryfikowano elektroforetycznie w 1,4% żelach agarozowych.

Ilościową ocenę stopnia metylacji DNA prowadzono techniką RP-HPLC przy użyciu systemu Waters 625 LC z detektorem Waters 996 PDA (Johnston i in., 2005, Orłowska i in., 2016). Po denaturacji DNA w 100°C próby trawiono za pomocą nukleazy P1, a następnie oznaczono dC oraz 5mdC po rozdziale w warunkach izokratycznych na kolumnie Max-RP C12, 4 µm, 150x4,6 mm, firmy Phenomenex (USA), połączonej z przedkolumną 4µ Max-RP C12, wymywanymi eluentem o gradiencie linearnym: 0 – 55% buforu B w czasie 0 - 10 min., 55 – 100% B w czasie 10,1 - 20 min, następnie 100% buforu A przez 5 min, przy przepływie 1 ml/min, gdzie bufor A to: 0.5% metanol w 10 mM KH₂PO₄ pH 3,7 oraz bufor B to: 10% metanol w 10 mM KH₂PO₄ pH 3,7. Detekcję prowadzono spektrofotometrycznie w przy długości fali λ = 280 nm. Za pomocą oprogramowania Millennium 32 v. 4.0 określano procentowy udział 5-metylocytyzyny (5mdC) w analizowanych preparatach. Dla każdej badanej próby wyznaczano wartość procentową całkowitej metylacji genomowego DNA z ilorazu zawartości 5-metyl-2'-deoksycytydyny w stosunku do sumy: 2'-deoksycytydyny i 5-metyl-2'-deoksycytydyny: 5mdC [%] = [5mdC / (5mdC + dC)] x 100. Uzyskane wyniki poddano analizie wariancji ANOVA i wyznaczono grupy jednorodne na podstawie testu Tukeya.

Wyniki i Dyskusja

Poprzez zrealizowane doświadczenie sprawdzono czy modyfikacja procesu androgenyzy *in vitro* polegająca na zastosowaniu światła monochromatycznego na etapie indukcji kalusa, wpływa na zmiany poziomu metylacji genomowego DNA regenerantów. Analizie ilościowej poddano DNA wyizolowane z 60 roślin, a dokładniej 30 par roślin, uzyskanych w warunkach kontrolnych

i modyfikowanych światłem. Ponieważ roślinę donorową charakteryzował ustabilizowany poziom metylacji DNA, gdyż pochodziła ona z rozmnożeń generatywnych (Orłowska i in., 2016), zakładamy, że zmiany zaobserwowane w niniejszym doświadczeniu zostały indukowane przez światło. Nie ma dostępnych informacji, ile dokładnie cykli generatywnych jest potrzebnych do ustabilizowania/wyeliminowania (jeśli to w ogóle możliwe) wpływu kultur tkankowych na poziom metylacji DNA. Niemniej jednak wykazano, że zarówno w genomie jęczmienia jak i pszenżyta poziom metylacji stabilizuje się po jednym/dwóch cyklach (Machczyńska i in., 2014, Orłowska i in., 2016). Tak więc, aby ustabilizować zmiany metylacji DNA indukowane w regenerantach podczas hodowli tkankowych *in vitro*, należy rozważyć zastosowanie jako potomstwo regenerantów jako rośliny donorowe. Całkowity zakres zmian metylacyjnych genomu jęczmienia oznaczony w obecnym eksperymencie był niewielki i zawierał się w granicach 21,12-21,87%. Również Orłowska i in. (2016) wykazała dla odmiany jęczmienia Scarlett stopień metylacji genomu rośliny donorowej 17,86% natomiast zakres zmienności całkowitej metylacji DNA regenerantów i kolejnych dwóch pokoleń generatywnych zawierał się w granicach 19,88-20,09%. Machczyńska i in. (2014) dla pszenżyta (odmiana Bogo) wykazała podobny trend. Niezależnie od metody prowadzenia kultur *in vitro* (androgenyza w kulturach pylnikowych vs embriogeneza) całkowita metylacja DNA, oznaczana techniką RP-HPLC wynosiła 25,4% w przypadku roślin donorowych, w generatywnie otrzymanym pierwszym pokoleniu obniżała się do 23,6% a następnie nieco się podnosiła, różnicując P2 od P1, lecz już nie różnicowała dalszych pokoleń. Należy zauważyć, że poziom całkowitej metylacji DNA jak również zmiana poziomu metylacji w skutek rozmnażania *in vitro* zależą od genomu; np. stopień metylacji DNA roślin donorowych goryczki pannońskiej (*Gentiana pannonica* Scop), wynosił 22,3%, podczas gdy u regenerantów zawierał się w granicach 28,1 – 30,9% (Fiuk i in., 2010).

W prezentowanym obecnie doświadczeniu całkowita ilość 5dmC w DNA roślin kontrolnych wynosiła średnio 21,4% i nie różnicowała badanych regenerantów uzyskanych w warunkach niemodyfikowanych światłem (Tab. 1). Natomiast w grupie regenerantów uzyskanych przy użyciu światła na etapie indukcji kalusa zaobserwowano różnice: dla warunków światła niebieskiego ilość 5dmC była najmniejsza, istotnie różna od wartości zarejestrowanej dla paralelnych roślin kontrolnych natomiast dla światła zielonego, największa

i również różna od grupy kontrolnej (Tab. 1). Wyniki uzyskane dla grupy poddanej działaniu światła czerwonego były ambiwalentne. Nie różniły się istotnie od wartości uzyskanej dla grupy roślin spod światła niebieskiego, jednakże nie różniły się także od roślin kontrolnych. Różnica w ilości zmetylowanej cytydiny między kontrolą a światłem wynosiła średnio: +0,40%, +0,16% oraz -0,55% dla światła niebieskiego, czerwonego oraz zielonego (Rys. 1). W regenerantach uzyskanych spod oświetlacza czerwonego, różnice względem kontroli wahały się od -0,86% do +0,92%. Wyniki dla tego zakresu widma światła widzialnego są ambiwalentne i wymagają dalszych badań.

Opisane w literaturze zmiany w poziomie globalnej metylacji cytydiny w roślinach zbożowych indukowane pod wpływem rozmnażania generatywnego dotyczyły głównie porównywań między roślinami donorowymi i regenerantami w warunkach standardowych dla laboratorium prowadzącego te eksperymenty, bądź między

zastosowanymi systemami regeneracji roślin. Interesujące jest, że w obrębie gatunku *Hordeum vulgare* L. hodowla *in vitro* form dzikich powodowała zmiany metylacji cytozyny zarówno pod względem poziomu, jak i wzoru w porównaniu z rośliną donorową u której stwierdzano wyższy poziom metylacji (Li i in., 2007). Odwrotną zależność obserwowano w przypadku jęczmienia odmiany Scarlett, gdyż najniższą średnią wartość globalnej metylacji zaobserwowano u roślin donorowych, podczas gdy średnia wartość dla regenerantów i ich potomstwa wynosiła odpowiednio 20% i 20,13%. (Orłowska i in., 2016). W DNA pszenżyta obserwowano wyższy poziom metylacji dla roślin uzyskanych w kulturach samoistnie uwalniających się mikrospor, w porównaniu do regenerantów z kultury niedojrzałych zarodków zygocytynych. Wykazano różnice między roślinami donorowymi a regenerantami. Średnia metylacja genomu roślin donorowych wynosiła 25,4%, natomiast regenerantów 24,1%, pierwszego pokolenia generatywnego 23,6%, drugiego 23,8% i trzeciego pokolenia generatywnego 23,9%. (Machczyńska i in., 2014). Zmiany w poziomie metylacji genomowego DNA są charakterystyczne dla każdego gatunku, zależą również od warunków hodowli *in vitro*. Ekspozycja na światło UV-B sadzonek bylicy rocznej, uzyskanych z pędów merystemu wierzchołkowego, indukowała znaczące obniżenie całkowitego poziomu metylacji DNA (Pandev i Pandev-Rai. 2015). Przedstawione

Tabela 1
Table 1

Średnia ilość zmetylowanej cytydiny [%] w DNA genomowym regenerantów jęczmienia uzyskanych na drodze androgenyzy w warunkach standardowych (kontrola) oraz w warunkach modyfikowanych przez światło monochromatyczne o barwie niebieskiej, zielonej bądź czerwonej.

The average amount of methylated cytidine [%] in the genomic DNA of barley regenerants obtained by androgenesis under standard conditions (control) and conditions modified by blue, green or red monochromatic light.

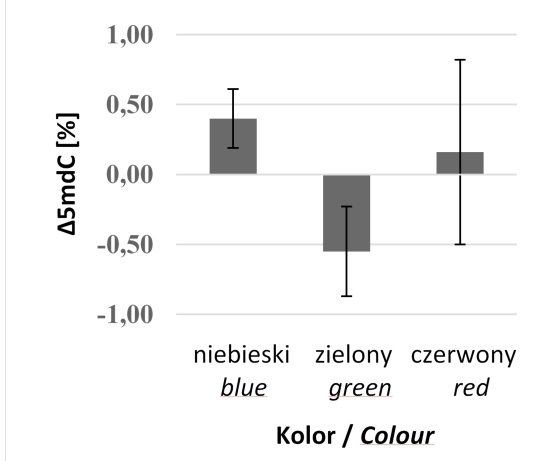
5dmC [%]		
warunki androgenyzy androgenesis condition		
światło light	kontrola control	światło light
niebieskie blue	21.52 a	21.12 b **
zielone green	21.32 a	21.87 a **
czerwone red	21.45 a	21.29 b nd

Wartości oznaczone tą samą literą nie różnią się istotnie w grupie regenerantów kontrolnych (kontrola) i grupie regenerantów uzyskanych w warunkach modyfikowanych światłem (światło) (liczby w kolumnie)

** istotna różnica z $P \geq 95\%$ (nd – brak różnic) pomiędzy stopniem metylacji regenerantów uzyskanych w warunkach kontrolnych a stopniem metylacji regenerantów uzyskanych w warunkach modyfikowanych światłem (liczby w wierszach)

Values marked with the same letter do not differ significantly in the group of control regenerants (control) and the group of regenerants obtained under conditions modified by light (light) (numbers in a column)

** significant difference with $P \geq 95\%$ (nd - no differences) between the level of methylation of regenerants obtained under control conditions and the level of methylation of regenerants obtained under conditions modified by light (numbers in rows)



Rys. 1. Średnie różnice [%] w ilości zmetylowanej cytydiny w DNA regenerantów uzyskanych na drodze androgenyzy prowadzonej w warunkach kontrolnych i warunkach modyfikowanych światłem niebieskim, zielonym i czerwonym z zaznaczoną wartością odchylenia standardowego, na podstawie wyników uzyskanych dla 10 par regenerantów z każdego warunków świetlnych.

Fig. 1. Average differences [%] in the amount of methylated cytidine in the DNA of regenerants obtained by androgenesis under control conditions and conditions modified by blue, green and red lights, with marked standard deviation, based on the results obtained for 10 pairs of regenerants from each light condition.

wyniki wskazują, że również rodzaj zastosowanego światła monochromatycznego w trakcie indukcji kalusa w kulturach pylnikowych *in vitro* wywołuje zmiany w poziomie metylacji genomowego DNA, w sposób zależny od zastosowanej długości fali światła, czyli od koloru światła monochromatycznego.

Wnioski

Wykorzystanie światła monochromatycznego w androgenezie w czasie inkubacji pylników na pożywce indukującej wpływa na niewielkie, lecz istotne zmiany metylacji DNA genomowego. Poziom metylacji jest zależny od długości fali zastosowanego światła.

Część wyników została zaprezentowana podczas Konferencji Dni Młodego Naukowca w 2019 r. w Radzikowie.

Literatura

- Bednarek P. T., Orłowska R. 2020. Plant tissue culture environment as a switch-key of (epi)genetic changes. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 140: 245 – 257.
- Finnegan E. J., Genger R. K., Peacock W. J., Dennis E. S. 1998. DNA methylation in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 49(1): 223 – 247.
- Fiuk A., Bednarek P. T., Rybczyński J. J. 2010. Flow Cytometry, HPLC-RP, and metAFLP Analyses to Assess Genetic Variability in Somatic Embryo-Derived Plantlets of *Gentiana pannonica* Scop. *Plant Mol. Biol. Rep.* 28: 413 – 420.
- Guz J., Foksiński M., Oliński R. 2010. Mechanizm metylacji i demetylacji DNA – znaczenie w kontroli ekspresji genów [Eng.: Mechanism of DNA methylation and demethylation – its role in control of genes expression]. *Post. Bioch.* 56(1): 7 – 15.
- Johnston J. W., Harding K., Bremner D. H., Souch G., Green J., Lynch P. T., Grout B., Benson E. E. 2005. HPLC analysis of plant DNA methylation: a study of critical methodological factors. *Plant Physiol. Biochem.* 43(9): 844 – 853.
- Karan R., DeLeon T., Biradar H., Subudhi P. K. 2012. Salt stress induced variation in DNA methylation pattern and its influence on gene expression in contrasting rice genotypes. *PLoS One* 7(6): e40203.
- Law J. A., Jacobsen S. E. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Gen.* 11(3): 204 – 220.
- Li X., Yu X., Wang N., Feng Q., Dong Z., Liu L., Liu B. 2007. Genetic and epigenetic instabilities induced by tissue culture in wild barley (*Hordeum brevisubulatum* Trin.). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 90(2): 153 – 168.
- Machczyńska J., Orłowska R., Zimny J., Bednarek P. T. 2014. Extended metAFLP approach in studies of the tissue culture induced variation (TCIV) in case of triticale. *Mol. Breed.* 34(3): 845 – 854.
- Niedziela A. 2018. The influence of Al³⁺ on DNA methylation and sequence changes in the triticale (*× Triticosecale* Wittmack) genome. *J. Appl. Gen.* 59(4): 405 – 417.
- Orłowska R., Machczyńska J., Oleszczuk S., Zimny J., Bednarek P. T. 2016. DNA methylation changes and TE activity induced in tissue cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.) *J. Biol. Res.-Thessalonike* 23(1): 19.
- Pandey N., Pandey-Rai S. 2015. Deciphering UV-B-induced variation in DNA methylation pattern and its influence on regulation of DBR2 expression in *Artemisia annua* L. *Planta* 242(4): 869 – 879.
- Parrilla-Doblas J. T., Roldan-Arjona T., Ariza R. R., Cordoba-Canero D. 2019. Active DNA Demethylation in Plants. *Int. J. Mol. Sci.* 20(19): 4683.
- Peredo E. L., Revilla M. Á., Arroyo-García R. 2006. Assessment of genetic and epigenetic variation in hop plants regenerated from sequential subcultures of organogenic calli. *J. Plant Physiol.* 163(10): 1071 – 1079.
- Siedlarz i in. 2020 (w przygotowaniu).
- Zhang H., Zhu J. K. 2012. Active DNA demethylation in plants and animals. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 77: 161 – 173.

