



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Participación de la proteína
ARGONAUTA 4 en
respuesta a estrés durante la
germinación de *Arabidopsis thaliana***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

Bióloga

PRESENTA:

Daniela Flores Espino

TUTORA

**Dra. Alejandra Alicia Covarrubias
Robles**

Ciudad Universitaria, CD. MX.

enero 2019





Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

1. Datos del Alumno

Apellido Paterno
Apellido Materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

2. Datos del tutor

Grado
Nombre(s)
Apellido Paterno
Apellido Materno

3. Datos del sinodal 1

Grado
Nombre(s)
Apellido Paterno
Apellido Materno

4. Datos del sinodal 2

Grado
Nombre(s)
Apellido Paterno
Apellido Materno

5. Datos del sinodal 3

Grado
Nombre(s)
Apellido Paterno
Apellido Materno

6. Datos del sinodal 4

Grado
Nombre(s)
Apellido Paterno
Apellido Materno

7. Datos del trabajo escrito

Título
Número de páginas
Año

1. Datos del Alumno

Flores
Espino
Daniela
5580219156
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
311084788

2. Datos del tutor

Doctora
Alejandra Alicia
Covarrubias
Robles

3. Datos del sinodal 1

Doctora
Alicia Enriqueta
Brechú
Franco

4. Datos del sinodal 2

Doctora
Tzvetanka
Dimitrova
Dinkova

5. Datos del sinodal 3

Doctora
Adriana
Garay
Arroyo

6. Datos del sinodal 4

Maestro
Octavio
González
Caballero

7. Datos del trabajo escrito

Participación de la proteína
ARGONAUTA 4 en
respuesta a estrés durante la
germinación de *Arabidopsis thaliana*
51 páginas
2019

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

La presente tesis se realizó bajo la tutoría de la Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles en el Depto. de Biología Molecular de Plantas en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México con el apoyo de PAPIIT-DGAPA UNAM IN211816.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Dra. Alejandra Covarrubias por su excelente asesoría y paciencia para guiar este trabajo. Igualmente me gustaría agradecer a la Lic. Rosa María Solorzano por su enseñanza en muchas de las técnicas que realicé para esta tesis. También un sincero reconocimiento a Jesús Moreno por su gran ayuda en la preparación de diversos materiales importantes para la realización de este trabajo.

De igual manera expreso mi profunda gratitud a la Q.F.B. Xochitl Alvarado Affantranger por sus consejos, compañía y paciencia para la toma de fotos requeridas en este trabajo. De la misma forma agradezco al Laboratorio Nacional de Microscopia Avanzada (LNMA) y al resto del personal por facilitarnos el uso de los equipos.

A los miembros de mi comité sinodal: Dra. Alicia Brechú, Dra. Adriana Garay, M. Octavio González y Dra. Tzvetanka Dinkova muchas gracias por tomarse el tiempo de leer y aportar excelentes comentarios para mejorar el escrito final de esta tesis.

Por último, muchas gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México con gratitud especial a la Facultad de Ciencias y al Instituto de Biotecnología como a todos los profesores por su aportación a mi formación académica y personal durante los últimos 5 años.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres María de Jesús Espino y Luis Flores (porque sé que sigues aquí conmigo, en mi corazón) por enseñarme a soñar y darme las herramientas necesarias para alcanzar esos sueños. No hay forma alguna de agradecer una vida de lucha, sacrificios y esfuerzos constantes; solo quiero que sepan que este y todos mis logros, son sus logros, que mi esfuerzo es inspirado en ustedes. Desde el fondo de mi corazón muchísimas gracias por tanto.

Al resto de mi familia, con especial amor a Claudia Flores, Oscar Espino y Lorena Espino gracias por estar y motivarme a ser siempre mejor.

A todos mis amigos de la Facultad, con especial cariño a Fer León por su excentricidad y los buenos consejos tanto en lo académico como en lo personal; a Andy “rompebancas” Trejo por ser la gran amiga que es, gracias por estar siempre dispuesta escucharme, por todas las pláticas largas, consejos, risas y lloriqueos; a Emilio Herrera por su gran amistad y porque juntos aprendimos lo difícil que es la vida de un estudiante en otro estado, gracias por todas las risas; a Jorge Cabral por estar y escucharme en los buenos y malos tiempos, gracias por tan bonita amistad. A mis amigas/hermanas: Zaira Stephania Fermín, Viridiana González y Rebeca Gil por seguirme soportando a pesar de los años y por todo el apoyo y amor que me siguen brindando. Y de manera muy especial a David Rodríguez por ser mi mejor amigo, cómplice y confidente; por escucharme, apoyarme y ayudarme en cada paso que doy, pero sobre todo muchas gracias por creer en mí y por todo el amor que a diario me brindas.

A la Dra. Alejandra Covarrubias por permitirme ser parte de su laboratorio y compartir conmigo el vasto conocimiento que tiene. Gracias por sus pláticas, consejos, regaños y por confiar en mí. Espero que con este trabajo pueda retribuirle lo mucho que ha hecho por mí. A todo el consorcio Covarrubias-Reyes con un especial afecto a Coral Martínez porque has estado para ayudarme con cada pregunta tonta hasta en los peores momentos; a Beatriz Pérez por regañarme siempre, aconsejarme y por todos los apapachos empalagosos; a Omar Rosas por enseñarme que incluso en las peores circunstancias siempre debes dar lo mejor de ti; a César Cuevas por siempre estar dispuesto a enseñarme cosas nuevas y compartir su experiencia conmigo, por último a Miguel Palomar por enseñarme tanto y por su tutoría en la realización de esta tesis.

A mis padres

En memoria de mi papá Luis Flores Chirino que, aunque ya no existe en el plano terrenal, existe y existirá por siempre en mi corazón.

Con todo el amor de mi ser a donde sea que estés

ÍNDICE

Índice	6
Resumen	7
Introducción	
1. <i>Arabidopsis thaliana</i> como modelo de estudio.....	8
2. Semilla y germinación.....	9
Hormonas y su papel en la germinación.....	12
3. Estrés en plantas.....	13
Estrés hídrico.....	14
Estrés oxidativo.....	16
Comunicación ROS y hormonas.....	18
4. Mecanismos epigénéticos y su respuesta a estrés.....	19
Modificaciones de histonas.....	20
Complejos de re-modelamiento de cromatina.....	21
Metilación de DNA.....	22
Metilación de DNA dependiente de RNA (RdDM).....	23
Justificación	25
Hipótesis	26
Objetivos	27
Materiales y métodos	28
Líneas mutantes y condiciones de crecimiento.....	28
Tratamientos de estrés y análisis fenotípico.....	29
Análisis estadístico.....	29
Patrones de acumulación de la proteína ARGONAUTA 4.....	29
Localización tisular de la proteína ARGONAUTA 4.....	30
Resultados	31
Discusión	40
Conclusiones	45
Bibliografía	46

RESUMEN

Las plantas están expuestas a ambientes contrastantes, por lo que cuentan con mecanismos altamente regulados para ejecutar una respuesta eficiente y mantener su homeostasis en condiciones estresantes. La germinación es un proceso clave en el ciclo de vida de las plantas, por lo tanto, han seleccionado mecanismos que controlan diversas rutas que conducen a una germinación exitosa en diferentes entornos que pueden ocurrir durante esta etapa de desarrollo. La respuesta de las plantas al estrés ambiental está modificada epigenéticamente. Una de las vías que ejercen este control es la de la metilación del ADN dependiente de ARN (RdDM). En nuestro grupo hemos demostrado que RdDM modula la germinación en *Arabidopsis thaliana* en presencia de estrés osmótico. Los resultados obtenidos permitieron proponer que la vía de RdDM modula este proceso en otras situaciones ambientales adversas.

Dado que las diferentes condiciones de estrés abiótico producen ambientes intracelulares hiper-oxidantes, en este trabajo se estudió el papel de la vía RdDM durante la germinación de *A. thaliana* contra el estrés oxidativo. Los resultados mostraron que los mutantes en diferentes genes de RdDM presentan una mayor tasa de germinación que las semillas silvestres germinadas en presencia de metil viologenol, lo que indica que esta vía también modula la germinación en condiciones de hiperoxidantes.

En conjunto con estos resultados, se observó que el patrón de expresión de la proteína ARGONAUTA 4 aumenta bajo condiciones de estrés oxidativo, así mismo su patrón de distribución cambia bajo esta condición. Lo que refuerza el papel de RdDM en la germinación durante condiciones hiper-oxidantes. Sin embargo, los fenotipos obtenidos son diferentes de los detectados bajo estrés hiperosmótico, lo que sugiere una diversidad en la regulación por RdDM durante la germinación y abre una línea de investigación que permitirá una mejor comprensión de los mecanismos seleccionados en las plantas para enfrentar situaciones ambientales adversas.

INTRODUCCIÓN

1. *Arabidopsis thaliana* como modelo de estudio

El estudio sobre la respuesta de las plantas ante condiciones adversas derivadas de la interacción con el ambiente u otros organismos ha cobrado gran relevancia en los últimos años. No sólo por la importancia que tiene el conocer cómo las plantas, a pesar de ser organismos sésiles, responden y se han adaptado a los cambios ambientales sino también porque este conocimiento ha permitido y permitirá generar nuevas estrategias para mejorar aquellos cultivos que constituyen parte de nuestra alimentación y de fuentes para nuevos medicamentos, entre otros muchos beneficios. El progreso en estos sectores se debe en parte a la identificación de genes y redes genéticas involucradas en procesos biológicos específicos de las plantas. Para la obtención de dicha información es fundamental tener un modelo vegetal flexible para trabajar en condiciones de laboratorio y que sea manipulable para realizar diversas técnicas como lo es la modificación genética, una técnica poderosa e indispensable en el campo de la biología experimental.

Arabidopsis thaliana es una angiosperma herbácea, dicotiledónea que está clasificada dentro de la familia de las brasicáceas. Tiene características que la hacen un modelo de estudio, como lo es su pequeño tamaño y pocos requerimientos para su crecimiento, propiedades convenientes para experimentar en condiciones de laboratorio. Es una planta diploide con flores hermafroditas, lo que significa que se auto-poliniza que es una característica de suma importancia para la generación y mantenimiento de líneas isogénicas. Produce miles de semillas por planta, facilitando la producción rápida de progenie de líneas transgénicas o mutantes. Tiene un ciclo de vida relativamente corto, de tal forma que en, aproximadamente seis semanas a partir de la germinación, se pueden obtener semillas maduras. Es de transformación genética fácil mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens*, de biobalística o por microinyección (An, *et al.*, 1986; Schiml, *et al.*, 2016). Su genoma es pequeño en comparación a otros modelos vegetales o plantas de cultivo; consta de cinco cromosomas, con un genoma de 135 megapares de bases, además de sus genomas plastídico y mitocondrial, los cuales se han secuenciado varias veces. Existen bases de datos con gran información sobre mutantes o líneas transgénicas para muchos genes de *Arabidopsis*, incluidos experimentos de secuenciación masiva que facilitan el análisis sobre la participación de estos genes en diversos mecanismos de respuesta a estrés y durante desarrollo. Así mismo, existen bancos con grandes colecciones de mutaciones y plantas transgénicas caracterizadas. Estas cualidades hacen a *Arabidopsis* un excelente modelo de estudio (Rivero, *et al.*, 2014).

2. Semilla y germinación

La semilla de las angiospermas se compone de los siguientes elementos:

- un embrión, resultante de la fecundación entre el núcleo de la célula huevo y

uno de los núcleos del tubo polínico;

- el endospermo, el cual se forma de la fusión entre los dos núcleos polares y el otro núcleo del tubo polínico. El endospermo sirve como reserva de nutrientes para el desarrollo de la planta, y
- la testa, que es el tegumento que rodea al embrión y lo protege de daños físicos (Bewley, 2013). La función básica de las semillas es la propagación de la especie.

En el caso de las semillas ortodoxas, antes de que estas sean capaces de germinar deben pasar por un periodo denominado dormancia, el cual es un proceso que modula el inicio de la germinación. La dormancia es una estrategia de las plantas para la dispersión de las semillas en el espacio y el tiempo para evitar la muerte ante condiciones desfavorables (Bewley, *et al.*, 2013; Rodríguez-Gacío *et al.*, 2009). Este proceso está regulado por la hormona ácido abscísico (ABA), la cual se encarga de inhibir la germinación y mantener a las semillas en un estado de dormancia hasta que se encuentran las condiciones favorables para germinar, de manera que ABA previene la emergencia de la radícula, pero no así el rompimiento de la testa (Figura 1B). Una vez que la semilla rompe la dormancia, ésta podrá germinar

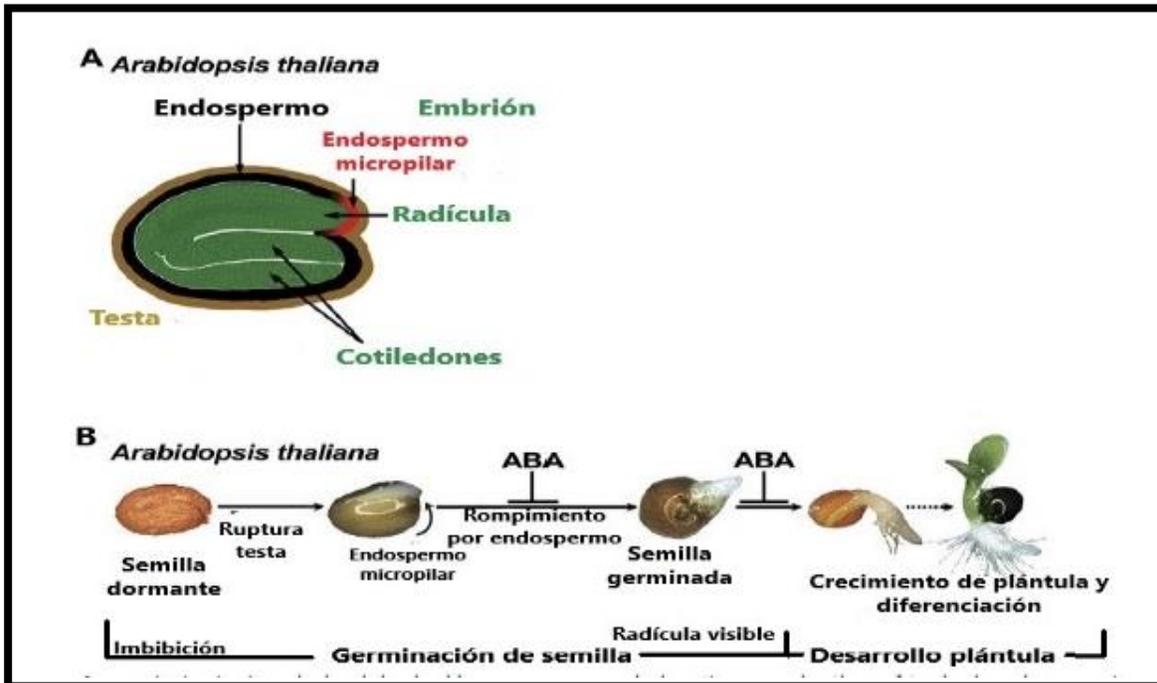


Figura 1. A) Morfología de la semilla de *Arabidopsis thaliana*. B) Se muestran los eventos visibles de la germinación: imbibición de la semilla, disminución en la concentración de la hormona vegetal ABA que permite el término de la dormancia para dar paso al rompimiento de la testa por la radícula. Una vez que la semilla germina, la plántula se establece y crece.
Foto tomada y modificada de Weitbrecht *et al.*, 2011.

El proceso de germinación es un evento decisivo en el ciclo de vida de las plantas ya que la supervivencia en esta etapa permite el establecimiento de una nueva generación. Por lo anterior, existen mecanismos que regulan finamente este proceso, los cuales incorporan una serie de sucesos que empiezan desde la absorción de agua, síntesis de DNA, transcripción y traducción de nuevos ARNs mensajeros (mARN) y la movilización y metabolismo de moléculas de reserva. Estos eventos permiten la expansión y elongación del eje embrionario lo que genera el rompimiento del endospermo y la testa (Bewley, 2013). Este proceso se puede dividir en tres fases (Figura 2):

Fase I, fase de imbibición

Las semillas ortodoxas, como la de *Arabidopsis thaliana*, son semillas que tienen un bajo contenido de humedad relativa de 5-15%, y a pesar de ello son capaces de sobrevivir a esta condición. Cuando estas semillas se embeben en agua, ésta entra rápidamente debido a que la testa es permeable y a que existe un gradiente de agua entre la semilla y el medio.

Existen características diferentes para las semillas de cada especie, de manera que la entrada de agua para cada una es distinta pues influye la permeabilidad y conductividad de la testa, así como de los tejidos alrededor del embrión (Bewley *et al.*, 2013).

Fase II, fase de latencia

Durante esta fase, la semilla ya se encuentra hidratada y esto permite el restablecimiento del metabolismo, la división celular, transcripción y traducción de nuevos ARN mensajeros, y la movilización de moléculas de reserva como carbohidratos, proteínas, etc. Esto aumenta el volumen celular del embrión permitiendo que la testa se rompa para dar paso a la emergencia de la radícula a través del endospermo.

Fase III, finalización de la germinación

Durante esta fase la absorción de agua es muy poca debido a un aumento en el potencial osmótico por el aumento en la producción de sustancias osmóticamente activas, resultantes del re-establecimiento del metabolismo. Esto da fin a la germinación y al comienzo del establecimiento de la plántula.

La duración en cada fase depende de las características intrínsecas de cada semilla como lo es la permeabilidad de la testa, el tamaño de la semilla, etc., así como de las condiciones en las que se dio la imbibición como lo es la temperatura, contenido relativo de humedad y disponibilidad de agua.

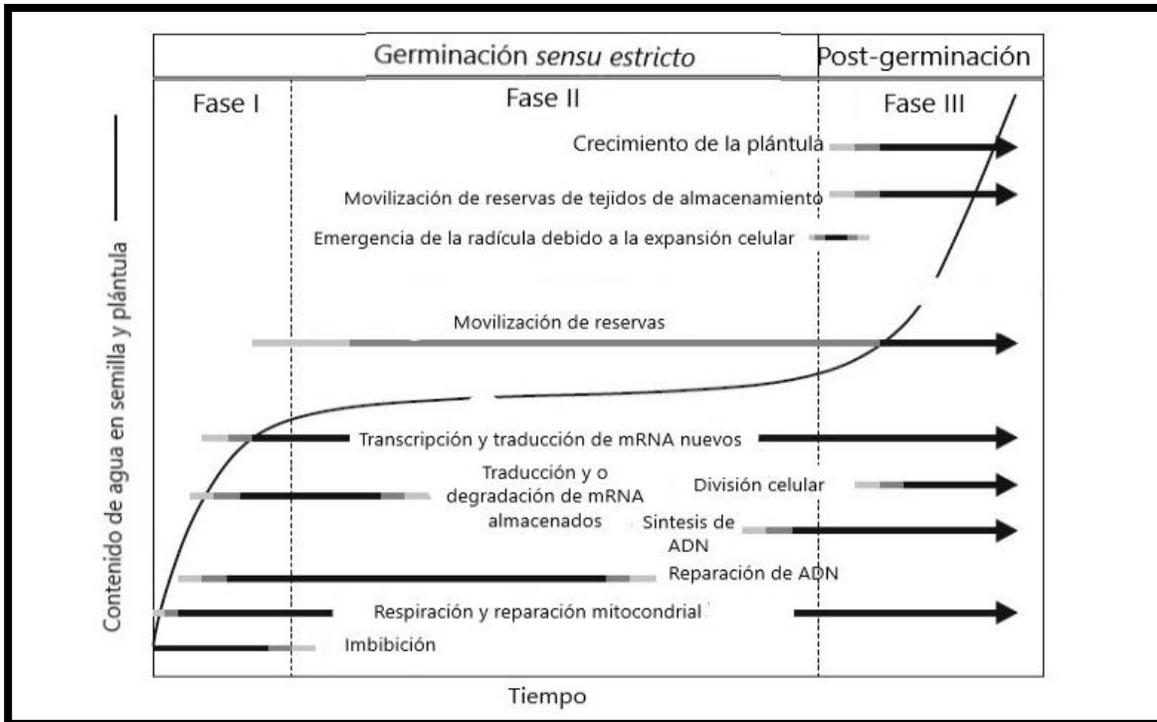


Figura 2. Fases de la germinación y post-germinación. Se muestra el tiempo de absorción de agua por las semillas, así como los cambios asociados a cada fase de la germinación y crecimiento de las plántulas. Tomado y modificado de Bewley *et al.*, 2013.

2.1. Participación de las hormonas vegetales en la germinación

Para controlar diferentes procesos a lo largo del desarrollo de la planta, existe una estrecha comunicación entre las diferentes vías involucradas en la síntesis, catabolismo y regulación de los niveles y distribución de las diferentes hormonas vegetales. Esta comunicación se complementa con otras señales, como lo son las especies reactivas de oxígeno (ROS, por sus siglas en inglés), los azúcares como la glucosa y con diversas proteínas, a través de una compleja red de vías de señalización. Estas rutas de señalización suelen regular factores de transcripción (FTs) que, a su vez, permiten regular niveles de expresión de diversos genes (Rodríguez-Gacío *et al.*, 2009; Kermodé *et al.*, 2005; Matilla, y Matilla-Vázquez, 2008).

En el proceso de germinación participan tanto factores genéticos y ambientales, tales como la temperatura, la luz, la disponibilidad de agua y de nutrientes, así como diversas hormonas vegetales (Weitbrecht *et al.*, 2011). Las fitohormonas ABA, giberelinas (GAs), auxinas (IAA), citocinas y brasinoesteroides son hormonas que controlan varios procesos fisiológicos y bioquímicos en la planta. Específicamente

el ABA, regula una serie de procesos a lo largo del ciclo de vida de la planta que van desde la regulación del desarrollo de la semilla, la inducción de la dormancia y la respuesta a diferentes tipos de estrés o condiciones desfavorables para el crecimiento como con el frío, la sequía, las altas concentraciones de sal, etc. (Rodríguez-Gacío *et al.*, 2009). Su papel en la germinación es la de inhibirla, regulando la expresión de factores de transcripción que pueden afectar negativamente este proceso y evitar la expansión de la radícula para impedir que rompa la testa (Graeber *et al.*, 2010).

Se sabe que existe un equilibrio antagónico entre la síntesis y el catabolismo entre el ABA y las GAs que contribuye a controlar la dormancia y la germinación mediante la regulación de vías de señalización que modifican la expresión de diferentes genes implicados en estos procesos y en la percepción de las condiciones ambientales.

Otras hormonas que regulan el proceso de germinación son el etileno y las auxinas. El etileno promueve la germinación al disminuir la sensibilidad al ABA, por lo que parece tener un papel antagónico a ésta y actúa de manera conjunta con las GAs para promover el proceso de elongación de la radícula. A diferencia del etileno, las auxinas tienen efectos positivos en la dormancia de manera que, junto con el ABA, regulan negativamente la germinación.

3. Estrés en plantas

Las plantas son organismos sésiles que se encuentran expuestas constantemente a una variedad de cambios ambientales, donde intervienen factores bióticos, representados por otros organismos, y factores abióticos, como temperatura, luz, disponibilidad de agua, nutrientes y minerales. El desbalance en cualquiera de estos factores impone un estrés para la planta que afecta su correcto desarrollo y crecimiento (Figura 3).

La respuesta de la planta ante condiciones adversas dependerá de la severidad, duración y del tipo de estrés, o de la combinación de ellos, así como del número de veces que ha sido expuesta a ese estrés y de la etapa de desarrollo en la que se encuentre el órgano afectado, así como de las características genéticas de las plantas (Buchanan *et al.*, 2015).

Las plantas poseen mecanismos que les permiten percibir los cambios en las condiciones del medio ambiente de forma eficaz. Una vez que los cambios ambientales son percibidos, se activan vías de transducción de señales que transmiten esta información a diferentes niveles para modificar el crecimiento y desarrollo de forma coordinada y poder contender con la condición de estrés dada. Uno de estos niveles es la regulación genética que incluye tanto la reducción como el aumento en los niveles de transcritos implicados en la respuesta ante un estrés dado; así como alteraciones en la maquinaria post-transcripcional modulando los niveles de los ARNs mensajeros sintetizados que, a su vez, codifican para proteínas específicas.

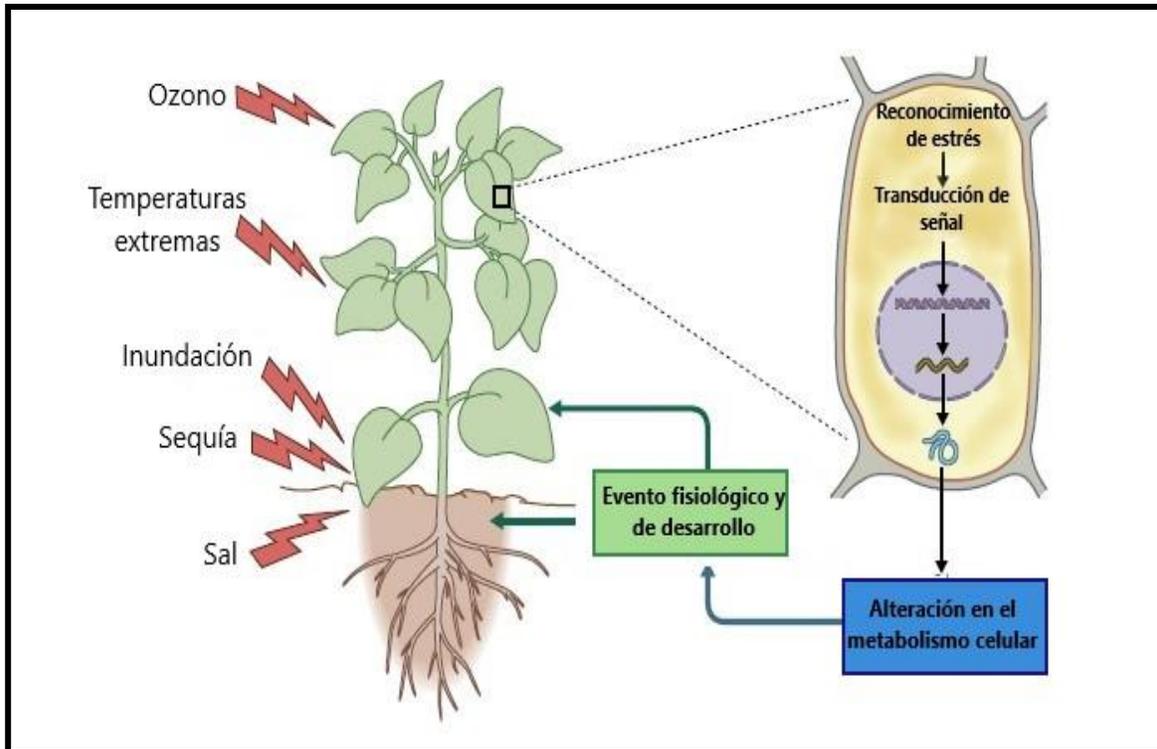


Figura 3. Respuesta de las plantas a condiciones ambientales adversas. Las señales son reconocidas y viajan a través de las células por toda la planta para generar una respuesta que resulta en una alteración en la expresión de genes que influencia el metabolismo y desarrollo de las plantas. Tomado y modificado de Buchanan *et al.*, 2015.

3.1. Estrés hídrico

El déficit hídrico es un tipo de estrés que se genera cuando la cantidad de agua disponible en el medio es insuficiente para que la planta realice óptimamente sus procesos vitales. Esta condición de estrés se puede presentar en regiones en donde la precipitación anual es muy baja, cuando las cantidades de sal en el suelo son muy altas, impidiendo que la raíz de las plantas pueda absorber el agua del medio, así como cuando hay temperaturas muy bajas, lo que hace que el agua no esté igualmente disponible para la planta.

El déficit hídrico provoca perturbaciones en el metabolismo de la planta, generando cambios en el volumen celular, cambios en la forma de la membrana, generando interrupciones de los gradientes de potencial de agua, pérdida de turgencia y alteración en la función de proteínas o bien su desnaturalización en casos severos (Buchanan *et al.*, 2015).

Para que el agua sea absorbida por la raíz, ésta debe tener un menor potencial de agua que el suelo. El potencial de agua es un parámetro que se utiliza para medir el movimiento del agua dentro o fuera de la planta y se puede medir usando un conjunto de potenciales: de solutos, de presión, gravitacional y matricial. El movimiento del agua va desde las regiones de alto potencial hídrico (con más agua)

hacia las regiones con bajo potencial hídrico (con menos agua). De manera que para que el agua sea absorbida por la raíz, ésta debe tener menor potencial que el suelo (Buchanan *et al.*, 2015).

Para contrarrestar los efectos negativos de una baja disponibilidad de agua, las plantas poseen diversos mecanismos de respuesta, entre ellos se encuentran:

- **Ajuste osmótico:** Proceso en el que se da un aumento en la concentración de osmolitos compatibles, los cuales son un grupo de moléculas orgánicas muy solubles en agua y que no interfieren con el metabolismo de la planta, permitiendo que el agua se difunda por la raíz. Los osmolitos pueden ser carbohidratos como manitol, trealosa, myo-inositol, galactinol y rafinosa, o aminoácidos como prolina, glicina-betaína, entre otros. Estos compuestos no sólo ayudan a disminuir el potencial de agua en el interior de la célula y, por tanto, inducen la entrada de agua, sino que también presentan un papel osmoprotector ya que estabilizan macromoléculas como, preservando la estabilidad de la membrana y evitan que iones como el Na⁺ y el Cl⁻ interfieran con las interacciones no covalentes que mantienen la estructura de las proteínas (Buchanan *et al.*, 2015).
- **Proteínas que protegen macromoléculas y membranas contra daño:** Existen diversas proteínas con actividad de chaperonas y que se mantienen activas bajo condiciones de estrés, como son las proteínas de choque de calor (HSPs, por sus siglas en inglés: Heat Shock Proteins) así como las proteínas abundantes en la embriogénesis tardía (LEA por sus siglas en inglés: Late Embryogenesis Abundant). Ambos tipos de proteínas son capaces de prevenir la desnaturalización o promover la renaturalización de otras proteínas sensibles a esta condición (Bakthisaran *et al.*, 2015). Adicionalmente, las proteínas LEA son una familia de proteínas altamente hidrofílicas y que presentan elevados niveles de desorden estructural, las cuales se acumulan en respuesta a déficit hídrico y que se ha demostrado pueden prevenir cambios conformacionales en enzimas reporteras *in vitro* evitando que pierdan su conformación nativa y, por tanto, su función bajo condiciones de deficiencia de agua (Reyes *et al.*, 2005)
- **Actividad estomática:** Esta actividad se ve afectada por diferentes tipos de estrés e influye en la toma de CO₂ y en la retención y/o pérdida de agua (transpiración), por lo que tiene impacto tanto en la fotosíntesis como en el crecimiento de las plantas. Como respuesta ante la falta de agua, los sistemas de transporte de iones y agua a través de las membranas, así como el aumento en la síntesis de ABA endógeno, controlan cambios en la presión de turgencia de las células guarda y estimulan el cierre de los estomas para evitar la transpiración y, con ello, la pérdida de agua.
- **Rol de ABA en respuesta al déficit hídrico:** Como ya se mencionó anteriormente, la hormona ABA juega un papel importante en diversos procesos como la germinación de las semillas y en respuesta a estrés. En respuesta a déficit hídrico, se da un incremento en la concentración de ABA, lo que funciona como una señal para la inducción de diferentes respuestas que le permiten a la planta contender contra la situación de estrés; como son

la inducción de la acumulación de metabolitos y proteínas con papel protector y la inducción de factores de transcripción y de proteínas involucrados en la tolerancia al estrés.

3.2. Estrés oxidativo

Una de las consecuencias inevitables que se presentan cuando existe cualquier tipo de estrés (ya sea calor, déficit de agua, frío, osmótico, etc.) es el daño oxidativo celular generado por un aumento en las especies reactivas de oxígeno (Sewelam *et al.*, 2016). Las ROS son el resultado de la transferencia de electrones de molécula en molécula a través de reacciones tipo óxido-reducción (redox), en donde se utiliza al oxígeno como aceptor final de electrones. De esta manera, se forman diferentes tipos de ROS: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el singulete de oxígeno (1O_2) y el radical hidroxilo (OH), siendo este último el más reactivo. Estas moléculas se forman de manera natural en las plantas a causa de su metabolismo y se generan principalmente en cloroplastos, en peroxisomas y, en menor cantidad, en la mitocondria. Las ROS tienen un papel dual en el metabolismo celular ya que pueden actuar como moléculas señalizadoras que desencadenan diversas respuestas o como moléculas dañinas ya que, en altas concentraciones, provocan daño oxidativo a las membranas (peroxidación lipídica), a las proteínas, a los ácidos nucleicos (ARN y ADN) e incluso pueden conducir a la destrucción oxidativa de la célula (Kumar, 2011).

Debido a la reactividad de estas moléculas y a lo dañinas que pueden ser, las plantas poseen varios mecanismos de defensa contra la acumulación de ROS. Por un lado, se pueden utilizar una serie de enzimas antioxidantes o bien, usar metabolitos capaces de oxidarse sin perder su función como son el ascorbato, el glutatión, las antocianinas, los carotenoides, etc. Dentro de las enzimas antioxidantes se encuentran las superóxido dismutasas (SOD) que catalizan y dismutan el O_2^- en H_2O_2 . Las SODs se encuentran presentes en casi todos los compartimentos celulares, requieren de cofactores metálicos como Fe^{3+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} y Zn^{2+} y su localización depende del cofactor: las Fe-SOD se localizan principalmente en los cloroplastos, las Mn-SOD en las mitocondrias y en los peroxisomas y las Cu-Zn-SOD en los cloroplastos, el citosol y el espacio extracelular.

Por otro lado, el peróxido de hidrógeno (la ROS más estable) se descompone en agua y oxígeno por enzimas como la catalasa (CAT), la ascorbato peroxidasa (APX) y la glutatión peroxidasa (GPX). La catalasa es menos específica para H_2O_2 , por lo que se encarga de eliminar la mayor parte del H_2O_2 y funciona como regulador de la actividad de la APX. Las CATs se localizan principalmente en peroxisomas, mientras que las APXs se encuentran en cloroplastos, mitocondrias, peroxisomas y citosol, funcionando como reguladores específicos del nivel de ROS intracelular (Kuma Kar, 2011; Alscher *et al.*, 2002; Dat *et al.*, 2000; Apel *et al.*, 2004). La CAT puede actuar directamente sobre H_2O_2 , mientras que las APX y las GPX requieren de ascorbato y glutatión, respectivamente, como donadores de electrones (Figura 4) (Kumar, 2011)

Como parte del sistema antioxidante no enzimático están el ascorbato y el glutatión (GSH). El último se oxida por ROS formando glutatión oxidado (GSSG) y el ascorbato se oxida a monodehidroascorbato (MDA) y dehidroascorbato (DHA). Otros compuestos antioxidantes que juegan un papel importante en la eliminación de ROS son el tocoferol, los flavonoides, los alcaloides y los carotenoides (Kumar, 2011).

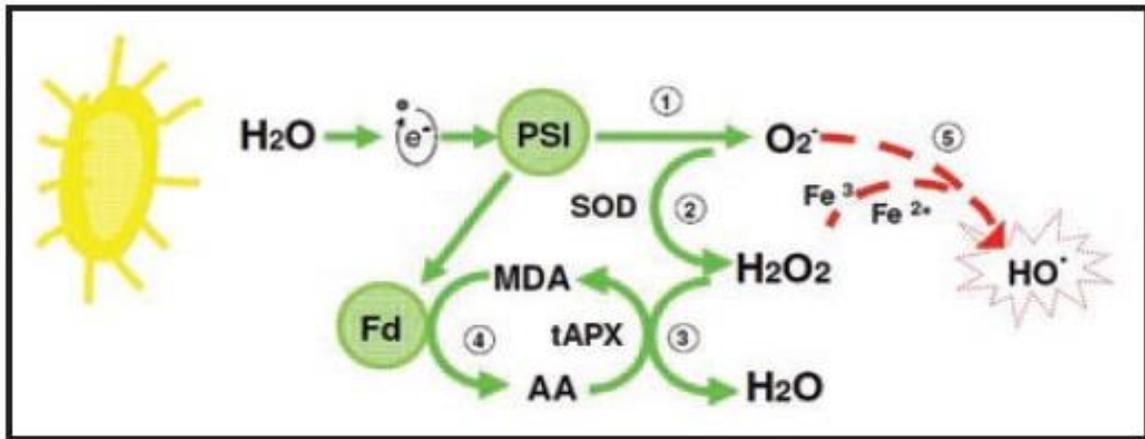


Figura 4. 1) Producción de ROS por reacciones que involucran la fuga de electrones de la cadena de transporte de electrones al oxígeno generando superóxido. 2) El cual es dismutado a H₂O₂ por la SOD. 3) El H₂O₂ es reducido a agua. 4) Estas reacciones pueden ser catalizadas por metales que resultan en la formación de radicales hidroxilos. Tomado de Cruz de Carvalho, 2008.

En condiciones de estrés, se genera un desequilibrio entre el sistema antioxidante y la producción de ROS lo que conduce a un aumento en la concentración de estas moléculas. Esto funciona como una señal que altera el estado 'redox' de diversas proteínas reguladoras, altera la transcripción y la traducción de diferentes genes lo que provoca la activación de vías de defensa y de respuestas de aclimatación, permitiendo que la planta se adapte al entorno cambiante y reduzca el nivel de ROS producidas metabólicamente (Figura 5) (Cruz de Carvalho, 2008; Choudhury *et al.*, 2017).

El H₂O₂ parece ser la especie reactiva de oxígeno señalizadora por excelencia ya que tiene características que la diferencian del resto: su vida media es de ~1 ms contra la del radical OH⁻ que es de ~1μs, su naturaleza es menos reactiva de manera que puede difundirse entre los diferentes compartimentos, tiene una producción acelerada y se metaboliza en compuestos menos reactivos (Kumar, 2011). El peróxido de hidrógeno desencadena cascadas de señalización que involucran la movilización e incremento del ion Ca⁺ y la inducción de proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPKs) que están implicadas en la transducción de señales que regulan la expresión genética. También parecen estar involucrados en mecanismos de reparación y de protección celular ya que regulan a diferentes

miembros de las vías de transducción de señales implicados en la respuesta al estrés como son la serina y la treonina. De la misma manera, es capaz de alterar la estructura de proteínas oxidando residuos que contienen azufre y esto favorece la formación de enlaces disulfuro, lo que se traduce en una señal para regular la unión de los factores de transcripción al ADN y afectar la transcripción. Por último, también afecta la interacción entre los radicales superóxido ($O_2^{\cdot-}$) y los grupos hierro-azufre (Fe-S) de ciertas proteínas (Dietz, 2015, 2016; Dietz *et al.*, 2016; Choudhury *et al.*, 2017).

Cada conjunto de condiciones ambientales (por ejemplo, la sequía, la salinidad, el frío, el calor, etc.) dará como resultado ROS celulares específicos y una señal redox que contribuye a la formación de una respuesta celular específica de aclimatación a cada tipo de estrés. Las respuestas de aclimatación generadas por ROS pueden estar mediadas por interacciones con diferentes proteínas y hormonas (Choudhury *et al.*, 2017; Grant *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2000).

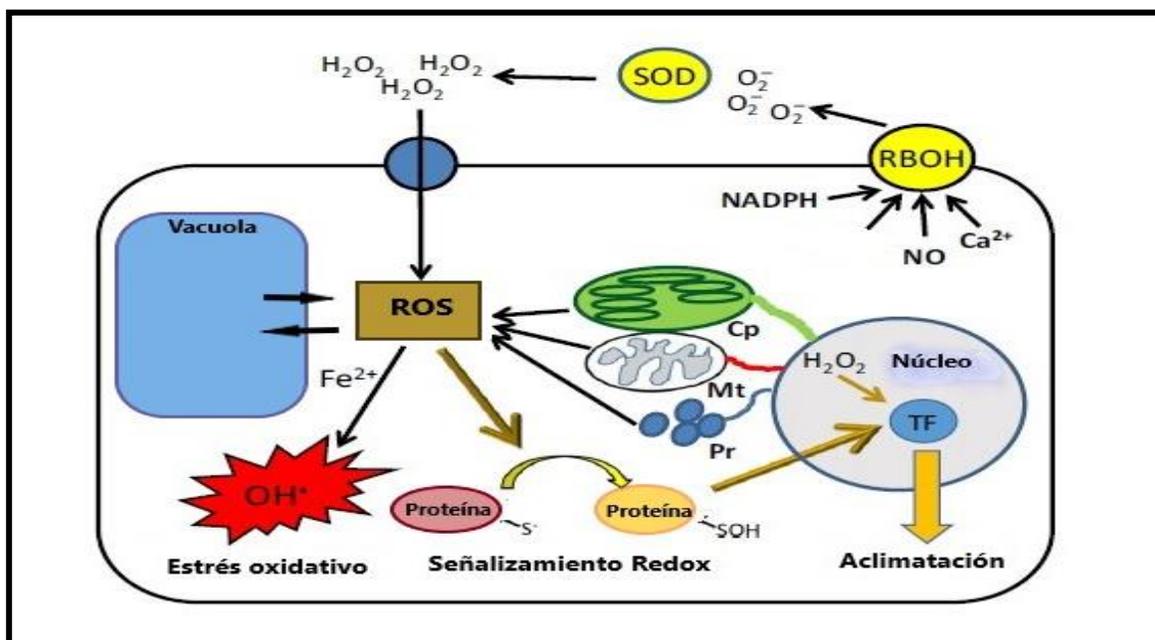


Figura 5. Señalización de ROS. Las especies reactivas de oxígeno que son producidas en diferentes compartimentos celulares durante diferentes condiciones de estrés abiótico que permiten la aclimatación de la planta a condiciones adversas. Abreviaciones: Cp, cloroplasto; Mt, mitocondria; Pr, peroxisomas; RBOH (Respiratory Burst Oxidase Homolog), TF, factor transcripcional; SOD, superóxido dismutasa.

4. Comunicación ROS y hormonas

Como se mencionó anteriormente, las hormonas vegetales desempeñan un papel clave en diversos mecanismos, entre ellos se encuentra la germinación y la respuesta de aclimatación de las plantas al estrés abiótico. Estudios previos han demostrado que existe una estrecha comunicación entre las hormonas vegetales (ABA, GAs, auxinas, brasinoesteroides, etc.) y las ROS durante condiciones ambientales desfavorables (Choudhury *et al.*, 2017).

La comunicación recíproca de ROS con las auxinas influye en los gradientes, distribución, degradación y transporte de esta hormona (Kawano, 2003; Tognetti *et al.*, 2010; Grunewald y Friml, 2010); así mismo, las auxinas pueden inducir la producción de ROS y regular su homeostasis (Tognetti *et al.*, 2012). Por ejemplo, la tolerancia al estrés abiótico en el tomate correlaciona con la síntesis de brasinoesteroides (BRs) debido a un incremento en la actividad de la NADPH oxidasa y el aumento del H₂O₂ apoplástico (Nie *et al.*, 2013). Estos efectos son similares en presencia de ABA, por lo que se ha propuesto un mecanismo de retroalimentación positiva en el que los BRs inducen, mediante la activación de RBOH (Respiratory Burst Oxidase), la acumulación transitoria de H₂O₂ y la inducción de la síntesis de ABA, provocando tolerancia de la planta a estrés (Zhou *et al.*, 2014).

Entre las enzimas que producen ROS destacan las NADPHs oxidasas, las cuales han sido designadas como homólogos de la RBOH. Estas enzimas juegan un rol relevante en diversos procesos fisiológicos, participando en la regulación de la actividad de las células guarda, a través de la señalización de ABA dependiente de ROS, en la germinación de las semillas y en el alargamiento de las raíces así como, en la regulación de la homeostasis de los niveles Na⁺ / K⁺ en respuesta a estrés salino (Kwak *et al.*, 2003; Ma *et al.*, 2012).

Las GAs son hormonas que están involucradas en la respuesta a estrés abiótico a través del control de la homeostasis redox celular. Achard y colaboradores (2009) observaron que en mutantes de reguladores negativos de GAs (proteínas DELLA) hubo un aumento en la expresión de genes que codifican enzimas antioxidantes, por lo que se redujo la acumulación de ROS en plantas sometidas a alta salinidad (Achard *et al.*, 2009).

5. Mecanismos epigenéticos y la respuesta a estrés

Los mecanismos epigenéticos desempeñan un papel esencial en la regulación de la expresión génica en respuesta al estrés ambiental en plantas. De acuerdo con lo descrito por Sudan y colaboradores (2018), “la epigenética se refiere tanto a los cambios hereditarios en la actividad y expresión de los genes (en la progenie de las células o de los individuos) como a las alteraciones estables a largo plazo en el potencial transcripcional de una célula”.

Los mecanismos epigenéticos involucran principalmente la metilación del ADN, las modificaciones de histonas, el remodelamiento de la cromatina y el silenciamiento de genes mediado por ARN. Se ha observado que los patrones de metilación y desmetilación del ADN en regiones codificantes de algunos genes de respuesta a estrés y un cambio en la expresión de los mismos, se ven alterados por diferentes tipos de estímulos abióticos como son: temperatura, rayos UV, déficit hídrico, sal y estrés oxidativo (Beck *et al.*, 2004; Pecinka *et al.*, 2009; Boyko *et al.*, 2010; Xie y Yu, 2015). Estas modificaciones epigenéticas se heredan como un tipo de memoria al estrés y llegan a aumentar la tolerancia al estrés en la siguiente generación (Figura

6) (Zhu, 2009).

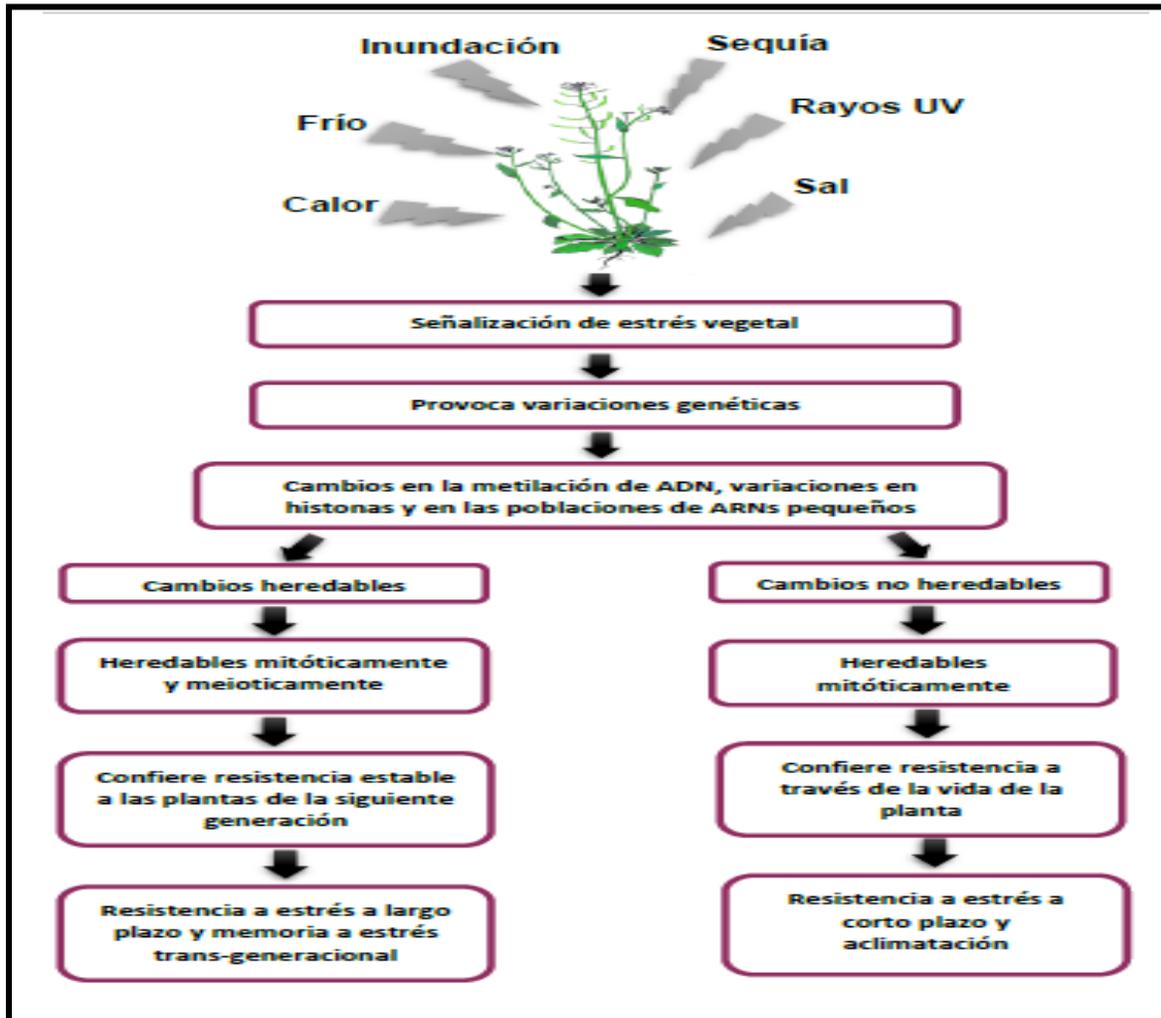


Figura 6. Modelo de cambios en los mecanismos epigenéticos inducidos por diferentes tipos de estrés abiótico que generan una resistencia o aclimatación a esas condiciones. Tomado y modificado de Sudan *et al.*, 2018.

5.1. Modificaciones de histonas

El ADN está empaquetado en una estructura organizada llamada cromatina. El nucleosoma, que es la unidad básica de la cromatina, consta de alrededor de 200 pb de ADN, asociado a un complejo específico de ocho histonas nucleosómicas (octámero de histonas). Cada partícula tiene una forma de disco, con un diámetro de 11 nm y contiene dos copias de cada una de las cuatro histonas H3, H4, H2A y H2B. Este octámero forma un núcleo proteico, alrededor del cual se enrolla la hélice de ADN (de aproximadamente 1,8 vueltas) (Chinnusamy *et al.*, 2014). Este mecanismo incluye modificaciones como acetilación, ubiquitinación, biotilación, metilación, sumoilación y fosforilación en residuos localizados en regiones

denominadas “colas de histonas”. Dichas modificaciones son factores clave en definir la estructura de la cromatina y la estabilidad genómica (Liu *et al.*, 2010). Las proteínas histonas forman un octámero con dos copias de cada histona (H2A, H2B, H3 y H4) y los residuos de los aminoácidos de las histonas H3 y H4 son los más propensos a las modificaciones debido a que su extremo N-terminal es más prominente, haciéndolo más accesible a la modificación por enzimas (Eichten *et al.*, 2014).

De estas modificaciones, la acetilación, la fosforilación y la ubiquitinación están asociadas a la regulación positiva, mientras que la desacetilación y la biotilación funcionan como reguladores negativos (Sridhar *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Nathan *et al.*, 2006; Camporeale *et al.*, 2007). Para el caso de la metilación, se conoce que esta marca puede afectar tanto de manera positiva como negativa a la regulación transcripcional ya que el efecto que tiene en la regulación genómica depende del residuo, y del número de grupos que sean añadidos o bien eliminados mediante el proceso de desmetilación.

En el mecanismo de modificación de histonas participan metiltransferasas de histonas (HMT), desmetilasas de histonas (HDM), acetiltransferasas de histonas (HAT) y desacetilasas de histonas (HDAC). Las HMTs catalizan la transferencia de grupos metilos a lisinas y argininas de las H3 y H4 y pueden metilar tanto heterocromatina como eucromatina. La metilación en H3K9, H3K27, H3K79 e H4K20 que ocurre en regiones de heterocromatina causan silenciamiento génico, mientras que la metilación en la H3K4 permite la expresión de genes (Tsaftaris *et al.*, 2007).

La expresión de diferentes miembros de la familia de acetilasas de histonas (HDA) está regulada diferencialmente de acuerdo con el estrés abiótico al que las plantas estén sometidas (frío, sal, ABA). Las HDA6 y HDA19 pueden inducirse por ABA y la expresión de la HDA6 aumenta por señales de estrés salino regula el silenciamiento genético-transcripcional y la vía de metilación de ADN dependiente de RNA (Chen y Wu, 2010).

El resultado de las modificaciones de las histonas es la alteración de la fuerza de interacción entre las histonas con el ADN o bien con el reclutamiento de proteínas especializadas en reconocer dichas modificaciones (Bannister y Kouzarides, 2011; Patel y Wang, 2013; Zentner y Henikoff, 2013).

5.2. Complejos de re-modelamiento de cromatina

La remodelación de la cromatina es la reorganización de la cromatina de un estado condensado (heterocromatina) a un estado transcripcionalmente accesible (eucromatina), lo que permite que los factores de transcripción u otras proteínas de unión al ADN accedan al ADN y controlen la expresión génica. Los complejos modificadores de cromatina se pueden dividir en dos grupos, según sus modos de acción: (i) complejos dependientes de ATP que utilizan la energía de la hidrólisis de ATP para alterar la asociación de histonas con ADN, y (ii) complejos de histona

acetiltransferasa (HAT) e histona deacetilasa (HDAC), que regulan la actividad transcripcional de los genes determinando el nivel de acetilación de los dominios amino terminales de las histonas (Vignali *et al.*, 2000).

Las plantas contienen tres tipos de ATPasas remodeladoras de cromatina de la subfamilia SWI / SNF llamadas BRAHMA (BRM), SPLAYED (SYD) y MINUSCULE (MINU). En Arabidopsis, por ejemplo, la familia BRM contiene SWI3 y SNF5, las cuales responden a ABA y al estrés por sequía (Vercruyseen *et al.*, 2014). Las mutantes en BRM, SYD y SWI3 muestran un fenotipo donde el tamaño de las hojas y del tallo está reducido y existen perturbaciones en el desarrollo floral, a veces ocasionando esterilidad. Este fenotipo puede explicarse, ya que dichas proteínas participan en la regulación de los factores de transcripción que determinan el crecimiento del cotiledón (Kwon *et al.*, 2006), el mantenimiento del meristemo apical del brote (Kwon *et al.*, 2005) y participan en la inhibición de las respuestas de las citoquininas para promover la maduración de la hoja (Efroni *et al.*, 2013). Además, se demostró que los genes que codifican para proteínas de almacenamiento de semillas y los genes involucrados en la señalización de estrés mediada por ABA, JA y etileno están regulados por BRM o por SYD (Tang *et al.*, 2008; Walley *et al.*, 2008; Han *et al.*, 2012).

5.3. Metilación de ADN

La metilación del ADN es uno de los mecanismos epigenéticos más relevantes el cual involucra la metilación de citosinas, reacción que está catalizada por citosina metiltransferasas, las cuales agregan un grupo metilo donado por la S-adenosil metionina (SAM) a la posición 5 (C) del anillo aromático del residuo de citosina del ADN, convirtiéndolo en la marca 5-metilcitosina (^{5m}C) (Qiao y Fan, 2011; Sudan *et al.*, 2018).

La metilación se puede clasificar en dos grupos:

***Metilación simétrica:** que se da en un contexto CG o CHG generado por metil transferasas (Mtasas) como la metiltransferasa 1 (MET1) y cromometilasa 3 (CMT3), respectivamente, que se encargan del mantenimiento y de la transmisión estable de los patrones de ^{5m}C después de cada replicación del ADN.

* **Metilación no simétrica:** se da en un contexto genético CHH (H= A, C o T) y se lleva a cabo por Mtasas, como las metilasas de dominios re-organizados (DRM1 y 2) y por CMT2, las cuales son capaces de metilar *de novo*, es decir, metilan citosinas sin tomar en cuenta el patrón de la cadena complementaria del ADN metilación (Sudan *et al.*, 2018).

Para que exista un equilibrio en la regulación genética, esta marca puede ser reversible por medio de un proceso llamado desmetilación en donde el nucleótido ^{5m}C se elimina, dejando un espacio restante, el cual se llena con una citosina no metilada por la actividad de la ADN polimerasa y la ligasa mediante un mecanismo de reparación (Agius *et al.*, 2006; Bhutani *et al.*, 2011).

Dado que las condiciones ambientales cambian la expresión genética a través de la metilación y la desmetilación, Choi y Sano (2007) observaron que el gen *NtGDPL* (glycerophosphodiester phosphodiesterase) del tabaco puede ser desmetilado bajo condiciones de bajas temperaturas y estrés salino, permitiendo su expresión, mientras que, bajo condiciones normales, la región codificante de *NtGDPL* se encuentra hipermetilada.

El mecanismo de metilación de ADN, además de modular la transcripción de los genes, es un factor clave en la represión de transposones, ya que las tensiones ambientales también podrían activar los elementos transponibles a través de este proceso (Sudan *et al.*, 2018).

5.4. Metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM)

En plantas, la principal ruta epigenética mediada por si-RNAs (RNAs pequeños interferentes) es la metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM: del inglés RNA Directed DNA Methylation), la cual requiere de siRNAs y de ciertas proteínas.

La vía RdDM es específica de las plantas y se caracteriza por modificar el estado de la cromatina con la ayuda del ARN. Esta vía depende de una maquinaria de transcripción especializada que requiere dos complejos enzimáticos relacionados con la ARN Polimerasa II (Pol II) que son específicos de plantas, conocidos como RNA Polimerasa IV y V (Pol IV y Pol V).

De manera general, la vía canónica de RdDM consiste en el siguiente mecanismo: los transcritos generados por la Pol IV son copiados en RNA de doble cadena (dsRNA) por la RNA Polimerasa dependiente de RNA 2 (RDR2). Este RNA de doble cadena se corta en fragmentos de doble cadena de 24 nucleótidos de longitud por la RNAsa tipo III Dicer-Like 3 (DCL-3), generando siRNAs los cuales se metilan en sus extremos 3' por la proteína HUA-enhancer 1 (HEN1). Una vez metilados los siRNAs, se liberan al citoplasma donde se cargan en la proteína Argonauta 4 (AGO 4), la cual se queda solo con la cadena líder del siRNA; este complejo se importa de nuevo al núcleo, donde el siRNA que lleva AGO4 se hibrida por complementariedad de secuencia con los transcritos nacientes de Pol V que sirven como andamio. Esto sirve como señal para reclutar a la ADN metiltransferasa (DRM2) para mediar la metilación *de novo* de citosinas en el contexto CHH y posteriormente establecer la metilación simétrica CHG (Figura 7) (Matzke y Mosher, 2014).

La RdDM mediada por Pol V (conocida como RdDM canónica) silencia transcripcionalmente varias regiones en todo el genoma, con preferencias por regiones eucromáticas, particularmente en transposones intergénicos pequeños, así como en los que fueron adquiridos recientemente. También participa en la metilación de genes que contienen transposones u otras repeticiones en sus promotores, intrones o regiones codificantes (Zhong *et al.*, 2012; Wierzbicki *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2012; Zemach *et al.*, 2013; Zheng *et al.*, 2013).

Se ha observado que la vía de RdDM está involucrada en diferentes procesos fisiológicos y de desarrollo de la planta, como en la reproducción y en la respuesta a algunos tipos de estrés, ya sea bióticos o abióticos. También se han descubierto nuevas funciones de esta vía en la comunicación celular (Matzke y Mosher, 2014).

La vía de RdDM se ha visto implicada en la respuesta a estrés por calor y a condiciones de baja humedad (Tricker *et al.*, 2012; Popova *et al.*, 2013), en donde se han observado afectaciones en los patrones de metilación de los transposones. La activación de un transposón en respuesta a estrés aumenta la diversidad fenotípica a través de la regulación transcripcional positiva de los genes aledaños. De manera similar, las inserciones de los transposones podrían alterar la función de genes o alterar el patrón de transcripción de genes cercanos (Ito *et al.*, 2011). Este aumento en la diversidad fenotípica podría aumentar la adaptabilidad a un entorno cambiante (Matzke y Mosher, 2014).

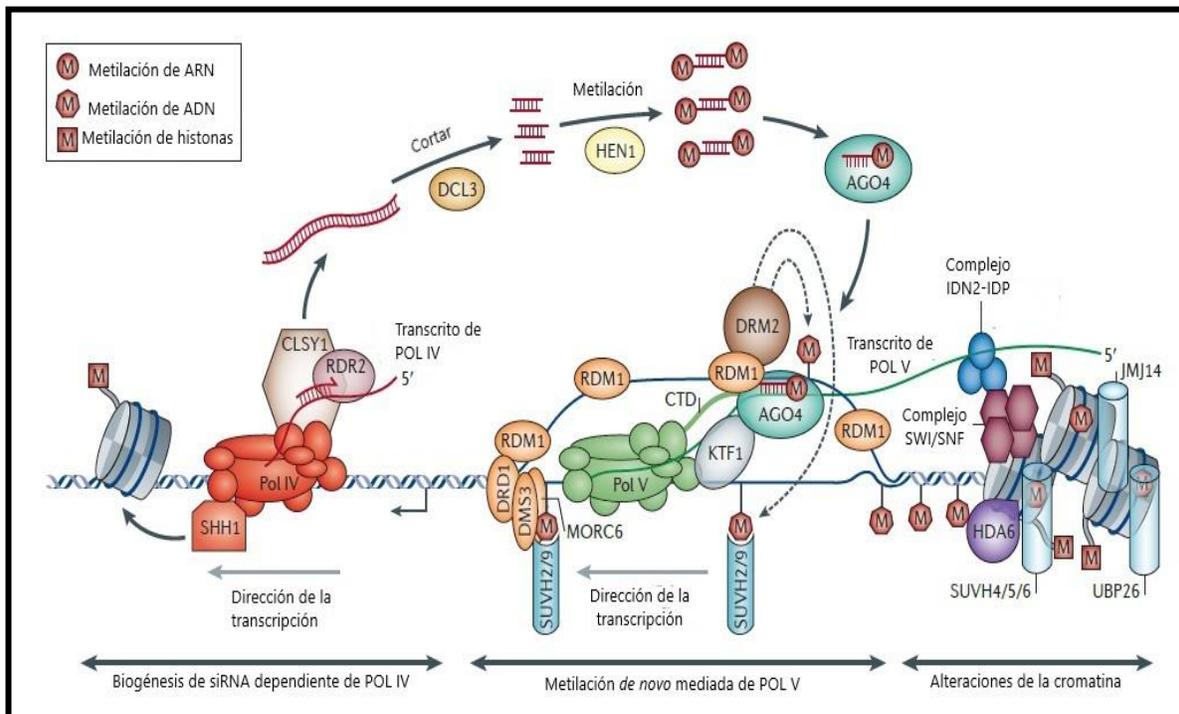


Figura 7. Vía de Metilación de DNA dependiente de RNA (RdDM) que se encarga de regular regiones eucromáticas, particularmente, en transposones intergénicos pequeños, así como en los que fueron adquiridos recientemente, y en genes que contienen transposones u otras repeticiones en sus promotores, intrones o regiones codificadoras. (Tomado de Matzke y Mosher, 2014).

JUSTIFICACIÓN

Dado que los transcritos de varios componentes de la vía de RdDM se detectan durante diferentes estadios del desarrollo de la semilla y considerando que la germinación es una etapa crucial que se ve afectada por diversas condiciones ambientales. En un trabajo previo del laboratorio, Palomar y colaboradores (en proceso) se preguntaron si RdDM participa en la respuesta ante condiciones de déficit hídrico durante la germinación. En el transcurso de este trabajo demostraron que, efectivamente, RdDM juega un papel clave en la respuesta a esta condición de estrés durante la germinación y el crecimiento temprano de las plántulas, debido a que bajo esta condición de estrés las mutantes en la vía de RdDM presentan una menor tasa de germinación que la silvestre (véase figura 8). Sus resultados también indican que la proteína ARGONAUTA 4, uno de los componentes principales de esta vía, posee una función independiente a la de RdDM, la cual exhibe en respuesta a esta condición de estrés.

Por otro lado, es bien conocido que una condición de estrés en la planta muestra un aumento en la concentración de especies reactivas de oxígeno y que éstas pueden participar en la regulación de la respuesta y la adaptación al estrés.

Dado que RdDM participa en la respuesta a déficit hídrico durante la germinación de *Arabidopsis thaliana* y puesto que esta condición promueve la acumulación de especies reactivas de oxígeno.

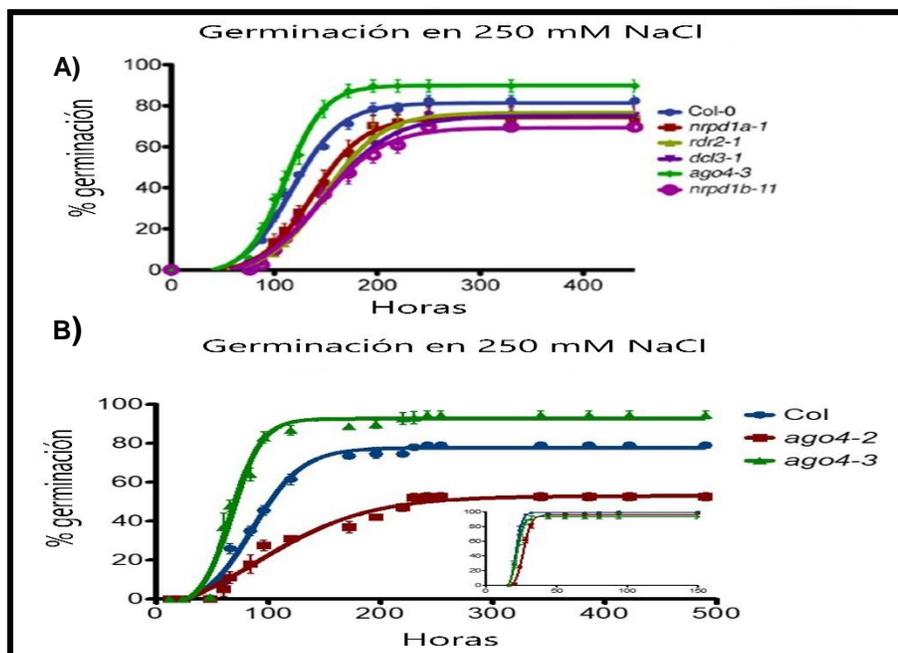


Figura 8. RdDM está involucrado en la regulación de la germinación de *Arabidopsis* bajo condiciones de déficit hídrico. Cada línea representa el porcentaje de germinación en función del tiempo para cada línea mutante.

A) Cinética de germinación de mutantes de genes de las proteínas centrales de RdDM.

B) Cinética solo con mutantes en la proteína AGO4 (*ago 4-2*-mutante no catalítica; *ago 4-3*-mutante nula)

Las barras representan el error estándar de los análisis de 5 réplicas. Del lado derecho se muestra la tasa de germinación bajo condiciones óptimas.

Dados estos antecedentes se propone la siguiente hipótesis:

HIPÓTESIS

La vía de RdDM participa en la respuesta de la planta ante un estrés oxidativo durante la germinación.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la vía de metilación de DNA dependiente de RNA participa en la respuesta a estrés oxidativo durante la germinación de *Arabidopsis thaliana*

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ♣ Analizar el fenotipo de las mutantes nulas de la vía de RdDM así como de la mutante no catalítica de AGO4 (*ago4-2*) bajo estrés oxidativo durante la germinación.
- ♣ Determinar los niveles acumulación de la proteína de ARGONAUTA 4 en diferentes estadios de la germinación bajo estrés oxidativo.
- ♣ Investigar la localización tisular de la proteína ARGONAUTA 4 en embriones de *Arabidopsis* bajo condiciones hiper-oxidantes.

MATERIALES Y MÉTODOS

• Líneas mutantes y condiciones de crecimiento

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana* L. ecotipo Columbia (Col-0) de tipo silvestre, así como mutantes en las proteínas más importantes de la vía de metilación de DNA dependiente de RNA (RdDM).

1. ARGONAUTE 4 (AGO 4): *ago4-2* (sin actividad catalítica) y *ago4-3* (nula)
2. DICER LIKE 3 (DCL3): *dcl-3* (nula)
3. RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2 (RDR2): *rdr-2* (nula)
4. POLYMERASE IV (POL IV): *nrpd-1a* (nula)
5. POLYMERASE V (POL V): *nrpd-1b* (nula)

Las líneas mutantes *dcl-3*, *rdr-2*, *nrpd-1a* y *nrpd-1b* en fondo Columbia se obtuvieron de ABRC (Arabidopsis Biological Resource Center) o de NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre), mientras que las mutantes *ago 4-2* y *ago 4-3* también en Col-0 fueron generosamente donadas por el Dr. Pablo Vera (Agoria y Vera, 2007), y los Drs. Blake Meyers y David Baulcombe (Havecker *et al.*, 2010), respectivamente.

Para desinfectar las semillas se resuspendieron en 1 mL de etanol absoluto, se agitaron durante 2 minutos, se centrifugaron 30 segundos y se decantó el sobrenadante. Después se agregó un 1mL de una solución cloro-tritón X-100 (Sigma) (40% y 0.2%, respectivamente), se agitaron por 8 minutos, se centrifugó y se decantó el sobrenadante. Para finalizar se hicieron de ocho a diez lavados con agua miliQ estéril, todo bajo condiciones asépticas

Para sembrar las semillas se utilizó medio sólido MS 1X: mezcla de sales MS (4.3 g L⁻¹; CaissonLabs™), sacarosa 1% p/v (Research Organics), MES (0.5 g L⁻¹; Calbiochem™) y agar 0.65% (Sigma-Aldrich™). El medio se esterilizó en autoclave, a 120°C por 20 minutos, se vació en cajas Petri (Laboratorios S y M; tamaño 100 x 15 mm). Las semillas se estratificaron en placas durante 3 días, en la oscuridad a 4 °C. Después se transfirieron a una cámara ambiental en donde la temperatura se mantuvo constante a 22 °C con un ciclo de día largo de 16 h de luz / 8 h de oscuridad y una humedad relativa de 60%

Para la propagación de las semillas se utilizaron plántulas de 2 semanas, las cuales se crecieron primero en cajas Petri en las condiciones antes mencionadas y posteriormente se transfirieron a tierra (Metromix 200, Hummert Intl) bajo condiciones de riego óptimo hasta que las silicuas se secaron.

- **Tratamientos de estrés y análisis fenotípico.**

Las semillas que se utilizaron para los experimentos de germinación se colectaron de plantas crecidas bajo condiciones óptimas a 22°C. Para imponer las condiciones de estrés oxidativo, las semillas se sembraron en medio MS con Metil Viológeno (MV) (Sigma-Aldrich) a diferentes concentraciones: 1, 1.5 y 2 µM. Así como también se ocupó peróxido de hidrógeno a concentraciones de: 5, 10 y 12 mM.

Para analizar el fenotipo se contaron las semillas germinadas (aparición de las radículas) de seis réplicas técnicas, cada una con 100 semillas. Se realizaron, al menos cuatro experimentos independientes como éstos, en donde el fenotipo mostró reproducibilidad. Todos los experimentos se realizaron con semillas de la misma edad.

- **Análisis estadístico**

Los datos se acumularon a lo largo del tiempo y se ajustaron a las curvas dosis-respuesta sigmoidales con pendiente variable [$Y = \text{abajo} + \{(\text{arriba} - \text{abajo}) / 1 + 10^{(\text{LogEC50} - X) * \text{Hillslope}}\}$], también llamada ecuación logística de cuatro parámetros. (Olvera-Carrillo et al., 2010).

- **Patrones de acumulación de la proteína ARGONAUTA 4 (AGO 4)**

Para conocer los patrones de acumulación de la proteína AGO4 se realizaron experimentos de inmunodetección tipo Western, a partir de cinco diferentes estadios durante la germinación, en condiciones control y en condiciones de estrés oxidativo generado con MV. Los estadios analizados fueron: estadio A (semilla estratificada: 5 horas después de la estratificación), estadio B (aparición de la radícula sin romper la testa: 30 horas después de la estratificación), estadio C (rompimiento de la testa por la radícula: 50 horas después de la estratificación), estadio D (elongamiento de la radícula: 65 horas después de la estratificación) y estadio E (radícula con pelos radiculares, aún no presentan las primeras hojas: 80 horas después de la estratificación).

- I. Electroforesis para la separación de proteínas

Se utilizaron geles de poli(acrilamida) (30:0.8% p/v) al 10% y al 7.5% de acrilamida final, con SDS (%) (Sigma-Aldrich™), y otros con urea (Sigma-Aldrich™) 6M, con el fin de separar adecuadamente al polipeptido de AGO4 que tienen una masa molecular aproximada de 100 kDa. Para cada muestra se cargaron 30 µg de proteína total disuelta en el buffer de carga (Laemmli 1X) y se corrieron en cámaras

de BioRad a 100 V por 95 min.

II. Transferencia a membrana (experimentos tipo Western)

Se utilizó una membrana de nitrocelulosa de 0.45 μm (GE Healthcare Life Science™), papel filtro (Whatman™ 3mm); la transferencia de las proteínas del gel a la membrana se realizó a 4°C por 3 horas a 300 mA constantes. Una vez finalizada la transferencia, se tiñó la membrana con rojo Ponceau con el fin de verificar la transferencia y obtener una imagen como referencia de la carga. Después se bloqueó la membrana con TBS 1X+ Tween (TBST 1X) (Sigma Aldrich™) 0.1% v/v + leche 5% p/v durante dos horas a temperatura ambiente.

III. Incubación con los anticuerpos

Se utilizó un anticuerpo (Agrisera™) específico contra la proteína AGO-4 a una concentración de 1:500. La membrana se incubó con el anticuerpo durante toda la noche a 4°C. Al finalizar, se hicieron tres lavados cada uno de 7 minutos con TBS 1X + Tween 0.1% p/v.

El anticuerpo secundario (anti-conejo; Agrisera™) se usó a una dilución 1:20,000 y se incubó por dos horas a temperatura ambiente. Se hicieron tres lavados, cada uno de 7 minutos con TBST 1X.

IV. Revelado de la reacción antígeno-anticuerpo sobre la membrana

A la membrana se le colocó una solución 1:1 de luminol-peróxido (Thermo-Scientific™) durante 3 minutos, después la membrana se expuso a una película azul de rayos X (Kodak™), para posteriormente revelarla con soluciones reveladora y fijadora (20% v/v Carestream y Kodak™, respectivamente). El tiempo de exposición en oscuridad fue variable, desde los 5 minutos hasta las 2 horas.

• Localización tisular de la proteína ARGONAUTA 4

Para este experimento se utilizaron semillas mutantes de *Arabidopsis*, en donde se tiene fusionada la región codificante de la proteína GFP (Green Fluorescent Protein) en el extremo N-terminal con la región codificante de la proteína AGO4; la expresión del transgen está controlada bajo el promotor nativo de AGO4 (pAGO4::GFP-AGO4). Estas semillas fueron donadas amablemente por el Dr. Qi (Ye et al., 2012). Las semillas se germinaron en medio MS 1X con 2 μM de MV, y se obtuvieron embriones de diferentes estadios de la germinación (previamente descritos), a los cuales se les retiró cuidadosamente la testa. Se montaron preparaciones para cada estadio añadiendo yoduro de propidio (Sigma-Aldrich™) 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ por 15 minutos con el fin de visualizar las paredes celulares. Las imágenes se tomaron con un microscopio confocal MPhot invertido (Olympus™) con un objetivo 10X de . Las imágenes de los embriones se obtuvieron de apilamientos de cortes individuales digitales con un grosor de 6.35 μm c/u. La excitación para GFP fue de 488 nm y para yoduro de propidio de 568 nm, ambos con una intensidad al 10%.

RESULTADOS

♣ Análisis fenotípico

Las semillas de tipo silvestre se sembraron en medio sólido MS adicionado con MV (metil viológeno) a diferentes concentraciones (1, 1.5 y 2 μM) o con peróxido de hidrógeno (H_2O_2 5, 10 y 15 mM). El metil viológeno (dicloruro de 1,1'-dimetil-4,4'-bipiridilo) es el compuesto activo del herbicida llamado 'Paraquat' ® que actúa como un ciclador redox con un gran potencial reductor. Cuando el dicatión (MV^{2+}) acepta un electrón forma el radical monocatión (MV^+), el cual rápidamente reacciona con el oxígeno (O_2) produciendo superóxido, peróxido de hidrógeno y radicales hidroxilo.

Bajo condiciones super-oxidantes se observó que, conforme se aumentó la concentración de MV, la tasa de germinación disminuyó. Por lo tanto, las semillas que se sometieron a una menor concentración de MV presentaron una respuesta similar a la de las semillas germinadas en condiciones favorables. Se debe resaltar que la concentración más alta (2 μM) que se utilizó de MV generó un estrés muy severo para las semillas (Han et al., 2014) y, aunque todas ellas lograron germinar, una vez que la radícula rompe la testa y aparecen los pelos radiculares, la semilla ya no logra establecerse para poder continuar con su desarrollo, lo que indica que el MV es un compuesto que afecta de manera negativa la correcta germinación y el establecimiento de la plántula (Figura 9).

En el caso del peróxido de hidrogeno, a pesar de que se siguió el mismo procedimiento que para los tratamientos con MV y, que las concentraciones que se utilizaron fueron las mismas que en estudios previos (Han et al., 2014), éste generaba una capa de "mucílago" alrededor de las semillas que les impedía germinar, razón por la cual ya no se continuó trabajando con dicho compuesto.

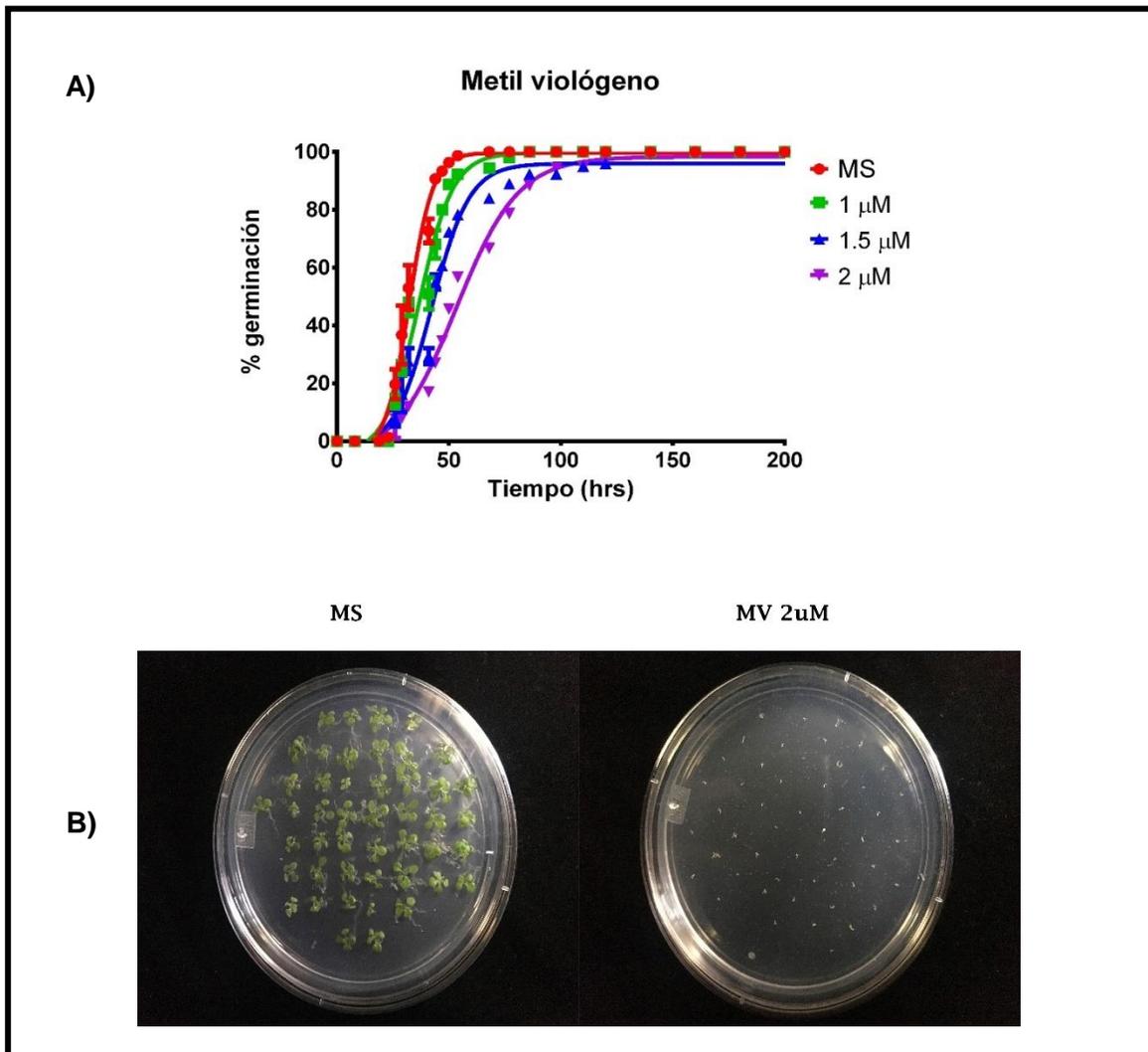


Fig. 9. El metil viológeno (MV) afecta de manera negativa la germinación de semillas de *Arabidopsis*. (A) Gráficas que representan la tasa de germinación de semillas de tipo silvestre (Col-0) bajo diferentes concentraciones de MV (1, 1.5 y 2 μ M). Cada línea representa la tasa de germinación en función del tiempo para cada concentración probada. Las barras representan el error estándar del análisis de tres réplicas. (B) Del lado izquierdo se muestran plántulas de *Arabidopsis* tipo silvestre (Col-0) después de 14 días post-germinación bajo condiciones favorables. Del lado derecho se muestran semillas de *Arabidopsis* tipo silvestre (Col-0) después de 14 días post-germinación en 2 μ M de MV

Las semillas mutantes en genes codificantes para las proteínas centrales de la vía de RdDM que fueron sembradas en medio sólido MS adicionado con 2 μ M de MV presentaron un atraso en la germinación. Estas semillas comenzaron a germinar aproximadamente a las 40 horas de haberse colocado en la cámara de germinación (hdg), en comparación con las que crecieron en condiciones óptimas, en donde la

radícula se observó desde, aproximadamente, 12 horas después de haberse colocado en la cámara de germinación (Figura 10).

Ahora bien, cuando se compararon las tasas de germinación de las mutantes con las de las semillas de tipo silvestre (Col-0), se observó que las mutantes germinaron más rápido que las de tipo silvestre, (Figura 10). A pesar de que todas las semillas comenzaron a germinar casi al mismo tiempo (entre las 40-50 hdg), se observa una notable ventaja en las mutantes, pues alcanzan el 50% de germinación aproximadamente a las 70 hdg mientras que las de tipo silvestre lo hicieron hasta las 100 hdg.

Estos resultados nos indican que la vía de RdDM participa en la modulación del proceso de germinación bajo condiciones hiperoxidantes.

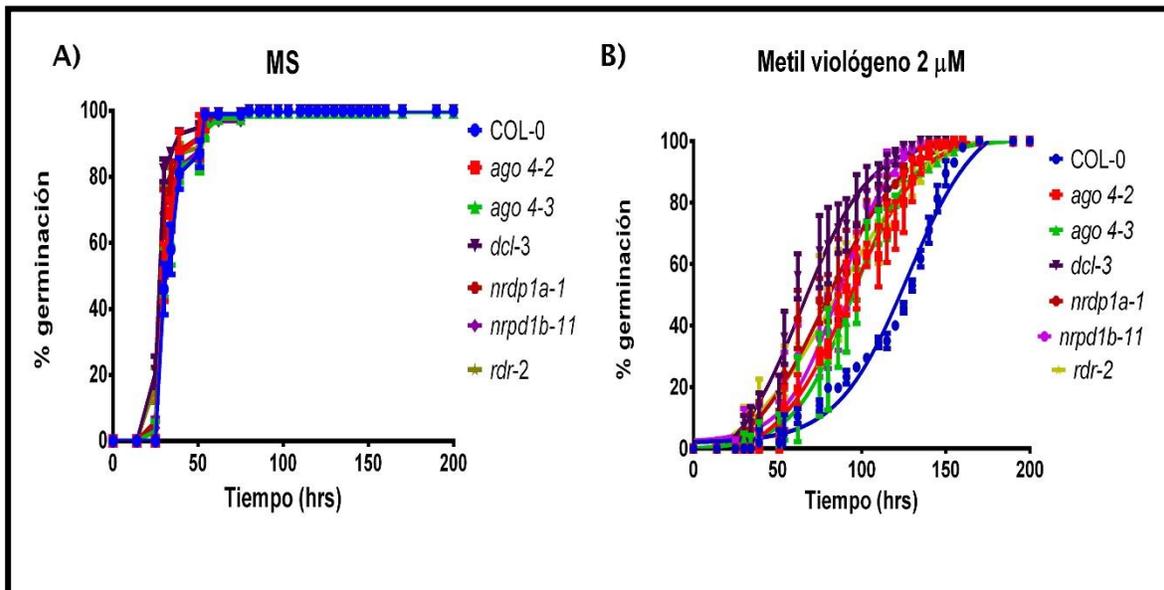


Figura 10. Se requiere de una vía RdDM funcional para llevar a cabo una germinación óptima bajo condiciones de estrés oxidativo. (A) Gráficas que representan la tasa de germinación de semillas de mutantes de *Arabidopsis* en proteínas centrales de la vía RdDM, germinadas bajo condiciones óptimas. (B) Gráficas que representan la tasa de germinación de semillas de *Arabidopsis* germinadas en medios que contienen MV 2 μ M. Cada línea representa la tasa de germinación de cada una de las mutantes en los genes para proteínas centrales de la vía RdDM (*nrpd1a-1*, *rdr2-1*, *dcl3-1*, *ago4-3* y *nrpd1b-11*) y líneas de tipo silvestre. Las barras representan el error estándar del análisis de cuatro réplicas

Aunque todas las mutantes de la vía mostraron un fenotipo de germinación acelerada ante condiciones hiper-oxidantes, se decidió analizar un poco más la participación de AGO4 debido a que es la que transloca al siRNA del citosol al núcleo y, por lo tanto, es la única proteína de la vía cuya función ocurre en ambos compartimentos. Además, en los ensayos en presencia de sal, las mutantes en este gen mostraron un fenotipo contrastante con el resto de las mutantes. Dado que la proteína AGO 4 posee una actividad catalítica que elimina la cadena pasajera del RNA de doble cadena, señal que permite la entrada del complejo maduro de

AGO4/siRNA al núcleo (Matzke y Mosher, 2014), se utilizaron dos mutantes: la mutante nula (*ago 4-3*) y una mutante sin actividad catalítica (*ago 4-2*). Los resultados obtenidos con ellas mostraron que ambas mutantes conservan el fenotipo de germinación acelerada ante el estrés oxidativo generado por MV comparado con las semillas de tipo silvestre (Figura 11).

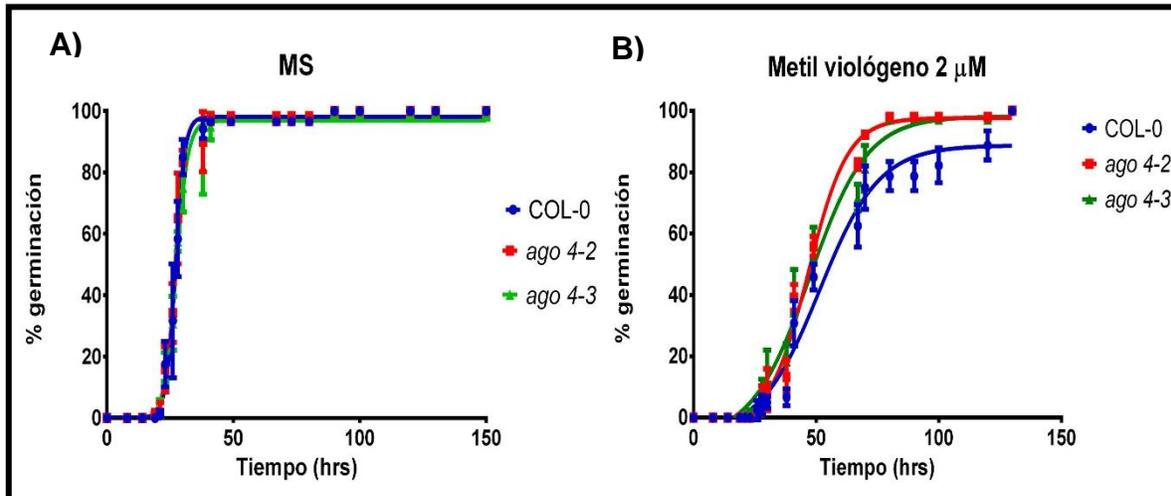


Figura 11. La proteína AGO4 es necesaria para una germinación óptima bajo condiciones de estrés oxidativo. (A) Gráficas que representan la tasa de germinación de semillas mutantes en la vía RdDM germinadas bajo condiciones favorables. Cada línea representa el porcentaje de germinación en función del tiempo para cada línea mutante de acuerdo con las claves mostradas del lado derecho. Las barras representan el error estándar de los análisis de las cuatro réplicas. (B) Gráficas que representan la tasa germinación de semillas de *Arabidopsis* germinadas en medios que contienen MV 2 µM. Cada línea representa el porcentaje de germinación de cada mutante de AGO4 (*ago4-3* y *ago4-2*) y líneas de tipo silvestre. Las barras representan el error estándar del análisis de cuatro réplicas.

El fenotipo que se observó bajo condiciones de estrés oxidativo es contrastante al que observaron Palomar y colaboradores (en proceso bajo estrés salino; ya que ellos registraron que las mutantes en los genes para las proteínas centrales de la vía RdDM poseen una menor tasa de germinación con respecto a la silvestre ante dicho estrés, contrario al que se presentó en respuesta al estrés oxidativo utilizado en este trabajo, donde la tasa de germinación de todas las mutantes es mayor a la del tipo silvestre.

La única excepción a este fenotipo bajo alta salinidad es el que presentó la mutante nula *ago4-3*, la cual mostró un porcentaje de germinación mayor a la del resto de las mutantes y a la del tipo silvestre (Figura 12). Esta observación, en conjunto con otros datos, llevó a Palomar (en proceso) a sugerir la existencia de una función adicional para la proteína AGO4, independiente la vía RdDM canónica. Si esta hipótesis es acertada, al parecer en estrés hiper-oxidante esta nueva función se ve enmascarada, dado que no se detectaron fenotipos diferentes entre estas dos mutantes en estas condiciones.

La variabilidad en los fenotipos observados muestra una diversidad en los mecanismos de regulación de la vía de RdDM durante el proceso de germinación.

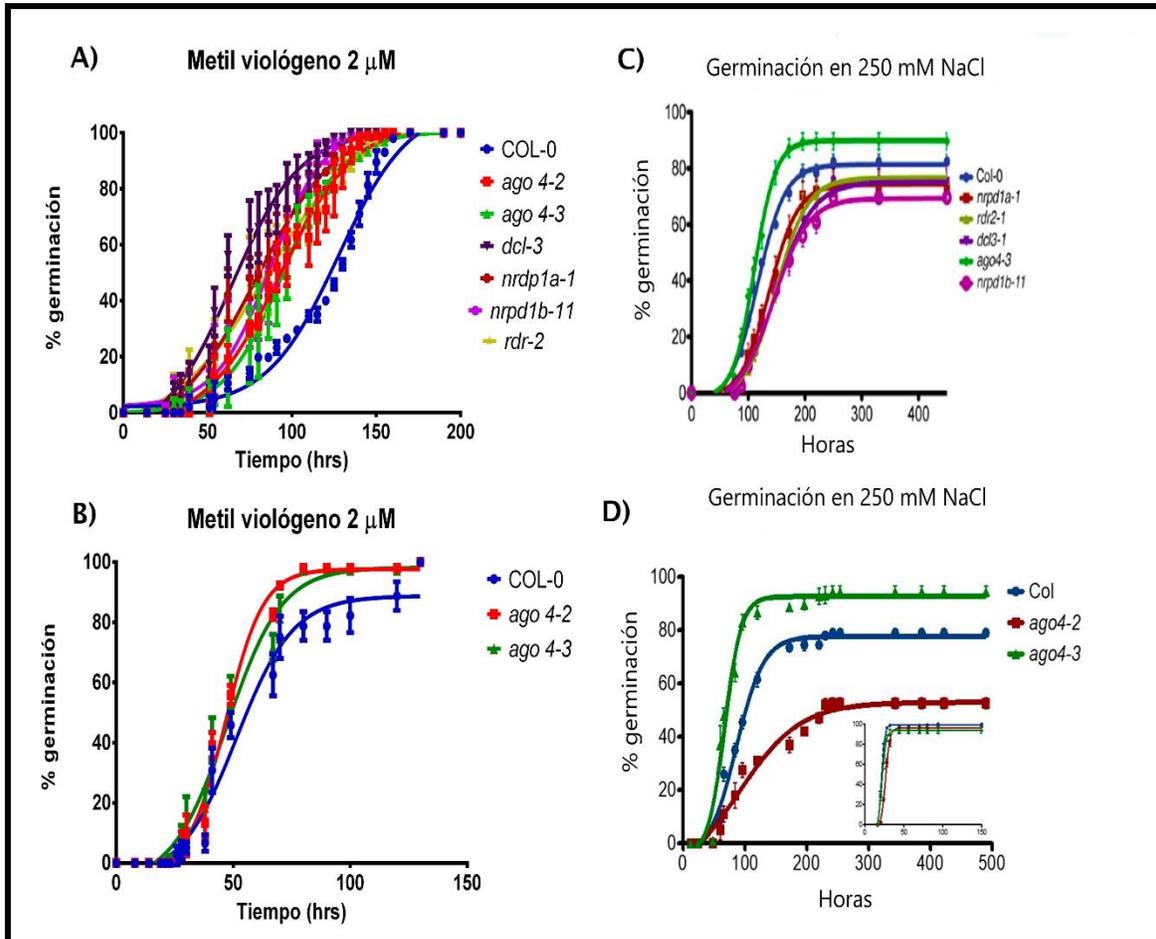


Figura 12. La vía RdDM y la proteína AGO4 son necesarias una germinación óptima de *Arabidopsis* en condiciones de estrés. (A-B) Gráficas que representan la tasa de germinación de semillas de *Arabidopsis* en medios que contienen MV 2 μ M. Cada línea representa el porcentaje de germinación de cada mutante en proteínas núcleo de RdDM (*nrpd1a-1*, *rdr2-1*, *dcl3-1*, *ago4-3*, *ago 4-2* y *nrpd1b-11*) y líneas de tipo silvestre. Las barras representan el error estándar de los análisis de 4 réplicas. (C-D) Gráficas que representan la tasa de germinación de *Arabidopsis* en medios con 250 mM de NaCl. Las barras representan el error estándar de los análisis de 4 réplicas.

≈ Patrones de expresión de la proteína ARGONAUTA 4

Con el objetivo de determinar los niveles de acumulación de AGO4 durante el proceso de germinación, se extrajeron proteínas totales de embriones en tres

diferentes estadios (A, C y E, Figura 13) de la germinación, a partir de semillas que se germinaron en condiciones óptimas y bajo estrés oxidativo. Los resultados mostraron que cuando las semillas se germinan en condiciones óptimas, los niveles máximos de AGO4 se detectaron en el estadio A, comparado con los niveles de esta proteína en los estadios C y E (Figura 13). Un patrón similar con la misma tendencia se observó cuando las semillas se germinan en medio con MV. Estos datos sugieren que AGO 4 (o RdDM) participan en modular el proceso de germinación desde los inicios de esta, tanto en condiciones óptimas como bajo estrés.

Este patrón de acumulación para AGO4 también fue similar al obtenido bajo condiciones de estrés salino, en donde los niveles de acumulación más altos de AGO4 se encontraron en semilla estratificada, disminuyendo conforme avanza la germinación. Esto refuerza el papel funcional para esta proteína durante estas etapas de desarrollo y en respuesta a condiciones adversas.

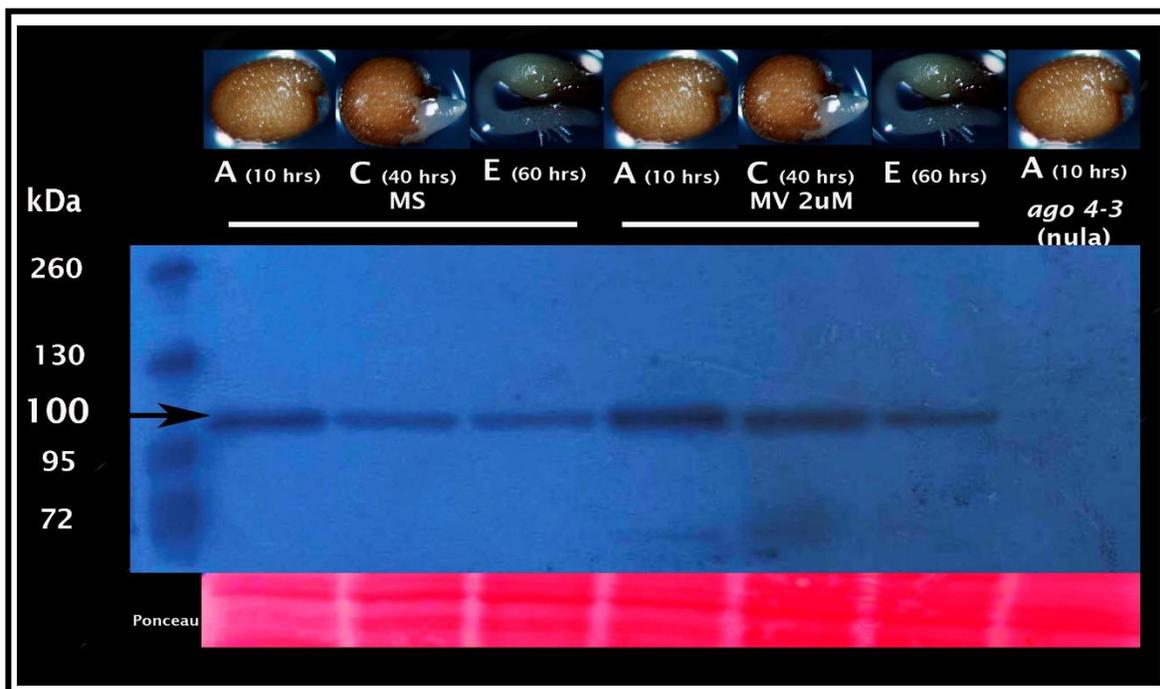


Fig. 13. Los patrones de acumulación de la proteína ARGONAUTA 4 durante el proceso de germinación y de establecimiento de plántula, en condiciones óptima o bajo estrés oxidativo. Inmunodetección por experimentos tipo Western - blot de la proteína AGO4 durante la germinación de semillas de tipo silvestre y en la mutante nula (*ago4-3*) como control negativo. **Estadios:** (A) semilla estratificada, (C) semillas donde la radícula ya rompió la testa y (E) semillas que muestran la radícula con pelos radicales. La cabeza de flecha indica la banda correspondiente a la proteína AGO4. En la parte inferior se muestra la tinción de Ponceau como control de carga.

≈ Localización tisular de la proteína AGO4

Puesto que los patrones de acumulación de AGO4 determinados por inmunodetección en membranas, sólo nos muestran la abundancia total en el embrión o plántulas completos, y no el tejido en donde se encuentra y en donde realizaría su función, decidimos determinar su distribución tisular. Para ello se utilizaron plantas transgénicas que expresan una proteína quimérica resultado de la fusión de la proteína GFP en el amino terminal de AGO4, y cuya expresión está controlada por el promotor endógeno del gen *AGO4* (pAGO4::GFP-AGO4) (Ye *et al.*, 2012). Esto nos permitiría detectar por la fluorescencia de la GFP, usando microscopía confocal, la distribución de la proteína AGO4, con la que está fusionada.

La fluorescencia de GFP en embriones en los estadios A y B (10 y 22 horas), crecidos en condiciones óptimas, mostraron una alta abundancia de AGO4 en los cotiledones y en la radícula; sin embargo, conforme se avanza en la germinación, la abundancia se mantiene en los cotiledones pero disminuye en la radícula, hasta casi no ser detectada (Figura 14-A).

En los embriones que se crecieron bajo condiciones hiper-oxidantes, se detectaron niveles elevados de AGO4 en los cotiledones y en la radícula en todos los estadios analizados. Una observación cuidadosa de esta distribución muestra que AGO4 se encontró distribuida en toda la estructura de la radícula hasta antes de que ésta rompiera la testa por completo (estadio C); sin embargo, a partir de este punto, comenzaron a disminuir los niveles de esta proteína, pero su acumulación permanece en la zona superior de la radícula (cerca a los cotiledones) y en la punta de la misma (estadio D), para después redistribuirse nuevamente en toda la radícula, excepto en su ápice (estadio E) (Figura 14-B).

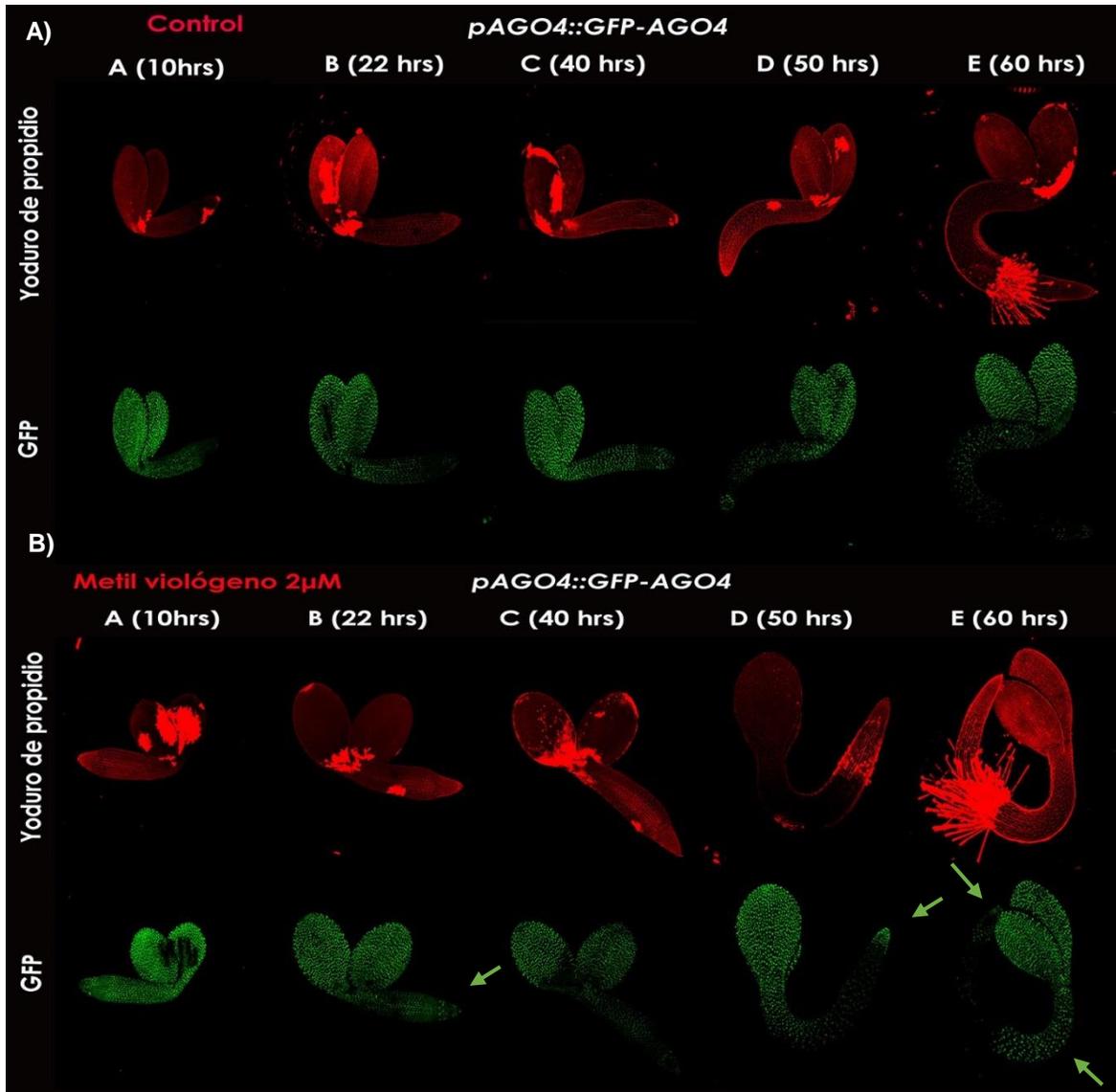


Figura 14. Distribución de la proteína AGO4 durante la germinación y post-germinación en condiciones óptimas e hiper-oxidantes. A) Fluorescencia detectada de GFP-AGO4 en embriones de 10, 22, 40, 50 y 60 horas después de la estratificación, bajo condiciones óptimas. (Arriba) Tinción con yoduro de propidio. (Abajo) Fluorescencia de GFP en las mismas muestras. **(B)** Fluorescencia detectada de GFP-AGO4 en embriones de 10, 22, 40, 50 y 60 horas post-estratificación en medios adicionados con 2 μM de MV. (Arriba) Tinción con yoduro de propidio. (Abajo) Fluorescencia de GFP en las mismas muestras. Estas son muestras representativas de por lo menos 10 individuos analizados por experimento. Las flechas señalan la abundancia de AGO4 en regiones apicales y en radículas.

El patrón de distribución de AGO4 durante la germinación y post-germinación cambia de acuerdo con el estrés al que está sometida la planta, pues en condiciones de salinidad (Figura 15-A), Palomar y colaboradores (en proceso) observaron que AGO4 es más abundante en los cotiledones durante todos los estadios analizados, mostrando además una distintiva acumulación en los haces vasculares, tanto en los

cotiledones como en la radícula. En estos tejidos la mayor acumulación se detectó en los estadios A y B, en tanto que disminuye en el resto; en cambio, en la radícula se detectaron bajos niveles de AGO4.

Estos datos confirman un papel funcional para AGO4 durante estas etapas de desarrollo en condiciones óptimas y de estrés; así como, los efectos que las variaciones en el ambiente tienen sobre su distribución.

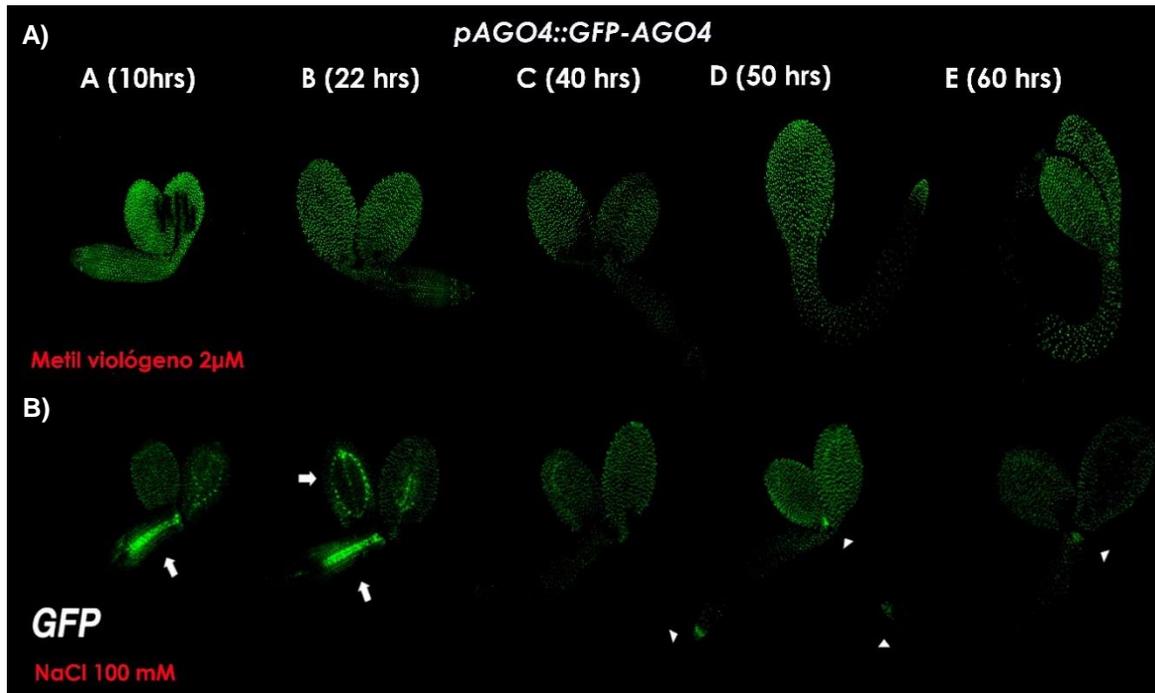


Figura 15. Los patrones de distribución de AGO4 cambian ante diferentes condiciones estresantes. A) Fluorescencia detectada de GFP-AGO4 en embriones de 10, 22, 40, 50 y 60 horas después de la estratificación en medios adicionados con 100 mM de NaCl. (Arriba) Tinción con yoduro de propidio. (Abajo) Fluorescencia de GFP en las mismas muestras. **(B)** Fluorescencia detectada de GFP-AGO4 en embriones de 10, 22, 40, 50 y 60 horas post-estratificación en medios adicionados con 2 μ M de MV. (Arriba) Tinción con yoduro de propidio. (Abajo) Fluorescencia de GFP en las mismas muestras. Estas son muestras representativas de por lo menos 10 individuos analizados por experimento. Las flechas señalan la abundancia de AGO4 en regiones apicales y de radículas

DISCUSIÓN

La germinación es una etapa compleja durante el desarrollo de las plantas, la cual implica cambios morfogénéticos y fisiológicos drásticos, controlados mediante una regulación precisa mediada por diferentes moléculas señalizadoras, como las hormonas, las ROS, fosfatasa y quinasas, entre otras más. Naturalmente este proceso está expuesto a un cambio dramático del ambiente; ya que, la semilla pasa de estar en un estado casi totalmente deshidratado a un estado húmedo, en donde el agua es un estímulo para el inicio de la actividad metabólica del embrión que le permitirá germinar y desarrollarse. Así pues, el embrión tiene que estar preparado para soportar y contender con este cambio natural, pero también con aquellos cambios que se presenten de manera inesperada en el ambiente en donde se iniciará su crecimiento y desarrollo (Buchanan, *et al.*, 2015).

Los resultados obtenidos en este trabajo mostraron que el MV es un inductor de estrés oxidativo que tiene un efecto negativo sobre la germinación, ya que la tasa de germinación de semillas de *Arabidopsis* de tipo silvestre disminuyó evidentemente al compararla con las que crecen en condiciones favorables. Este efecto es dosis dependiente, pues conforme aumenta la concentración de MV, el efecto en la germinación es más severo (Figura 9). Esto es resultado del impacto de la elevación en las concentraciones de las ROS que afectan diferentes procesos, como movilización de iones, la expresión de genes, la regulación post-transcripcional, traduccional y post-traduccional, la alteración en la actividad de enzimas metabólicas y de proteínas reguladoras, etc. (Cruz de Carvalho, 2008; Choudhury *et al.*, 2017).

Como parte de las estrategias que las plantas han desarrollado como defensa y/o ajuste ante diferentes tipos de estrés, están cambios rápidos y coordinados en los mecanismos que modulan procesos transcripcionales y post-transcripcionales (Boyko y Kovalchuk 2008). Estas estrategias provocan alteraciones de la homeostasis de la planta durante su crecimiento (Shinozaki *et al.*, 2003), y algunas de ellas llevan a modificaciones hereditarias de la expresión génica, las cuales pueden diferir entre especies de plantas, en función de la intensidad y la duración del estrés y la información genética de las mismas (Chen *et al.*, 2010). Estas últimas modificaciones pueden ocurrir sin cambiar la secuencia del ADN original y se conocen como modificaciones epigenéticas.

Una de las vías epigenéticas que ha recibido mucha atención en el estudio de la regulación de la expresión genética en los últimos años es la vía de metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM); en particular, porque es específica de plantas. Esta vía es biológicamente importante ya que se ha hipotetizado que regula la transcripción/actividad de los transposones, manteniendo así la estabilidad del genoma y, por tanto, contribuyendo al control de los procesos de desarrollo. También se ha reportado que está involucrada en el control de las respuestas de ajuste ante algunos tipos de estrés (biótico y abiótico) (Xie y Yu, 2010); sin embargo, poco se sabe sobre los mecanismos por los que regula las respuestas a estas condiciones adversas, en particular en las implicadas en la deficiencia de agua o en

condiciones hiper-oxidantes (Tricker *et al.*, 2012; Popova *et al.*, 2013). En este trabajo, nos enfocamos en la participación de la vía RdDM en la regulación de la respuesta de la planta ante un estrés abiótico impuesto por un aumento en la concentración de ROS durante la germinación, una etapa crítica en el desarrollo de la planta. La motivación de ello fue el conocer si una condición hiperoxidante que generalmente se presenta como una primera respuesta de las plantas ante cualquier condición de estrés, presentaba los mismos requerimientos de la vía RdDM canónica, como sucedió en respuesta a una condición de alta sal en el medio de germinación. Esta investigación a la vez nos daría una respuesta en cuanto a la participación de esta vía regulatoria en la respuesta de la planta ante un estrés hiperoxidante durante la germinación.

Como se describe en la sección de Resultados, las mutantes en los genes para las proteínas centrales de la vía RdDM (*nrpd1a-1*, *nrpd1b-11*, *dcl3-1*, *rdr2-1*, *ago4-2* y *ago 4-3*) mostraron una tasa de germinación mayor que la línea silvestre, revelando una cierta tolerancia al estrés oxidativo impuesto con MV. El hecho de que el fenotipo en las líneas mutantes sea diferente al de plantas silvestre demostró que la vía RdDM canónica también participa en la modulación de la germinación bajo condiciones hiper-oxidantes. Sin embargo, hay que resaltar, que el fenotipo detectado fue diferente al observado en respuesta a altas concentraciones de salinidad. Palomar y colaboradores (en proceso) observaron que bajo condiciones de alta salinidad las semillas mutantes en RdDM exhiben una germinación retrasada, a excepción de la mutante nula *ago 4-3*; razón que los llevó a sugerir una función adicional para esta proteína, independiente de la que tiene en la vía de RdDM canónica. Estos resultados son evidencia que sugiere que la vía RdDM canónica participa de forma diferencial modulando la germinación en función de la condición ambiental que se presente durante la germinación.

La vía RdDM está implicada en regular la metilación *de novo* del ADN, principalmente, en transposones y zonas repetidas de ADN. Se sabe que los patrones de metilación varían dependiendo del estrés al que la planta esté sometida, lo cual genera una respuesta específica. Por lo tanto, nuestros datos sugieren que las condiciones que se están imponiendo de estrés dan lugar a una respuesta de ajuste diferente para cada caso, y que, en el establecimiento de esas respuestas, participa la vía de RdDM.

La pérdida del silenciamiento de transposones en respuesta a una condición de estrés, regula la transcripción de genes vecinos (Matzke y Moshier, 2014). Como se ha observado en la inducción mediada por estrés en los retrotransposones Tos17 (arroz) [Hirochika *et al.*, 1996], Tto1 (tabaco) [Takeda *et al.*, 1999], Tnt1 (tabaco) [Beguiristain *et al.*, 2001], y BARE-1 (cebada) [Kalendar *et al.*, 2000].

En este sentido, el fenotipo contrastante que observamos entre condiciones de alta salinidad e hiper-oxidantes puede ser debido a que en ausencia de una vía de RdDM funcional, los transposones están activos y moviéndose en el genoma haciendo que prevalezca o aumente la producción de enzimas antioxidantes que eliminan con mayor rapidez las ROS, y, de esta manera, permitiendo que las germinen más rápido bajo estas condiciones. También, se podrían promover la expresión de genes codificantes de proteínas represoras implicadas en la inhibición

de la germinación, de tal manera que cuando la vía RdDM no es funcional daría como resultado una germinación más rápida, generando un fenotipo de tolerancia a concentraciones altas de ROS (Figura 16). O bien, dado que las ROS durante la imbibición regulan las redes hormonales de GA y ABA, bajo condiciones oxidantes favorecen la biosíntesis de GA y de esta forma liberan a la semilla de la dormancia y promueven una mayor germinación. Cabe resaltar que los fenotipos sólo son detectables bajo condiciones de estrés, lo que es consistente con la activación de elementos transponibles, activación que estaría controlada por la vía RdDM.

A pesar de que cualquier tipo de estrés induce la generación de ROS, cada conjunto de condiciones ambientales dará como resultado un aumento en ROS celulares específicos y una señal redox que contribuye a la formación de una respuesta celular específica (Choudhury *et al.*, 2017; Grant *et al.*, 2000; Kovtun *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2000). Esto complementa los resultados contrastantes que observamos (Figura 12) pues a pesar de que en ambas condiciones hay un incremento de ROS, el efecto que tiene el aumento de un tipo de ROS específico (H_2O_2 , O_2) en un tejido determinado, así como el sistema antioxidante implicado, desencadena una respuesta característica en cada condición.

Bajo condiciones hiper-oxidantes, la posible función adicional de AGO4 que proponen Palomar y colaboradores (en proceso) se encuentra enmascarada o bien no ocurre en estas condiciones, pues las mutantes de esta proteína (nula y no-catalítica) muestran el mismo fenotipo de resistencia que el resto de las mutantes de la vía de RdDM.

Debido a que las mutantes en AGO4 se comportaron igual que el resto de las mutantes de la vía de RdDM, mostrando un fenotipo de tolerancia a condiciones hiper-oxidantes, se decidió seguir explorando el comportamiento de esta proteína en respuesta a estrés oxidativo. La proteína AGO 4 muestra niveles altos de acumulación en semilla seca que varían a lo largo de la germinación y post-germinación bajo condiciones óptimas; este patrón de acumulación cambia en condiciones de alta salinidad, pues la mayor acumulación se da en la semilla estratificada y se reduce a lo largo de la germinación (Palomar y colaboradores, en proceso). Los patrones de acumulación que observamos bajo estrés oxidativo son similares a los que se inducen en estrés salino, donde la mayor acumulación se da en semillas estratificadas. Estas observaciones son consistentes con un papel funcional para AGO4 durante la y en la respuesta ante estas condiciones adversas.

Utilizando la proteína reportera GFP-AGO4 expresada bajo el control del promotor de AGO4, observamos que en condiciones óptimas de crecimiento la distribución de esta proteína cambia a lo largo de las diferentes etapas del proceso de germinación, siendo que la acumulación es mayor y continua en cotiledones, mientras que en la radícula sus niveles y su distribución se modifican a lo largo de los diferentes estadios de la germinación y post-germinación. La disminución significativa de los niveles de AGO4 y su distribución diferencial, primero más abundante en las regiones cercanas a los cotiledones y casi nula en la punta de la radícula es indicativo de una participación diversa de esta proteína y/o de la vía RdDM en cada uno de los tejidos que conforman este órgano y en sus diferentes etapas de desarrollo. Posteriormente, su acumulación en las puntas de las radículas

(posiblemente en el nicho de células madre) sugiere un papel en la percepción del estrés para prevenir la actividad de los elementos transponibles y por tanto generación de mutaciones deletéreas que pudieran afectar el posterior desarrollo de la raíz. Por otro lado, el que se mantenga su abundancia y distribución en los cotiledones a lo largo de las etapas de desarrollo analizadas sugiere una función relevante en el desarrollo de estos órganos que serán esenciales para iniciar sus funciones fotosintéticas durante el establecimiento de la plántula. La distribución y abundancia de AGO4 a lo largo de la germinación y post-germinación de *Arabidopsis* refuerza el papel de esta proteína durante esta etapa crucial en el desarrollo de la planta.

Bajo condiciones hiper-oxidantes, la localización y abundancia de AGO4 muestra algunos cambios. En los embriones de semillas recién estratificadas exhibe una mayor abundancia en cotiledones y en toda la radícula que bajo condiciones óptimas, los niveles disminuyen en las siguientes etapas; sin embargo, se mantienen relativamente constantes en los cotiledones, como cuando no están bajo estrés, indicando la relevancia de esta proteína en el desarrollo de los cotiledones bajo altos niveles de ROS. En las etapas C y D, resulta notable una mayor abundancia y distribución de AGO4 en la punta de la raíz, no sólo en el nicho de células troncales, que dan lugar a los diferentes tejidos de este órgano. En tanto que en la etapa E, su localización en la punta desaparece y se eleva su abundancia a lo largo de la radícula, comparado con su patrón en plántulas no estresadas. La presencia de AGO4 en el nicho de células madre y en la zona meristemática en algunas etapas del desarrollo de la plántula es consistente con la importancia que se le ha atribuido al control epigenético en estos tipos celulares, pues ahí se llevan a cabo procesos como la división celular y la especificación de la identidad celular (Takatsuka y Umeda, 2015). Cabe hacer notar que estas regiones son muy vulnerables a cualquier condición adversa, lo que permite predecir que en ellas se han seleccionado mecanismos de contención para mantener su integridad estructural y genética. En el caso de las condiciones hiper-oxidantes que se analizan en esta tesis, habrá que considerar que las ROS promueven la peroxidación de fosfolípidos de membrana, así como la oxidación de grupos sulfhidrilo localizados en las proteínas de transporte iónico, por lo que afectan la entrada de diversos iones como Ca^{2+} y K^+ , y de otras proteínas afectando diversos procesos que impactan en la homeostasis celular.

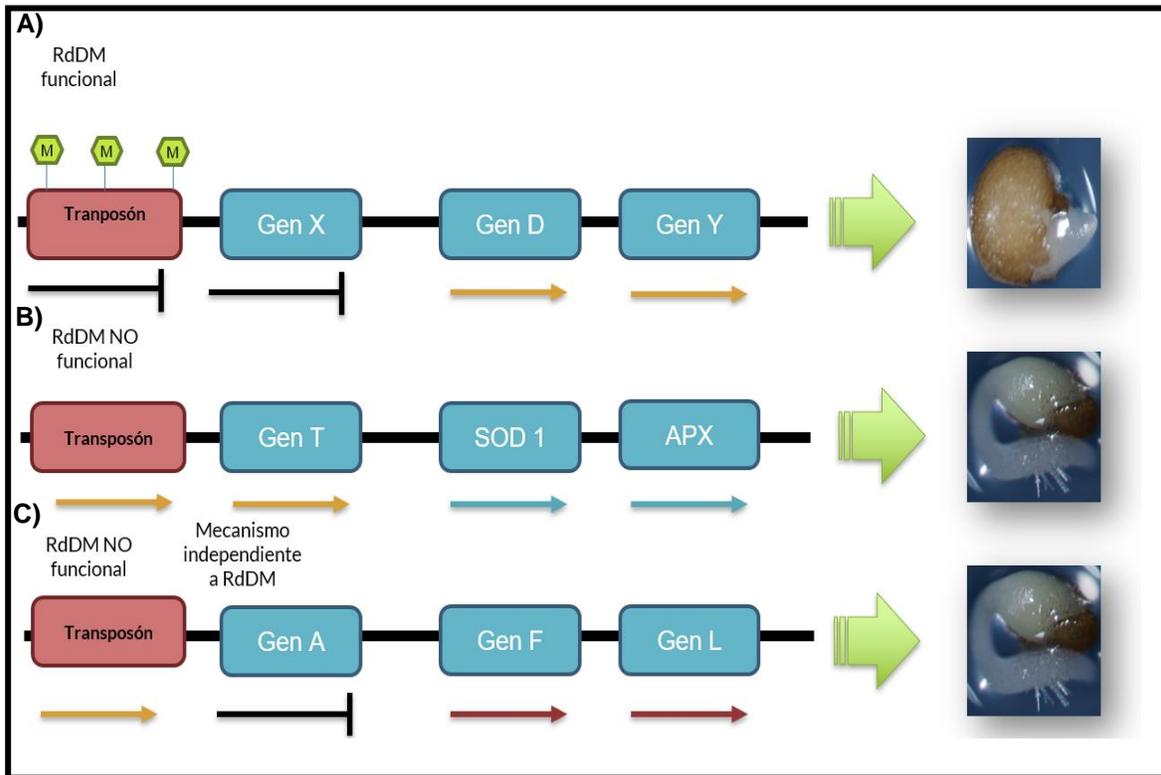


Figura 16. Modelo propuesto para la participación de RdDM en el control del proceso de germinación de *Arabidopsis thaliana* bajo condiciones hiper-oxidantes. (A) Vía de RdDM funcional que mantiene inhibidos tanto a transposones como a sus genes aledaños a ellos; como resultado da un proceso de germinación óptimo. (B) Vía de RdDM no funcional, los transposones no se encuentran metilados y por lo tanto están activos, permitiendo la transcripción de genes aledaños relacionados ya sea con enzimas antioxidantes o con genes que promueven la germinación, provocando una germinación más rápida en condiciones hiper-oxidantes comparada con la que se observa en condiciones óptimas. (C) Vía de RdDM no funcional que promueve la activación de transposones y de sus genes aledaños que forman una respuesta indirecta ante condiciones hiper-oxidantes.

CONCLUSIONES

- ≈ Las condiciones hiper-oxidantes afectan el proceso de germinación.

- ≈ La vía de Metilación de ADN dependiente de ARN (RdDM) participa en la modulación de la respuesta ante estrés oxidativo durante la germinación de *Arabidopsis thaliana*.

- ≈ Las condiciones hiper-oxidantes revelan una diversidad en los mecanismos de regulación RdDM durante la germinación de *Arabidopsis thaliana*.

- ≈ La proteína ARGONAUTA 4 participa en la respuesta a estrés oxidativo durante la germinación.

- ≈ Condiciones hiper-oxidantes muestran una localización diferencial para la proteína ARGONAUTA 4 a lo largo de la germinación y durante el desarrollo de la plántula.

- ≈ La función adicional de AGO4, revelada en el análisis genético de esta vía en semillas de *Arabidopsis* carentes de AGO4 o expresando una proteína AGO4 sin actividad catalítica, bajo condiciones de estrés salino, no se detectó bajo estrés hiper-oxidante, sugiriendo una diversidad funcional de esta proteína bajo diferentes condiciones de estrés.

BIBLIOGRAFÍA

- Achard, P., Gusti, A., Cheminant, S., Alioua, M., Dhondt, S., Coppens, F., Beemster, G.T. y Genschik, P. (2009). Gibberellin signaling controls cell proliferation rate in *Arabidopsis*. *Curr Biol.* 19:1188-93.
- Agius, F., Kapoor, A. y Zhu, J.K. (2006). Role of the *Arabidopsis* DNA glycosylases/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci* 103:11796–11801.
- Alscher, R.G., Erturk, N. y Heath LS. (2002). Role of superoxide dismutases (SODs) in controlling oxidative stress in plants. *J Exp Bot*; 53:1331-41.
- An, G., Watson, B. D., Chiang, C. C. (1986). Transformation of Tobacco, Tomato, Potato, and *Arabidopsis thaliana* Using a Binary Ti Vector System. *Plant Physiology*. 81, (1), 301-305.
- Apel K, Hirt H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*; 55:373-99.
- Bakthisaran, R., Tangirala, R. y MohanRao, Ch. (2015). Small heat shock proteins: Role in cellular functions and pathology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1854. 291–319.
- Bannister, A.J. y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*. 21:381–395.
- Beck, E.H., Heim, R., Hansen, J. (2004). Plant resistance to cold stress: mechanisms and environmental signals triggering frost hardening and dehardening. *J Biosci* 29(4):449–459.
- Beguiristain, T., Grandbastien, M.A., Puigdoménech, P. y Casacuberta, M. (2001). Three Tnt1 Subfamilies Show Different Stress-Associated Patterns of Expression in Tobacco. Consequences for Retrotransposon Control and Evolution in Plants. *Plant Physiology*, Vol. 127, pp. 212–221.
- Bewley, D., Bradford, K., Hilhorst, H. y Nonogaki, H. (2013). *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3ra edición. Springer Science.
- Bhutani, N., Burns, D.M. y Blau, H.M. (2011). DNA demethylation dynamics. *Cell* 146:866–872.
- Boyko, A. y I. Kovalchuk. (2008). Epigenetic Control of Plant Stress Response. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 49:61-72.
- Boyko, A., Blevins, T., Yao, Y., Golubov, A., Bilichak, A., Ilnytsky, Y., Hollander, J., Meins, F.J. y Kovalchuk, I. (2010). Transgenerational adaptation of *Arabidopsis* to stress requires DNA methylation and the function of Dicer-like proteins. *PLoS One* 5(3):9514.
- Buchanan, B., Gruissem, W y Jones, R. (2015). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Segunda edición. Wiley Blackwell.UK
- Camporeale, G., Oommen, A.M., Griffin, J.B., Sarath, G. y Zemleni, J. (2007). K12-biotinylated histone H4 marks heterochromatin in human lymphoblastoma cells. *J Nutr Biochem*. 8:760–768.

- Chen, LT. y K. Wu. (2010). Role of histone deacetylases HDA6 and HDA19 in ABA and abiotic stress response. *Plant Signaling & Behavior* 5:10, 1318-1320.
- Chen, M., Lv, S. y Meng, Y. (2010). Epigenetic performers in plants, *Dev.Growth Differ.* 52: 555–566.
- Chinnusamy, V., Dalal, M. y Zhu, JK. (2014). Epigenetic regulation of abiotic stress responses in plants. *Plant Abiotic Stress.* 12(2): 133–139.
- Choi, CS. y Sano, H. (2007). Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Mol Genet Genomics* 277(5):589–600.
- Choudhury, F., R. Rivero., Blumwald , E y Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *The Plant Journal.* 90, 856–867.
- Cruz de Carvalho, MA. (2008). Drought stress and reactive oxygen species Production, scavenging and signaling. *Plant Signaling & Behavior* 3:3, 156-165.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D. y Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell Mol Life Sci*; 57:779-95.
- Desikan, R., Neill, S. y Hancock, J. (1999). Hydrogen Peroxide–Induced Gene Expression In *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical Biology & Medicine*, Vol. 28, No. 5,773–778.
- Desikan, R., Neill, SJ. y Hancock, JT. (2000). Hydrogen peroxide-induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free radical Biology and Medicine* 28, 773-778.
- Dietz, K.J. (2015) Efficient high light acclimation involves rapid processes at multiple mechanistic levels. *J. Exp. Bot.* 66, 2401–2414.
- Dietz, K.J. (2016) Thiol-based peroxidases and ascorbate peroxidases: why plants rely on multiple peroxidase systems in the photosynthesizing chloroplast?. *Mol. Cells* 39, 20–25.
- Dietz, K.J., Turkan, I. y Krieger-Liszkay, A. (2016) Redox- and reactive oxygen species-dependent signaling in and from the photosynthesizing chloroplast. *Plant Physiol.* 171, 1541–1550.
- Efroni, I., Han, S.K., Kim, H.J., Wu, M.F., Steiner, E., Birnbaum, K.D., Hong, J.C., Eshed, Y. y Wagner, D. (2013). Regulation of leaf maturation by chromatin-mediated modulation of cytokinin responses. *Dev. Cell* 24: 438–445.
- Eichten, SR., Schmitz, RJ. y Springer, NM. (2014). Epigenetics: beyond chromatin modifications and complex genetic regulation. *Plant Physiology.* 165(3):933–947.
- Graeber, K., Linkies, A., Müller, K., Wunchova, A., Rott, A. and Leubner-Metzger, G. (2010). Cross species approaches to seed dormancy and germination: conservation and biodiversity of ABA-regulated mechanisms and the Brassicaceae DOG1 genes. *Plant Mol. Biol.* Vol. 73: 67–87.
- Grant, JJ., Yun, B-W. y Loake, GJ. (2000). Oxidative burst and cognate redox signalling reported by luciferase imaging: identification of a signal network that

- functions independently of ethylene, SA and Me-JA but is dependent on MAPKK activity. *The Plant Journal* 24, 569–582.
- Grunewald, W. y Friml, J. (2010) The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO J.* 29, 2700–2714.
 - Han, HJ., Peng, RH., Zhu, B., Fu, XY., Zhao, W., Shi, B. y Yao, QH. (2014). Gene expression profiles of arabidopsis under the stress of methyl
 - Han, S.K., Sang, Y., Rodrigues, A., Wu, M.F., Rodriguez, P.L. y Wagner, D. (2012). The SWI2/SNF2 chromatin remodeling ATPase BRAHMA represses abscisic acid responses in the absence of the stress stimulus in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 4892–4906.
 - Hirochika, H., Sugimoto, K., Otsuki, Y., Tsugawa, H., Kanda, M. (1996). Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 7783-7788.
 - Ito, H., Gaubert, H., Bucher, E., Mirouze, M., Vaillant, I. y Paszkowski, J. (2011). An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* 472, 115–119.
 - Kalendar, R., Tanskanen, J., Immonen, S., Nevo, E. y Schulman, A. (2000). Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *PNAS*. Vol. 97. 6603–6607.
 - Kawano, T. (2003) Roles of the reactive oxygen species-generating peroxidase reactions in plant defense and growth induction. *Plant Cell Rep.* 21, 829–837.
 - Kermode, A. (2005). Role of Abscisic Acid in Seed Dormancy. *J Plant Growth Regul.* Vol. 24:319–344.
 - Kumar Kar, R. (2011). Plant responses to water stress: Role of reactive oxygen species. *Plant Signaling & Behavior* 6:11, 1741-1745.
 - Kwak, JM., Mori, IC., Pei, ZM., Leonhardt, N., Torres, MA., Dangl, JL., Bloom, RE., Bodde, S., Bones, JD. y Schroeder, JI. (2003). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF genes function in ROS-dependent ABA signaling in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 22:2623-33.
 - Kwon, C.S., Chen, C. y Wagner, D. (2005). *WUSCHEL* is a primary target for transcriptional regulation by *SPLAYED* in dynamic control of stem cell fate in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 19: 992–1003.
 - Kwon, C.S., Wagner, D. (2007). Unwinding chromatin for development and growth: A few genes at a time. *Trends Genet.* 23: 403–412.
 - Lee, T. F., Gurazada, SG., Zhai, J., Li, S., Simon, SA., Matzke, MA., Chen, X. y Meyers, BC. (2012). RNA polymerase V-dependent small RNAs in *Arabidopsis* originate from small, intergenic loci including most SINE repeats. *Epigenetics* 7, 781–795.
 - Liu, C., Lu, F., Cui, X. y Cao, X. (2010). Histone methylation in higher plants, *Annu. Rev. Plant Biology.* 61: 395–420.
 - Ma, L., H. Zhang, L. Sun, Y. Jiao, G. Zhang, C. Miao y F. Hao. (2012). NADPH oxidase AtrbohD and AtrbohF function in ROS-dependent regulation of Na⁺/K⁺ homeostasis in *Arabidopsis* under salt stress. *J Exp Bot.*;63 :305-17.
 - Matilla AJ, MA. Matilla-Vázquez. (2008) Involvement of ethylene in seed

- physiology. *Plant Science*. Vol. 175:87-97.
- Matzke, M. y R. Moshier. (2014). RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature*. Vol. 15. 394-408.
 - Nathan, D., Ingvarsdottir, K., Sterner, DE., Bylebyl, GR., Dokmanovic, M., Dorsey, JA., Whelan, KA., Krsmanovic, M., Lane, WS. y Meluh, PB. (2006). Histone sumoylation is a negative regulator in *Saccharomyces cerevisiae* and shows dynamic interplay with positive-acting histone modifications. *Genes Dev*. 20:966–976.
 - Neill, SJ., Desikan, R., Clarke, A., Roger, D. y Hancock, JT. (2002). Hydrogen peroxide and nitric oxide as signalling molecules in plants, *Journal of Experimental Botany*, Vol 53:1237–1247.
 - Nie, W.F., Wang, M.M., Xia, X.J., Zhou, Y.H., Shi, K., Chen, Z. y Yu, J.Q. (2013) Silencing of tomato RBOH1 and MPK2 abolishes brassinosteroid-induced H₂O₂ generation and stress tolerance. *Plant, Cell Environ*. 36, 789–803.
 - Olvera, Y., Campos, F., Reyes, JL., Garcarrubio, A. y Covarrubias, A. (2010). Functional Analysis of the Group 4 Late Embryogenesis Abundant Proteins Reveals Their Relevance in the Adaptive Response during Water Deficit in Arabidopsis. *Plant Physiology*. American Society of Plant Biologists.
 - Patel, DJ. Y Wang, Z. (2013). Readout of epigenetic modifications. *Annual Review of Biochemistry*. 82, 81–118.
 - Pecinka, A., Rosa, M., Schikora, A., Berlinger, M., Hirt, H., Luschnig, C., Mittelsten Scheid, O. (2009). Transgenerational stress memory is not a general response in Arabidopsis. *PLoS One* 4(4):5202.
 - Popova, O. V., Dinh, H., Aufsatz, Q., y Jonak, C. (2013). The RdDM pathway is required for basal heat tolerance in Arabidopsis. *Molecular plant*, 6(2), 396-410.
 - Reyes, T., Rodrigo M., Colmenero-Flores, J., Gil, J., Garay-Arroyo, A., Campos, F., Salamini, F., Bartels, D. y Covarrubias, A. (2005). Hydrophilins from distant organisms can protect enzymatic activities from water limitation effects in vitro. *Plant, Cell and Environment*. Vol 28, 709–718.
 - Rivero, L., Sánchez-Serrano, JJ. y Salinas, J. (2014). *Arabidopsis Protocols*. Humana Press. Totowa, NJ. 3-25 .
 - Rodríguez-Gacío, M., Matilla-Vázquez, M. y Matilla, M. (2009). Seed dormancy and ABA signaling: The breakthrough goes on. *Plant Signaling & Behavior* 4:11, 1035-1048.
 - Schiml, S., Fauser, F., Puchta, H. (2016). Chromosome and Genomic Engineering in Plants: Methods and Protocols. Murata, M. Springer New York. New York, NY. 111-122.
 - Sewelam, N., Kazan, K. y Schenk, P. M. (2016). Global plant stress signaling: reactive oxygen species at the cross-road. *Front. Plant Sci*. 7:187.
 - Shinozaki, K., Yamaguchi, K. y Saki, M. (2003). Regulatory network of gene expression in the drought and cold stress responses. *Plant Biology* 6, 410-417.
 - Sridhar, VV., Kapoor, A., Zhang, K., Zhu, J., Zhou, T., Hasegawa, PM., Bressan, RA. y Zhu, JK. (2007). Control of DNA methylation and

heterochromatic silencing by histone H2B deubiquitination. *Nature*. 447:735–738.

- Sudan, J., Raina, M., Singh, R. (2018). Plant epigenetic mechanisms: role in abiotic stress and their generational heritability. *Biotech*, 8:172.
- Takatsuka, H., & Umeda, M. (2015). Epigenetic Control of Cell Division and Cell Differentiation in the Root Apex. *Frontiers in plant science*, 6, 1178.
- Takeda, S., Sugimoto, K., Otsuki, H., Hirochika, H. (1999). A 13-bp cis-regulatory element in the LTR promoter of the tobacco retrotransposon Tto1 is involved in responsiveness to tissue culture, wounding, methyl jasmonate and fungal elicitors. *Plant J.* 18, 383–393.
- Tang, X.R., Hou, A.F., Babu, M., Nguyen, V., Hurtado, L., Lu, Q., Reyes, J.C., Wang, A.M., Keller, W.A., Harada, J.J., Tsang, E.W.T. y Cui, Y.H. (2008). The Arabidopsis BRAHMA chromatin-remodeling ATPase is involved in repression of seed maturation genes in leaves. *Plant Physiol.* 147: 1143–1157.
- Tognetti, V.B., Muhlenbock, P. y Van Breusegem, F. (2012) Stress homeostasis– the redox and auxin perspective. *Plant, Cell Environ.* 35, 321–333.
- Tognetti, V.B., Van Aken, O., Morreel, K. (2010). Perturbation of indole-3-butyric acid homeostasis by the UDP-glucosyltransferase UGT74E2 modulates Arabidopsis architecture and water stress tolerance. *Plant Cell*, 22, 2660–2679.
- Tricker, P. J., Gibbings, J. G., Rodriguez Lopez, C. M., Hadley, P. y Wilkinson, M. J. (2012). Low relative humidity triggers RNA-directed de novo DNA methylation and suppression of genes controlling stomatal development. *J. Exp. Bot.* 63, 3799–3813.
- Tsaftaris, AS., Polidoros, AN., Kapazoglou, A., Tani, E. y Kovacevic, NM. (2007). Epigenetics and plant breeding. *Plant Breed Rev.* 30:49–178.
- Vercruyssen, L., Verkest, A., Gonzalez, N., Heyndrickx, K. S., Eeckhout, D., Han, S. K., Jégu, T., Archacki, R., Van Leene, J., Andriankaja, M., De Bodt, S., Abeel, T., Coppens, F., Dhondt, S., De Milde, L., Vermeersch, M., Maleux, K., Gevaert, K., Jerzmanowski, A., Benhamed, M., Wagner, D., Vandepoele, K., De Jaeger, G. e Inzé, D. (2014). ANGUSTIFOLIA3 binds to SWI/SNF chromatin remodeling complexes to regulate transcription during Arabidopsis leaf development. *The Plant cell*, 26(1).
- Vignali, M., Hassan, A. H., Neely, K. E. y Workman, J. L. (2000). ATP-dependent chromatin-remodeling complexes. *Molecular and cellular biology*, 20(6), 1899-910.
- viologen: a microarray analysis. *Mol Biol Rep.* 41:7089–7102
- Walley, J.W., Rowe, H.C., Xiao, Y.M., Chehab, E.W., Kliebenstein, D.J., Wagner, D. y Dehesh, K. (2008). The chromatin remodeler SPLAYED regulates specific stress signaling pathways. *PLoS Pathog.* 4.
- Weitbrecht, K., Müller, K y Leubner-Metzge, G. (2011). First off the mark: early seed germination. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62: 3289–3309.
- Wierzbicki, A. T., Cocklin, R., Mayampurath, A., Lister, R., Jordan Rowley, M., Gregory, B., Ecker, J., Tang, H. y Pikaard, C. (2012). Spatial and

- functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. *Genes Dev.* 26, 1825–1836.
- Xie, M. y Yu, B. (2015). siRNA-directed DNA methylation in plants. *Curr. Genom.* 16(1):23–31.
 - Zemach, A., Kim, MY., Hsieh, PH., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao. K., Harmer, SL. y Zilberman, D. (2013). The *Arabidopsis* nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* 153, 193–205.
 - Zentner, GE. y Henikoff, S. (2013). Regulation of nucleosome dynamics by histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology* 20, 259–266.
 - Zhang, K., Sridhar, VV., Zhu, J., Kapoor, A. y Zhu, JK. (2007). Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*.11:e1210.
 - Zheng, Q., Rowley, MJ., Böhmendorfer, G., Sandhu, D., Gregory, BD. Y Wierzbicki, AT. (2013). RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *Plant J.* 73, 179–189.
 - Zhong, X. (2012). DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nature Struct. Mol.Biol.* 19, 870–875.
 - Zhou, J., Wang, J., Li, X., Xia, X.J., Zhou, Y.H., Shi, K., Chen, Z. and Yu, J.Q. (2014). H₂O₂ mediates the crosstalk of brassinosteroid and abscisic acid in tomato responses to heat and oxidative stresses. *J. Exp. Bot.* 65, 4371–4383.
 - Zhu, JK. (2009). Active DNA methylation mediated by DNA glycosylases. *Annu Rev Genet* 43:143–166.