

Tesis Doctoral

Regulación epigenética de la familia de genes Asr en tomate (*Solanum lycopersicum*)

González, Rodrigo Matías

2012

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

González, Rodrigo Matías. (2012). Regulación epigenética de la familia de genes Asr en tomate (*Solanum lycopersicum*). Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

González, Rodrigo Matías. "Regulación epigenética de la familia de genes Asr en tomate (*Solanum lycopersicum*)". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2012.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Departamento de Fisiología y Biología Molecular y Celular

***Regulación epigenética de la familia de genes Asr en tomate
(Solanum lycopersicum)***

**Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos
Aires en el área Ciencias Biológicas**

Lic. Rodrigo Matías González

Director de tesis: Dr. Norberto Daniel Iusem

Consejero de Estudios: Dr. Norberto Daniel Iusem

Lugar de trabajo: Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular (LFBM) - Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE - CONICET)

Buenos Aires, 2012

Regulación epigenética de la familia de genes *Asr* en tomate (*Solanum lycopersicum*)

En el presente trabajo, se estudió la epigenética asociada al estrés por falta de agua en dos genes de tomate (*Asr1* y *Asr2*), que pertenecen a una familia génica involucrada en la tolerancia a distintos estreses abióticos.

Se analizó la región codificante del gen *Asr1* en hojas y se detectó la presencia de metilación en todos los contextos: CG, CNG y CNN. Al someter las plantas a estrés hídrico, se observó un ligero aumento de la metilación en contexto CG y una marcada disminución en la metilación asimétrica (CNN). También se detectó, en histonas, una marca represiva de la expresión: H3K27me3, la cual disminuyó como consecuencia del estrés impuesto. Concomitantemente, se registró un marcado aumento en el nivel de transcripto de *Asr1*.

También se analizaron las regiones regulatoria y codificante de *Asr2* en raíces. En este sistema, se hallaron elevados niveles de metilación en citosinas en todos los contextos sobre la región regulatoria, registrándose una ligera disminución en la metilación asimétrica como consecuencia del estrés impuesto. En cambio, sobre la región codificante sólo se halló metilación CG, la cual no varió como consecuencia del estrés. Sólo se detectó la marca represiva H3K27me3 sobre una región ubicada 800 pb río arriba del gen, permaneciendo la misma invariable al aplicar el estrés. Estos hallazgos fueron concomitantes con una disminución generalizada de la transcripción, manteniéndose casi constantes los niveles de transcripto de *Asr2*.

Palabras Clave:

Tomate - Epigenética – Metilación asimétrica (CNN) – Técnica de Bisulfito – Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).

Epigenetic regulation of the *Asr* gene family in tomato (*Solanum lycopersicum*)

In this work, we studied the epigenetics associated with water stress in two tomato genes (*Asr1* and *Asr2*), belonging to a gene family involved in tolerance to various types of abiotic stress.

The *Asr1* gene coding region in leaves was analyzed. The presence of methylation in all contexts (CG, CNG and CNN) was detected. When subjecting plants to water stress, a slight increase in methylation in CG context and a marked decrease in asymmetric methylation (CNN) were observed. An expression-repressive histone mark was also detected: H3K27me₃, which decreased as a result of the stress imposed. Concomitantly, a marked increase in the level of *Asr1* transcript was registered.

The regulatory and coding regions of *Asr2* in roots were analyzed as well. In this system, high levels of cytosine methylation in all contexts were found on the regulatory region and a slight decrease in asymmetric methylation due to the stress imposed was recorded. By contrast, on the coding region, only stress-independent CG methylation was found. Only the repressive H3K27me₃ mark on a region located 800 bp upstream of the gene was registered, remaining unchanged when the same stress was applied. These findings were concomitant with a general decrease in transcription, remaining the *Asr2* transcript levels almost constant.

Keywords:

Tomato - Epigenetics - Asymmetric methylation (CNN) - – *Asr* genes - Bisulfite technique - Chromatin immunoprecipitation (ChIP).

AGRADECIMIENTOS

A Dios.

A Patricia, mi amor, que me bancó todos estos años y siempre me alentó a seguir adelante aún en los momentos más difíciles. Lo más hermoso que me pasó en esta facultad fue conocerte... Te amo!!!

A mi mamá, a mi abuela y a Pedro, por su apoyo incondicional y el afecto que me dieron y me siguen dando. Gracias por toda la ayuda recibida!!! Los quiero mucho!!!

A mi papá y a mi abuelo, que me alumbran desde el cielo...

A Norberto, por esta gran oportunidad que me dio, y por ese "empujoncito" que me faltaba para decidirme a hacer el doctorado. Gracias por confiar siempre en mí!!!

A Martiniano, por enseñarme a dar mis primeros pasos en un laboratorio. Gracias por ser mi maestro!!! Sin vos, todo hubiera sido más difícil. No tengo palabras para agradecerte.

A José, Melina, Juan y Javier, por todos los momentos compartidos en el labo, en las buenas y en las malas.

A toda la gente del LFBM, por todos los "préstamos" sin devolución, y por hacer de éste un muy buen lugar de trabajo.

Al CONICET, por el sustento de estos 5 años de investigación.

A todos los Argentinos, cuyos aportes contribuyendo a la Educación Pública han posibilitado toda mi formación hasta llegar a esta instancia. Siempre estaré en deuda...Gracias por seguir confiando en la Educación Pública, a la cual siempre defenderé.

Parte de los resultados presentados en esta tesis fueron publicados en el siguiente artículo:

González, R.M., Ricardi M.M. e Iusem N.D. (2011). *Atypical epigenetic mark in an atypical location: cytosine methylation at asymmetric (CNN) sites within the body of a non-repetitive tomato gene*. BMC Plant Biology 11:94.-

INDICE

INDICE	1
ABREVIATURAS	5
RESUMEN	8
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	13
EL ESTRÉS HÍDRICO	13
LA PLANTA DE TOMATE (<i>Solanum lycopersicum</i>)	14
LA FAMILIA DE GENES <i>Asr</i>	16
EPIGENÉTICA EN PLANTAS	19
LA METODOLOGÍA DEL BISULFITO SOBRE ADN GENÓMICO TOTAL	22
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
CULTIVO DE PLANTAS DE TOMATE	26
INDUCCIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO	26
EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO	27
ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE METILACIÓN SOBRE EL GENOMA DE HOJAS	28
DETECCIÓN DE MARCAS DE METILACIÓN EN CITOSINAS DEL ADN POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE BISULFITO SOBRE ADN GENÓMICO TOTAL	29

<u>REACCIÓN DEL ADN GENÓMICO CON BISULFITO DE SODIO</u>	<u>29</u>
<u>AMPLIFICACIÓN DE LAS ZONAS DE INTERÉS POR MEDIO DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)</u>	<u>31</u>
<u>Asr1 EN HOJAS</u>	<u>31</u>
<u>Asr2 EN RAÍCES</u>	<u>32</u>
<u>SUBCLONADO Y SECUENCIACIÓN</u>	<u>33</u>
<u>ANÁLISIS DE LOS RESULTADOS</u>	<u>34</u>
<u>CONTROLES DE CONVERSIÓN POR BISULFITO</u>	<u>35</u>
<u>DETECCIÓN DE MARCAS DE METILACIÓN EN CITOSINAS DEL ADN MEDIANTE EL USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN ISOESQUIZÓMERAS CON DIFERENTE SENSIBILIDAD A LA METILACIÓN</u>	<u>36</u>
<u>RESTRICCIÓN DEL ADN GENÓMICO CON MspI o HpaII</u>	<u>36</u>
<u>ESTIMACION DEL NIVEL DE CORTE DE LAS ENZIMAS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (REAL-TIME PCR)</u>	<u>37</u>
<u>DETECCIÓN DE MARCAS DE METILACIÓN EN LISINAS DE HISTONAS MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)</u>	<u>38</u>
<u>INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA EN TOMATE</u>	<u>38</u>
<u>ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE ENRIQUECIMIENTO DE LOS GENES Asr1 Y Asr2 MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (REAL-TIME PCR)</u>	<u>41</u>
<u>ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES Asr1 Y Asr2</u>	<u>43</u>
<u>EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL</u>	<u>43</u>

<u>RETROTRANSCRIPCIÓN</u>	<u>43</u>
<u>ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (REAL-TIME PCR)</u>	<u>43</u>
<u>DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR EN RAÍCES FRENTE A CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO MEDIANTE TINCIÓN CON EVANS BLUE</u>	<u>45</u>
<u>RESULTADOS</u>	<u>46</u>
<u>ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE METILACIÓN A NIVEL GENÓMICO</u>	<u>46</u>
<u>MARCAS DE METILACIÓN EN CITOSINAS DEL ADN DE LOS GENES Asr1 Y Asr2</u>	<u>47</u>
<u>Asr1 EN HOJAS</u>	<u>47</u>
<u>Asr2 EN RAÍCES</u>	<u>52</u>
<u>METILACIÓN EN LISINAS DE HISTONAS</u>	<u>57</u>
<u>Asr1 EN HOJAS</u>	<u>57</u>
<u>Asr2 EN RAÍCES</u>	<u>58</u>
<u>NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES Asr</u>	<u>62</u>
<u>NIVEL DE EXPRESIÓN DE Asr1 EN HOJAS</u>	<u>62</u>
<u>NIVEL DE EXPRESIÓN DE Asr2 EN RAÍCES</u>	<u>63</u>
<u>VIABILIDAD CELULAR EN RAÍCES</u>	<u>64</u>
<u>DISCUSIÓN</u>	<u>66</u>
<u>CONCLUSIONES</u>	<u>75</u>
<u>SOBRE EXPERIMENTOS REALIZADOS EN HOJAS</u>	<u>75</u>

<u>SOBRE EXPERIMENTOS REALIZADOS EN RAÍCES</u>	<u>76</u>
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	<u>78</u>
<u>APÉNDICE</u>	<u>86</u>

ABREVIATURAS

°C: Grados Centígrados

3' UTR: Región Río Abajo no traducible

3': Río Abajo

5' UTR: Región Río Arriba no traducible

5': Río Arriba

ABA: Ácido abscísico

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

ARN: Ácido Ribonucleico

Asr: Absicic Acid, Stress and Ripening (Ácido Abscísico, Estrés y Maduración)

BSA: Seroalbúmina Bovina

cm: centímetros

cm²: centímetros cuadrados

CMT3: Cromometilasa 3

CTAB: Bromuro de Cetil Trimetil Amonio

DNMT1: DNA metiltransferasa 1

dNMP's: Desoxirribonucleótidos monofosfato

dNTP's: Desoxirribonucleótidos trifosfato

dpa: Días post-antesis

DRM2: Domains Rearranged Methyltransferase 2 (Metiltransferasa con dominios rearrreglados 2)

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraacético

g: veces la fuerza gravitatoria

H3K27me3: Histona 3, lisina 27 trimetilada

H3K4me3: Histona 3, lisina 4 trimetilada

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

Kpb: kilopares de bases

LB: Luria Bertani

LiCl: Cloruro de Litio

M: molar

MET1: Metiltransferasa 1

mg: miligramos

MgCl₂: Cloruro de Magnesio

ml: mililitros

mm: milímetros

mM: milimolar

Mpb: megapares de bases

mQ: milliQ

mRNA: Ácido Ribonucléico mensajero

NaCl: Cloruro de Sodio

ng: nanogramos

pb: Pares de bases

PCR: Reacción en Cadena de la Polimerasa

pmoles: picomoles

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PVP: Polivinil Pirrolidona

Rpm: Revoluciones por minuto

SDS: Dodecil Sulfato de Sodio

SOB: Super Optimal Broth (Caldo super óptimo)

TE: Tris-EDTA

tRNA: Ácido Ribonucleico de Transferencia

U: Unidades enzimáticas

V: Volts

X-Gal: 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactopiranosido

μ g: microgramos

μ l: microlitros

μ m: micrómetros

μ M: micromolar

RESUMEN

En este trabajo estudiamos la epigenética asociada con el estrés por falta de agua en dos genes (*Asr1* y *Asr2*) de tomate (*Solanum lycopersicum*) que pertenecen a una familia génica involucrada en la tolerancia a varios tipos de estreses abióticos como la sequía, las bajas temperaturas y la alta salinidad. Esta familia génica es exclusiva del reino Plantae y está ampliamente distribuida entre las gimnospermas, las monocotiledóneas y las dicotiledóneas, sin embargo, está ausente en la planta modelo *Arabidopsis*.

El estudio implicó la detección de marcas de metilación en I) citosinas del ADN mediante el uso de la técnica de bisulfito sobre ADN genómico total, y II) lisinas de histonas empleando el procedimiento de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP). También estimamos los niveles de expresión de ARN mensajero mediante transcripción reversa seguida de PCR en tiempo real. Todos estos ensayos se hicieron tanto en condiciones basales como a diferentes tiempos de privación de agua.

Para el estudio de *Asr1*, se eligieron hojas, dado que estudios previos indicaban que este órgano mostraba inducción de este gen como resultado del estrés hídrico. Por lo tanto, analizamos la región codificante de este gen y encontramos niveles significativos de metilación en citosinas en todos los contextos descritos: CG, CNG y el menos explorado, CNN, usualmente concentrados en genes de transposones y en elementos repetitivos no codificantes. Observamos un incremento en el nivel de metilación de tipo CG y una reducción significativa en la metilación asimétrica (CNN) como consecuencia del tratamiento de estrés. El análisis de las marcas de histonas reveló la presencia de la marca represiva H3K27me3, la cual disminuyó significativamente como consecuencia del estrés. Estos hallazgos fueron concomitantes con un marcado aumento en la expresión del gen a nivel de ARN mensajero.

Paralelamente, se investigó el gen *Asr2* en raíces de tomate, previamente reportado como el órgano en el cual este gen se enciende como consecuencia del estrés hídrico. En este caso fuimos capaces de analizar tanto la región regulatoria como el cuerpo del gen. La metilación en citosinas fue evidente en los tres contextos a lo largo de la región regulatoria, donde ocurrió una ligera disminución de la metilación asimétrica (CNN) cuando se aplicó el estrés hídrico. Por el contrario, sobre el cuerpo del gen, sólo se detectó metilación en el contexto CG, la cual permaneció sin cambios después de estresar las raíces por períodos cortos de tiempo. No se halló asociación entre los patrones de metilación en citosinas y en histonas (H3K4me3 y H3K27me3) sobre la región codificante del gen. No obstante, si se detectó la presencia de la marca represiva H3K27me3 sobre una región ubicada a 800 pb río arriba del gen, la cual no varió como consecuencia del estrés. Sorprendentemente, se detectó un marcado descenso en la transcripción de genes de expresión constitutiva luego de la privación de agua, pero no en *Asr2*, el cual se mantuvo aproximadamente constante.

No se hallaron marcas de metilación en lisinas de histonas sobre el cuerpo de gen de *actina*, un gen de expresión constitutiva; pero sí se hallaron sobre un elemento transponible (ToRTL 1), que a priori se esperaba que se encuentre silenciado. En este último caso, se hallaron concomitantemente ambas marcas de activación y represión, las cuales disminuyeron como consecuencia del estrés.

En resumen, encontramos una nueva locación para la atípica metilación asimétrica CNN: el cuerpo de un gen activo, *Asr1*, el cual no es un elemento repetitivo ni un transposón. Este tipo de marca covalente mostró variación debida a un estímulo ambiental (falta de agua) y fue concomitante con un incremento en los niveles de ARN mensajero, sugiriendo la presencia de un nuevo mecanismo para la regulación de la expresión génica. Finalmente, la regulación de la expresión de *Asr2* en raíces también parece estar asociada a modificaciones epigenéticas como la metilación en contexto CNN, aunque en menor medida que *Asr1* y asociada a la región promotora en lugar del cuerpo del gen. La marca en histonas, represiva de expresión génica (H3K27me3) parece estar vinculada a la

expresión de *Asr1* solamente, ya que en el caso de *Asr2*, sólo se la detectó sobre la región promotora y no varió al someter a la planta a estrés hídrico.

ABSTRACT

In this work we studied epigenetics associated with water deficit stress in two tomato (*Solanum lycopersicum*) genes (*Asr1* and *Asr2*) belonging to a family involved in tolerance to various types of abiotic stresses such as drought, low temperatures and high salinity. This gene family is unique to the kingdom Plantae and is widely distributed among gymnosperms, monocots and dicots, although absent in the model plant *Arabidopsis*.

The study involved detection of methylation marks in I) DNA cytosines through the use of the bisulfite technique on total genomic DNA and II) histone lysines by employing the procedure of chromatin immunoprecipitation (ChIP). We also estimated the expression levels of mRNA by reverse transcription followed by real-time PCR. All these assays were done both in basal conditions and at different times of water withholding.

For the study of *Asr1*, leaves were chosen, because previous studies indicated that this organ exhibits induction of this gene as a result of water stress. Therefore, we analyzed the coding region of this gene and found significant levels of methylation at cytosines in all contexts described: CG, CNG and the less explored CNN, preferentially concentrated in transposon genes and non-coding repetitive elements. We observed an increase in the level of CG methylation type and a significant reduction in asymmetric methylation (CNN) as a consequence of the stress treatment. The analysis of histone marks showed the presence of the repressive H3K27me3 mark, which decreased significantly as a result of stress. These findings were concomitant with a marked rise in gene expression at the mRNA level.

In parallel, a scrutiny on *Asr2* was performed on tomato roots, previously reported to be the site of its turning on by water stress. In this case, we were able to analyze both the regulatory region and the gene body. Cytosine methylation was evident in the three contexts throughout the regulatory region, where a slight

decrease of asymmetrical methylation (CNN) occurred when the water stress was applied. In contrast, on the gene body, only methylation in the CG context was detected, which remained unchanged after stressing the roots for short periods of time. No association was found between cytosine methylation and histone (H3K4me3 and H3K27me3) patterns on the coding region of the gene. However, we detected presence of repressive H3K27me3 mark on a region located 800 bp upstream of the gene, which did not vary as a result of stress. Surprisingly, there was a marked decrease in the transcription of housekeeping genes after water withdrawal, but not in *Asr2*, which remained approximately constant.

No histone lysine methylation marks were found on the body of the actin gene, a constitutive expression gene, but they were found on transposable element (ToRTL 1) which a priori we expected to be muted. In the latter case, the two marks were found concomitantly, the activation and repression marks, which decreased as the result of stress.

In summary, we found a new location for the atypical asymmetric CNN methylation: the body of an active gene, *Asr1*, which is neither a repetitive element nor a transposon. This type of covalent mark showed variation due to an environmental stimulus (water deprivation) and was concomitant with increased mRNA levels, suggesting the occurrence of a new epigenetic mechanism for regulation of gene expression. Finally, regulation of *Asr2* expression in roots also appears to be associated with epigenetic modifications such as methylation in the CNN context, although to a lesser extent than *Asr1* and associated with the promoter region instead of the body of the gene. The gene expression repressive mark on histone (H3K27me3) appears to be linked to *Asr1* expression only, as in the case of *Asr2*, it was detected only on the promoter region and did not change by subjecting the plant to water stress.

INTRODUCCIÓN

EL ESTRÉS HÍDRICO

Debido a que el agua (tanto de lluvia como por irrigación artificial) es un factor determinante en el rendimiento de los cultivos [1], la optimización de los recursos hídricos en general es medular dentro de uno de los más grandes desafíos de este siglo: la alimentación sustentable de 9 mil millones de personas en un mundo de clima cambiante donde la lluvia y la temperatura son cada vez más erráticas (figura 1).

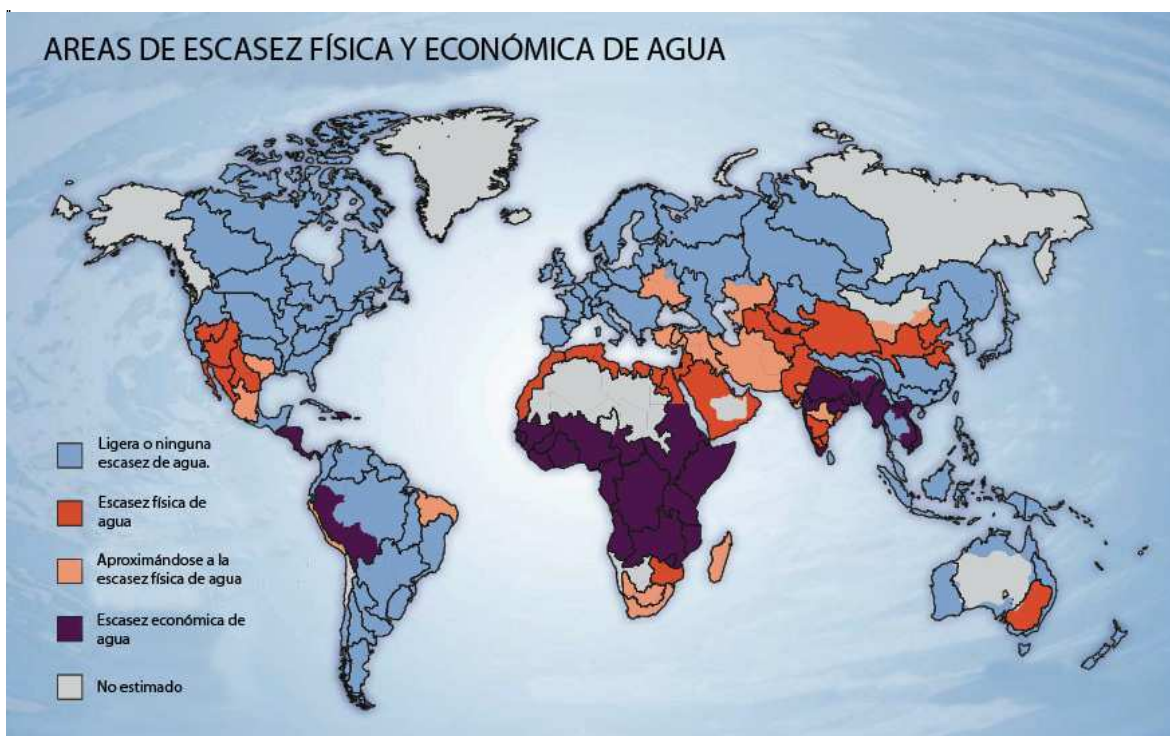


Figura 1. Niveles de escasez de agua a nivel mundial. Según el Instituto Internacional de manejo del Agua. Adaptado de Marris, 2003.

La urgencia en resolver estas cuestiones a nivel mundial obliga a generar debates periódicos en foros internacionales. Un ejemplo es la *Fourth World Conference on The Future of Science*, organizada en Venecia, Italia en

septiembre de 2008. El tema del congreso en dicha oportunidad fue “Alimento y Agua para la vida” [2]. Los participantes fueron científicos de muchas disciplinas, así como también políticos y economistas. Como las ciencias de los vegetales están relacionadas con la alimentación y la agricultura, los científicos que trabajan con plantas hablaron sobre cómo su propia investigación puede ayudar a asegurar alimento adecuado y mejorar la nutrición en el mundo del siglo XXI.

En este contexto general y con la motivación de solucionar el problema a largo plazo, la adaptabilidad de cultivos de importancia alimentaria en zonas áridas (estimada midiendo la “eficiencia de uso de agua”, *water-use efficiency* en inglés) ha interesado a muchos científicos, tanto a nivel básico como aplicado. En este marco, las respuestas celulares al estrés provocado por pérdida de agua han sido estudiadas mediante diferentes estrategias experimentales, no solamente en plantas sino a varios niveles de organización biológica, dada la conservación evolutiva de las moléculas involucradas [3].

LA PLANTA DE TOMATE (*Solanum lycopersicum*)

El tomate (*Solanum lycopersicum*) pertenece a la familia de las solanáceas. Las especies silvestres son originarias del oeste de Sudamérica, extendiéndose a lo largo de la cordillera de los Andes desde Ecuador hasta el norte de Chile. Crecen en una gran diversidad de entornos ambientales: desde el nivel del mar hasta los 3300 metros de altura y tanto en zonas áridas de la costa del océano Pacífico y de las altiplanicies andinas, como en los valles de los ríos que drenan hacia el Pacífico. Los diversos entornos en los que se desarrollan, así como el aislamiento geográfico de las diferentes poblaciones han contribuido notablemente a la gran diversidad que presentan las especies de tomate silvestres [4]. Su domesticación comenzó en América, por parte de las culturas precolombinas y se cree que los primeros cultivos se desarrollaron en Perú o en México. No obstante, el cultivo de la planta tal como la conocemos hoy se desarrolló a partir del siglo XVI con su introducción en Europa hasta llegar a la actualidad en donde existen

gran cantidad de cultivares morfológicamente diferentes, los cuales fueron obtenidos en su mayoría por cruzamientos de plantas de *S. lycopersicum* [5].

Es una planta herbácea, perenne, que en la naturaleza se comporta como anual debido al congelamiento o a la sequía, que pueden matar a la planta. El tallo inicialmente es erecto, pero con el crecimiento se cae y resulta en una planta postrada con capacidad de enraizar en los nudos de los tallos. Sus hojas son imparipinnadas con 2 a 6 pares de hojuelas sésiles o pecioladas opuestas o subopuestas. Las flores son amarillas, gamosépalas en la base y gamopétalas. Existen especies autocompatibles y autoincompatibles. Los frutos son muy variables en cuanto a su color, su tamaño y su pubescencia. Su clasificación taxonómica ha sido muy controvertida: Linneo en su obra *Species Plantarum* (1753), clasificó al tomate dentro del género *Solanum*. Sin embargo, posteriormente fue incluido en un nuevo género, *Lycopersicum*, basándose en su fruto multilocular. Actualmente, con los estudios realizados a nivel molecular, se ha vuelto a incluir bajo el género *Solanum* [4].

A nivel molecular, presenta un genoma compuesto por 950 Mpb, distribuidos en 12 cromosomas. Su nivel de ploidía es mayormente diploide ($2n=2x=24$), aunque en algunos casos puede ser tetraploide ($2n=4x=48$). La abundancia de recursos genéticos como bancos de germoplasma, disponibilidad de diversos mutantes y la secuenciación de su genoma, lo hacen un modelo ideal para el estudio de plantas con frutos carnosos (<http://solgenomics.net/organism/1/view/>).

A diferencia de *Arabidopsis*, la planta modelo por excelencia, el genoma del tomate es unas 10 veces más grande y contiene gran cantidad de elementos repetitivos. La reciente finalización del proyecto de secuenciación del genoma del tomate [6], permite explorar las regiones regulatorias de los diferentes genes con facilidad.

La planta de tomate es un importante cultivo a nivel global y por ende de gran importancia económica. Es la hortaliza más difundida alrededor del mundo y

la de mayor valor económico. Su demanda aumenta constantemente y con ella su cultivo, producción y comercio. El consumo promedio mundial de tomate oscila alrededor de 12 kg per cápita por año. Es el cuarto cultivo vegetal a nivel mundial, siendo China su principal productor [7]. La producción mundial actual es de unos 100 millones de toneladas de fruta fresca que se cultivan en 3,7 millones de hectáreas. (FAOSTAT, 2001). (http://www.fao.org/nr/water/cropinfo_tomato.html). En la Argentina se producen alrededor de 700000 toneladas de tomate al año (según la FAO), lo que lo convierte en la hortaliza con mayor nivel de producción. Cabe destacar que los principales países productores de tomate, no poseen el clima ideal, ni destinan grandes extensiones de tierra para este cultivo. La mayor parte de su producción proviene de cultivos bajo condiciones controladas en invernadero.

El tomate es una gran fuente de nutrientes. El tomate fresco posee una gran cantidad de agua y su contenido calórico es bajo. Son una fuente importante de vitaminas A y C, y de minerales, siendo de gran importancia en la dieta humana [7].

LA FAMILIA DE GENES *Asr*

La familia de proteínas ASR (llamada así por *abscisic acid*, *stress* y *ripening*) es exclusiva del reino vegetal y está ampliamente distribuida. Se han encontrado miembros de esta familia génica en un gran abanico de especies vegetales, algunas de ellas de gran importancia económica tales como uva [8], papa [9], banana [10], arroz [11], frutilla [12] y maíz [13] entre otras. En tomate (*Solanum lycopersicum*), esta familia de genes está compuesta por cuatro miembros: *Asr1*, *Asr2*, *Asr3* y *Asr4*, los cuales están muy conservados y se expresan diferencialmente bajo estrés hídrico [14], [15]. Se los puede encontrar en pino (gimnosperma ancestral) y en maíz (monocotiledónea). No obstante, estos genes no se encuentran presentes en *Arabidopsis*, planta modelo en la biología molecular de plantas [14]. Estos genes han sido estudiados extensivamente a

nivel de ADN [14], ARN [15] y proteína [16], [17]; y en términos de función fisiológica [18] y evolución [14].

La historia evolutiva de esta familia génica se remonta a las gimnospermas [14], las primeras plantas con semilla, que aparecieron durante el período Carbonífero tardío, por lo menos hace 300 millones de años. En este escenario, propiedades de resistencia a la sequía propias de las coníferas (como el pino) deben haber sido críticas durante su evolución en el período Pérmico, cuando la Tierra continental se volvió fría y seca.

La primera secuencia nucleotídica reportada de un gen *Asr* es la del gen *Asr1* de tomate [19]. Fue descubierta mediante hibridación diferencial sobre una biblioteca genómica de tomate, utilizando como sonda cDNA proveniente de hojas de plantas estresadas por falta de agua o de frutos maduros. La proteína codificada por esta secuencia posee una masa de 13 kDa con un punto isoeléctrico de 7,9. Dicha proteína se detectó tanto en hojas estresadas como en pericarpo de frutos maduros. Se determinó que subcelularmente se ubica en el núcleo. Experimentos posteriores mostraron que la expresión de *Asr1* también aumenta como consecuencia del estrés osmótico, tanto a nivel de mRNA como de proteína; así como también mediante el tratamiento con ABA [20]. La secuencia de *Asr1* fue utilizada para realizar un nuevo *screening* sobre una biblioteca genómica, detectándose otra secuencia, denominada *Asr2* [21]. Esta secuencia presenta una homología del 73% con *Asr1* a nivel nucleotídico y del 85% a nivel proteico. Se analizó su promotor [22], el cual presenta probables motivos de respuesta a ABA y un elemento en la región 3' UTR similar al del gen de poligalacturonasa, que también se expresa durante la maduración del fruto. Se demostró que dicho promotor es funcional y que es estimulado por ABA, al menos en papaya y tabaco [23]. Un tercer miembro de la familia se halló luego [24] y se determinó que los tres loci mapean juntos y se encuentran estrechamente ligados en el cromosoma 4.

Se establecieron los patrones de expresión de los genes *Asr1* y *Asr2*: Mientras que ambos genes se expresan ante disección en hojas, *Asr2* es el único que se expresa en raíces bajo condiciones de estrés [15]. A nivel tisular, *Asr1* se expresa en todo el tejido vascular de la hoja tanto en condiciones normales como de estrés hídrico, mientras que *Asr2* se expresa específicamente en células acompañantes del floema y se expande hacia células del mesófilo en condiciones de estrés [25]. También se ha demostrado que la proteína ASR1 se acumula en semillas durante la embriogénesis, órgano sometido a disección fisiológica [17].

A nivel proteico, se encontró que ASR1 también se halla en el citoplasma [26] y que es intrínsecamente desestructurada, monomérica, y que en presencia de zinc forma homodímeros. [27]. En el núcleo es capaz de unirse a ADN de forma zinc dependiente [26]. También es capaz de formar homodímeros y de unirse a ADN tanto en forma monomérica como dimérica [17]. Recientemente se demostró que ASR1 se encuentra tanto en forma monomérica como dimérica tanto en citosol como en núcleo. La proteína puede ser traslocada al núcleo en forma pasiva, por simple difusión a través de los poros nucleares, tanto en su forma monomérica como dimérica [28].

Respecto de su función, se ha demostrado que es capaz de actuar como chaperona, estabilizando proteínas para evitar su desnaturalización frente al calor y al congelamiento [16]. También se ha probado que confiere tolerancia al estrés osmótico cuando se expresa de manera heteróloga en levaduras [18] y se encontró que en este sistema su ubicación es mayoritariamente citoplasmática [29]. Respecto a su función putativa como factor de transcripción, hasta la fecha se ha demostrado que al sobreexpresar ASR1 de tomate en *Arabidopsis*, ésta compete con una proteína endógena, ABI4, por el sitio de unión al ADN y que reduce la expresión de los genes regulados por esta proteína [30]. En uva (*Vitis vinifera*) se ha encontrado que el gen homólogo de *Asr1* (*VvMSA*) se une a regiones promotoras de genes que codifican para transportadores de azúcares [8].

También se han estudiado los aspectos evolutivos de esta familia de genes, determinándose que todos los miembros de la familia presentes en tomate se ubican en el mismo *cluster* en el árbol filogenético. Se ha determinado que *Asr1* es un gen muy conservado [14] y que *Asr2* presenta evidencias de selección positiva en especies adaptadas a ambientes áridos, tales como *Solanum chilense*, que crece en el desierto de Atacama, Chile [31], [32]. Estos estudios han llevado al descubrimiento del cuarto miembro de la familia, *Asr4* [14], y de un quinto miembro (*Asr5*) presente en especies adaptadas a ambientes áridos como *Solanum chilense* y *Solanum peruvianum* [33].

Las proteínas ASR han sido recientemente clasificadas como un nuevo tipo de proteínas de la familia LEA (*Late Embryogenesis Abundant*), dado que comparten algunas propiedades tales como una elevada expresión durante el desarrollo temprano del embrión, pequeño peso molecular, el grado de hidrofobicidad y patrones órgano - específicos de expresión [3], [34].

EPIGENÉTICA EN PLANTAS

Las modificaciones epigenéticas son modificaciones covalentes en el ADN o en la cromatina asociada, que no implican alteraciones en la secuencia del ADN, pero que tienen gran influencia sobre la expresión génica. Ocurren como consecuencia de complejas maquinarias enzimáticas, son mitóticamente y meióticamente estables y pueden ser adquiridas o perdidas como consecuencia de factores ambientales externos [35]. Esto otorga mayor plasticidad a los organismos, que pueden adaptarse con mayor rapidez a su entorno.

Durante la última década, la investigación en epigenética se ha enfocado principalmente en los mamíferos, mientras que las plantas han recibido menos atención. La información disponible sobre epigenética en plantas se centra en la planta modelo *Arabidopsis* [36], [37], en arroz [38] y maíz [39].

En plantas, las modificaciones epigenéticas son de suma importancia, ya que al llevar una vida sésil, no pueden moverse en busca de nutrientes o mejores

condiciones ambientales. Las modificaciones epigenéticas en las plantas, pueden ser transmisibles a la línea germinal y por ende, ser heredadas transgeneracionalmente [40]. Entre las modificaciones epigenéticas que podemos encontrar se hayan las metilaciones en citosinas del ADN, que en plantas se las puede hallar en tres contextos diferentes: el clásico contexto CG y también en contextos CNG y CNN (asimétrica), exclusivos de plantas, que están vinculados generalmente con el silenciamiento de transposones y elementos repetitivos [41].

La regulación epigenética, a nivel de metilación en el nucleótido citosina del ADN en plantas es mucho más compleja que la descrita previamente en animales mamíferos. Estudios realizados en la planta modelo *Arabidopsis* revelaron que la metilación en ADN no sólo ocurre en las regiones promotoras, sino también sobre la propia región transcribible del gen. La regulación de la expresión génica varía según la región en que se halle la metilación: la metilación de tipo CG reprime la expresión génica cuando se halla sobre las regiones regulatorias, pero la estimula cuando se halla sobre el cuerpo del gen. En efecto, se han hallado altos niveles de metilación de tipo CG sobre el cuerpo de genes *housekeeping* [42].

Hasta el momento, se ha logrado establecer parte de la maquinaria enzimática responsable de los diferentes contextos de metilación en plantas: se sabe que MET1, una enzima ortóloga a la DNA metiltransferasa 1 mamaliana es la encargada de mantener la metilación del ADN en el contexto CG [43]. Por otra parte, la cromometilasa 3 (CMT3), una metiltransferasa exclusiva de plantas es la responsable del mantenimiento de la metilación en el contexto CNG [44]. Finalmente, se ha demostrado por medio de análisis de mutantes, que la metilación asimétrica (CNN) se debe a la metilasa DRM2 [45], homóloga a la metiltransferasa de novo mamaliana DNMT3 en conjunto con pequeños ARNs de interferencia [46].

Otros tipos de modificaciones epigenéticas son aquellas que se pueden hallar sobre las histonas. Hasta el momento se han detectado numerosas modificaciones sobre las diferentes histonas: acetilaciones, metilaciones,

fosforilaciones, ubiquitinaciones, sumoilaciones y ADP ribosilaciones entre otras [47]. Estas modificaciones actúan como un lenguaje propio de las histonas que es decodificado por una gran batería de proteínas. Estas marcas son muy dinámicas y se han reportado una gran cantidad de enzimas involucradas en el agregado y remoción de las mismas [48]. Entre las modificaciones más estudiadas se encuentran las acetilaciones en las lisinas 9 y 27 de la histona 3, las cuales se ubican preferentemente hacia el extremo 5' de los genes y correlaciona siempre con activación transcripcional. Las metilaciones de histonas pueden ocurrir tanto en residuos de lisinas como de argininas y puede diferir el número de grupos metilo que se agregan. En la histona 3, tanto la trimetilación en lisina 4 (H3K4me3) como la di- (H3K36me2) o trimetilación en lisina 36 (H3K36me3) correlacionan con un aumento de la actividad transcripcional, aunque éstas no se encuentran en las mismas regiones: mientras que H3K4me3 se halla sobre los promotores y región 5' de los genes, H3K36me2 y me3 se halla sobre la región transcribible de los genes [49]. Otra marca de metilación en histonas con correlato en los niveles de transcripto es la trimetilación en la lisina 27 de la histona 3 (H3K27me3), la cual se halla sobre el cuerpo de los genes a los que regula y correlaciona con muy bajos niveles de expresión. Es de destacar que, al menos en maíz, esta marca se halla principalmente sobre genes de expresión tejido específica y genes implicados en el desarrollo, y que se excluyen mutuamente con la metilación en citosinas del ADN, pese a que ésta es también una marca represiva [39]. Por último, la dimetilación en lisina 9 de la histona 3 se ha reportado como una marca de heterocromatina en *Arabidopsis* [50], sin embargo estudios encarados por nuestro grupo arrojaron que ésto pareciera no ser así al menos en tomate, ya que dicha marca se halló sobre el cuerpo de genes de expresión constitutiva tales como *ubiquitina 3 (Ubi3)* y *factor de elongación 1 (EF-1)* [51].

LA METODOLOGÍA DEL BISULFITO SOBRE ADN GENÓMICO TOTAL

La metodología más empleada en el análisis de la metilación en citosinas del ADN es la técnica de bisulfito, dado que permite identificar el estado de metilación de cada citosina particular a nivel de cada nucleótido. Esta técnica fue desarrollada en 1992 por Frommer [52], y se basa en la reacción diferencial de las citosinas no metiladas y metiladas con el bisulfito, para dar origen a uracilo. Mientras que la reacción de las citosinas no metiladas ocurre con cierta rapidez, las citosinas metiladas son mucho menos reactivas. Esto permite que, bajo condiciones adecuadas se puedan diferenciar aquellas citosinas metiladas de las que no lo están. Los uracilos resultantes de la conversión por bisulfito de las citosinas no metiladas son reemplazadas por timinas durante la posterior amplificación por PCR y se observan como tales luego de la secuenciación; mientras que las citosinas metiladas no sufren ningún cambio [53].

No obstante las ventajas del método, la puesta a punto del mismo es un gran desafío. En primer lugar, la reacción de las citosinas con el bisulfito para dar uracilo, ocurre solamente sobre ADN simple cadena, por esto es necesario la desnaturalización del mismo para que la reacción tenga lugar. Para facilitar el paso de desnaturalización, es necesario obtener fragmentos de ADN cuyo tamaño oscile entre 500 y 2000 pb. Esto puede lograrse o bien mediante sonicado del ADN o mediante el corte con alguna enzima de restricción de corte frecuente. Si se elige la segunda opción hay que verificar que la región de interés no contenga el sitio de corte de la enzima, ya que si así fuera, no se podrá amplificar luego mediante PCR.

La reacción con bisulfito (Figura 2) consta de dos etapas [53]: una etapa de conversión con bisulfito (sulfonación y desaminación) a pH=5, de parámetros variables según la concentración del ADN a tratar; y una segunda etapa de desulfonación en medio alcalino (NaOH 0.3 M, pH=13) a 37 °C.

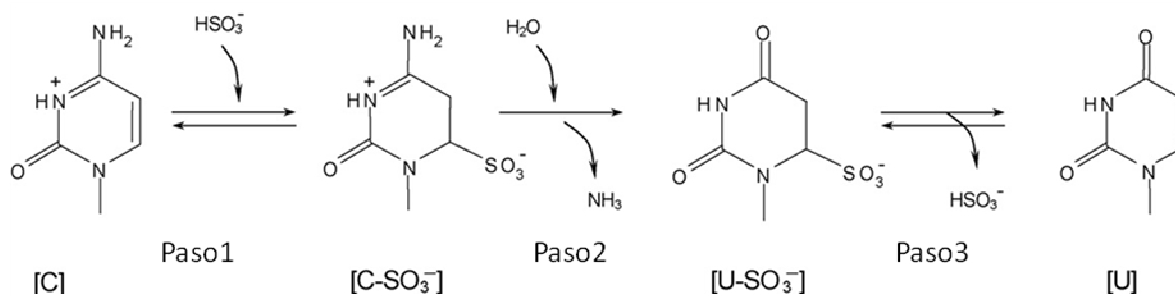


Figura 2. Esquematización de las etapas de la reacción del bisulfito sobre citosinas no metiladas. Paso 1: Etapa de sulfonación, Paso 2: Etapa de desaminación y Paso 3: Etapa de desulfonación. Las primeras se llevan a cabo a pH = 5 y a temperaturas y tiempos variables según la cantidad de ADN a tratar. La desulfonación se realiza a 37°C entre 15 y 20 minutos a pH=13. (Adaptado de Hayatsu et Al.,2008).

Uno de los principales desafíos de la técnica es la puesta a punto de la etapa de conversión. Durante esta etapa hay que considerar que una gran proporción del ADN de partida se degrada a consecuencia del bisulfito [53], [54] (Figura 3) y que si las temperaturas y el tiempo de la reacción no son los adecuados, se corre el riesgo de que queden citosinas no metiladas sin convertir a uracilo y de esta forma, considerar metilada una citosina que no lo está. Para evitar estos inconvenientes es necesario poner a punto las condiciones de temperatura y duración de la reacción, la cual siempre debe ser un compromiso entre el menor nivel de degradación posible y el mayor nivel de conversión de citosinas no metiladas [55].

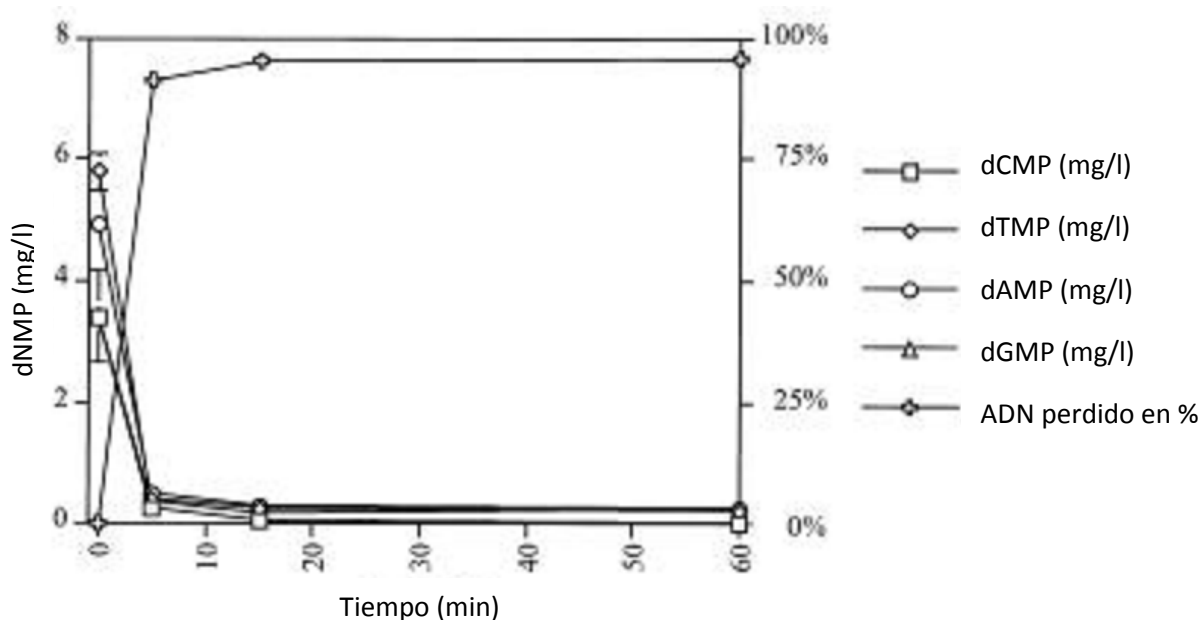


Figura 3. Niveles de degradación del ADN al tratarlo con bisulfito a 55°C. ADN remanente luego de diferentes tiempos de reacción determinando la concentración de dNMP's por cromatografía. (Adaptado de Grunau et Al., 2001).

Una vez finalizada la reacción, y antes de realizar cualquier ulterior análisis, es necesario amplificar el fragmento de interés mediante PCR, dado que la cantidad de ADN convertido remanente es generalmente menos del 5% del ADN de partida y es insuficiente para cualquier reacción de secuenciación.

En este punto surge un nuevo desafío: el diseño de los *primers*. En primer término, el producto convertido por bisulfito presenta un alto contenido de A+T y bajo contenido de C+G (aproximadamente 75 % A+T y 25 % C+G), resultando en *primers* con alto contenido de A+T que presentan temperaturas de *melting* muy bajas (en muchos casos menores a 50°C). A consecuencia de esto, las reacciones llevadas a cabo con estos *primers* pueden no amplificar ningún producto (por falta de apareamiento de los *primers* al templado), o bien, amplificación de un gran número de productos inespecíficos, como resultado de utilizar bajas temperaturas de *annealing* para tratar de que la reacción amplifique el producto deseado. En segundo lugar, el hecho de que el ADN tratado con bisulfito esté compuesto mayoritariamente por tres bases (A, T y G), produce que haya una mayor

repetitividad de secuencias, haciendo que los *primers* anillen en varios sitios simultáneamente dando como resultado productos espurios.

Por otro lado, se debe procurar evitar que los *primers* diseñados sean capaces de amplificar templados que puedan haber quedado sin convertir, ya que esto resultaría en una gran sobreestimación de la metilación.

Para zanjar estos inconvenientes, se tuvieron en cuenta algunos parámetros adicionales a los habituales para el diseño de *primers*, los cuales se indican en [56]. Se buscó que los *primers* tuvieran en su secuencia, timinas derivadas de la conversión de citosinas, en particular en su extremo 3', a fin de garantizar la amplificación exclusiva de las moléculas de ADN convertidas por la reacción de bisulfito. Asimismo, se buscó que los *oligos* tuvieran el mayor porcentaje de C+G posible, para favorecer su *annealing* al templado.

OBJETIVOS

Los objetivos planteados en este trabajo fueron:

- a) Estudiar las modificaciones epigenéticas presentes sobre los genes *Asr1* y *Asr2*. Las marcas de metilación en citosinas del ADN se estudiaron mediante el empleo de la técnica de bisulfito sobre ADN genómico total, mientras que las marcas sobre histonas se estudiaron mediante la técnica de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP).
- b) Determinar si estas marcas varían como consecuencia de factores ambientales externos, en este caso por estrés hídrico.
- c) Determinar si existe una correlación entre las variaciones de las marcas epigenéticas y los niveles de expresión de estos genes frente a estrés hídrico.

MATERIALES Y MÉTODOS

CULTIVO DE PLANTAS DE TOMATE

Las semillas comerciales de tomate fueron sometidas a un tratamiento de blanqueo, para lo cual se las dejó en una solución de lavandina (20 g/l de hipoclorito de sodio) por 30 minutos, luego de lo cual se las enjuagó con agua destilada. La germinación de las semillas se realizó sobre papel secante humedecido, manteniéndolas por 72 a 96 horas en oscuridad total. Transcurrido ese tiempo, se las colocó en una cámara de cultivo a 23°C, con un fotoperíodo de 12 horas luz – 12 horas oscuridad, por 4 o 5 días más, luego de lo cual se procedió a su transplante. Las plantas se cultivaron sobre un sustrato sólido, compuesto por 4 partes de tierra, 2 partes de turba, 1 parte de perlita y 1 parte de vermiculita, manteniéndolas en la misma cámara y bajo las mismas condiciones descriptas anteriormente.

INDUCCIÓN DE ESTRÉS HÍDRICO

Se utilizaron plantas de entre 3 y 4 semanas, las cuales fueron removidas de su sustrato cuidadosamente y sus raíces se limpiaron hasta que no quedaron restos de tierra. A la mitad de las plantas se les cortaron las hojas y/o raíces y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. La otra mitad fue sometida a estrés hídrico por diferentes tiempos que oscilaron entre los 10 minutos y las 6 horas, para lo cual se colocaron sus raíces sobre un papel absorbente. En algunos casos, las raíces se colocaron además, bajo una lámpara incandescente. Luego de transcurrido el tiempo requerido, se procedió a cortar las hojas y/o raíces y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido. Se verificó en todos los casos que los fenotipos de marchitez observados fueran reversibles, volviendo a colocar las plantas estresadas en un recipiente con agua corriente.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO

El ADN genómico de hojas se extrajo siguiendo el protocolo de Peralta [57] con algunas modificaciones. Para esto, se tomaron las hojas y se molieron en mortero con nitrógeno líquido. Una vez molido el tejido, el polvo resultante se resuspendió en 30 ml de Buffer de Extracción (ver composición en apéndice) conteniendo CTAB como detergente, el cual es más eficaz dado el alto contenido de azúcares y polifenoles presentes en la planta de tomate. El extracto resultante se calentó a 65°C por 20 minutos, tras lo cual se añadieron 10 ml de cloroformo y se agitó en un agitador tipo vaivén a temperatura ambiente. Luego se centrifugó por 20 minutos a 5000 rpm a 4°C. El sobrenadante obtenido se pasó a un tubo tipo Falcon y se agregó 0.7 volúmenes de isopropanol. Se incubó a -20°C por 30 minutos, tras lo cual se centrifugó por 30 minutos a 5000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el *pellet* se resuspendió en 1 ml de buffer TE. Se trasvasó el contenido a un Eppendorf de 1.5 ml y se agregaron 10 µl de RNAsa A. Se dejó actuar por 30 minutos a 37°C, tras lo cual se agregó 0.5 ml de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1), se centrifugó a 5000 rpm por 10 minutos y se tomó el sobrenadante. Luego se realizó otra extracción con cloroformo únicamente para extraer todo resto de fenol que pudiera haber quedado. Al sobrenadante se agregó 0.7 volúmenes de isopropanol y se dejó por 30 minutos a -20°C, tras lo cual se centrifugó por 20 minutos a 12000 rpm. Luego se realizó un lavado con etanol 70% y se secó en estufa a 37°C por 10 minutos. Se resuspendió en 50 µl de agua mQ.

La extracción de ADN genómico de raíces resultó más dificultosa dado la gran cantidad de pigmentos que se extraen con él y cuya eliminación mediante extracción orgánica es muy difícil. Se siguió un protocolo adaptado de Khan [58], para el cual se cortaron 2 gramos de raíces en trozos de no más de 2 mm con un bisturí, tras lo cual se molieron en mortero con nitrógeno líquido. Se agregaron 8 ml de Buffer de Extracción (ver composición en apéndice) y se colocó en un tubo Falcon de 50 ml. Se incubó a 70°C por 30 minutos, tras lo cual se dejó enfriar a

temperatura ambiente. Se agregó un volumen de cloroformo: isoamílico (24:1), se mezcló y se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm. Luego se transfirió la fase acuosa a otro tubo y se le agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol helado, se dejó precipitando por 30 minutos a -20°C. Se centrifugó a 12000 rpm por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* resultante se lavó con etanol 80% y se secó por 10 minutos en bloque seco a 37°C. Se redisolvió el *pellet* en 400 µl de buffer TE (ver composición en apéndice), se agregó 1µl de RNAsa A y se incubó por 10 minutos a 37°C. Al cabo de ese tiempo, se agregó nuevamente un volumen de cloroformo: isoamílico (24:1), se mezcló bien y se centrifugó por 10 minutos a 8000 rpm a 4°C. La fase acuosa se transfirió a otro tubo y nuevamente se agregaron 0.6 volúmenes de isopropanol helado y se dejó precipitando por 10 minutos a -20°C. Posteriormente se centrifugó a 8000 rpm por 5 minutos a 4°C. Se descartó el sobrenadante, y el *pellet* se lavó dos veces con etanol 80%, se dejó secar a 37°C por 10 minutos y se resuspendió en 50 µl de agua mQ.

Luego, el ADN extraído se pasó por un tamiz molecular (Sephadex G-100, GE), colocando la muestra sobre la parte superior de la columna y centrifugando por 1 minuto a 700 g. Este procedimiento se repitió tres veces, eliminando eficazmente los pigmentos presentes en la raíz.

ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE METILACIÓN SOBRE EL GENOMA DE HOJAS

Se trataron 100 ng de ADN genómico total con enzimas de restricción que presentan diferente sensibilidad a la metilación en citosinas (Tabla 1). Las incubaciones se realizaron a 37°C por 4 horas, empleando 5 U enzimáticas en un volumen final de 20 µl.

Enzima	Sitio de Reconocimiento	Sensibilidad a la metilación
Aci I	5'-CCGC-3'	Sensible a metilación CG
Bfa I	5'-CTAG-3'	Insensible
BstU I	5'-CGCG-3'	Sensible a metilación CG
Cfo I	5'-GCGC-3'	Sensible a metilación CG
Hae III	5'-GGCC-3'	Insensible
Msp I	5'-CCGG-3'	Sensible a metilación CNG
Sau3A I	5'-GATC-3'	Insensible

Tabla 1. Lista de enzimas empleadas para determinar el nivel de metilación a nivel genómico. Se incluye información sobre el sitio de corte y su sensibilidad a los distintos tipos de metilación.

A modo de control, se realizaron restricciones en paralelo con el plásmido comercial pBluescript (Stratagene) bajo las mismas condiciones que el ADN genómico, como chequeo de la eficiencia de corte de las enzimas. Los productos de las restricciones se sometieron a electroforesis en gel de agarosa 1% por una hora a 75 V.

DETECCIÓN DE MARCAS DE METILACIÓN EN CITOSINAS DEL ADN POR MEDIO DE LA TÉCNICA DE BISULFITO SOBRE ADN GENÓMICO TOTAL

REACCIÓN DEL ADN GENÓMICO CON BISULFITO DE SODIO

En primer lugar, se fragmentó el ADN en fragmentos de entre 500 y 2000 pb en promedio, mediante el empleo de enzimas de restricción, con el objeto de favorecer su desnaturalización. Se realizaron ensayos previos con diferentes enzimas de restricción para evaluar el resultado final sobre el ADN. Finalmente, para los experimentos con *Asr1* en hoja se utilizó la enzima BfaI (Fermentas) y para los experimentos con *Asr2* en raíces se utilizó la enzima DraI (New England

Biolabs). En ambos casos, la reacción se llevó a cabo colocando 5 µg de ADN con 10 U de una u otra enzima en un volumen final de 20 µl.

La reacción con bisulfito se realizó siguiendo los parámetros previamente establecidos por Clark [59] con algunas modificaciones que se detallan a continuación. La primera etapa consiste en la desnaturalización del ADN, para lo cual se colocó en un Eppendorf de 1,5 ml, 18 µl de ADN (entre 500 ng y 1 µg totales) y 2 µl de una solución de hidróxido de sodio 3 M. Luego se incubó por 20 minutos a 37°C en estufa y se le dio un pulso de 2 minutos a 90°C. Finalmente se colocó en hielo por 5 minutos y se realizó un centrifugado breve a 13000 rpm y a 4°C.

La siguiente etapa es la de sulfonación y deaminación hidrolítica. Para esta etapa se preparó una solución disolviendo 7,6 g de bisulfito de sodio en 15 ml de agua mQ estéril y se llevó a pH=5 con una solución de hidróxido de sodio 10 M. A los 20 µl de la etapa anterior se le agregaron 208 µl de la solución de bisulfito y 12 µl de una solución de hidroquinona 10 mM. Luego, se agregaron dos gotas de aceite mineral, se mezclaron bien los reactivos y se colocaron las muestras en una termocicladora MJ PTC-100 (MJ Research) con un programa de 16 ciclos de 5 segundos a 90°C y 1 hora a 55°C. Finalmente se centrifugó brevemente y se descartó el aceite mineral.

La última etapa es la de desalado y desulfonación alcalina, para lo cual se juntaron dos tubos de reacción de la etapa anterior y se agregó 1 ml de resina del *kit* comercial Promega Wizard DNA Clean-Up (Promega); se mezcló por 5 minutos utilizando un agitador y se colocó la mezcla en una jeringa de 3 ml, previamente unida a una columna del *kit*. Luego se insertó el émbolo y se empujó la resina junto con la muestra a través de la columna. Se separó la columna de la jeringa, se extrajo el émbolo y se volvieron a unir. Se agregaron 2 ml de isopropanol 80% y se hizo pasar a través de la columna para lavarla. Se separó la columna de la jeringa y se colocó sobre un Eppendorf de 1,5 ml y se realizó un centrifugado por dos minutos a máxima velocidad, para secar la resina. La columna se transfirió a

un nuevo tubo y se agregó 50 µl de buffer TE (ver composición en apéndice) previamente calentado a 70°C en un baño seco. Se dejó reposar a temperatura ambiente por 5 minutos y se realizó un centrifugado a máxima velocidad por 30 segundos para colectar el eluído. Al eluído se le agregó 5,5 µl de hidróxido de sodio 3 M y se incubó por 20 minutos a 37°C para que se produzca la desulfonación. Luego de la desulfonación se centrifugó brevemente y se agregó 1 µl de tRNA (10 mg/ml) (Biodynamics), 93,5 µl de agua mQ, 105 µl de isopropanol y 15 µl de acetato de sodio 3 M, pH=5,3. Se colocó a -20°C por 3 horas o durante toda la noche para precipitar el ADN. Al cabo de ese tiempo, se centrifugó 20 minutos a 15000 rpm a 4°C, se descartó el sobrenadante y se colocaron 100 µl de etanol 70% para lavar, se agitó vigorosamente y se centrifugó por 20 minutos a 15000 rpm a 4°C. Se removió el etanol y se secó por 10 minutos a 37°C en un baño seco. Se resuspendió el pellet en 50 µl de agua mQ y se almacenó a -20°C.

AMPLIFICACIÓN DE LAS ZONAS DE INTERÉS POR MEDIO DE REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

Los *primers* se diseñaron considerando los parámetros descritos por Wojdacz [56], y otras consideraciones generales, tales como formación de dímeros intra e inter *primers*, formación de horquillas (*hairpins*), repeticiones de secuencias, etc. Para esto se utilizaron los programas Beacon Designer (http://www.premierbiosoft.com/molecular_beacons/index.html), Kismeth [60] y Primer3 [61].

Asr1 EN HOJAS:

Para el análisis de la región codificante de *Asr1*, se realizó una PCR *semi-nested* utilizando para la primer ronda de amplificación los siguientes *primers*:

Forward Primer: 5' - ATAGAGGATTTGATAAGATTATATTTG- 3'

Reverse Primer: 5' - CTTTTTCTCATAATACTCATAA- 3'

El producto esperado de esta reacción de PCR es un amplicón de 1044 pb.

Luego se realizó una segunda reacción de PCR en la cual se utilizó el mismo *primer reverse*, pero se utilizó el siguiente *primer forward*, río abajo del primero:

Forward Primer (2): 5' - GGAGGAGGAGAAATATTATTATT- 3'

El producto final de esta reacción de PCR fue un amplicón de 966 pb.

Las reacciones se llevaron a cabo en una termocicladora MJ PTC-100 (MJ Research) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial: 2 minutos a 94°C; 40 ciclos conformados por desnaturalización a 94°C por 30 segundos, annealing a 50°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos. La elongación final fue de 10 minutos a 72°C.

En ambas reacciones de PCR se utilizaron 0,625 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen); 6 mM de cloruro de magnesio; 0,2 µM de una mezcla de dNTPs (Fermentas) y 0,2 µM de cada uno de los primers. El volumen final fue de 50 µl. Para la primera reacción se utilizaron 5 µl de ADN previamente tratado con bisulfito como templado, y para la segunda, 5 µl de la primera reacción de PCR.

Asr2 EN RAÍCES:

Para el análisis de la región regulatoria de *Asr2*, se realizaron dos rondas de PCR utilizando para ambas rondas de amplificación los siguientes *primers*:

Forward Primer: 5' -TTATGAGGAATATGTAATGGAGAAG - 3'

Reverse Primer: 5' -TATAACAACCAATAACTTAAATTAACC - 3'

El producto esperado de esta reacción de PCR es un amplicón de 968 pb.

Las reacciones se llevaron a cabo en una termocicladora Techne TC-3000-G (Techne Inc.) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial: 2 minutos a 94°C; 40 ciclos conformados por desnaturalización a 94°C por 30 segundos, annealing a 61°C por 30 segundos y elongación a 72°C por 90 segundos. La elongación final fue de 10 minutos a 72°C.

Dado que la reacción arrojó como resultado muy poca masa de producto específico, se realizaron entre 10 y 20 reacciones de PCR idénticas, se juntaron y se concentraron por centrifugación en vacío, hasta alcanzar un volumen final de 50 µl. Las muestras se sometieron a una electroforesis en gel de agarosa 1% por 45 minutos a 80 V, tras lo cual se recortó la banda específica y se purificó el ADN mediante el empleo del *kit* comercial QiaQuick Gel Extraction Kit (Qiagen). Este producto de PCR purificado se utilizó como templado para la segunda ronda de amplificación.

Para el análisis del cuerpo del gen *Asr2*, también se realizaron dos rondas de PCR utilizando para ambas rondas de amplificación los siguientes *primers*:

Forward Primer: 5' -GGTTAATATTTTTGGATATTGTTTATAT- 3'

Reverse Primer: 5' -AACAAAACATAAAATCCATAAATACC - 3'

El producto esperado de esta reacción de PCR es un amplicón de 602 pb.

Las reacciones se llevaron a cabo en una termocicladora MJ PTC-100 (MJ Research) bajo las siguientes condiciones: Desnaturalización inicial: 2 minutos a 94°C; 40 ciclos conformados por desnaturalización a 94°C por 30 segundos, annealing a 58°C por 45 segundos y elongación a 72°C por 45 segundos. La elongación final fue de 10 minutos a 72°C.

Para este amplicón también se realizaron dos rondas de amplificación, siguiendo el mismo procedimiento que para el amplicón anterior, a fin de aumentar la masa del mismo y obtenerlo libre de otros productos espurios de la reacción.

En ambos casos, las concentraciones de los reactivos para cada reacción fueron las mismas que las empleadas para la amplificación del gen *Asr1*.

SUBCLONADO Y SECUENCIACIÓN

Con el fin de poder detectar diferentes alelos de metilación, se procedió a realizar un subclonado de los productos obtenidos por PCR. Para el clonado, se

utilizó el vector pGEM-T Easy Vector (Promega), realizando una ligación a 4°C durante toda la noche y empleando una relación molar inserto:vector de 3:1. Se transformaron por electroporación células competentes de *E. coli* cepa BH5- α , con el producto de la reacción de ligado. Esto se llevó a cabo mediante el empleo de un electroporador (Gene-Pulser, Biorad), utilizando el programa "Ec2" y cubas de electroporación de 2 mm de paso. Luego de la electroporación, las bacterias se recuperaron en medio SOB (ver composición en el apéndice) por 40 minutos en estufa a 37°C. Se seleccionaron los clones positivos en placas conteniendo LB Agar (ver composición en apéndice), Ampicilina, X-Gal e IPTG. Sobre las colonias que contenían el inserto (blancas), se realizó una *colony* PCR, utilizando los *primers* universales T7 y SP6 (Biodynamics), para corroborar la presencia y el tamaño del inserto. Una vez corroborado esto, se realizaron cultivos en medio LB líquido (ver composición en apéndice) con ampicilina, durante toda la noche a 37°C de las colonias positivas. Luego, se realizó un protocolo de extracción de ADN plasmídico (miniprep) utilizando el *kit* comercial GeneJet Plasmid Miniprep Kit (Fermentas) para diez clones obtenidos en cada uno de los diferentes tiempos de estrés ensayados. Una vez purificados, los plásmidos fueron enviados al servicio de secuenciación de la FCEyN o a Macrogen (Corea) para ser secuenciados siguiendo el método de Sanger.

ANALISIS DE LOS RESULTADOS

Los resultados obtenidos en la secuenciación fueron analizados mediante el *software* Kismeth [60]. Dicho *software* compara las secuencias obtenidas con la secuencia original (o sea sin tratar con bisulfito) y determina el estado de metilación en cada citosina de la secuencia a analizar. Estos datos fueron traducidos manualmente a un sistema binario (0 = no metilado, 1 = metilado) y se volcaron en el *software* GraphPad. De esta forma se estimaron los porcentajes de metilación por sitio y también agrupándolos por región de interés (promotor, exones e intrones). El análisis estadístico se realizó mediante el test de Mann-Whitney con un 95% de confianza.

CONTROLES DE CONVERSIÓN POR BISULFITO

Como control, utilizamos el plásmido pBluescript (Stratagene), el cual fue previamente metilado utilizando la metilasa mHaeIII (New England Biolabs) siguiendo las instrucciones del fabricante. Esta enzima metila la citosina interna del sitio 5'-GGCC-3'. Como control de la correcta metilación, se sometió al plásmido a restricción con la enzima HaeIII, verificando que la misma no lo cortara en ningún sitio. Luego se realizó el tratamiento con bisulfito a diferentes tiempos, y finalmente se realizó una PCR, utilizando un par de *primers* específicos para amplificar solamente el fragmento convertido por el bisulfito, y así minimizar la amplificación del ADN no convertido. Para verificar el grado de conversión, se chequeó la misma digiriendo el producto de PCR con la enzima de restricción Bfa I. El fragmento amplificado por PCR presenta un sitio de corte para esta enzima (5'-CTAG-3') que se pierde cuando es convertido por bisulfito (pasa a ser 5'-TTAG-3') y la enzima deja de cortar. Además este fragmento contiene un sitio 5'-GGCCAG-3', donde las primeras cuatro bases corresponden al sitio de metilación de la metilasa mHae III. De modo que esta secuencia cuando está metilada (5'-GG^mCCAG-3') y es tratada con bisulfito, da origen a la secuencia 5'-GGCTAG-3', donde las últimas cuatro bases corresponden ahora con un nuevo sitio de corte para la enzima Bfa I. Entonces, el patrón de bandas es diferente en una muestra no tratada con bisulfito, una muestra tratada con bisulfito pero no metilada previamente y una muestra metilada y tratada luego con bisulfito. Con un tratamiento con bisulfito de 16 horas a 55°C, obtuvimos este patrón de bandas diferenciales al cortar con Bfa I (Figura 4).

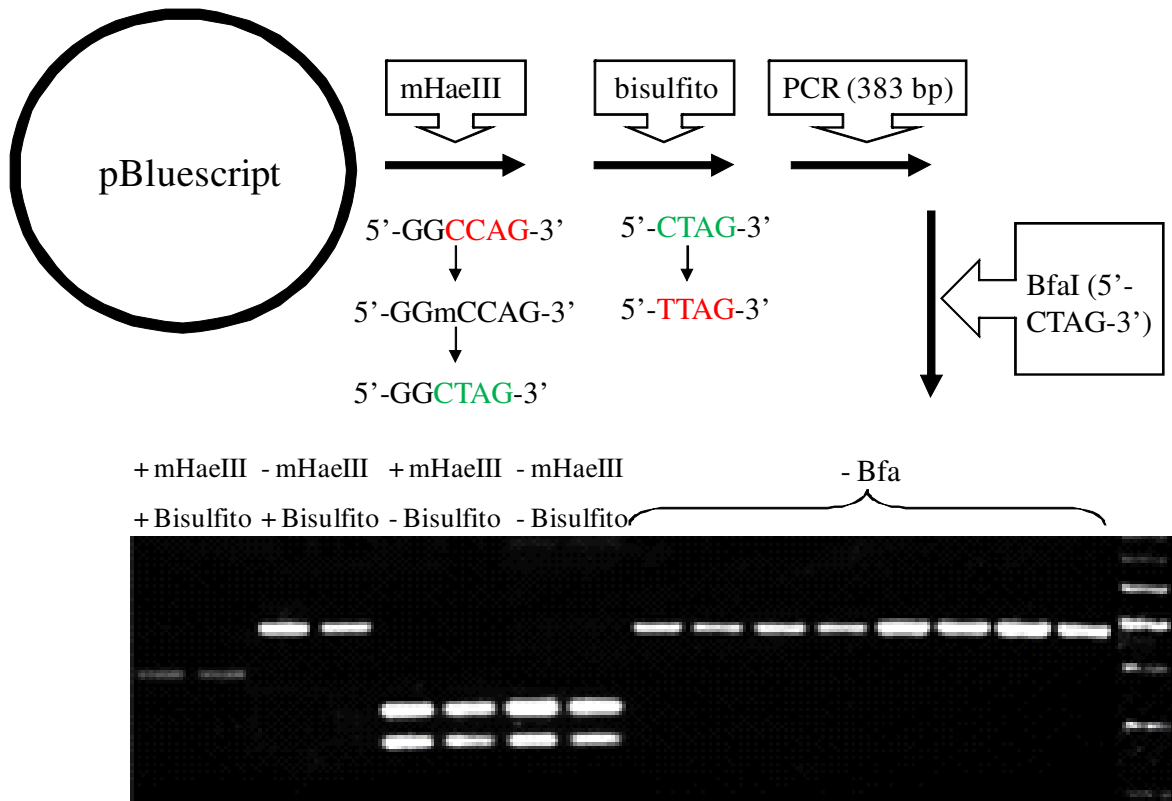


Figura 4. Esquema del procedimiento empleado para verificar la conversión por bisulfito y resultados obtenidos. En la fotografía del gel de agarosa se aprecian los patrones de bandas obtenidos en cada tratamiento, coincidente con el esperado previamente. Se muestra la desaparición de los sitios de corte originales de BfaI como consecuencia del tratamiento con bisulfito y la aparición de un nuevo sitio, por acción de la metilasa mHaeIII seguida de una reacción de bisulfito.

DETECCIÓN DE MARCAS DE METILACIÓN EN CITOSINAS DEL ADN MEDIANTE EL USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN ISOESQUIZÓMERAS CON DIFERENTE SENSIBILIDAD A LA METILACIÓN

RESTRICCIÓN DEL ADN GENÓMICO CON *MspI* o *HpaII*

Se utilizaron las enzimas *HpaII* (5'-CCGG-3'), la cual es sensible a metilación CG y la enzima *MspI* (5'-CCGG-3'), la cual no es sensible a la metilación CG, pero si es sensible a la metilación en la citosina externa del sitio de corte, siendo indicativa de metilación CNG [62].

Las restricciones se realizaron durante toda la noche (o por un mínimo de 4 horas) a 37°C, empleando 100 ng de ADN genómico total y 5 U de una u otra enzima de restricción en un volumen final de 20 µl.

ESTIMACION DEL NIVEL DE CORTE DE LAS ENZIMAS MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (REAL-TIME PCR)

Después de cada reacción enzimática se realizó una PCR en tiempo real para cuantificar el amplicón de 169 pb generado por los siguientes *primers* flanqueantes al sitio de corte de las enzimas:

Forward Primer: 5'-ATGGAGGAGGAGAAACACC-3'

Reverse Primer: 5'-GATTATATCAACGTACCAAGGC-3'

Las reacciones se llevaron a cabo en una termocicladora MJ Engine Opticon (Biorad) utilizando Sybr Green (Roche) como fluoróforo. Se utilizaron 0,625 U de Taq DNA Polymerase (Invitrogen), 3 mM de cloruro de magnesio, 2 µM de una mezcla de dNTPs (Fermentas) y 0,2 µM de cada uno de los primers (IDT Inc.). Para cada reacción, se utilizó 1 µl (5 ng) de templado y su volumen final fue de 25 µl.

Las condiciones de ciclado fueron 40 ciclos de desnaturalización por 30 segundos a 94°C, *annealing* por 30 segundos a 67°C y elongación por 45 segundos a 72°C. La curva de *melting* se realizó entre 70 y 95°C, cada 0,5°C. Todas las reacciones de PCR se realizaron por duplicado y se incluyeron 4 controles negativos (sin templado). Se realizó una curva estándar para validar el rango lineal de la PCR, la sensibilidad y el límite de detección. El análisis de los datos se realizó mediante el *software* Opticon Monitor, provisto por el fabricante del equipo.

En todos los casos, la especificidad del producto de PCR se confirmó analizando la curva de *melting* y mediante una electroforesis en gel de agarosa 2% por 1 hora a 80 V.

La ocurrencia de corte casi total, debido a la ausencia de metilación fue inferida si se detectaba amplificación tardía del fragmento. Por el contrario, el ADN metilado y por ende no cortado, se detectó mediante la amplificación temprana del fragmento, bajo las mismas condiciones. Los valores de $C(t)$ se relativizaron a un amplicón no relevante, que carecía del sitio de corte de la enzima. Para esto utilizamos un par de *primers* correspondiente al gen de *actina*, el cual originó un amplicón de 185 pb bajo las mismas condiciones de ciclado y concentraciones de reactivos. Los *primers* de actina utilizados para este propósito fueron los siguientes:

Forward Primer: 5'-GGGATGATATGGAGAAGATATGG-3'

Reverse Primer: 5'-AAGCACAGCCTGGATAGC-3'

Se calcularon los valores de $\Delta C(t)$ entre las muestras tratadas y no tratadas con las enzimas de restricción. Si el nivel de metilación era alto, el valor de $\Delta C(t)$ era menor y viceversa.

DETECCION DE MARCAS DE METILACIÓN EN LISINAS DE HISTONAS MEDIANTE EL USO DE LA TÉCNICA DE INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)

INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA EN TOMATE

Para llevar a cabo la inmunoprecipitación de la cromatina se siguió el protocolo desarrollado en nuestro laboratorio con algunas modificaciones [51].

Se partió de 4 gramos de hojas, tratando de elegir las más jóvenes o, en caso contrario, se las cortó en fragmentos de 1 cm²; o bien 4 gramos de raíces que se cortaron en fragmentos de 1 cm de largo. Las hojas o raíces se dividieron en 4 tubos tipo Falcon con un gramo de tejido en cada uno. Se agregaron 37 ml de Buffer de Extracción 1 (ver composición en apéndice) y 1 ml de formaldehído, para realizar el *crosslinking* (entrecruzamiento de ácidos nucleicos y proteínas). Se chequeó que las hojas o raíces quedaran perfectamente sumergidas en la solución y se aplicó vacío por 10 minutos. Se cortó el vacío a intervalos de dos

minutos aproximadamente, para favorecer la penetración de la solución de *crosslink*. A los 5 minutos se detuvo el vacío y se mezclaron los tubos por inversión con el fin de eliminar las burbujas de aire que impiden el *crosslink*. El *crosslinking* se detuvo agregando 2,5 ml de glicina 2 M y haciendo vacío por 5 minutos adicionales. Luego, las hojas o raíces se enjuagaron con agua destilada 2 o 3 veces para eliminar los restos de buffer y se secaron sobre papel absorbente.

El material vegetal *crosslinkeado* se molió bien fino en un mortero con nitrógeno líquido, de a un gramo por vez. El polvo resultante se resuspendió en 30 ml de Buffer de Extracción 1 y se filtró primero por una malla de nylon de 80 μm y luego por otro de 11 μm . El filtrado se centrifugó por 20 minutos a 2880 g a 4 °C en una centrífuga Hermle Z323K. Se descartó el sobrenadante, y el *pellet* se resuspendió en 50 ml de Buffer de Extracción 2 (ver composición en apéndice). Se dejó a 4 °C por 10 minutos con agitación lenta, a fin de eliminar los plástidos. Luego se centrifugó por 30 minutos a 2100 g en la misma centrífuga. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 4 ml de Buffer de extracción 2 con inhibidores de proteasas sin EDTA (Complete EDTA Free, Roche). La muestra se dividió en 4 tubos Eppendorf y se centrifugó por 10 minutos a 12000 g en una centrífuga Hitachi Koki. Se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 ml de Buffer con Percoll (GE Healthcare) 95% (ver composición en apéndice). Se centrifugó por 10 minutos a 12000 g en la misma centrífuga. Se tomó la fase superior (que contiene los núcleos), minimizando tomar el Percoll y luego se diluyó 5 veces en Buffer de Resuspensión Nuclear (ver composición en apéndice). Se centrifugó por 10 minutos a 12000 g, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 1 ml de Buffer de Resuspensión Nuclear. Se centrifugó nuevamente a 12000 g por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el *pellet* en 500 μl de Buffer de Lisis Nuclear (ver composición en apéndice). Se agregaron inhibidores de proteasas con EDTA (Invitrogen). Se sonicó la muestra por 20 minutos a máxima potencia en un sonicador de baño Bioruptor, en dos tandas de 10 minutos cada una, separadas por un intervalo de 30 minutos. A continuación, se centrifugó por 5 minutos a 21000 g, se tomó el

sobrenadante y se cuantificó el ADN presente en la muestra mediante el empleo del *kit* comercial Qbit (Invitrogen), utilizando 1 μ l de muestra.

Por otra parte, se prebloquearon 40 μ l de esferas magnéticas conjugadas a proteína A (Dynabeads Protein A, Invitrogen) durante 1 hora con 1 μ l de ADN de espermatozoos de salmón (10 mg/ml) y 2 μ l de BSA. Se llevó a 1 ml de volumen final con Buffer de Dilución de CHIP (ver composición en apéndice). Luego, las esferas se lavaron 3 veces con Buffer de Dilución de CHIP, para lo cual se utilizó una gradilla magnética (MagnaRack, Invitrogen). Se agregó a las esferas la cromatina obtenida anteriormente y se incubó por 1 hora a 4 °C con agitación suave. Se colectaron las esferas con la gradilla magnética, se tomó el sobrenadante y se dividió la muestra de modo tal de obtener 8 μ g de ADN total por cada ensayo a realizar y se reservaron 2 μ g de ADN a modo de *input* (muestra de partida). Para cada ensayo, la cromatina se diluyó 1/10 en Buffer de Dilución de CHIP con inhibidores de proteasas con EDTA (Invitrogen). Por cada ensayo se colocaron 2 μ l de anticuerpo anti - H3K4me3 o H3K27me3 (Abcam) y se dejó un tubo al que no se le colocó ningún anticuerpo (control negativo). Tanto con cada uno de los anticuerpos como para el control, los ensayos se hicieron por duplicado. Se incubó durante toda la noche a 4 °C con agitación suave.

Al día siguiente, se incorporó a cada tubo, 40 μ l de esferas magnéticas Dynabeads Protein A, previamente prelavadas 3 veces en Buffer de Dilución de CHIP. Se incubó por 20 a 25 minutos a 4 °C con agitación suave. Se *pelletearon* las esferas con la gradilla magnética y se descartó el sobrenadante. Se lavó con 1 ml de Buffer Baja Sal (ver composición en apéndice) y se agitó por 10 minutos a 4 °C, se repitió el procedimiento lavando con 1 ml de Buffer Alta Sal (ver composición en apéndice) y luego con 1 ml de *Wash* Buffer LiCl (ver composición en apéndice). Finalmente se realizaron dos lavados con Buffer TE. Las proteínas adheridas a las esferas se eluyeron con 250 μ l de Buffer de Elusión (ver composición en apéndice) recién preparado. Se *vortexeó* y se incubó por 15 minutos a 65 °C. Se repitió una vez más la elusión y se juntaron ambos sobrenadantes. Por otra parte, el *input* que estaba reservado, se llevó a un volumen final de 500 μ l con Buffer de Elusión. A

todas las muestras, incluyendo al *input*, se agregó 20 µl de cloruro de sodio 5 M y se incubó a 65°C durante toda la noche, para revertir el *crosslinking*. Esto se realizó en un baño termostático y con los tubos totalmente sumergidos para impedir la evaporación de la muestra.

Al día siguiente, se agregaron 10 µl de EDTA, 20 µl de Tris-HCl pH=6,5 y 1,5 µl de proteinasa K (14 mg/ml) y se incubó durante 1 hora a 45°C, para degradar las proteínas. Se agregaron 500 µl de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1) y se mezcló fuertemente por inversión. Se centrifugó por 5 minutos a 7000 g en una centrífuga Hitachi Koki. Se tomaron 400 µl de la fase acuosa sin arrastrar nada de interfase. Se agregaron 40 µl de acetato de sodio 3 M pH=5,3; 310 µl de isopropanol y 0,5 µl de tRNA (Biodynamics), y se dejó precipitando el ADN por 2 horas (al menos) a -20°C. Luego se centrifugó por 15 minutos a 21500 g a 4°C, se descartó el sobrenadante y se dio un breve centrifugado para eliminar la mayor parte de líquido posible. Se dejó secando en un bloque seco por 10 minutos a 45°C y se resuspendió en 30 µl de buffer TE con 10 µg/ml de RNAsa A y se dejó nuevamente en el bloque por 10 a 20 minutos para que se degrade el ARN, tras lo cual se resuspendió bien el *pellet*.

ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE ENRIQUECIMIENTO DE LOS GENES *Asr1* Y *Asr2* MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (REAL-TIME PCR)

La PCR en tiempo real cuantitativa se realizó en un equipo Stratagene Mx3000P, utilizando las siguientes condiciones de ciclado: 2 minutos de desnaturalización a 94°C seguido de 40 ciclos de 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de *annealing* a 67°C y 30 segundos de elongación a 72°C cada uno. La curva de *melting* se realizó entre 65°C y 95°C, con lecturas cada 0,5°C.

Se utilizaron 0,625 U de Maxima Hot Start Taq (Fermentas), 3 mM de cloruro de magnesio, 2 µM de una mezcla de dNTPs (Fermentas) y 0,2 µM de cada uno de los *primers* (IDT Inc.). Para cada reacción, se utilizaron 2 µl de

templado y su volumen final fue de 25 µl. Como fluoróforo se utilizó Sybr Green® (Roche).

Los *primers* utilizados fueron los siguientes:

Actina - 185 pb-:

Forward Primer: 5'-GGGATGATATGGAGAAGATATGG-3'

Reverse Primer: 5'-AAGCACAGCCTGGATAGC-3'

ToRTL ORF3 (To3) - 127 pb-:

Forward Primer: 5'-ATGAAGAGGAAGAAGAATACCG-3'

Reverse Primer: 5'-TGGCAATGATGAGTGAAGAG-3'

Asr1 Región codificante (Exón 1) - 169 pb-:

Forward Primer: 5'-ATGGAGGAGGAGAAACACC-3'

Reverse Primer: 5'-GATTATATCAACGTACCAAGGC-3'

Asr2 Región regulatoria lejana (820 pb río arriba) - 168 pb-:

Forward Primer: 5'-GCTGATTGATTGCTTGGATGAC-3'

Reverse Primer: 5'-TGGTGAAGAGGATGTAATCTGAAG-3'

Asr2 Región regulatoria cercana (207 pb río arriba) - 110 pb-:

Forward Primer: 5'-GATGGCTTGGGAGTAGGATGC-3'

Reverse Primer: 5'-CTCGTTGTGATTATCTTCTGCTTCC-3'

Asr2 Región codificante (Exón 1) - 108 pb-:

Forward Primer: 5'-CACCACAAGAACAAGGAGGATGAGG-3'

Reverse primer: 5'-ACCAGCAGCAACAGCACCAAG-3'

ANÁLISIS DEL NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *Asr1* Y *Asr2*

EXTRACCIÓN DE ARN TOTAL

La extracción de ARN total se realizó mediante el empleo del *kit* comercial Trizol (Invitrogen). Se molieron 200 mg de tejido procedente de hojas (para *Asr1*) o de raíz (para *Asr2*) en un mortero con nitrógeno líquido. El polvo resultante se colectó en un tubo Eppendorf de 1,5 ml y se agregó 1 ml del reactivo Trizol. Se incubó 5 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 12000 g por 10 minutos. El sobrenadante fue transferido a otro tubo y se agregaron 200 μ l de cloroformo. Se agitó en un vórtex unos 15 segundos y se incubó a temperatura ambiente por 3 minutos más. Se centrifugó a 12000 g por 15 minutos a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo limpio. Se agregaron 500 μ l de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente por 10 minutos. Nuevamente se centrifugó a 12000 g por 10 minutos a 4°C y se descartó el sobrenadante. El *pellet* resultante se lavó con etanol 75%, agregando 1 ml de etanol 75%, *vortexeando* y se centrifugó a 7500 g por 5 minutos a 4°C. El *pellet* se secó en un baño seco a 37°C por 5 a 10 minutos y se resuspendió en 50 μ l de agua libre de nucleasas (Promega).

RETROTRANSCRIPCIÓN

El ARN total fue tratado con DNaseI (12,5 U) por 30 minutos a 37°C. La retrotranscripción se realizó usando 200 ng (2 μ l) de ARN, 50 U de la enzima MMLV-RT (Promega), 50 pmoles de oligo-dT, y, para prevenir la degradación del ARN, se agregaron 10 U de RNaseOUT (Invitrogen); en un volumen final de 25 μ l, por una hora a 42°C.

ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE EXPRESIÓN MEDIANTE PCR EN TIEMPO REAL (REAL-TIME PCR)

Se realizó una PCR en tiempo real empleando primers específicos para *Asr1*, *Asr2* y para *Actina*, como ejemplo de un gen de expresión constitutiva. En

todos los casos los *primers* fueron diseñados mediante el software Beacon Designer.

Los *primers* utilizados para *Asr1* fueron los siguientes:

Forward Primer: 5'-CAGATGGAGGAGGAGAAACAC-3'

Reverse Primer: 5'-TAGAAGAGATGGTGGTGTCCC-3'

Este par de *primers* amplifica un producto de 337 pb.

Los *primers* utilizados para *Asr2* fueron los siguientes:

Forward Primer: 5'-AAGAACAAGGAGGATGAGGGTGGAC-3'

Reverse Primer: 5'-TCTCGAGATGGCTGTGGTGCT-3'

Este par de *primers* amplifica un producto de 170 pb.

Los *primers* utilizados para *actina* fueron los siguientes:

Forward Primer: 5'-GGGATGATATGGAGAAGATATGG-3'

Reverse Primer: 5'-AAGCACAGCCTGGATAGC-3'

Este par de *primers* amplifica un producto de 185 pb.

En los tres casos se utilizó el mismo equipo, condiciones de ciclado y concentraciones de reactivos que en la PCR en tiempo real realizada para el ensayo con enzimas de restricción con diferente sensibilidad a la metilación. Para cada tratamiento se analizaron 4 réplicas biológicas y 2 reacciones de PCR en tiempo real para cada una de ellas. Se realizó una curva estándar con el objeto de estimar la eficiencia de la reacción, la cual se consideró aceptable si superaba el 95 %.

Los niveles de transcripto se estimaron según el método descrito por Livak & Schmittgen [63]. Luego los niveles de transcripto de *Asr1* o *Asr2* se relativizaron

a los de actina y cada uno de estos valores se relativizó al valor obtenido para las plantas control.

DETERMINACIÓN DE LA VIABILIDAD CELULAR EN RAÍCES FRENTE A CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO MEDIANTE TINCIÓN CON EVANS BLUE.

Se siguió el protocolo descrito por Tamás [64], con algunas modificaciones. Se tomaron plantas estresadas por diferentes períodos de tiempo y se les cortaron sus raíces, las cuales se trozaron en fragmentos de 5 mm aproximadamente con un bisturí. Luego de esto, se pesaron las raíces antes del procedimiento. Luego se agregó una solución de Evans Blue (Biopack) 0,25 % y se dejó en agitación por 15 minutos. A continuación se realizaron 3 lavados con agua mQ por 10 minutos cada uno, con agitación. Posteriormente se incubó por una hora con dimetilformamida, siempre con agitación, tras lo cual se centrifugó a 21500 g por 5 minutos y se tomó el sobrenadante. Se midió la absorbancia a 595 nm utilizando un lector de Elisa (Biorad) y se relativizó la absorbancia a la masa de raíces de partida.

RESULTADOS

ESTIMACIÓN DEL NIVEL DE METILACIÓN A NIVEL GENÓMICO

Se hallaron importantes niveles de metilación tanto en el contexto clásico CG como en el contexto CNG (Figura 5). Esto último nos motivó a seguir investigando particularmente los contextos no clásicos de metilación, haciendo énfasis en los genes modelo.

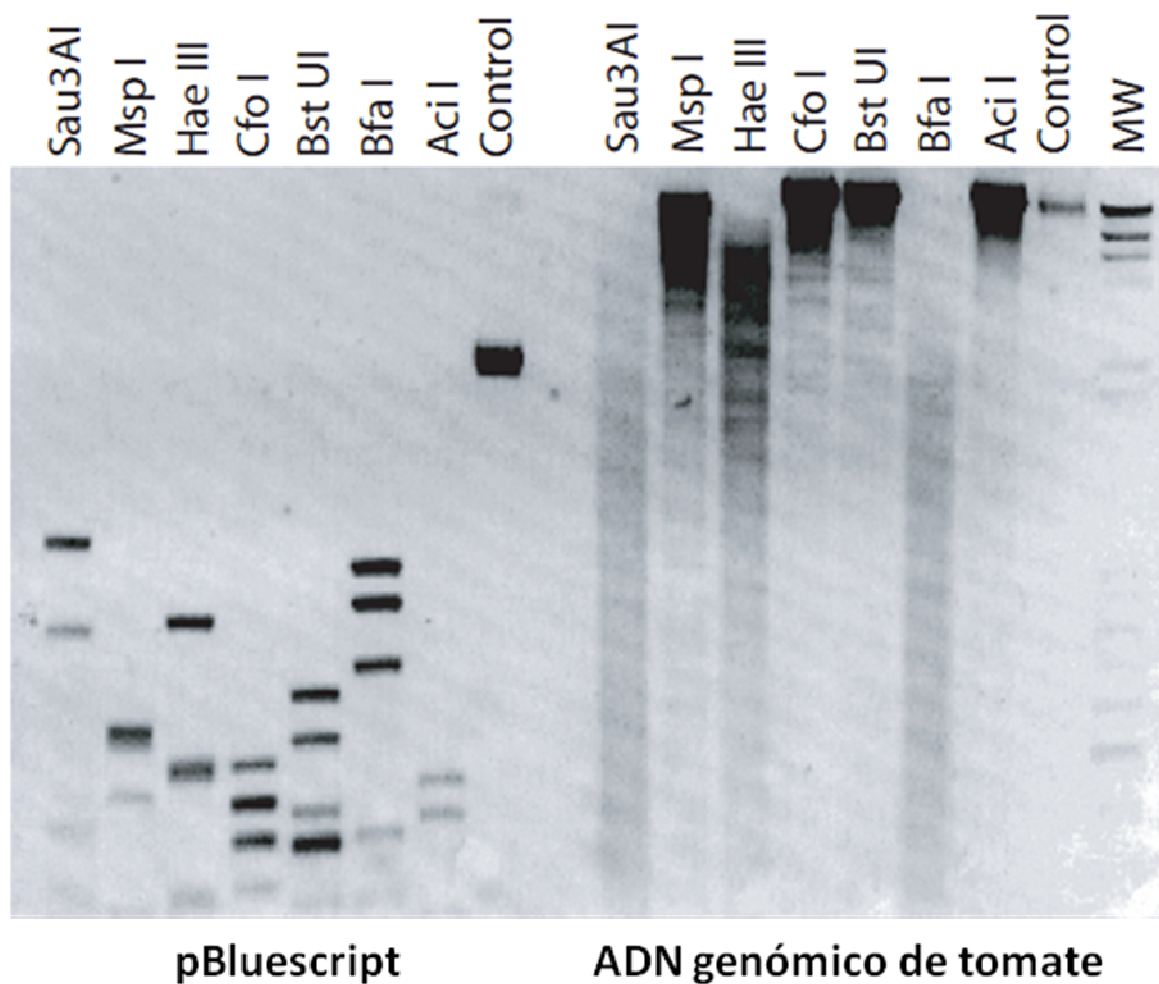


Figura 5. Resultado de las restricciones sobre ADN genómico total con enzimas con diferentes sensibilidades a la metilación. Se aprecia un elevado nivel de metilación en contexto CG (Tratamiento con Cfo I, BstU I y Aci I) e, inesperadamente, un alto nivel de metilación en contexto CNG (Tratamiento con Msp I).

MARCAS DE METILACIÓN EN CITOSINAS DEL ADN DE LOS GENES *Asr1* Y *Asr2*

Asr1 EN HOJAS

Se analizó una región de 966 pb, la cual comprende al exón 1, el intrón y una porción 5' del exón 2 del gen. La cantidad de citosinas analizadas, correspondientes a los distintos contextos de metilación y por cada región génica se detallan en la figura 6:

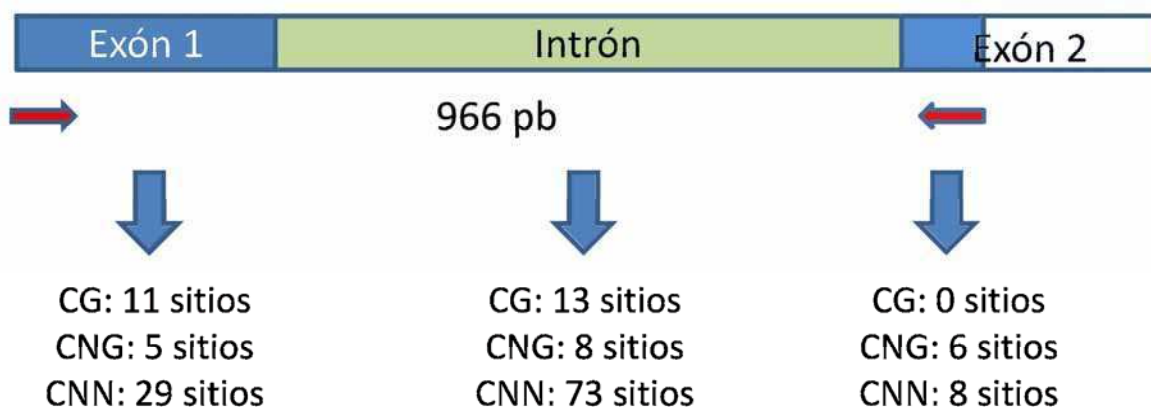


Figura 6. Representación esquemática de la región analizada del gen *Asr1*. Se muestra la cantidad de citosinas presentes en cada contexto de metilación y en cada región génica.

En todas las regiones estudiadas se hallaron niveles significativos de los tres tipos de metilación (CG, CNG y CNN) en condiciones normales, sin estrés hídrico. Sorprendentemente, se encontró metilación de tipo CNN pese a que *Asr1* no es un trasposón, sino un gen que no contiene elementos repetitivos. Por ende, constituye una nueva ubicación para este tipo de metilación, donde la metilación de tipo CNN se concentra principalmente en el intrón (Figuras 7 y 8).

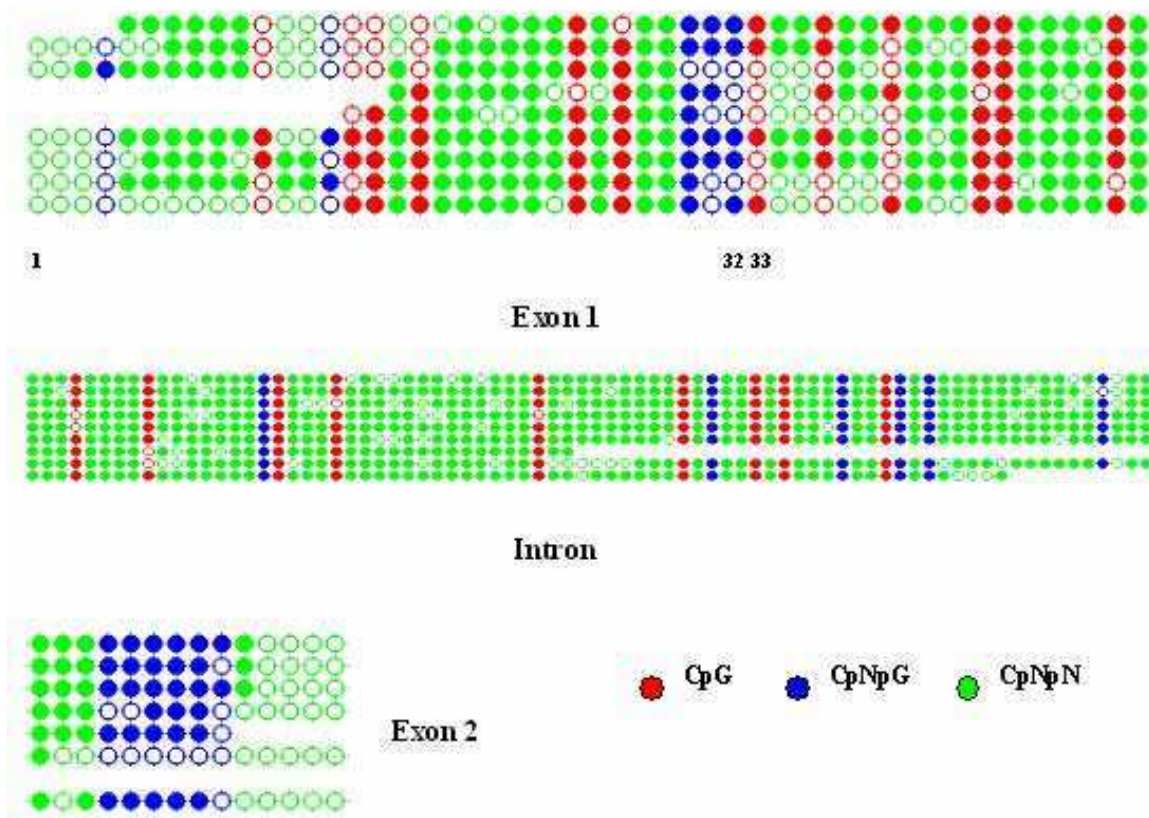


Figura 7. Región codificante de *Asr1* en condiciones basales. Cada citosina se presenta como un círculo lleno cuando se halla metilada y como un círculo vacío cuando no lo está (Software Kismeth). Las posiciones señaladas (32 y 33) corresponden a las citosinas ensayadas mediante enzimas de restricción con diferente sensibilidad a la metilación.

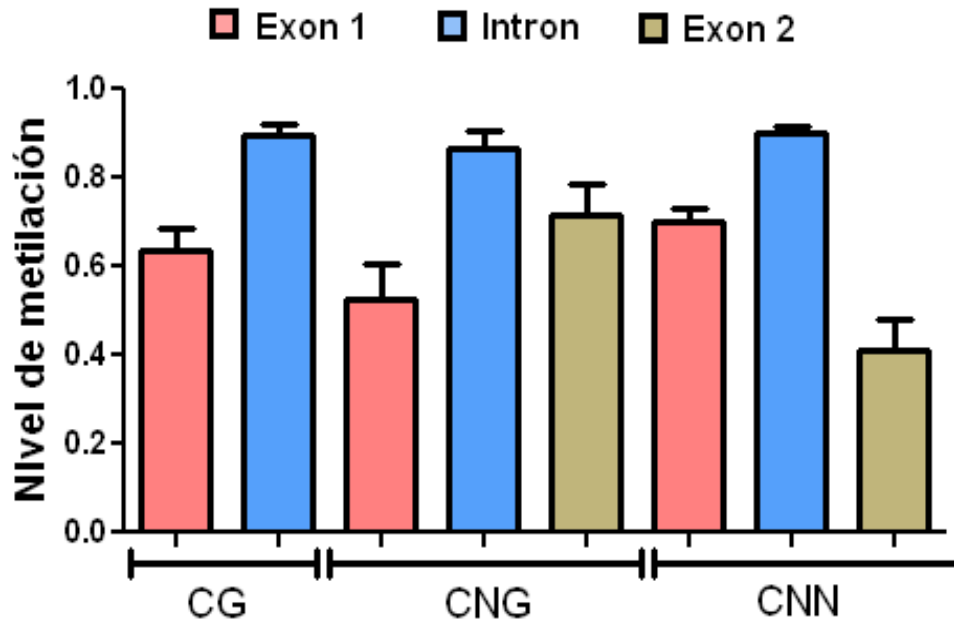


Figura 8. Nivel de metilación en cada contexto y en cada región del gen, en condiciones basales. Las observaciones de citosinas individuales se agruparon por región génica para el análisis estadístico.

Cuando las plantas se expusieron a condiciones de sequía por el lapso de 2 horas, se observó un aumento del nivel de metilación de tipo CG en el exón 1 ($p < 0.08$) y simultáneamente una pérdida de las marcas de metilación asimétrica en 75 de los 110 sitios estudiados. (Figura 9). Este escenario de desmetilación fue estadísticamente significativo, como se muestra a continuación: Exón 1 ($p < 0.005$), intrón ($p < 0.0001$) y exón 2 ($p < 0.05$) (Figura 10).

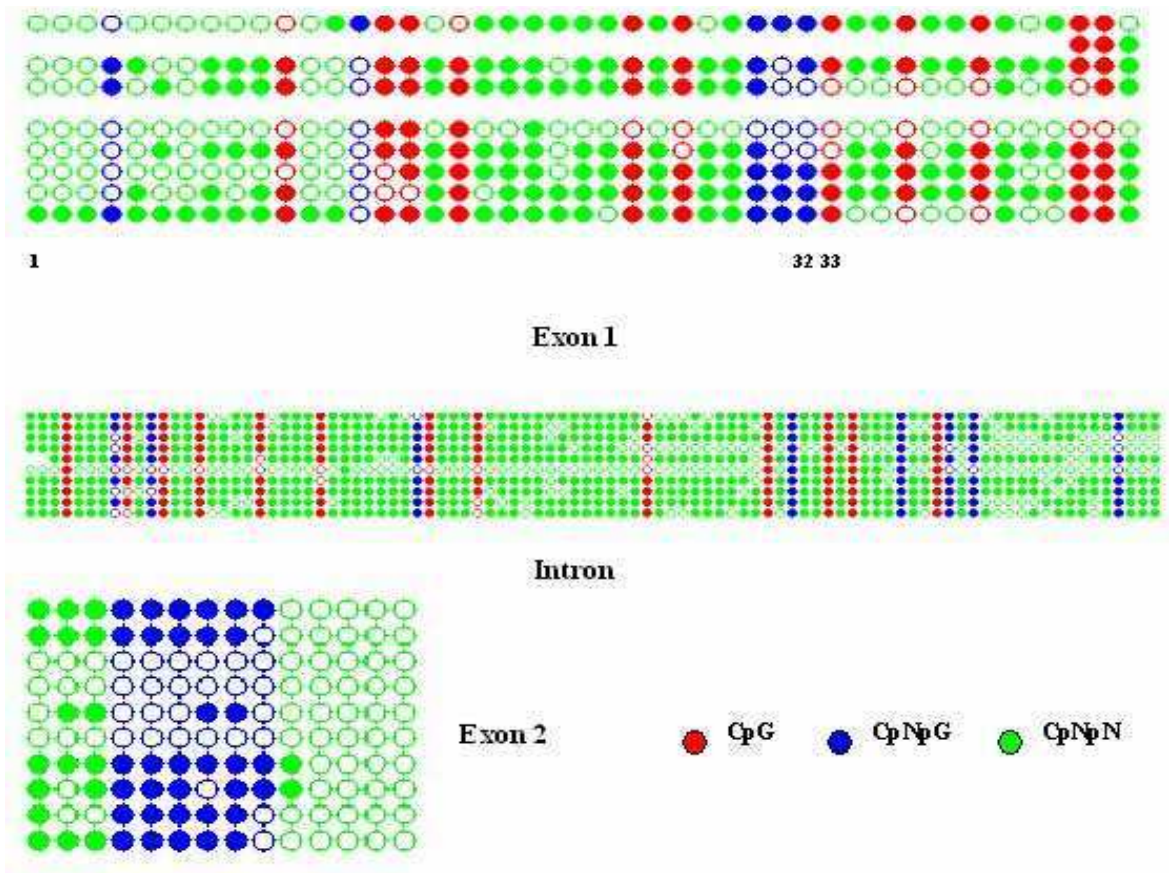


Figura 9. Región codificante de *Asr1* luego de dos horas de estrés hídrico. Cada citosina se presenta como un círculo lleno cuando se halla metilada y como un círculo vacío cuando no lo está (Software Kismeth). Las posiciones señaladas (32 y 33) corresponden a las citosinas ensayadas mediante enzimas de restricción con diferente sensibilidad a la metilación.

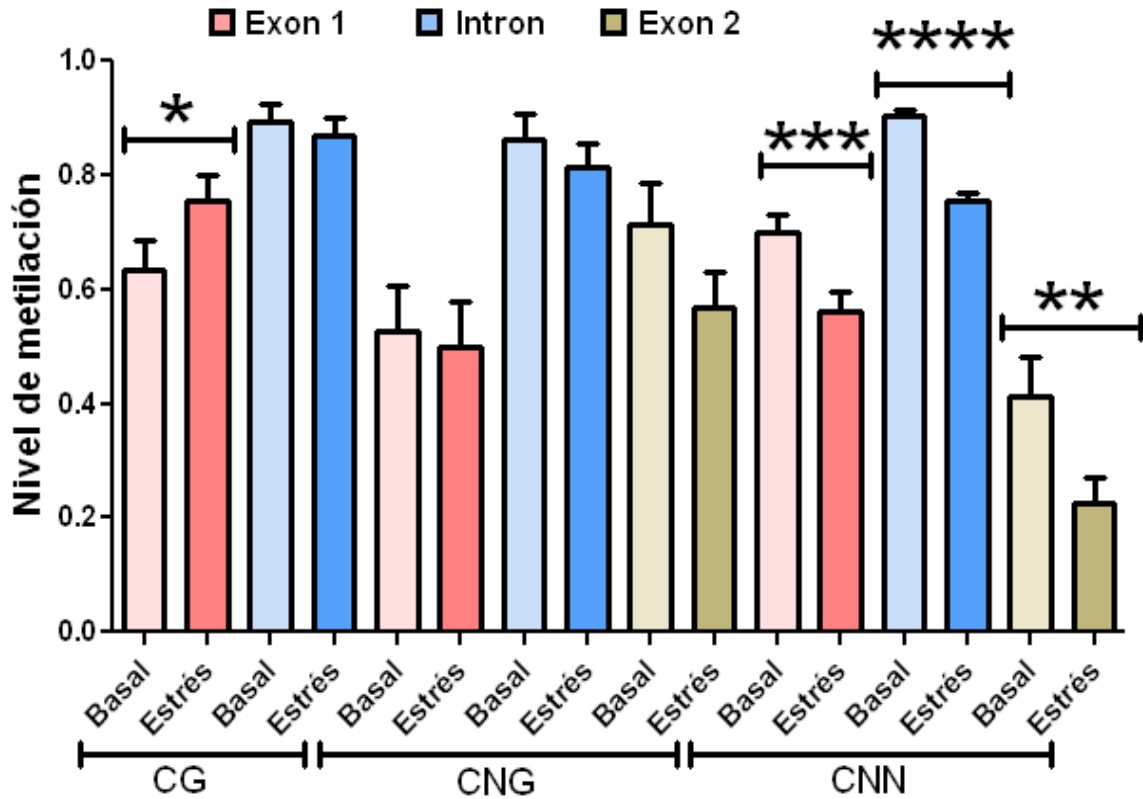


Figura 10. Niveles de metilación agrupados por región génica y contexto de metilación en condiciones basales y luego de dos horas de estrés hídrico. Se observaron diferencias significativas en el contexto CG en el exón 1 y en la metilación asimétrica CNN en todas las regiones analizadas. * $p < 0.08$, ** $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$.

El análisis de metilación de dos citosinas particulares, mediante enzimas de restricción con diferente sensibilidad a la metilación, arrojó un resultado coincidente con el obtenido mediante bisulfito para esas citosinas particulares, con un aumento significativo de la metilación en la citosina ubicada en contexto CG ($p < 0.01$) y la ubicada en contexto CNG ($p < 0.0001$) (Figura 11).

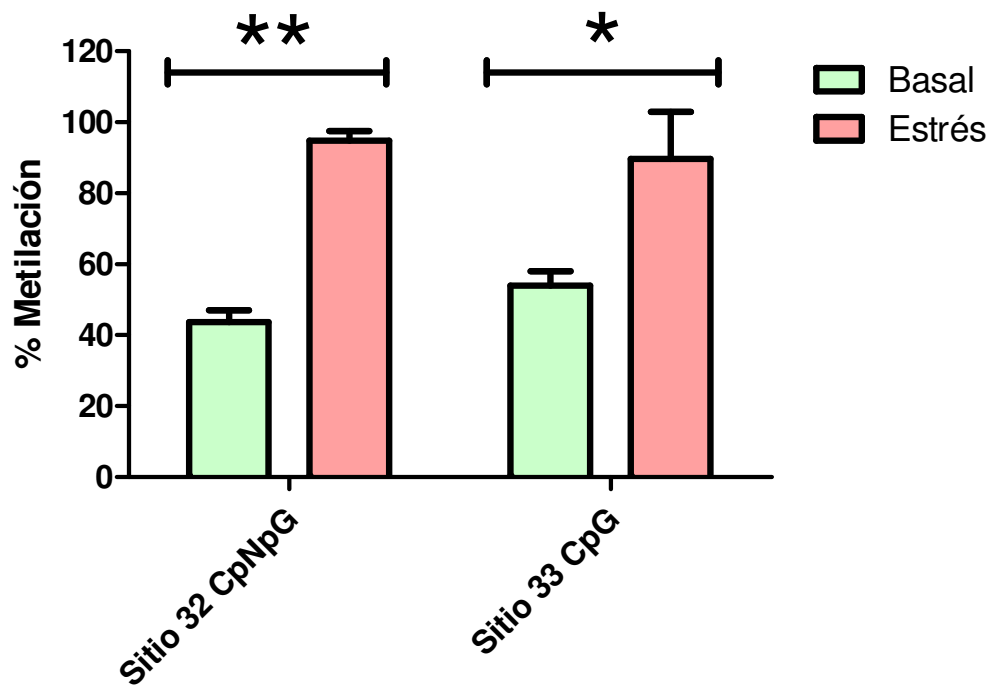


Figura 11. Niveles de metilación en dos sitios particulares del exón 1 de *Asr1* estimados mediante enzimas de restricción con diferente sensibilidad a la metilación seguido de real-time PCR. Se observaron diferencias significativas luego de dos horas de estrés hídrico, coincidente con lo observado para esos sitios particulares empleando la técnica de bisulfito. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Asr2 EN RAÍCES

Región regulatoria:

Se analizó una región de aproximadamente 1 Kpb río arriba del gen *Asr2*, ubicada entre las posiciones -1342 y -374. El número total de citosinas en los diferentes contextos se detallan en la figura 12:

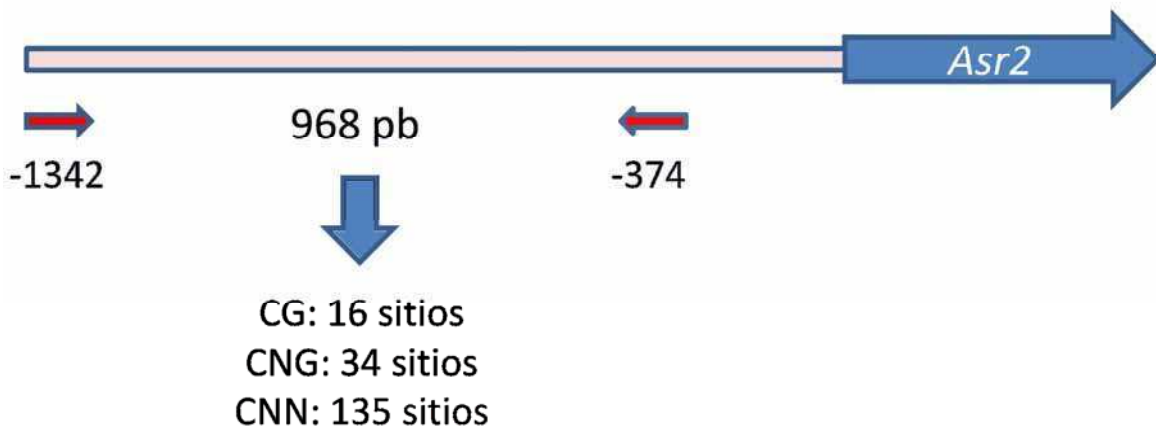


Figura 12. Representación esquemática de la porción analizada de la región reguladora del gen *Asr2*. Se muestran la cantidad de citosinas presentes en cada contexto de metilación.

En condiciones basales, se encontraron elevados niveles de metilación en todos los contextos analizados (cercano al 90%). Al cabo de 2 horas de estrés, no se observaron variaciones en los niveles de metilación. Sin embargo, luego del chequeo de viabilidad celular (ver luego), se decidió repetir el experimento con sólo 30 minutos de estrés (Figura 13) (donde se probó que la viabilidad celular era de más de 90%) y entonces se halló una disminución significativa de la metilación en el contexto CNN (Figura 14).

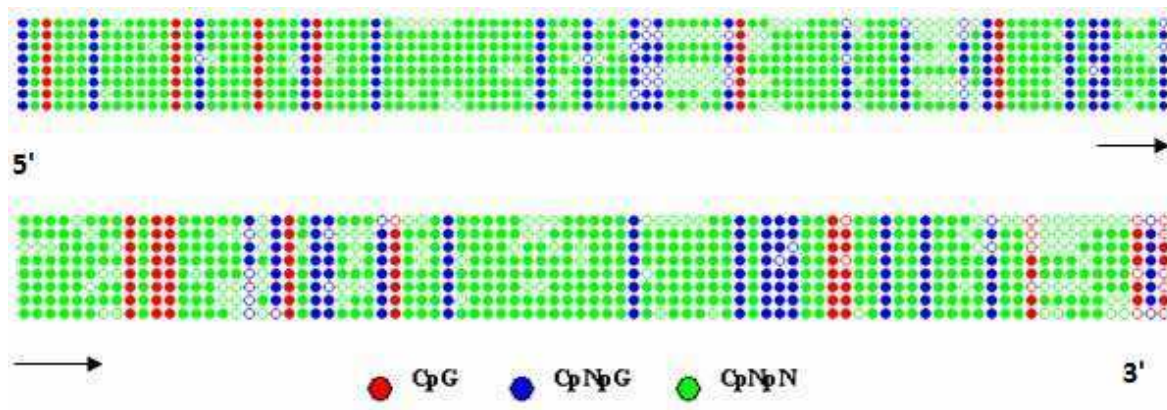


Figura 13. Región reguladora de *Asr2* luego de 30 minutos de estrés hídrico. Cada citosina se presenta como un círculo lleno cuando se halla metilada y como un círculo vacío cuando no lo está (Software Kismeth).

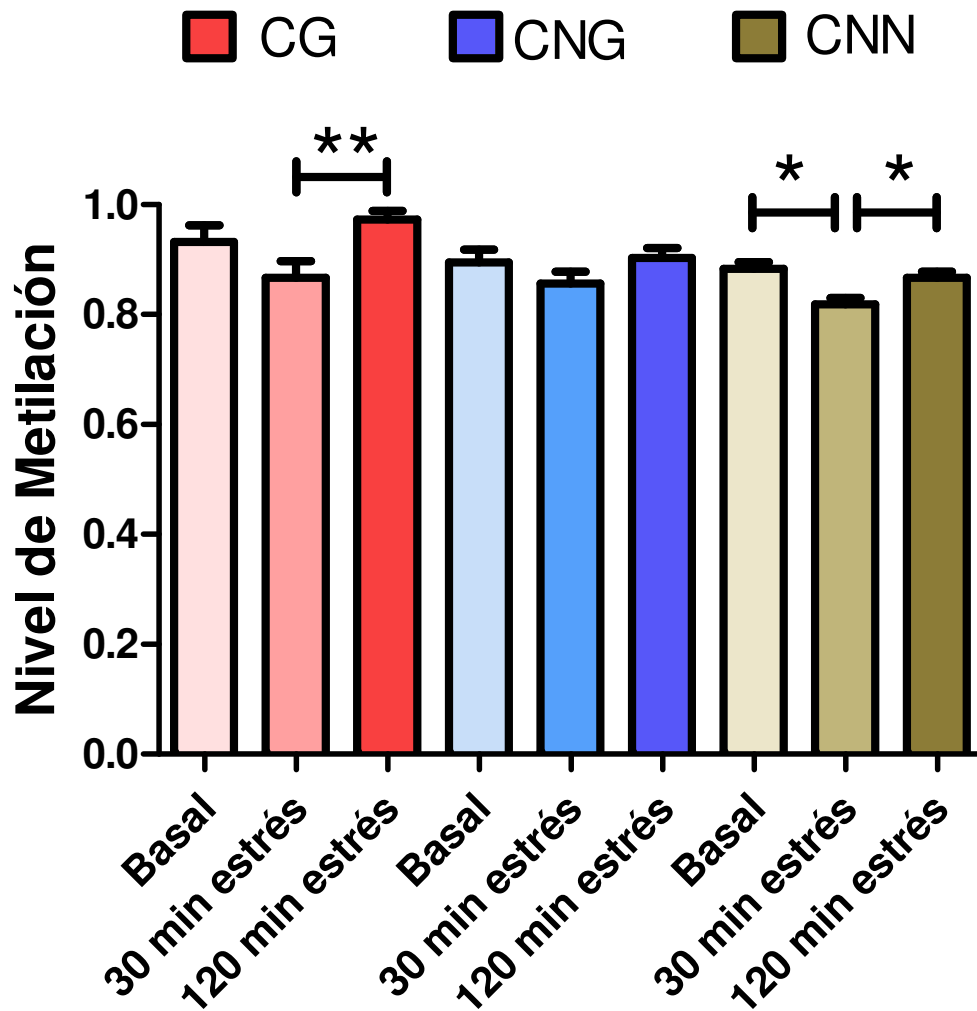


Figura 14. Niveles de metilación en la región regulatoria de *Asr2*, agrupados por contexto de metilación en condiciones basales y luego de 30 minutos o dos horas de estrés hídrico. Se observaron diferencias significativas en los contextos CG y CNN entre las condiciones basales y los 30 minutos de estrés así como entre los 30 minutos y las dos horas. (* $p < 0,05$; ** $p < 0,005$)

Cuerpo del gen:

Se analizó una región de aproximadamente 600 pb, entre las posiciones +1144 y +1746, comprendiendo la porción 3' del extremo 5' UTR, la región codificante completa y la porción 5' del extremo 3' UTR. La cantidad de citosinas en cada contexto presentes en la región se muestran en la figura 15:

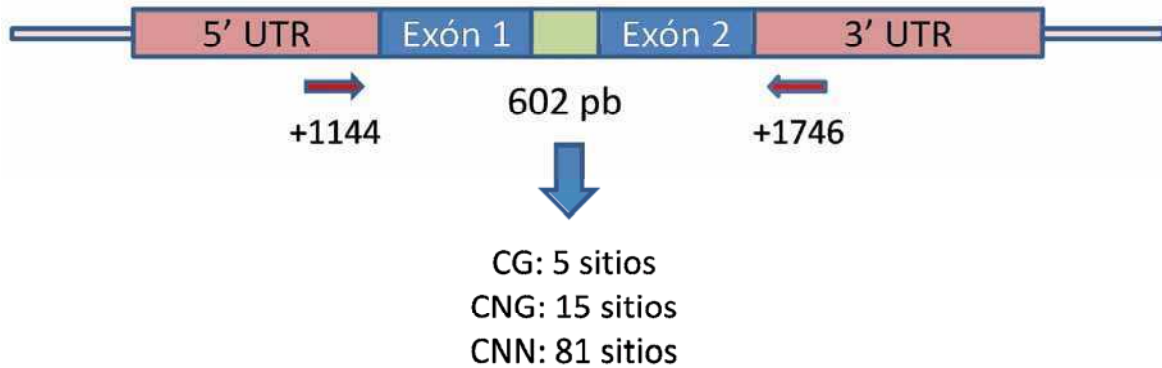


Figura 15. Representación esquemática de la porción analizada del cuerpo del gen *Asr2*. Se muestran la cantidad de citosinas presentes en cada contexto de metilación.

Se hallaron niveles importantes de metilación de tipo CG y muy escasa metilación en los contextos CNG y CNN. Dichas condiciones no variaron significativamente luego de 30 minutos de estrés (Figuras 16 y 17) ni luego de 2 horas de estrés hídrico (Figura 17).

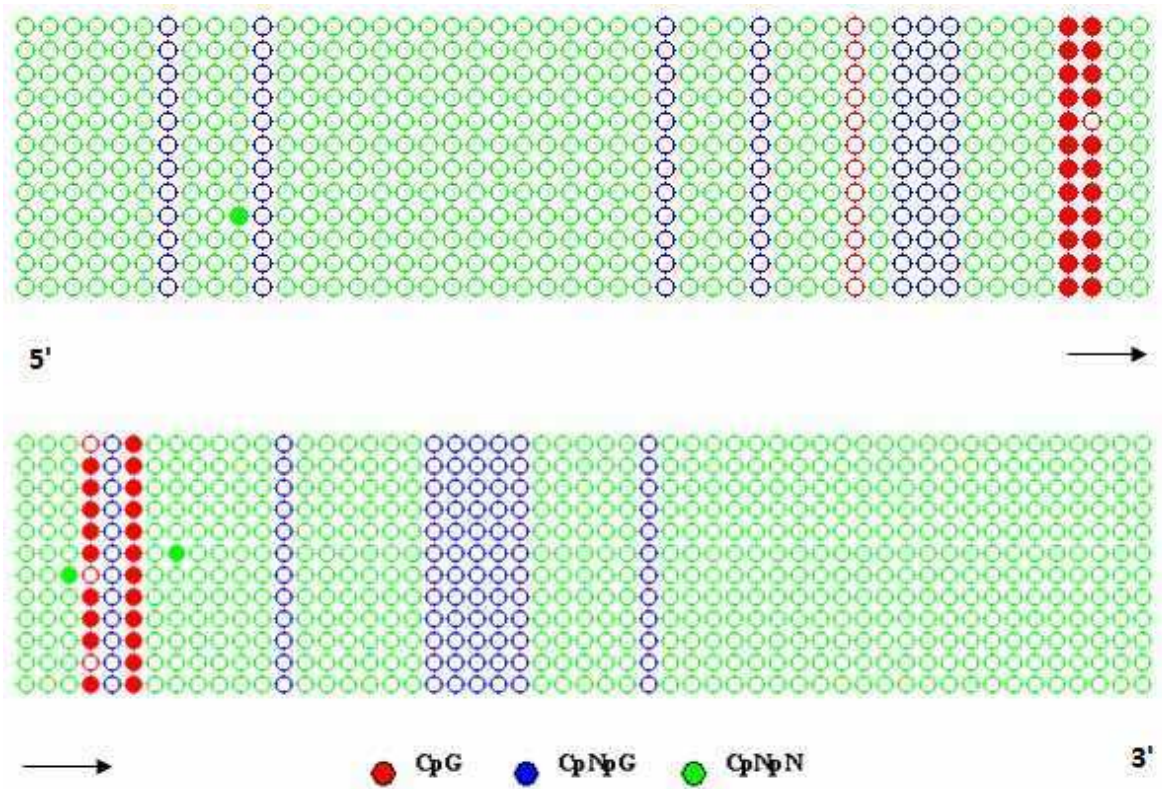


Figura 16. Cuerpo del gen *Asr2* luego de 30 minutos de estrés hídrico. Cada citosina se presenta como un círculo lleno cuando se halla metilada y como un círculo vacío cuando no lo está (Software Kismeth).

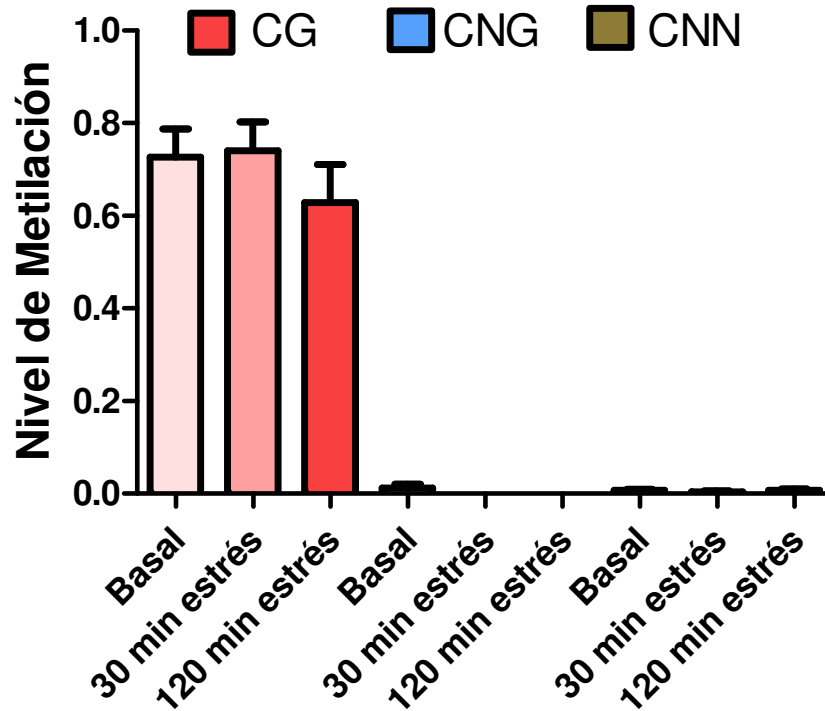


Figura 17. Niveles de metilación en el cuerpo del gen *Asr2*, agrupados por contexto de metilación en condiciones basales y luego de 30 o 120 minutos de estrés hídrico. Se observó metilación en el contexto CG, el cual no varió significativamente como consecuencia del estrés, mientras que no se observó metilación en ningún otro contexto estudiado tanto en condiciones basales como de estrés.

METILACIÓN EN LISINAS DE HISTONAS

Asr1 EN HOJAS

El experimento de inmunoprecipitación de la cromatina arrojó la presencia de histona 3 trimetilada en la lisina 27, la cual es una probada marca de represión de la transcripción [49]. Dicha marca epigenética mostró una disminución significativa concomitante con el tratamiento de estrés hídrico por 2 horas. No se halló la marca de activación (lisina 4 trimetilada en la histona 3) en este gen, bajo ninguna condición (Figura 18). Como control, se investigaron las mismas marcas sobre la región codificante del gen de *actina*, no hallándose las mismas bajo ninguna condición ensayada.

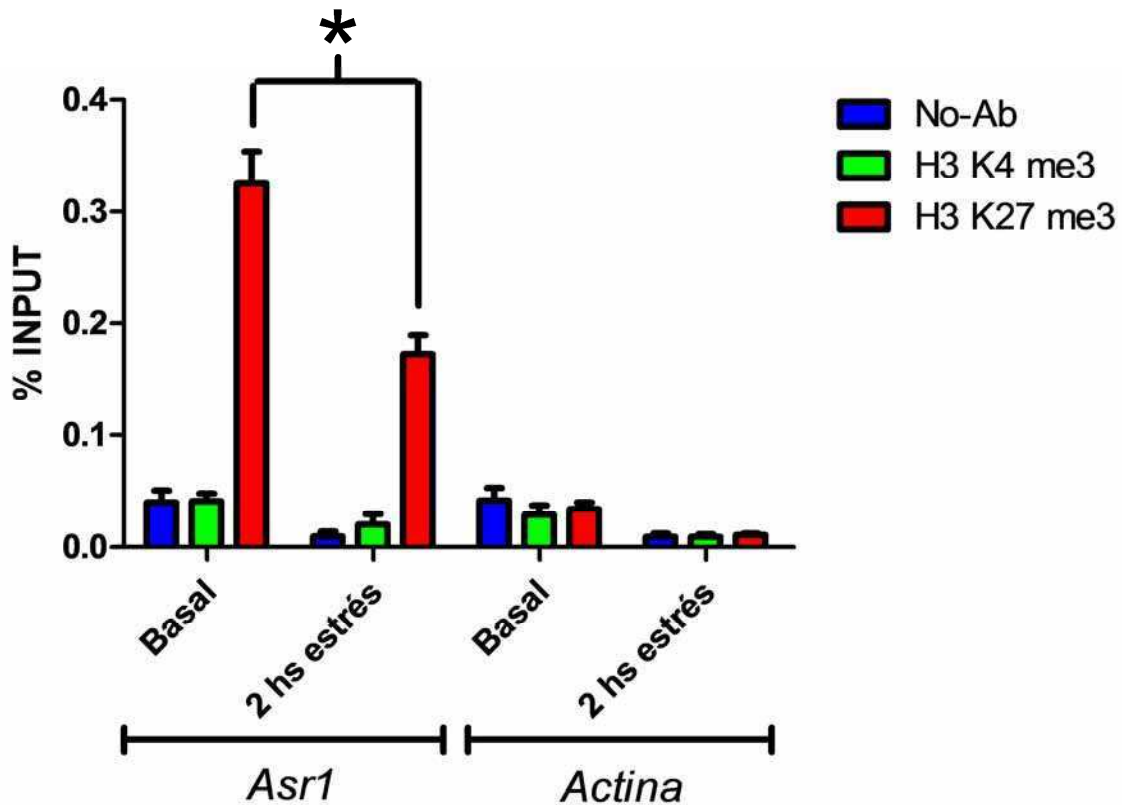


Figura 18. Niveles de las marcas H3K4me3 (activadora) y H3K27me3 (represora) en la región codificante de *Asr1*, expresados como % respecto del input. Se observó una disminución significativa de la marca represora H3K27me3 luego de dos horas de estrés. No se detectó la presencia de la marca activadora H3K4me3 en ningún caso. Se muestran las mismas marcas sobre actina como control ($p < 0,05$).

Asr2 EN RAÍCES

En los ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina en raíces, no se detectó asociación de ninguna de ambas marcas de metilación en lisinas de histonas con la región codificante del gen *Asr2*. Para ambas marcas de metilación en histonas ensayadas, no se detectaron diferencias significativas con respecto a la muestra no tratada con ningún anticuerpo tanto en condiciones basales como luego de 30 minutos de estrés (Figura 19).

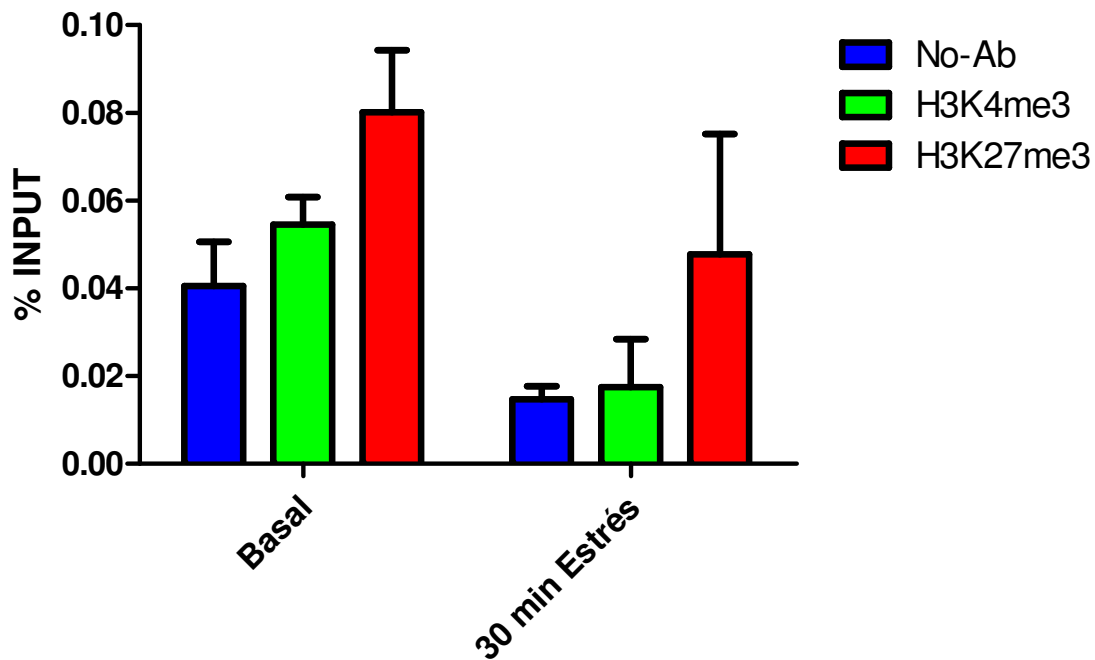


Figura 19. Niveles de las marcas H3K4me3 (activadora) y H3K27me3 (represora) en la región codificante de *Asr2*, expresados como % respecto del input. No se observó asociación de ninguna de estas marcas de metilación en lisinas de histonas con esta región del gen *Asr2* en raíces.

Con respecto al análisis de las marcas de metilación en lisinas de histonas sobre la región reguladora de *Asr2*, no se detectó ninguna de las marcas de metilación en estudio en la región cercana al inicio de la transcripción del gen (200 pb río arriba) (Figura 20). Por el contrario, en una región más alejada del inicio de la transcripción (800 pb río arriba) se encontró asociación con la marca represiva H3K27me3 tanto en condiciones basales como luego de 30 minutos de estrés. No obstante, esta marca no sufrió cambios como consecuencia del estrés impuesto (Figura 20).

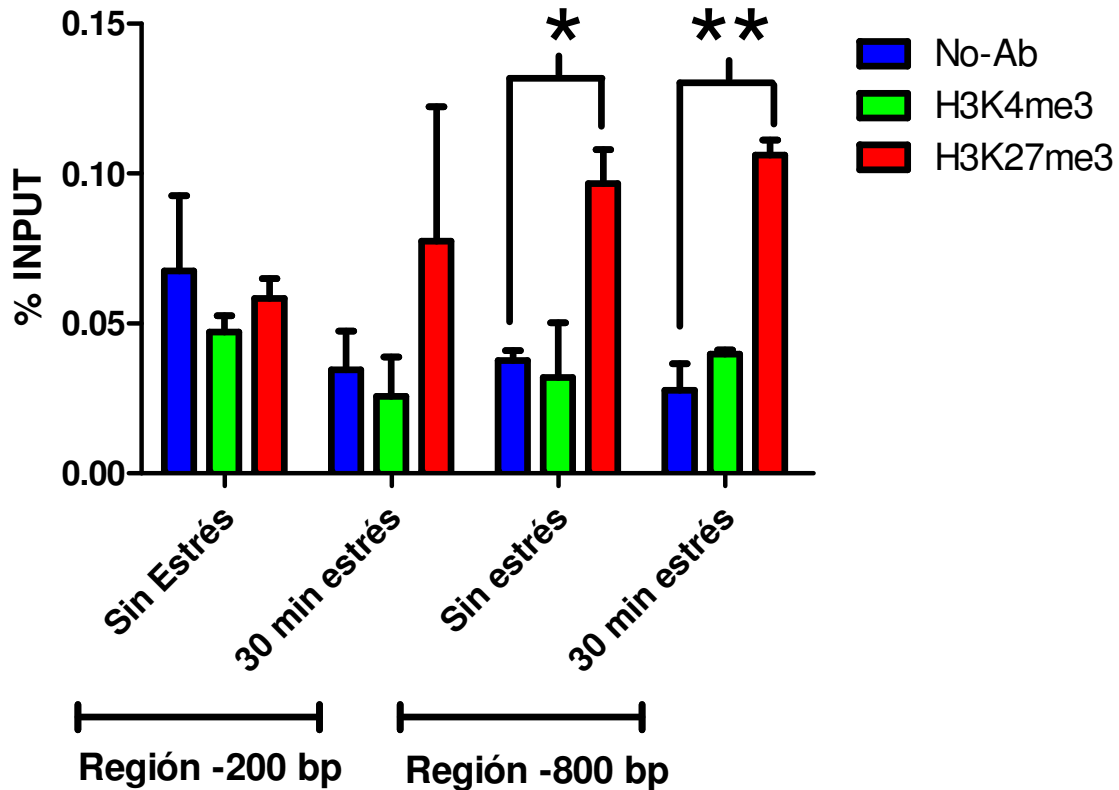


Figura 20. Niveles de las marcas H3K4me3 (activadora) y H3K27me3 (represora) en la región regulatoria de *Asr2*, expresados como % respecto del input. No se observó asociación de ninguna de estas marcas de metilación en lisinas de histonas con la región más próxima al gen de la región regulatoria. En la región más distal se halló asociación con la marca represiva H3K27me3, pero la misma no varió como consecuencia del estrés. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Como control, se evaluó la presencia de estas marcas de metilación sobre el cuerpo de un gen de expresión constitutiva, como *Actina* y sobre un elemento transponible que se haya silenciado (La subregión To3 del retrotransposón ToRTL). Sobre el gen de *actina* no se halló la presencia de ninguna de estas marcas, tanto en condiciones basales como de estrés (Figura 21), al igual que lo hallado en hojas (Figura 18). Sobre el elemento transponible ToRTL, se esperaba hallar la marca de represión de la expresión, H3K27me3, tanto en condiciones basales como luego de aplicado el estrés. Sin embargo, se hallaron ambas marcas de metilación, la represiva y la activadora (H3K4me3), las cuales estaban presentes en condiciones basales, pero desaparecen como consecuencia del

estrés aplicado (Figura 21). Esto constituyó un hallazgo inesperado, por cuanto esperábamos *a priori* que dicho elemento se encuentre permanentemente silenciado.

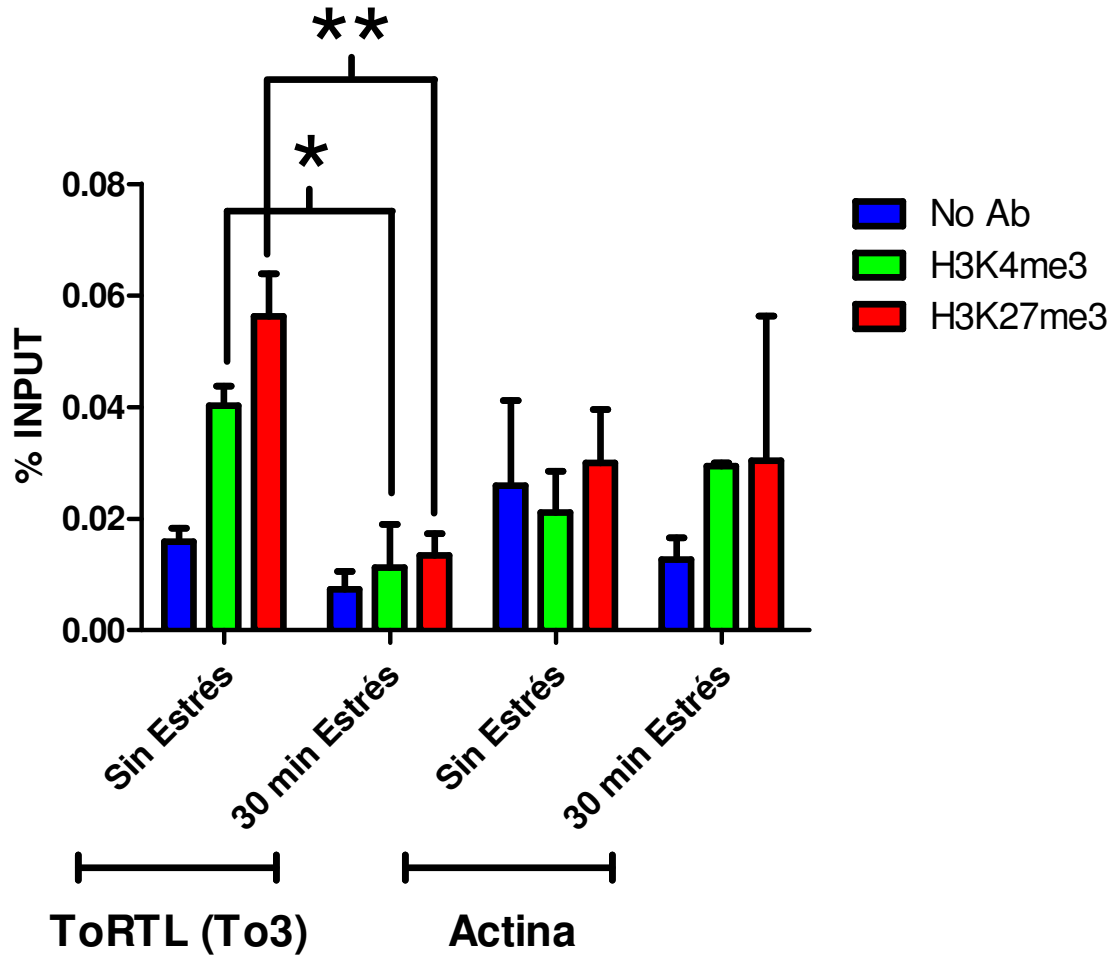


Figura 21. Niveles de las marcas H3K4me3 (activadora) y H3K27me3 (represora) sobre un gen de expresión constitutiva (*Actina*) y sobre un elemento transponible (ToRTL) expresados como % respecto del input. No se observó asociación de ninguna de estas marcas de metilación en lisinas de histonas sobre el cuerpo de gen de *actina*. Sobre el elemento transponible ToRTL se halló asociación con ambas marcas (H3K4 me3 y H3K27me3), las cuales se perdieron como consecuencia del estrés. * p<0.05, ** p<0.01.

NIVEL DE EXPRESIÓN DE LOS GENES *Asr*

NIVEL DE EXPRESIÓN DE *Asr1* EN HOJAS

Se observó un marcado incremento en el nivel de expresión de *Asr1* con respecto a varios genes de expresión constitutiva, tales como la *actina*. Luego de dos horas de estrés hídrico, el incremento de la expresión alcanzó unas 7 veces con respecto a la expresión basal, alcanzando unas 36 veces luego de 6 horas de estrés, tiempo hasta el cual se pudo comprobar que el fenotipo de marchitez era reversible (Figura 22).



Figura 22. Nivel de expresión de *Asr1* relativo al nivel de expresión de *Actina* a diferentes tiempos de estrés. A las dos horas, ya se observó un incremento de 7 veces en el nivel de expresión, alcanzando unas 36 veces a las 6 horas de estrés hídrico.

NIVEL DE EXPRESIÓN DE *Asr2* EN RAÍCES

Al relativizar el nivel de expresión de *Asr2* al de diversos genes de expresión constitutiva, se encontró que la expresión aumenta levemente a lo largo del tratamiento de estrés hídrico (se ensayaron entre 30 y 120 minutos de estrés) (Figura 23).

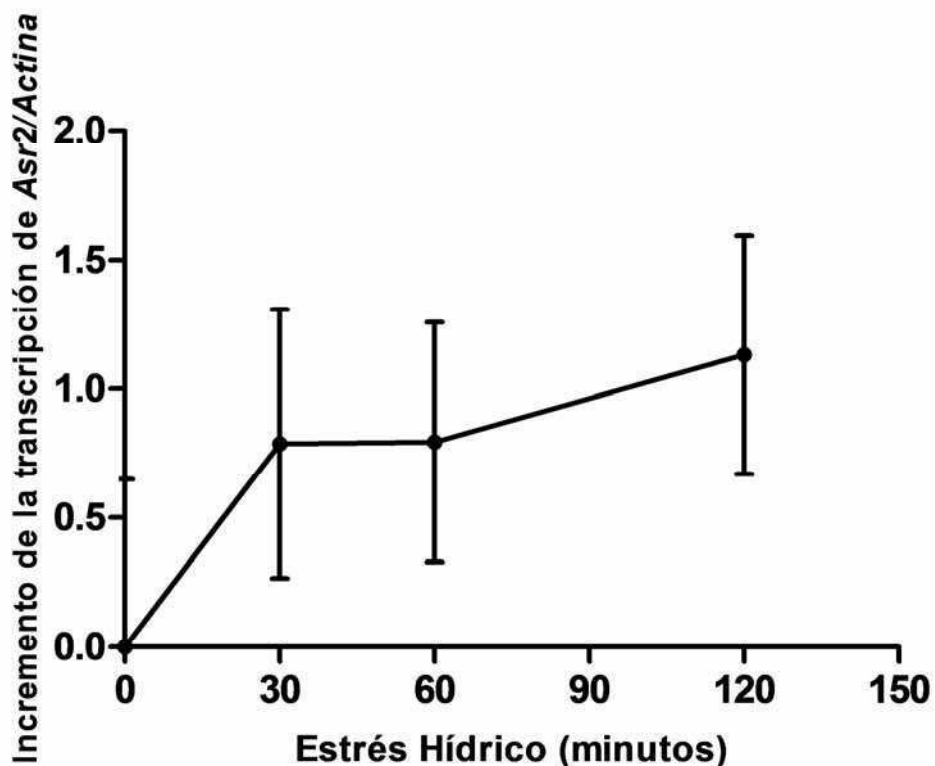


Figura 23. Nivel de expresión de *Asr2* relativo al nivel de expresión de *Actina* a diferentes tiempos de estrés. Se observa un discreto aumento de su expresión ya a los 30 minutos de estrés y luego de 2 horas de estrés el nivel de expresión relativo a actina llegó a duplicarse.

Sin embargo, al analizar la expresión de cada gen por separado, se encontró una leve disminución de la expresión de *Asr2* y una muy marcada disminución en los niveles de expresión de todos los genes de expresión constitutiva ensayados (Se muestra la expresión de *actina* como ejemplo) (Figura 24).

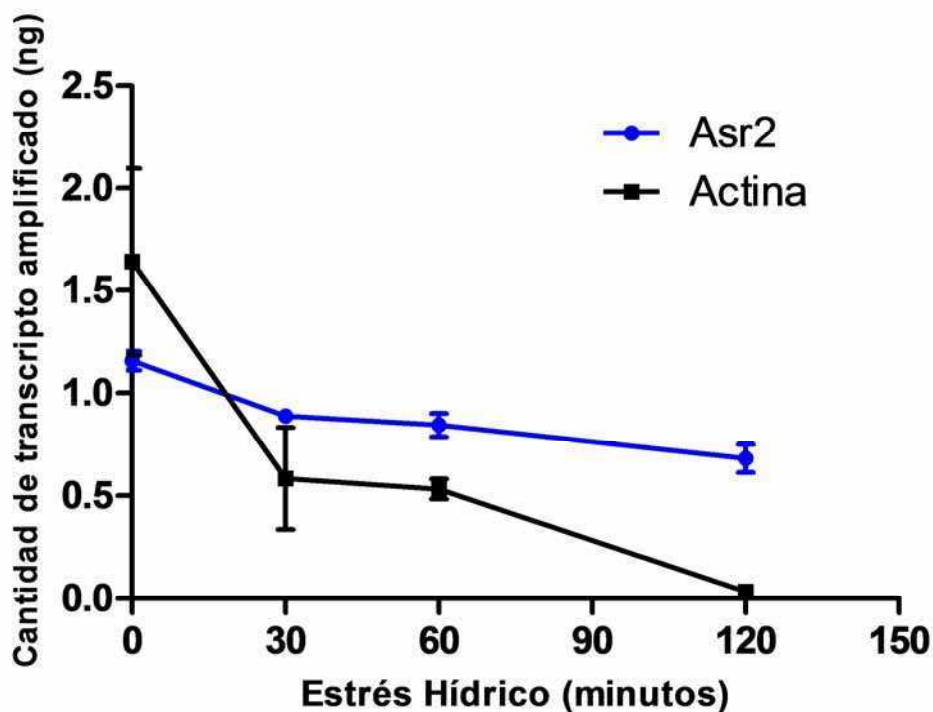


Figura 24. Cantidades de transcritos amplificadas de *Asr2* y *Actina*. Se observa una disminución generalizada de la transcripción, siendo esta más marcada en los genes de expresión constitutiva (*Actina* en este caso) que en *Asr2*.

Por este motivo, para poder discernir si el efecto era como consecuencia de una disminución generalizada de la transcripción, manteniendo la expresión sólo de los genes que confieren tolerancia al estrés; o bien, debido a un aumento de la expresión de *Asr2* concomitante con un marcado nivel de muerte celular; se realizó el ensayo de viabilidad celular que se describe luego, en la correspondiente sección.

VIABILIDAD CELULAR EN RAÍCES

Se determinó la fracción de células vivas en la raíz al cabo de diferentes tiempos de estrés hídrico, mediante tinción con el colorante vital Evans Blue [64]. No se hallaron diferencias significativas al cabo de 30 minutos de estrés, sin embargo, luego de 60 minutos de estrés la fracción de células muertas se incrementó hasta alcanzar un 82%, porcentaje que se mantuvo al cabo de dos

horas de estrés (Figura 25). Por este motivo, se realizaron los ensayos de metilación sobre el ADN a tiempos más cortos (30 minutos) (Figuras 13 y 16) que los empleados primeramente (2 horas).

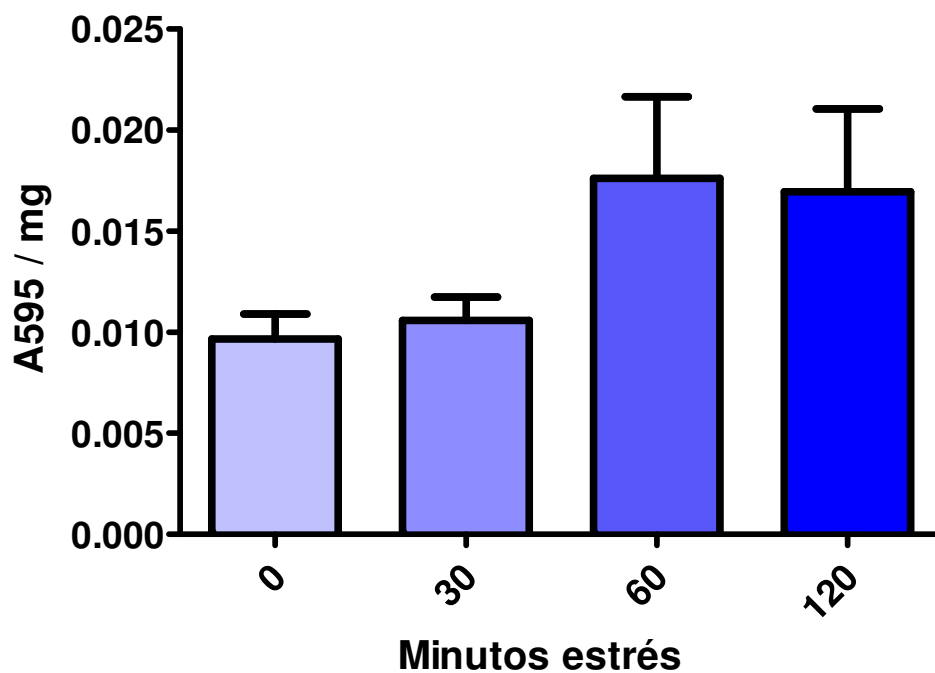


Figura 25. Absorbancia a 595 nm debida al Evans blue a distintos tiempos de estrés. Entre los 30 y los 60 minutos se observa un marcado incremento, del 82%, debido a muerte celular.

DISCUSIÓN

Los resultados de metilación a nivel de citosinas del ADN en el gen *Asr1* en hojas revelaron que es posible hallar metilación en contextos no CG sobre el cuerpo de un gen activo y cuya secuencia no es repetitiva. Esto es una novedad, ya que reportes previos en *Arabidopsis* indican que estos contextos de metilación se hallan asociados a secuencias repetitivas y a transposones [65]. Más aún, la metilación de tipo asimétrica (CNN) mostró variaciones como consecuencia del estrés hídrico. Este resultado podría indicar mecanismos de regulación epigenética diferentes en plantas con genomas de gran tamaño, como el tomate [66]. Por otra parte, el incremento en la metilación de tipo CG en la región codificante de *Asr1*, se condice con los resultados previos en *Arabidopsis* [42] según los cuales existe una extensa metilación de tipo CG sobre el cuerpo de genes de expresión constitutiva y que esto favorece su expresión. Además, el hallazgo de una marca represiva en lisinas de histonas, tal como la trimetilación en la lisina 27 de la histona 3, y su disminución como consecuencia del estrés hídrico, se halla en concordancia con los reportes previos [49]. Estos hallazgos, sumados al notable incremento en la expresión del mensajero de *Asr1*, dejan entrever un probable mecanismo de regulación de la expresión como consecuencia de factores ambientales externos, en este caso el estrés provocado por la privación de agua. Restan por establecer los mecanismos por los cuales esta señal externa se transduce y provoca los cambios a nivel epigenético, tales como los hallados en este trabajo, todos los cuales en conjunto llevarían al aumento de expresión del gen, también reportado aquí. En resumen, el estrés hídrico parece gatillar la metilación de tipo CG y la desmetilación en el contexto asimétrico, concomitantemente con una disminución de la marca represiva en histonas H3K27me3, lo cual llevaría al aumento en los niveles de transcripto observados.

El estudio de la regulación epigenética de *Asr2* en raíces como consecuencia del estrés hídrico, arrojó resultados muy diferentes de los hallados para *Asr1*. Los resultados muestran que la expresión de *Asr2* en raíces no sufre

un gran incremento a nivel de ARN mensajero, cuando la planta sufre la falta de agua (resultados luego de 30 minutos de estrés), lo que podría indicar que probablemente el mecanismo de regulación sea post-transcripcional, ya que previamente se reportó un incremento de la proteína ASR2 [15]. No obstante, el *status* epigenético de este gen, aún en condiciones basales, resultó ser muy diferente del de *Asr1*, ya que el cuerpo del gen sólo mostró metilación en el contexto clásico CG y no en contextos CNG ni CNN. Más aún, pareciera haber cierta preferencia por algunas citosinas en particular, las cuales están mayormente metiladas, mientras que otras no se encuentran metiladas bajo ninguna circunstancia (Figura 16). Por otra parte, la región regulatoria de este gen, presentó elevados niveles de metilación en todos los contextos, siendo esta siempre superior al 80%, con una ligera baja en el nivel de metilación asimétrica (CNN) como consecuencia del estrés, los cuales serían compatibles con un estado reprimido del gen, según lo reportado hasta ahora en plantas. En este punto, es menester aclarar que se trató de analizar la región regulatoria del gen *Asr1* en hojas, no siendo esto posible debido a la complejidad de la técnica, particularmente del diseño de los *primers* para la amplificación del ADN post tratamiento con bisulfito (ver Materiales y Métodos). Un ulterior análisis de esta región podría revelar algún mecanismo de regulación mediante metilación fuera de la región transcribible del gen.

Estos resultados, tomados en su conjunto podrían demostrar que los mecanismos de regulación epigenética son locus y/o tejido específico, ya que el comportamiento de estos genes es muy diferente: mientras uno se encuentra metilado sobre su cuerpo en todos los contextos, el otro sólo lo está en el contexto CG. Para clarificar si estas diferencias son debidas al tejido o a cada gen en particular, un estudio posterior de la regulación epigenética de *Asr1* en raíces y de *Asr2* en hojas, debería ser encarado.

Recientemente se han publicado los primeros datos preliminares del proyecto epigenoma del tomate (<http://ted.bti.cornell.edu/epigenome>) en el cual se determinó el estado de metilación a nivel de cada citosina mediante tratamiento

con bisulfito seguido de secuenciación masiva del genoma (*high-throughput sequencing*). Este proyecto busca establecer las variaciones epigenéticas a lo largo del desarrollo y maduración del fruto. Los datos de metilación publicados en este proyecto permite conocer en particular el estado de metilación de los genes *Asr1* y *Asr2* en frutos en diferentes estadios de desarrollo, siendo ese trabajo junto con el presentado aquí, los únicos reportes de metilación a nivel de nucleótido único realizados sobre los genes de esta familia.

Comparando estos datos con los obtenidos aquí, se puede apreciar que los patrones de metilación de *Asr1* en fruto (figura 26) son muy diferentes a los hallados en hoja. En hojas se halló metilación en todos los contextos superior al 50% tanto en condiciones basales como de estrés (figura 10), mientras que en fruto la metilación se centra en el intrón y la misma no supera el 20%. Esto demuestra que las modificaciones epigenéticas, al menos sobre *Asr1*, son tejido específicas. Es de notar también, que la metilación asimétrica detectada en hojas no presenta correlato en fruto, donde la misma es escasa y limitada al intrón. Por otra parte, de los resultados obtenidos en fruto se observan elevados niveles de metilación río abajo del gen, lo que podría indicar otra forma de regulación de la expresión, no testeada en este trabajo, pero merecedora de ser encarada.

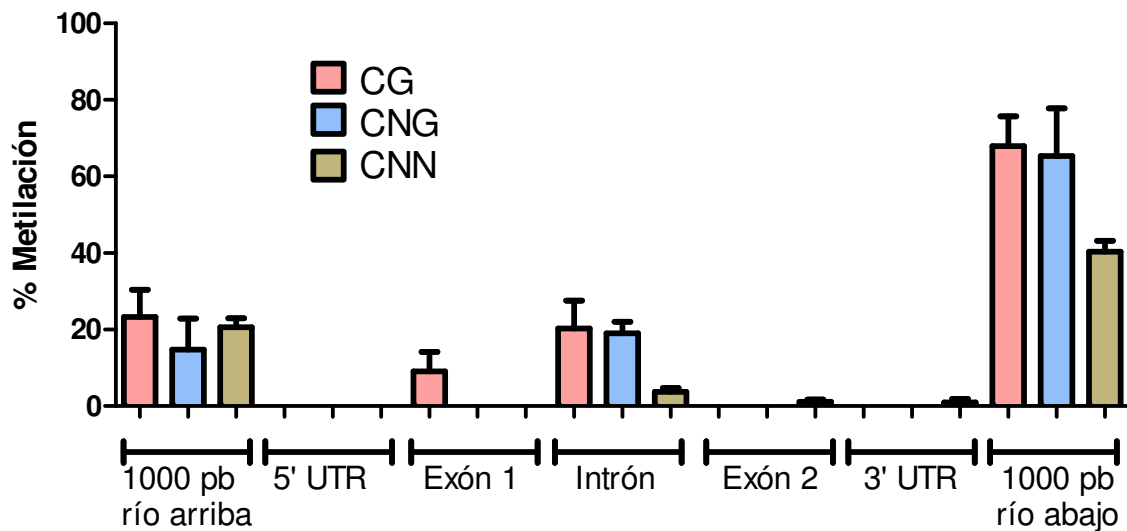


Figura 26. Metilación del locus *Asr1* en diferentes contextos, en frutos de 17 dpa. Se aprecia que los porcentajes más significativos de metilación se hallan río abajo de la región codificante del gen, y en menor medida sobre la región promotora y el intrón.

Con respecto a *Asr2*, en fruto (figura 27) también difiere bastante de lo hallado en raíces (figuras 14 y 17). La principal diferencia la hallamos a nivel de la región promotora, extensamente metilada en hojas, pero poco significativa en raíces, evidenciándose una nueva diferencia tejido específica. No obstante, la presencia de metilación en contexto CG sobre el cuerpo del gen (particularmente sobre el intrón) es un punto de coincidencia entre los dos tejidos, ya que en ambos casos la metilación en la región codificante resultó ser muy pobre, a excepción de este tipo de metilación. En ambos casos, las pocas citosinas en este contexto que se hallan sobre el cuerpo del gen tienden a encontrarse metiladas, aún en condiciones de estrés. Esto podría tratarse de una marca constitutiva en el gen *Asr2*, o bien, una indicación de que este gen podría tener algún patrón de expresión común a ambos tejidos. Finalmente, también en este gen se detectaron altos niveles de metilación tanto en la región 3' UTR como río abajo de la misma, reforzando la idea de un posible sitio de regulación epigenética río abajo del gen.

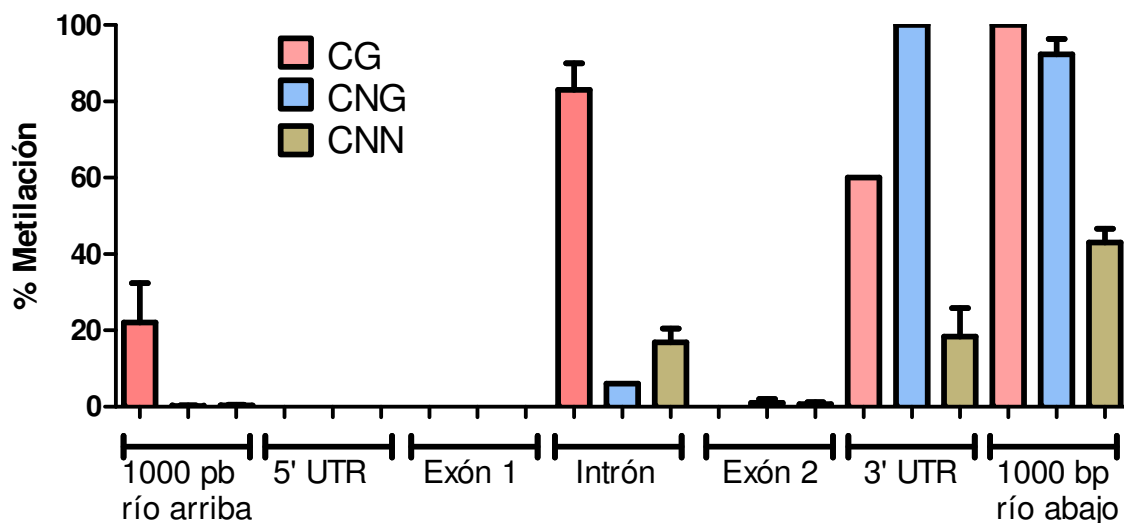


Figura 27. Metilación del locus *Asr2* en diferentes contextos, en frutos de 17 dpa. Se aprecia que los porcentajes más significativos de metilación se hallan sobre la región 3' no traducible y río abajo de la región codificante del gen. Sobre el cuerpo del gen, la metilación se halla restringida al contexto CG y limitada al intrón.

La observación de que todos los genes de expresión constitutiva disminuían notablemente su expresión como consecuencia del estrés hídrico, pero no *Asr2*, nos llevó a preguntarnos si esto podría deberse a que las células bajo estrés reprimen la transcripción de manera general, manteniendo sólo la de aquellos genes que le permiten adaptarse a la situación de estrés; o bien, si *Asr2* aumenta su transcripción, pero esta es enmascarada por un alto nivel de mortalidad celular. El ensayo de tinción vital con Evans Blue reveló que la mortalidad celular se elevó el 82% luego de 60 minutos de estrés, lo cual deja abierta la posibilidad de la segunda alternativa, que implicaría que existe una regulación transcripcional de *Asr2*, que tal vez ocurre en la naturaleza a lo largo de tiempos más largos en que la planta va estresándose. La metodología encarada en este estudio, donde el estrés hídrico es abrupto, produce una masiva muerte celular que difícilmente ocurra en la naturaleza, lo cual enmascara e impide interpretar correctamente los mecanismos de regulación epigenética subyacentes.

El hallazgo de metilación en citosinas en contextos asimétricos (CNN) y su probable papel como regulador del nivel de transcripción en estos genes, llevan a preguntarse por el papel de la maquinaria de metilación en este contexto, la metiltransferasa DRM2 [45]. Muy pocos estudios se han realizado al respecto [67], y en todos los casos se han realizado mediante el análisis de mutantes, restando aún realizar una caracterización de estas proteínas a nivel bioquímico y estructural. Al mismo tiempo, se ha reportado que este tipo de metilación se halla en estrecha correlación con la presencia de pequeños ARN de interferencia (siRNA) [68], lo cual abre la puerta al estudio de las vías por las cuales se gatilla este tipo de metilación y la relevancia de todos los posibles actores intermedios.

Este trabajo abre las puertas a seguir investigando en dos líneas: la primera de ellas tendiente a dilucidar los mecanismos de la reversibilidad de este proceso, tanto a nivel de reversión del estatus epigenético como de los probables mecanismos inherentes a la desmetilación del ADN; mientras que la segunda hace hincapié en la posibilidad de que estas modificaciones epigenéticas puedan ser heredadas transgeneracionalmente, dando mayor posibilidad de adaptación a ambientes hostiles a las futuras generaciones.

Respecto de la primera línea, cabría realizar estudios en plantas que, luego de haber sido sometidas a diferentes tiempos de estrés, son vueltas a colocar en un medio donde no haya escasez de agua. El objetivo de estos ensayos sería determinar si las modificaciones epigenéticas descritas luego del tratamiento con estrés son reversibles a las presentes en condiciones basales.

Otro aspecto a tener en cuenta es que en este trabajo se describe un fenómeno de desmetilación, siendo más notorio en este caso sobre un contexto de metilación asimétrica. Esto abre el interrogante acerca de los mecanismos subyacentes a este fenómeno, bastante poco conocidos en plantas. En los últimos años se han descrito los mecanismos subyacentes a la desmetilación de citosinas del ADN en mamíferos, en los cuales dicho proceso ocurre mediante los mecanismos habituales de reparación del daño en ADN, en el cual la base

nitrogenada es escindida por completo [69]. Este proceso, llevado a cabo por la enzima *Thymine DNA Glycosylase* (TDG) implica la formación de varios compuestos intermediarios, tales como la 5-hidroximetilcitosina, la 5-formilcitosina, la 5-carboxilcitosina y el 5-hidroximetiluracilo [70], [71]. Si bien la mayoría de estos compuestos se producen en baja proporción, o bien tienen una vida media muy corta [70], la 5-hidroximetilcitosina se ha detectado en cantidades significativas. Esta modificación epigenética es indistinguible de la 5-metilcitosina mediante la metodología del bisulfito [72], por lo cual no es posible determinar si las metilaciones detectadas son tales, o bien 5-hidroximetilcitosinas. Para poder distinguir entre estos dos escenarios, se podría estudiar la presencia de 5-hidroximetilcitosinas mediante anticuerpos específicos (disponibles comercialmente) siguiendo la metodología de inmunoprecipitación de la cromatina descrita en este trabajo. Recientemente se ha presentado una nueva tecnología de secuenciación sobre molécula única, en tiempo real (SMRT), la cual no requiere de la modificación con bisulfito y permite distinguir a nivel de un nucleótido las distintas variantes epigenéticas [73].

El conocimiento del mecanismo de desmetilación de citosinas en plantas es aún mucho menor. En *Arabidopsis*, se han caracterizado las ADN glicosilasas responsables de escindir el nucleótido citosina modificado. Pertenecientes a la familia *DEMETETER* (*DME*), se han descrito y caracterizado cuatro miembros: *DME*, *DML2*, *DML3* y *ROS1*, todas éstas necesarias en procesos vitales tales como el *imprinting* [74], [75]. En la misma dirección se ha realizado un trabajo en arroz que muestra la importancia de las glicosilasas de ADN en la desmetilación y transposición de elementos móviles [76]. Recientemente se ha descubierto un vínculo entre desmetilación en el ADN y modificaciones en las histonas adyacentes, donde una acetilasa de histonas facilita el acceso al ADN de las enzimas necesarias para la desmetilación [77]. También se ha logrado determinar la presencia de 5-hidroximetilcitosina en hojas y flores de *Arabidopsis* [78], no obstante los mecanismos, intermediarios y enzimas intervinientes en el proceso de desmetilación no han sido develados aún.

Por todos los motivos expuestos, sería necesario encarar estudios tendientes a poder distinguir entre todas las diferentes modificaciones epigenéticas que se pueden encontrar en citosinas del ADN, ya que estudios realizados mediante la metodología del bisulfito como el que se presenta en este trabajo no permiten realizar esta distinción. Por otra parte, dichos estudios podrían echar luz sobre los mecanismos subyacentes al proceso de desmetilación del ADN en plantas.

Un último aspecto a destacar es la posibilidad de que las modificaciones epigenéticas descritas en este trabajo puedan ser transmitidas a la línea germinal y ser heredadas transgeneracionalmente, otorgando de esta forma un nivel de tolerancia al estrés mayor a las plantas hijas. Esta posibilidad es más probable en plantas, ya que en las mismas, las células germinales se producen tardíamente por diferenciación terminal de células somáticas [79]. Para que esto ocurra, las marcas epigenéticas deben mantenerse no sólo durante la meiosis, sino también durante las mitosis haploides postmeióticas, la diferenciación del gametofito, la fertilización y la embriogénesis [40]. Se ha encontrado herencia transgeneracional de marcas epigenéticas que se han mantenido hasta por ocho generaciones, correlacionando estos epialelos con la herencia de caracteres morfológicos tales como tiempo de floración y peso de la planta [80]. También se halló que cambios epigenéticos tales como acetilación de histonas, mediados por factores ambientales tales como temperatura y radiación UV, pueden ser transmitidos de una generación a otra, aunque limitados a un pequeño número de células y sólo hasta dos generaciones como máximo. Además se comprobó que si las semillas envejecen antes de germinar, dichas modificaciones se pierden [81].

El estudio de la herencia transgeneracional de modificaciones epigenéticas ha planteado la posibilidad de que dichas marcas sean importantes evolutiva y ecológicamente. Aún no está claro si los cambios epigenéticos inducidos por el ambiente son el reflejo de una aclimatación temporaria a nuevas condiciones ambientales o si puede tener consecuencias evolutivas [79]. Se ha postulado que la adaptación al medio puede estar mediada por diferentes epialelos y no sólo

mediante variación a nivel genético [82]. No obstante, poder discernir entre ambos factores no es sencillo. Las modificaciones epigenéticas traen aparejados cambios a nivel genético: la tasa de mutación de la 5-metilcitosina (su conversión a timina) es mayor que la de la citosina no metilada; la variación de las marcas epigenéticas sobre elementos transponibles, lleva a su movimiento con la consecuente alteración del nuevo entorno en el cual se insertan y, finalmente, las modificaciones en histonas que llevan a una descompactación de la cromatina, facilitan el acceso al ADN de agentes mutagénicos y a los sistemas de recombinación y reparación del mismo [83]. No obstante esto, varios trabajos se han realizado sobre poblaciones naturales tendientes a buscar una correlación entre los diferentes estados de metilación tanto en ADN como en histonas, con diferentes caracteres morfológicos y/o condiciones ambientales que deben afrontar las plantas [82], [84]. Uno de estos estudios fue realizado en la Argentina sobre una especie de solanácea endémica de la región de Cuyo, *Solanum ruiz-lealii*, la cual mostró una importante correlación entre los patrones de metilación en citosinas y un fenotipo de floración anormal [85].

Por todo lo expuesto, sería de gran importancia el estudio de la probable herencia transgeneracional en tomate, comprobando las marcas epigenéticas estudiadas en este trabajo sobre la descendencia de plantas sometidas a condiciones de estrés. Esto permitiría determinar si las plantas hijas están mejor adaptadas al ambiente en el que han debido desarrollarse sus progenitores; así como también, en caso de que las condiciones ambientales vuelvan a ser favorables, si las mismas son capaces de borrar dicha información epigenética preestablecida.

CONCLUSIONES

SOBRE EXPERIMENTOS REALIZADOS EN HOJAS.

- Se hallaron importantes niveles de metilación tanto en contexto CG como CNG a lo largo del genoma, mediante el empleo de enzimas de restricción con diferente sensibilidad a la metilación.
- Se halló metilación en citosinas del ADN en todos los contextos sobre la región transcribible de *Asr1*. La distribución de estos sitios de metilación reveló la presencia de diferentes epialelos, tanto en condiciones basales como de estrés.
- Se observó un importante nivel de metilación en contextos no clásicos, tales como CNG y CNN, los cuales fueron concomitantes con una pobre expresión del gen *Asr1* en condiciones basales.
- Se observó un incremento de la metilación en contexto CG en *Asr1* cuando las plantas fueron sometidas a estrés hídrico, particularmente en el exón 1.
- Se observó una disminución marcada de la metilación asimétrica (CNN) en todas las regiones del gen *Asr1* analizadas (exón 1, intrón y exón 2) bajo condiciones de estrés hídrico.
- Se detectó la presencia de la marca represiva en histonas H3K27me3 asociada a la región codificante de *Asr1*, la cual disminuyó cuando se sometió a la planta a condiciones de estrés hídrico.
- No se halló ninguna de las marcas en lisinas de histonas sobre el gen de actina.
- Los últimos 3 ítems resultaron concomitantes con un marcado aumento del nivel de expresión de *Asr1*, el cual aumentó unas 7 veces, al cabo de dos horas de estrés hídrico y 36 veces al cabo de 6 horas.

SOBRE EXPERIMENTOS REALIZADOS EN RAÍCES

- Se hallaron elevados niveles de metilación en todos los contextos sobre la región regulatoria del gen *Asr2* en condiciones basales.
- La metilación en contexto asimétrico CNN sobre la región regulatoria de *Asr2*, disminuyó al someter a las plantas a estrés hídrico. Los contextos simétricos de metilación (CG y CNG) se mantuvieron sin variación.
- Se halló un moderado nivel de metilación en contexto CG sobre el cuerpo del gen *Asr2* en condiciones basales. Esta metilación resultó específica de ciertas citosinas puntuales, mientras que otras se hallaban siempre desmetiladas. No se halló metilación en los contextos CNG ni CNN.
- El status de metilación sobre el cuerpo del gen *Asr2* no varió como consecuencia del estrés hídrico impuesto.
- No se halló asociación del cuerpo del gen *Asr2* con las marcas en histona H3K4me3 (activadora) ni H3K27me3 (represiva).
- Se halló la marca represiva H3K27me3 sobre la región distal de la región regulatoria de *Asr2* (-800 pb aproximadamente). La misma no mostró variaciones como consecuencia del estrés.
- No se halló ninguna de las marcas en lisinas de histonas sobre el gen de *actina*.
- Se detectaron ambas marcas de metilación sobre el elemento transponible ToRTL1 en condiciones basales. Ambas marcas se perdieron como consecuencia del estrés hídrico de 30 minutos impuesto a las plantas.
- Se detectó una marcada disminución en la expresión de genes de expresión constitutiva, concomitante con el estrés hídrico impuesto a las plantas.

- En comparación con los genes de expresión constitutiva, la expresión de *Asr2* se mantuvo prácticamente constante, con una ligera tendencia a la baja.
- Se detectaron altos niveles de mortalidad celular, al cabo de 60 minutos de estrés por falta de agua.

BIBLIOGRAFÍA

1. Marris, E., *Water: more crop per drop*. Nature, 2008. **452**(7185): p. 273-7.
2. Eckardt, N.A., et al., *The future of science: food and water for life*. Plant Cell, 2009. **21**(2): p. 368-72.
3. Caramelo, J.J. and N.D. Iusem, *When cells lose water: Lessons from biophysics and molecular biology*. Prog Biophys Mol Biol, 2009. **99**(1): p. 1-6.
4. Peralta I.E. and D.M. Spooner, *Classification of wild tomatoes: a review*. Kurtziana, 2000. **28**(1): p. 9.
5. Bai, Y. and P. Lindhout, *Domestication and breeding of tomatoes: what have we gained and what can we gain in the future?* Ann Bot, 2007. **100**(5): p. 1085-94.
6. Tomato Genome Consortium, *The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution*. Nature, 2012. **485**(7400): p. 635-41.
7. Peralta I.E. and D.M. Spooner, *History, Origin and Early Cultivation of Tomato (Solanaceae)*, in *Genetic Improvement of Solanaceous Crops*, Razdan, M.K. and A.K. Matoo, Editors. 2007, Science Publishers: Enfield, USA. p. 27.
8. Cakir, B., et al., *A grape ASR protein involved in sugar and abscisic acid signaling*. Plant Cell, 2003. **15**(9): p. 2165-80.
9. Frankel, N., et al., *ci21A/Asr1 expression influences glucose accumulation in potato tubers*. Plant Mol Biol, 2007. **63**(5): p. 719-730.
10. Liu, H.Y., et al., *Characterization of a novel plantain Asr gene, MpAsr, that is regulated in response to infection of Fusarium oxysporum f. sp. cubense and abiotic stresses*. J Integr Plant Biol, 2010. **52**(3): p. 315-23.
11. Philippe, R., et al., *Structure, allelic diversity and selection of Asr genes, candidate for drought tolerance, in Oryza sativa L. and wild relatives*. Theor Appl Genet, 2010. **121**(4): p. 769-87.

12. Chen, J.Y., et al., *Molecular characterization of a strawberry FaASR gene in relation to fruit ripening*. PLoS One, 2011. **6**(9): p. e24649.
13. Virilouvet, L., et al., *The ZmASR1 protein influences branched-chain amino acid biosynthesis and maintains kernel yield in maize under water-limited conditions*. Plant Physiol, 2011. **157**(2): p. 917-36.
14. Frankel, N., et al., *Evolutionary history of the Asr gene family*. Gene, 2006. **378**: p. 74-83.
15. Maskin, L., et al., *Differential expression of the members of the Asr gene family in tomato (*Lycopersicon esculentum*)*. Plant Science, 2001. **161**(4): p. 739-746.
16. Konrad, Z. and D. Bar-Zvi, *Synergism between the chaperone-like activity of the stress regulated ASR1 protein and the osmolyte glycine-betaine*. Planta, 2008. **227**(6): p. 1213-9.
17. Maskin, L., et al., *Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss*. Biochem Biophys Res Commun, 2007. **352**(4): p. 831-5.
18. Bermúdez Moretti, M., et al., *ASR1, a stress-induced tomato protein, protects yeast from osmotic stress*. Physiol Plant, 2006. **127**(1): p. 111-118.
19. Iusem, N.D., et al., *Tomato (*Lycopersicon esculentum*) transcript induced by water deficit and ripening*. Plant Physiol, 1993. **102**(4): p. 1353-4.
20. Amitai-Zeigerson, H., P.A. Scolnik, and D. Bar-Zvi, *Tomato Asr1 mRNA and protein are transiently expressed following salt stress, osmotic stress and treatment with abscisic acid*. Plant Science, 1995. **110**(2): p. 205-213.
21. Rossi, M. and N.D. Iusem, *Tomato (*Lycopersicon esculentum*) genomic clone homologous to a gene encoding an abscisic acid-induced protein*. Plant Physiol, 1994. **104**(3): p. 1073-4.
22. Rossi, M. and N.D. Iusem, *Sequence of Asr2, a member of a gene family from *Lycopersicon esculentum* encoding chromosomal proteins: homology to an intron of the polygalacturonase gene*. DNA Seq, 1995. **5**(4): p. 225-7.

23. Rossi, M., et al., *Analysis of an abscisic acid (ABA)-responsive gene promoter belonging to the Asr gene family from tomato in homologous and heterologous systems*. Mol Gen Genet, 1998. **258**(1-2): p. 1-8.
24. Rossi, M., et al., *Asr genes belong to a gene family comprising at least three closely linked loci on chromosome 4 in tomato*. Mol Gen Genet, 1996. **252**(4): p. 489-92.
25. Maskin, L., S. Maldonado, and N.D. Iusem, *Tomato leaf spatial expression of stress-induced Asr genes*. Mol Biol Rep, 2008. **35**(4): p. 501-5.
26. Kalifa, Y., et al., *The water- and salt-stress-regulated Asr1 (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein*. Biochem J, 2004. **381**(Pt 2): p. 373-8.
27. Goldgur, Y., et al., *Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening 1, a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state*. Plant Physiol, 2007. **143**(2): p. 617-28.
28. Ricardi, M.M., et al., *Nuclear Import and Dimerization of Tomato ASR1, a Water Stress-Inducible Protein Exclusive to Plants*. PLoS One, 2012. **7**(8): p. e41008.
29. Urtasun, N., et al., *Predominantly Cytoplasmic Localization in Yeast of ASR1, a Non-Receptor Transcription Factor from Plants*. Open Biochem J, 2010. **4**: p. 68-71.
30. Shkolnik, D. and D. Bar-Zvi, *Tomato ASR1 abrogates the response to abscisic acid and glucose in Arabidopsis by competing with ABI4 for DNA binding*. Plant Biotechnol J, 2008. **6**(4): p. 368-78.
31. Frankel, N., et al., *Adaptive evolution of the water stress-induced gene Asr2 in Lycopersicon species dwelling in arid habitats*. Mol Biol Evol, 2003. **20**(12): p. 1955-62.
32. Giombini, M.I., et al., *Nucleotide polymorphism in the drought responsive gene Asr2 in wild populations of tomato*. Genetica, 2009. **136**(1): p. 13-25.
33. Fischer, I., et al., *Adaptation to drought in two wild tomato species: the evolution of the Asr gene family*. New Phytol, 2011. **190**(4): p. 1032-44.

34. Battaglia, M., et al., *The enigmatic LEA proteins and other hydrophilins*. Plant Physiol, 2008. **148**(1): p. 6-24.
35. Henderson, I.R. and S.E. Jacobsen, *Epigenetic inheritance in plants*. Nature, 2007. **447**(7143): p. 418-24.
36. Reinders, J. and J. Paszkowski, *Unlocking the Arabidopsis epigenome*. Epigenetics, 2009. **4**(8): p. 557-63.
37. Zhang, M., et al., *DNA cytosine methylation in plant development*. J Genet Genomics, 2010. **37**(1): p. 1-12.
38. Akimoto, K., et al., *Epigenetic inheritance in rice plants*. Ann Bot, 2007. **100**(2): p. 205-17.
39. Wang, X., et al., *Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize*. Plant Cell, 2009. **21**(4): p. 1053-69.
40. Takeda, S. and J. Paszkowski, *DNA methylation and epigenetic inheritance during plant gametogenesis*. Chromosoma, 2006. **115**(1): p. 27-35.
41. Tran, R.K., et al., *DNA methylation profiling identifies CG methylation clusters in Arabidopsis genes*. Curr Biol, 2005. **15**(2): p. 154-9.
42. Zhang, X., et al., *Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in arabidopsis*. Cell, 2006. **126**(6): p. 1189-201.
43. Finnegan, E.J., W.J. Peacock, and E.S. Dennis, *Reduced DNA methylation in Arabidopsis thaliana results in abnormal plant development*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1996. **93**(16): p. 8449-54.
44. Meyer, P., *DNA methylation systems and targets in plants*. FEBS Lett, 2011. **585**(13): p. 2008-15.
45. Cao, X. and S.E. Jacobsen, *Role of the arabidopsis DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing*. Curr Biol, 2002. **12**(13): p. 1138-44.
46. Zhang, X., *The epigenetic landscape of plants*. Science, 2008. **320**(5875): p. 489-92.
47. Lauria, M. and V. Rossi, *Epigenetic control of gene regulation in plants*. Biochim Biophys Acta, 2011. **1809**(8): p. 369-78.

48. Kouzarides, T., *Chromatin modifications and their function*. Cell, 2007. **128**(4): p. 693-705.
49. Feng, S. and S.E. Jacobsen, *Epigenetic modifications in plants: an evolutionary perspective*. Curr Opin Plant Biol, 2011. **14**(2): p. 179-86.
50. Mathieu, O., A.V. Probst, and J. Paszkowski, *Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in Arabidopsis*. EMBO J, 2005. **24**(15): p. 2783-91.
51. Ricardi, M.M., R.M. Gonzalez, and N.D. Iusem, *Protocol: fine-tuning of a Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) protocol in tomato*. Plant Methods, 2010. **6**: p. 11.
52. Frommer, M., et al., *A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1992. **89**(5): p. 1827-31.
53. Hayatsu, H., *The bisulfite genomic sequencing used in the analysis of epigenetic states, a technique in the emerging environmental genotoxicology research*. Mutat Res, 2008. **659**(1-2): p. 77-82.
54. Tanaka, K. and A. Okamoto, *Degradation of DNA by bisulfite treatment*. Bioorg Med Chem Lett, 2007. **17**(7): p. 1912-5.
55. Grunau, C., S.J. Clark, and A. Rosenthal, *Bisulfite genomic sequencing: systematic investigation of critical experimental parameters*. Nucleic Acids Res, 2001. **29**(13): p. E65-5.
56. Wojdacz, T.K., L.L. Hansen, and A. Dobrovic, *A new approach to primer design for the control of PCR bias in methylation studies*. BMC Res Notes, 2008. **1**: p. 54.
57. Peralta, I.E. and D.M. Spooner, *Granule-bound starch synthase (GBSSI) gene phylogeny of wild tomatoes (Solanum L. section Lycopersicon [Mill.] Wettst. subsection Lycopersicon)*. Am J Bot, 2001. **88**(10): p. 1888-902.
58. Khan S., et al., *Protocol for isolation of genomic DNA from dry and fresh roots of medicinal plants suitable for RAPD and restriction digestion* African Journal of Biotechnology, 2007. **6**(3): p. 175-178.

59. Clark, S.J., et al., *DNA methylation: bisulphite modification and analysis*. Nat Protoc, 2006. **1**(5): p. 2353-64.
60. Gruntman, E., et al., *Kismeth: analyzer of plant methylation states through bisulfite sequencing*. BMC Bioinformatics, 2008. **9**: p. 371.
61. Rozen, S. and H. Skaletsky, *Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers*. Methods Mol Biol, 2000. **132**: p. 365-86.
62. Takamiya, T., et al., *Restriction landmark genome scanning method using isoschizomers (MspI/HpaII) for DNA methylation analysis*. Electrophoresis, 2006. **27**(14): p. 2846-56.
63. Livak, K.J. and T.D. Schmittgen, *Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method*. Methods, 2001. **25**(4): p. 402-8.
64. Tamas, L., et al., *Aluminium-induced drought and oxidative stress in barley roots*. J Plant Physiol, 2006. **163**(7): p. 781-4.
65. Henderson, I.R. and S.E. Jacobsen, *Tandem repeats upstream of the Arabidopsis endogene SDC recruit non-CG DNA methylation and initiate siRNA spreading*. Genes Dev, 2008. **22**(12): p. 1597-606.
66. Gonzalez, R.M., M.M. Ricardi, and N.D. Iusem, *Atypical epigenetic mark in an atypical location: cytosine methylation at asymmetric (CNN) sites within the body of a non-repetitive tomato gene*. BMC Plant Biol, 2011. **11**(1): p. 94.
67. Greenberg, M.V., et al., *Identification of genes required for de novo DNA methylation in Arabidopsis*. Epigenetics, 2011. **6**(3): p. 344-54.
68. Andika, I.B., et al., *Lower levels of transgene silencing in roots is associated with reduced DNA methylation levels at non-symmetrical sites but not at symmetrical sites*. Plant Mol Biol, 2006. **60**(3): p. 423-35.
69. Cortellino, S., et al., *Thymine DNA glycosylase is essential for active DNA demethylation by linked deamination-base excision repair*. Cell, 2011. **146**(1): p. 67-79.
70. Hashimoto, H., et al., *Excision of 5-hydroxymethyluracil and 5-carboxylcytosine by the thymine DNA glycosylase domain: its structural*

- basis and implications for active DNA demethylation. Nucleic Acids Res*, 2012.
71. Tsukada, Y.-i., *Hydroxylation mediates chromatin demethylation. J Biochem*, 2012. **151**(3): p. 229-246.
 72. Gupta, R., A. Nagarajan, and N. Wajapeyee, *Advances in genome-wide DNA methylation analysis. Biotechniques*, 2010. **49**(4): p. iii-xi.
 73. Flusberg, B.A., et al., *Direct detection of DNA methylation during single-molecule, real-time sequencing. Nat Methods*, 2010. **7**(6): p. 461-5.
 74. Penterman, J., R. Uzawa, and R.L. Fischer, *Genetic interactions between DNA demethylation and methylation in Arabidopsis. Plant Physiol*, 2007. **145**(4): p. 1549-57.
 75. Penterman, J., et al., *DNA demethylation in the Arabidopsis genome. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(16): p. 6752-7.
 76. La, H., et al., *A 5-methylcytosine DNA glycosylase/lyase demethylates the retrotransposon Tos17 and promotes its transposition in rice. Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011. **108**(37): p. 15498-503.
 77. Qian, W., et al., *A histone acetyltransferase regulates active DNA demethylation in Arabidopsis. Science*, 2012. **336**(6087): p. 1445-8.
 78. Yao, Q., et al., *Heterologous expression and purification of Arabidopsis thaliana VIM1 protein: in vitro evidence for its inability to recognize hydroxymethylcytosine, a rare base in Arabidopsis DNA. Protein Expr Purif*, 2012. **83**(1): p. 104-11.
 79. Saze, H., *Transgenerational inheritance of induced changes in the epigenetic state of chromatin in plants. Genes Genet Syst*, 2012. **87**(3): p. 145-52.
 80. Johannes, F., et al., *Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. PLoS Genet*, 2009. **5**(6): p. e1000530.
 81. Lang-Mladek, C., et al., *Transgenerational inheritance and resetting of stress-induced loss of epigenetic gene silencing in Arabidopsis. Mol Plant*, 2010. **3**(3): p. 594-602.

82. Richards, E.J., *Natural epigenetic variation in plant species: a view from the field*. *Curr Opin Plant Biol*, 2011. **14**(2): p. 204-9.
83. Hauser, M.T., et al., *Transgenerational epigenetic inheritance in plants*. *Biochim Biophys Acta*, 2011. **1809**(8): p. 459-68.
84. Hunter, B., J.D. Hollister, and K. Bomblies, *Epigenetic inheritance: what news for evolution?* *Curr Biol*, 2012. **22**(2): p. R54-6.
85. Marfil, C.F., E.L. Camadro, and R.W. Masuelli, *Phenotypic instability and epigenetic variability in a diploid potato of hybrid origin, Solanum ruiz-lealii*. *BMC Plant Biol*, 2009. **9**: p. 21.

APÉNDICE

Soluciones empleadas en las diferentes metodologías desarrolladas durante este trabajo.

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE HOJAS

Buffer de Extracción:

Tris-HCl (pH=8) 50 mM
EDTA 20 mM
CTAB 10%
NaCl 100 mM
 β -Mercaptoetanol 1,5 mM

EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE RAÍCES

Buffer de Extracción:

Tris-HCl (pH=8) 100 mM
EDTA (pH=8) 25 mM
CTAB 3%
NaCl 2 M
PVP 5%
 β -Mercaptoetanol 4%

Buffer TE:

Tris-HCl (pH=8) 10 mM
EDTA (pH=8) 1 mM

SUBCLONADO Y SECUENCIACIÓN

Medio LB:

Tripteína Bacteriológica 10 g/l
Extracto de Levadura 5 g/l

NaCl 10 g/l

Medio LB Agar:

Tripteína Bacteriológica 10 g/l

Extracto de Levadura 5 g/l

NaCl 10 g/l

Agar-Agar 7g/l

Medio SOB:

Tripteína Bacteriológica 20 g/l

Extracto de Levadura 5 g/l

NaCl 0,5 g/l

MgCl₂ 10 mM

INMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA

Buffer de Extracción 1:

Sacarosa 0,44 M

Tris-HCl (pH=8,0) 10 mM

β-Mercaptoetanol 5 mM*

PMSF 0,1 mM*

*Estos componentes deben agregarse al momento de utilizar la solución.

Buffer de Extracción 2:

Sacarosa 0,25 M

Tris-HCl (pH=8,0) 10 mM

MgCl₂ 10 mM

Tritón X-100 1%*

β-Mercaptoetanol 5 mM*

PMSF 0,1 mM*

Inhibidores de proteasas SIN EDTA*

*Estos componentes deben agregarse al momento de utilizar la solución.

Buffer 95% Percoll

Sacarosa 0,25 M
Tris-HCl (pH=8,0) 10 mM
MgCl₂ 10 mM
Percoll 95%
Tritón X-100 1%*
β-Mercaptoetanol 5 mM*
PMSF 200 μM*
Inhibidores de proteasas SIN EDTA*

*Estos componentes deben agregarse al momento de utilizar la solución.

Buffer de Lisis Nuclear

Tris-HCl (pH=8,0) 50 mM
EDTA 10 mM
SDS 1%
PMSF 0,1 mM*
Inhibidores de proteasas CON EDTA*

*Estos componentes deben agregarse al momento de utilizar la solución.

Buffer de Dilución de ChIP

Tris-HCl (pH=8,0) 16,7 mM
Tritón X-100 1,1%
EDTA 1,2 mM
NaCl 100 mM

Buffer de Resuspensión Nuclear

Glicerol 20%
Tris-HCl (pH=8,0) 50 mM

MgCl₂ 5 mM

β-Mercaptoetanol 5 mM*

PMSF 0,1 mM*

Inhibidores de proteasas CON EDTA*

*Estos componentes deben agregarse al momento de utilizar la solución.

Buffer de Elución

SDS 1%

NaHCO₃ 0,1 M

Buffer Baja Sal

Tris-HCl (pH 8,0) 20 mM

NaCl 150 mM

SDS 0,1%

Tritón X-100 1%

EDTA 2 mM

PMSF 0,1 mM*

*Estos componentes deben agregarse al momento de utilizar la solución.

Buffer Alta Sal

Tris-HCl (pH=8,0) 20 mM

NaCl 500 mM

SDS 0,1%

Tritón X-100 1%

EDTA 2 mM

PMSF 0,1 mM*

*Estos componentes deben agregarse al momento de utilizar la solución.

Buffer LiCl

Tris-HCl (pH=8,0) 10 mM

LiCl 0,25 M

NP-40 1%

Deoxicolato de sodio 1%

EDTA 1 mM

PMSF 0,1 mM*

*Estos componentes deben agregarse al momento de utilizar la solución.