



**Universidad Autónoma de Querétaro**

**Facultad de Ingeniería**

**Epigenética de la tolerancia a estrés  
en respuesta a peróxido de hidrógeno  
(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en *Nicotiana tabacum* L.**

**Tesis**

**Doctorado en Ingeniería de Biosistemas**

**M.C. Ana Laura Villagómez Aranda**

**Querétaro, Qro. Noviembre de 2022.**



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería

**Epigenética de la tolerancia a estrés  
en respuesta a peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en  
*Nicotiana tabacum L.***

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Doctor en Ingeniería de Biosistemas

Presenta

**M.C. Ana Laura Villagómez Aranda**

Dirigido por

**Dr. Ramón Gerardo Guevara González**

Querétaro, Qro. Noviembre de 2022.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



Epigenética de la tolerancia a estrés en respuesta a  
peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en *Nicotiana tabacum*  
L.

**por**

Ana Laura Villagómez Aranda

se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0  
Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/).

**Clave RI:** IGDCC-152706



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Doctorado en Ingeniería de Biosistemas

**Epigenética de la tolerancia a estrés  
en respuesta a peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) en  
*Nicotiana tabacum L.***

**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Doctor en Ingeniería de Biosistemas

Presenta

**M.C. Ana Laura Villagómez Aranda**

Dirigido por

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Dr. Ramón Gerardo Guevara González

Presidente

---

Dr. Enrique Rico García

Secretario

---

Dr. Irineo Torres Pacheco

Vocal

---

Dra. Ana Angélica Feregrino Pérez

Suplente

---

Dr. Luis Fernando García Ortega

Suplente

---

---

Dr. Manuel Toledano Ayala  
Director de la Facultad de Ingeniería

---

Dra. Ma. G. Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario, Querétaro, Qro.  
Noviembre de 2022. .

## RESUMEN

El sistema agrícola requiere de un cambio para satisfacer las crecientes demandas de productos y afrontar los actuales retos. Un aspecto clave a resolver es el desarrollo de cultivos resilientes. Recientemente se han considerado estrategias con un enfoque epigenético, donde la generación de memoria de estrés tiene un gran potencial al potenciar las capacidades innatas de defensa la planta para resistir eventos de estrés. Una forma de inducir esta memoria es por el tratamiento con compuestos señalizadores de estrés, como es el caso del peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  es un segundo mensajero implicado en diversas funciones de la planta, entre ellos las respuestas a estrés. Además, el  $H_2O_2$  aplicado de forma exógena a las plantas estimula tolerancia a un amplio espectro de estreses. En el presente trabajo se estudió el efecto del  $H_2O_2$  a nivel epigenético, en específico en la metilación de DNA y en la inducción de respuesta de tolerancia a estrés hídrico. Para ello se utilizaron dos modelos experimentales: 1) Línea de tabaco transgénico con sobreproducción endógena de  $H_2O_2$ , el cual ha sido estudiado a diversos niveles ómicos; y 2) Tabaco silvestre elicitado exógenamente con  $H_2O_2$  para ver efecto en respuesta a estrés hídrico e inducción de memoria transgeneracional. Para analizar los patrones de metilación de DNA se utilizó secuenciación de genoma completo por bisulfito (WGBS). En el modelo transgénico se identificaron sitios de metilación diferencial, algunos de los cuales correspondieron con genes de expresión diferencial previamente identificados en otros estudios. Estos genes se asociaron a respiración, metabolismo de energía y señalización por calcio. En el caso del modelo silvestre, se logró inducir algunos sitios de metilación diferencial, de los cuales una parte se conservaron estables en la siguiente generación. Estos sitios de metilación conservados se encontraron en genes asociados con respuestas celulares a estímulos abióticos y radiación, así como algunos miRNAs asociados a metabolismo de carbono, raíz y ciclo circadiano. A nivel fenotípico, se encontró un efecto bioestimulante a nivel de generación de biomasa radicular, así como tolerancia a estrés hídrico dado por una mayor actividad antioxidante. De esta forma, este trabajo sugiere que el  $H_2O_2$  tiene un impacto a nivel epigenético, en el control y modulación de las funciones en condiciones de estrés para mantener el sistema en homeostasis, y que al ser estables y heredadas a la siguiente generación sugiere un papel en la adaptación fisiológica de la planta y en el desarrollo de memoria de estrés.

**Palabras clave:** metilación de DNA, peróxido de hidrógeno, memoria de estrés.

## **ABSTRACT**

The agricultural system requires a change to meet the growing demands for products and solve the current challenges. The development of resilient crops is a pivotal aspect. Recently strategies with an epigenetic approach have been considered, where the generation of stress memory has great potential to potentiate the innate defence capabilities of the plant to resist stress events. One way to induce this memory is by priming with stress-signalling compounds, such as hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ).  $H_2O_2$  is a second messenger involved in various plant functions, including stress responses. In addition,  $H_2O_2$  applied exogenously to plants stimulates tolerance to a wide spectrum of stresses. In the present work, the effect of  $H_2O_2$  at the epigenetic level was studied, specifically in DNA methylation, in the induction of stress tolerance response. For this, two experimental models were used: 1) Line of transgenic tobacco with endogenous overproduction of  $H_2O_2$ , which has been studied at various omic levels; and 2) Tobacco elicited exogenously with  $H_2O_2$  to see an effect in response to stress and induction of transgenerational memory. To analyse DNA methylation patterns, bisulfite whole genome sequencing (WGBS) was used. The transgenic model identified differential methylation sites, some of which corresponded to differential expression genes previously identified in other studies. These genes were associated with respiration, energy metabolism, and calcium signalling. In the case of the wild model, it was possible to induce some different methylation sites, of which a part was kept stable in the next generation. These conserved methylation sites were found in genes associated with cellular responses to abiotic stimuli and radiation, as well as some miRNAs associated with carbon metabolism, root, and circadian cycle. At the phenotypic level, a biostimulant effect was found, as well as tolerance to water stress given by greater antioxidant activity. In this way, this work points out that  $H_2O_2$  has an impact at the epigenetic level, in the control and modulation of functions under stress conditions to keep the system in homeostasis, and that being stable and inherited to the next generation suggests a role in the physiological adaptation of the plant and the development of stress memory.

**Key word:** DNA methylation, hydrogen peroxide, stress memory.

## DEDICATORIAS

A mi familia:

porque ellos me han convertido en quién soy,  
y siempre han estado ahí incondicionalmente....

Y a mí misma:

Por las decisiones, trabajo, perseverancia y esfuerzos en esta etapa

**“Lo que era ya no es lo que soy.  
Y lo que soy no es aun lo que puedo ser.”**

**J. Katzenbach**



## AGRADECIMIENTOS

**"Ningún hombre es una isla,  
todo hombre es una parte de un conjunto."**

*John Donne*

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por el otorgamiento de la beca de doctorado 714246 (CVU 689382) a través el Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC), la cual me permitió continuar con mis estudios.

A la Universidad Autónoma de Querétaro, en particular a la Facultad de Ingeniería por el otorgamiento de la beca institucional durante la realización de mi posgrado.

Al Dr. Ramón Guevara, por toda su confianza, apoyo y motivación para iniciar esta nueva etapa de formación académica. Por permitirme formar parte de su grupo de trabajo durante este tiempo. Por todas las facilidades, recursos, observaciones y atenciones que fueron otorgadas durante la realización del proyecto.

A mi sínodo, por su participación en el proyecto, apoyo y ayuda a lo largo de este trabajo. En particular, un especial agradecimiento a la Dra. Gely, porque siempre que fue necesario abrió las puertas el Laboratorio de Metabolitos para uso del equipo, así como su gran ánimo y disponibilidad para proporcionar ayuda para resolver dudas y dificultades.

Al campus Amazcala, por brindarme acceso y uso a las instalaciones, infraestructura y equipo. Así como a todo el personal del campus, que siempre estuvo accesible para ofrecer el apoyo necesario, así como por su ánimo y calidez.

Al Dr. Juan Fernando García Trejo por facilitar el uso de equipo e instrumentos del Laboratorio de Bioingeniería.

A Heladia Salgado y Romualdo Zayas del Centro de Ciencias Genómicas de la UNAM Campus Morelos, quienes amablemente me abrieron las puertas. Agradezco mucho ese gran entusiasmo de su parte para hacer colaboración, activa participación y gusto por enseñar a los estudiantes que lo solicitan.

A mis compañeros, amigos y colegas del doctorado, por todos los momentos compartidos en estos años, y experiencias vividas. Porque cada uno de los especímenes ha aportado sus peculiaridades para hacer de la paleta un vivido arcoíris de colores: Eduardo, Diana, Laura, Nallely, Antonio, Samantha, Ixchel...

A mi familia, por ese apoyo, ánimo y amor incondicional, que me dio soporte, estructura y fortaleza. Incluyendo a los miembros peludos de la familia, que siempre dan su alegría, cariño y su compañía, aún en las noches de desvelo .



# TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	i
<b>ABSTRACT</b>	ii
<b>DEDICATORIAS</b>	iii
<b>AGRADECIMIENTOS</b>	iv
<b>TABLA DE CONTENIDOS</b>	v
<b>ÍNDICE DE TABLAS</b>	ix
<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	x
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	<b>1</b>
<b>2. ANTECEDENTES</b>	<b>3</b>
2.1 <i>Epigenética</i>	3
2.1.1 <i>Mecanismos epigenéticos</i>	3
2.1.2 <i>Priming</i>	4
2.2 <i>Metilación de DNA</i>	6
2.2.1 <i>Contextos de metilación</i>	6
2.2.2 <i>Métodos para determinar patrones de metilación en DNA</i>	7
2.2.3 <i>Cambios en metilación de DNA en respuesta a estrés</i>	8
2.3 <i>Estrés en plantas</i>	9
2.3.1 <i>¿Qué es el estrés?</i>	9
2.3.2 <i>Defensa de estrés</i>	9
2.4 <i>El peróxido de hidrogeno</i>	10
2.4.1 <i>Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)</i>	10
2.4.2 <i>Generalidades del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	10
2.4.3 <i>Señalización en respuesta a condiciones de estrés</i>	11
2.4.4 <i>ROS y epigenética</i>	12
2.5 <i>Plantas de tabaco transgénicas al gen CchGLP</i>	13
2.5.1 <i>Gen CchGLP</i>	13
2.5.2 <i>Expresión en plantas de tabaco</i>	14
2.5.3 <i>Tolerancia a estrés</i>	14
2.5.4 <i>Estudios “ómicos”</i>	14
2.5.5 <i>Tratamiento foliar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducir tolerancia a estrés</i>	15
<b>3. HIPÓTESIS</b>	<b>16</b>
<b>4. OBJETIVOS</b>	<b>16</b>

4.1 General	16
4.2 Específicos	16
<b>5. MATERIALES Y METODOS</b>	<b>17</b>
5.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.	17
5.1.1 Obtención del material vegetal	17
5.1.2 Crecimiento de plantas de tabaco transgénicas	17
5.1.3 Crecimiento de plantas de tabaco silvestres	17
5.1.4 Tratamiento de plantas silvestres con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	18
5.2 Toma de muestras y características morfológicas	18
5.2.1 Muestreo	18
5.2.2 Medición de características morfológicas	18
5.2.3 Análisis estadístico	19
5.3 Análisis de metilación global: objetivo 1	19
5.3.1 Extracción de DNA	20
5.3.2 Elisa de metilación global de DNA	20
5.4 Análisis de expresión de genes relacionados a procesos de metilación: objetivo 1	21
5.4.1 Diseño de primers para qPCR	21
5.4.2 PCR punto final	22
5.4.3 Extracción de RNA	22
5.4.4 Síntesis de cDNA	23
5.4.5 PCR tiempo real	23
5.5 Análisis de patrones de metilación en el genoma: objetivo 2	24
5.5.1 Extracción de gDNA	24
5.5.2 WGBS	24
5.5.3 Análisis bioinformático	25
5.5.3.1 Control de calidad	25
5.5.3.2 Alineación con genoma de referencia y extracción de sitios de metilación	26
5.5.3.3 Análisis de metilación diferencial	26
5.5.3.4 Análisis de enriquecimiento	26
5.5.3.5 Análisis de correlación entre metilación y expresión diferencial en L8	26
5.6 Análisis de estabilidad transgeneracional de marcas de metilación: objetivo 3	27
5.6.1 WGBS	27
5.6.2 Ensayo de tolerancia a sequía	27
5.6.2.1 Lugar experimental	27
5.6.2.2 Condiciones de estrés hídrico	27
5.6.2.3 Muestreo y evaluación morfológica	28
5.6.2.4 Cuantificación de prolina	28
5.6.2.5 Actividades enzimáticas PAL, SOD y CAT	28

5.6.2.6	<i>Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	29
5.6.2.7	<i>Análisis de expresión génica</i>	29
5.6.2.8	<i>Análisis estadísticos</i>	30
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b>	<b>31</b>
6.1	<i>Objetivo 1: impacto en la metilación global: ambos modelos</i>	31
6.1.1	<i>Comparación morfológica de plantas</i>	31
6.1.2	<i>Cuantificación de niveles de metilación global</i>	34
6.1.2.1	<i>Extracción de gDNA</i>	34
6.1.2.2	<i>Elisa Metilación global</i>	35
6.1.3	<i>Análisis de expresión de genes relacionados a metilación de DNA</i>	37
6.1.3.1	<i>Extracción de RNA</i>	37
6.1.3.2	<i>qPCR</i>	37
6.2	<i>Objetivo 2: análisis de metilación por secuenciación de genoma: modelo transgénico</i>	39
6.2.1	<i>Extracción de gDNA</i>	39
6.2.2	<i>Análisis bioinformático</i>	39
6.2.3	<i>Comparación entre DmC y DEG</i>	44
6.3	<i>Objetivo 3: análisis de herencia: modelo silvestre elicitado</i>	46
6.3.1	<i>Estabilidad de DmC en la primera generación</i>	46
6.3.2	<i>Prueba de estrés hídrico</i>	52
6.3.2.1	<i>Condiciones ambientales</i>	52
6.3.3	<i>Observaciones del tratamiento de elicitación</i>	53
6.3.4	<i>Comparación de características morfológicas</i>	53
6.3.5	<i>Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno</i>	59
6.3.6	<i>Contenido de Prolina</i>	60
6.3.7	<i>Actividades enzimáticas PAL, SOD y CAT</i>	61
6.3.8	<i>Expresión de genes AQP, PIP1 y CHS</i>	64
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES</b>	<b>68</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCIAS</b>	<b>69</b>
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b>	<b>78</b>
9.1.	<i>Curvas estándar para cuantificación de compuestos</i>	78
9.1.1.	<i>Curva de 5mC para metilación global.</i>	78
9.1.2.	<i>Curva de albumina para cuantificación de proteína</i>	78
9.1.3.	<i>Curva de prolina</i>	79
9.1.4.	<i>Curva de Ácido cinámico para actividad PAL</i>	79
9.1.5.	<i>Curva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></i>	80

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentración y relación 260/280 y 260/230 gDNA de muestras de tabaco a 1y 3 meses de edad de tejido foliar y radicular	34
Tabla 2. Datos de extracción de RNA	37
Tabla 3. Datos de extracción de gDNA para secuenciación	39
Tabla 4. Resultados estadísticos de lecturas de secuenciación	40
Tabla 5 Resultados estadísticos de lecturas de secuenciación 2	46

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismos epigenéticos.	3
Figura 2. Priming y memoria de estrés en las plantas.	5
Figura 3 Mecanismos de memoria de estrés	6
Figura 4. Mantenimiento de metilación.	7
Figura 5 Representación de las vías de señalización de ROS en plantas	12
Figura 6. Esquema de flujo de trabajo para el procesamiento de datos de WGBS	25
Figura 7. Morfología de las plantas transgénicas L1 y L8 a 1 y 3 meses.	31
Figura 8. Morfología de las plantas silvestre y elicidadas a 1 y 3 meses	32
Figura 9. Características morfológicas de plantas a los 3 meses.	33
Figura 10. Metilación global en plantas transgénicas	36
Figura 11. Efecto de la elicitación con H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> en metilación global en plantas silvestres	36
Figura 12. Expresión de genes MET1, DRM2, CMT3 y ROS1	38
Figura 13. Gel de electroforesis gDNA de muestras de tejido foliar de tabaco	39
Figura 14. Alineación de los datos de secuenciación de las muestras con el genoma de referencia	40
Figura 15. Distribución de metilaciones identificadas en contextos CG, CHG y CHH en plantas transgénicas	41
Figura 16. DmC identificadas en L8.	42
Figura 17. Distribución de DmC en diversos elementos genómicos	42
Figura 18. Análisis de enriquecimiento de DmC identificadas en L8 y L1.	43
Figura 19. Coincidencias de metilación y expresión diferenciales en L8.	45
Figura 20. Distribución de metilación en contextos CG, CHG y CHH en H y F.	46
Figura 21. Numero de DmC identificadas en H y F	47
Figura 22. Heatmap de principales DmCs heredadas en F.	49
Figura 23. Análisis de enriquecimiento en DmC heredadas en F.	50
Figura 24. Red de interacción de proteínas funcionales asociada a genes DmC	51
Figura 25 Registro de T y H en área de cultivo durante experimento de sequía	52
Figura 26 Afectación en hojas por tratamiento de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	53
Figura 27. Desarrollo de plantas y raíces en condiciones normales.	54

Figura 28. Características morfológicas en condiciones normales.	55
Figura 29. Desarrollo de plantas y raíces bajo estrés hídrico moderado.	56
Figura 30. Desarrollo de plantas y raíces bajo estrés hídrico severo.	57
Figura 31. Características morfológicas bajo estrés hídrico moderado y severo.	58
Figura 32. Contenido de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> endógeno.	59
Figura 33. Contenido de prolina.	60
Figura 34. Dinámica de actividad PAL.	62
Figura 35. Dinámica de actividad SOD.	63
Figura 36. Dinámica de actividad CAT.	64
Figura 37. Expresión relativa de genes CHS, PPI Y AQP.	66
Figura 38 Curva estándar de 5mC	78
Figura 39 Curva estándar de albumina	78
Figura 40 Curva estándar de Prolina	79
Figura 41 Curva estándar de Ácido cinámico	79
Figura 42 Curva estándar de H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	80

## 1. INTRODUCCIÓN

En la actualidad la población mundial asciende a 7.9 billones de personas, de las cuales más de 800 millones padecen de desnutrición y quizás cerca de un tercio de la población carece de seguridad alimentaria (Hirt, 2010), debido a la producción insuficiente de alimentos (Gitz et al., 2016). Además, el crecimiento acelerado de la población (Hirt, 2010), ha ejercido una gran presión sobre el uso de recursos y la demanda de productos básicos.

En la actualidad hay varios problemas respecto a la seguridad alimentaria: i) disminución de producción agrícola por alteraciones climáticas y bióticas; ii) pérdida de suelo fértil; iii) creciente limitación de suministros de agua; iv) Altos niveles de sustancias tóxicas por uso excesivo de pesticidas y fertilizantes, entre otros (Ehrlich & Harte, 2015). Para el año 2050 se estima que la población global ascenderá a más de 10 billones de personas (Ehrlich & Harte, 2015), por lo que se incrementará la demanda de recursos y producción de alimentos. Se considera que a causa del cambio climático en los próximos años habrá un descenso entre el 10 al 25 % del rendimiento de los cultivos a consecuencia del cambio climático (FAO, 2018). Esta situación, agrandará los problemas ya existentes y exacerbará otros problemas, por lo que es importante buscar soluciones y alternativas.

El reto de transformar los sistemas productivos para enfrentar los retos y problemas es un objetivo de interés global, donde se está enfocando hacia la sustentabilidad y resiliencia. Sin embargo, la ser un problema complejo, se requiere de la acción a través de varios enfoques multidisciplinarios, desde el balance de las políticas en agricultura, acciones en la cadena de suministros (FAO, IFAD, UNICEF, WFP, 2020), hasta fortalecer la capacidad biológica innata de las plantas para resistir el estrés. Para ello, una alternativa es el uso de herramientas epigenéticas, que tienen el potencial de generar memoria de estrés y estimular el sistema de inmunidad en las plantas (Gutzat & Mittelsten Scheid, 2012; Ji et al., 2015; Lämke & Bäurle, 2017).

La memoria de estrés en plantas hace referencia a la capacidad de almacenar información de un estímulo pasado, para responder de forma más eficiente ante un nuevo estímulo, en donde el estímulo detonante puede ser una dosis baja de estrés, un compuesto químico o un organismo benéfico (Lämke & Bäurle, 2017). Sin embargo, el conocimiento en este tema es limitado, y sus aplicaciones están en proceso de desarrollo (Kalavacharla et al., 2017).

Un compuesto con gran potencial como elicitador inductor de memoria de estrés, consideramos es el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ). El  $H_2O_2$  actúa como segundo mensajero en la planta, y tiene un rol esencial en la percepción de estímulos, señalización y respuestas de defensa a estrés (Choudhury et al., 2017; Nazir et al., 2020; Saxena et al., 2016; Smirnov & Arnaud, 2019). Además, se ha observado que la aplicación exógena de  $H_2O_2$  en las plantas tiene un efecto positivo en las respuestas de defensa, ya que induce tolerancia a diversos tipos de estrés abiótico e incluso biótico (Bagheri et al., 2019; Basal & Szabó, 2020; Cao et al., 2013; Iqbal et al., 2018; X. L. Zhang et al., 2011). Sin embargo, no se han realizado estudios a nivel epigenético que indaguen sobre la función del  $H_2O_2$  en la regulación epigenética del DNA, y en la inducción de una memoria en plantas.

Los estudios epigenéticos en plantas en respuesta al  $H_2O_2$ , pueden contribuir en primera instancia a entender el mecanismo regulatorio universal de las respuestas estrés, e inclusive podrían profundizar en la

inducción de tolerancia a estrés y sugerir una inducción de memoria a estrés a través de la inducción de cambios epigenéticos en la planta, que le permita enfrentar mejor los retos presentados por el cambio climático (Lämke & Bäurle, 2017). Además, este tipo de estudios pueden ser importantes para la identificación de epialelos específicos para tolerancia a estrés que pueden ser útiles en enfoques de fitomejoramiento y manejo de estrés en cultivos (Álvarez-Venegas et al., 2016; Wang et al., 2017). Por ello, en este trabajo de tesis se enfocó en estudiar el efecto de la aplicación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas a nivel epigenético, en particular el mecanismo de metilación del DNA.



## 2. ANTECEDENTES

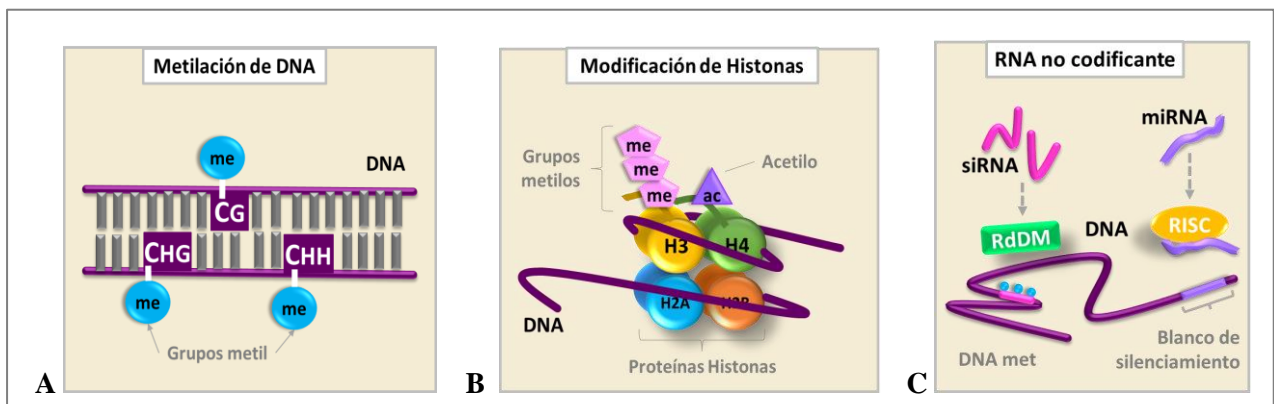
### 2.1 Epigenética

Un fenómeno epigenético consiste en cambios heredables en la expresión génica por modificaciones reversibles en la estructura de la cromatina, sin alterar la secuencia del DNA. Estos se definen en función de la presencia de grupos químicos y/o proteínas unidas covalentemente al DNA, las cuales se denominan “marcas epigenéticas”, e incluyen la modificación de histonas y la metilación de DNA. Estas macas van a alterar el estado de la cromatina entre una conformación compacta (heterocromatina) o laxa (eucromatina), de manera que se puede favorecer el silenciamiento o la expresión de genes respectivamente (Barozai et al., 2018; Gallusci et al., 2017; Hauser et al., 2011; Y. He & Li, 2018; Kapazoglou et al., 2018; Masuelli & Marfil, 2011; Yamamuro et al., 2016).

Los estímulos del ambiente pueden generar cambios en las marcas epigenéticas, y por ende, cambios en la expresión de varios genes de respuesta, de tal manera que un mismo genotipo puede mostrar fenotipos alternativos de acuerdo a los estímulos que este reciba durante su desarrollo (Avramova, 2015).

#### 2.1.1 Mecanismos epigenéticos

La estructura de la cromatina está determinada por la modificación postraduccional de histonas, la modificación química del DNA (metilación y acetilación), expresión de microRNAs y RNAs pequeños de interferencia (Figura 1) (Avramova, 2015). Todos estos elementos contribuyen a la flexibilidad de la regulación de la actividad génica (Ito, 2014).



**Figura 1.** Mecanismos epigenéticos. A) Metilación de DNA. B) Modificación de histonas. C) RNAs no codificantes (Villagómez-Aranda et al., 2022).

La metilación del DNA (Figura 1.A) consiste en la unión de un grupo metil ( $\text{CH}_3$ ) en las bases de la cadena de DNA, principalmente a la citosina, originando la 5-metilcitosina (5mC). La 5mC inhibe el proceso de transcripción de la secuencia de DNA, y por ello, reprime la expresión de los genes correspondientes (Du et al., 2015; Ji et al., 2015; Lukens & Zhan, 2007; Yong et al., 2016). La metilación del DNA participa en diversos procesos biológicos en las plantas, como la regulación del desarrollo, el

control del tiempo de floración, fertilidad, morfología de hojas, mecanismos de defensa contra el estrés, e inclusive se ha sugerido el desarrollo y regulación de una “memoria del estrés” a manera de inmunidad (Ito, 2014).

La modificación de histonas (Figura 1.B), consiste en la adición de grupos químicos a las histonas, las proteínas que ayudan a empaquetar el DNA. Entre las modificaciones descritas en histonas se encuentran: acetilación ( $\text{CH}_3\text{CO}^-$ ), metilación ( $\text{CH}_3^-$ ), fosforilación ( $\text{PO}_4^{3-}$ ), ubiquitinación, sumolación, entre otras. Estas modificaciones van a alterar la estructura de la cromatina, modificando la accesibilidad de la maquinaria transcripcional, y por ende tienen un efecto directo en la expresión genética (Holeski et al., 2012). En particular, la metilación (mono, di o tri) de la histona 3 en residuos de lisina (H3K4me2 y H3K4me3) están presentes en plantas con “priming”, por lo que se consideran indicadores de un estado preparado, así como las acetilaciones, las cuales son marcas activas de expresión (Lämke & Bäurle, 2017; Ramírez-Prado et al., 2018).

Los ncRNA (Figura 1.C), son moléculas funcionales de RNA, transcritas del DNA, pero no traducidas a proteínas, que funcionan en la regulación de la expresión de genes a nivel transcripcional y postranscripcional. Los ncRNA relacionados con los fenómenos epigenéticos incluyen:

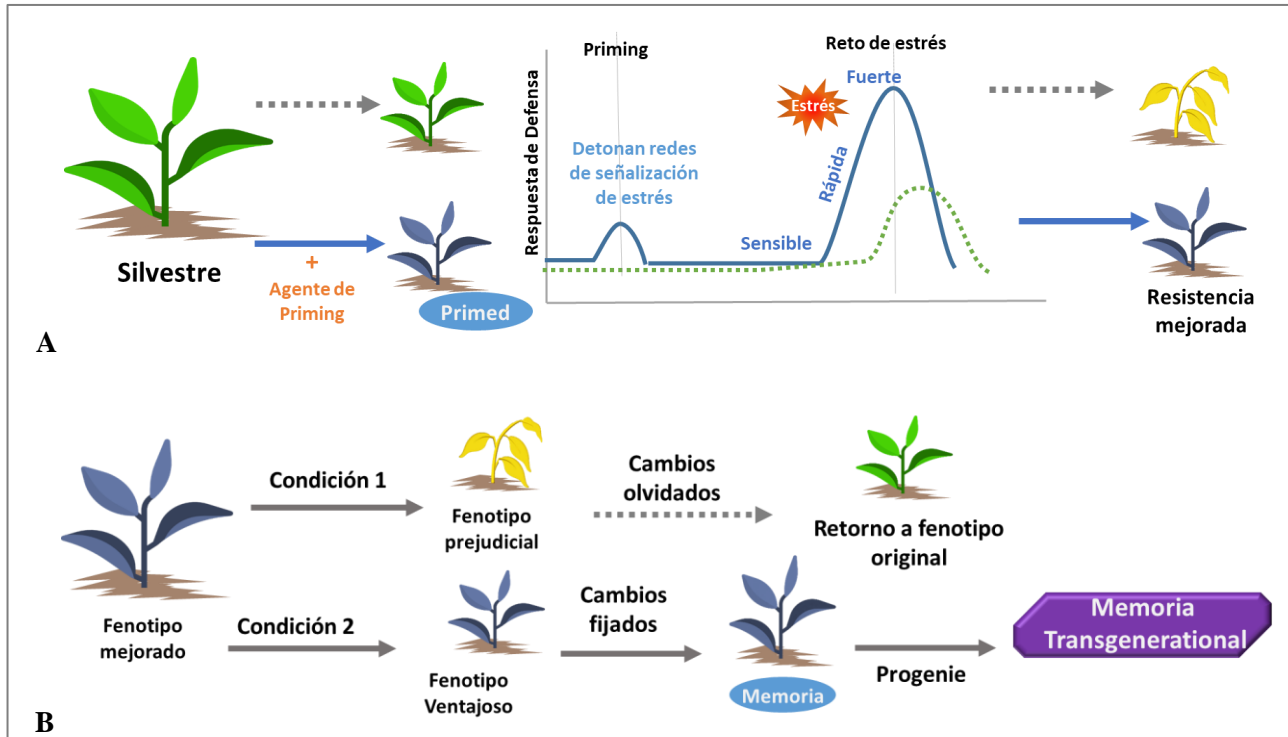
- Los microRNAs (miRNAs), que inducen la degradación de una secuencia blanco de RNA complementaria, y puede realizarse en un mecanismo de retroalimentación involucrado en metilación de cromosomas.
- Los RNAs pequeños de interferencia (siRNAs), que inducen la formación de heterocromatina por el complejo de silenciamiento transcripcional inducido por RNA (RITS), que promueve la metilación H3K9 de histonas.
- Los RNAs asociados a piwi (piRNAs), cuya función consiste en la regulación de cromatina y supresión de actividad de transposones.
- Los RNAs largos no codificantes (lncRNAs) que están asociados a complejos de modificación de cromatina y promover estados epigenéticos específicos en un loci blanco (Collins et al., 2011; Kaikkonen et al., 2011; Mercer & Mattick, 2013).

### 2.1.2 Priming

El “priming” es el fenómeno por el cual un estímulo temporalmente limitado modifica a la planta a nivel fenotípico para una futura exposición a estrés (Lämke & Bäurle, 2017; Wang et al., 2017). El “priming” se considera parte de la “memoria del estrés”, al brindar a la planta la capacidad de responder más eficientemente a un estrés, y lograr inclusive una tolerancia (Figura 2) (Crisp et al., 2016; Lämke & Bäurle, 2017; Walter et al., 2013). Por mencionar algunos ejemplos, se presenta regulación diferencial de genes codificantes para reguladores epigenéticos, y cambios en la metilación del DNA y estado de la cromatina en respuesta a factores como frío, salinidad, sequía, osmolaridad, nutrición patógenos biotróficos y necróticos (Fortes & Gallusci, 2017). Además, dado el efecto sinérgico que tienen los factores de estrés, un primer factor puede perdurar por “priming”, y predisponer a la planta aun estado preparado a estrés futuro, ya sea un estrés repetitivo, simple o múltiple (Pandey et al., 2017).

El “priming” también puede consistir en la aplicación de elicitores, moléculas capaces de inducir cualquier tipo de defensa en plantas, para activar la memoria (Figura 2) (González-Bosch, 2018; Hossain et al., 2015; Wang et al., 2017). Un ejemplo de ello son las fitohormonas, como auxinas (IAAs), etileno (ET),

ácido jasmónico (JA) y SA, las cuales tienen interacción con las regulaciones epigenéticas y (Downen et al., 2012; Yamamuro et al., 2016). Además, compuestos como el ácido  $\beta$ -aminobutírico (BABA) y el metil-jasmonato (MeJA) pueden inducir memoria en plantas de forma transgeneracional, (Bertini et al., 2018; Martínez-Aguilar et al., 2016; Meller et al., 2018; Ramírez-Carrasco et al., 2017).



**Figura 2.** Priming y memoria de estrés en la planta. A) Estado mejorado de la planta debido a la repuesta sensibilizada, rápida e intensa, que se desarrolla con el priming. B) Puede permanecer como memoria transgeneracional si representa una ventaja en las condiciones ambientales (Villagómez-Aranda et al., 2022).

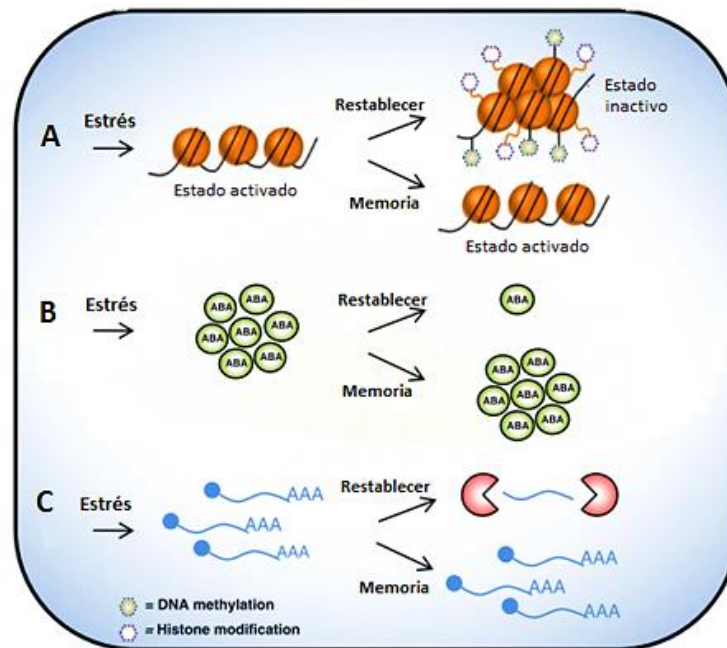
La memoria epigenética del estrés, al tener la capacidad de almacenar información para influir en las respuestas al ambiente presente y futuro, se considera como un mecanismo constante de aclimatación (Crisp et al., 2016; Wang et al., 2017). Sin embargo, la duración de la memoria es variable, ya que puede permanecer activa durante días o semanas (Lämke & Bäurle, 2017), e incluso puede ser persistente y heredable de forma estable en varias generaciones, denominándose herencia transgeneracional (Barozai et al., 2018; González-Bosch, 2018; Hauser et al., 2011; Y. He & Li, 2018).

La memoria epigenética del estrés, al tener la capacidad de almacenar información para influir en las respuestas al ambiente presente y futuro, se considera como un mecanismo constante de aclimatación (Crisp et al., 2016; Wang et al., 2017). Sin embargo, la duración de la memoria es variable, ya que puede permanecer activa durante días o semanas (Lämke & Bäurle, 2017), e incluso puede ser persistente y heredable de forma estable en varias generaciones, denominándose herencia transgeneracional (Barozai et al., 2018; González-Bosch, 2018; Hauser et al., 2011; Y. He & Li, 2018).

Los mecanismos que permiten la memoria incluyen (Figura 3):

- i) Acumulación de factores de transcripción, proteínas o metabolitos.

- ii) Bucles de retroalimentación transcripcional (autoactivación de factores de transcripción) y postraduccionales (modificaciones en la estabilidad de proteínas).
- iii) Mecanismos epigenéticos, como modificación de histonas, metilación de DNA y regulación de RNA, están involucrados en los patrones de expresión génica, y tienen una función en la memoria (Crisp et al., 2016; Lämke & Bäurle, 2017; Walter et al., 2013).



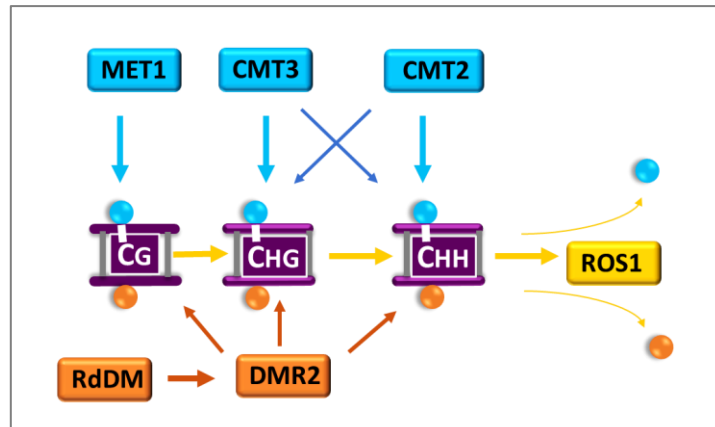
**Figura 3.** Mecanismos de memoria del estrés. A) Metilación de DNA y modificación de histonas. B) Acumulación de metabolitos señalizadores. C) Presencia de RNAs. (Crisp et al., 2016).

## 2.2 Metilación de DNA

### 2.2.1 Contextos de metilación

En las plantas la metilación ocurre en tres formas diferentes de contexto de secuencias: CG, CHG y CHH, donde H puede ser cualquier nucleótido entre A, T o C. El contexto simétrico CG es el más abundante y ocurre en sitios con alta densidad de dinucleótidos CG, denominados comúnmente como islas de CG, las cuales están asociadas con unidades genéticas activas (Ji et al., 2015; Lukens & Zhan, 2007; Yong et al., 2016). Los contextos CHG y CHH se denominan contextos no simétricos, los cuales se encuentran solo en plantas. Los niveles de metilación varían entre los organismos, por ejemplo, la metilación CG en *Arabidopsis* es de 24%, en maíz es de 86% (Yong et al., 2016), en betabel 92.5 % y en jitomate es de 71.60 % (Zuo et al., 2017). Sin embargo, la metilación CHG es muy variable en plantas, desde 0 hasta 100 %, por su parte la metilación CHH raramente excede el 20 %. Los tres contextos de metilación están presentes en regiones pericentroméricas, transposones y regiones repetitivas; por su parte en regiones génicas la más común con los sitios CG (Vanyushin & Ashapkin, 2011).

Los contextos de metilación son establecidos y mantenidos por mecanismos diferentes (Figura 4). La metilación CG es considerada estable por su capacidad de mantenerse tras el proceso de replicación del DNA. Esta se establece por acción de la enzima metiltransferasa 1 (MET1), la cual reconoce la metilación CG tras la replicación y metila a la cadena de DNA hija. Los contextos CHG y CHH, están relacionados con la modificación de histonas, en particular la metilación de histona H3K9. Estos son mantenidos por acción de las enzimas metiltransferasa CMT3 y CMT2 respectivamente (Du et al., 2015; Ji et al., 2015; Lukens & Zhan, 2007; Yong et al., 2016). La metilación no CG (CHG y CHH) participa en el silenciamiento de DNA exógeno (Ambrosi et al., 2017; Ji et al., 2015; Zuo et al., 2017).



**Figura 4.** Mantenimiento de metilación de DNA en diferentes contextos en plantas. Metilasas de mantenimiento para cada contexto MET1, CMT3 y CMT2. Metilasa de novo por mecanismo RdDM en los tres contextos DMR2. Demetilasa general ROS1.

Adicionalmente, la vía de metilación dirigida por RNA (RdDM) se encarga de metilaciones *de novo* en todos los contextos, y requiere de la actividad de las enzimas metiltransferasas de re-arreglo de dominio DRM1 y DMR2. Por su parte, las marcas de metilación pueden ser removidas de forma activa a través de vías de demetilación, donde la 5mC es removida y reemplazada por una C sin metilación. Las enzimas encargadas de esto son la familia de Liberación de Silenciamiento 1 (ROS1), las cuales tienen una función glicosilasas/liasas de DNA. Por su parte, la demetilación pasiva ocurre durante la replicación del DNA, donde la nueva cadena no es metilada, diluyendo y eventualmente perdiendo la metilación (R. Liu & Lang, 2020).

### 2.2.2 Métodos para determinar patrones de metilación en DNA

Los estudios para determinar el estado de metilación del DNA se enfocan en identificar regiones diferencialmente metiladas (DMRs) y establecer su relación con la expresión genética diferencial, ya sea a nivel de genes específicos de interés o del genoma completo. Las técnicas utilizadas para estudiar la metilación del DNA se pueden clasificar en tres enfoques experimentales, que son digestión enzimática, enriquecimiento por afinidad y conversión con bisulfito (Yong et al., 2016).

Los métodos basados en enzimas de restricción utilizan enzimas de restricción sensibles a metilación (MREs), las cuales cortan de forma específica la secuencia no metilada y deja la metilada intacta. Los fragmentos de DNA resultantes se secuencian para determinar la localización de los sitios con 5mC y los no metilados. Uno de los métodos más utilizados, es el arreglo de alto rendimiento para metilación relativa (CHARM), que utiliza la enzima McrBC que reconoce y corta 5mC, por lo que es capaz de detectar DMRs en las islas de CG, a diferencia de los métodos de enriquecimiento (Yong et al., 2016).

Los métodos de enriquecimiento por afinidad utilizan proteínas (MBD) o anticuerpos (MeDIP) para enriquecer e identificar regiones metiladas de DNA, sin embargo, dependen de la especificidad de unión a las secuencias metiladas. La técnica MBD utiliza proteínas de unión a dominio de metil-CG, que permite la detección de DMRs en regiones hipermetiladas, con una resolución de 150 pares de bases (bp). Las técnicas más utilizadas de este tipo para obtener el perfil de metilación de una muestra son mediante un microarreglo (MBD-chip) o por secuenciación (MBDCap-seq). La técnica de MeDIP utiliza anticuerpos específicos a 5-mC para inmunoprecipitar los sitios con metilaciones. Esta tiene una resolución de 100 a 300 pb, no puede discriminar entre diferentes contextos de metilación, y tiene baja resolución en regiones pobres de CG, por lo que es más utilizada para perfiles de diferentes tipos de células o tejidos; sin embargo, es incapaz de predecir niveles de metilación absoluta (Yong et al., 2016).

Los métodos basados en conversión con bisulfito se basan en el tratamiento con bisulfito de sodio del DNA, el cual convierte las C no metiladas a U, las cuales en reacciones posteriores son convertida a T, mientras que las C metiladas permanecen inalteradas. Estos métodos tienen una resolución de una sola base, y son utilizados para investigar secuencias específicas de DNA cuando se acopla con la secuenciación, donde las dos modalidades más comunes son la secuenciación completa del genoma (WGBS) y la secuenciación de representación reducida (RRBS). En WGBS se tiene una cobertura de toda la información, por lo que permite identificar patrones de metilación globales, determinar DMRs y loci diferentes, por lo que es el método estándar para el estudio del epigenoma. Por su parte RRBS, integra la digestión con la enzima de restricción MspI, la cual reconoce y corta CGGG, para selección de fragmentos, por lo que se enfoca en las regiones proximales al sitio de reconocimiento de la enzima (Yong et al., 2016).

### 2.2.3 Cambios en metilación de DNA en respuesta a estrés

La metilación de DNA está relacionada con las vías de silenciamiento de transposones, represión de elementos repetitivos, actividad transcripcional, “*imprinting*” genómico y memoria transgeneracional (Downen et al., 2012; Yaish et al., 2018). En los últimos años se ha demostrado su importancia en los procesos fisiológicos, y de respuesta a estrés, como:

- Downen et al. (2012) utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* (L.) mutantes deficientes en el mantenimiento de metilación, las cuales fueron expuestas a diferentes factores de estrés para determinar el efecto de estos en la metilación de DNA. Encontraron que el metiloma de la planta está relacionado al estrés, tal que identificaron DMRs específicas a la infección con el patógeno *Pseudomonas syringae* (van Hall), a la cepa avirulenta del mismo, y en respuesta a SA. Un aspecto interesante que encontraron fue que la hipometilación del DNA no específica mejora la resistencia a infección con el patógeno *P. syringae*; así como que el SA induce la sobreexpresión en 21 nt siRNAs en transposones. (Downen et al., 2012).

- Yaish et al. (2018) demostraron que la metilación de DNA está involucrada en el cambio de expresión genética en respuesta a salinidad. Encontraron que en *Medicago truncatula* (Gaertn) con tratamiento de NaCl se presentaba un estado de hipometilación, se alteraba en un 14.9 % los sitios metilados, presentando cambios en los contextos de metilación, y un decremento de niveles de metilación en regiones de promotores y transcritos (Yaish et al., 2018).

## 2.3 Estrés en plantas

### 2.3.1 ¿Qué es el estrés?

En los sistemas biológicos, el estrés se define como toda fuerza adversa, efecto o influencia que tiende a inhibir el funcionamiento normal del sistema. El estrés puede ser clasificado en dos categorías de acuerdo con su origen: abiótico y biótico. El estrés abiótico corresponde a una alteración en los factores ambientales óptimos como temperatura, agua, luz, viento, compuestos químicos (sales, metales pesados, nutrientes), radiación y heridas mecánicas. El estrés biótico por su parte se refiere a la acción de patógenos (bacterias, hongos y virus), herbívoros e insectos (Hirt, 2010). En la naturaleza es común que interactúe más de un factor de estrés, por lo que el estrés se puede clasificar en: simple (un factor), individual múltiple (dos o más factores ocurriendo a diferentes periodos sin sobreponerse) o combinado (ocurriendo simultáneamente en cierto grado) (Pandey et al., 2017).

Los diferentes tipos de interacciones de estrés pueden tener un amplio rango de efectos en la planta dependiendo de la naturaleza, severidad, duración e interacción de los factores de estrés. De manera que, el rendimiento de un cultivo es determinado en gran parte por el resultado neto de la interacción entre las condiciones abióticas y bióticas, la cual puede tener un efecto sinérgico en la fisiología de la planta (Pandey et al., 2017). Sin embargo, debido a que la naturaleza está en constante cambio, se considera que las plantas están expuestas de manera permanente a condiciones de estrés. Sin embargo, las plantas responden mediante la activación de mecanismos de defensa a fin de contrarrestar los efectos negativos del estrés, y lograr su crecimiento, propagación y supervivencia (Gutzat & Mittelsten Scheid, 2012).

### 2.3.2 Defensa de estrés

En las respuestas a estrés en plantas se pueden describir diferentes mecanismos, como la resistencia sistémica adquirida (SAR) y respuesta hipersensitiva (HR) para estímulos bióticos, y la aclimatación sistémica adquirida (SAA) para estímulos abióticos (Mittler & Blumwald, 2015).

La HR es una defensa inmediata y localizada en el sitio de la infección, caracterizada por la necrosis de las células, tras el reconocimiento del patógeno que inicia vías de señalización (Gao et al., 2015; Kombrink & Schmelzer, 2001; McDowell & Dangl, 2000). En una segunda etapa, se activan genes de defensa en los sitios proximales a la infección, para la síntesis de novo de metabolitos secundarios como fitoalexinas, compuestos con actividad antimicrobiana, y para reforzar la pared celular; así mismo, implica la expresión de genes relacionados a patogenicidad (Kombrink & Schmelzer, 2001). Una tercera etapa, se tiene la SAR, donde las señales de defensa se transportan por el floema en la planta, resultando en un amplio espectro de

resistencia contra infecciones secundarias en tejidos distales (Gao et al., 2015; Kombrink & Schmelzer, 2001; McDowell & Dangl, 2000). La SAA es una respuesta generalizada, similar a la SAR, pero en respuesta a factores ambientales (Mittler & Blumwald, 2015). Otro término relacionado es la resistencia sistémica inducida (IRS), la cual se considera sinónimo de SAR, pero cuyo mecanismo es independiente de la expresión de proteínas de resistencia, y que puede ser estimulada por la presencia de microorganismos benéficos o compuestos elicitores (Tuzun & Bent, 2006).

El propósito de estas respuestas sistémicas es alertar a todos los tejidos remotos y no-estresados de la existencia de una amenaza y activar vías de respuesta para aumentar el “fitness” de la planta (Mittler & Blumwald, 2015). Si bien las rutas y genes que caracterizan a cada mecanismo son distintas, comparten elementos en común de señalización, como son el desbalance en la homeostasis de especies reactivas de oxígeno (ROS), que provoca un estallido oxidativo y ondas de  $\text{Ca}^{2+}$  para la propagación de señales; así como fitohormonas como SA, JA, ET, ABA, diferentes péptidos, proteínas, señales eléctricas y moléculas de RNA para regular las respuestas (Czarnocka & Karpiński, 2018; Mittler & Blumwald, 2015; Raja et al., 2017). Debido a la cruce de diversas vías de señalización es que se puede originar una resistencia a estrés combinado en las plantas, con la activación de diversos genes. Sin embargo, las respuestas moleculares de las plantas contra estrés combinado apenas se empiezan a elucidar, y será vital para descubrir los mecanismos y candidatos potenciales para mejorar la tolerancia de las plantas (Pandey et al., 2017).

## 2.4 El peróxido de hidrogeno

### 2.4.1 Especies Reactivas de Oxígeno (ROS)

Las especies reactivas de oxígeno (ROS) son formas moleculares de oxígeno atmosférico parcialmente reducido o excitado (Mittler, 2017), que incluye al peróxido de hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), el anión superóxido ( $\text{O}^{2-}$ ), el radical hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) y el singlete ( $^1\text{O}_2$ ) (Hossain et al., 2015; Qi et al., 2017).

Las plantas producen ROS como producto del metabolismo aerobio, en diferentes sitios celulares como el cloroplasto (fotosíntesis), mitocondria (fotorespiración y oxidación de  $\beta$ -ácidos grasos), peroxisoma, núcleo, membrana y pared celular/apoplasto. Las ROS funcionan como moléculas señalizadoras, y son altamente versátiles debido a sus propiedades como nivel de reactividad, sitios de producción y potencial de cruzar las membranas biológicas. En plantas, las ROS se encargan de la regulación de procesos fisiológicos como la diferenciación, desarrollo, interacciones con otros organismos, respuestas de estrés, respuestas sistémicas y muerte celular (Hossain et al., 2015; Mittler, 2017; Qi et al., 2017).

### 2.4.2 Generalidades del $\text{H}_2\text{O}_2$

El  $\text{H}_2\text{O}_2$  es el ROS más estable ( $t_{1/2} > 1$  ms) y con mayor distancia de migración ( $> 1$   $\mu\text{s}$ ), con la capacidad de cruzar membranas por acuaporinas, por lo que actúa como molécula señalizadora. Su modo de acción se basa en la reacción con los residuos cistina de las proteínas, causando un cambio estructural en la proteína blanco que altera su función, los cuales pueden afectar la transcripción, fosforilación y otros eventos de



señalización, así como alterar flujos metabólicos y reacciones dentro de la célula, así como el DNA (Czarnocka & Karpiński, 2018; Mittler, 2017; Qi et al., 2017).

### 2.4.3 Señalización en respuesta a condiciones de estrés

Las vías moleculares que emplean las ROS aún no se han descrito completamente, debido a la multiplicidad de blancos de ROS, su movilidad, y la complejidad de su producción y eliminación en diferentes locaciones subcelulares, como se muestra en la Figura 5 (Czarnocka & Karpiński, 2018). El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> actúa en las vías de señalización a través de reacciones de óxido-reducción con otros componentes de la traducción de señales, tal como proteínas cinasas y factores transcripcionales, así como la interacción con hormonas e iones como el Ca<sup>2+</sup>, que participan en la modulación de las respuestas por la activación/desactivación de genes (Hossain et al., 2015).

El primer paso es la percepción de señales de estrés. En el caso de factores biológicos se origina por el reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos o microbios (PAMPs/MAMPs) por proteínas transmembranales en la planta denominadas receptores de reconocimiento de patrones (PPRs) (Gao et al., 2015; Kombrink & Schmelzer, 2001; McDowell & Dangl, 2000). En el caso de factores ambientales se da a través de proteínas de la familia de receptores tipo cinasa localizados en la membrana plasmática (RLKs), los cuales son sensores de ROS y transmisores redox. Además, varios receptores tipo cinasas ricas en Cys (CRKs), una subfamilia de RLKs, están involucradas en la detección de redox en respuesta a estrés (Czarnocka & Karpiński, 2018).

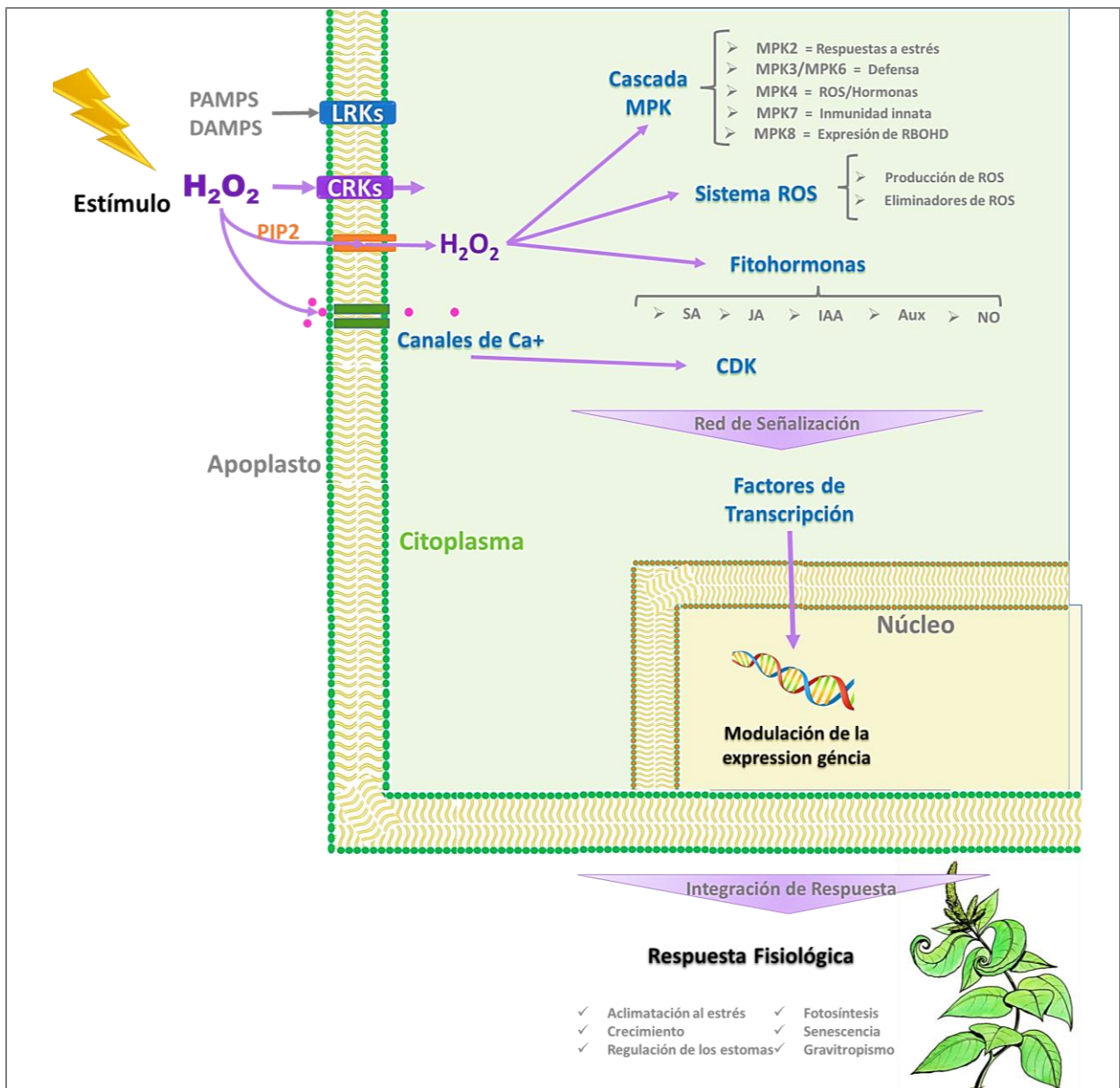
El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa los canales permeables de Ca<sup>2+</sup> en la membrana. El incremento en el Ca<sup>2+</sup> citoplasmático activa múltiples proteínas cinasa, que participan en la propagación de las señales a través de los diferentes tejidos y células (Czarnocka & Karpiński, 2018; Habibi, 2014; Hossain et al., 2015). En algunas ocasiones, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y otras ROS también activan los canales de K<sup>+</sup> en la membrana, y desencadenan la muerte celular programada (Czarnocka & Karpiński, 2018).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> interacciona con cascadas MPK (Figura 5), las cuales consisten en tres cinasas que se fosforilan y activan de forma secuencial (MAPKKKs), activando a su vez vías de señalización retrograda para regular la expresión de genes involucrados en diversos procesos fisiológicos de la planta (Y. Liu & He, 2017). Entre estas, las MPK2, MPK4 y MPK7 son activadas por la explosión oxidativa de ROS, al sufrir sulfenilación dependiente de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La MPK4 se propone como un reóstato ROS/hormonal que regula negativamente las defensas inmunitarias de una manera dependiente de SA, pero al mismo tiempo regula positivamente la fotosíntesis, el metabolismo de las ROS y el crecimiento (Czarnocka & Karpiński, 2018). De igual forma, el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> está involucrado con la vía de MPK8, que regula negativamente la expresión de RBOHD (Habibi, 2014).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> activa a las cinasas ANP1 y OXI1 (señal oxidativa inductora 1), los cuales inician una cascada de fosforilación involucrando a MPK3 y MPK6 (Czarnocka & Karpiński, 2018; Habibi, 2014; Y. Liu & He, 2017). Las MPK3 y MPK6 una vez activadas se translocan al núcleo (ver Figura 5), fosforilan proteínas blanco y regulan la expresión genética al actuar sobre factores de transcripción como la familia WRKY, MYB44 (proteínas de dominio MYB), HSFA4A (Factor de transcripción A-4A de estrés térmico), ERF6 (Factor de unión 6 a elementos responsivos de etileno) y factores responsivos Apetala2/Etileno. En particular el ERF6 y MPK6 regulan la expresión de genes responsivos a ROS a través de su unión a cajas

GCC durante las respuestas a estrés. Por su parte, la cinasa OXI1 afecta induce la vía dependiente de JA y la muerte celular programada (Czarnocka & Karpiński, 2018).

Las ROS también tienen una gran relación con los niveles y funciones de las fitohormonas en las respuestas de aclimatación y resistencia. Las ROS regulan el transporte de auxinas mediante la regulación de los genes PIN, y en condiciones de estrés la regulación negativa de genes regulados por auxinas por efecto de ANP1 que activa genes inducidos por estrés. Como se mencionó anteriormente la cascada de MPK3/MPK6 regula la expresión de genes dependientes de JA. El SA es una hormona clave en el desarrollo de SAR y SAA, involucrado directa e indirectamente con el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, en la regulación de genes de proteínas de choque térmico (HSP) y la MPK4, que es parte de la señalización de SA (Raja et al., 2017).



**Figura 5.** Representación de las vías de señalización de ROS en plantas.

#### 2.4.4 ROS y epigenética

Aún no está claramente definido, pero se considera que el establecimiento de marcas epigenéticas puede tener una conexión con las ROS, debido que tienen una conexión con el metabolismo redox. La demetilación de DNA por ROS1 y DME requiere la interacción directa con una maquinaria de ensamble de Fe-S, la cual es altamente susceptible a la oxidación por ROS, por lo que es factible una relación con las condiciones derivadas de estrés oxidativo. Por otra parte, las deacetilasas de histonas HDA9 y HDA19 son oxidadas por SA, reduciendo su actividad, y favoreciendo la acetilación de histonas y la expresión de genes responsivos de estrés; donde el SA está involucrado en las respuestas de homeostasis redox. Además, las enzimas encargadas de la metilación de histonas son sensibles a la producción de ROS (Locato et al., 2018).

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce la síntesis de óxido nítrico (NO) en las células guarda, para la inducción del cierre de estomas en condiciones de estrés, a través de la acción de la MPK6. El NO funciona como mensajero de señalización, y actúa de forma similar al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Habibi, 2014). Si bien en plantas no se ha demostrado una función epigenética del NO, en células animales está relacionado con la actividad de enzimas deacetilasas de histonas (HDACs) y aciltransferasas (HAT), las cuales participan en la remodelación de la cromatina en respuesta a diversas enfermedades, sugiriendo una regulación epigenética en las respuestas a estrés (Bovee et al., 2017; Vasudevan et al., 2016).

### 2.5 Plantas de tabaco transgénicas al gen *CchGLP*

El grupo de investigación de Biosistemas desarrolló una planta de tabaco transgénica al gen *CchGLP*, el cual que provoca una sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de forma constitutiva en la planta, y resulta en una tolerancia diversos tipos de estrés tanto biótico como abiótico. Por ello es un modelo de estudio interesante en el estudio de la resistencia a estrés en plantas.

#### 2.5.1 Gen *CchGLP*

En el 2002 se identificó en Yucatán una variedad de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con resistencia a los geminivirus PepGMV (Virus del mosaico dorado del chile) y PHYVV (Virus huasteco de la vena amarilla del chile) (Anaya-López et al., 2003).

La planta era asintomática a la infección, debido a una expresión diferencial de transcritos, genes reguladores y genes con función desconocida (Barrera-Pacheco et al., 2008; Gasca-González et al., 2008). El gen *CchGLP* fue uno de los genes que mostró mayor contraste. Se determinó que correspondía a una GLP de la familia PR-16, con actividad de superóxido dismutasa (Mn-SOD) (León-Galván et al., 2011).

Las proteínas PR son proteínas que se codifican tras la inducción de una situación relacionada a patogenicidad en la planta, y están asociadas con el desarrollo de la SAR. Estas proteínas se clasifican en familias de acuerdo con su similitud de secuencias y características. Las GLPs, proteínas tipo germina, se clasifican como la familia PR-16 (Dzhavakhiya et al., 2007.; Park et al., 2004). Las SODs pertenecen a la familia de las metaloenzimas, son antioxidantes enzimáticos, que catalizan la remoción de O<sub>2</sub><sup>-</sup> al convertirlo a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que disminuye la posibilidad de formación de OH<sup>-</sup>, el cual es la especie más reactiva y dañina.

Hay distintos tipos de peroxididasas ubicados en diferentes compartimientos: Mn-SOD (mitocondria), Fe-SOD (cloroplasto) y Cu/Zn-SOD (cloroplasto, peroxisoma y citosol). Una alta expresión y actividad de SODs se ha demostrado que está presente en respuestas a estrés, biótico y abiótico, así como en una mayor protección a estrés oxidativo en la planta (Czarnocka & Karpiński, 2018).

### 2.5.2 Expresión en plantas de tabaco

El gen *CchGLP* se expresó de forma constitutiva con el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor (CaMV) en plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc), las cuales son altamente susceptibles a infección por geminivirus, mediante el sistema de *Agrobacterium tumefaciens* PVG2260. De este proceso se obtuvieron cinco líneas transgénicas de alta expresión a *CchGLP* (L2, L8, L9, L25 y L26), las cuales mostraron resistencia a la enfermedad; y una línea acigótica (L1), la cual tiene insertado el gen *CchGLP*, pero no lo expresa y muestra un fenotipo similar a la planta silvestre (Guevara-Olvera et al., 2012).

### 2.5.3 Tolerancia a estrés

Debido a la actividad de una Mn-SOD, los niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógenos en las líneas transgénicas de tabaco son hasta de 2 veces superiores a la planta silvestre. El nivel de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es proporcional al grado de tolerancia a estrés observado en las plantas transgénicas (Cárdenas-Manríquez et al., 2016). Además, de la mayor producción de ROS en las plantas transgénicas, estas sobre expresan genes relacionados a SAR de forma basal, como *PAL* (fenilalanina amonio liasa) y *PR-1* (proteína relacionada a patogénesis 1), que están involucrados en la defensa contra la infección a geminivirus (Guevara-Olvera et al., 2012).

Considerando la función del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como molécula de señalización global a estrés en plantas (Mejía-Teniente et al., 2013), se evaluó la respuesta de estas plantas transgénicas a otros tipos de estrés, tanto biótico como abiótico, encontrando una tolerancia significativa a sequía (Cárdenas-Manríquez et al., 2016), salinidad, frío, metales pesados (Sáenz-de la O et al., 2020), entre otros. Esto demuestra la importancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las respuestas a estrés, y en el desarrollo de un mecanismo de resistencia de amplio espectro.

### 2.5.4 Estudios “ómicos”

En la búsqueda del mecanismo detrás del fenotipo con tolerancia a estrés biótico y abiótico en las plantas transgénicas de tabaco, se analizó el perfil de estas a nivel transcriptómico, proteómico y metabolómico. En estos estudios se identificaron 58 proteínas diferenciales entre las líneas L8 y L1, relacionadas a estrés, metabolismo general y metabolismo de proteínas. Así mismo, se encontró mayor cantidad de compuestos bioactivos (flavonoides, taninos, compuestos fenólicos y antocianinas en las líneas transgénicas. De forma más específica, se encontraron 32 compuestos diferenciales entre las líneas L8 y L1, que sugieren un impacto en metabolismo de aminoácidos. En general, se sugiere una inducción de las vías de los fenilpropanoides como un ajuste metabólico a la expresión del gen *CchGLP* (Cárdenas-Manríquez et al., 2016).

A nivel transcriptómico se encontraron transcritos diferencialmente expresados en L8 (1800 inducidos y 2700 reprimidos) en comparación a L1. De estos la mayoría estaban relacionados con procesos

metabólicos y celulares. Solo el 8% de transcritos estuvieron relacionados con estrés, tal como: proteínas de estrés térmico, antimicrobianos, y peroxidasas, que están asociadas a respuestas a estímulos ambientales (Cárdenas-Manríquez et al., 2018).

#### 2.5.5 *Tratamiento foliar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para inducir tolerancia a estrés*

La importancia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las respuestas a estrés también se ha observado por elicitación foliar en varios estudios. Dentro del grupo de Biosistemas se evaluó la aspersión con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (200 mM) para inducir tolerancia, donde se demostró que las plantas de tabaco silvestres y la línea transgénica acigótica alcanzan niveles de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> similares a la línea transgénica L8 tolerante. Este efecto también se observó en plantas de Chile en el comportamiento de tolerancia a geminivirus, a estrés hídrico (Mejía-teniente et al., 2015), y actividad antimicrobiana, y su relación con los niveles endógenos de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> inducidos por la aplicación exógena del mismo (Vargas-Hernández et al., 2016). El gen *CchGLP* fue inducido por geminivirus, y al ser silenciado mediante vectores virales se observó una completa susceptibilidad a éstos patógenos (Mejía-teniente et al., 2015).

Varios estudios recientes sugieren que la exposición a agentes químicos, entre ellos el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, produce tolerancia a condiciones de estrés en las plantas, al modular las vías de respuesta a estrés y múltiples procesos fisiológicos. Esta impresión se puede realizar a cualquier estado de desarrollo, siendo las más estudiadas la impresión de las semillas o la aspersión foliar con una solución a bajas concentraciones. Entre las condiciones a las que se ha demostrado una atenuación de la severidad de daño, así como una mejor respuesta a estrés recurrente se encuentra la salinidad, sequía, congelación, temperaturas elevadas y metales pesados (Hossain et al., 2015).

### 3. HIPÓTESIS

El peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) siendo un mensajero en las respuestas de estrés en plantas, tiene un efecto a nivel epigenético, como es el caso de cambios en los patrones de metilación de DNA. De tal forma que en plantas transgénicas de tabaco al gen *CchGLP* con resistencia a factores de estrés, los cambios en metilación de DNA se relacionaran con datos ómicos previamente obtenidos para este modelo. Asimismo, la aplicación exógena de  $H_2O_2$  a plantas de tabaco silvestres [*Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi* (L.)] induce cambios en los patrones de metilación de DNA, algunos de los cuales se relacionan con respuestas a estrés, y son heredados transgeneracionalmente en la primera generación filial (F1).

### 4. OBJETIVOS

#### 4.1 General

Evaluar cambios a nivel de metiloma en plantas de tabaco [*N. tabacum* cv. *Xanthi* (L.)] transgénicas al gen *CchGLP* resistentes a estrés; así como evaluar el metiloma y su herencia en plantas de tabaco silvestres tratadas con  $H_2O_2$ .

#### 4.2 Específicos

1. Determinar si el  $H_2O_2$  en las plantas tiene un efecto en los niveles de metilación global del DNA: en plantas de tabaco silvestres con tratamiento de  $H_2O_2$  y en plantas de tabaco transgénicas al gen *CchGLP*.
2. Identificar regiones metiladas diferencialmente (DMRs) en las plantas de tabaco tratadas con  $H_2O_2$  y en las plantas transgénicas.
3. Evaluar si el tratamiento con  $H_2O_2$  en las plantas silvestres induce un mecanismo de memoria transgeneracional en la resistencia a estrés hídrico y si existen DMRs asociadas a este fenómeno.

## 5. MATERIALES Y METODOS

### 5.1 Material vegetal y condiciones de cultivo.

#### 5.1.1 Obtención del material vegetal

En el presente estudio el modelo de estudio fue la planta de tabaco (*Nicotiana tabacum* cv. xanthi nc. L.), de las cuales se utilizaron:

- Plantas silvestres (W)
- Plantas transgénicas al gen *CchGLP*:
  - ✓ Línea de alta expresión (L8)
  - ✓ Línea acigótica (L1)

Las semillas fueron proporcionadas por el Dr. Ramón Guevara, provenientes del stock de semillas que se tiene dentro del grupo de investigación de Biosistemas. En el desarrollo de este trabajo se mantuvieron algunas plantas hasta la etapa de colecta de semillas, para mantener la resera de semillas en el grupo.

#### 5.1.2 Crecimiento de plantas de tabaco transgénicas

Las semillas de tabaco transgénicas fueron esterilizadas mediante su inmersión en etanol al 96 % durante 1 min, seguido de una incubación en una solución de NaClO al 10 % por 7 min. Posteriormente se realizaron 3 lavados con agua destilada estéril, y se dejaron sumergidas en agua durante 2 días.

Se prepararon frascos de cultivo in vitro con 25 ml de medio Murashige-Skoog adicionado con Fitagel como gelificante y kanamicina a una concentración final de 100 µg/ml como agente de selección (Guevara-Olvera et al., 2012). En cada frasco se colocaron 15 semillas de tabaco, a una profundidad de 1 mm. Solo se sembraron aquellas semillas que presentaban turgencia y/o emergencia de radícula. Los frascos se mantuvieron a temperatura ambiente, en una zona iluminada, con un fotoperiodo aproximado de 14 h de luz/10 h de oscuridad. Las plántulas se dejaron crecer en medio por 14 días, el tiempo mínimo observado para la selección de los individuos transgénicos, tras lo cual se traspasaron a una maceta de cartón de 3 x 3 x 5 cm con Peat Moss Sunshine Mezcla 3 como sustrato. Se mantuvieron por 7 días dentro de una cámara de aclimatación, que consistió en un recipiente de vidrio con tapa, se colocó un vaso con 50 ml de agua para mantener la humedad dentro de la cámara. Diariamente se abría la tapa, el primer día durante 1 h, posteriormente se fue incrementando el tiempo 1 h por día, durante 7 días. Posteriormente se llevaron a un invernadero. Alrededor de 1 mes después se traspasaron las plántulas a una maceta grande con Peat Moss, donde se mantuvo hasta la obtención de semilla (aproximadamente 3 meses). Las plantas fueron regadas diariamente por aplicación manual con una manguera.

#### 5.1.3 Crecimiento de plantas de tabaco silvestres

Las semillas de tabaco silvestres fueron colocadas directamente en una charola de germinación de unicel con Peat Moss Sunshine Mezcla 3 como sustrato. Se mantuvieron en un invernadero a temperatura ambiente,

con un fotoperiodo aproximado de 14 h de luz/10 h de oscuridad. Alrededor de 1 mes después de la emergencia de la planta, se traspasaron las plántulas a una maceta grande con sustrato, donde se mantuvo hasta la obtención de semilla (aproximadamente 3 meses). Las plantas fueron regadas diariamente por aplicación manual con una manguera.

#### 5.1.4 *Tratamiento de plantas silvestres con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>*

Las plantas silvestres se trataron con aspersión exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, grupo al que se definió como H.

El tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se realizó en plantas a partir de 1 mes de edad. Se realizaron 3 aplicaciones con espacio de 5 días entre cada una. La elicitación se realizó por aspersión foliar a punto de goteo (Zunun-Pérez et al., 2017) con aproximadamente un volumen de solución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2 ml por planta. La concentración utilizada de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> fue de 200 mM, la cual fue preparada de forma fresca, inmediatamente antes de su uso en cada ocasión. Paralelamente, para el grupo control de plantas W se utilizó aspersión de agua (Mejía-Teniente et al., 2013, 2019).

Las semillas colectadas de las plantas H se denominaron plantas de la primera generación (F).

## 5.2 **Toma de muestras y características morfológicas**

### 5.2.1 *Muestreo*

Para la mayoría de los análisis realizados en el proyecto se utilizaron muestras de tejido foliar. Estas consistieron en hojas apicales, cortadas desde la base, y congeladas inmediatamente en nitrógeno líquido. Las muestras se almacenaron a – 80 °C hasta su análisis. Cada muestreo se hizo por triplicado.

En algunos casos se trabajó con tejido radicular. Para la extracción de la raíz completa se removió la mayor cantidad de sustrato posible con golpes suaves; posteriormente se sumergió el cepellón en agua por unos minutos y se realizaron movimientos circulares para desprender el sustrato. Por último, se realizó un lavado de la raíz bajo el chorro del grifo a una baja presión para remover sustrato remanente. Se colocaron sobre una superficie absorbente para remover el exceso de agua y se dejaron secar a temperatura ambiente por 20 min.

### 5.2.2 *Medición de características morfológicas*

En los puntos de análisis de las variables de respuesta de la planta, adicionalmente se tomaron medidas de las características morfológicas siguientes para evaluar diferencias en fenotipo. Estas se realizaron previamente a cada muestreo:



- *Altura de la planta:* se midió con una cinta métrica flexible, desde la base del tallo a partir del sustrato hasta la punta apical.
- *Ancho de tallo:* se midió con un vernier electrónico, en 2 puntos distintos del tallo: base y parte media. Sin embargo, debido a las variaciones de altura en plantas, y para evitar variaciones por error humano, se decidió tomar el punto de base de tallo (alrededor de 1 cm sobre la línea del sustrato) para tener mediciones más homogéneas.
- *Número de hojas:* se determinó por conteo simple la cantidad de hojas verdaderas de cada planta.
- *Área foliar:* se estimó de forma directa por procesamiento de imágenes. Se fotografiaron el número total de hojas por planta con un celular con cámara colocando una regla como medida de referencia. Posteriormente se analizaron las imágenes para calcular el área de cada hoja mediante el software ImageJ versión 1.52a [<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>].
- *Estimación de contenido de clorofila:* se utilizó un SPAD Minolta modelo 502DL. Se midieron 3 hojas apicales por planta al azar, para cada hoja se consideró una medida promedio de 10 mediciones al azar, abarcando la totalidad del área de cada hoja. Posteriormente para estimar el contenido de clorofila a partir de las unidades spad, se utilizó la ecuación de relación para tabaco de Parry et al., 2014:

$$\text{Chl} = (1 + 0.00119 * \text{SPAD}^{2.67})^2 \quad (1)$$

donde: Chl es clorofila, SPAD unidades registradas por el SPAD

- *Peso fresco:* se midió directamente el total de hojas y la raíz de cada planta en una balanza analítica.
- *Peso seco:* Las muestras de peso fresco se colocaron de forma individual en una bolsa de papel estraza, y se secaron en una estufa a 50 °C por 3 días. Se verificó que se tuviera un peso constante a una veracidad de 0.01 g para determinar secado completo.
- *Longitud de raíz:* Se midió la longitud de la raíz con una regla de medición estándar, desde el cuello de la raíz hasta la cofia.

### 5.2.3 Análisis estadístico

Para determinar la diferencia significativa entre los datos obtenidos de las plantas contrastantes se realizó un análisis estadístico en el Software GraphPad Prism versión 6. Se utilizó un diseño experimental completamente al azar. Se aplicó a los datos: un análisis de normalidad, un ANOVA de una vía ( $P > 0.05$ ), y una prueba de diferencias significativas y grupos homogéneos de Turkey ( $\alpha > 0.05$ ).

Las comparaciones entre los grupos de plantas se manejaron de forma paralela entre modelo silvestre y modelo transgénico, de forma que la comparación siempre fue: L8 vs L1 y H vs W.

### 5.3 Análisis de metilación global: objetivo 1

Para determinar cambios a nivel de metilación global en los modelos de tabaco silvestre (W y H) y transgénico (L1 y L8), para identificar cambios asociados directamente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aplicado exógenamente a manera de elicitación y a la sobreproducción endógena por el transgén respectivamente.

Para ello se utilizaron muestras de tejido foliar y tejido radicular, en dos etapas fisiológicas diferentes: a la edad de 1 mes (en etapa de crecimiento, y que corresponde además al momento tras completar el tratamiento de elicitación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el caso de las silvestres) y a los 3 meses (en etapa reproductiva, previo a la floración).

#### 5.3.1 Extracción de DNA

La extracción de DNA genómico (gDNA) de las muestras se realizó de acuerdo con el método del CTAB (Clarke, 2009). Una muestra de 250 mg de tejido fue pulverizada con nitrógeno líquido en un mortero. Se adicionó 1 ml de buffer CTAB (CTAB 3%; NaCl 1.4 M; EDTA 20 mM; Tris-HCl 0.1 M; pH 8.0) adicionado con  $\beta$ -mercaptoetanol al 2% y polivinilpirrolidona (PVP) al 2%. Se mezcló en un agitador vórtex durante 30 s y se incubó la mezcla en un baño de agua a 65 °C por 30 min, agitando cada 10 min en el vórtex. Posteriormente, se adicionó 1 ml de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, se mezcló en el vórtex y se centrifugó a 12'000 rpm durante 10 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo eppendorf, y se adicionó 500  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, se centrifugó a 12'000 rpm durante 5 min a 4 °C y se transfirió a un nuevo tubo eppendorf. A este se adicionó 2/3 del volumen recuperado (aprox. 500  $\mu$ l) de isopropanol. Se agregó 5  $\mu$ l de RNasa I y se incubó la mezcla a 37 °C por 15 min. Después de ello, se agregó 1/10 del volumen de sobrenadante (aprox. 100  $\mu$ l) de acetato de sodio 5 M, y se incubó a -20 °C durante 1 h. Se centrifugó a 12'000 rpm por 5 min a 4 °C. Se descartó el líquido y se realizaron 3 lavados de la pastilla de DNA con etanol al 70%. Se dejó secar la pastilla a temperatura ambiente en la campana de flujo laminar bajo la lámpara de luz blanca por 20 min. Se resuspendió en 50  $\mu$ l de agua destilada estéril.

Una alícuota de 5  $\mu$ l de cada muestra de DNA se corrió en una electroforesis en gel de agarosa al 1.2%, con 1  $\mu$ l de buffer de carga y 1  $\mu$ l de Gel Red (Biotium). La electroforesis se realizó a 80 V por 45 min, y se reveló el gel en un fotodocumentador ChemiDoc (BioRad). Así mismo, se cuantificó la concentración de DNA en las muestras mediante un espectrofotómetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific) con una alícuota de 2  $\mu$ l. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

#### 5.3.2 Elisa de metilación global de DNA

La determinación del nivel de metilación global se realizó con un Kit de ELISA 5-mC DNA (Zymo Research) de acuerdo con el protocolo del proveedor (Ashikawa, 2001; Sánchez et al., 2015). Para la placa de Elisa se recomienda una cantidad de 100 ng de DNA por pocillo, por ello, se realizaron diluciones a una concentración de 10 ng/ $\mu$ l, de la cual se tomó un volumen de 10  $\mu$ l por pozo. Cada muestra de DNA se midió por duplicado.

Las muestras de DNA se colocaron en tubos de PCR, se aforó el volumen total de cada una a 100 µl con Coating Buffer, se colocaron en un baño maría a 98 °C por 5 min y luego 10 min en hielo. Se transfirieron las muestras a la placa de Elisa, se cubrió con aluminio y se incubó a 37 °C por 1 h. Posteriormente se descartó el buffer y se realizaron 3 lavados con 200 µl de Elisa Buffer a c/pocillo con una micropipeta multicanal. Se adicionó 200 µl de Elisa Buffer, se cubrió la placa con aluminio y se incubó a 37 °C por 30 min. Se descartó el Buffer, y se adicionó 100 µl de Mix 5mC (Elisa Buffer, Anti-5mC y Anticuerpo-secundario), se cubrió la placa con aluminio y se incubó a 37 °C por 1 h. Transcurrido el tiempo se descartó el buffer, se realizaron 3 lavados con 200 µl de Elisa Buffer, y se adicionó 100 µl de revelador HRP. La placa se midió a los 15, 30 y 45 min en un espectro Multiskan Go (Thermo Scientific) a una longitud de onda de 405 nm.

Para la cuantificación de la metilación global se preparó una curva de estándar a diferentes porcentajes de metilación (0, 5, 10, 25, 50, 75 y 100%) como indica el proveedor, la cual fue preparada de forma paralela con las muestras

Los datos se analizaron en el software GraphPad Prism versión 6, donde se realizó una interpolación de las muestras de acuerdo con la curva estándar. Sin embargo, debido a que el kit utiliza como base genoma de *E. coli*, para determinar el nivel de metilación en las muestras, se aplicó un factor de corrección de 3.41 que corresponde a el contenido de CpG en *Arabidopsis* (I. Ashikawa, 2001), para estimar los valores de nuestras muestras de tabaco, del cual no se tiene un factor específico, como se ha reportado en otros estudios (Vega-Muñoz et al., 2018). Posteriormente los resultados se analizaron estadísticamente como se mencionó en la sección 5.2.3.

#### **5.4 Análisis de expresión de genes relacionados a procesos de metilación: objetivo 1**

De forma complementaria a la cuantificación de metilación global en las muestras, se decidió realizar un análisis de expresión de genes relacionados directamente al estado de metilación de DNA, para determinar si se tenía un impacto en específico en alguna actividad en particular como consecuencia del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en nuestro modelo silvestre y transgénico.

Los genes de interés consistieron en:

- *MET1*: Methyltransferase 1: implicada en el mantenimiento de metilación CG
- *CMT3*: Chromomethylase 3: mantenimiento de metilación CHG.
- *CMT2*: Chromomethylase 2: homólogo de CMT3 que metila sitios CHH
- *DRM2*: Domains Rearranged Methyltransferase 2. Metilasa *de novo*.
- *ROS1*: Repressor Of Silencing 1: principal demetilasa que quita metilaciones para la regulación transcripcional dinámica

##### *5.4.1 Diseño de primers para qPCR*

A partir del genoma de referencia de *N. tabacum*, se buscaron las secuencias correspondientes a genes relacionados con la metilación de DNA. Posteriormente se buscaron opciones de pares de primers para cada

uno de los genes antes mencionados, utilizando la herramienta Primer-Blast del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) para la identificación de pares de primers específicos para cada gen de interés, y OligoAnalyzer de IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>) para la comprobación de formaciones de hairpins, heterodímeros y homodímeros de las secuencias de primers.

En búsqueda de literatura y bibliografía se encontró con el artículo de Manoharlal et al.(2018). En este trabajaron con expresión de genes relacionados con epigenética en tabaco, por lo que se tomaron como referencia estos primers para nuestro estudio (Manoharlal et al., 2018).

Gen	Numero de acceso NCBI	Secuencia (5'→3')	Amplificación (pb)	Tm (°C)
<b>EF1a</b>	NM_001326165.1	TGAGATGCACCACGAAGCTC CCAACATTGTCACCAGGAAGTG	51	59
<b>Met1</b>	AB030726.1	TGAACCAGAAGACAAGCCGTAGT ATCTCATCCTCATTGATCTTGATGTAA	73	59
<b>DRM 2</b>	AB087883.1	AGACCGCTTGGAGCAACTGATA CACGGGCTTCCACCAATTA	66	59
<b>CTM 3</b>	AB032538.1	CCAGAGACTGCGGTAAGAAATGA TGCCTCCACTCCCTCAAAAG	65	59
<b>ROS1</b>	AB281587.1	GATCGGCTACAGCTAATGCAGC TCCTGTGCTCCTACATTAGGC	389	59

#### 5.4.2 PCR punto final

Se realizó un PCR a partir de gDNA de plantas de tabaco, para comprobar la especificidad de los primers y hacer las pruebas de estandarización de las condiciones de amplificación, mediante un gradiente de temperatura de amplificación (56, 58, 60 y 62 °C). Para ello, se utilizó el kit de la enzima Hot Start ® (Thermo Scientific) de acuerdo con las sugerencias del proveedor. La reacción consistió en:

Reactivo	Vol.	[ ] <sub>f</sub>
Buffer 10X Hot Start	1.0 µl	1 X
Mix dNTPs 10 mM	1.0 µl	1 mM
MgCl <sub>2</sub> 25 mM	0.8 µl	2 mM
Primer F 10 mM	0.5 µl	500 nM
Primer R 10 mM	0.5 µl	500 nM
DNA (100 ng/ µl)	1.00 µl	100 ng
Hot Start Polymerasa (5U/µl)	0.2 µl	1 U
Agua estéril	5.2 µl	
Total	10 µl	

El PCR se llevó a cabo en un termociclador CFX® 96 BioRad, con las siguientes condiciones de reacción: 95 °C por 2 min, 30 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 15 s, y 72 °C por 2 min. Los productos de PCR se analizaron mediante una electroforesis en un gel de agarosa al 2.5 % con una

alícuota de 3 µl de reacción de PCR, 1 µl de buffer de carga y 1µl de Gel Red. La electroforesis se corrió a 90 V por 30 min, y se reveló el gel en un transiluminador fotodocumentador ChemiDoc (BioRad).

#### 5.4.3 Extracción de RNA

Para la extracción de RNA total de las muestras se siguió protocolo de la extracción de isotiocianato de guanidina/fenol/cloroformo en base al método descrito por Chomczynski (1987). Para ello, se molió 100 mg de tejido vegetal con nitrógeno líquido, y se mezcló con 1 ml de reactivo TRIzol (Invitrogen). Se realizó lisis celular por choque térmico, al congelar la muestra en nitrógeno líquido y descongelar en un bloque térmico a 70 °C, por cinco ciclos consecutivos, mezclando 30 s con vórtex entre cada ciclo (Chomczynski, 1987).

Posteriormente se adicionaron 200 µl de cloroformo, se mezcló por inversión durante 10 s, y se centrifugó a 12,000 rpm por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se adicionaron 500 µl de isopropanol y se incubó en hielo por 30 min. Después se centrifugó a 12,000 rpm por 10 min a 4 °C, se lavó el pellet con 1 ml de etanol al 75% y se secó en la campana de flujo laminar por 10 min. El pellet se resuspendió en 50 µl de agua destilada estéril.

La extracción de RNA se corroboró mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1.5 % preparado con buffer TAE, con una muestra de 3 µl de RNA, a la cual se adicionó 6 µl de formamida, incubó a 50 °C por 5 min, y 5 min en hielo. Posteriormente se adicionó 1 µl de buffer de carga con Gel Red, y se corrió la electroforesis a 90 V por 30 min. Se visualizó en un fotodocumentador ChemiDoc MP Bio-Rad. El RNA total extraído se cuantificó en el Nanodrop con una alícuota de 1 µl. Las muestras se almacenaron a -20 °C hasta su utilización.

#### 5.4.4 Síntesis de cDNA

Se realizó una reacción de retro-transcripción con el Kit Maxima First Strand (Thermo Scientific) de acuerdo con las indicaciones del proveedor utilizando 2 µg de RNA total.

Previamente a la síntesis de cDNA se realizó un tratamiento con DNasa I (Thermo Scientific) utilizando 1 µl de Buffer DNasa I 10 X y 0.33 µl de DNasa I (3 U/µl) por cada muestra de RNA en un volumen total de 8 µl. La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 30 min, tras lo cual se adicionó 1 µl de EDTA 0.5 M, se calentó a 65 °C por 1 min en un termociclador Apollo ATC 401 y se dejó en hielo por 1 min.

La reacción se preparó de acuerdo con las indicaciones del proveedor:

Reactivo	Vol.	[ ] <sub>f</sub>
Buffer Master Mix 5 X	4.0 µl	1 X
Enzima Maxima (5U/µl)	2.0 µl	10 U
RNA (500 ng/µl)	2.0 µl	1 µg
Agua estéril	12.0 µl	
Total	20.0 µl	

La reacción se llevó a cabo en el termociclador en las siguientes condiciones: 10 min a 25 °C, 30 min a 50 °C, y 5 min a 85 °C. Los productos de cDNA se almacenaron a -20°C hasta su análisis.

#### 5.4.5 PCR tiempo real

En primera instancia se realizó una prueba para verificar la temperatura de amplificación, y se realizó un gradiente con la cantidad de templado en reacción (cDNA directo con 2 y 1 µl, y dilución 1:1). En cada placa se utilizó como control positivo de reacción una amplificación con DNA cromosomal como templado a una concentración de 100 ng de DNA por reacción.

Las reacciones de qPCR se realizaron por triplicado, utilizando el Maxima Sybr Green qPCR Master Mix (Thermo Scientific). La reacción consistió en:

Reactivo	Vol.	[ ] <sub>f</sub>
Buffer Master Mix 2 X	5.0 µl	1 X
Primer F 10 mM	0.3 µl	300 nM
Primer R 10 mM	0.3 µl	300 nM
cDNA	0.5 µl	~ 100 ng
Agua estéril	3.9 µl	
Total	10.0 µl	

El PCR se llevó a cabo en un termociclador CTX96 Touch Real-Time System (Bio-Rad) usando un protocolo de tres pasos con las siguientes condiciones: 1 ciclo de 95 °C por 4 min, 40 ciclos de 95 °C por 30 s, 60 °C por 30 s y 72 °C por 30 s, y un ciclo correspondiente a la curva de disociación de 65 a 95 °C con incrementos cada 5s. El análisis de los datos de qPCR se realizó mediante el software CFX Manager versión 3.1 (Bio-Rad).

La cuantificación de expresión los genes *Met1*, *DRM2*, *CTM3* y *ROS1* se realizó por expresión relativa utilizando como gen de referencia el gen *EF1a*, con base en el método comparativo de doble delta CT ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) (Rao et al., 2013).

### 5.5 Análisis de patrones de metilación en el genoma: objetivo 2

Para determinar cambios de metilación puntuales en el genoma de los modelos de tabaco silvestre (W y H) y transgénico (L1 y L8), se realizó un análisis a nivel de secuenciación para identificar metilaciones diferenciales. Esto con el fin de para identificar cambios asociados directamente al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aplicado exógenamente a manera de elicitación y a la sobreproducción endógena por el transgén respectivamente, que pudieran señalar un efecto a nivel epigenético. Para ello se utilizaron muestras de tejido foliar de plantas (n=3) de 1 mes de plantas: W y H, y L1 y L8.

### 5.5.1 Extracción de gDNA

Se realizó una extracción de gDNA de forma similar a como se mencionó en la sección 5.3.1, con una ligera modificación. Después de la incubación a -20 °C la muestra se pasó a través de una columna de purificación del kit Gene Jet Genomic DNA Purification (Thermo Scientific). Se centrifugó a 12'000 rpm por 1 min a 4 °C, se descartó el líquido y se realizaron 3 lavados de la columna con etanol al 70 %. Se eluyó el DNA con 50 µl de agua destilada estéril. Las muestras se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

### 5.5.2 WGBS

Las muestras de gDNA (12 en total) se enviaron al Instituto de Genómica de Beijing (BGI) para un servicio de secuenciación completa del genoma por bisulfito de sodio (WGBS). El flujo del experimento consistió en:

- 1) Prueba de calidad de la muestra.
- 2) Digestión del gDNA con enzimas de restricción.
- 3) Reparación de los extremos de DNA 3'-dA y ligación del adaptador.
- 4) Selección de fragmentos de DNA entre 40 – 220 bp.
- 5) Tratamiento de bisulfito mediante el kit EZ DNA Methylation-Gold de ZYMO.
- 6) Amplificación por PCR.
- 7) Construcción de librerías RRBS (Secuenciación de bisulfito de representación reducida)
- 8) Preparación del clúster y secuenciación Illumina Nova Seq PE 150.

Los datos crudos de secuenciación se almacenan como archivos FASTQ para cada muestra.

### 5.5.3 Análisis bioinformático

Los datos de WGBS fueron procesados de forma inicial en la terminal mediante el lenguaje de Python. Posteriormente los datos se analizaron en la interfaz del software R. De forma general el flujo de trabajo llevado a cabo se muestra en la Figura 6.

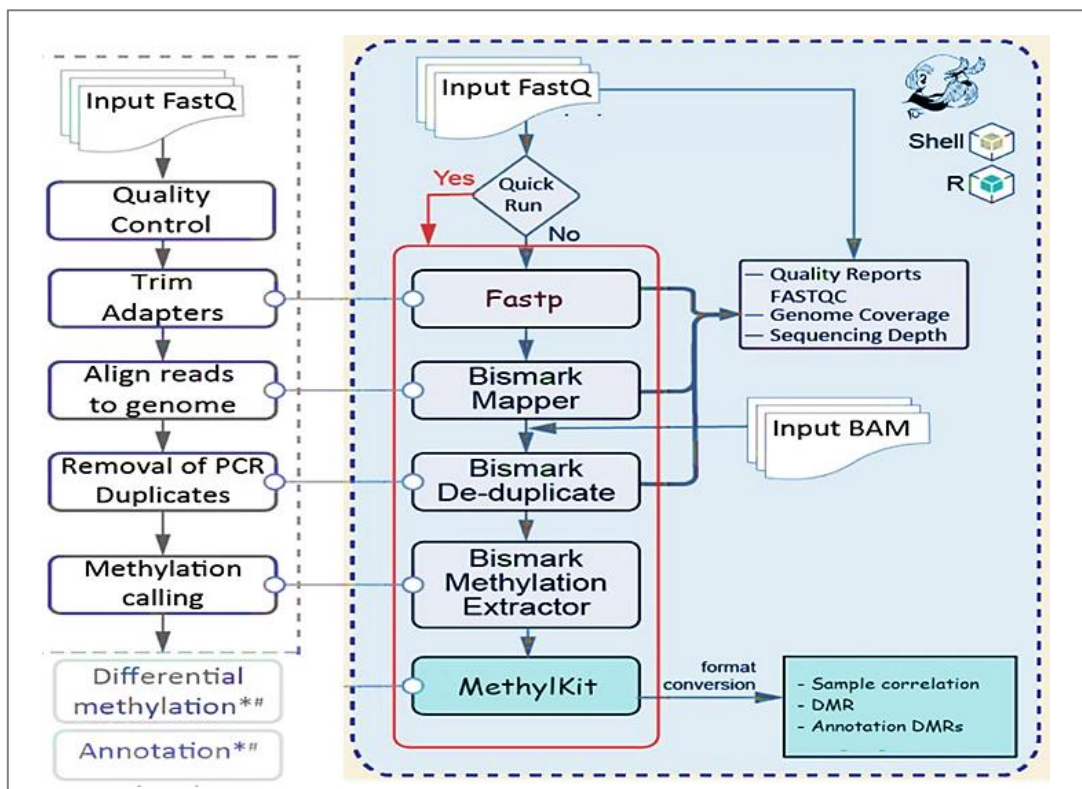
#### 5.5.3.1 Control de calidad

Las lecturas crudas se analizaron para comprobar su calidad y limpieza mediante el paquete Fastp v0.20.0 (Chen et al., 2018). En el código de instrucción se utilizaron las opciones `-c -x -y` para recortar poli-X en los extremos 3', `corrigir base` en regiones superpuestas y `filtrar lecturas de baja complejidad`, respectivamente.

#### 5.5.3.2 Alineación con genoma de referencia y extracción de sitios de metilación

Las lecturas limpias se alinearon con el genoma de referencia de *Nicotiana tabacum* (EBI: AWOJ01000000). Para ello se utilizó la función de alineador del paquete Bismark v0.22.3 (Krueger & Andrews, 2011), con los siguientes parámetros: `-N 1 -L 20 -bowtie2 -nondirection`.

Los archivos BAM resultantes se ordenaron e indexaron utilizando Samtools v1.9 (H. Li et al., 2009).



**Figura 6.** Esquema del flujo de trabajo para el procesamiento de datos de WGBS.

### 5.5.3.3 Análisis de metilación diferencial

Para los pasos subsiguientes se utilizó el software R v4.0.0 (Ihaka & Gentleman, 1996). Para el análisis de metilación diferencial se utilizó el paquete Methylkit v1.14.2 (Akalın et al., 2012). Los parámetros utilizados en la función fueron:

`processBismarkAln`, para procesar los archivos Bismark.

`filterByCoverage`: para filtrar bases por encima del umbral límite de cobertura de 10X para descartar ineficiencias en la reacción de conversión de bisulfito y errores de secuenciación, tal que se utilicen bases que tienen más del percentil 99.9 de cobertura en cada muestra.

Para calcular las metilaciones diferenciales entre las muestras se utilizó la función `DiffMeth` con los parámetros: `slim = TRUE`, `weighted.mean = TRUE`. Las citosinas metiladas diferenciales (DmC) se definieron como citosinas que tenían un valor  $q < 0,01$  y una diferencia de metilación  $> 25\%$  entre las tasas



de metilación de las muestras. Solo se consideraron DmC presentes en las 3 réplicas biológicas de cada grupo de plantas para hacer más rigurosa nuestra detección de cambios de metilación.

Las muestras se compararon independientemente en cada modelo, tal que en el modelo transgénico se contrastó L1 (control) vs L8 (prueba); y por su parte, en el modelo silvestre W (control) vs H (prueba).

#### 5.5.3.4 *Análisis de enriquecimiento*

Se realizó un análisis de enriquecimiento de ontología génica para identificar las funciones biológicas o moleculares o componentes celulares que se están viendo más impactados. Para el análisis solo se consideraron categorías GO significativas con valor  $q < 0,05$ .

#### 5.5.3.5 *Análisis de correlación entre metilación y expresión diferencial en L8*

En el caso del modelo transgénico se buscó darle una mayor profundidad al análisis bioinformático de metilación diferencial, por lo que se contrastaron con los datos obtenidos en estudios anteriores del modelo L8 y L1 donde se identificaron genes de expresión diferencial (DEGs) (Cárdenas-Manríquez et al., 2018). Para ello se utilizaron los paquetes stats y ggplot2 de R, donde se utilizó la función de ANOVA y análisis múltiple de Duncan para la creación de las gráficas, así como la función heatmap.

### **5.6 Análisis de estabilidad transgeneracional de marcas de metilación: objetivo 3**

Para el último objetivo nos enfocamos únicamente en el modelo de plantas silvestres (W), plantas tratadas con  $H_2O_2$  (H), y las plantas progenie de las H de lotes anteriores (F). En este caso, el fin era determinar si algunas características inducidas por la aplicación exógena de  $H_2O_2$  en las plantas parentales permanecían en la siguiente generación a manera de memoria.

Las características por evaluar consistieron en un análisis de WGBS para ver los cambios a nivel de genoma en metilación en sitios específicos, y por otro en un reto a estrés abiótico para evaluar la respuesta fenotípica de las plantas, para el cual se seleccionó el estrés hídrico.

#### 5.6.1 *WGBS*

Se mandaron muestras de DNA de plantas progenie F (n=3) al Instituto de Genómica de Beijing (BGI) para la secuenciación, como se describió en la sección anterior 5.5. El procesamiento se realizó de manera similar a lo mencionado en la sección 5.5.3. En este caso se identificaron las metilaciones presentes en F en contraste con W, para posteriormente comparar contra las metilaciones identificadas previamente en H y determinar los cambios y permanencias entre generaciones.

### 5.6.2 *Ensayo de tolerancia a sequía*

Se realizó una prueba de estrés de sequía de acuerdo con estudios previos en plantas transgénicas L8 y L1 (Cárdenas-Manríquez et al., 2016), para comprobar el fenotipo de tolerancia a sequía en las plantas silvestres (W), las plantas elicidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H), plantas progenie (F1) y se adicione un grupo de plantas progenie sometidas a el tratamiento de elicitación (FH) por la curiosidad de ver el efecto que tendría sobre la progenie.

#### 5.6.2.1 *Lugar experimental*

El experimento se llevó a cabo en un patio con piso de cemento y techo de policarbonato translucido. Se midieron las variaciones diarias de Temperatura y Humedad ambiental del espacio, durante 7 días previos al desafío de estes hídrico, con un dispositivo Data Logger GSP-6 Elitech. Las mediciones se tomaron de forma continua con un intervalo de 30 min entre mediciones.

#### 5.6.2.2 *Condiciones de estrés hídrico*

Las condiciones hídricas consistieron en diferentes grados de capacidad del campo de agua: control (100%), estrés hídrico moderado (MHS = 40 - 45%) y estrés hídrico severo (SHS = 20 - 25 %). El estrés hídrico se mantuvo durante 21 días. Diariamente se realizó un ajuste de la humedad de suelo en cada planta por relación volumen/peso con riego manual.

El desafío de estrés se inició una semana después del tratamiento de elicitación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. En ese momento, todas las plantas fueron trasplantadas de charola a bolsas de plástico con la misma cantidad de sustrato ajustado a la humedad correspondiente a las 3 condiciones: C, MHS y SHS. De cada uno de los grupos de plantas mencionado anteriormente (W, H, F1 y FH) se destinaron 15 plantas de cada uno a cada una de las 3 condiciones hídricas.

Al considerarse homogéneas las condiciones ambientales dentro del espacio experimental, las plantas se acomodaron en bloques separados de acuerdo con la condición hídrica para mayor control de la humedad de las plantas. Dentro de cada bloque, las plantas se acomodaron al azar, y para mayor homogeneidad de las plantas, estas se fueron rotando de posición dentro del boque diariamente durante el ajuste de humedad.

#### 5.6.2.3 *Muestreo y evaluación morfológica*

Se tomaron muestreos a los días 0, 7, 14 y 21. En cada jornada, se realizó una selección aleatoria de 3 plantas (n=3) de cada grupo de planta en cada una de las condiciones hídricas. Se tomó tejido foliar apical de cada planta, como se mencionó en la sección 5.2.1. Además, se realizó medición de características morfológicas de las plantas como se describió en la sección 5.2.2.

#### 5.6.2.4 Cuantificación de prolina

La prolina se midió mediante el método colorimétrico optimizado basado en ninhidrina descrito por Lee et al. (2018). Para ello, se pulverizaron 30 mg de tejido foliar congelado en un mortero de porcelana y se homogeneizó con 1 ml de ácido sulfosalicílico al 1%. La reacción se preparó con 66  $\mu$ l de extracto y 132  $\mu$ l de reactivo de ninhidrina (1,25% de ninhidrina en ácido acético glacial al 80%) en tubos de Eppendorf. Todas las muestras se midieron por reacción triplicada. La reacción se incubó en un baño de agua a 100 °C durante 60 minutos y luego 10 minutos en un baño de hielo. La absorbancia de la reacción a 510 nm se leyó utilizando un espectrofotómetro de microplacas Multiskan Go (Thermo Scientific). Para la cuantificación, se preparó una curva estándar de prolina de 0 a 250  $\mu$ M por triplicado y se utilizó para calcular el contenido de prolina en muestras.

#### 5.6.2.5 Actividades enzimáticas PAL, SOD y CAT

Las actividades de fenilalanina amoníaco-liasas (PAL, EC 4.3.1.5), catalasa (CAT, EC 1.11.1.6) y superóxido dismutasa (SOD, EC 1.15.1.1) fueron medidas por métodos espectrofotométricos descritos por Parola-Contreras et al. (2020) (Parola-Contreras et al., 2020). Para el extracto enzimático, se pulverizaron 300 mg de tejido foliar congelado en un mortero de porcelana y se homogeneizaron con 1 ml de buffer de fosfato de 50 mM (pH 7.8). La mezcla se centrifugaba a 12.000 rpm durante 15 min a 4 °C, y el sobrenadante se recogía y almacenaba a -20 °C hasta que se usaba para ensayos.

La actividad PAL fue determinada por la formación de ácido cinámico. La mezcla de reacción consistió en 230  $\mu$ l 100 mM tampón de borato pH 8.8 con 10 mM L-fenilalanina, y 20  $\mu$ l de extracto enzimático, que se incubó a 40 °C durante 60 min. La reacción se detuvo agregando 50  $\mu$ l 1 N HCl, y la absorbancia de la solución se midió a 290 nm en un espectrofotómetro de microplacas Multiskan Go. Se realizó una curva estándar de ácido cinámico para el cálculo del producto de reacción considerando que una unidad (U) de PAL liberó 1  $\mu$ mol de ácido cinámico por minuto a pH 8.8 y 40 °C.

La actividad de CAT se determinó por la tasa de disminución de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en la reacción. El volumen de reacción se ajustó a una microplaca de 96 pocillos. La mezcla de reacción contenía 200  $\mu$ l 50 mM tampón de fosfato de potasio (pH 8.0), 30  $\mu$ l 100 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y 20  $\mu$ l de extracto enzimático. El cambio en la absorbancia a 240 nm se midió en 6 min con una medida cada min. La actividad CAT se calculó considerando que una unidad (U) de CAT descompone 1  $\mu$ mol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por min a pH 8.0 y 25 °C.

Actividad de SOD determinada por la inhibición de la reducción fotoquímica de tetrazolio azul nitro (NBT). El volumen de reacción se ajustó a una microplaca de 96 pocillos. La mezcla de reacción contenía 150  $\mu$ l buffer de fosfato de 50 mM (pH 7.8), 30  $\mu$ l 10 nM EDTA, 30  $\mu$ l 130 mM de metionina, 30  $\mu$ l 750 nM NBT, 30  $\mu$ l 20 nM de riboflavina, 25  $\mu$ l de agua destilada y 5  $\mu$ l de extracto enzimático. La mezcla de reacción se expuso a la luz solar durante 30 minutos y luego, se midió la absorbancia a 560 nm. La actividad de SOD se calculó considerando que una unidad (U) de actividad de SOD causa la reducción de inhibición del 50% de NBT a pH 7.8 y 25 °C.

La concentración de proteínas en extractos enzimáticos se determinó de acuerdo con lo informado por Bradford (1976) con una ligera modificación para ajustar el volumen de reacción a la microplaca de 96

pocillos. La mezcla de reacción consistió en 230 µl de reactivo Bradford y 20 µl de extracto enzimático. La absorbancia se midió a 595 nm. Para el cálculo se preparó una curva estándar de albúmina sérica bovina.

Todas las muestras y estándares se prepararon por triplicado para cada ensayo. Las actividades PAL, CAT y SOD se expresaron como proteína U/mg.

#### 5.6.2.6 Cuantificación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

La concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras se midió con el kit de ensayo Amplex Red Hydrogen Peroxide/Peroxidase (Thermo Fisher Scientific) de acuerdo con el protocolo de fabricación. Los extractos enzimáticos se utilizaron para la reacción, y la absorbancia de la mezcla de reacción se leyó a 590 nm. Para el cálculo de la concentración de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las muestras se preparó una curva estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sugiere el proveedor.

#### 5.6.2.7 Análisis de expresión génica

Para el análisis de expresión génica se siguieron los métodos descritos en la sección 5.4, con una modificación: en este caso por cuestiones de disponibilidad de reactivos se utilizó el kit iScript Adv cDNA para RT-qPCR (BioRad) para la síntesis de cDNA.

Los genes considerados para el análisis de expresión génica consistieron en: chalcona sintasa (*CHS*), y las acuaporinas *AQP1* y *PIP1*. El gen de referencia consistió en el factor de elongación 1 alfa (*EF1α*):

Gen	# Acceso NCBI	Secuencia de primers	Amplicón (pb)	Referencia
CHS	NM_001326166.1	F: TTCTCCGATTGGCCAAGGAC R: CACTTGGGCCACGAAATGTG	96	(Sáenz-de la O et al., 2021)
AQP	AJ001416.1	F: TTTCCTCAAGAAGCCTTAATCTTT R: TTGAACACAAGAAAATCCACATT	116	(Mahdih et al., 2008)
PIP1	AF440271.1	F: CTGGGTTGGACCATTCATT R: TTGACAGACACCAGCAAGAGA	150	(Mahdih et al., 2008)
EF1α	NM_001326165.1	F: TGAGATGCACCACGAAGCTC R: CCAACATTGTCACCAGGAAGTG	59	(Schmidt & Delaney, 2010)

Para el análisis de expresión solo se consideraron las muestras correspondientes a los días 0 y 21.

#### 5.6.2.8 Análisis estadísticos

Se utilizó el programa GraphPad Prism 6.0 para realizar los análisis estadísticos. En este caso, se utilizó un análisis de varianza ANOVA de dos vías ( $P > 0.05$ ) para analizar datos morfológicos, actividades enzimáticas y expresión génica utilizando tratamientos de sequía y grupos de plantas como factores. Para cada día de medición se realizó un análisis independiente. Los datos se sometieron a de diferencias significativas mediante la prueba de comparaciones múltiples de Tukey ( $\alpha > 0.05$ ).

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

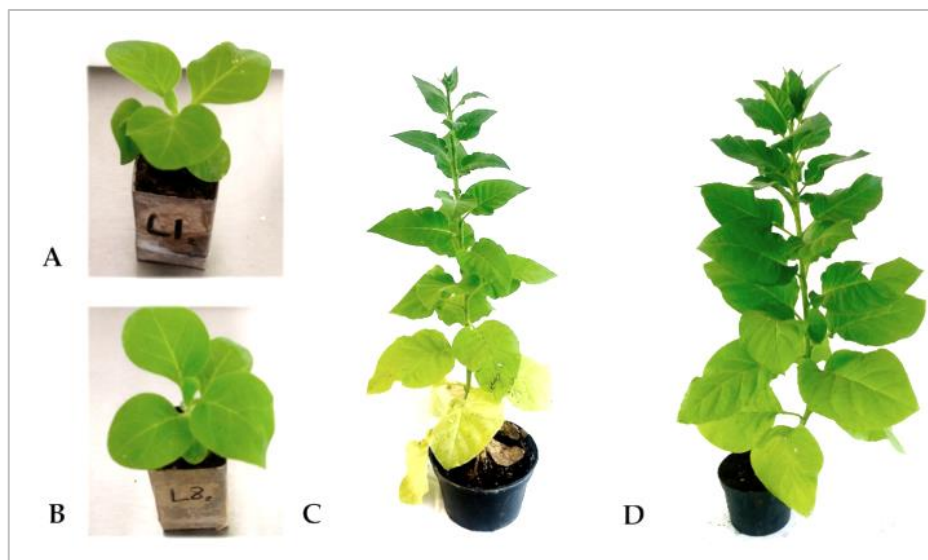
Los resultados del trabajo de tesis se presentan en forma ordenada de acuerdo con el cumplimiento de cada objetivo para una mejor comprensión y organización de los datos. Como primer punto, es menester recordar que se trabajó de forma paralela e independiente con dos modelos:

- i. Modelo transgénico: plantas L8 (sobreproducción de  $H_2O_2$ ) y L1 (línea acigótica). Estas se estudiaron con el propósito de profundizar en la caracterización del modelo transgénico que se tiene en el grupo de investigación, el cual nos ayuda a profundizar en el conocimiento del efecto del  $H_2O_2$  en las respuestas a estrés en la planta de forma sistemática.
- ii. Modelo silvestre: plantas control (W), y plantas elicidadas con  $H_2O_2$  (H); y en la parte de herencia se adicionaron: plantas de primera generación (F) y plantas progenie elicidadas (FH). Este modelo se consideró con el objeto de evaluar el impacto en la planta a nivel epigenético, y elucidar algunos de los alcances de la elicitación para su uso aplicado en agricultura.

### 6.1 OBJETIVO 1: IMPACTO EN LA METILACIÓN GLOBAL: AMBOS MODELOS

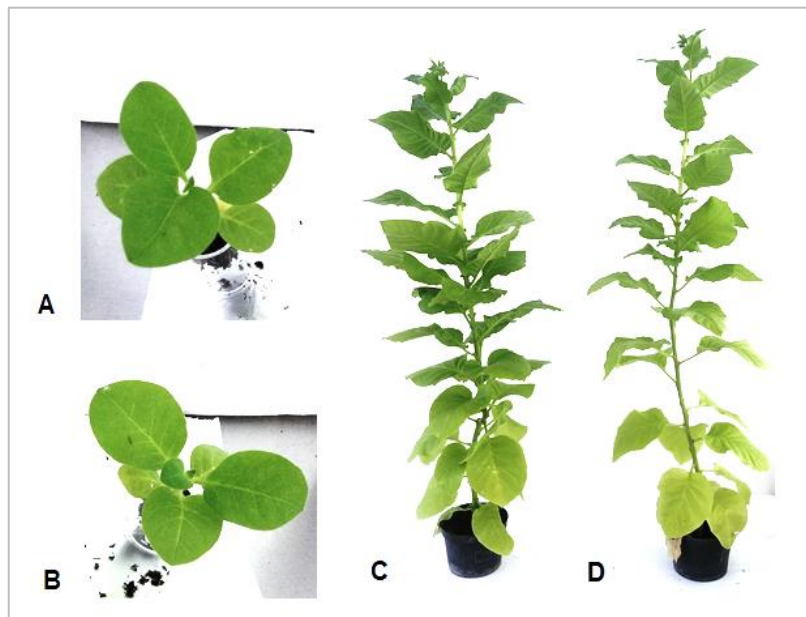
#### 6.1.1 Comparación morfológica de plantas

Las plantas transgénicas tienen un crecimiento típico en las condiciones experimentales utilizadas, como se muestra en la Figura. El grupo L8 mostró un ligero retraso de crecimiento en comparación con L1, probablemente asociado con las demandas de energía de su fenotipo. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la altura, el peso fresco, el diámetro del tallo y el contenido de clorofila, como se observa en la Figura 7.



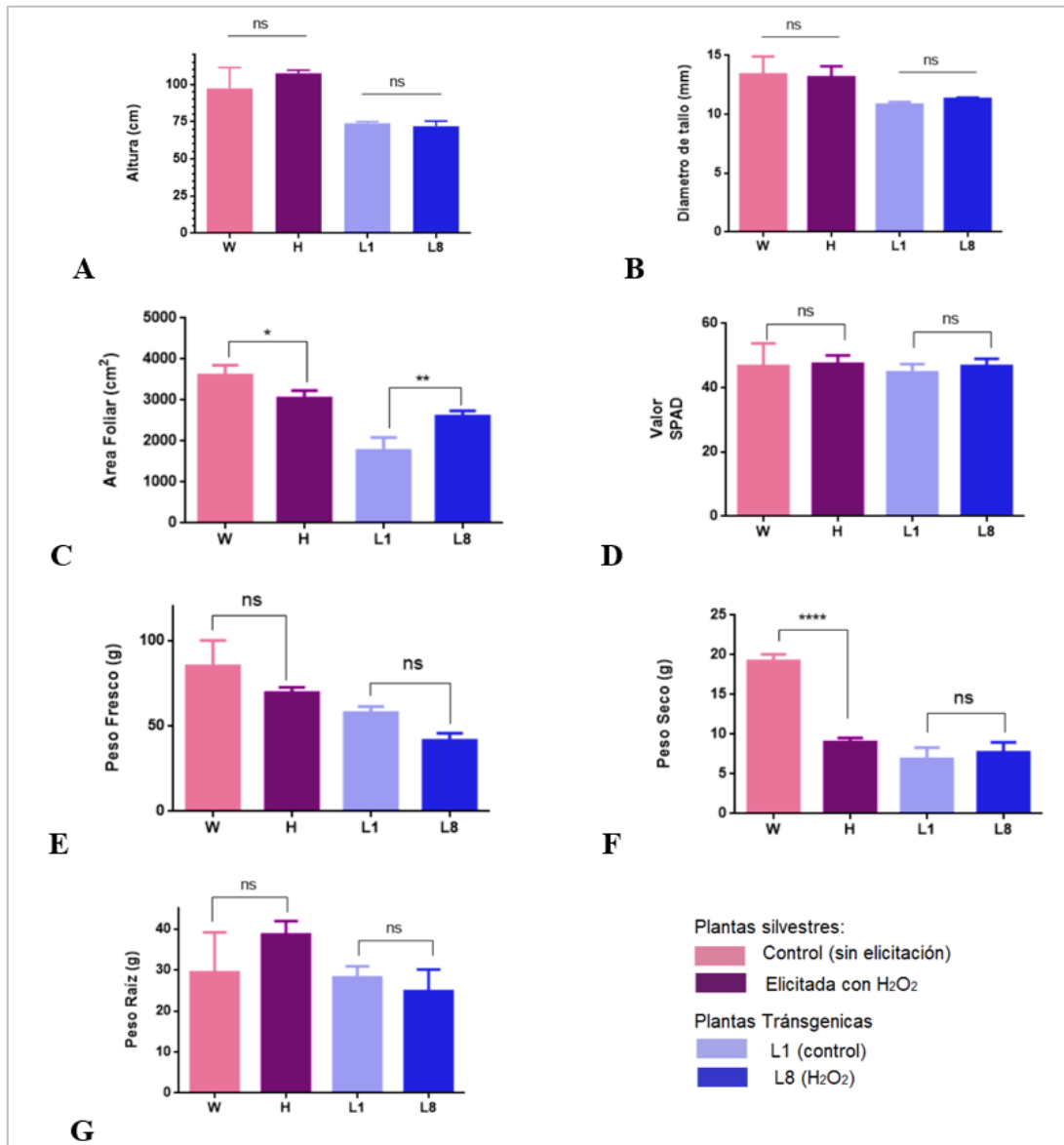
**Figura 7.** Morfología de las plantas transgénicas. Se muestran las características morfológicas de las plantas L8 (B y D) y L1 (A y C) en 2 etapas edades diferentes: 6 semanas y 3 meses.

El único carácter en donde se observó una diferencia significativa fue en el área foliar, donde las plantas L8 tuvieron una mayor área foliar en comparación con las L1. Por lo tanto, como se ha mencionado en trabajos anteriores, los niveles de sobreproducción de  $H_2O_2$  en L8 no afectan significativamente el crecimiento y la morfología de las plantas durante su ciclo de vida.



**Figura 8.** Morfología de las plantas silvestres. Se muestran las características morfológicas de las plantas control (A y C) y elicidadas con  $H_2O_2$  (B y D) en 2 etapas: 6 semanas y 3 meses.

En el modelo de plantas silvestres, las plantas elicidadas con  $H_2O_2$  en las primeras etapas de crecimiento no presentaron diferencias con la silvestre, como se observa en la Figura 8. Se observó una aceleración en su desarrollo en comparación con las silvestres, que se observó inclusive en una floración adelantada. Sin embargo, en cuanto a las características morfológicas evaluadas a los 3 meses, las únicas donde se encontraron diferencias significativas fueron en el área foliar y el contenido de peso seco, siendo menores en el caso de las plantas elicidadas (Figura 9).



**Figura 9.** Características morfológicas de plantas a los 3 meses. Se muestran las mediciones de A) Altura de la planta, B) Ancho de tallo, C) Área foliar, D) Estimación de clorofila, E) Peso fresco de hojas, F) Peso seco de hojas, G) Peso fresco de raíz, de las plantas silvestres elicidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y control, y las plantas tránsrgénicas L8 y L1 a los 3 meses de edad. Grupos: W (control silvestre), H (elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), L1 (tránsrgénica acigótica, control), L8 (tránsrgénica con sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno). En caso de diferencia significativa se indica con un \*, mientras que en caso contrario se indica con ns.

## 6.1.2 Cuantificación de niveles de metilación global

### 6.1.2.1 Extracción de gDNA

Las extracciones de gDNA del tejido foliar de las plantas de tabaco tuvieron que ser estandarizadas previamente al proceso de extracción de las muestras, debido a la alta concentración de polisacáridos y polifenoles. Esto se especulaba por la presencia de una coloración café en la muestra de gDNA final. De esta manera se recurrió al protocolo modificado de CTAB, con el que se logró obtener extracciones de una buena concentración, pureza e integridad para los análisis subsecuentes.

En la Tablas 1 se muestran los datos obtenidos en el nanodrop de cada una de las muestras de gDNA correspondiente a cada individuo, en los 2 muestreos realizados a diferente edad de la planta.

**Tabla 1** Concentración y relación 260/280 y 260/230 gDNA de muestras de tabaco a 1y 3 meses de edad de tejido foliar y radicular

Grupo	n	gDNA de hoja			gDNA de raíz			t
		[ ] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280	260/230	[ ] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280	260/230	
W	a	487.1	1.96	2.16	460.1	1.97	2.15	1 m e s
	b	153.8	1.89	1.98	548.3	1.96	1.94	
	c	154.1	1.83	2.02	539.5	1.95	2.13	
H	a	131.9	1.83	1.91	469.2	1.93	1.85	
	b	165.0	1.85	2.04	406.5	1.94	2.03	
	c	272.6	1.85	2.00	661.4	1.95	2.14	
L8	a	110.1	2.01	2.29	549.2	1.96	2.08	
	b	302.9	1.83	1.92	555.1	1.96	2.01	
	c	208.3	1.85	1.95	683.2	1.98	2.21	
L1	a	253.5	1.85	1.86	327.2	1.98	2.06	
	b	303.6	1.84	1.90	261.7	1.91	1.98	
	c	200.0	1.85	1.71	462.1	1.97	1.98	
W	a	1 323.0	2.01	2.30	367.7	1.90	1.92	3 m e s
	b	3 936.7	2.00	2.24	424.0	1.86	1.80	
	c	1 224.4	1.57	1.69	280.3	1.87	1.84	
H	a	3 332.2	2.03	2.29	176.5	1.87	1.63	
	b	2 895.4	2.00	2.22	667.1	1.88	1.62	
	c	2 703.1	1.99	2.22	197.0	1.88	1.95	
L8	a	2 549.8	1.92	2.20	782.6	1.89	1.95	
	b	2 467.5	1.95	1.97	729.7	1.91	2.10	
	c	3 077.0	1.98	2.24	463.1	1.87	1.85	
L1	a	2 409.4	1.90	2.18	220.5	1.82	1.51	
	b	2 574.8	1.94	2.16	218.6	1.84	1.54	
	c	2 871.5	1.89	2.07	361.1	1.86	1.80	

Debido que se tuvieron buenas extracciones de gDNA, se puede garantizar que el material utilizado en el análisis siguiente se encontraba en las mejores condiciones, minimizando las variaciones por materia prima. Adicionalmente, para todas las muestras se realizó una dilución para asegurar que el material de input fuera igual para todas las muestras.



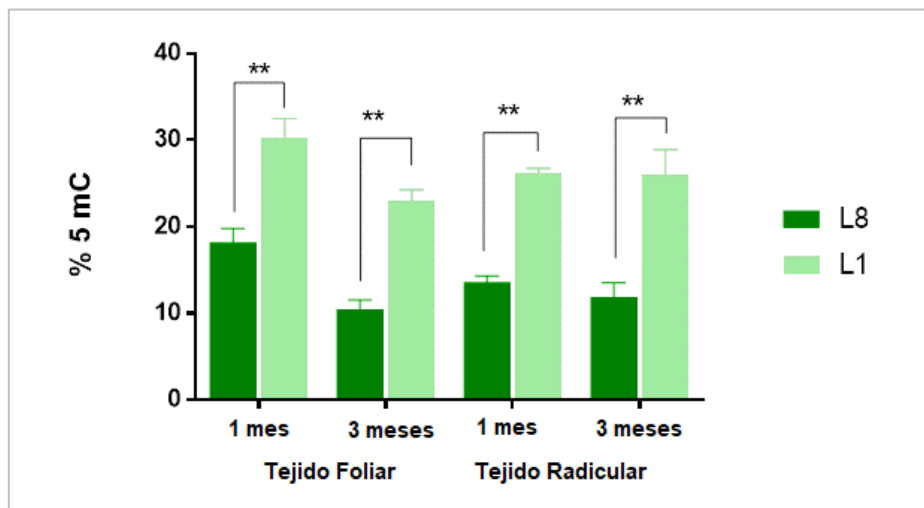
### 6.1.2.2 Elisa Metilación global

La cuantificación general de metilación global se realizó para detectar si existían diferencias significativas entre los grupos de plantas a analizar en el estudio (plantas transgénicas y plantas elicidadas). La cuantificación se realizó por un método espectrofotométrico mediante un Kit Elisa. La curva de calibración para dicho ensayo se muestra en la sección de anexos 9.1.1. El kit Elisa utilizado es indicado para múltiples organismos. Sin embargo, hay 2 aspectos a considerar. El primero es que los cálculos de porcentaje de metilación están dados en datos de los sitios CG en el genoma para *E. coli*. En el manual se indica que para datos de otros organismos es necesario utilizar un factor de corrección dado en la relación de sitios CG/genoma de la especie específica contra *E. coli*. En el trabajo de Ashikawa (2001) se dan datos de esta relación para diversas especies vegetales que incluyen arroz (0.039), *Arabidopsis* (0.022), sorgo (0.035) y maíz (0.039) (Ikuo Ashikawa, 2001). Debido a que no se encontró ninguna referencia de la relación de sitios CG/genoma específico para tabaco, se utilizó para fines prácticos el dato de *Arabidopsis*, que correspondió a un factor de corrección de 3.41. Sin embargo, hay una gran diferencia entre el tamaño de genoma de estas 2 especies, tal que para *Arabidopsis* es de 125 Mb y para tabaco es de 4.5Gb, lo cual da margen a una posible variación del valor real. Sin embargo, esto no altera la tendencia y comportamiento en general de los tratamientos.

Otro aspecto para considerar es que el kit está diseñado para la detección de sitios de metilación CG, que es el contexto de metilación mayoritario en la mayoría de los organismos. Sin embargo, en plantas se encuentra una proporción de metilación CHG y CHH que varía de entre 15 a 5 %, con variaciones especie-específicas. Por lo que el uso de este en plantas si bien es significativo para identificar variaciones generales, puede omitirse variaciones en estado de metilación de otros contextos.

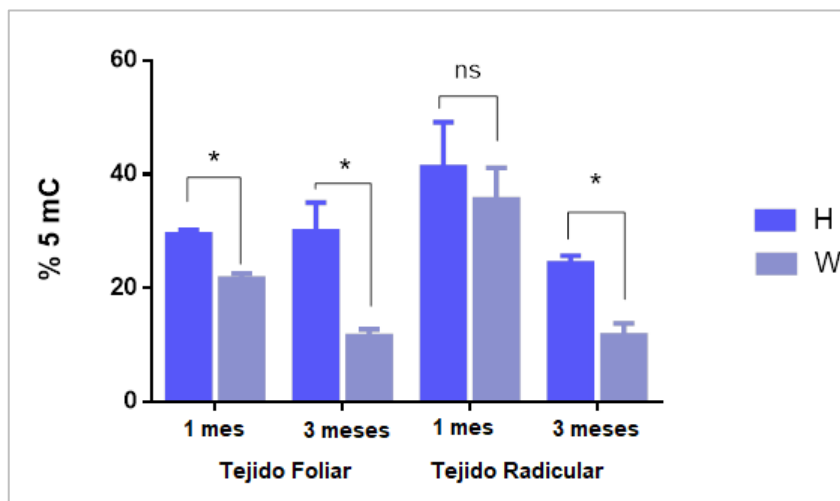
En el caso de las plantas transgénicas se encontró un patrón muy contrastante entre las plantas sobre productoras de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (L8) y las plantas acigóticas (L1), como se observa en la Figura 10. Las plantas L8 mostraron una tendencia significativa a la hipometilación e hipermetilación para las plantas L1. En las muestras de tejido foliar se obtuvo una estimación de un  $18.18 \pm 3.63$  % 5mC para la muestra de 1 mes y  $10.57 \pm 2.76$  % 5mC para la de 3 meses. Para las plantas L1 los valores correspondieron a un  $30.31 \pm 1.78$  % y  $22.96 \pm 1.05$  % respectivamente. De forma similar, en las muestras de tejido radicular se observó una hipometilación marcada para las muestras de L8, donde se obtuvieron valores de porcentaje de metilación de  $12.74 \pm 1.76$  % 5 mC para la muestra del mes, y de  $11.87 \pm 2.42$  % para el trimestre. Por su parte, las muestras de las plantas L1 correspondió a  $26.19 \pm 1.49$  % y  $25.98 \pm 2.38$  % respectivamente.

Las diferencias entre los porcentajes de metilación general 5 mC entre las plantas L8 y L1 es alrededor de 12.13 % al mes, y 12.39 % al trimestre para el tejido foliar; y de 13.45 % y 14.11 % respectivamente para el tejido radicular. Como se observa, la variación temporal observada es mínima, sugiriendo que el estado de metilación general del genoma permanece relativamente constante en cuanto a los sitios metilados/no metilados distribuidos en el genoma.



**Figura 10.** Metilación global en plantas transgénicas. Se indica la diferencia significativa entre las diferentes líneas L8 (con sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y L1 (control) en cada tejido por asteriscos (\*).

En el caso de las plantas elicidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H) en comparación con las plantas silvestres (W) control también se observó un patrón muy contrastante, aunque en este caso las plantas H mostraron una tendencia significativa a la hipermetilación, como se observa en la Figura 11. En las muestras de tejido foliar se obtuvo una estimación de un  $29.40 \pm 0.94\%$  5mC para la muestra de 1 mes y  $29.99 \pm 4.10\%$  5mC para la de 3 meses para las plantas H. Por su parte para las plantas W los valores correspondieron a un  $21.60 \pm 1.06\%$  y  $11.52 \pm 2.56\%$  respectivamente. De forma similar, en las muestras de tejido radicular los porcentajes de metilación cuantificados fueron de  $41.28 \pm 4.67\%$  5mC para la muestra del mes, y de  $24.31 \pm 1.35\%$  para el trimestre para el grupo H; contra un  $35.55 \pm 4.43\%$  y  $11.69 \pm 1.74\%$  respectivamente para el grupo W.



**Figura 11.** Dinámica en la metilación global de DNA en plantas de tabaco silvestres elicidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Se indica la diferencia significativa entre las plantas elicidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H) y las plantas control (W) en cada tejido por asteriscos (\*). En el caso de no significativo se muestra como “ns”.

### 6.1.3 Análisis de expresión de genes relacionados a metilación de DNA

El drástico contraste entre las plantas de interés y los controles en los modelos de tabaco transgénico y silvestre elicitado, nos llevó a preguntarnos si esto se debía a una alteración en la actividad de las enzimas metilasas y demetilasas (Figura 4) involucradas en el proceso de metilación de DNA, y por ende en el estatus de metilación global del organismo. Por ello, se procedió a realizar un análisis de expresión de los genes *MET1*, *CMT3*, *DRM2* y *ROS1* en las muestras de tabaco tanto transgénico como silvestre.

#### 6.1.3.1 Extracción de RNA

Las extracciones de RNA de tejido foliar de las plantas de tabaco obtenidas por el método del Trizol tuvieron una buena calidad y concentración como se muestra en la tabla 2.

**Tabla 2.** Datos de extracción de RNA

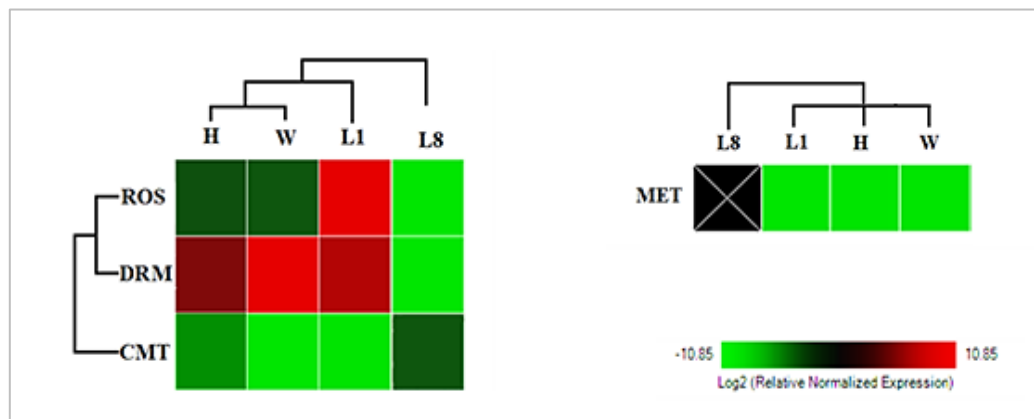
Grupo	n	[ ] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280	260/230
L8	a	2 432	1.54	1.18
	b	2 952	1.39	1.21
	c	1 756	1.48	1.12
L1	a	2 514	1.38	1.02
	b	2 525	1.41	1.11
	c	2 581	1.56	1.15
W	a	2 048	1.59	0.99
	b	3 104	1.57	1.05
	c	2 553	1.60	1.14
H	a	452.8	1.51	1.17
	b	494.4	1.37	1.28
	c	428.1	1.38	1.25

#### 6.1.3.2 qPCR

El análisis de expresión relativa de los genes *MET1*, *CMT3*, *DRM2* y *ROS1* se muestra en la Figura 12. Se encontró una similitud en el patrón de expresión en las plantas W, H y L1, siendo la L8 el grupo más diferenciado. Respecto al gen *MET1*, que corresponde al mantenimiento de metilación CG, en las muestras de L8 no se logró detectar amplificación. Se considera que es una cuestión particular de la muestra, ya que se logró una correcta amplificación para las demás muestras y para el control positivo adicionado para cada gen en cada corrida. A pesar de hacer varios intentos la detección en L8 fue fallida. No se considera que la expresión sea nula, pero quizás se encuentra a un nivel muy bajo de expresión por debajo del límite para su cuantificación. En las demás muestras no se encontró una diferencia significativa entre muestras.

El gen *CMT3*, correspondiente a la metilación CHG, se detectó un incremento en la cantidad de transcritos de este gen en las muestras de H en comparación con W, y una mayor cantidad en L8 en

comparación con L1, lo que sugiere una mayor expresión y, por ende, actividad de metilación en este contexto. Por su parte, el gen *DRM2*, correspondiente a metilación *de novo*, presentó una menor cantidad de transcritos en la línea L8. No se encontraron diferencias entre H y L1, sin embargo, ambas mostraron una menor expresión en comparación con W. Por último, en el gen *ROS1* correspondiente a la demetilasa, la menor expresión se encontró en L8 y contrariamente la mayor en L1. En las plantas silvestres no se encontraron diferencias significativas.



**Figura 12.** Expresión de genes MET1, DRM2, CMT3 y ROS1. Se muestran las expresiones relativas de genes relacionados a metilación en las plantas transgénicas L8 (con sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y L1 (acigótica, control) así como en las plantas silvestres H (elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y control (W). El color de escala representa la expresión log2 fold-change (rojo = sobreexpresión, verde = baja expresión). El cuadro correspondiente a MET en L8 indica una nula detección del gen.

Estos datos sugieren por un lado que el modelo transgénico muestra diferencias contrastantes con el modelo silvestre, en particular en la L8, donde se sugiere una alteración en la metilación CHH, que podría estar asociada a la sobreproducción característica del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de esta línea. La L1, muestra un comportamiento similar a la silvestre, por lo que se demuestra su validez como control en el modelo de estudio de este trabajo.

Por su parte, en el modelo silvestre, en particular en las muestras elicidadas con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, se sugiere que hay un incremento en la metilación CHH y en la metilación de novo por DMR2.

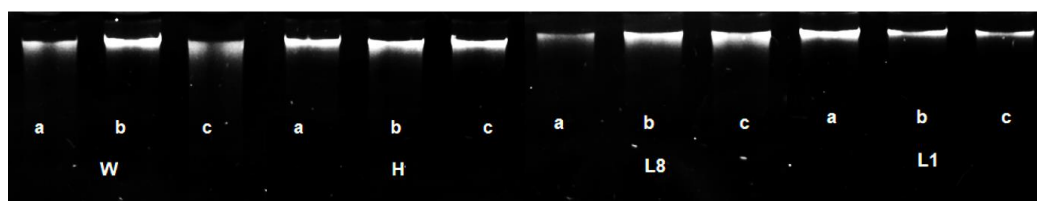
## 6.2 OBJETIVO 2: ANÁLISIS DE METILACIÓN POR SECUENCIACIÓN DE GENOMA: MODELO TRANSGÉNICO

### 6.2.1 Extracción de gDNA

En este caso las muestras de gDNA fueron extraídas mediante columnas de purificación para asegurar su pureza y calidad, debido a que serían utilizadas para secuenciación. Como se observa en la Tabla 3 y Figura 13, se obtuvieron índices de pureza idóneos, empero se comprometió la concentración de material extraído a menores niveles que los obtenidos anteriormente. Sin embargo, esto no afectó su viabilidad para utilizarse para la secuenciación por bisulfito (WGBS).

**Tabla 3** Concentración gDNA y relación 260/280 y 260/230 de muestras de tabaco para secuenciación

Grupo	n	[ ] $\mu\text{g}/\mu\text{l}$	260/280	260/230
W	a	113.6	1.85	2.13
	b	150.4	1.83	2.10
	c	68.4	1.83	2.04
H	a	100.2	1.85	2.06
	b	97.7	1.86	1.82
	c	83.2	1.83	1.74
L8	a	44.3	1.82	1.78
	b	91.4	1.88	1.74
	c	70.9	1.80	1.56
L1	a	79.4	1.87	1.58
	b	65.8	1.77	1.28
	c	54.4	1.86	1.62



**Figura 13.** Gel de electroforesis gDNA de muestras de tejido foliar de tabaco.

### 6.2.2 Análisis bioinformático

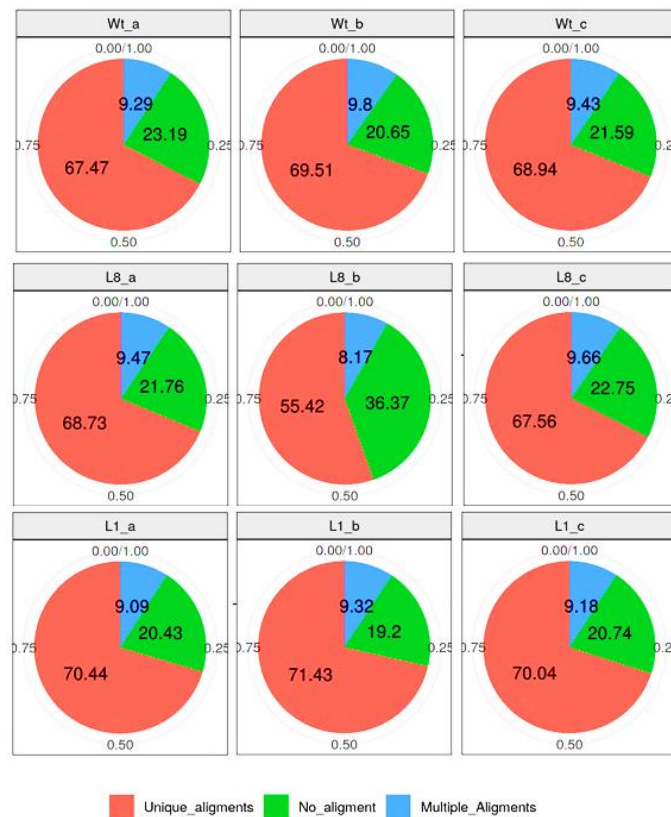
Se obtuvo un promedio de lecturas limpias de 461205823 por cada muestra, con puntaje de calidad del promedio Q20 de 97.73%. Los datos se muestran en la Tabla 4. Los metilomas presentaron una eficiencia de mapeo con el genoma de referencia en un rango entre 55 y 71% de alineaciones únicas por biblioteca como se observa en la Figura 14. En estudios similares se han trabajado con datos que reportan una eficiencia de mapeo superior a 45 %, por lo que se considera que los datos presentados en este trabajo tienen una buena confiabilidad por su nivel de mapeo con el genoma de referencia.

**Tabla 4.** Resultados estadísticos de lecturas de secuenciación

Grupo	n	No. Lecturas	No. Bases	Q20 (%)	GC (%)	Archivo (Gb)
W	a	468,171,434	70,225,715,100	98.19	28.08	14.82 y 14.91
	b	466,950,564	70,042,584,600	98.22	27.69	14.79 y 14.84
	c	467,016,254	70,052,438,100	98.18	28.11	14.83 y 14.89
H	a	466,788,074	70,018,211,100	98.08	27.92	14.82 y 15.05
	b	467,870,308	70,180,546,200	97.99	26.46	14.95 y 14.99
	c	466,716,804	70,007,520,600	97.99	26.91	14.96 y 14.98
L8	a	466,865,970	70,029,895,500	98.06	27.36	15.00 y 14.98
	b	467,240,236	70,086,035,400	97.96	27.08	15.04 y 14.96
	c	432,492,428	64,873,864,200	97.86	27.98	14.02 y 13.96
L1	a	466,685,804	70,002,870,600	97.92	26.15	14.97 y 14.91
	b	466,931,508	70,039,726,200	97.89	26.30	14.99 y 14.95
	c	467,018,992	70,052,848,800	97.89	26.54	15.04 y 14.95

\* Q20: parámetro de calidad, indica el número de nucleótidos con una calidad superior a 20/nucleótido (lectura limpia 1, lectura 2). Donde el valor de 20 corresponde con un error de secuenciación < 1 %.

\* Archivo (Gb): se indican los tamaños de los archivos originales en gigabytes, en formato GZ. Se muestran dos valores por muestra, correspondientes a cada archivo del par de secuenciación.

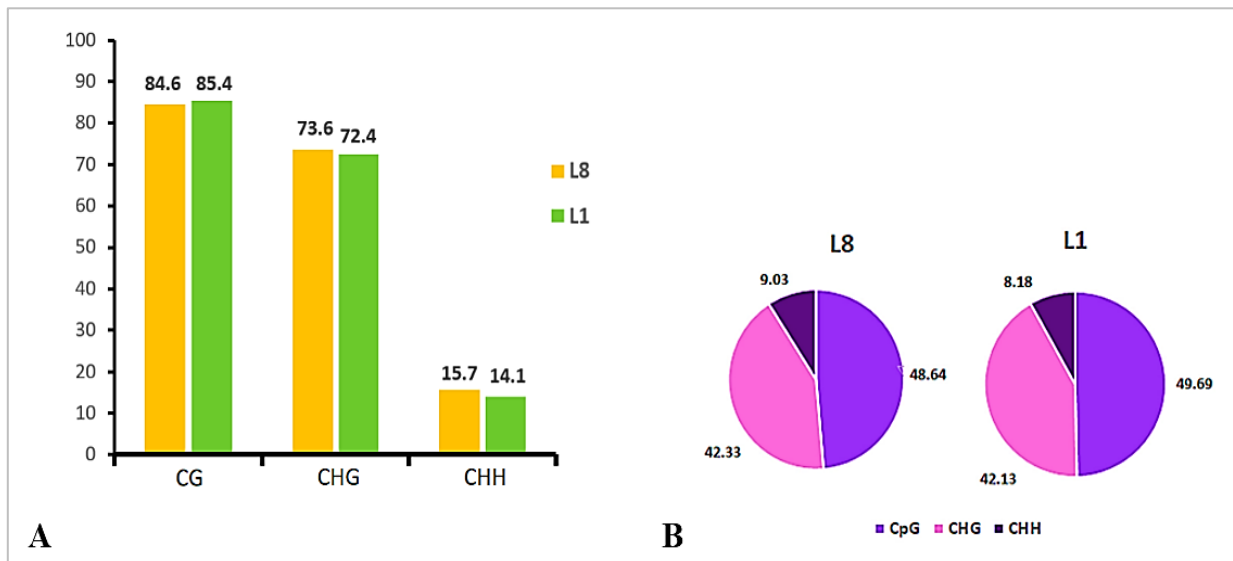


**Figura 14.** Alineación de los datos de secuenciación de las muestras con el genoma de referencia.

Para caracterizar los metilomas transgénicos del tabaco, se generaron mapas de resolución de base única de metilación de DNA por secuenciación de bisulfito del genoma completo (WGBS) para plantas de 6

semanas de edad de ambas líneas de tabaco transgénico. Cada línea transgénica se secuenció con tres réplicas biológicas, y se produjo y secuenciaron todas las bibliotecas de secuenciación.

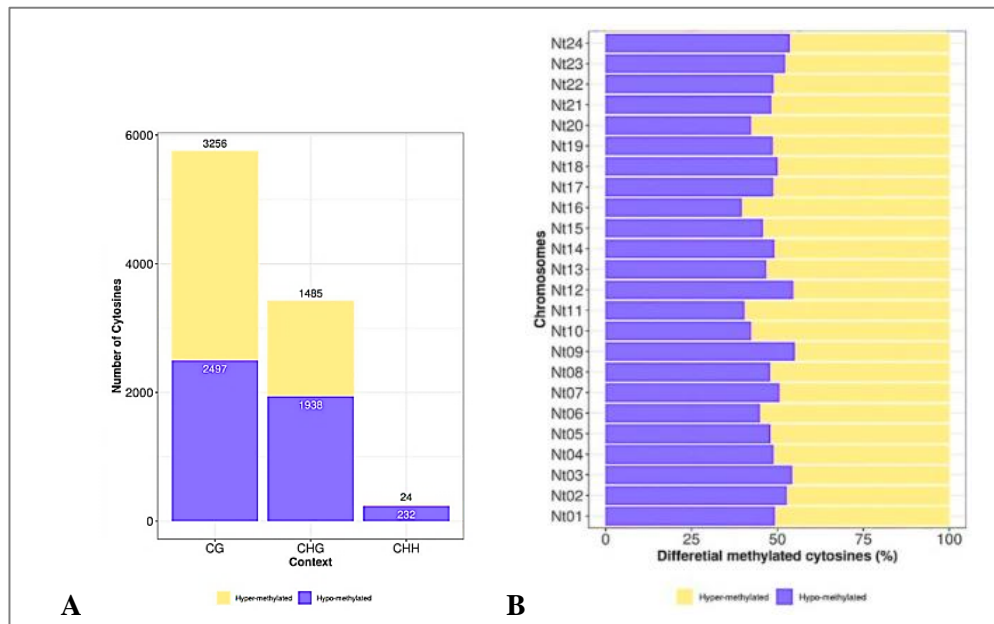
El principal contexto de metilación fue CG, en ambas plantas transgénicas, con 84,6% para L8 y 85,4% para L1 (Figura 15). Asimismo, el contexto menos abundante fue la CHH con 15,7% y 14,1%, respectivamente. Esto representó un nivel de metilación promedio de 48.64% para CG, 42.33% en CHG y 9.03% en CHH de los niveles totales de metilación de DNA en la línea transgénica L8. Sin embargo, los niveles generales de metilación y la distribución del contexto no cambiaron notablemente entre las líneas transgénicas en condiciones normales de crecimiento.



**Figura 15.** Distribución de metilaciones identificadas en contextos CG, CHG y CHH en plantas transgénicas.

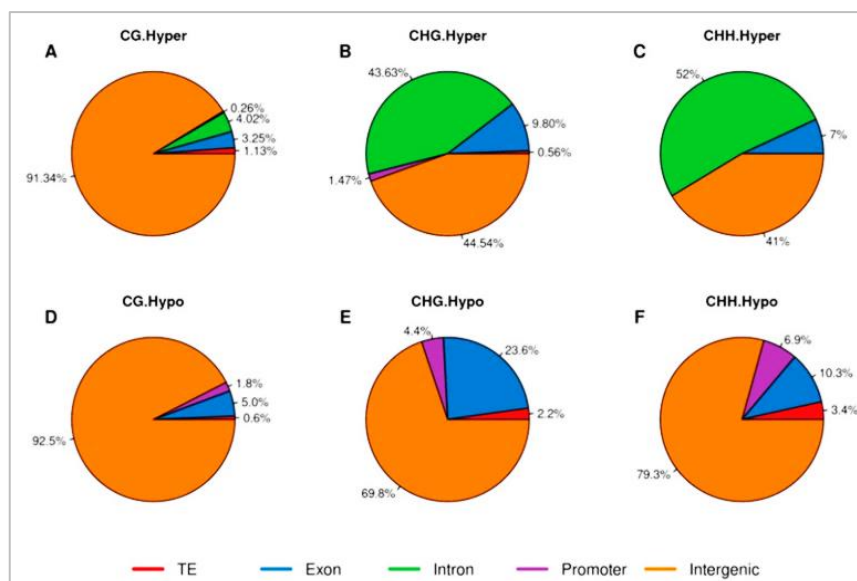
Para examinar las diferencias en la metilación del DNA entre las dos líneas transgénicas, se comparó las citosinas metiladas entre las plantas L8 y L1 para definir las citosinas metiladas diferencialmente (DmC) como hiper o hipometiladas, de acuerdo con la proporción de metilación de una citosina entre las muestras L1 y L8 en el mismo sitio. De esta manera se identificaron en total 9432 DmCs de las cuales 4 765 DmC correspondieron a citocinas hipermetiladas y 4 667 DmC hipometiladas. Estas se distribuyeron principalmente en contextos CG como se observa en la Figura 16 A.

Se realizó un mapeo de DmC en los cromosomas para identificar si algún cromosoma se destacaba en alguna tendencia de metilación. Sin embargo, las DmC hipermetiladas e hipometiladas se distribuyeron de manera similar a través de los cromosomas del genoma (Figura 16 B). La mayor abundancia de citosinas hipermetiladas se mapeó en los cromosomas 11 y 16, mientras que la hipometiladas estaba en los cromosomas 9 y 12.



**Figura 16.** Numero de DmC identificadas en L8. A) Numero de DmC identificadas en cada contexto de metilación. Se muestra la proporción hipo/hiper en cada uno de ellos. B) Distribución general de hipo/hiper DmC en los cromosomas de tabaco.

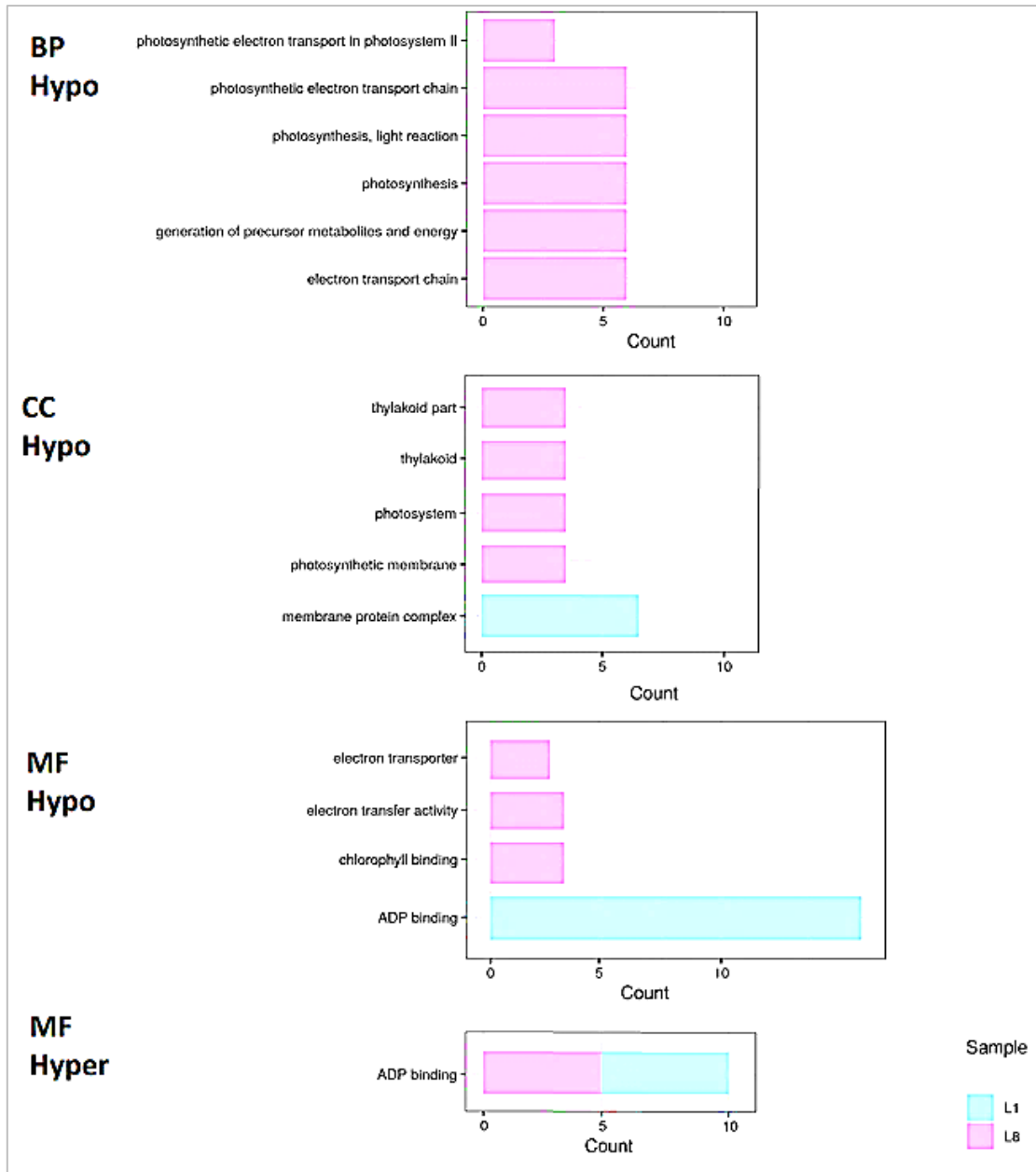
Posteriormente se analizó la distribución global de los patrones (genes, promotores, intrones, regiones intergénicas y elementos transponibles) fue variable en cada contexto (Figura 17). Las regiones intergénicas fueron el elemento más enriquecido con metilación en casi todos los contextos, excepto en los contextos hipermetilados de CHG y CHH. En el contexto de la GC, la metilación de las regiones intergénicas fue del 91,34% y del 92,5% para las DmC hiper e hipometiladas, respectivamente. En el caso de las DmC hipometiladas en CHG y CHH en regiones intergénicas fueron 69,8% y 79,3%. Las regiones de intrón fueron significativamente abundantes en los DmC hipermetilados en contextos de CHG y CHH, con 43,63% y 52%, respectivamente.



**Figura 17.** Distribución de DmC en diversos elementos genómicos.



Se realizó un análisis enriquecimiento ontológico por genes, para identificar si alguna función, proceso biológico o componente celular se veía en particular afectado por las DmC. de El análisis génico-ontológico aplicado a las DmCs en regiones codificantes de proteínas mostró enriquecimiento en DmCs hipometiladas sobre metabolismo respiratorio y energético (Figura 18). En la categoría proceso biológico, las funciones identificadas fueron cadena de transporte de electrones fotosintéticos, fotosíntesis, reacciones de luz fotosintéticas, generación de metabolitos precursores y energía, cadena de transporte de electrones. En la categoría función molecular, los DmC hipermetilados se asociaron con el enriquecimiento para el proceso de unión a ADP.



**Figura 18.** análisis de enriquecimiento de DmC identificadas en L8 y L1. Se muestran las categorías de Proceso Biológico (BP), componente celular (CC) y función molecular (MF).

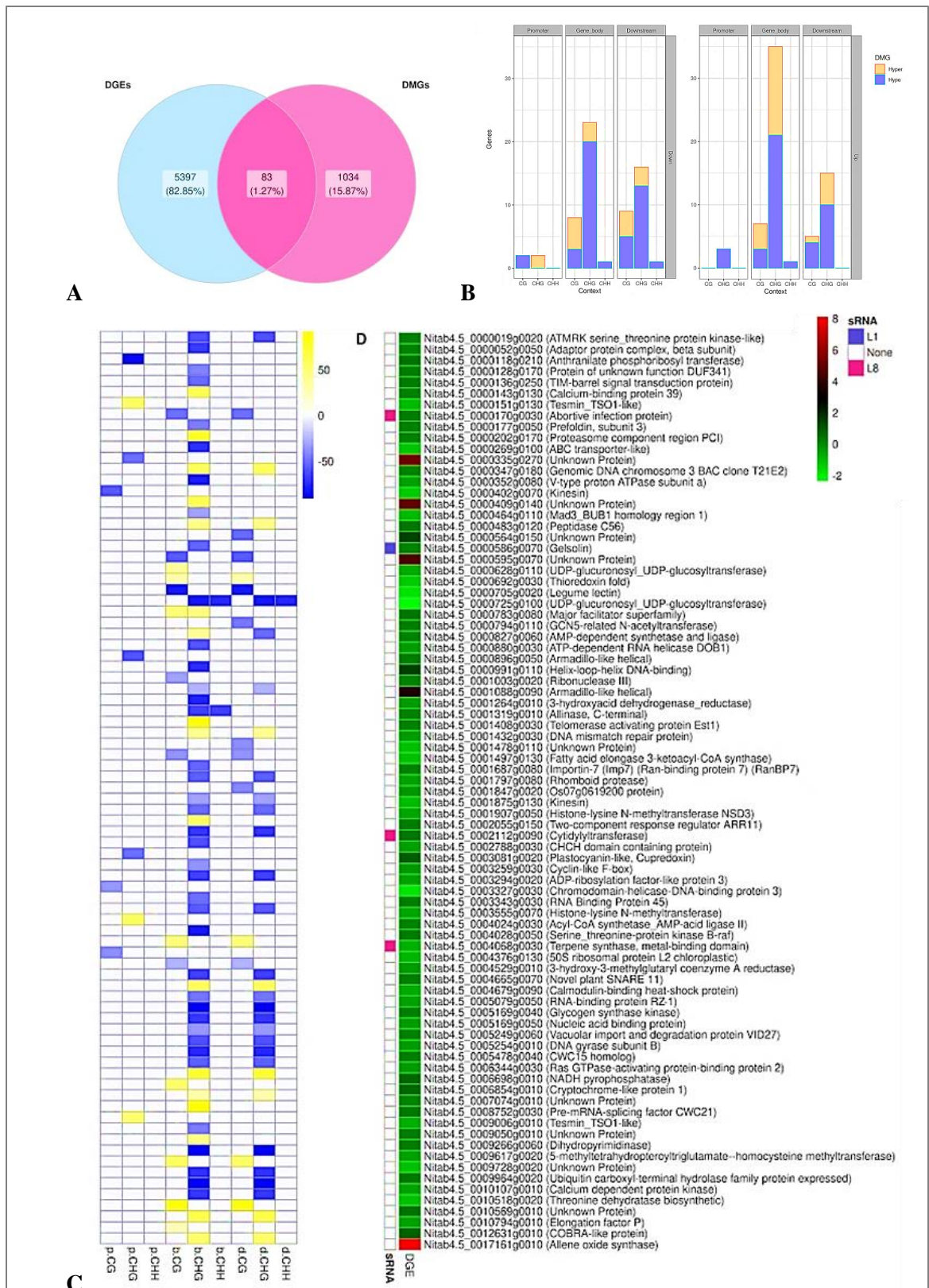
### 6.2.3 Comparación entre DmC y DEG

Posteriormente, y para dar mayor profundidad y significancia a los datos de metilación, se cotejaron los datos de transcriptómica obtenidos en estudios anteriores en el grupo. Para este análisis, se consideraron 1117 sitios de DmCs, incluidos los sitios en regiones codificantes de proteínas y regiones promotoras. Asimismo, se consideraron el conjunto de datos de genes diferencialmente expresados (DEGs) y dianas de sRNA obtenidos en trabajos anteriores, considerando que en los experimentos se utilizaron las mismas condiciones de cultivo y la edad fisiológica de las plantas ensayadas fue idéntica. De los genes expresados diferencialmente en respuesta al H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en los tabacos transgénicos, se consideraron 5397 DEG, y entre ellos, 83 genes también fueron metilados diferencialmente (Figura 19 A). La mayoría de los genes fueron metilados en el cuerpo génico en el contexto de CHG, donde tendían a la hipometilación, como se mencionó en secciones anteriores (Figura 19 B).

La Figura 19 C muestra un heatmap de 83 genes con DmC-DEG, donde el número de identificación del gen y la identidad del gen se alineó con el nivel de metilación diferencial y el contexto en cada uno, así como de la expresión diferencial (Figura 20D). En la mayoría de los genes, se observó una correlación positiva, donde los sitios hipometilados se asociaron con la expresión de regulación descendente de los genes. Curiosamente, se identificaron tres genes de RNAs en los tabacos transgénicos L8, correspondientes a una proteína de infección abortiva, una citidiltransferasa y un terpeno sintasa; y uno de los tabacos L1 combinado con una gelsolina.

Dentro de los cambios a gran escala en el estado de metilación del DNA, no se encontró un número de genes relacionados con el estrés dentro de los genes con DmC y DEG, algunos cambios en las regiones codificantes de proteínas con DmC identificados en el estudio. En nuestro caso, hubo una baja coincidencia con los datos transcriptómicos debido a la diferente cobertura de profundidad de los datos ómicos obtenidos en cada perfil. Se realizarán más estudios para confirmar la expresión de algunos de estos genes en la planta transgénica, para validar los datos obtenidos por WGBS.

Tomados en conjunto, los datos obtenidos en el presente estudio sugieren fuertemente que la sobreproducción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el tabaco transgénico podría estar asociada con el reconocimiento rápido del estrés y la activación de las respuestas de defensa, lo que puede ser crítico en la activación oportuna del sistema de defensa y, por consiguiente, en la adaptación fisiológica al estrés. Esto está relacionado con el estudio de Zhou et al., en el que los vuelos espaciales indujeron un número significativo de genes DmC - DEG asociados con la señalización ROS, demostrando que los genes ROS juegan un papel fundamental en la adaptación fisiológica de las plantas al estrés. Teniendo en cuenta que el entorno de vuelo espacial es una condición de estrés única y no convencional, destacaron la importancia de la señalización ROS en las respuestas moldeadas al estrés, lo que las convirtió en un punto crítico para estimular la adaptación de los cultivos a un entorno más cambiante e impredecible. Finalmente, la metilación diferencial de citosina del genoma completo que se encuentra entre las dos líneas de tabaco transgénico ayuda a explicar el fenotipo diferencial relacionado con la respuesta al estrés mostrada por estas plantas; además, lo que sugiere que un componente epigenético en la metilación del DNA de la citosina es importante en el fenómeno.



**Figura 19.** Metilación diferencial y expresión génica diferencial. A) Correlación en número de genes con metilación y expresión diferencial. B) Relación Genes up/down regulados con hiper/hipo metilación en contexto CG, CHG y CHH. C) Perfiles de expresión génica (L8/L1) de los genes con DmCs. El color de escala representa la expresión log2 fold-change (rojo = regulación ascendente, verde = regulación descendente).

## 6.3 OBJETIVO 3: ANÁLISIS DE HERENCIA: MODELO SILVESTRE ELICITADO

### 6.3.1 Estabilidad de DmC en la primera generación

Los resultados estadísticos de secuenciación y control de calidad y preprocesamiento de las muestras F fueron muy similares a las obtenidas para las muestras anteriores. Los datos de secuenciación tuvieron una calidad con un valor Q20 promedio de 97.92, como se muestra en la Tabla 5.

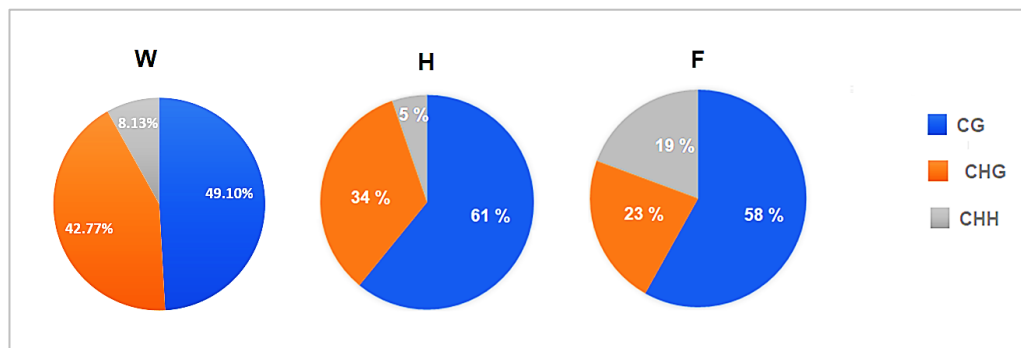
Tabla 5 Resultados estadísticos de lecturas de secuenciación 2

**Tabla 5.** Resultados estadísticos de lecturas de secuenciación 2

Grupo	n	No. Lecturas	No. Bases	Q20 (%)	GC (%)
H	a	466,788,074	70,018,211,100	98.08	27.92
	b	467,870,308	70,180,546,200	97.99	26.46
	c	466,716,804	70,007,520,600	97.99	26.91
F1	a	467,482,514	70,122,377,100	97.88	28.28
	b	468,078,352	70,211,752,800	97.89	27.94
	c	468,141,088	70,221,163,200	97.99	27.80

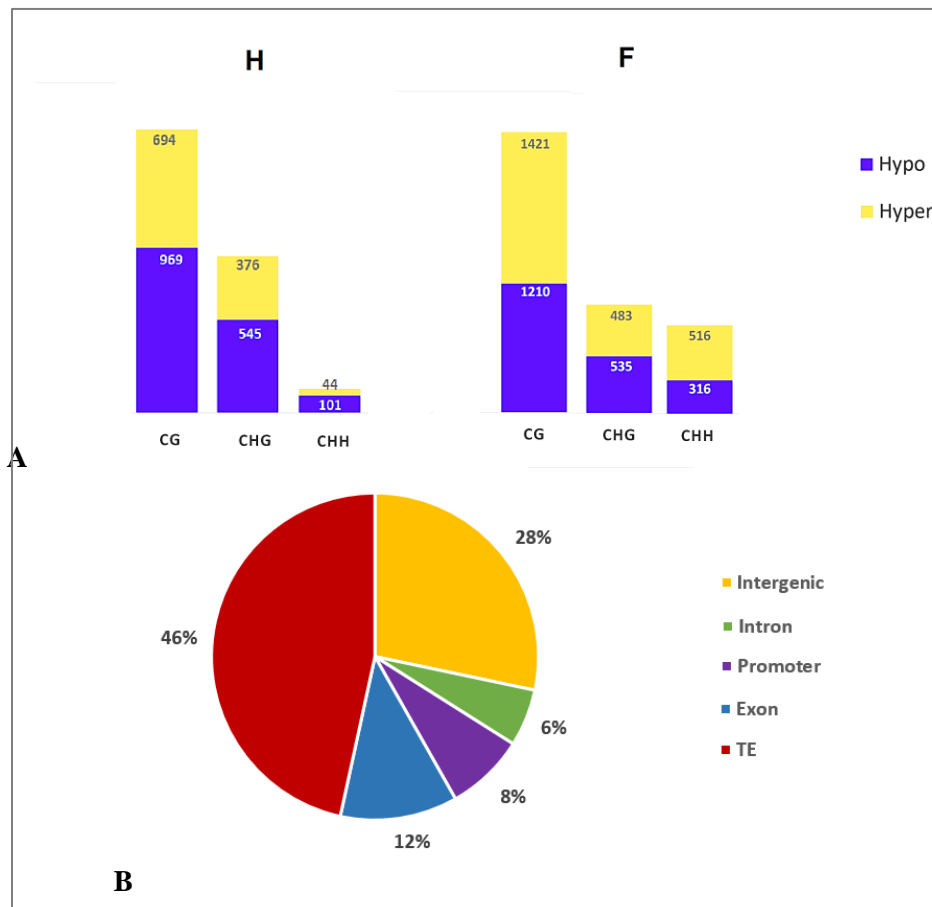
\* Q20: parámetro de calidad, indica el número de nucleótidos con una calidad superior a 20/nucleótido (lectura limpia 1, lectura 2). Donde el valor de 20 corresponde con un error de secuenciación < 1 %.

Por practicidad, en este caso se procede directamente a mostrar los resultados finales respecto a la identificación de sitios de metilación diferencial en cada una de las líneas H (parental tratada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) y F (primera generación). En la Figura 20, se muestra el porcentaje de metilaciones en citosinas diferenciales (DmC) en cada uno de los contextos de metilación. De forma general se observó un cambio significativo en la distribución entre el grupo silvestre (W), el grupo elicitado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (H) y el grupo de primera generación de este último (F). En ambos grupos de interés se observa una clara tendencia a una mayor cantidad de metilaciones en el contexto CG, una menor cantidad de metilaciones CHG, y En el caso de las metilaciones en contexto CHH, una disminución en H y un incremento significativo en F.



**Figura 20.** Distribución de metilación en contextos CG, CHG y CHH en H y F. W: silvestre. H: elicitado con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. F: primera generación filial. (n=3)

Al momento de comparar las metilaciones diferenciales (DmCs) con referencia al control, se encontraron 2,729 DmCs en H y 4,5278 DmCs en F, las cuales en su mayoría corresponden a contexto CG como se observa en la Figura 21A. Así mismo, en el caso del grupo H en su mayoría se trataron de sitios con hipometilaciones, mientras que en el caso del grupo F la mayoría consistió en sitios de hipermetilación.



**Figura 21.** DmC identificadas en H y F. A) Numero de DmC identificadas en los contextos CG, CHG y CHH. B) DmC presente en H y F distribuidas en zonas génicas.

En total se identificaron 689 DmC coincidentes en H y F, que indica que fueron inducidas por el tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y permanecieron estables en la siguiente generación, a modo de herencia. De estas DmCs, la mayoría corresponde a sitios en contexto CG (76.7%), seguido del contexto CHG (21.2%) y en menor porcentaje en CHH (2.1%). Estas DmCs estables y heredadas se localizaron en su mayoría en sitios de TE y regiones intergénicas como se observa en la Figura 21 B.

Se considera que la metilación es un proceso dinámico, debido a que es parte del control de regulación génica del organismo, donde se presentan cambios en metilación global, principalmente en contexto CHH, así como en regiones de TEs, en particular en las etapas de crecimiento y desarrollo (Katsuya-gaviria et al., 2020). En nuestro caso, las DmCs heredadas es probable que en su mayoría sean del tipo de contexto CG por ser el más estable al ser mantenido durante el proceso de transcripción. Por su parte, la gran estabilidad en marcas establecidas en las zonas de TE sugiere una importante regulación de estos elementos como parte

de un mayor control en la estabilidad misma del genoma ante cambios y mutaciones aleatorias. Esto puede ser una consecuencia inducida por la señalización de  $H_2O_2$ .

La metilación de DNA en regiones eucromáticas que se localizan en genes tienen diferentes efectos en la expresión génica, de tal forma que metilación en regiones de cuerpo génico se asocian a expresión; mientras que aquellas en promotores se asocian a represión o silenciamiento (Katsuya-gaviria et al., 2020). Sin embargo, esta afirmación no es una regla, y ocurren varios casos de excepción. En nuestro caso estas zonas génicas tuvieron un 12 % y 8 % respectivamente para las DmCs identificadas heredadas en el grupo de plantas de primera generación.

En las DmCs localizadas en zonas génicas se obtuvo un total de 89 sitios. Estos se muestran en el heatmap de la Figura 22, donde se indica su tendencia a hipo o hiper metilación, así como el contexto de metilación específico para cada sitio. Entre ellos se encuentran varios elementos asociados a respuestas a estrés en plantas.

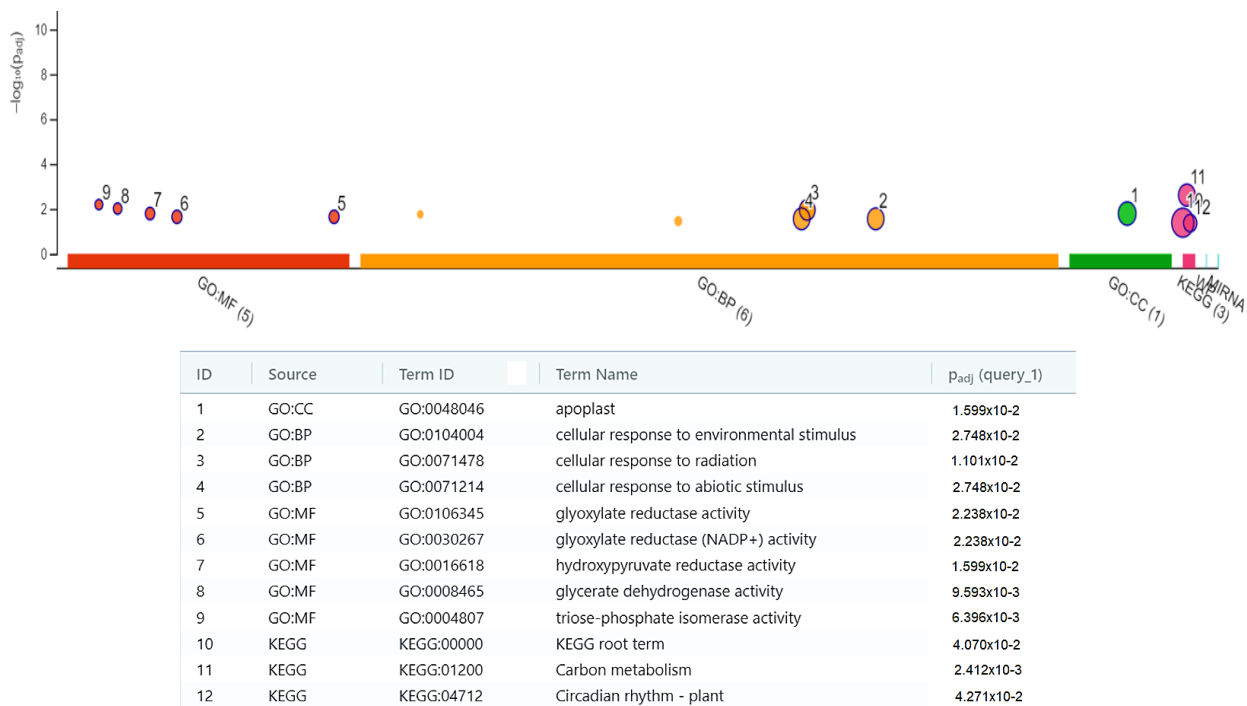
Con estos datos se realizó un análisis de enriquecimiento para analizar las funcionalidades del sistema con mayor impacto entre los genes con DmCs identificados como heredados. Este se muestra en la Figura 23. Los datos arrojados por los datos de metilación en el DNA en nuestro modelo, indica que el  $H_2O_2$  es probablemente un intermediario de señalización fundamental en las respuestas a estrés, al ser éstos los procesos biológicos de mayor impacto encontrados en el análisis de enriquecimiento, y de igual forma, que el principal componente celular sea el apoplasto, donde se encuentra un gran número de proteínas asociadas a membrana con relación en señalización y detección de estímulos. Esto corresponde con o encontrado en otros estudios de investigación relacionados al  $H_2O_2$ , así como estudios de estrés donde se enfatiza el papel fundamental de la señalización por ROS en la respuesta a estrés y generación de tolerancia a un amplio rango de estrés abiótico y biótico.

La estabilidad transgeneracional en el epigenoma se da por el equilibrio entre las vías de metilación y demetilación. Se ha reportado una progresiva re-metilación de DNA hipometilado tras varias generaciones, donde es indispensable la vía RdDM (Williams & Gehring, 2017), así como las marcas de memoria de metilación CG y CHG para la dirección de la maquinaria RdDM para la formación, estabilidad y transmisión de epialelos (J. Li et al., 2020; Y. Zhang et al., 2020), como se observó en nuestro modelo, donde la mayor parte de marcas heredadas correspondieron al contexto simétrico CG.

La “impresión genómica” a nivel de metilación se considera un mecanismo por el que se altera la expresión de genes en una manera de origen parental, ya que depende de los epialelos que sean heredados (Katsuya-gaviria et al., 2020). Aunque el mecanismo por el cual esto ocurre no es claro, en nuestro estudio se enfatizó que esta impresión epigenética se puede dar a través de la elicitación con agentes de priming, como es el  $H_2O_2$ , en donde se puede inducir la generación de epialelos en función a los beneficios que provoca la elicitación, con efectos estables que aseguran una gran eficiencia en la adaptación de los cultivos a las condiciones cambiantes del medio ambiente.



**Figura 22.** Heatmap de genes con DmCs heredadas en F1. El color amarillo representa genes hipometilados, y los azules hipometilados.

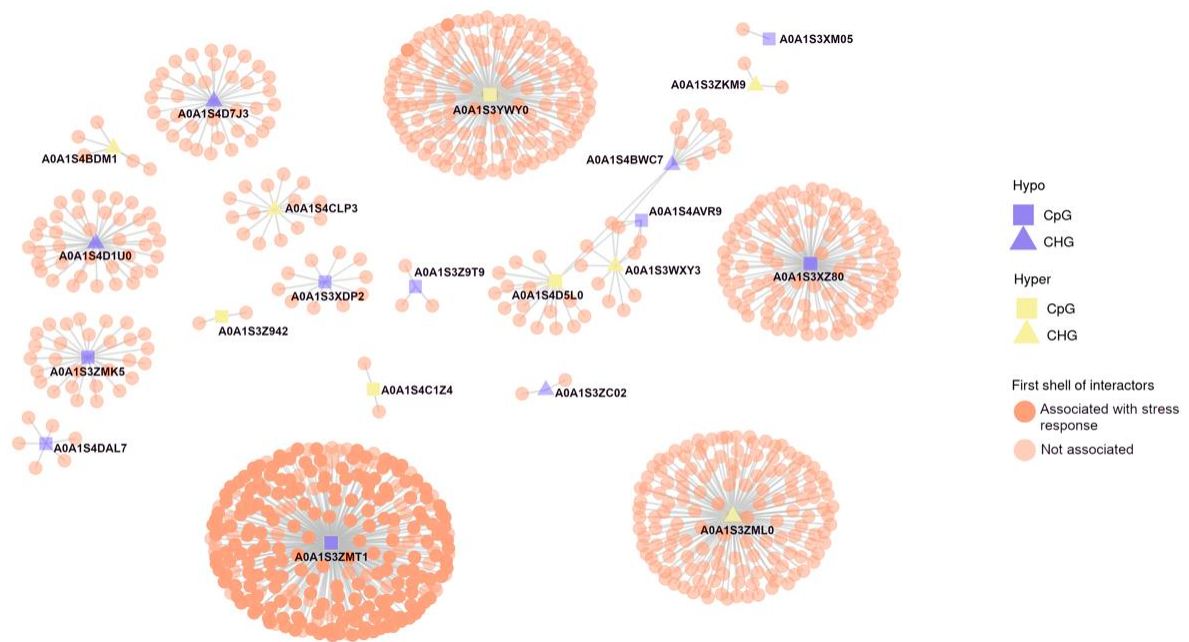


**Figura 23.** Análisis de enriquecimiento en DmC heredadas en F. En la gráfica se muestran los elementos identificados en el análisis en cada categoría: MF: Función molecular, BP: proceso biológico, CC: componente celular; KEGG: identificación de miRNA asociados a vías metabólicas. En la tabla de la parte superior se muestran los 12 elementos identificados, con su término, nombre y el P-value correspondiente a cada uno.

El cambio epigenético puede ser un mecanismo de gran valor adaptativo en la naturaleza. Por lo que es probable que en un futuro las estrategias de fitomejoramiento integren en su proceso datos genómicos de alta resolución, entre ellos epigenéticos, para la creación de un esquema de selección de multicomponentes que integre la percepción de las condiciones ambientales y las respuestas fenotípicas para mejorar la resiliencia de la planta (Gallego-Bartolomé, 2020; Yang & Mackenzie, 2019). Sin embargo, para que ello sea posible, se debe llegar a una gran comprensión del fenómeno, por lo que es de gran interés el realizar estudios de este tipo que nos den la información de punto necesario para la creación de estrategias favorables a los intereses agronómicos particulares de la especie y del sitio en donde se encuentre.

Con el fin de detectar asociaciones funcionales a nivel de proteína, enfocado a respuestas a estrés, se realizó una red de interacción (Figura 24). El nodo con mayor número de interacciones correspondió a una flavoenzima oxidoreductasa, en el cual la mayoría de las asociaciones detectadas correspondían a la categoría funcional de respuestas a estrés. Esto es de esperar, debido al papel que juegan las flavoenzimas en las reacciones del metabolismo secundario. Dentro de los genes localizados en segunda capa de este nodo se localizó al gen ROS1 (A4PF88, 0.995 de confiabilidad). Esto sugiere que en particular el proceso de demetilación está fuertemente asociado a los cambios de metilación en nuestro modelo, y nuevamente corrobora la importancia del proceso de metilación del DNA en las respuestas y adaptación de las plantas a su entorno.





ID	Information
A0A1S3ZMT1	Flavin-dependent oxidoreductase FOX1-like
A0A1S3YVY0	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37a-like; heat shock protein 70 family
A0A1S3ZML0	CDP-diacylglycerol--inositol 3-phosphatidyltransferase
A0A1S3XZ80	Acetolactate synthase small subunit 1, chloroplastic-like
A0A1S4D7J3	ETHYLENE INSENSITIVE 3-like 1 protein
A0A1S4D1U0	60S ribosomal protein L18a
A0A1S3ZMK5	Pentatricopeptide repeat-containing protein At4g16470-like; thymidine kinase family.
A0A1S4CLP3	DNA repair protein XRCC2 homolog isoform X1
A0A1S4D5L0	Anthranilate phosphoribosyltransferase, chloroplastic-like
A0A1S3WXY3	Transcription factor VOZ1-like
A0A1S4AVR9	RAB6A-GEF complex partner protein 1-like
A0A1S4BWC7	26S protease regulatory subunit 7 homolog A isoform X1AAA ATPase family.
A0A1S4DAL7	TGACG-sequence-specific DNA-binding protein TGA-1A-like
A0A1S4BDM1	DEXH-box ATP-dependent RNA helicase DEXH3-like
A0A1S3XDP2	Pinin-like
A0A1S3Z942	Sec-independent protein translocase protein TATA, chloroplastic-like
A0A1S4C1Z4	Protein root UVB sensitive 2, chloroplastic-like isoform X1
A0A1S3ZC02	Protein disulfide-isomerase 5-3-like
A0A1S3Z9T9	Glycosyltransferase; UDP-glycosyltransferase family.
A0A1S3ZKM9	Obg-like ATPase 1; Hydrolyzes ATP
A0A1S3XM05	Transcription factor IIIB 70 kDa subunit-like isoform X1

**Figura 24.** Red de interacción de proteínas funcionales asociada a genes DmC. Se graficaron las redes de interacción proteína-proteína con un nivel de confianza de 0.7 en los nodos. Los colores de los nodos representan la diferencia en el nivel de metilación (azul: hipometilación; amarillo: hipermetilación), mientras que la forma representa el contexto de metilación (Cuadrado: CpG, Triángulo: CHG). Se distinguió en particular la asociación a respuestas a estrés (Color rojo oscuro, categoría GO: 0006950 "respuesta al estrés").

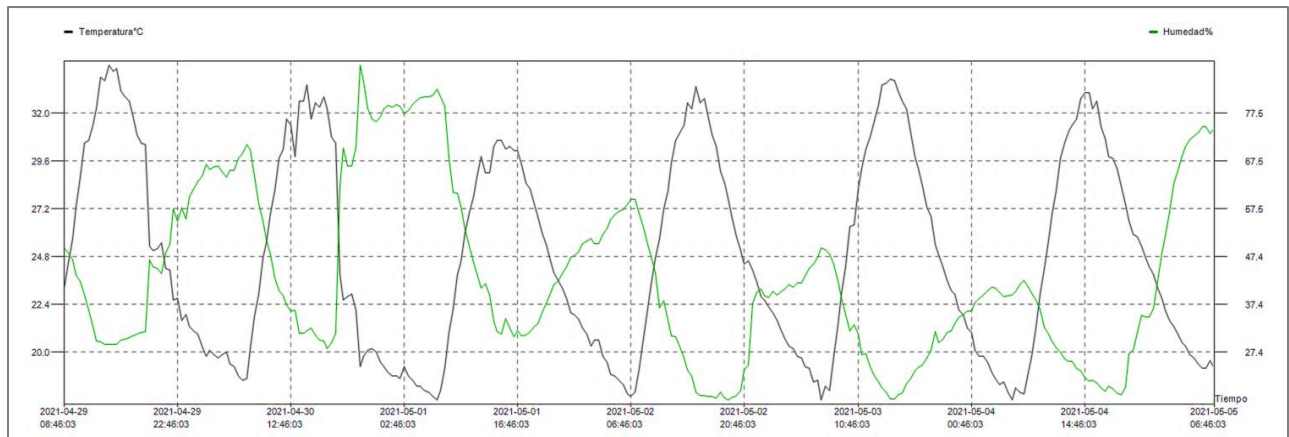
### 6.3.2 Prueba de estrés hídrico

Con la finalidad de evaluar el comportamiento fenotípico de las plantas de primera generación (F1) de plantas parentales elicitadas con  $H_2O_2$  (H), para identificar caracteres que sugieran la permanencia de algún tipo de memoria de estrés, se realizó un reto de estrés hídrico. Adicionalmente se adicionó al diseño experimental un grupo de plantas progenie elicitadas con  $H_2O_2$  (FH) para observar el efecto de un nuevo ciclo de elicitación en el comportamiento fenotípico de las plantas durante el estrés.

#### 6.3.2.1 Condiciones ambientales

El reto de estrés hídrico se realizó en mayo de 2021. Las condiciones ambientales de temperatura y humedad ambiental se monitorearon la semana previa al experimento a manera de tener una estimación de los valores de estas variables, dado a que es un aspecto relevante dentro del espectro del estrés hídrico y puede influir en el impacto sobre las plantas.

Como se observa en la Figura 25, se presentó una gran variación diaria tanto en temperatura como en humedad. Se registró una temperatura promedio de 24.9 °C, con un máximo de 35.4 °C y un mínimo de 17.6 °C. En el caso de la humedad el promedio se registró en 43.3%, con un máximo de 87.5% y un mínimo de 17.4%.

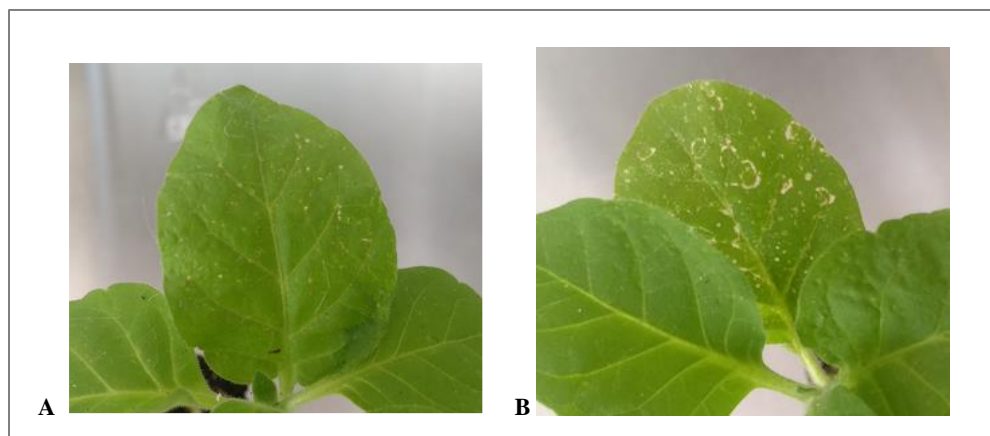


**Figura 25.** Registro de T y H en área de cultivo durante experimento de sequía.

La combinación de altas temperaturas y decremento de humedad del aire, incrementan el déficit de presión de vapor y por ende el índice de transpiración de las plantas, lo cual puede aumentar el factor de riesgo de daño a las plantas en estrés hídrico (Georgii et al., 2017). En nuestro caso, a pesar de presentarse estas condiciones en el ambiente, las variaciones diarias es probable que favorecieran un margen de compensación de temperatura y humedad, al presentarse puntos de baja temperatura y alta humedad, los cuales pudieron impactar de forma directa en la modulación del estrés hídrico en las plantas.

### 6.3.3 Observaciones del tratamiento de elicitación

La elicitación de  $H_2O_2$  provocó algunos puntos cloróticos en las hojas de las plantas causados por el daño oxidativo, particularmente en las plantas FH (Figura 26 A y B). Los puntos de daño oxidativo se encontraron en las hojas basales, que fueron las más expuestas a las tres aplicaciones de  $H_2O_2$ . En las hojas apicales, tras finalizar el tratamiento, se observó un ligero arrugamiento de las hojas. En el caso de las plantas H, los puntos observados fueron pocos y pequeños; y en las plantas FH los puntos fueron abundantes y de mayor tamaño.

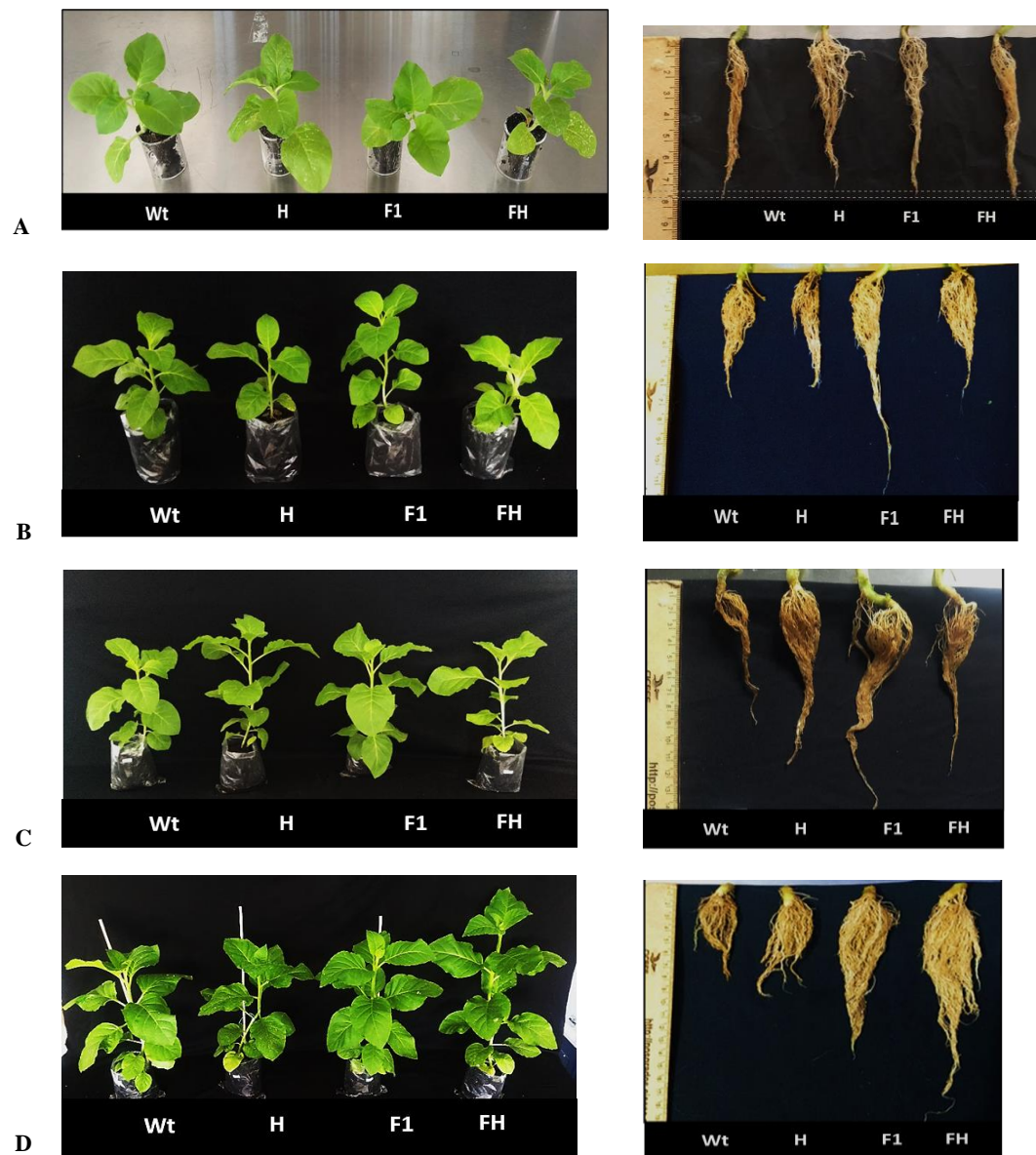


**Figura 26.** Afectación en hojas por tratamiento de  $H_2O_2$ . A) Planta del grupo H (elicitada con  $H_2O_2$ ) . B) Planta FH (primera generación filial de plantas elicitadas con  $H_2O_2$  con elicitación). La fotografía se tomó al final de la elicitación con  $H_2O_2$ . Los signos aparecieron después de la segunda aplicación para las plantas FH, pero aumentaron para la tercera aplicación cuando las plantas H eran ligeramente perceptibles.

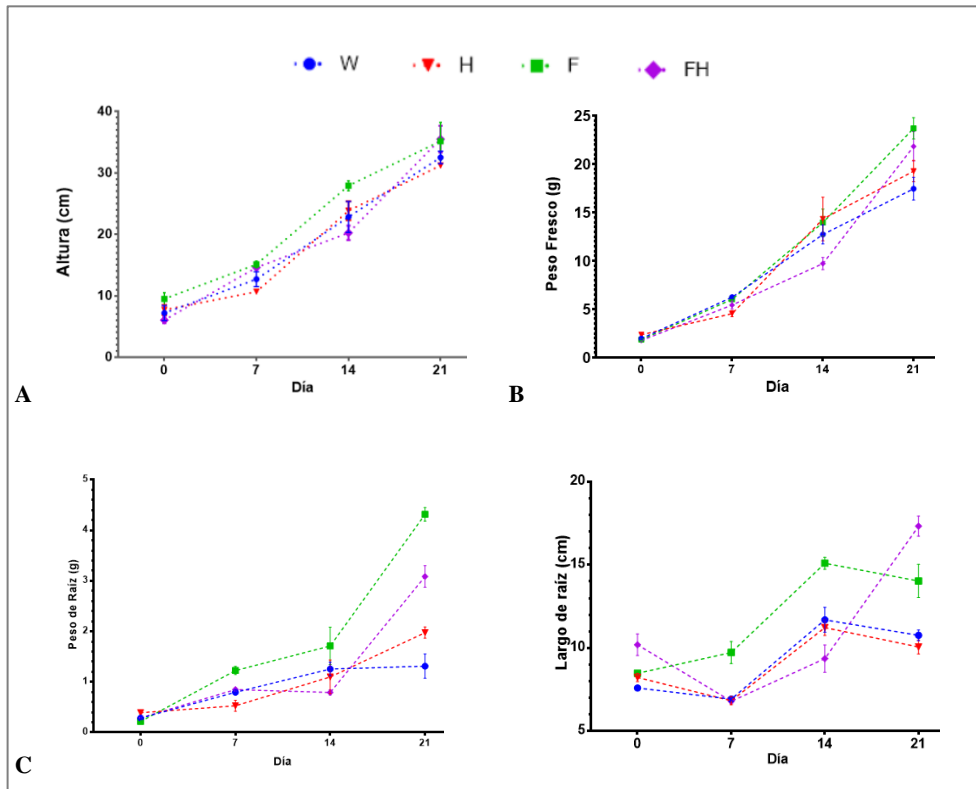
Al final del experimento, los daños en las hojas basales eran imperceptibles en la mayoría de las plantas tratadas. En las plantas en SHS, en el grupo de FH las hojas con daño (Figura 26 B) se mostraron cloróticas, en un color amarilloso, en el resto de los tratamientos hídricos la coloración de las hojas era similar al resto de la planta.

### 6.3.4 Comparación de características morfológicas

En primera instancia, el efecto más visible del tratamiento con  $H_2O_2$  en las plantas fue un incremento en el crecimiento y el desarrollo, tanto foliar como radicular (Figura 27). En las plantas H (elicitadas con  $H_2O_2$ ) se observó un aumento de la biomasa tanto en tejido foliar como radicular (Figuras 28 A y B). En el caso de las plantas F1, se observó un comportamiento similar de las plantas provocadas.

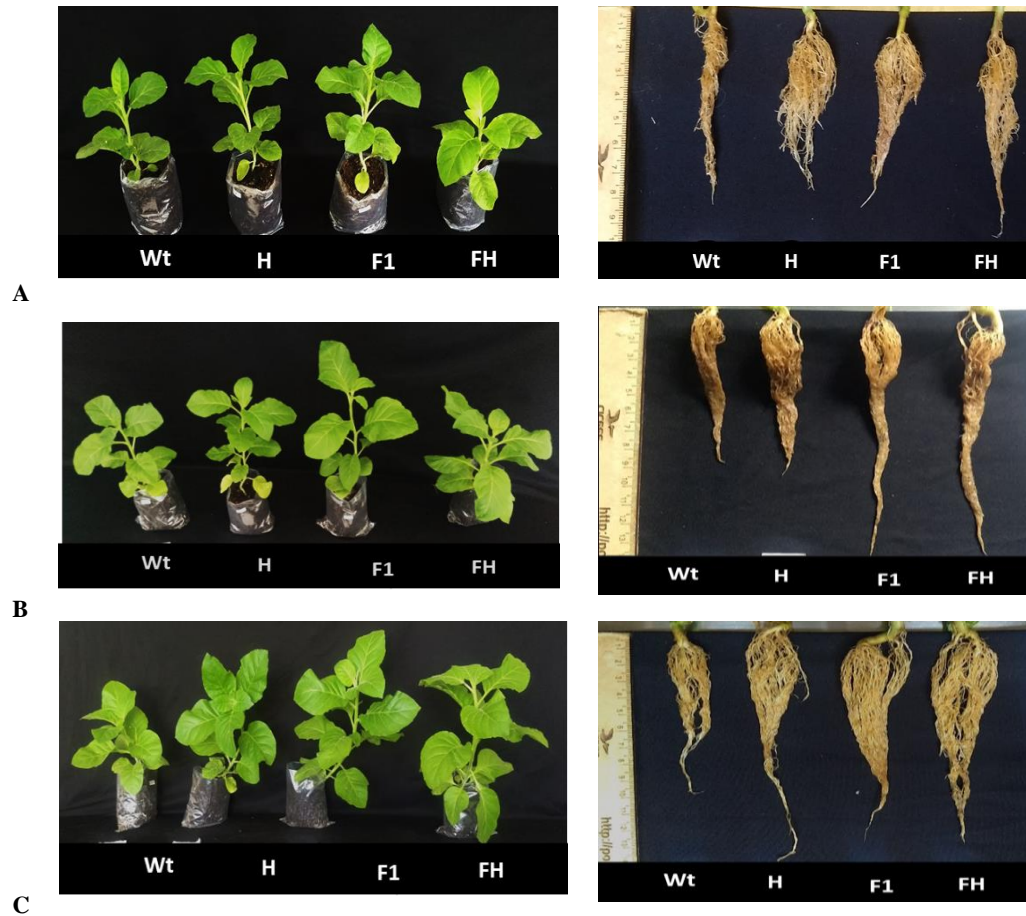


**Figura 27.** Desarrollo de plantas y raíces en condiciones normales. A) Día 0 (Considerado en el momento del reto hídrico. Corresponde a plantas de 6 semanas de edad post-germinación). B) Día 7. C) Día 14. D) Día 21.



**Figura 28.** Características morfológicas en condiciones normales. A) Altura. B) Peso fresco. C) Longitud de la raíz. D) Peso de la raíz.

Al inicio del estrés hídrico, las características consideradas fueron más homogéneas entre los grupos de plantas. Sin embargo, el día 21 se observaron algunas diferencias significativas. En condiciones bien regadas: i) las plantas H presentaron un diámetro de tallo espesante; ii) las plantas F1 presentaron un incremento del 35 % en peso de hoja fresca, del 30 % en longitud de raíz y del 150 % en peso de raíz fresca; Las plantas de FH presentaron el mayor desarrollo radicular con un incremento del 60 % en la longitud de la raíz y del 135 % en el peso de la raíz fresca (Figura 27 B).

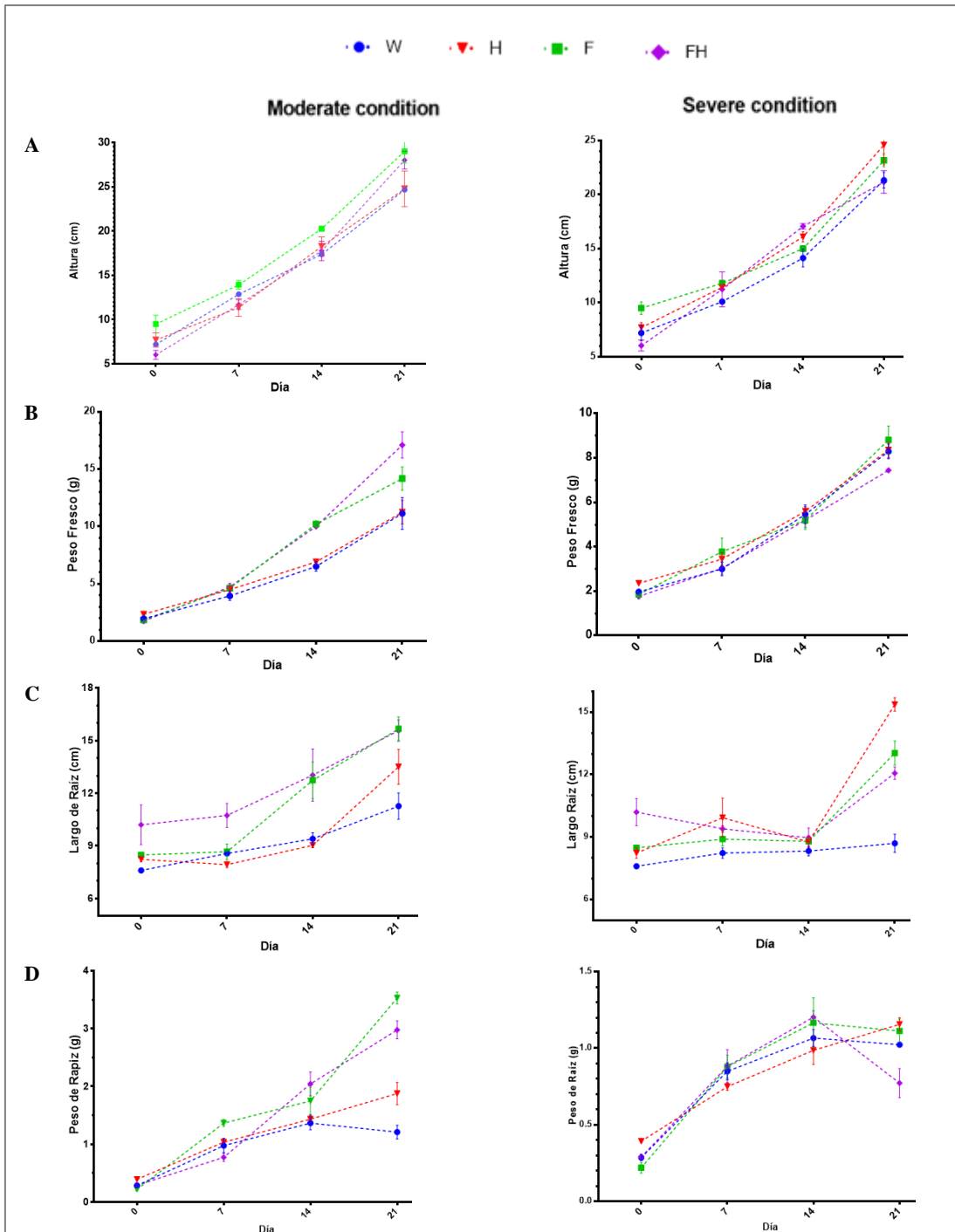


**Figura 29.** Desarrollo de plantas y raíces bajo estrés hídrico moderado. Estado morfológico de las plantas menores de 40 - 45% WFC en A) Día 7. B) Día 14. C) Día 21.



**C**  
**Figura 30.** Desarrollo de plantas y raíces bajo estrés hídrico severo. Estado morfológico de las plantas menores de 20 - 25% WFC en A) Día 7. B) Día 14. C) Día 21.

Estos datos coinciden con múltiples estudios donde se ha observado que el tratamiento exógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induce un incremento en la biomasa y variables de crecimiento en plantas (Abd Elhady et al., 2021; Latef et al., 2019; Sun et al., 2016), sin embargo, un aspecto interesante es que el efecto bioestimulante permanezca en la primera generación. Debido a que no se observaron señales evidentes de estrés por sequía, se considera probable que las condiciones en el experimento no favorecieran un estrés hídrico severo como se esperaba, aunque el comportamiento de algunas variables de respuesta medidas sugiere características de plantas tolerantes a estrés hídrico. La humedad del suelo fue limitada de acuerdo con nuestros objetivos en moderada (40 % WFC) y severa (20 % WFC), lo que limitó la absorción de agua a través de las raíces, sin embargo, el alto contenido de humedad ambiental pudo amenorar la pérdida de agua por vía aérea.

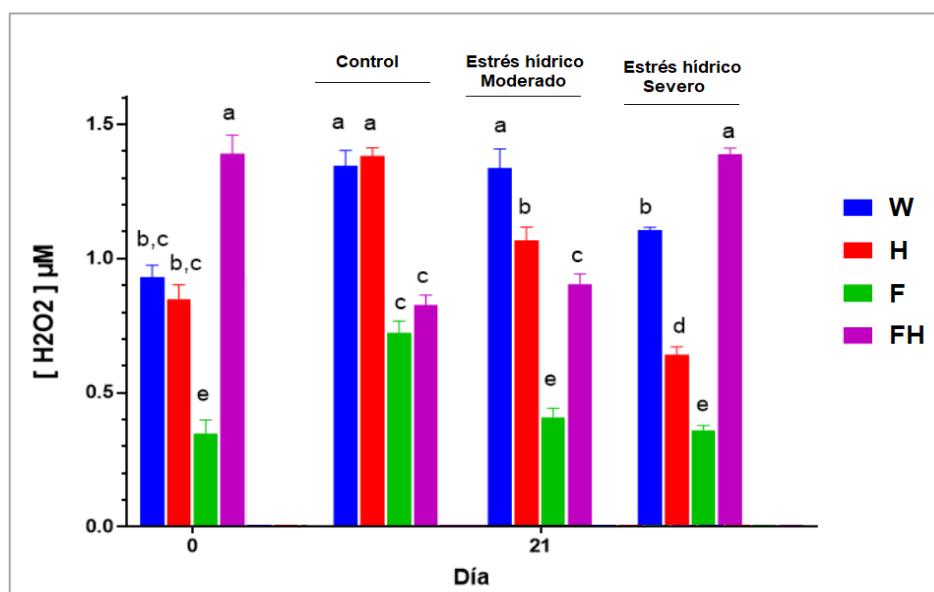


**Figura 31.** Características morfológicas bajo estrés hídrico moderado y severo. A) Altura. B) Peso fresco. C) Longitud de la raíz. D) Peso de la raíz.



### 6.3.5 Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno

El contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno se determinó para verificar el estado de estrés oxidativo en las plantas durante la condición de estrés hídrico como se muestra en la Figura 32. Una observación interesante en nuestros datos fue que los grupos de interés del modelo elicitado sobrepasaron el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en el grupo control (W), sugiriendo una homeostasis en el metabolismo oxidativo. En el caso del grupo elicitado (H) en condiciones control se mantuvo comparable al grupo W, y mostro un decremento en condiciones de estrés hídrico; por su parte en el grupo de primera generación (F) fue donde se detectó el menor contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en todas las condiciones. Por último, en el grupo F con elicitación (FH) en el día 0 fue el de mayor contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno, posiblemente derivado del estrés oxidativo generado por el tratamiento en la planta, que para el día 21 había disminuido de forma considerable, comparándose al contenido detectado en F, el cual aumento en la condición de estrés hídrico severo.

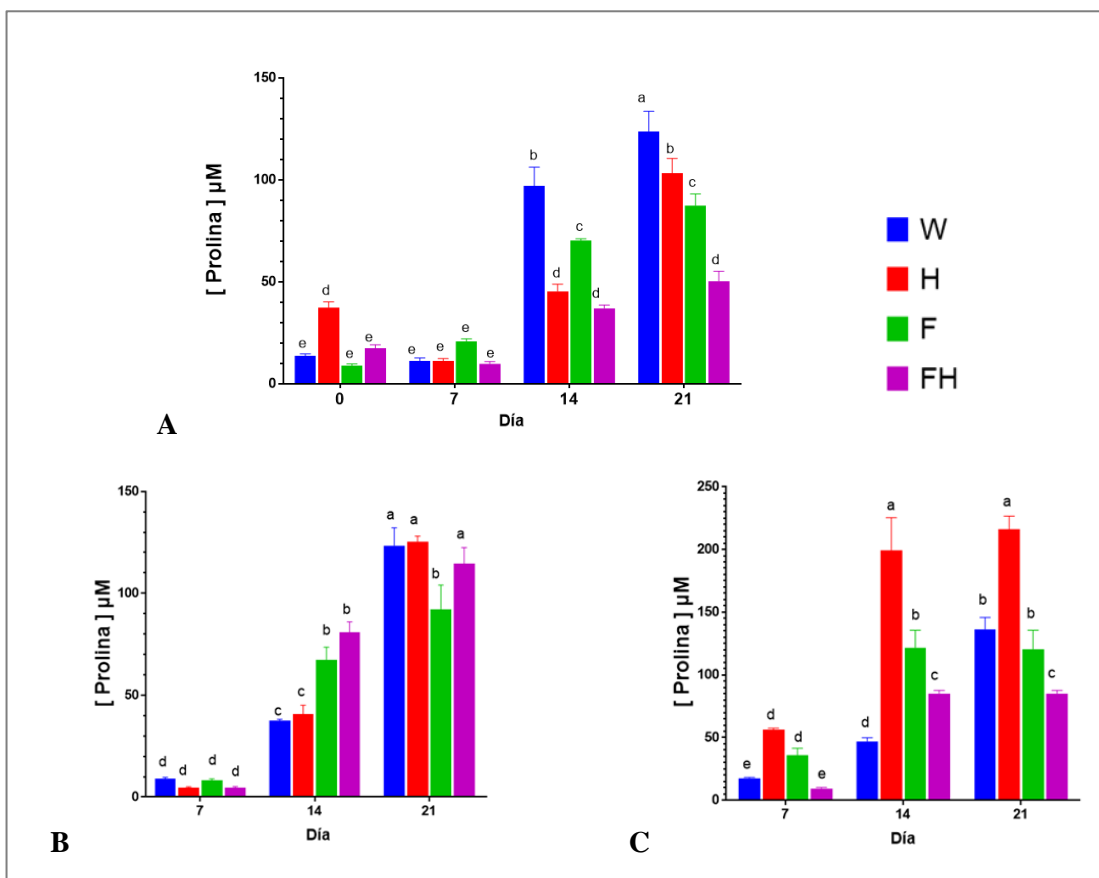


**Figura 32.** Contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> endógeno. Las letras representan la significancia estadística [(ANOVA, Tukey (P=0.05)]. Grupos de plantas: W (silvestre), H (elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), F (primera generación filiar de H), FH (F elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

En algunos estudios se ha reportado una reducción sustancial en el contenido de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> celular, particularmente bajo condiciones de estrés, donde si bien se observa un incremento transitorio inmediato al terminar el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, posteriormente los niveles bajan por el ajuste inducido en el sistema antioxidante de la planta (He et al., 2009; Iqbal et al., 2018; Skowron & Trojak, 2021).

### 6.3.6 Contenido de Prolina

La prolina se midió como un indicador bioquímico de las respuestas al tratamiento de elicitación de  $H_2O_2$ , así como del estrés hídrico al que fueron sometidas las plantas. Como se observa en la Figura 33, el contenido de prolina en las plantas incremento a lo largo del tiempo del experimento, tanto en la condición control como en las condiciones de estrés hídrico. En la condición control al inicio del experimento se detectó un incremento de 140% en el grupo H en comparación con los demás grupos; sin embargo, en el día 7 se normalizó con los demás. Es posible que en parte sea un efecto del tratamiento de elicitación, debido a que la prolina también posee cierta actividad antioxidante al actuar como un eliminador de ROS, tal que sea parte del ajuste metabólico inducido por el  $H_2O_2$ . Al final del experimento, el mayor contenido de prolina se detectó en el grupo W, y disminuyendo progresivamente en los demás.



**Figura 33.** Contenido de prolina. A) Condición control. B) Condición de estrés hídrico moderado. C) Condición de estrés hídrico severo. Las letras representan la significancia estadística [(ANOVA, Tukey (P=0.05)). Grupos de plantas: W (silvestre), H (elicitada con  $H_2O_2$ ), F (primera generación filiar de H), FH (F elicitada con  $H_2O_2$ ).

En el caso de las condiciones de estrés hídrico, a pesar de no observar signos visibles de estrés en las plantas, si se observa un incremento en el contenido de prolina como respuesta de estrés a nivel celular. Sin

embargo, en la mayoría de los grupos de plantas no se observaron diferencias significativas entre la condición de estrés hídrico moderada y la severa. La excepción fue el caso del grupo H, donde en la condición severa se observó un incremento significativo en comparación con los demás grupos. Esta acumulación de prolina puede sugerir un mecanismo de respuestas a estrés por la función osmo-protectora y estabilizante de proteínas y estructura celulares de la prolina (Chakraborty et al., 2019). El hecho de que se detecte una mayor acumulación en el grupo elicitado, puede sugerir una inducción de mecanismos de tolerancia.

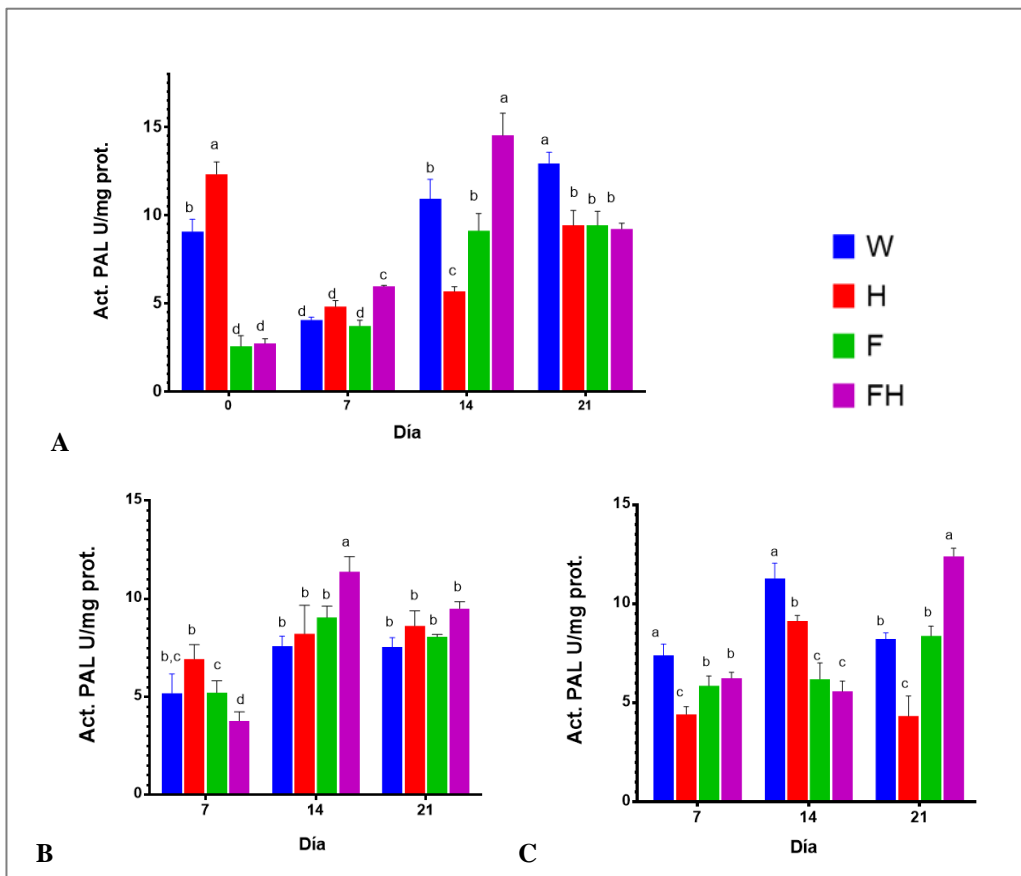
En el estudio de Liu et al. (2020) el tratamiento exógeno de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en trigo incremento el contenido de prolina bajo estrés salino y redujo la peroxidación de lípidos causados por el estrés, así mismo provocó una acumulación transitoria de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en tejido radicular, señalando un importante papel del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como intermediario de señalización (L. Liu et al., 2020). Por el contrario, en el estudio de Abd et. al. (2021) el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en condiciones de riego óptimas no mostró ningún efecto en el contenido de prolina, sin embargo, en déficit de irrigación si se estimula una mayor concentración de este osmolito (Abd Elhady et al., 2021; L. Liu et al., 2020).

#### 6.3.7 *Actividades enzimáticas PAL, SOD y CAT*

Para seguir evaluando las respuestas celulares y moleculares tanto por el estrés como por el tratamiento de elicitación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se midió la actividad enzimática de las enzimas PAL, SOD y CAT.

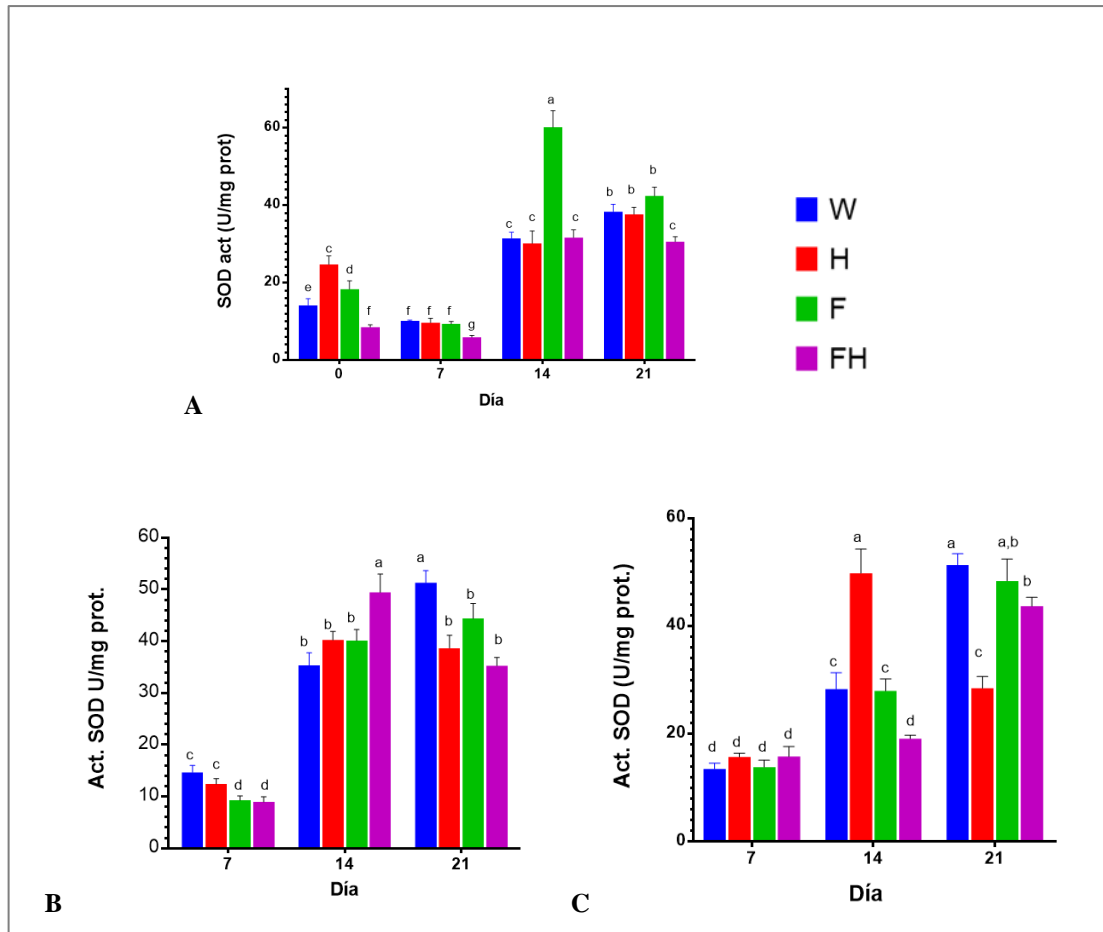
La actividad de la enzima PAL (Figura 34) se mantuvo en valores similares entre las diferentes condiciones probadas en el experimento, tal que no se observó un efecto determinante por las condiciones de estrés hídrico. De forma similar, no se observó una tendencia en los grupos de plantas de interés en comparación con el control. En el día 0 la mayor actividad PAL se detectó en el grupo elicitado (H), pero en los siguientes puntos de muestreos se observó un decremento en todas las condiciones. En el caso del grupo de primera generación (F) y F elicitada (FH), en el inicio presentaron sus valores más bajos de actividad PAL, el cual incremento progresivamente en los siguientes días en todas las condiciones. Para el día 21, en la condición normal se observó la más alta actividad PAL (Figura 34A); en la condición de estrés hídrico moderado no se encontraron diferencias significativas entre los grupos (Figura 34B); y por último en la condición de estrés hídrico severo el grupo FH presentó el valor más alto, y en contraste el H el más bajo (Figura 34C).

La actividad de la enzima SOD (Figura 35) presentó un incremento progresivo en el tiempo evaluado en el experimento en todas las condiciones para todos los grupos de plantas. Al inicio del experimento, los grupos H y F presentaron mayor actividad SOD, mientras que el FH menor en comparación con el control. En la condición de estrés hídrico moderado los grupos de interés presentaron menor actividad SOD que el control (Figura 35 B), y por su parte en la condición de estrés hídrico severo, el grupo H presentó un significativo decremento de la actividad SOD (Figura 35 C).



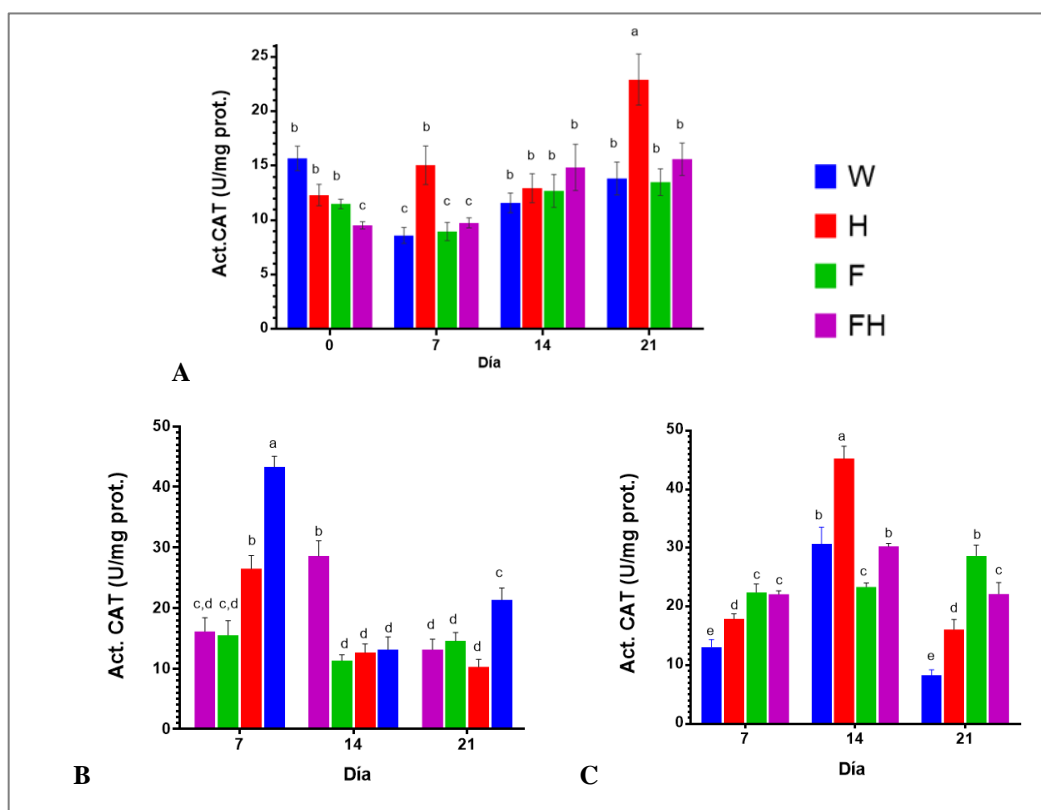
**Figura 34.** Dinámica de actividad PAL. A) Condición control. B) Condición de estrés hídrico moderado. C) Condición de estrés hídrico severo. Las letras representan la significancia estadística [(ANOVA, Tukey (P=0.05)]. Grupos de plantas: W (silvestre), H (elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), F (primera generación filiar de H), FH (F elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

La actividad de la enzima CAT (Figura 36) de forma similar a las anteriores enzimas antioxidantes no presenta una tendencia específica entre los grupos de plantas. En la condición normal, el grupo H presentó los valores más altos de actividad CAT, sin embargo, los valores superiores de actividad CAT en general fueron detectados entre las condiciones de estrés hídrico severo (Figura 36 C).



**Figura 35.** Dinámica de actividad SOD. A) Condición control. B) Condición de estrés hídrico moderado. C) Condición de estrés hídrico severo. Las letras representan la significancia estadística [(ANOVA, Tukey (P=0.05)]. Grupos de plantas: W (silvestre), H (elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), F (primera generación filiar de H), FH (F elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

En varios estudios en referencia al tratamiento de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas se ha demostrado una mayor actividad antioxidante, así como presencia de agentes osmoprotectores como la prolina en diferentes especies vegetales como trigo, (Abd Elhady et al., 2021), quinoa (Iqbal et al., 2018), maíz (de Sousa et al., 2016; Latef et al., 2019), cebada (Skowron & Trojak, 2021), frijol (Ishibashi et al., 2011; Mohamed Abass & Ibrahim Mohamed, 2011) y trigo (He et al., 2009). Sin embargo, en algunos casos se reporta que el tratamiento con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> no es efectivo para inducir la actividad CAT, sugiriendo la acción de otros mecanismos antioxidantes en el proceso de ajuste oxidativo, como es el caso de un estudio en pepino (Sun et al., 2016) y arroz (Sohag et al., 2020). Sin embargo, estos estudios coinciden en la conclusión de que la elicitación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en plantas puede incrementar la tolerancia a sequía en plantas.



**Figura 36.** Dinámica de actividad CAT. A) Condición control. B) Condición de estrés hídrico moderado. C) Condición de estrés hídrico severo. Las letras representan la significancia estadística [(ANOVA, Tukey (P=0.05)]. Grupos de plantas: W (silvestre), H (elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), F (primera generación filiar de H), FH (F elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).

### 6.3.8 Expresión de genes AQP, PIP1 y CHS

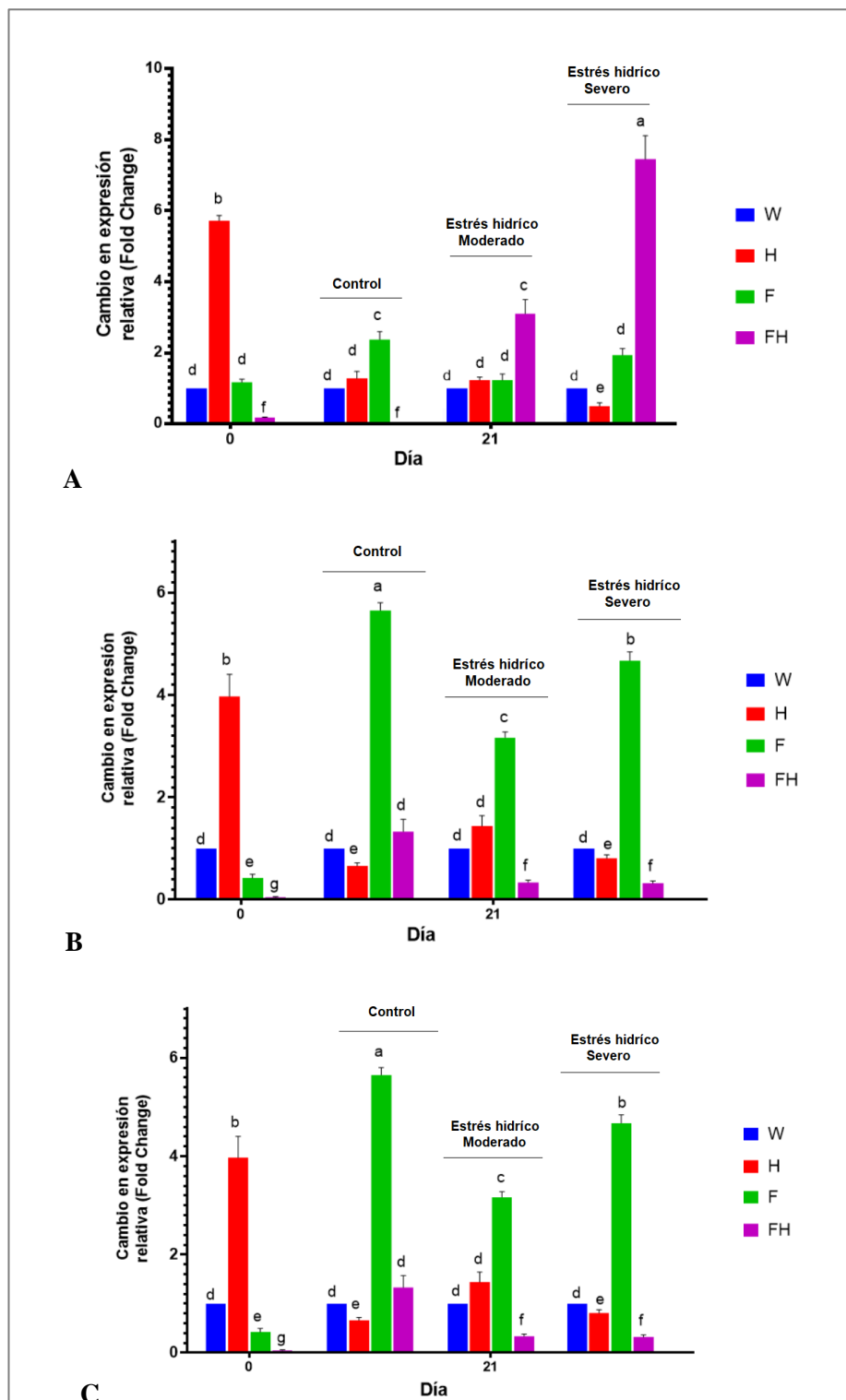
Debido a la importancia de los flavonoides en las respuestas antioxidantes, se cuantificó la expresión relativa del gen *CHS* en muestras del día 0 y 21 del experimento. De igual forma, se cuantificó la expresión de dos acuaporinas de membrana PIP1 y AQP, por su participación en el transporte de moléculas y principalmente su influencia en las respuestas a estrés abiótico (Figura 37).

En respecto al gen *CHS*, en el día 0, se detectó un incremento significativo en la expresión del gen en el grupo elicitado (H), pero para el final del experimento la expresión tanto en la condición control como en la de estrés moderado no mostro diferencia significativa con el grupo W, y en estrés severo la expresión fue menor. En las F elicitadas (FH) en la condición control se encontró una significativa baja expresión de *CHS*, tanto en el día 0 como en el 21; sin embargo, se indujo una alta expresión en condiciones de estrés hídrico en forma proporcional al grado de estrés (Figura 36A).

Los genes de acuaporinas *PIP1* y *AQP*, algo interesante es que, a pesar de tener diferentes valores, mostraron una dinámica de expresión similar (Figura 37 B y C). En el día 0 en las plantas elicidadas (H) se encontró una alta cantidad de transcritos de ambos genes, sin embargo, en el día 21 los niveles de expresión fueron iguales al control, e inclusive en la condición de estrés hídrico severo se observó una disminución en la expresión en respecto al control. En las plantas de primera generación (F) se observó una baja expresión de ambos genes en el día 0, pero su máxima expresión se encontró en el día 21 y de forma similar se observaron valores altos de expresión en condiciones de estrés hídrico. En las F elicidadas (FH) en el día 0 se encontró una significativa baja expresión de ambos genes, al inicio del experimento y bajo condiciones de estrés hídrico (Figura 37 B y C).

En el estudio de Mahdieh et al (2008) determinaron que hay una dinámica en la expresión de acuaporinas *PIP1*, *PIP2* y *AQP* en condiciones de estrés, donde ellos encontraron que las primeras dos eran reprimidas en condiciones de estrés, mientras que *AQP* incrementaba su expresión en estrés hídrico, con el fin de reducir la conductancia hídrica y perdida de presión osmótica en el sistema. A pesar de que *PIP1* y *AQP* corresponden al mismo tipo de acuaporinas ellos sugieren que pueden estar involucradas en mecanismos diferentes como en el caso de *PIP2* (Mahdieh et al., 2008). Nuestros datos mostraron una tendencia distinta, por lo que se sugiere que la regulación de expresión de *PIP1* y *AQP* sea influenciada en parte por el tratamiento de  $H_2O_2$  de forma que los mecanismos y procesos activados durante el estrés hídrico difieran por las condiciones previas sufridas en las plantas. Si bien estas acuaporinas no son permeables al transporte de  $H_2O_2$ , tienen un papel fundamental en la osmorregulación y sean parte de la señalización inducida por la elicitación (Jang et al., 2012). En algunos estudios se ha asociado el incremento de expresión de ciertas acuaporinas en el desarrollo de un fenotipo tolerante a estrés hídrico, térmico y salino (Mosa et al., 2017). Además, se ha comenzado a sugerir que también pueden ser un factor relevante para el desarrollo de memoria inducida por estrés en plantas, debido a la importancia que juegan en los mecanismos de aclimatación al estrés (Srivastava et al., 2021).

El  $H_2O_2$  como segundo mensajero en las respuestas al estrés, puede ser un punto fundamental para inducir una memoria de estrés en la planta con permanencia a las próximas generaciones. Entre los beneficios directos está el efecto bioestimulante, tanto en condiciones normales de riego, como en aminorar los efectos adversos de estrés en el desarrollo de biomasa (Basal & Szabó, 2020; Mohamed Abass & Ibrahim Mohamed, 2011; Sun et al., 2016). En segundo plano, se destaca la inducción de respuestas antioxidantes por el tratamiento con  $H_2O_2$ , que a su vez contribuyen a su inducción de tolerancia (Fleta-Soriano & Munné-Bosch, 2016; Hossain et al., 2015; Skirycz & Inzé, 2010). Sin embargo, las respuestas pueden ser variables y flexibles de acuerdo con las condiciones que enfrenta la planta. Por ejemplo, en nuestro caso, al no observar signos evidentes de estrés hídrico en las plantas, se sugiere que las condiciones provocaron que la estrategia a tomar en lugar de una tolerancia a sequía tendiera hacia una evasión de deshidratación. Sin embargo, en condiciones más severas de restricción hídrica, es posible que se vean favorecidas las vías de tolerancia en el ciclo de vida de la planta, e inclusive en su descendencia. La sequía es uno de los estreses más dañinos para las plantas, y sus efectos son variables según la intensidad y duración del estrés. La memoria es una parte relevante de la aclimatación al estrés, tal que se ha reportado que los hijos de padres estresados bajo condiciones hídricas limitadas tuvieron un mayor rendimiento, lo que indica un establecimiento de memoria relacionado con el déficit de agua durante la generación parental. Además, se ha sugerido que la memoria de estrés transgeneracional puede limitarse a las primeras etapas de crecimiento, pero el proceso sigue sin estar claro (Racette et al., 2019, 2020). Sin embargo, algo que parece fundamental en el proceso es la detección eficiente y oportuna de las condiciones ambientales cambiantes, adoptando y combinando estrategias de respuesta adecuadas (Martignago et al., 2020).



**Figura 37.** Expresión relativa de genes CHS, PP1 y AQP. A) Expresión de CHS. B) Expresión de PP1. C) Expresión de AQP. Las letras representan la significancia estadística [(ANOVA, Tukey (P=0.05)]. Grupos de plantas: W (silvestre), H (elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), F (primera generación filiar de H), FH (F elicitada con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Condiciones: C (control), M (estrés hídrico moderado), S (estrés hídrico severo).



En nuestro estudio, las plantas progenie de plantas elicidadas muestran un comportamiento similar al de los grupos parentales, lo que sugiere que las características permanecieron en un fenómeno de memoria en el fenotipo de las plantas, debido a la mejora de la defensa antioxidante en condiciones de estrés hídrico, probablemente debido a la activación de vías dependientes de ABA. Existe la posibilidad de que un mecanismo epigenético esté involucrado en los fenómenos de memoria de estrés observados en este estudio. A pesar de que solo hemos informado aquí la evaluación de aptitud física, estamos trabajando en algunos datos sobre la metilación del ADN para llegar a una mejor comprensión de los cambios moleculares que una provocación con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede tener en las plantas y su memoria de estrés inducida.

## 7. CONCLUSIONES

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> tiene efecto positivo en la planta a nivel epigenético, en base a los resultados de este estudio en los patrones de metilación de DNA, al favorecer marcas en genes relacionados en la homeostasis y respuestas de estrés de la planta. Por ello, se acepta la hipótesis planteada para esta investigación.

En el modelo de tabaco transgénico al gen *CchGLP* con resistencia a factores de estrés, los cambios de metilación de DNA del genoma se asociaron con cambio en expresión de genes relacionados a metabolismo de energía, transporte de moléculas, detección de estímulos y señalización de calcio y reparación de DNA. Al corresponder con los datos ómicos previamente obtenidos de este modelo en el grupo de investigación, se comprueba un equilibrio en todos los niveles de control del sistema biológico.

Por su parte, en el modelo silvestre, se comprobó que la aplicación exógena de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> puede inducir cambios en los patrones de metilación del DNA, que permanecen estables en la siguiente generación filial. Estos cambios se asocian a procesos de respuesta celular a estímulos ambientales, estrés abiótico y radiación, lo cual se mostró al presentar mejor respuesta a una condición de estrés hídrico, donde se observó además un efecto bioestimulante a nivel fisiológico.

El H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> es un segundo mensajero en las plantas, que puede inducir estados de resistencia a estrés biótico y abiótico, y como se demostró en este trabajo, puede impactar a nivel epigenético, siendo un potencial inductor de tolerancia a estrés por su participación en la señalización adaptativa. Además, el hecho de que esta potenciación de la inmunidad natural de la planta tenga cierto grado de estabilidad para permanecer en las siguientes generaciones a manera de memoria de estrés, enfatiza el rol central del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en las respuestas a estrés en plantas. Esta línea de investigación posee un gran potencial como herramienta para la agricultura en la adaptación de los cultivos a un entorno cambiante, así como herramienta para el fitomejoramiento; sin embargo, aún prevalecen varias interrogantes, como es el protocolo de elicitación de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para mejorar las características deseables de interés del cultivo, así como su extrapolación a otras especies de interés comercial.

## 8. REFERENCIAS

---

- Abd Elhady, S. A., El-Gawad, H. G. A., Ibrahim, M. F. M., Mukherjee, S., Elkelish, A., Azab, E., Gobouri, A. A., Farag, R., Ibrahim, H. A., & El-Azm, N. A. (2021). Hydrogen peroxide supplementation in irrigation water alleviates drought stress and boosts growth and productivity of potato plants. *Sustainability (Switzerland)*, *13*(2), 1–16. <https://doi.org/10.3390/su13020899>
- Akalin, A., Kormaksson, M., Li, S., Garrett-Bakelman, F. E., Figueroa, M. E., Melnick, A., & Mason, C. E. (2012). MethylKit: a comprehensive R package for the analysis of genome-wide DNA methylation profiles. *Genome Biology*, *13*(10), R87. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-R87>
- Álvarez-Venegas, R., De-la-Peña, C., & Cullis, C. (2016). Recent Advances of Epigenetics in Crop Biotechnology. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 7). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00413>
- Ambrosi, C., Manzo, M., & Baubec, T. (2017). Dynamics and Context-Dependent Roles of DNA Methylation. *Journal of Molecular Biology*, *429*(10), 1459–1475. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.02.008>
- Anaya-López, J. L., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M., Garzon-Tiznado, J. A., Pons-Hernandez, J. L., Guevara-González, R. G., Muñoz-Sánchez, C. I., Guevara-Olvera, L., Rivera-Bustamante, R. F., & Hernández-Verdugo, S. (2003). Resistance to geminivirus mixed infections in Mexican wild peppers. *HortScience*, *38*(2), 251–255.
- Ashikawa, I. (2001). Gene-associated CpG islands in plants as revealed by analyses of genomic sequences. *Plant Journal*, *26*(6), 617–625. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01062.x>
- Ashikawa, Ikuo. (2001). Gene-associated CpG islands in plants as revealed by analyses of genomic sequences. *Plant Journal*, *26*(6), 617–625. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.2001.01062.x>
- Avramova, Z. (2015). Transcriptional “memory” of a stress: Transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress-response genes. *Plant Journal*, *83*(1), 149–159. <https://doi.org/10.1111/tpj.12832>
- Bagheri, M., Gholami, M., & Baninasab, B. (2019). Hydrogen peroxide-induced salt tolerance in relation to antioxidant systems in pistachio seedlings. *Scientia Horticulturae*, *243*, 207–213. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.08.026>
- Barozai, M. Y. K., Aziz, A. N., Khan Barozai, M. Y., & Aziz, A. N. (2018). Recent plant growth and stress management related significant advancements in epigenetics. *Annals of Agrarian Science*, July. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.aasci.2018.07.002>
- Barrera-Pacheco, A., Joaquin-Ramos, A. D., Torres-Pacheco, I., Gonzalez-Chavira, M. M., Perez-Perez, M. C. I., Guevara-Olvera, L., & Guevara-Gonzalez, R. G. (2008). Analysis of transcriptional expression induced in *Capsicum chinense* BG-3821 under conditions of biotic and abiotic stress. *Agrociencia*, *42*, 95–106.
- Basal, O., & Szabó, A. (2020). Ameliorating drought stress effects on soybean physiology and yield by hydrogen peroxide. *Agriculturae Conspectus Scientificus*, *85*(3), 211–218.
- Bertini, L., Proietti, S., Focaracci, F., Sabatini, B., & Caruso, C. (2018). Epigenetic control of defense genes following MeJA-induced priming in rice. *Journal of Plant Physiology*, *228*(June), 166–177.
- Bovee, R. C., Hickok, J. R., Vasudevan, D., & Thomas, D. D. (2017). Mechanisms of Epigenetic Regulation by Nitric Oxide. In *Nitric Oxide: Biology and Pathobiology: Third Edition* (pp. 255–270). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-804273-1.00020-X>
- Cao, Y. Y., Gao, Y., Sun, W. J., Huang, Y. W., Zhang, J., & Bai, J. G. (2013). Role of hydrogen peroxide pretreatment in heat-induced alteration of DNA methylation in cucumber leaves. *Scientia*

- Cardenas-Manríquez, G., Vega-Muñoz, I., Villagómez-Aranda, A. L. L., León-Galvan, M. F. F., Cruz-Hernandez, A., Torres-Pacheco, I., Rangel-Cano, R. M. M., Rivera-Bustamante, R. F. F., & Guevara-Gonzalez, R. G. G. (2016). Proteomic and metabolomic profiles in transgenic tobacco (*N. tabacum* xanthi nc) to CchGLP from *Capsicum chinense* BG-3821 resistant to biotic and abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany*, 130, 33–41. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2016.05.005>
- Cardenas-Manríquez, German, Cruz-Hernandez, A., Torres-Pacheco, I., Caballero-Pérez, J., González-Chavira, M. M., García-Ortega, L. F., & Guevara-González, R. G. (2018). Transcriptome profiling of transgenic tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. xanthi nc) expressing CchGLP gene from *Capsicum chinense* Jacq. reveals gene expression associated with stress tolerance. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 00(00), 1–10. <https://doi.org/10.1080/14620316.2017.1421485>
- Chakraborty, U., Chakraborty, B. N., Dey, P. L., Chakraborty, A. P., & Sarkar, J. (2019). Biochemical Responses of Wheat Plants Primed with *Ochrobactrum pseudogrignonense* and Subjected to Salinity Stress. *Agricultural Research*, 8(4), 427–440. <https://doi.org/10.1007/s40003-018-0394-7>
- Chen, S., Zhou, Y., Chen, Y., & Gu, J. (2018). Fastp: An ultra-fast all-in-one FASTQ preprocessor. *Bioinformatics*, 34(17), i884–i890. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty560>
- Chomczynski, P. (1987). *Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Extraction*. 159, 156–159.
- Choudhury, F. K., Rivero, R. M., Blumwald, E., & Mittler, R. (2017). Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination. *Plant Journal*, 90(5), 856–867. <https://doi.org/10.1111/tpj.13299>
- Clarke, J. D. (2009). Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) DNA miniprep for plant DNA isolation. *Cold Spring Harbor Protocols*, 4(3), 5177–5179. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot5177>
- Collins, L. J., Schönfeld, B., & Chen, X. S. (2011). The epigenetics of non-coding RNA. In *Handbook of Epigenetics* (First Edit). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-375709-8.00004-6>
- Crisp, P. A., Ganguly, D., Eichten, S. R., Borevitz, J. O., & Pogson, B. J. (2016). Reconsidering plant memory: Intersections between stress recovery, RNA turnover, and epigenetics. *Science Advances*, 2(2), e1501340. <https://doi.org/10.1126/sciadv.1501340>
- Czarnocka, W., & Karpiński, S. (2018). Friend or foe? Reactive oxygen species production, scavenging and signaling in plant response to environmental stresses. *Free Radical Biology and Medicine*, 122(October 2017), 4–20. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2018.01.011>
- de Sousa, D. P. F., Braga, B. B., Gondim, F. A., Gomes-Filho, E., Martins, K., & de Brito, P. O. B. (2016). Increased drought tolerance in maize plants induced by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> is closely related to an enhanced enzymatic antioxidant system and higher soluble protein and organic solutes contents. *Theoretical and Experimental Plant Physiology*, 28(3), 297–306. <https://doi.org/10.1007/s40626-016-0069-3>
- Downen, R. H., Pelizzola, M., Schmitz, R. J., Lister, R., Downen, J. M., Nery, J. R., Dixon, J. E., & Ecker, J. R. (2012). Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(32), E2183–E2191. <https://doi.org/10.1073/pnas.1209329109>
- Du, J., Johnson, L. M., Jacobsen, S. E., & Patel, D. J. (2015). DNA methylation pathways and their crosstalk with histone methylation. *Nature Publishing Group*, 16(9), 519–532. <https://doi.org/10.1038/nrm4043>
- Dzhavakhiya, V. G., Ozeretskovskaya, O. L., & Zinovyeva, S. V. (2007). Immune response. In *Comprehensive and Molecular Phytopathology*. Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52132-3.50014-6>

- Ehrlich, P. R., & Harte, J. (2015). Opinion: To feed the world in 2050 will require a global revolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 112(48), 14743–14744. <https://doi.org/10.1073/pnas.1519841112>
- FAO, IFAD, UNICEF, WFP, W. (2020). The state of Food Security and Nutrition in the World. In *Food and Agriculture Organization of the United Nations*.
- FAO. (2018). *El trabajo de la FAO sobre el cambio Climático*. <http://www.theeuropeanlibrary.org/tel4/record/2000067458578>
- Fleta-Soriano, E., & Munné-Bosch, S. (2016). Stress Memory and the Inevitable Effects of Drought: A Physiological Perspective. *Frontiers in Plant Science*, 7(February), 1–6. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00143>
- Fortes, A. M., & Gallusci, P. (2017). Plant Stress Responses and Phenotypic Plasticity in the Epigenomics Era : Perspectives on the Grapevine Scenario , a Model for Perennial Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 8(82), 1–9. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00082>
- Gallego-Bartolomé, J. (2020). DNA methylation in plants: mechanisms and tools for targeted manipulation. *New Phytologist*, 227(1), 38–44. <https://doi.org/10.1111/nph.16529>
- Gallusci, P., Dai, Z., Génard, M., Gauffretau, A., Leblanc-fourmier, N., Richard-molard, C., Vile, D., & Brunel-muguet, S. (2017). Epigenetics for Plant Improvement : Current Knowledge and Modeling Avenues. *Trends in Plant Science*, 22(7), 610–623. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.04.009>
- Gao, Q.-M., Zhu, S., Kachroo, P., & Kachroo, A. (2015). Signal regulators of systemic acquired resistance. *Frontiers in Plant Science*, 06(April), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00228>
- Gasca-González, M. R., Rivera-Herrera, Y., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., Guevara-Olvera, L., Muñoz-Sánchez, C. I., & Guevara-González, R. G. (2008). Study on the transcriptome in Capsicum chinense Jacq. resistant to pepper huasteco yellow vein virus (PHYVV). *Agrociencia*, 42, 107–117.
- Georgii, E., Jin, M., Zhao, J., Kanawati, B., Schmitt-Kopplin, P., Albert, A., Winkler, J. B., & Schäffner, A. R. (2017). Relationships between drought, heat and air humidity responses revealed by transcriptome-metabolome co-analysis. *BMC Plant Biology*, 17(1), 1–23. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-1062-y>
- Gitz, V., Meybeck, A., Lipper, L., De Young, C., & Braatz, S. (2016). *Climate change and food security: Risks and responses*.
- González-Bosch, C. (2018). Priming plant resistance by activation of redox-sensitive genes. *Free Radical Biology and Medicine*, October, 0–1. <https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2017.12.028>
- Guevara-Olvera, L., Ruíz-Nito, M. L., Rangel-Cano, R. M., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante, R. F., Muñoz-Sánchez, C. I., González-Chavira, M. M., Cruz-Hernandez, A., & Guevara-González, R. G. (2012). Expression of a germin-like protein gene (CchGLP) from a geminivirus-resistant pepper (Capsicum chinense Jacq.) enhances tolerance to geminivirus infection in transgenic tobacco. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 78, 45–50. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2012.01.005>
- Gutzat, R., & Mittelsten Scheid, O. (2012). Epigenetic responses to stress: Triple defense? *Current Opinion in Plant Biology*, 15(5), 568–573. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2012.08.007>
- Habibi, G. (2014). Hydrogen Peroxide (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) Generation, Scavenging and Signaling in Plants. In *Oxidative Damage to Plants: Antioxidant Networks and Signaling* (pp. 557–584). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799963-0.00019-8>
- Hauser, M. T., Aufsatz, W., Jonak, C., & Luschnig, C. (2011). Transgenerational epigenetic inheritance in plants. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(8), 459–468.

<https://doi.org/10.1016/j.bbagrm.2011.03.007>

- He, L. H., Gao, Z. Q., & Li, R. Z. (2009). Pretreatment of seed with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> enhances drought tolerance of wheat (*Triticum aestivum* L.) seedlings. *African Journal of Biotechnology*, 8(22), 6151–6157.
- He, Y., & Li, Z. (2018). *Epigenetic Environmental Memories in Plants : Establishment , Maintenance , and Reprogramming*. xx, 1–11.
- Hirt, H. (2010). Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology. In *Plant Stress Biology: From Genomics to Systems Biology*. <https://doi.org/10.1002/9783527628964>
- Holeski, L. M., Jander, G., & Agrawal, A. A. (2012). Transgenerational defense induction and epigenetic inheritance in plants. *Trends in Ecology and Evolution*, 27(11), 618–626. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2012.07.011>
- Hossain, M. A., Bhattacharjee, S., Armin, S.-M., Qian, P., Xin, W., Li, H.-Y., Burritt, D. J., Fujita, M., & Tran, L.-S. P. (2015). Hydrogen peroxide priming modulates abiotic oxidative stress tolerance: insights from ROS detoxification and scavenging. *Frontiers in Plant Science*, 6(June), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2015.00420>
- Ihaka, R., & Gentleman, R. (1996). R: A Language for Data Analysis and Graphics. *Journal of Computational and Graphical Statistics*, 5(3), 299–314. <https://doi.org/10.1080/10618600.1996.10474713>
- Iqbal, H., Yaning, C., Waqas, M., Rehman, H., Shareef, M., & Iqbal, S. (2018). Hydrogen peroxide application improves quinoa performance by affecting physiological and biochemical mechanisms under water-deficit conditions. *Journal of Agronomy and Crop Science*, 204(6), 541–553. <https://doi.org/10.1111/jac.12284>
- Ishibashi, Y., Yamaguchi, H., Yuasa, T., Iwaya-Inoue, M., Arima, S., & Zheng, S. H. (2011). Hydrogen peroxide spraying alleviates drought stress in soybean plants. *Journal of Plant Physiology*, 168(13), 1562–1567. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2011.02.003>
- Ito, H. (2014). Chapter 12 Plant Models of Transgenerational Epigenetic Inheritance. In *Transgenerational Epigenetics* (pp. 147–161). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-405944-3.00012-X>
- Jang, J. Y., Rhee, J. Y., Chung, G. C., & Kang, H. (2012). Aquaporin as a membrane transporter of hydrogen peroxide in plant response to stresses. *Plant Signaling and Behavior*, 7(9), 1180–1181. <https://doi.org/10.4161/psb.21178>
- Ji, L., Neumann, D. A., & Schmitz, R. J. (2015). Crop epigenomics: Identifying, unlocking, and harnessing cryptic variation in crop genomes. *Molecular Plant*, 8(6), 860–870. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2015.01.021>
- Kaikkonen, M. U., Lam, M. T. Y., & Glass, C. K. (2011). Non-coding RNAs as regulators of gene expression and epigenetics. *Cardiovascular Research*, 90(3), 430–440. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr097>
- Kalavacharla, V. (Kal), Subramani, M., Ayyappan, V., Dworkin, M. C., & Hayford, R. K. (2017). Plant Epigenomics. *Handbook of Epigenetics*, 245–258. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-805388-1.00016-X>
- Kapazoglou, A., Ganopoulos, I., Tani, E., & Tsaftaris, A. (2018). Epigenetics, Epigenomics and Crop Improvement. *Advances in Botanical Research*, 86, 287–324. <https://doi.org/10.1016/bs.abr.2017.11.007>
- Katsuya-gaviria, K., Caro, E., Carrillo-barral, N., & Iglesias-fernández, R. (2020). Reactive oxygen species (ROS) and nucleic acid modifications during seed dormancy. *Plants*, 9(6), 1–14.

<https://doi.org/10.3390/plants9060679>

- Kombrink, E., & Schmelzer, E. (2001). The hypersensitive response and its role in local and systemic disease resistance. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 69–78. <https://doi.org/10.1023/A:1008736629717>
- Krueger, F., & Andrews, S. R. (2011). Bismark: A flexible aligner and methylation caller for Bisulfite-Seq applications. *Bioinformatics*, 27(11), 1571–1572. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr167>
- Lämke, J., & Bäurle, I. (2017). Epigenetic and chromatin-based mechanisms in environmental stress adaptation and stress memory in plants. *Genome Biology*, 18(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1263-6>
- Latef, A. A. H. A., Kordrostami, M., Zakir, A., Zaki, H., & Saleh, O. M. (2019). Eustress with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> facilitates plant growth by improving tolerance to salt stress in two wheat cultivars. *Plants*, 8(9). <https://doi.org/10.3390/plants8090303>
- León-Galván, F., Joaquín-Ramos, A. de J., Torres-Pacheco, I., de la Rosa, A. P. B., Guevara-Olvera, L., González-Chavira, M. M., Ocampo-Velazquez, R. V., Rico-García, E., & Guevara-González, R. G. (2011). A germin-like protein gene (CchGLP) of *Capsicum chinense* Jacq. Is induced during incompatible interactions and displays Mn-Superoxide dismutase activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(11), 7310–7313. <https://doi.org/10.3390/ijms12117301>
- Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., & Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 25(16), 2078–2079. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp352>
- Li, J., Yang, D. L., Huang, H., Zhang, G., He, L., Pang, J., Lozano-Durán, R., Lang, Z., & Zhu, J. K. (2020). Epigenetic memory marks determine epiallele stability at loci targeted by de novo DNA methylation. *Nature Plants*, 6(6), 661–674. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0671-x>
- Liu, L., Huang, L., Lin, X., & Sun, C. (2020). Hydrogen peroxide alleviates salinity-induced damage through enhancing proline accumulation in wheat seedlings. *Plant Cell Reports*, 39(5), 567–575. <https://doi.org/10.1007/s00299-020-02513-3>
- Liu, R., & Lang, Z. (2020). The mechanism and function of active DNA demethylation in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 148–159. <https://doi.org/10.1111/jipb.12879>
- Liu, Y., & He, C. (2017). A review of redox signaling and the control of MAP kinase pathway in plants. *Redox Biology*, 11(December 2016), 192–204. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.12.009>
- Locato, V., Cimini, S., & De Gara, L. (2018). ROS and redox balance as multifaceted players of cross-tolerance: epigenetic and retrograde control of gene expression. *Journal of Experimental Botany*, 69(14), 3373–3391. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery168/4990821>
- Lukens, L. N., & Zhan, S. (2007). The plant genome 's methylation status and response to stress : implications for plant improvement. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 317–322. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.04.012>
- Mahdieh, M., Mostajeran, A., Horie, T., & Katsuhara, M. (2008). Drought stress alters water relations and expression of PIP-type aquaporin genes in *Nicotiana tabacum* plants. *Plant and Cell Physiology*, 49(5), 801–813. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcn054>
- Manoharlal, R., Saiprasad, G. V. S., Ullagaddi, C., & Kovařík, A. (2018). Gibberellin A3 as an epigenetic determinant of global DNA hypo-methylation in tobacco. *Biologia Plantarum*, 62(1), 11–23. <https://doi.org/10.1007/s10535-017-0738-3>
- Martignago, D., Rico-Medina, A., Blasco-Escámez, D., Fontanet-Manzaneque, J. B., & Caño-Delgado, A.

- I. (2020). Drought Resistance by Engineering Plant Tissue-Specific Responses. *Frontiers in Plant Science*, 10(January), 1–19. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01676>
- Martínez-Aguilar, K., Ramírez-Carrasco, G., Hernández-Chávez, J. L., Barraza, A., & Alvarez-Venegas, R. (2016). Use of BABA and INA As Activators of a Primed State in the Common Bean ( *Phaseolus vulgaris* L. ). *Frontiers in Plant Science*, 7(May), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00653>
- Masuelli, R., & Marfil, C. (2011). Variabilidad epigenética en plantas y evolución. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 22(1), 1–8.
- McDowell, J. M., & Dangl, J. L. (2000). Signal transduction in the plant immune response. *Trends in Biochemical Sciences*, 25(2), 79–82. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(99\)01532-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(99)01532-7)
- Mejía-Teniente, L., Durán-Flores, B. A., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., Rivera-Bustamante, R. F., Feregrino-Perez, A. A., Pérez-Ramírez, I., Rocha-Guzmán, N. E., Reynoso-Camacho, R., & Guevara-González, R. G. (2019). Hydrogen peroxide protects pepper (*Capsicum annuum* L.) against pepper golden mosaic geminivirus (PepGMV) infections. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 106(October 2018), 23–29. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2018.11.008>
- Mejía-Teniente, L., Duran-Flores, F. de D., Chapa-Oliver, A. M., Torres-Pacheco, I., Cruz-Hernández, A., González-Chavira, M. M., Ocampo-Velázquez, R. V., & Guevara-González, R. G. (2013). Oxidative and molecular responses in capsicum annuum L. after hydrogen peroxide, salicylic acid and chitosan foliar applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 14(5), 10178–10196. <https://doi.org/10.3390/ijms140510178>
- Mejía-teniente, L., Joaquin-ramos, A. D. J., Torres-pacheco, I., & Guevara-gonzalez, R. G. (2015). Silencing of a Germin-Like Protein Gene ( CchGLP ) in Geminivirus-Resistant Pepper ( *Capsicum chinense* Jacq. ) BG-3821 Increases Susceptibility to Single and Mixed Infections by Geminiviruses PHYVV and PepGMV. *Viruses*, 7, 6141–6151. <https://doi.org/10.3390/v7122930>
- Meller, B., Kuźnicki, D., Arasimowicz-Jelonek, M., Deckert, J., & Floryszak-Wieczorek, J. (2018). BABA-Primed Histone Modifications in Potato for Intergenerational Resistance to *Phytophthora infestans*. *Frontiers in Plant Science*, 9(August), 1–17. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01228>
- Mercer, T. R., & Mattick, J. S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nature Structural and Molecular Biology*, 20(3), 300–307. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2480>
- Mittler, R. (2017). ROS Are Good. *Trends in Plant Science*, 22(1), 11–19. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2016.08.002>
- Mittler, R., & Blumwald, E. (2015). The Roles of ROS and ABA in Systemic Acquired Acclimation. *The Plant Cell Online*, 27(1), 64–70. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.133090>
- Mohamed Abass, S., & Ibrahim Mohamed, H. (2011). Alleviation of adverse effects of drought stress on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) by exogenous application of hydrogen peroxide. *Bangladesh Journal of Botany*, 40(1), 75–83. <https://doi.org/10.3329/bjb.v40i1.8001>
- Mosa, K. A., Ismail, A., & Helmy, M. (2017). *Plant Stress Tolerance An Integrated Omics Approach*. <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-319-59379-1.pdf>
- Nazir, F., Fariduddin, Q., & Khan, T. A. (2020). Hydrogen peroxide as a signalling molecule in plants and its crosstalk with other plant growth regulators under heavy metal stress. *Chemosphere*, 252, 126486. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2020.126486>
- Pandey, P., Irulappan, V., Bagavathiannan, M. V., & Senthil-Kumar, M. (2017). Impact of Combined Abiotic and Biotic Stresses on Plant Growth and Avenues for Crop Improvement by Exploiting Physio-morphological Traits. *Frontiers in Plant Science*, 8(April), 1–15.



<https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00537>

- Park, C. J., An, J. M., Shin, Y. C., Kim, K. J., Lee, B. J., & Paek, K. H. (2004). Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. *Planta*, *219*(5), 797–806. <https://doi.org/10.1007/s00425-004-1290-x>
- Parola-Contreras, I., Tovar-Perez, E. G., Rojas-Molina, A., Luna-Vazquez, F. J., Torres-Pacheco, I., Ocampo-Velazquez, R. V., & Guevara-González, R. G. (2020). Changes in affinin contents in *Heliopsis longipes* (chilcuague) after a controlled elicitation strategy under greenhouse conditions. *Industrial Crops and Products*, *148*(September 2019), 112314. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112314>
- Qi, J., Wang, J., Gong, Z., & Zhou, J. (2017). Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology*, *38*, 92–100. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2017.04.022>
- Racette, K., Rowland, D., Tillman, B., Erickson, J., Munoz, P., & Vermerris, W. (2019). Transgenerational stress memory in seed and seedling vigor of peanut (*Arachis hypogaea* L.) varies by genotype. *Environmental and Experimental Botany*, *162*(March), 541–549. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2019.03.006>
- Racette, K., Zurweller, B., Tillman, B., & Rowland, D. (2020). Transgenerational stress memory of water deficit in peanut production. *Field Crops Research*, *248*(December 2019), 107712. <https://doi.org/10.1016/j.fcr.2019.107712>
- Raja, V., Majeed, U., Kang, H., Andrabi, K. I., John, R., Iqbal, K., & John, R. (2017). Abiotic stress: Interplay between ROS, hormones and MAPKs. *Environmental and Experimental Botany*, *137*, 142–157. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2017.02.010>
- Ramírez-Carrasco, G., Martínez-Aguilar, K., & Alvarez-Venegas, R. (2017). Transgenerational Defense Priming for Crop Protection against Plant Pathogens: A Hypothesis. *Frontiers in Plant Science*, *8*(May), 1–8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00696>
- Ramirez-Prado, J. S., Abulfaraj, A. A., Rayapuram, N., Benhamed, M., & Hirt, H. (2018). Plant Immunity: From Signaling to Epigenetic Control of Defense. *Trends in Plant Science*, *23*(9), 833–844. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2018.06.004>
- Rao, X., Huang, X., Zhou, Z., & Lin, X. (2013). An improvement of the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. *Biostatistics, Bioinformatics and Biomathematics*, *3*(3), 71–85. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25558171> <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4280562>
- Sáenz-de la O, D., Cedillo-Jimenez, C. A., García-Ortega, L. F., Martínez-Reséndiz, M., Arné-Robles, D., Cruz-Hernandez, A., & Guevara-Gonzalez, R. G. (2020). Response of transgenic tobacco overexpressing the CchGLP gene to cadmium and aluminium: phenotypic and microRNAs expression changes. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, *26*(January), 3–13. <https://doi.org/10.1007/s12298-019-00716-x>
- Sáenz-de la O, D., Morales, L. O., Strid, Å., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2021). Ultraviolet-B exposure and exogenous hydrogen peroxide application lead to cross-tolerance toward drought in *Nicotiana tabacum* L. *Physiologia Plantarum*, *173*(3), 666–679. <https://doi.org/10.1111/ppl.13448>
- Sánchez, I., Reynoso-Camacho, R., & Salgado, L. M. (2015). The diet-induced metabolic syndrome is accompanied by whole-genome epigenetic changes. *Genes and Nutrition*, *10*(4). <https://doi.org/10.1007/s12263-015-0471-5>

- Saxena, I., Srikanth, S., & Chen, Z. (2016). Cross Talk between H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and Interacting Signal Molecules under Plant Stress Response. *Frontiers in Plant Science*, 7(April), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00570>
- Schmidt, G. W., & Delaney, S. K. (2010). Stable internal reference genes for normalization of real-time RT-PCR in tobacco (*Nicotiana tabacum*) during development and abiotic stress. *Molecular Genetics and Genomics*, 283(3), 233–241. <https://doi.org/10.1007/s00438-010-0511-1>
- Skirycz, A., & Inzé, D. (2010). More from less: Plant growth under limited water. *Current Opinion in Biotechnology*, 21(2), 197–203. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2010.03.002>
- Skowron, E., & Trojak, M. (2021). Effect of exogenously-applied abscisic acid, putrescine and hydrogen peroxide on drought tolerance of barley. *Biologia*, 76(2), 453–468. <https://doi.org/10.2478/s11756-020-00644-2>
- Smirnoff, N., & Arnaud, D. (2019). Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants. *New Phytologist*, 221(3), 1197–1214. <https://doi.org/10.1111/nph.15488>
- Sohag, A. A. M., Tahjib-Ul-Arif, M., Brestič, M., Afrin, S., Sakil, M. A., Hossain, M. T., Hossain, M. A., & Hossain, M. A. (2020). Exogenous salicylic acid and hydrogen peroxide attenuate drought stress in rice. *Plant, Soil and Environment*, 66(1), 7–13. <https://doi.org/10.17221/472/2019-PSE>
- Srivastava, A. K., Suresh Kumar, J., & Suprasanna, P. (2021). Seed ‘primeomics’: plants memorize their germination under stress. *Biological Reviews*, 96(5), 1723–1743. <https://doi.org/10.1111/brv.12722>
- Sun, Y., Wang, H., Liu, S., & Peng, X. (2016). Exogenous application of hydrogen peroxide alleviates drought stress in cucumber seedlings. *South African Journal of Botany*, 106, 23–28. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2016.05.008>
- Tuzun, S., & Bent, E. (2006). Multigenic and Induced Systemic Resistance In Plants. In *New York: Springer* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Vanyushin, B. F., & Ashapkin, V. V. (2011). DNA methylation in higher plants: Past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809(8), 360–368. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2011.04.006>
- Vargas-Hernández, M., Torres-Pacheco, I., Gautier, F., Álvarez-Mayorga, B., Cruz-Hernández, A., García-Mier, L., Jiménez-García, S. N., Ocampo-Velázquez, R. V., Feregrino-Perez, A. A., & Guevara-Gonzalez, R. G. (2016). Influence of hydrogen peroxide foliar applications on in vitro antimicrobial activity in *Capsicum chinense* Jacq. *Plant Biology*, 3504(April). <https://doi.org/10.1080/11263504.2016.1168494>
- Vasudevan, D., Bovee, R. C., & Thomas, D. D. (2016). Nitric oxide , the new architect of epigenetic landscapes. *Nitric Oxide*, 59, 54–62.
- Vega-Muñoz, I., Angelica Feregrino-Perez, A., & Gerardo Guevara-Gonzalez, R. (2018). Exogenous fragmented DNA acts as a damage-Associated molecular pattern (DAMP) inducing changes in CpG DNA methylation and defence-related responses in *Lactuca sativa* Mathematical modeling of tomato growth and quality View project Phenotypic and Molecular . *Article in Functional Plant Biology*. <https://doi.org/10.2747/1539-7216.50.1.93>
- Villagómez-Aranda, A. L., Feregrino-Pérez, A. A., García-Ortega, L. F., González-Chavira, M. M., Torres-Pacheco, I., & Guevara-González, R. G. (2022). Activating stress memory: eustressors as potential tools for plant breeding. *Plant Cell Reports, Fao 2021*. <https://doi.org/10.1007/s00299-022-02858-x>
- Walter, J., Jentsch, A., Beierkuhnlein, C., & Kreyling, J. (2013). Ecological stress memory and cross stress tolerance in plants in the face of climate extremes. *Environmental and Experimental Botany*, 94, 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2012.02.009>

- Wang, X., Liu, F. lai, & Jiang, D. (2017). Priming: A promising strategy for crop production in response to future climate. *Journal of Integrative Agriculture*, *16*(12), 2709–2716. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(17\)61786-6](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(17)61786-6)
- Williams, B. P., & Gehring, M. (2017). Stable transgenerational epigenetic inheritance requires a DNA methylation-sensing circuit. *Nature Communications*, *8*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02219-3>
- Yaish, M. W., Al-Lawati, A., Al-Harrasi, I., & Patankar, H. V. (2018). Genome-wide DNA Methylation analysis in response to salinity in the model plant caliph medic (*Medicago truncatula*). *BMC Genomics*, *19*(1), 1–17. <https://doi.org/10.1186/s12864-018-4484-5>
- Yamamuro, C., Zhu, J., & Yang, Z. (2016). Epigenetic Modifications and Plant Hormone Action. *Molecular Plant*, *9*(January), 57–70.
- Yang, X., & Mackenzie, S. A. (2019). Many facets of dynamic plasticity in plants. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *11*(10), 1–16. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a034629>
- Yong, W.-S., Hsu, F.-M., & Chen, P.-Y. (2016). Profiling genome-wide DNA methylation. *Epigenetics & Chromatin*, *9*(1), 26. <https://doi.org/10.1186/s13072-016-0075-3>
- Zhang, X. L., Jia, X. F., Yu, B., Gao, Y., & Bai, J. G. (2011). Exogenous hydrogen peroxide influences antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in cucumber leaves at low light. *Scientia Horticulturae*, *129*(4), 656–662. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2011.05.009>
- Zhang, Y., Wendte, J. M., Ji, L., & Schmitz, R. J. (2020). Natural variation in DNA methylation homeostasis and the emergence of epialleles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *117*(9), 4874–4884. <https://doi.org/10.1073/pnas.1918172117>
- Zunun-Pérez, A. Y., Guevara-Figueroa, T., Jimenez-Garcia, S. N., Feregrino-Perez, A. A., Gautier, F., & Guevara-González, R. G. (2017). Effect of foliar application of salicylic acid , hydrogen peroxide and a xyloglucan oligosaccharide on capsate content and gene expression associated with capsinoids synthesis in *Capsicum annum* L . *Indian Academy of Sciences*, *42*(June), 245–250. <https://doi.org/10.1007/s12038-017-9682-9>
- Zuo, J., Wang, Y., Zhu, B., Luo, Y., Wang, Q., & Gao, L. (2017). Comparative analysis of DNA methylation reveals specific regulations on ethylene pathway in tomato fruit. *Genes*, *8*, 1–15.

## 9. ANEXOS

---

### 9.1. Curvas estándar para cuantificación de compuestos

#### 9.1.1. Curva de 5mC para metilación global.

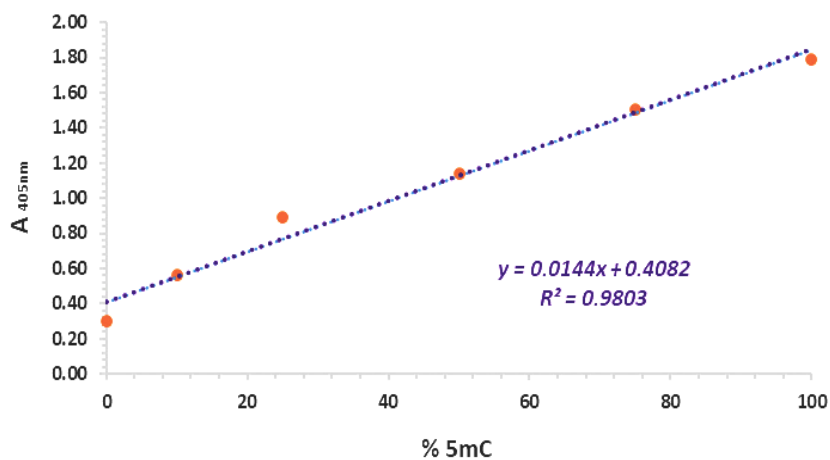


Figura 38. Curva estándar de 5mC.

#### 9.1.2. Curva de albumina para cuantificación de proteína

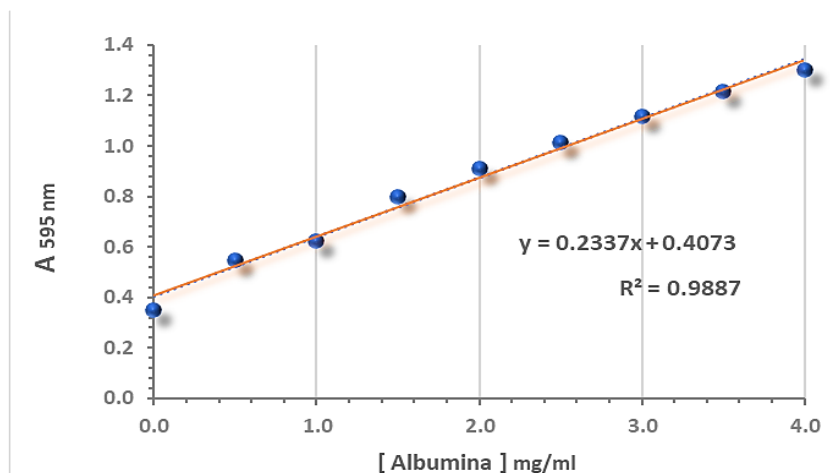
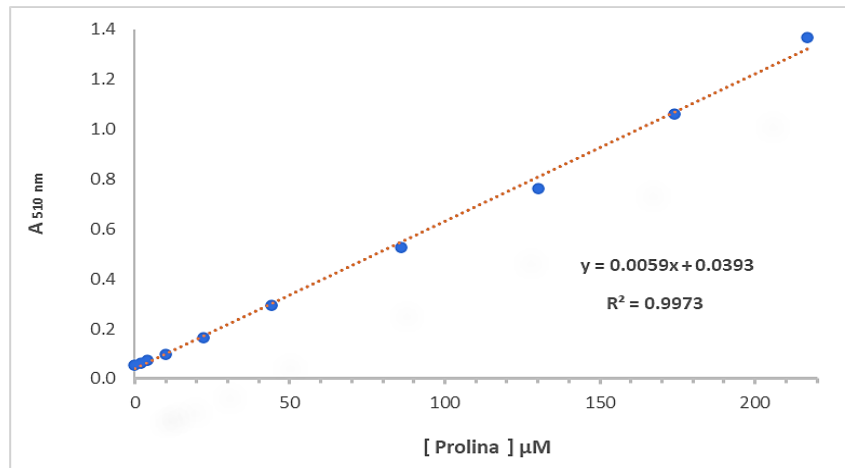


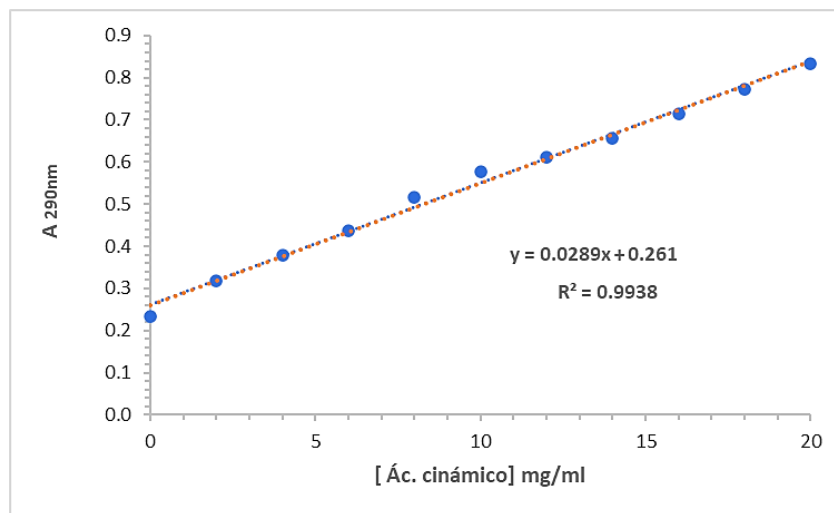
Figura 39. Curva estándar de Albumina.

### 9.1.3. Curva de prolina



**Figura 40.** Curva estándar de Prolina.

### 9.1.4. Curva de Ácido cinámico para actividad PAL



**Figura 41.** Curva estándar de Ácido cinámico.

9.1.5. Curva de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

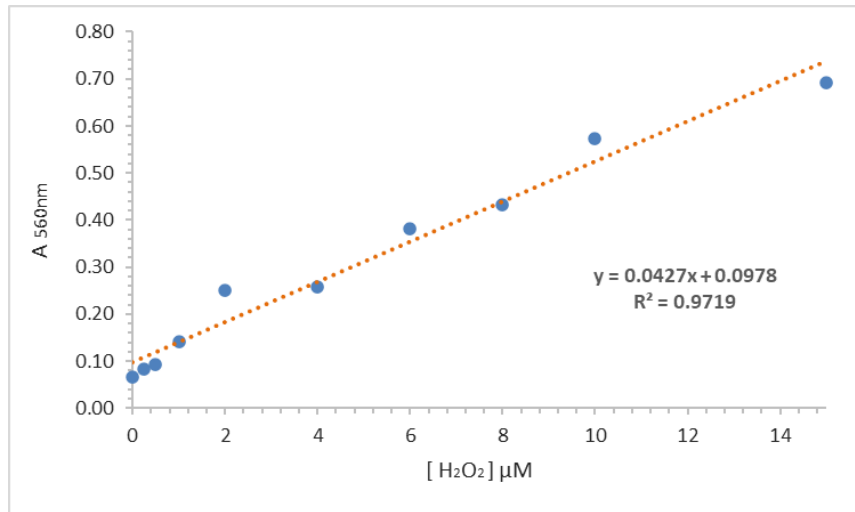


Figura 41 Curva estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

**Figura 42.** Curva estándar de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



