



“Alteraciones de la cromatina de Arabidopsis inducidas por infecciones bacterianas y sus efectos en la activación de las defensas”

TESIS DE DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

Biol. Damián Alejandro Cambiagno

Dra. María Elena Alvarez

Directora

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN QUÍMICA BIOLÓGICA DE CÓRDOBA
(CIQUIBIC-CONICET)
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA BIOLÓGICA, FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS,
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA

**CÓRDOBA
2016**

Directora de Tesis:

Dra. María Elena Alvarez

Comisión de Tesis:

Dr. José Luis Barra

Dra. Cecilia Rodriguez Galán

Dra. Susana Rubiales

Evaluador externo:

Dr. Javier Palatnik

Esta Tesis de Doctorado fue realizada gracias al apoyo de las siguientes Instituciones:

- Agencia Nacional de Promoción de Ciencia y Tecnología (FONCyT).
- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas de la República Argentina (CONICET).
- Secretaría de Ciencia y Técnica – Universidad Nacional de Córdoba (SeCyT-UNC).
- Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Agradecimientos

Agradezco a las siguientes personas por acompañarme durante la realización de esta Tesis Doctoral:

Mis padres, Luis y Carlota, que con su cariño y apoyo continuo fueron un pilar indispensable para llevar a cabo mi Tesis Doctoral, como el resto de los proyectos que me he propuesto a lo largo de mi vida. El orgullo y cariño que tengo por mis padres son parte de las cosas que más me llenan en la vida.

A mi hermano Gabriel, que me ha dado muchos consejos que, quizás sin saber, fueron clave para tomar decisiones importantes de mi vida. Además de darme con mi cuñada Lucre mis dos sobrinas Angelina y Delfina que son increíbles!!

A Sofía, que con todo su amor y comprensión me ayudó a estar mejor cada día, a salir de los momentos malos y a disfrutar más de los momentos lindos. Hace tanto por mí...

A mis compañeros del lab, que soportaron mis momentos de angustia y euforia (y mis relativamente pocos momentos calmos). Además de soportar mis chistes... Muchas gracias por todo lo que me ayudaron! Me llevo grandes amigos/as!!

A mis amigos de la vida, que en los asados y juntadas me distrajeron en los momentos malos y acompañaron en mis festejos, no solo por alegrías de la vida si no también del lab! Me acompañan desde siempre y por supuesto no faltaron en este período.

A Malena por permitirme formarme como Doctor en su laboratorio, apropiarme de la Tesis, estudiar, diseñar experimentos, llevarlos a cabo y escuchar mis teorías poco avaladas experimentalmente... También por permitirme involucrarme en proyectos de extensión universitaria, que fue una experiencia increíble. Por confiar en mí.

A la gente del "CIQUI", porque realmente está muy bueno saber que siempre hay alguien que te va a poder ayudar con gusto cuando "las papas queman". Y porque sus saludos por la mañana acompañados de una sonrisa, siempre suman.

A mi tribunal, Cecilia Rodriguez Galán, Susana Rubiales y Jose Barra, por ayudarme en cada una de las reuniones de Tesis con ideas y aliento para seguir. En particular a Jose, le agradezco las charlas de pasillo que en muchos casos eran una extensión de mis reuniones de Tesis, donde me daba aun más ideas de cómo encarar algunos puntos, y en otros casos solo para hablar de "la vida misma" o de temas científicos, de esos *cool* que poco tienen que ver con mi Tesis. Es una gran persona.

Al CIQUIBIC, por darme un lugar para hacer mi Tesis, y a CONICET y la UNC que me sustentaron estos años

Abreviaturas	6
Resumen	9
Introducción	11
Estructura de la cromatina y marcas epigenéticas	12
Transposones	13
Metilación del DNA	14
Variantes y modificaciones post-traduccionales de histonas de Arabidopsis	15
Silenciamiento génico transcripcional y post-transcripcional	18
Silenciamiento génico mediado por MOM1	21
Interacción planta-patógeno	24
Expresión de genes <i>R</i>	27
Remodelación de la cromatina centromérica en respuesta al estrés y en el desarrollo	30
Regulación transcripcional mediada por smRNAs en <i>trans</i>	31
Objetivos	34
Resultados	36
Capítulo 1:	
Respuestas a la infección con <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> en mutantes de la cromatina	37
CCs de mutantes de cromatina	39
Resistencia a <i>Pst</i> de mutantes de cromatina	43
Expresión de genes de respuesta a estrés biótico en mutantes de cromatina	45
Capítulo 2:	
Activación de las defensas de Arabidopsis contra <i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i> en mutantes de MOM1	48
Resistencia de distintos alelos de <i>mom1</i> a <i>Pst</i>	49
Factores que afectan la activación de genes de defensa y resistencia contra <i>Pst</i> en <i>mom1-2</i> y <i>mom1-5</i>	52
Genes de defensa que podrían ser regulados por MOM1	55
"Priming" de genes <i>R</i> en mutantes <i>mom1</i>	58
Efectos del estrés biótico sobre la expresión de genes de defensa en <i>mom1-5</i>	62
Proximidad de los TEs blanco de MOM1 a los genes de defensa inducidos en la mutante	65
Efecto de los dominios CMM2 y NLS de MOM1 sobre el fenómeno de "priming"	68
Regulación de H3K9me2 en el promotor de <i>ADR1</i> en plantas salvajes infectadas, mutantes <i>mom1-5</i> , <i>mom1-1</i> y <i>miniMOM</i> no tratadas	70
Capítulo 3:	
Expresión de la cromatina centromérica en plantas salvajes infectadas y su efecto en las defensas	73
Niveles de transcritos de TEs y repeticiones centroméricas en plantas salvajes infectadas con <i>Pst</i>	73
Efecto de la maquinaria de silenciamiento génico sobre la abundancia de transcritos de TEs en plantas salvajes infectadas	77
Expresión de componentes de la maquinaria de síntesis de siRNAs en plantas salvajes infectadas con <i>Pst</i>	80

Abundancia de smRNAs en plantas salvajes infectadas _____	82
Niveles de smRNAs homólogos a genes <i>R</i> en plantas salvajes infectadas _____	85
Otras secuencias homólogas a los R-smRNAs que son inducidos en infección _____	88
Expresión de <i>RLK7</i> , <i>ADR1-L1</i> y <i>ADR1</i> en plantas salvajes infectadas y mutantes de RdDM no tratadas _____	91
<i>Discusión y conclusión</i> _____	93
Resistencia a <i>Pst</i> de mutantes de cromatina _____	94
Defensas de las mutantes <i>mom1</i> _____	98
Fenómeno de “priming” _____	98
Activación indirecta de los genes de defensas (en <i>trans</i>) _____	99
Participación de RdDM en el “priming” _____	103
Defensas de plantas salvajes _____	104
Expresión de TEs centroméricos en plantas salvajes infectadas _____	104
Silenciamiento génico de TEs en infección _____	105
smRNAs homólogos al centrómero y a genes <i>R</i> en plantas infectadas _____	106
<i>Materiales y Métodos</i> _____	112
Plantas y condiciones de crecimiento _____	113
Manipulación de bacterias _____	113
Contenido de <i>Pst</i> en plantas infectadas _____	114
Expresión génica _____	114
Condensación de CCs _____	118
Inmuno-precipitación de la cromatina _____	118
Análisis de transcriptomas _____	119
Análisis genómico de blancos de MOM1 _____	119
Análisis de sRNA-seq _____	120
<i>Referencias</i> _____	121

Abreviaturas

5mC	5 metil-citosina
AGO	Argonauta
CCs	Cromocentros
CMM	"Conserved MOM1 Motif" (dominio conservado de MOM1)
DCL	"Dicer-like"
DMT	DNA metil-transferasas
ETI	"Efector-triggered immunity" (Inmunidad desencadenada por efectores)
FT	Factores de transcripción
HMT	Histona metil-transferasa
lncRNA	"long non-coding RNA" (RNAs no codificantes largos)
miRNA	micro RNAs
MOM1	"Morpheus' Molecule 1"
ncRNA	"non-coding RNA" (RNAs no codificantes)
NLS	"Nuclear Localization Singal" (señal de localización nuclear)
NRPD1a	"Nuclear RNA Polymerase D 1a" (subunidad mayor de la polimerasa de RNA D1a o Pol IV)
NRPD1b	"Nuclear RNA Polymerase D 1b" (subunidad mayor de la polimerasa de RNA D1b o Pol V)
NRPD7	"Nuclear RNA Polymerase D 7" (subunidad menor de la polimerasa de RNA D7 o Pol IV)
NRPE7	"Nuclear RNA Polymerase E 7" (subunidad menor de la polimerasa de RNA E7 o Pol V)
PAMPs	"Pathogen-Associated Molecular Patterns" (Patrones moleculares asociados a patógenos)
Pol IV	"RNA Polymerase IV" (polimerasa de RNA IV)
Pol V	"RNA Polymerase V" (polimerasa de RNA V)
PR	"Pathogenesis Related proteins" (proteínas relacionadas a patogénesis)

PRR	“Pattern Recognition Receptors” (receptores de reconocimiento de patrones)
<i>Pst</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
PTGS	“Post-Transcriptional Gene Silencing” (silenciamiento génico post-transcripcional)
PTI	“PAMPs-triggered immunity” (inmunidad desencadenada por PAMPs)
R	Proteínas de resistencia a enfermedades
R de MOM1	Genes R cuyo silenciamiento depende de MOM1
RdDM	“RNA dependent DNA-methylation” (metilación del DNA dependiente de RNAs)
RDR	“RNA Dependent RNA polymerase” (polimerasa de RNA dependiente de RNA)
<i>REB</i>	Genes de respuesta al estrés biótico
R-smRNA	smRNAs homólogos a genes R (región promotora y codificante)
SA	“Salicylic Acid” (ácido salicílico)
siRNA	“small interfering RNA” (RNAs pequeños de interferencia)
smRNA	“small RNAs” (RNAs pequeños)
tasiRNA	“trans-acting siRNAs”
TE distantes	Transposones distantes de genes R
TE próximos	Transposones próximos a genes R
TEs	Transposones
TEs de MOM1	Transposones cuyo silenciamiento dependen de MOM1
TGS	“Transcriptional Gene Silencing” (silenciamiento génico transcripcional)
TSI	“Transcriptional Silent Information”

Resumen

La cromatina de eucariotas está compuesta por regiones compactas (heterocromáticas) y relajadas (eucromáticas). En la planta modelo *Arabidopsis*, las regiones compactas están comprendidas principalmente en los centrómeros, en donde se concentran la mayoría de los transposones (TEs) del genoma. Estas regiones están enriquecidas en marcas epigenéticas represoras tales como las derivadas de la metilación del DNA (5mC) e histonas (H3K9me2). Estas estructuras son dinámicas, y se modifican frente a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*), condición que produce la relajación de la cromatina centromérica y la pérdida de 5mC. Otros estreses bióticos y abióticos desencadenan respuestas similares sobre estas regiones genómicas, pero curiosamente aún no existen estudios que evalúen si la decondensación y demetilación de los centrómeros afecta a la resistencia a los diferentes estrés.

En esta Tesis Doctoral abordamos esta incógnita realizando distintos tipos de estudios en plantas de *Arabidopsis* infectadas con *Pst*. Como una primera aproximación, analizamos de qué manera la falta de proteínas que regulan la estructura de la cromatina centromérica (mutantes de metilación del DNA e histonas, y de remodelación de cromatina) afecta a la decondensación de cromocentros (CCs) y resistencia a *Pst*. Los resultados mostraron que todas las mutantes analizadas son más resistentes al patógeno. Posteriormente seleccionamos a la mutante *mom1-5* para estudiar en ella el proceso de activación de defensas. Demostramos que esta mutante manifiesta predisposición a la activación de las defensas (“priming”) involucrando un mecanismo que operaría en *trans*. Evaluamos el comportamiento de las secuencias blanco de MOM1 y otros blancos centroméricos en plantas salvajes infectadas y encontramos que la decondensación de la cromatina centromérica se asocia a la activación y posterior represión de TEs y transgenes allí codificados, requiriendo componentes del silenciamiento génico transcripcional mediado por RNAs pequeños (smRNAs). En paralelo, detectamos un grupo de genes *R* (genes que codifican a proteínas de resistencia a patógenos) que en plantas salvajes infectadas poseen smRNAs homólogos que no inducirían su silenciamiento. Por el contrario, el silenciamiento sería re-direccionado hacia otras secuencias también homólogas a estos mismos smRNAs pero más abundantes (TEs centroméricos) liberando los minoritarios (*R*) y permitiendo su expresión. A partir de los resultados obtenidos, proponemos un mecanismo que operaría en *trans*, por el cual la activación transcripcional de TEs centroméricos podría afectar a la transcripción de genes *R* en plantas salvajes infectadas.

Introducción

Estructura de la cromatina y marcas epigenéticas

En células eucariotas, la cromatina adopta distintos grados de compactación dependiendo de la proximidad y empaquetamiento de los nucleosomas. Estas unidades están formadas por un octámero de histonas (dímeros de H2A, H2B, H3 y H4) que está rodeado por DNA (147 pb) (Kornberg, 1974; Hyde y Walker, 1975). La cromatina menos compacta o relajada se denomina eucromatina y la compacta, heterocromatina.

El grado de compactación de la cromatina está determinado por el conjunto de marcas que presenta el DNA y las histonas. Esto incluye la modificación covalente del DNA generada por metilación del carbono 5 de la citosina (C) que genera 5-metil citosina (5mC), la metilación, ubiquitinación, fosforilación y acetilación de histonas y la deposición de variantes particulares de histonas (Berger, 2007; Bannister y Kouzarides, 2011; Pfluger y Wagner, 2007; Zhang et al., 2007; Draker y Cheung, 2009; Guillemette y Gaudreau, 2006; March-Diaz y Reyes, 2009; Zlatanova y Thakar, 2008; Gehring y Henikoff, 2007; Zilberman et al., 2008; Fleury et al., 2007; Liu et al., 2007; Wang et al., 2015a). La metilación del DNA y las modificaciones post-traduccionales de las histonas son marcas epigenéticas que pueden actuar como activadoras o represoras de la transcripción, transposición y recombinación (Bannister y Kouzarides, 2011; Draker y Cheung, 2009; Gehring y Henikoff, 2007; Mirouze et al., 2009; Ito y Kakutani, 2014; Yelina et al., 2015; Choi y Henderson, 2015).

La heterocromatina se caracteriza por estar enriquecida en marcas represoras, tales como las derivadas de la mono o dimetilación de la lisina 9 de la histona 3 (H3K9me1/2), histonas deacetiladas y DNA con altos niveles de 5mC, mientras que la eucromatina está enriquecida en marcas activadoras, tales como H3K4me1/2/3, histona 3 acetiladas (H3Ac) y DNA hipometilado. A pesar del enriquecimiento de ciertas marcas en distintas regiones del genoma, el perfil epigenético es dinámico a lo largo del desarrollo, y puede modificarse por condiciones ambientales adversas (Baulcombe y Dean, 2014; Probst y Mittelsten Scheid, 2015; Ding y Wang, 2015). De esta manera, la deposición de estas marcas en sitios específicos forma parte de un complejo mecanismo regulatorio de la estructura de la cromatina y de las funciones del DNA.

Los centrómeros contienen extensos dominios de heterocromatina. Estas estructuras mantienen la cohesión de las cromátidas hermanas y median la segregación de los cromosomas durante la mitosis y meiosis ya que nuclean a los

cinetocoros y actúan como anclaje del huso mitótico (Craig et al., 1999). A nivel molecular, están enriquecidos en TEs y repeticiones, y poseen escasos genes codificantes (exceptuando TEs). Su límite físico se ha definido a través de distintas aproximaciones, como la tasa de recombinación, la existencia de secuencias específicas y de proteínas que se unen solo a esta región, entre otras (Copenhaver et al., 1999).

En los cromosomas interfásicos de eucariotas, la heterocromatina centromérica se organiza en forma de estructuras denominadas cromocentros (CCs). En la planta modelo *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) los núcleos interfásicos poseen 7-10 CCs, los cuales son visibles por microscopía óptica (Fransz et al., 2002). Estas regiones concentran TEs inactivos, y poseen una alta concentración de 5mC, H3K9me2, e histonas deacetiladas (Fransz et al., 2002; Tessadori et al., 2007).

Transposones

Los TEs son secuencias de DNA que tienen la capacidad de movilizarse en el genoma y ocupar una nueva posición por eventos de transposición o retro-transposición catalizados por enzimas codificadas en sus propias secuencias. Su movimiento genera duplicaciones y mutaciones, por lo que han sido estudiados por su contribución a la evolución de los genomas (Feschotte et al., 2002; Slotkin, 2010). Originalmente fueron nombrados “controlling elements” por su capacidad de regular ciertas funciones de genes adyacentes (McClintock, 1946) a través de mecanismos que operan en *cis*. Posteriormente, se describió que estos elementos también afectan a genes distantes por mecanismos que operan en *trans* (Downen et al., 2012; McCue et al., 2013). El segundo tipo de control parece operar en *Arabidopsis* donde estudios evolutivos sugirieron que TEs que originalmente regulaban en *cis* a genes adyacentes, siguieron regulando a los mismos genes luego de ser duplicados/insertados en regiones distantes en el genoma, involucrando en el segundo caso mecanismos que operan en *trans* (Wang et al., 2013a).

Además de las funciones regulatorias que los TEs ejercen sobre algunos genes particulares, su expresión y transposición pueden tener efectos negativos sobre la integridad del genoma. Normalmente estos elementos son silenciados por mecanismos convergentes basados en la represión de su expresión a través de la metilación del DNA e histonas y la compactación de la cromatina (Wang et al., 2015a;

Slotkin y Martienssen, 2007; Numa et al., 2010; Pikaard et al., 2012; Chekanova et al., 2015).

Dependiendo de la especie, los TEs pueden llegar a constituir una gran parte del genoma. Generalmente estos elementos se localizan en los centrómeros, regiones de organización nucleolar y otras estructuras heterocromáticas de los cromosomas eucariotas (Feschotte et al., 2002; Wessler, 2006; Lee y Kim, 2014). Dentro del reino vegetal, *Arabidopsis* contiene un nivel relativamente bajo de TEs y en su genoma se encuentran representadas la mayoría de las familias descritas en plantas, siendo la familia Gypsy la más abundante en los centrómeros (Slotkin, 2010).

Metilación del DNA

La unión covalente de un grupo metilo en el carbono 5 de la C que genera 5mC, involucra la actividad de las DNA metil transferasas (DMT) (Chan et al., 2005; Goll y Bestor, 2005). En mamíferos, esta metilación ocurre principalmente en el contexto CG (C seguida de G), a través de la actividad de las DMT DNMT1, DNMT3a y DNMT3b (Goll y Bestor, 2005). En plantas, la metilación de C también ocurre en otros consensos además de CG, tales como CHG y CHH (H: C, T o A). En *Arabidopsis*, MET1 (“Methyl-Transferase 1”) es homóloga a DNMT1 y cataliza la metilación de C en el consenso CG, mientras que DRM1, DRM2 (“Domains Rearranged Methylase 1 y 2”), CMT2 y CMT3 (“Chromomethylase 3”) son homólogas a las DNMT3a/b y metilan en consensos CHG y CHH (Chan et al., 2005; Stroud et al., 2014). Además, existen otras proteínas sin actividad DMT que son requeridas para esta función. Entre ellas, DDM1 (“Deficient in DNA Methylation 1”) es un remodelador de cromatina que presenta actividad helicasa dependiente de ATP (Jeddeloh et al., 1998; Brzeski y Jerzmanowski, 2003) y contribuye a incorporar marcas epigenéticas en la cromatina. Las mutantes *ddm1* manifiestan hipometilación del DNA, e incluso decondensación de CCs (Jeddeloh et al., 1998; Gendrel et al., 2002; Soppe et al., 2002; Ebbs y Bender, 2006). Por otra parte VIM1, VIM2 y VIM3 (“Variant In Methylation 1/2/3”) son proteínas que se unen al DNA previamente metilado (5mC) y guían la metilación CG y H3K9, actuando como cofactor de MET1 (Shook y Richards, 2014). En este caso, la triple mutante *vim1/2/3* muestra hipometilación del DNA y de H3K9, alteraciones de otras marcas represoras de histonas, así como reorganización nuclear de secuencias centroméricas y activación transcripcional de TEs y genes próximos al centrómero (Woo et al., 2007; Shook y Richards, 2014; Kim et al., 2014).

La decondensación y activación transcripcional de la cromatina, puede involucrar procesos de demetilación del DNA. Esta demetilación puede ser de dos tipos, pasiva o activa. La primera se produce por la falta de actividad DMT luego de la síntesis de una nueva hebra de DNA en la replicación. Por otra parte, la demetilación activa es mediada por enzimas que catalizan la escisión de la base metilada y su remplazo por una no metilada (Furner y Matzke, 2011). Las primeras enzimas identificadas como capaces de generar demetilación activa fueron las DNA glicosidasas (Zhu, 2009; Hashimoto et al., 2015). Estas enzimas rompen el enlace glicosídico entre la C y la deoxi-ribosa, generando un sitio abásico. Esto recluta al sistema de reparación de bases (“Base Excision Repair” BER), en el que participan varios tipos de enzimas que permiten la incorporación de la nueva base. Existen distintas variantes de este proceso y uno de los más comunes incluye a una endonucleasa que remueve la deoxi-ribosa, una DNA polimerasa que incorpora la C (no metilada) y una DNA ligasa que sella la molécula. Las primeras DNA glicosidasas descritas en *Arabidopsis* fueron las pertenecientes a la familia DEMETER (Ikeda y Kinoshita, 2009; Zhu, 2009). Hasta el momento, en el reino vegetal, se conocen cuatro DNA glicosidasas de la familia DEMETER, ROS1 (“Repressor of Silencing 1”), DME (“DEMETER”), DML2 y DML3 (“DEMETER-Like 2 y 3”, respectivamente) (Agius et al., 2006; Ortega-Galisteo et al., 2008; Zhu, 2009). Recientemente, en *Arabidopsis* se describió una nueva DNA glicosidasa denominada MBD4L (“Methyl-Binding Domain 4-Like”), cuyo homólogo en animales (MBD4) contribuye a la demetilación activa del DNA. En ambos organismos esta enzima posee actividad glicosidasa sobre las bases U y T apareadas con G, previamente generadas por la deaminación de C y 5mC respectivamente (Ramiro-Merina et al., 2013). En nuestro laboratorio, describimos que MBD4L pertenece a una familia de DNA glicosidasas de plantas aún no descrita, cuya expresión es tejido específica. Esta enzima posee localización nuclear y potencia la tolerancia al estrés oxidativo a través de su dominio glicosidasa, sugiriendo que desencadena demetilación activa del genoma nuclear en condiciones que promueven la oxidación de C (Nota et al., 2015).

Variantes y modificaciones post-traduccionales de histonas de *Arabidopsis*

Existen alrededor de 80 enzimas que regularían directamente la deposición de marcas epigenéticas activadoras o represoras sobre las histonas. Estas enzimas y las modificaciones de histonas que ellas generan reclutan a otras proteínas para formar complejos que también modulan la metilación de histonas, del DNA y la remodelación

de la cromatina (Wang et al., 2015a). Esto evidencia la alta complejidad de los mecanismos que regulan a estas marcas epigenéticas. A pesar de esto, la H3K9me2 y la H3K4me3 son marcadores clásicos de la represión o activación transcripcional y de la estructura compacta o relajada de la cromatina, respectivamente. En eucariotas, se han descrito variantes de todas las histonas excepto de H4 (Bernstein y Hake, 2006). En *Arabidopsis*, la histona canónica H3 (H3.1) posee dos variantes, H3.3 (enriquecida en genes) y CENH3 (enriquecida en los centrómeros), mientras que la H2A posee la variante H2A.Z (marca antagónica a 5mC) (Shu et al. 2014; Lermontova et al., 2011; Kuppu et al., 2015; Karimi-Ashtiyani et al., 2015; Talbert et al., 2002; Zilberman et al., 2008; Jarillo y Piñeiro, 2015; March-Díaz et al., 2007).

La monoubiquitinación de H2A y H2B es catalizada por las enzimas HUB1 y HUB2 (“Histone Monoubiquitination 1 y 2”, respectivamente) (Fleury et al., 2007; Liu et al., 2007). Por otra parte, la acetilación y deacetilación de histonas puede ocurrir en lisinas de las histonas H3 y 4 (Zhang et al., 2007), y es catalizada por 12 enzimas histona acetil-transferasas (HAT) y 18 deacetilasas (HDAC) (Pandey et al., 2002). Finalmente, la metilación de histonas mayormente afecta a cinco lisinas de H3 y 4 (Pfluger y Wagner, 2007). Además, existen 49 enzimas histona metil-transferasa (HMT) que presentan un dominio SET (“Suppressor of variegation, Enhancer of zeste and Trithorax”), el cual les da el nombre a la familia SDG (“Set Domain Group”) (Gendler et al., 2008). Por ejemplo, SDG8 modula la mono y dimetilación de H3K36, ATX1 (“*Arabidopsis* Trithorax-like 1”) la trimetilación de H3K4, ATXR5 y ATXR6 (“*Arabidopsis* Trithorax-Related 5 y 6” respectivamente) la monometilación de H3K27 y las SUVH4, SUVH5 y SUVH6 entre otras (“Set Domain Proteins SU(VAR)3-9 homolog 4, 5 y 6” respectivamente) regulan la mono y dimetilación de H3K9 (Pontvianne et al., 2010).

Es decir, el perfil de metilación de histonas y del DNA y su efecto activador/represor es regulado por mecanismos complejos en donde participan numerosas proteínas y enzimas cuya inter-regulación es mayormente desconocido (Figura 1).

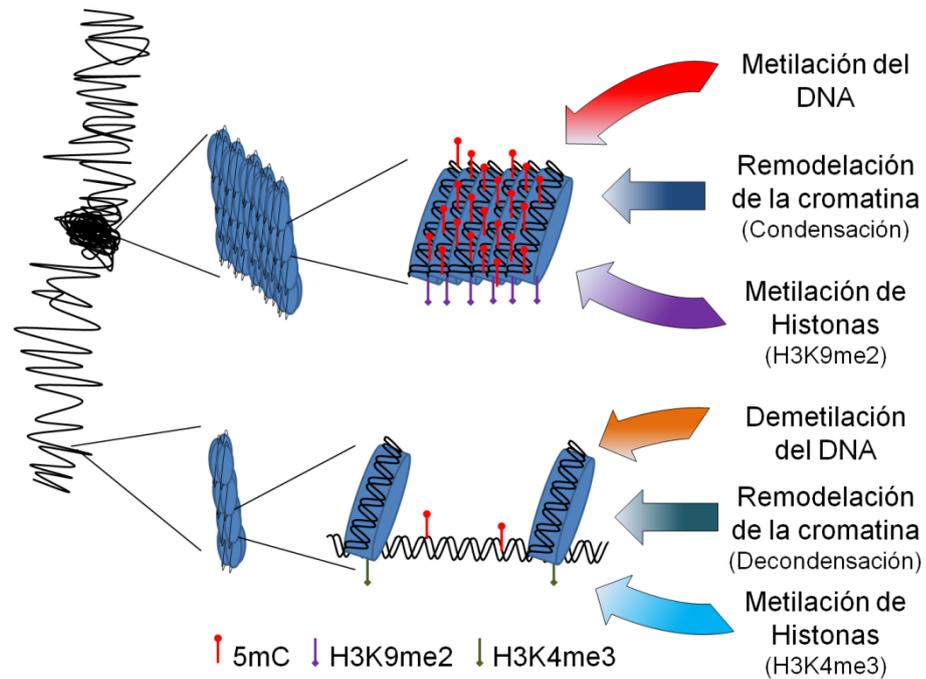


Figura 1: Marcas epigenéticas de la cromatina centromérica (parte superior) y no centromérica (parte inferior) de cromosomas interfásicos de Arabidopsis. El grado de compactación de los nucleosomas (azules) es mayor en los centrómeros, donde se acumula 5mC y H3K9me2. Las regiones no centroméricas se encuentran enriquecidas en H3K4me2 y DNA hipometilado. Distintos mecanismos median la metilación/demetilación del DNA, de histonas y remodelación de la cromatina (condensación/decondensación de nucleosomas).

Silenciamiento génico transcripcional y post-transcripcional

Dos mecanismos muy estudiados en la represión génica, son los que derivan de procesos de silenciamiento a nivel post-transcripcional o transcripcional (PTGS y TGS, respectivamente). Ambos sistemas están mediados por RNA no codificantes (ncRNA). El PTGS dirige la degradación de mRNAs o el bloqueo de la traducción de proteínas. Por el contrario, el TGS inhibe la transcripción a través de la metilación del DNA dependiente del RNA (RdDM), que luego deriva en la deposición de otras marcas represoras (Bologna y Voinnet, 2014). El PTGS y TGS involucran una maquinaria biosintética de ncRNAs denominados lncRNAs (“long non-coding RNAs”) y smRNAs (“small RNAs”), así como el direccionamiento de éstos smRNAs a su molécula blanco. En Arabidopsis, los lncRNAs y smRNAs son sintetizados por RNA polimerasas dependientes de DNA (Pol II, Pol IV y Pol V), RNA polimerasas dependientes de RNA (“RNA dependent RNA polymerases”; RDR) y endonucleasas (“Dicer-like”; DCL). Las proteínas que dirigen al smRNA a la molécula blanco (por complementariedad de bases) son las proteínas de la familia Argonauta (AGO) (Bologna y Voinnet, 2014).

El PTGS es un mecanismo que afecta a varios tipos de smRNAs, incluidos los microRNAs (miRNAs). Estos son codificados por genes localizados principalmente en regiones eucromáticas cuya transcripción es principalmente catalizada por la Pol II. Los blancos de estos miRNAs son genes codificantes de proteínas (no TEs) (Ghildiyal y Zamore, 2009; Bologna y Voinnet, 2014). El producto de su transcripción presenta una estructura secundaria caracterizada por una única hebra de RNA con secuencias inversas y complementarias que forman una doble hebra conectada por una horquilla. A través de la actividad endonucleasa de DCL1 se generan los miRNA de 21 nt que generalmente presentan una U en su extremo 5'. Luego de interactuar con AGO1 estas moléculas son dirigidas a sus mRNAs blanco, los cuales son generalmente degradados (Figura 2a) (Ghildiyal y Zamore, 2009, Bologna y Voinnet, 2014). Otros smRNAs que también dirigen el PTGS, son los siRNAs, natsiRNAs, tasiRNAs (“small interfering RNA”, “natural antisense transcript siRNAs” y los “trans-acting siRNA”, respectivamente). Estas últimas difieren en su biosíntesis con los miRNAs (Bologna y Voinnet, 2014).

En el TGS, los smRNAs son principalmente del tipo siRNAs y en general dirigen el silenciamiento de TEs y repeticiones. Este mecanismo actuaría principalmente sobre TEs de la eucromatina. La mayoría de los siRNAs son sintetizados por las polimerasas Pol IV y RDR2 que interactúan en el núcleo y generan una doble hebra de RNA. Este RNA es luego degradado por la endonucleasa DCL3

que produce siRNAs de 24 nt con una A en su extremo 5' (Pikaard et al., 2012; Law et al., 2013; Haag et al., 2012; Bologna y Voinnet, 2014). Existen variantes de siRNAs que son sintetizados por otras polimerasas (Pol II, RDR6, entre otras) y difieren en su longitud y nucleótido en el 5'. El extremo 5' y 3' de estos siRNAs son reconocidos y adheridos en un dominio MID y Paz de AGO4 respectivamente (Qi et al., 2006; Bologna y Voinnet, 2014) y el complejo AGO4-siRNA se dirige al núcleo, en donde interactúa por complementariedad de bases con lncRNAs del sitio blanco del silenciamiento que están siendo sintetizados por Pol V (Wierzbicki et al., 2009; Zhou y Law, 2015). Por su parte, Pol V es reclutada por SUVH2 y SUVH9 en sitios previamente metilados por MET1, generándose una retroalimentación positiva que mantiene y refuerza el silenciamiento de las regiones blanco (Johnson et al., 2014). Este complejo Pol V-lncRNA-smRNA-AGO4 involucra a su vez, la reclusión de metiltransferasas de DNA e histonas y remodeladores de cromatina que regulan la deposición de marcas epigenéticas represoras de la transcripción tales como las derivadas de la metilación CHH, la H3K9me2, y la compactación la cromatina (Figura 2b) (Pikaard et al., 2012). Publicaciones recientes proponen que la metilación CHH vía DRM1/2 dependiente de RdDM regularía principalmente el silenciamiento de TEs eucromáticos, mientras que la metilación de CHH vía CMT2 (de mantenimiento e independiente de RdDM) mediaría la represión de TEs centroméricos (Sigman y Slotkin; 2016). A pesar de esto, existen evidencias que el RdDM induce el re-silenciamiento de TEs centroméricos activados (Slotkin et al., 2009; Schoft et al., 2009; McCue et al., 2015).

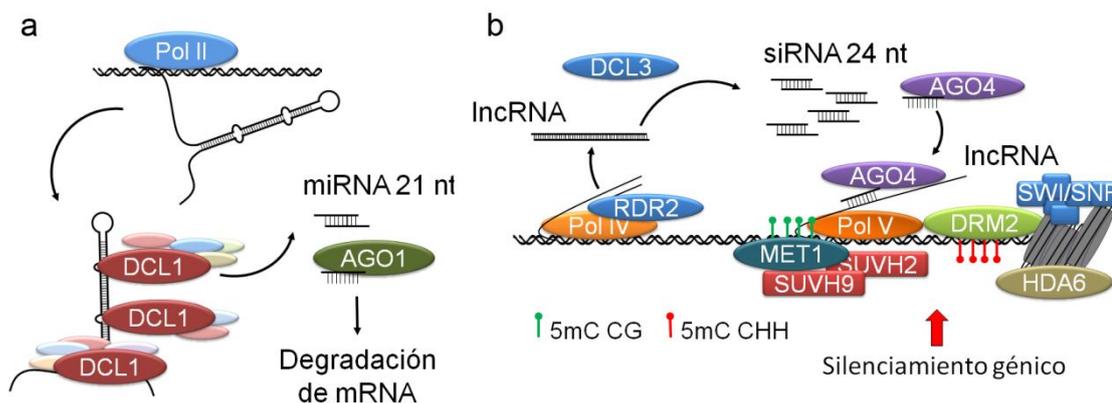


Figura 2: Biosíntesis de miRNA y siRNAs en el silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) y transcripcional (TGS). (a) En el PTGS, la Pol II sintetiza una molécula de RNA a partir de un gen eucromático que codifica a un miRNA. El RNA posee una estructura secundaria con una doble hebra unida por una horquilla, y es procesado por la enzima DCL1 para generar los miRNAs de 21 nt. Estos son incorporados en AGO1 y dirigidos a su molécula de mRNA blanco por complementariedad de bases, la cual será degradada. (b) En el TGS, la Pol IV sintetiza un lncRNA que será sustrato de RDR2 para la generación de un RNA de doble hebra. Este es posteriormente degradado por DCL3 en fragmentos de 24 nt o siRNAs. Los siRNAs son dirigidos al núcleo por AGO4, y por complementariedad de bases interactúan con un lncRNA que en este caso está siendo sintetizado por Pol V. Pol V es reclutada por SUVH2 y 9 en sitios previamente metilados por MET1 (metilación CG). El complejo AGO4-siRNA-lncRNA-Pol V recluta a DRM2 que cataliza la metilación en consensos CHH, y a otras enzimas remodeladores de la cromatina (HDA6, complejo remodelador SWI/SNF).

Silenciamiento génico mediado por MOM1

MOM1 es una proteína nuclear de *Arabidopsis* de 2001 aa que posee un dominio homólogo a remodeladores de cromatina con actividad ATPasa de la familia SWI2/SNF2. Esta proteína es requerida para el silenciamiento génico a través de la metilación de H3K9 en sitios previamente metilados (5mC) por RdDM (Figura 3a) (Amedeo et al., 2000; Habu et al., 2006; Vaillant et al., 2006). Debido a que MOM1 no posee actividad histona metil-transferasa, se cree que formaría parte de un complejo proteico involucrado en la deposición de estas marcas. Las mutantes *mom1-1*, *mom1-2* y *mom1-5* sobre-expresan transgenes, repeticiones, TEs de la familia Gypsy y en general blancos del RdDM. Estas mutantes presentan hipometilación de H3K9 pero no alteran otras marcas epigenéticas, tales como 5mC (Amedeo et al., 2000; Steimer et al., 2000; Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al., 2010; Won et al., 2012). Dada la disposición de marcas epigenéticas observada en los TEs blanco de MOM1 en mutantes *mom1* (pérdida de H3K9me2 pero no de 5mC), esta cromatina fue denominada “heterocromatina intermedia” (Habu et al., 2006; Vaillant et al., 2006).

Estudios genéticos determinaron que MOM1 interactúa de manera epistática, sinérgica o antagónica con otros componentes que afectan al silenciamiento de TEs. Por un lado actúa junto con Pol IV y Pol V y por ende con el RdDM (Figura 3b) (Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al., 2010). Por otra parte, actúa con MORC6 (“Microorchidia 6”) cuya función en el silenciamiento podría estar asociada a cambios estructurales de la cromatina (Moissiard et al., 2012; Moissiard et al., 2014). Además, MOM1 y otras cinco proteínas que regulan la estructura de la cromatina y metilación del DNA e histonas interactúan con tres isoformas de SUMO (“Small Ubiquitin-like Modifier”) (Elrouby et al., 2013). A su vez, MOM1 actúa con DDM1 inhibiendo la expresión de TEs en plantas hijas de madres sometidas a estrés por calor (Iwasaki y Paszkowski, 2014) aunque MOM1 por sí sola no es suficiente para inhibir la activación de estos TEs en este tipo de estrés (Wang et al., 2015b). Más allá de estas funciones represoras de TEs en estrés, no se conocen otros fenotipos asociados a la resistencia al estrés abiótico en las mutantes *mom1-2* y *mom1-1* (Dr. Jerzy Paszkowski, comunicación personal).

Además, MOM1 posee funciones independientes del RdDM, como la regulación transcripcional de un grupo de TEs (Figura 3b) y prevención de la generación de transcriptos aberrantes (largos) durante la terminación de la transcripción (Wierzbicki, 2010; Zhou et al., 2010).

Intentos por conocer la bioquímica del silenciamiento génico mediada por esta proteína permitieron identificar siete dominios diferentes. Uno de ellos sería responsable de su localización nuclear (NLS). Otros dos corresponden a secuencias repetitivas de función desconocida. El cuarto dominio es un relicto de un motivo remodelador de cromatina de tipo SNF2. Los restantes son tres dominios conservados entre proteínas MOM de álamo, arroz, pino (*Pinus taeda*) y *Selaginella* llamados CMM1 a 3 (“Conserved MOM1 Motif”) (Caikovski et al., 2008). El dominio NLS es requerido para su función en la represión transcripcional (Caikovski et al., 2008). A su vez, el dominio CMM2, es necesario para el silenciamiento de TEs cuya regulación también depende de RdDM, a través de su capacidad de formar homo dímeros y posiblemente multímeros con otras proteínas y unirse al DNA (Caikovski et al., 2008; Nishimura et al., 2012; Mlotshwa et al., 2010).

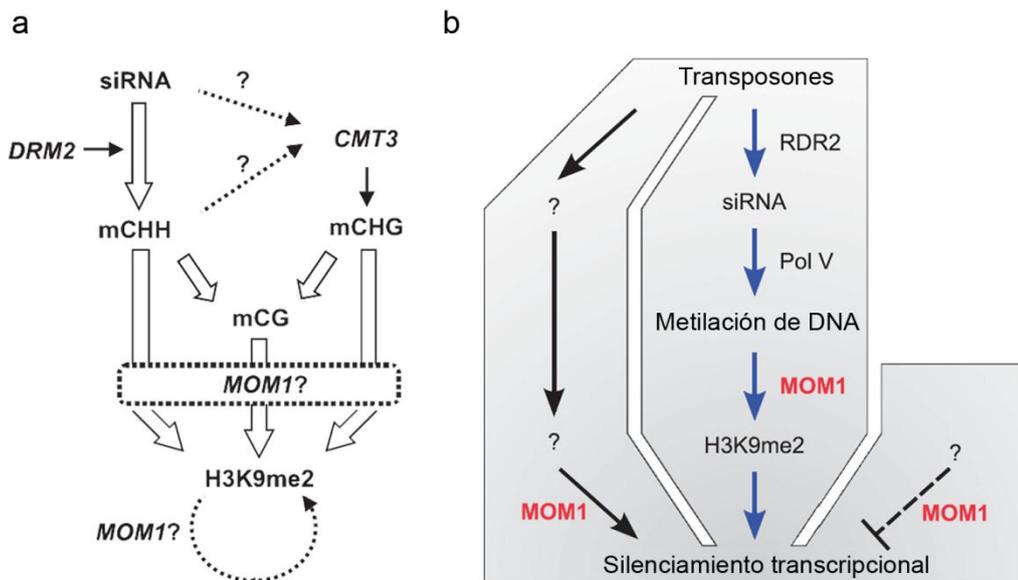


Figura 3: Rol de MOM1 en el silenciamiento génico de TEs. (a) La metilación de H3K9me2 mediada por MOM1 es guiada por marcas de 5mC derivadas de siRNAs y DRM2 o la acción de CMT3. (b) El silenciamiento transcripcional mediado por MOM1 puede ser dependiente o independiente de RdDM. Adaptado de Numa et al., 2011 y Wierzbicki, 2010.

Interacción planta-patógeno

En las plantas superiores, cada célula tiene la capacidad de inducir respuestas de defensa ante el reconocimiento de patógenos. Esto no ocurre en los animales superiores donde sólo las células especializadas del sistema inmune desarrollan esta función. Las células vegetales perciben a los microbios y patógenos a través de receptores de membrana e intracelulares. Los primeros receptores reconocen moléculas conservadas del patógeno tales como la flagelina, lipopolisacáridos, glicoproteínas, entre otros, denominadas PAMPs (“Pathogen-Associated Molecular Patterns”). Los segundos, reconocen moléculas del patógeno que son inyectadas al lumen celular y son denominadas “efectores” (Zhang y Thomma, 2013; Macho y Zipfel, 2014; Block y Alfano, 2011).

Los receptores extracelulares son llamados PRR (“Pattern Recognition Receptors”) y tras reconocer PAMPs inducen una vía de defensa denominada PTI (“PAMP-Triggered Immunity”) (Zhang y Thomma, 2013; Macho y Zipfel, 2014). Mientras que los intracelulares son llamados proteínas R (de resistencia), y tras reconocer a los efectores desencadenan una respuesta llamada ETI (“Effector-Triggered Immunity”) (Block y Alfano, 2011; McDowell y Simon, 2008). La ETI se induce de manera más rápida y robusta que la PTI, y sólo la primera respuesta activa la muerte celular programada de las células infectadas.

La PTI y ETI se caracterizan por la acumulación de especies reactivas del oxígeno y la activación de cascadas dependientes de MAPK (“Mitogen-Activated Protein Kinase”). Estas respuestas llevan al engrosamiento de la pared celular y activación de factores de transcripción que inducen a genes involucrados en el reconocimiento (*R* y *PRR*), en la acumulación de la hormona ácido salicílico (SA) (*EDS5*- “*Enhanced Disease Resistance 5*”, *ICS1*- “*Isochorismate Synthase 1*”), y en la actividad antimicrobiana (*PR1*, *PR2*, *PR5*, “*Pathogen Related 1, 2, 5*”, respectivamente) (Figura 4) (Asai et al., 2002; Block y Alfano, 2011; Dempsey et al., 2011; Tsuda et al., 2013). De esta manera, la activación transcripcional de los mismos es utilizada como marcador de la estimulación de las defensas a distintos niveles.

La expresión de los genes de defensa está estrictamente controlada. A nivel basal se encuentra normalmente reprimida por distintos mecanismos debido a que la activación de las defensas conlleva a un alto costo energético con consecuencias negativas en el desarrollo y reproducción de la planta (“fitness”). Este costo resulta de utilizar los recursos metabólicos para generar compuestos antimicrobianos en lugar de

producir aquellos necesarios para el crecimiento (van Hulten et al., 2006). Sin embargo, las plantas pueden inducir defensas de forma rápida e intensa sin presentar expresión constitutiva de estas vías. Esta última condición se denomina “priming” (Kohler et al., 2002; Conrath et al., 2015; Hilker et al., 2015; Balmer et al., 2015) y se define como la predisposición de estimular rápidamente estas vías. Un tipo de “priming” es el que ocurre a nivel sistémico (en tejidos no infectados) en plantas que indujeron localmente la PTI o ETI (Dempsey y Klessig, 2012; Shah y Zeier, 2013).

Durante el “priming”, la predisposición a la activación transcripcional de genes es regulada por marcas epigenéticas. Por ejemplo, esta activación génica está asociada a un incremento de la variante H2A.Z en los nucleosomas (March-Díaz et al., 2008). A su vez, el “priming” de factores de transcripción de la familia WRKY implica un incremento en la metilación y/o acetilación de histonas (H3K4me2/3, K5/8/9/12/14ac) (Jaskiewicz et al., 2011; Singh et al., 2014). Además de la PTI y ETI, otros estreses tales como sucesivas exposiciones a frío, calor y salinidad inducen “priming” para la resistencia a patógenos y activación de *WRKY53*, *FRK1* y *NHL10* acumulando marcas epigenéticas activadoras (H3K4me y H3K9/K14Ac) dependientes de HAC1 (“Histone Acetyltransferase 1”) (Singh et al., 2014).

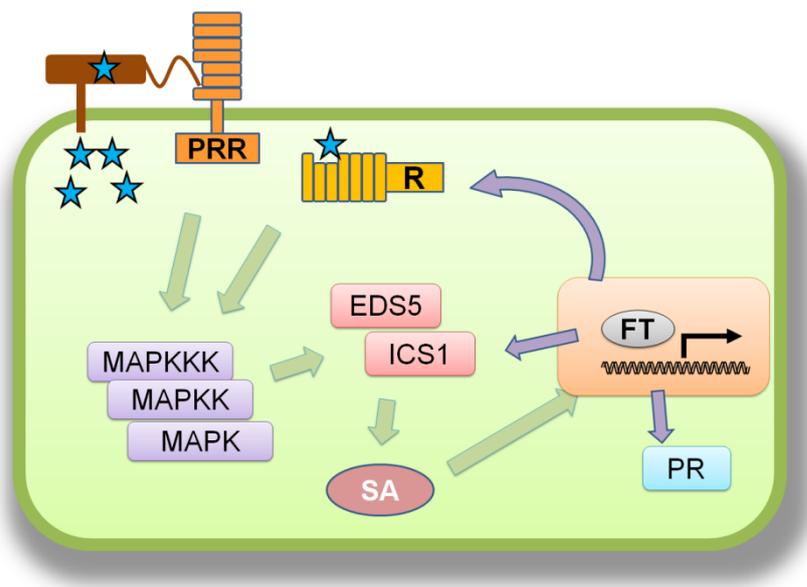


Figura 4: Principales vías de defensas contra patógenos. Receptores PRR o R median el reconocimiento de PAMPs y efectores, respectivamente. Tras el reconocimiento se inducen cascadas de fosforilación de MAPK y acumulación de SA por la actividad de EDS5 e ICS1 (entre otras). Finalmente, esta hormona induce la activación de factores de transcripción (*FT*) implicados en la expresión de genes *PRR*, *R*, *EDS5*, *ICS1*, *PR*, entre otros.

Expresión de genes *R*

Existen aproximadamente 150 proteínas de la familia *R* en *Arabidopsis* (McDowell y Simon, 2008). Dentro de esta familia las proteínas que contienen dominios NB-LRR (“Nucleotide Binding, Leucine-Rich Repeat”) comprenden una de las familias de genes más grande del genoma de *Arabidopsis*. Hasta el momento, la mayor parte de los estudios sobre estas proteínas están enfocados en su requerimiento para el reconocimiento de un determinado ligando, las evidencias bioquímicas y estructurales que sugieren esta unión y la activación de las vías de señalización de la ETI (Rafiqi et al., 2009; McDowell y Simon, 2008).

Curiosamente, aunque los genes *R* han sido muy estudiados desde el punto de vista funcional se conoce poco sobre su regulación transcripcional a nivel basal y en infección. La sobre-expresión de los genes *R* *RPS2*, *RPS4*, *Laz5*, *SNC1*, *ADR1*, *ADR-L1*, *ADR-L2* activa las defensas contra patógenos de manera constitutiva incluso en ausencia de ligando (Tao et al., 2000; Heidrich et al., 2013; Palma et al., 2010; Stokes et al., 2002; Yi y Richards, 2009; Grant et al., 2003; Collier et al., 2011; Bonardi et al., 2011). En los últimos años se está comenzando a estudiar la regulación epigenética de estos genes. En este aspecto, es importante notar que muchos genes *R* poseen TEs en sus cercanías (Weiberg et al., 2014). Aparentemente, esto podría afectar no sólo a la recombinación y evolución de los genes *R* sino también a su expresión (Alvarez et al., 2010; Weiberg et al., 2014). Para unos pocos genes *R*, se ha descrito que las marcas epigenéticas derivadas de RdDM y la metilación de histonas sobre TEs o relictos de TEs insertos en sus regiones regulatorias pueden condicionar su expresión (Figura 5a). De manera similar los TEs pueden afectar la generación de mRNAs codificantes o no codificantes mediante eventos de “splicing” alternativo (Figura 5b) (Downen et al., 2012; Wang et al., 2013a; Le et al., 2015; Yang et al., 2014; Weiberg et al., 2014).

El tratamiento de *Arabidopsis* con flg22 (péptido de 22 aa de la flagelina que conserva la capacidad de desencadenar PTI) induce la activación transcripcional del gen *R* *RMG1* como consecuencia de la demetilación del DNA de un TE inserto en su región promotora (Yu et al., 2013). Por otra parte, los genes *R* *RPS4* y *SNC1* que forman parte del “cluster” *RPP5*, están enriquecidos en TEs y su transcripción es susceptible a cambios en la metilación del DNA mediada por siRNAs (Yi y Richards, 2007). A su vez, los niveles de transcriptos de *SNC1* son inducidos por la generación del epialelo *bal* como consecuencia de la hipometilación en la mutante *ddm1* que lleva a la duplicación de una porción de 55 kb del cluster *RPP5* (Yi y Richards, 2009). Esto

sugiere que los genes *R* de *RPP5* serían regulados por un efecto local que ejercen los TEs sobre estos *loci* (esquema Figura 5a).

En el caso de gen *R RPP7*, las marcas epigenéticas serían modificadas durante el proceso infectivo dando lugar a la generación de un transcripto largo funcional (inicio de la infección) o uno corto no funcional (fase tardía). Este último es generado por un evento de “splicing” alternativo que genera una poliadenilación prematura y depende de los niveles de 5mC y H3K9 mediada por CMT3, DDM1, SUVH4/5/6, entre otras, en un TE inserto en su primer intrón (Figura 5b, Tsuchiya y Eulgem, 2013; Le et al., 2015).

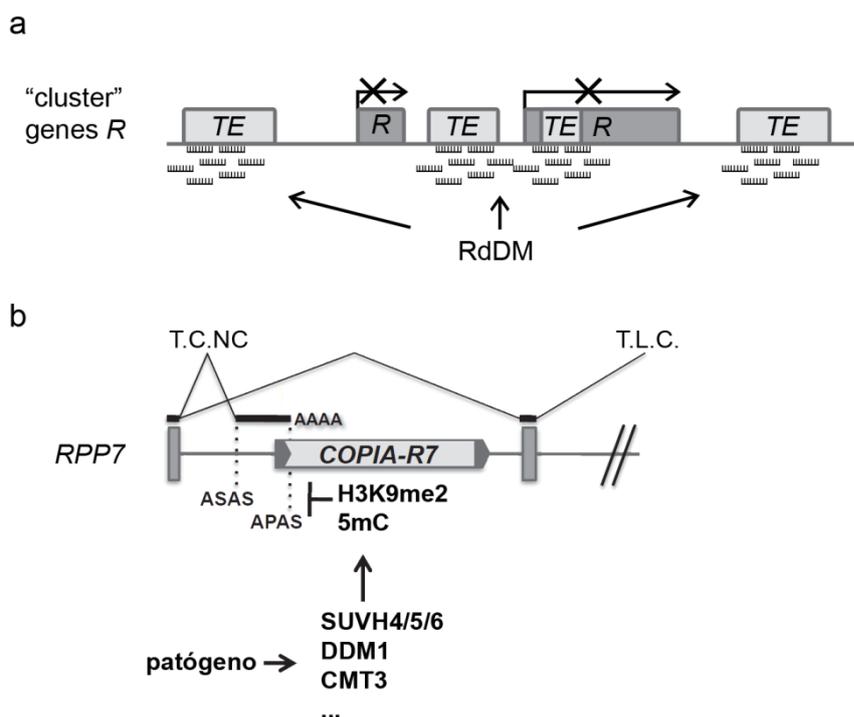


Figura 5: Regulación de genes *R*. (a) Algunos “clusters” de genes *R* se encuentran enriquecidos en TEs blanco de RdDM, que condicionan su expresión (Weiberg et al., 2014). (b) El gen *RPP7* es un modelo del efecto de 5mC y H3K9me2 (dependiente de SUVH4/5/6, DDM1, CMT3, entre otras) de TEs insertos en el primer intrón, el cual puede llevar a la generación de un transcrito largo y codificante (T.L.C), o una variante corta y no codificante (T.C.NC) dada por un sitio aceptor de “splicing” alternativo (ASAS) y un sitio de poliadenilación alternativo prematuro (APAS) (adaptado de Tsuchiya y Eulgem, 2013; Lee et al., 2015).

Remodelación de la cromatina centromérica en respuesta al estrés y en el desarrollo

La cromatina centromérica puede sufrir alteraciones estructurales y transcripcionales ante distintas condiciones estresantes tales como calor, frío o infección con patógenos, así como en distintas etapas del desarrollo vegetal (Lermontova et al., 2015; Probst y Mittelsten Scheid, 2015). Si bien en algunos casos se conocen los componentes proteicos involucrados en estos fenómenos, hasta la fecha no se ha vinculado a la relajación de la cromatina centromérica con respuestas fisiológicas del desarrollo o estrés de la planta (Pecinka et al., 2010; Wang et al., 2013b; Nota et al., resultados no publicados).

En el laboratorio se describió que algunos elicitores de las defensas contra patógenos alteran la estructura y expresión de la cromatina centromérica. Inicialmente la infección de *Arabidopsis* con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) induce la decondensación de CCs y demetilación del DNA en secuencias centroméricas (Pavet et al., 2006). Posteriormente, otros autores también describieron cambios en el patrón de 5mC inducidos por este patógeno, así como por SA (Downen et al., 2012). Recientemente, otro grupo describió que flg22, induce demetilación y activación transcripcional de algunos TEs, incluyendo elementos próximos al centrómero (Yu et al., 2013).

Por otra parte, estreses abióticos también inducen fenotipos similares. Plantas de *Arabidopsis* y maíz sometidas a estrés por frío aumentan la expresión de TEs y reducen las marcas de 5mC y H3K9me2, aunque no se conoce si decondensan los CCs (Hu et al., 2012; Lang-Mladek et al. 2010). Plantas de *Arabidopsis*, decondensan los CCs e inducen la transcripción de secuencias allí contenidas frente a altas temperaturas (Tittel Elmer et al., 2009; Pecinka et al., 2009; Wang et al., 2013b). A diferencia del fenotipo observado en plantas tratadas con patógenos (Pavet et al., 2006), en este caso no se detecta demetilación del DNA en estas secuencias (Tittel Elmer et al., 2009; Pecinka et al., 2009). Además, la exposición a baja intensidad de luz modula la estructura de los CCs, a través de PHYB y HDA6 (“Phytochrome-B” e “Histone Deacetylase-6”) (Tessadori et al., 2009).

Además existen células con distintos grados de compactación de la cromatina en distintos estados de desarrollo, y esto podría ser afectado por factores externos tales como la intensidad de la luz (Simon et al., 2015). Durante la transición del estado vegetativo al reproductivo (previo a la aparición de la vara floral) se produce una

decondensación de la cromatina centromérica y no centromérica dependiente del fotoreceptor CRY2 (“Cryptochrome 2”) en tejidos foliares (Tessadori et al., 2007). En los granos de polen, los núcleos vegetativos también poseen CCs decondensados, hipometilación de H3K9, alteraciones transcripcionales de TEs y repeticiones, sin modificación en los niveles de 5mC debido a la actividad del RdDM (DDM1, MET1, CMT3, DRM2, Pol IV y Pol V) (Schoft et al., 2009; Slotkin et al., 2009; Calarco et al., 2012). Dentro de las semillas los cotiledones sufren una disminución en el tamaño nuclear y compactación de la cromatina de manera dependiente de ABI3 (“Abscisic Acid-Insensitive 3”) (van Zanten et al., 2011). Posteriormente, entre el primer y el tercer día post-germinación, el tamaño nuclear comienza a restaurarse y la cromatina se decondensa de forma dependiente de LINC1 y LINC2 (“Little Nuclei 1 y 2”) (van Zanten et al., 2011). Finalmente, hacia el quinto día post-germinación, la compactación de los CCs se restaura, y esta última reorganización de la cromatina centromérica depende de Pol IV (Douet et al., 2008). En esta etapa del desarrollo, plántulas privadas de luz no re-estructuran sus núcleos ni compactan los CCs, debido a la actividad de reguladores fotomorfogénicos DET1 y COP1 (“De-Etiolated 1” y “Constitutive Photomorphogenic 1” respectivamente) (Bourbousse et al., 2015).

Se especula que la re-estructuración de la cromatina podría afectar a la transcripción de genes cuya expresión se relaciona a la topología nuclear y a su posición dentro del núcleo (periferia o región central). Algunos autores demostraron que los genes con menor actividad transcripcional se localizan en las regiones periféricas del núcleo y próximos al nucléolo (Fang y Spector, 2005; Goetze et al., 2007), aunque en *Arabidopsis* esto puede tener excepciones (Rosin et al., 2008). Por otra parte, los cambios en la posición subnuclear de TEs en mutantes de los remodeladores de la cromatina MORC1 y 6 se asocian a su activación transcripcional, curiosamente de manera independiente de la metilación del DNA, sugiriendo que ambas proteínas regularían la transcripción de secuencias centroméricas afectando la estructura de la cromatina y la posición de los TEs en el núcleo (Moissiard et al., 2012).

Regulación transcripcional mediada por smRNAs en *trans*

En esta Tesis, estudiamos los posibles efectos de la decondensación de la cromatina centromérica sobre la activación de las defensas contra *Pst*. Dado que la mayoría de los genes de defensa se encuentran en regiones eucromáticas no

centroméricas, sería poco probable que la decondensación de la cromatina centromérica que es inducida por *Pst* afecte la activación de estos genes mediante un efecto local (en *cis*). Hasta el momento, existen pocos mecanismos que expliquen efectos a distancia (en *trans*) sobre genes de defensa en *Arabidopsis*.

Quizás uno de los que más se conoce, es el silenciamiento génico por una familia de smRNAs que operan en *trans*, y son llamados tasiRNAs (“trans acting siRNAs”) (Eckardt et al., 2013). Su generación depende de componentes de la vía biosintética de los miRNAs y siRNAs dependientes de RDR6 y DCL4, y se caracterizan porque un mismo smRNA puede regular negativamente a más de un locus del genoma (Howell et al., 2007; Fei et al., 2013). En *Arabidopsis* existen relativamente pocos tasiRNAs respecto a otras especies (Fei et al., 2013), pero curiosamente en *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Pinaceae* y *Amborellaceae* y unas pocas *Brassicaceae* (entre ellas *Arabidopsis*), la familia de genes *R* es blanco de tasiRNAs (Eckardt et al., 2013; Zhai et al., 2011; Howell et al., 2007; Fei et al., 2013; Boccara et al., 2014).

Alternativamente, los genes de defensa podrían ser regulados en *trans* sin involucrar a los tasiRNAs. Una posibilidad sería que algunos smRNAs produzcan una “distracción” de la maquinaria de silenciamiento que normalmente los regula. A diferencia de los tasiRNAs, estos smRNAs dirigen el silenciamiento de un blanco genómico pero inhiben el de otro. Las primeras evidencias sobre estos efectos cruzados surgen del descubrimiento del miRNA399 que es complementario a los genes *PHO2* e *IPS1* (“*Phosphate 2*” e “*Induced by Phosphate Starvation 1*”, respectivamente). Este miRNA dirige la degradación del mRNA del primer gen, pero no del segundo debido a que su secuencia no es complementaria al mismo entre la posición 11 y 12 (Franco-Zorrilla et al., 2007). Como consecuencia, en condiciones donde hay una mayor expresión de *IPS1*, su mensajero funciona como un señuelo (“decoy” o “target mimicry”) que recluta y retiene al miRNA399, pero este transcripto no se degrada, impidiendo su actividad reguladora sobre el mRNA de *PHO2* (Franco-Zorrilla et al., 2007). A partir de este hallazgo, se diseñaron mRNAs “señuelo” de miRNAs para inhibir su función regulatoria sobre su mRNA blanco endógeno (Todesco et al., 2010; Ivashuta et al., 2011). Algunas evidencias de este mismo mecanismo fueron propuestas luego en *Nicotiana benthamiana* y soja, y curiosamente, algunos años después el mismo fenómeno se descubrió en modelos animales, donde los mRNAs señuelo fueron nombrados ceRNAs (“competing endogenous RNA”) (Rubio-Somoza et al., 2011; Banks et al., 2012).

Un mecanismo similar fue sugerido en plantas de *Arabidopsis* infectadas con el virus del mosaico del coliflor (CaMV), en donde la producción masiva de smRNAs actuaría como señuelo re-direccionando a la maquinaria de silenciamiento (Blevins et al., 2011). En respuesta a CaMV, se induce la maquinaria de silenciamiento para la degradación del RNA viral, pero se detecta una producción masiva de smRNAs con homología a una secuencia del RNA viral 35S, cuya estructura secundaria dificulta el apareamiento de los smRNAs y degradación de los RNAs, por lo que los smRNAs funcionarían como señuelo impidiendo el silenciamiento de los blancos virales (Blevins et al., 2011). Es decir, componentes de la maquinaria de silenciamiento podrían ser re-direccionados por smRNAs evitando que actúen sobre su molécula blanco (Blevins et al., 2011). Otros autores que desarrollaron estudios bioinformáticos proponen la “titulación” de componentes de la maquinaria de silenciamiento, y a diferencia de los anteriores, los smRNAs tienen la capacidad de dirigir el silenciamiento de todas sus moléculas blanco, pero los componentes de la maquinaria de silenciamiento no serían suficientes (Khan et al., 2009). En este caso, los autores observaron que la sobre-expresión de miRNA exógenos saturaría a componentes proteicos de la maquinaria de silenciamiento impidiendo o desplazando parcialmente su funcionamiento con miRNAs endógenos (Khan et al., 2009). Tanto en el caso que la molécula señuelo sea un mRNA o haya una saturación de la maquinaria de silenciamiento, los smRNA o componentes del silenciamiento serían secuestrados impidiendo su efecto regulatorio sobre otras moléculas blanco.

En resumen, los hallazgos del laboratorio y los aportes de otros autores sugerían que la decondensación de la cromatina centromérica inducida por *Pst* podría afectar a la activación de defensas contra este patógeno. Para conocer qué tipo de funciones relacionadas a la deposición de marcas epigenéticas represoras afectan a las defensas utilizamos mutantes de cromatina con decondensación basal de los CCs y estudiamos su resistencia a *Pst*. Además analizamos cómo se activan los genes de defensa y la resistencia al patógeno en la mutante *mom1* que no expresa defensa constitutiva pero si presenta transcripción basal de TEs centroméricos. Finalmente, nos preguntamos si el fenómeno de decondensación de CCs inducido por *Pst* que ocurre en plantas salvajes está asociado a cambios transcripcionales de los TEs allí contenidos, y evaluamos el efecto de estos elementos sobre la activación de genes de defensa mediado por smRNAs, a través de un mecanismo en *trans*.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general de esta Tesis Doctoral es estudiar los posibles efectos de la decondensación de cromocentros (CCs) inducida por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* (*Pst*) sobre la activación de las defensas contra este patógeno. Para ello, utilizamos plantas salvajes y mutantes de *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*) infectadas con *Pst* como modelo experimental y abordamos los siguientes objetivos específicos.

Objetivos específicos

- 1- Evaluar la resistencia a *Pst* en plantas mutantes incapaces de mantener la condensación/represión de los CCs
 - Seleccionar un grupo de mutantes deficientes en la metilación del DNA, de histonas y/o compactación de la cromatina centromérica para estudiar en ellas el grado de condensación/desrepresión de los CCs y la resistencia a *Pst*.
- 2- Seleccionar una mutante de cromatina que afecte la represión de secuencias exclusivamente centroméricas y permita estudiar la inducción de resistencia a *Pst*
 - Analizar la actividad génica de marcadores de distintos niveles de la vía de defensas contra *Pst* en esta mutante.
 - Evaluar si las secuencias blanco de la proteína mutada (TEs) ejercen un control sobre los genes de defensa y analizar cómo lo hacen (en *cis* o *trans*).
- 3- Analizar si en plantas salvajes infectadas la regulación transcripcional del centrómero ejerce un efecto en *trans* sobre la activación de genes de defensa
 - Caracterizar la regulación transcripcional de TEs centroméricos en plantas salvajes infectadas mediada por el silenciamiento génico transcripcional (TGS) y smRNAs.
 - Identificar genes *R* que podrían ser regulados en *trans* por smRNAs homólogos a TEs localizados en otras regiones del genoma.

Resultados

Capítulo 1:

Respuestas a la infección con *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en mutantes de la cromatina

Las plantas de *Arabidopsis* inducen la decondensación de sus CCs y la hipometilación del DNA del tejido foliar al ser infectadas con *Pst*. Este proceso ocurre en células que se encuentran en estado de interfase (Pavet et al., 2006). Por ello, especulamos que esta demetilación estaría mediada por la remoción de bases metiladas (demetilación activa) y no por fallas en la re-metilación en la etapa post-replicativa (demetilación pasiva por falta de actividad de DMTs) (Alvarez et al., 2010). En el grupo se está investigando la participación de DNA glicosidasas en este fenómeno de demetilación. Además, en esta Tesis se analiza si la relajación de los CCs podría afectar a la activación de las defensas contra *Pst*. Para abordar este interrogante, comenzamos estudiando aspectos de la decondensación de CCs inducida por la infección con *Pst* en mutantes de cromatina centromérica. Posteriormente, evaluamos la resistencia de estas plantas a *Pst*. Ambos tipos de resultados se describen en este capítulo.

Los estudios fueron realizados en tres tipos de mutantes que carecen de enzimas necesarias para: la metilación del DNA (DMTs), la remodelación de la cromatina (remodeladores) o la metilación de histonas (HMTs y mediadores de esa actividad) (Figura 6).

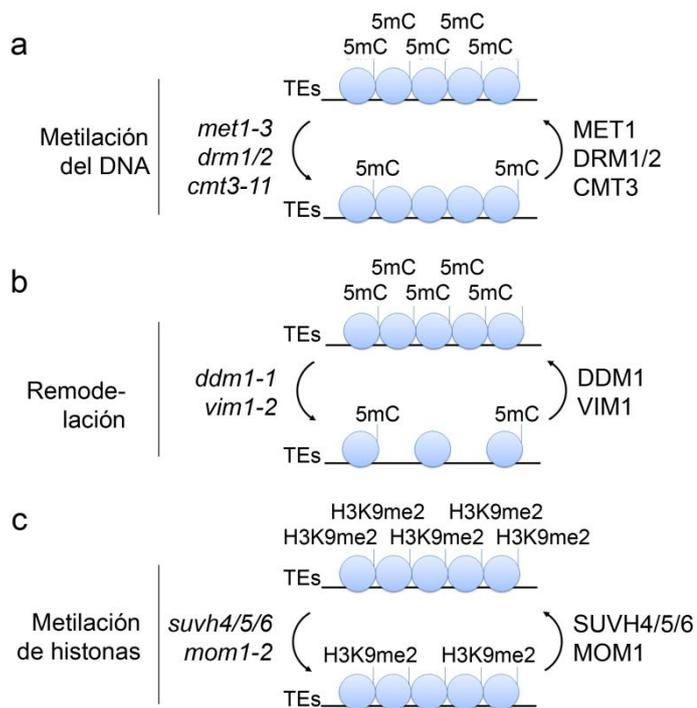


Figura 6: Componentes de Arabidopsis que regulan la estructura de la cromatina centromérica afectando la deposición de marcas epigenéticas. (a) DMTs (MET1, DRM y CMT3), (b) remodeladores (helicasa DDM1 y proteína de unión a 5mC VIM1) y (c) proteínas involucradas en la metilación de histonas (MOM1 y HMTs SUVH4/5/6). A la izquierda se muestran los alelos mutantes utilizados en esta Tesis (ver Tabla 1). TEs: transposones

Para cada grupo de mutantes se seleccionaron alelos ya caracterizados como hipomórficos o nulos en base a estudios genéticos o bioquímicos (Tabla 1).

Tabla 1: Mutantes utilizadas en este trabajo

Alelo mutante	Función/actividad	Tipo de alelo	Bibliografía
<i>drm1-2/drm2-2 (drm1/2)</i>	DMTs	Insercionales, nulos	Cao y Jacobsen, 2002
<i>cmt3-11</i>	DMT	Insercional, nulo	Cao y Jacobsen, 2002
<i>drm1-2/drm2-2/cmt3-11 (ddc)</i>	DMTs	Insercionales, nulos	Cao y Jacobsen, 2002
<i>ddm1-1</i>	Remodelador de la cromatina	Puntual, hipomórfico	Vongs et al., 1993; Soppe et al., 2002; Lippman y Martienssen, 2004
<i>vim1-2</i>	Remodelador de la cromatina	Insercional, nulo	Woo et al., 2007
<i>suvh4/suvh5-2/suvh6-1 (suvh4/5/6)</i>	HMTs	Insercionales, nulos	Ebbs y Bender, 2006
<i>mom1-2, mom1-5</i>	Mediador de la metilación de H3K9	Insercionales, nulos	Amedeo et al., 2000; Habu et al., 2010; Won et al., 2012; Caikovski et al., 2008
<i>mom1-1</i>	Mediador de la metilación de H3K9	Insercional, hipomórfico	Amedeo et al., 2000

CCs de mutantes de cromatina

Las mutantes de cromatina mencionadas pierden la deposición de marcas represoras en el centrómero, sugiriendo que tendrían propensión a decondensar sus CCs. El grado de compactación de estas estructuras es sensible a condiciones ambientales, tales como temperatura y luz, y estadíos del desarrollo (ver Introducción). Este fenotipo puede estudiarse con distintos niveles de sensibilidad, siendo la tinción de CCs con DAPI o yoduro de propidio una técnica poco sensible e independiente de la secuencia nucleotídica y la hibridización con sondas fluorescentes mediante ensayos

de FISH una metodología de mayor precisión y específica de secuencia (Fransz et al., 2002; Woo et al., 2007).

Analizando los CCs por tinción con DAPI, otros autores describieron que la mutante *ddm1* presenta decondensación basal de estas estructuras (Soppe et al., 2002), mientras que *vim1-2* y *mom1-5* no muestran este fenotipo (Woo et al., 2007; Wang et al., 2015b). Para corroborar que bajo nuestra condición experimental, los CCs de las mutantes se mantienen condensados en estado basal (T0) y no han sido afectados por estreses ambientales, usamos tinciones con yoduro de propidio. Del mismo modo evaluamos el número de CCs en tejidos infectados a las 24 hs de tratamiento con *Pst* (1×10^7 ufc ml⁻¹). El método de detección de CCs por tinción del DNA fue adaptado de estudios previos (Pavet et al., 2006).

En estos estudios utilizamos hojas expandidas de plantas adultas (sanas o infectadas) fijadas y tratadas con yoduro de propidio para su análisis por microscopia confocal. Localizamos las células vegetales próximas a las colonias de bacterias para estudiar en ellas sus núcleos y cuantificar el número de CCs. Como era de esperar (Pavet et al., 2006), las plantas salvajes presentaron un promedio de 7 CCs por núcleo en tejidos no infectados y de 2 CCs por núcleo en tejidos tratados con *Pst* (Figura 7a, f). A su vez, las mutantes *vim1-2*, *mom1-5* y *suvh4/5/6* no mostraron decondensación basal de CCs. Por el contrario, *ddm1-1* si presentó decondensación constitutiva de CCs (entre 3 y 7 CCs por núcleo) en un grado similar al ya descrito (Soppe et al., 2002) (Figura 7).

Curiosamente, los histogramas de frecuencia de CCs por núcleo de plantas salvajes y mutantes *vim1-2*, *mom1-5* y *suvh4/5/6* fueron muy similares tanto en la condición basal como en infección (Figura 7). Esto fue reproducido en tres experimentos biológicos independientes, donde se observó una mayoría de núcleos con 2-4 CCs en todas las plantas infectadas.

Estos resultados, indican que a las 24 hs post-infección (hpi) con *Pst* las mutantes no manifiestan mayor facilidad para decondensar sus CCs. Si este fuese el caso, estas mutantes hubieran incrementado el contenido de núcleos con menos de 2-4 CCs en infección. A pesar de ello, estos estudios no descartan que estas mutantes puedan llegar a decondensar los CCs antes que la planta salvaje.

Por otra parte, los resultados indican que la falta de DDM1, VIM1, MOM1 y SUVH4/5/6 no afecta la decondensación de CCs en respuesta a *Pst* detectada por tinción del DNA con yoduro de propidio. Sin embargo, esta técnica no informa si tanto a

nivel basal como luego de la infección, alguna de las mutantes tiene una mayor relajación de algunos *loci* centroméricos respecto a la planta salvaje. La activación transcripcional de secuencias contenidas en estos dominios podría ser alternativamente indicativa de estas diferencias entre plantas salvajes y mutantes. Este último aspecto se retoma en los próximos capítulos.

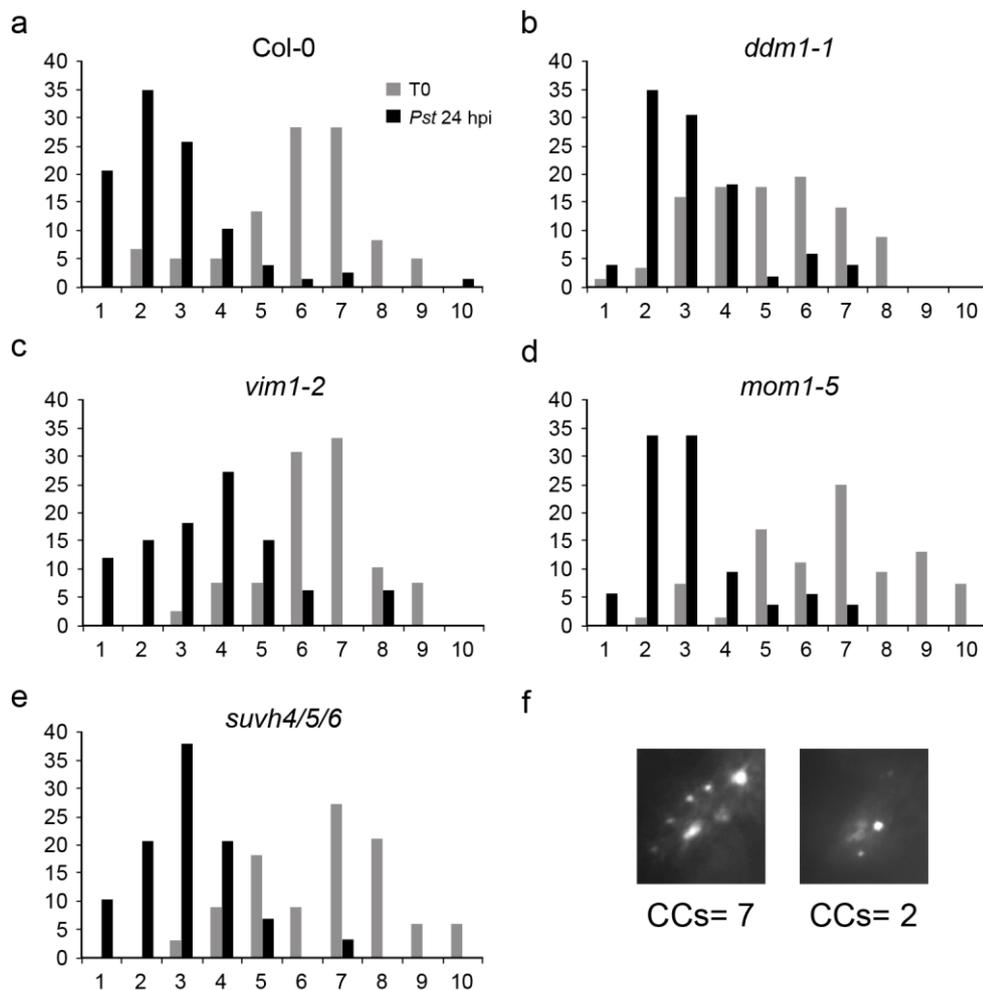


Figura 7: Decondensación de CCs en plantas salvajes (a) y mutantes de cromatina (b-e) luego de la infección con *Pst*. Los histogramas muestran el porcentaje de núcleos (eje Y) y contenido de CCs (eje X). Las muestras fueron obtenidas a partir de plantas salvajes y mutantes. Se comparan tejidos sanos (T0, barras grises) con infectados (24 horas post-infección con *Pst*; barras negras). Se muestra un experimento representativo de 3 réplicas biológicas. (f) Imágenes representativas de núcleos con 7 y 2 CCs luego de ser teñidos con yoduro de propidio.

Resistencia a *Pst* de mutantes de cromatina

Todas las mutantes de cromatina analizadas tienen incrementada la expresión de secuencias centroméricas (Cao y Jacobsen, 2002; Woo et al., 2007; Soppe et al., 2002; Lippman y Martienssen, 2004; Ebbs y Bender, 2006; Habu et al., 2010; Eamens et al., 2008). Nos interesó saber si todas ellas también tienen afectadas las defensas contra *Pst*, lo cual podría sugerir una correlación entre la activación transcripcional de los *loci* centroméricos y la resistencia.

Con este fin desafiamos con *Pst* a los tres tipos de mutantes (Figura 2, Tabla 1). El primer grupo incluye a las mutantes en DMTs. Entre ellas, la simple mutante *cmt3-11*, la doble mutante *drm1-2/drm2-2* (*drm1/2*) y la triple mutante *drm1-2/drm2-2/cmt3-11* (*ddc*) (Cao y Jacobsen, 2002). El segundo grupo abarca mutantes de remodeladores *vim1-2* (Woo et al., 2007) y *ddm1-1* (Soppe et al., 2002; Lippman y Martienssen, 2004), y el tercero mutantes con disminución en la metilación de H3K9me2 *suvh4/suvh5-2/suvh6-1* (*suvh4/5/6*) (Ebbs y Bender, 2006) y *mom1-5* (Habu et al., 2010; Won et al., 2012).

Para evaluar la resistencia a *Pst*, infectamos hojas adultas de plantas de dos meses y luego de tres días cuantificamos las unidades formadoras de colonias (ufc) presentes en el tejido tratado. Observamos que *cmt3-11* tiene una resistencia similar a las plantas salvajes (Col-0). Por el contrario las demás plantas mutantes fueron más resistentes que la planta salvaje (Figura 8). El patógeno alcanzó un contenido 10 veces mayor en la planta control que en las mutantes de los dos primeros grupos (*drm1/2*, *ddc*, *ddm1-1* y *vim1-2*) (Figura 8a y b) y 5 veces mayor en la planta salvaje respecto a las mutantes del tercer grupo (*suvh4/5/6* y *mom1-5*) (Figura 8c).

Estos resultados sugieren que los tres tipos de funciones (metilación del DNA e histonas y remodelación de la cromatina) son necesarios para una activación normal de las defensas y que todas las mutantes comparten el fenotipo de resistencia a *Pst*, aún cuando afectan a la cromatina centromérica de distintas maneras. Resultados similares fueron descritos en otras condiciones para las mutantes *nrpd1a* (*pol IV*), *nrpd1b* (*pol V*), *rdr2*, *rdr6*, *dcl2/3/4* y *met1*, todas involucradas en el silenciamiento mediado por RdDM de dominios genómicos entre los que se encuentran las regiones centroméricas (Downen et al., 2012; Yu et al., 2013; Lopez et al., 2011).

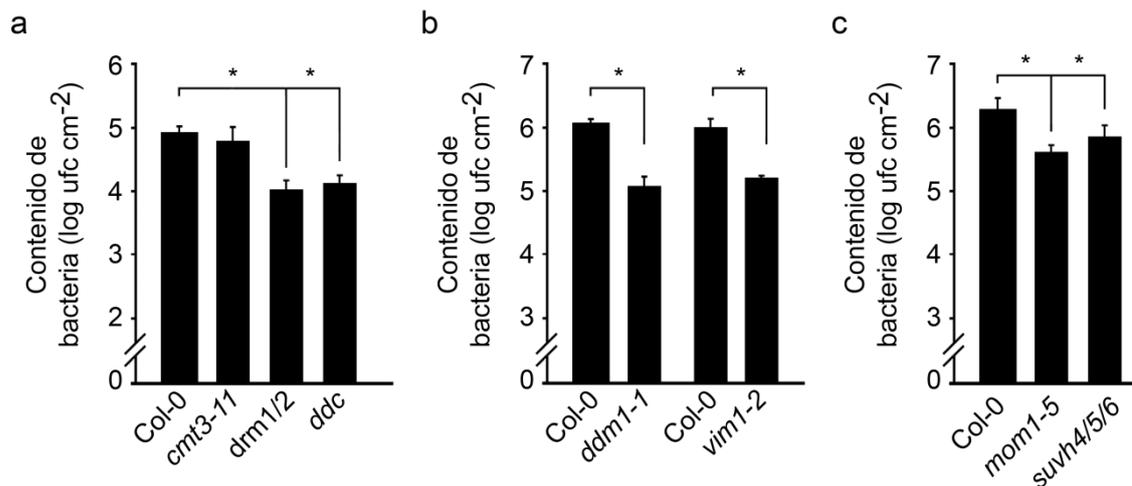


Figura 8: Contenido de *Pst* en plantas salvajes (Col-0) y en mutantes de cromatina. Se analizaron mutantes de metilación del DNA (*cmt3-11*, *drm1-2/drm1-2* [*drm1/2*] y *drm1-2/drm2-2/cmt3-11* [*ddc*]) (a), mutantes de remodelación (*ddm1-1* y *vim1-2*) (b) y mutantes de metilación de histonas (*mom1-5* y *suvh4/suvh5-2/suvh6-1* [*suvh4/5/6*]) (c). Las muestras fueron obtenidas a partir de hojas adultas luego de 3 días de ser infectadas con *Pst* (10^5 ufc ml⁻¹). Los valores representan la media del contenido de bacterias (log₁₀ de ufc cm⁻²) de 2 réplicas técnicas \pm el desvío estándar. *: Diferencias significativas tras aplicar test *t*. Se muestra un experimento representativo de 2 o 3 réplicas biológicas.

Expresión de genes de respuesta a estrés biótico en mutantes de cromatina

Las mutantes estudiadas afectan a la heterocromatina centromérica por tres mecanismos convergentes y algunas de ellas actúan sobre dominios genómicos comunes (Wang et al., 2015a). El aumento de resistencia a *Pst* en todos los tipos de mutantes podría deberse a su acción sobre blancos comunes. Alternativamente, esto también podría involucrar algún efecto sobre secuencias blanco no comunes.

Evaluamos si el fenotipo de resistencia implica alteraciones de los mismos genes de defensa en las distintas mutantes. Estos genes podrían estar inducidos (activadores de defensa) o reprimidos (represores de defensa) en estas plantas. Para evaluar si las mutantes de cromatina *mom1-2*, *ddm1-2*, *suvh4/5/6*, *drm1/2*, *met1-3*, *cmt3-11* y *nrpe1b11* (*pol V*) presentan activación basal de los mismos genes de defensa, utilizamos transcriptomas publicados por otros autores (Stroud et al., 2012; Zhu et al., 2013). A partir de estos transcriptomas analizamos el comportamiento de los genes de defensa (1250 genes para Arabidopsis; TAIR, www.arabidopsis.org). A partir de los valores de expresión estandarizados disponibles en la base de datos "Gene Expression Omnibus" (número de acceso GSE38286 y GSE38464). Calculamos los cambios en los niveles de expresión de distintos tipos de genes que responden al estrés biótico en cada mutante. A continuación generamos diagramas de Venn que representan los genes de defensa inducidos/reprimidos comunes entre ellas. Estos estudios, se realizaron en colaboración con el Mg. Julio Di Rienzo (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC).

Al analizar a los genes inducidos, no detectamos genes comunes entre todas las mutantes. Solo observamos dos intersecciones que contienen un grupo reducido de genes (dos genes compartidos entre *drm1/2* y *mom1-2*; un gen entre *mom1-2* y *met1-3*). Es llamativo que la mutante *met1-3* solo comparte 1 gen (*AT1G29715*) con otra mutante (*mom1-2*) dado que esta planta muestra 28 genes inducidos (Figura 9a). Según datos publicados en la base de datos TAIR (www.arabidopsis.org), *AT1G29715* sería un pseudogen homólogo a genes *R*, cuya función en las defensas contra patógenos, aún no ha sido descripta.

Por otra parte, solo dos genes mostraron un incremento de sus mRNA en *mom1-2* y *drm1/2* (Figura 9a). Uno de ellos codifica para el factor de transcripción LCL5 ("Lhy-Cca1-Like 5", *AT3G09600*) y el otro para ERD ("Early-Responsive to Dehydration", *AT4G15430*). Si bien ambos genes son regulados transcripcionalmente

en estrés biótico, no se ha descrito que los mismos sean capaces por sí mismos de activar las defensas contra *Pst*.

Respecto a los genes reprimidos, ninguno de ellos se altera en todas las mutantes y solo detectamos dos genes comunes entre *drm1/2* y *mom1-2*. Uno codifica a RSH2 ("Rela-Spot Homolog 2", *AT3G14050*) y otro al factor de transcripción WRKY25 (*AT2G30250*) (Figura 9b). *RSH2* actúa en respuesta a diferentes estreses mediante la síntesis de guanosina tetra/pentafosfato (Mizusawa et al., 2008; van der Biezen et al., 2000). Por su parte, *WRKY25* es un regulador negativo de las defensas contra *Pst* (Zheng et al., 2007) cuya mutación no altera el crecimiento de *Pst* pero si reduce los síntomas de infección (Zheng et al., 2007). Estas evidencias sugieren que la resistencia de las plantas *drm1/2* y *mom1-2* no sería debida a una menor expresión de *WRKY25*.

Estos resultados demuestran que la resistencia incrementada a *Pst* de las mutantes analizadas no se explica por la activación/represión de genes blanco comunes. A su vez, sugieren que en estas mutantes podrían operar mecanismos comunes relacionados a la inducción de las defensas, posiblemente asociado a efectos secundarios de la sobre-expresión de TEs y repeticiones centroméricas.

Los resultados obtenidos en este capítulo y publicaciones de otros grupos demuestran que todas las plantas mutantes analizadas que relajan a la cromatina centromérica son más resistentes a *Pst* (Downen et al., 2012; Yu et al., 2013; Lopez et al., 2011). El análisis de transcriptomas disponibles para algunas de estas mutantes sugiere que este fenotipo no sería explicado por la activación transcripcional constitutiva de una única ruta génica asociada a las defensas. Por el contrario, estas mutantes podrían utilizar mecanismos comunes que medien la resistencia a *Pst*.

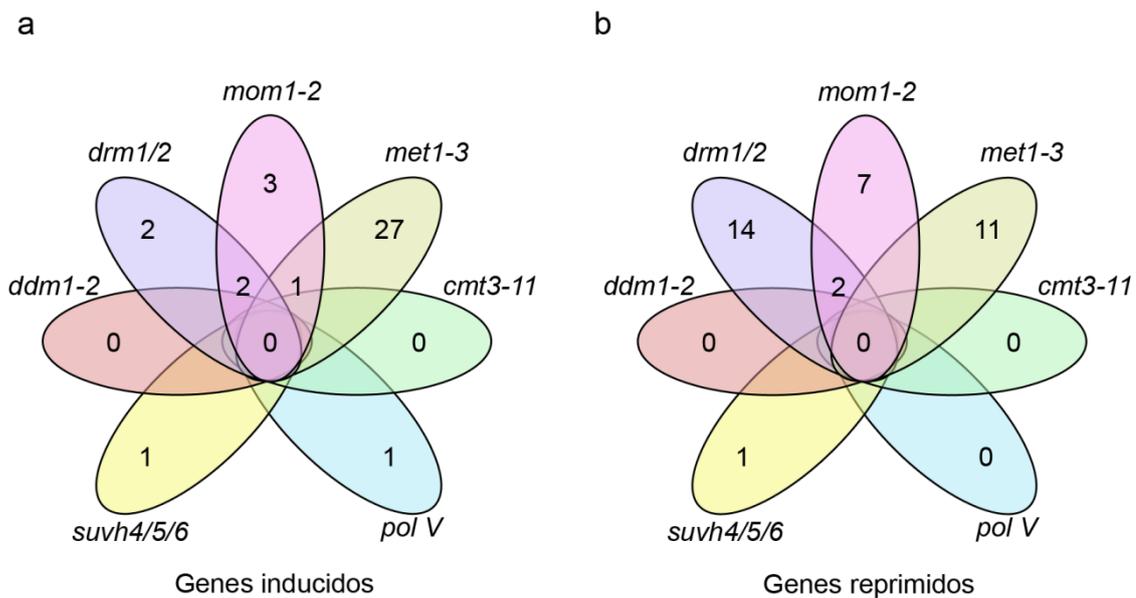


Figura 9: Genes transcripcionalmente afectados en mutantes de cromatina. Diagramas de Venn que indican el número de genes inducidos (a) o reprimidos (b) en cada mutante. La ausencia de números en una intersección significa valor cero. Los cambios en los niveles de expresión fueron considerados significativos cuando los valores de FC (“fold change”) fueron superiores a 2 con un $p < 0,05$ utilizando el programa *Infostat* (errores estándares y comparación múltiple entre medias del tipo LSD de Fisher basada en una prueba de Wald, o la prueba de formación de grupos excluyentes DGC [Di Rienzo et al., 2002]).

Capítulo 2:

Activación de las defensas de *Arabidopsis* contra *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* en mutantes de MOM1

En este capítulo analizamos posibles efectos de mutaciones en el gen codificante de MOM1 sobre la activación de las defensas. Los criterios que llevaron a la selección de esta mutante fueron: el bajo número de *loci* que son blanco de esta proteína y la acción casi específica de MOM1 sobre la cromatina centromérica (Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al., 2010). Para realizar estos estudios incorporamos además de *mom1-5* a otros alelos mutantes de MOM1.

Como se describió previamente, esta proteína es un remodelador de la cromatina que media la incorporación de la marca epigenética H3K9me2 en el genoma. Su actividad está guiada por la deposición previa de 5mC que realiza la maquinaria de silenciamiento (RdDM) dependiente de Pol IV y Pol V (Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al., 2010). Las plantas mutantes *mom1* reducen la metilación de H3K9, pero mantienen las marcas de 5mC (Amedeo et al., 2000; Habu et al., 2006). La cromatina de esta mutante se denomina "heterocromatina intermedia", y su compactación es suficientemente laxa como para activar algunos de sus TEs blanco (Habu et al., 2006).

Para estudiar las bases de la resistencia a *Pst* de las mutantes *mom1* analizamos la activación de genes de defensa, antes y luego del tratamiento con *Pst*. Esto nos permitió saber si los mismos están activados de manera constitutiva o presentan una mayor susceptibilidad a ser inducidos. Como una primera aproximación al estudio del mecanismo por el cual MOM1 podría afectar a la inducción de genes de defensa, también estudiamos si esta proteína podría tener un efecto directo sobre genes de defensa localizados en regiones próximas a sus TEs blanco.

Resistencia de distintos alelos de *mom1* a *Pst*

Analizamos si la resistencia a *Pst* de la mutante *mom1-5* se mantiene en otras plantas mutantes para el mismo gen. Con este objetivo, evaluamos el crecimiento del patógeno en las mutantes *mom1-2* (nula) y *mom1-1* (hipomórfica) (Tabla 1; Amedeo et al., 2000; Caikovski et al., 2008), comparándolas con *mom1-5* y la planta salvaje (Figura 10a). Las plantas fueron infectadas con *Pst* (10^5 ufc ml⁻¹) a los dos meses de edad, y el contenido bacteriano en el área infectada se determinó a 1 y 3 días post-tratamiento.

Como muestra la Figura 10b, las mutantes *mom1-2* y *mom1-5* tienen niveles similares de resistencia (diferencias de 1 log en el contenido de bacteria respecto a la planta salvaje). La mutante *mom1-1* posee una resistencia levemente mayor que las otras dos mutantes (casi 2 log de diferencia con la planta salvaje). Estos resultados confirman que la falta de MOM1 incrementa la resistencia a *Pst* y que este fenotipo es independiente del alelo mutante estudiado, descartando la posibilidad que el alelo *mom1-5* tenga un efecto particular sobre la resistencia al patógeno.

Nos interesó conocer si la resistencia de las mutantes *mom1* era debida a la activación constitutiva de las defensas o a una inducción más fuerte y/o acelerada de las mismas (Hilker et al., 2015; Balmer et al., 2015). Los datos analizados en el capítulo 1 planteaban la posibilidad de una mayor susceptibilidad a inducir las defensas en las mutante *mom1-2*, sin activación constitutiva de las mismas. En primer lugar, se analizó la expresión del gen marcador *PR1* ("*Pathogen Related 1*") en nuestro sistema experimental y posteriormente se evaluaron todos los transcriptomas publicados para *mom1-1* y *mom1-2*.

La inducción de *PR1* refleja la activación de defensas contra patógenos biótropos, incluido *Pst*. Utilizamos ensayos de RT-sqPCR para cuantificar el nivel de transcritos de *PR1*. Trabajamos con cuatro grupos de plantas adultas no infectadas, que contenían a las plantas salvajes y a las mutantes *mom1-2* o *mom1-5* y. Cada grupo de plantas fue crecido bajo una misma condición de ciclo de luz/oscuridad y temperatura, pero otras condiciones variaron levemente entre los distintos grupos. Observamos que las mutantes *mom1-5* y *mom1-2* presentaban activación de *PR1* en algunos grupos de plantas mientras que, tal como se esperaba, la planta salvaje no acumulaba transcritos de este gen en ningún caso (Figura 10c). Esta detección de transcritos de *PR1* en *mom1* parecía sugerir la activación basal de otras defensas en las mismas muestras.

Posteriormente analizamos los cinco transcriptomas de plantas *mom1-2* y *mom1-1* disponibles en bases de datos, que fueron obtenidos a partir de plantas jóvenes de aproximadamente 15 días de edad (plántulas de 4 a 8 hojas). Cuatro transcriptomas muestran que no existe inducción basal de genes de defensa (Figura 9; Yokthongwattana et al., 2010; Numa et al., 2010; Stroud et al., 2012; Moissiard et al., 2014). Por el contrario, un estudio realizado en *mom1-1* evidencia la leve inducción de estos genes, entre los que se encuentran los que codifican para la proteína EDS5 (“*Enhanced Disease Resistance 5*”) involucrada en la acumulación de ácido salicílico (SA), el receptor RLK7 (“*Receptor Like Kinase 7*”), y la proteína PR2 (“*Pathogen Related 2*”) asociada a resistencia contra patógenos biótropos (Habu et al., 2006).

Estos resultados sugieren que en edad temprana (plántulas de 4-8 hojas) las mutantes *mom1-2* y *mom1-5* no presentan una fuerte activación constitutiva de los genes de defensa, pero en edad avanzada (plantas adultas de 2 meses con 15-30 hojas) ambas mutantes mostrarían la capacidad de inducir a *PR1* y eventualmente otros genes de defensa en algunas condiciones de cultivo. Por esto, el estado de desarrollo de la planta, o la exposición a ciertas condiciones ambientales podrían afectar la inducción de defensas en estas mutantes.

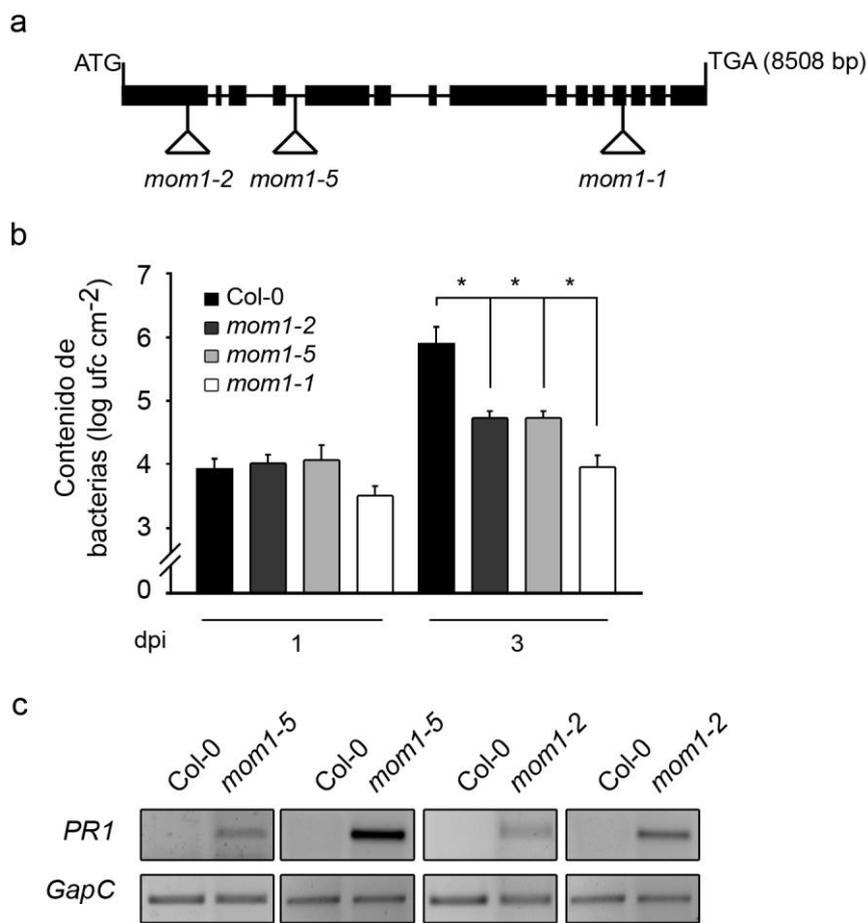


Figura 10: Resistencia a *Pst* de tres alelos mutantes de *MOM1* (*mom1-1*, *mom1-2*, *mom1-5*). (a) Esquema del gen *MOM1* y los alelos mutantes. Las barras gruesas y finas representan exones e intrones respectivamente. Los triángulos señalan la posición en que se encuentran las inserciones de T-DNA que interrumpen la secuencia codificante de *MOM1* en cada mutante. (b) Contenido del patógeno en plantas salvajes (Col-0), *mom1-2*, *mom1-5* y *mom1-1* evaluado como en la Figura 7. Los valores representan el contenido de bacterias (log₁₀ de ufc cm⁻²) en muestras de hojas tratadas con *Pst* (10⁵ ufc ml⁻¹) luego de 1 y 3 días post infección (dpi). (c) Ensayos de RT-sqPCR que evalúan la abundancia de transcritos de *PR1* en distintos grupos de plantas adultas (plantas de 2 meses, no infectadas). El gen de expresión constitutiva *GapC* fue usado como referencia.

Factores que afectan la activación de genes de defensa y resistencia contra *Pst* en *mom1-2* y *mom1-5*

Algunas plantas *mom1* acumulan transcriptos del gen marcador de defensas *PR1* en estado adulto pero no muestran el mismo fenotipo en estado joven. Estudiamos si la inducción de *PR1* depende de la edad de las plantas y/o de las condiciones de crecimiento. En primer lugar cuantificamos los transcriptos de *PR1* por ensayos de RT-sqPCR en dos condiciones diferentes. Para ello utilizamos plántulas de hasta 8 hojas (de aproximadamente 20 días de edad) crecidas en cajas de Petri (esterilidad), y plantas adultas (de 8 o 9 semanas) crecidas en tierra (no estéril).

Las plántulas *mom1-5* de hasta 8 hojas crecidas en esterilidad prácticamente no acumularon transcriptos del gen marcador (Figura 11a; izquierda). Las plántulas *mom1-2* y *mom1-5* de hasta 8 hojas crecidas en tierra, tampoco acumularon estos transcriptos (Figura 11a; derecha), confirmando los datos de transcriptoma previamente publicados para *mom1-2* (Yokthongwattana et al., 2010; Numa et al., 2010; Stroud et al., 2012; Moissiard et al., 2014). Como era previsible, las plantas salvajes tampoco activaron a *PR1* en ninguna de estas condiciones.

Al analizar los niveles de transcriptos de *PR1* en plantas adultas individuales (2 meses de edad) crecidas en tierra detectamos que una de cuatro plantas *mom1-5* activó la expresión de este gen (Figura 11b; izquierda). Sorprendentemente, al tomar otras cuatro plantas independientes una semana más tarde (9 semanas de edad), observamos que tres de ellas acumulaban altos niveles de mRNA de *PR1* (Figura 11b; derecha). Por otra parte y como se esperaba, las plantas salvajes crecidas en paralelo y bajo las mismas condiciones (ciclo de luz/oscuridad, temperatura y sustrato) no acumularon transcriptos de *PR1*.

En conjunto estos resultados sugieren que en *mom1-5*, la edad de 2 meses podría ser un punto crítico del desarrollo en el cual se inducirían las defensas contra *Pst* sin que la planta haya sido tratada con patógeno.

En los estudios del capítulo anterior, no habíamos discriminado el nivel de expresión de genes de defensa al momento de analizar el crecimiento de *Pst* en las mutantes (Figura 8c, Figura 10b). Debido a esto, estudiamos si la activación de *PR1* está estrictamente asociada a la resistencia de *mom1-5*. Para ello, cuantificamos los niveles basales de *PR1* en grupos de plantas *mom1-5* (3 plantas por grupo) y cuantificamos el crecimiento del patógeno utilizando plantas con o sin acumulación de mRNAs de *PR1* al momento de la infección. Observamos que ambos grupos de

plantas (con o sin expresión previa de *PR1*) eran más resistentes al patógeno (Figura 11c). *Pst* alcanzó menores niveles de crecimiento en las plantas que ya habían activado a *PR1* al momento de ser infectadas. Resultados similares fueron obtenidos en plantas *mom1-2* que presentaban expresión basal de *PR1* (Figura 11c).

Esto indica que la activación de genes de defensa que ocurre en las plantas *mom1* no es constitutiva sino que se induce en fases tempranas de desarrollo o durante el crecimiento sugiriendo que las alteraciones de la cromatina derivadas de la ausencia de MOM1 favorecen la activación de genes que aportan a la resistencia contra *Pst*. Podría especularse que la presencia de microbios en la tierra, la anoxia en las raíces de plántulas crecidas en cajas de Petri, u otras condiciones particulares de cada tipo de sustrato, contribuiría para inducir genes de defensa en las plantas mutantes.

En conjunto, estos resultados permiten sugerir que las mutantes *mom1* presentan el fenotipo de “priming”, es decir, la capacidad de inducir de manera prematura o en mayores niveles las vías de señalización para la activación de las defensas y la resistencia contra *Pst*.

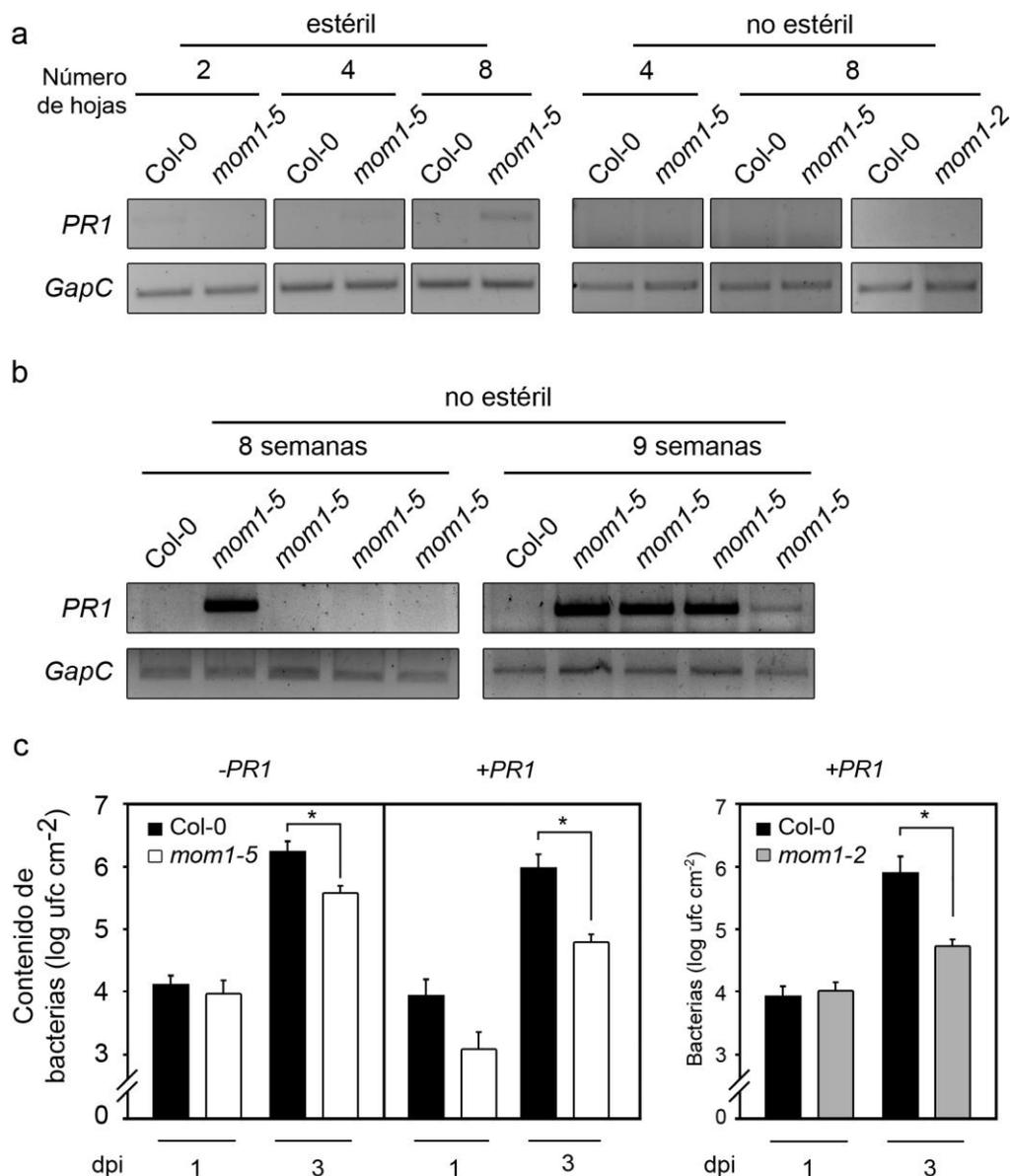


Figura 11: Expresión de *PR1* y resistencia de plantas *mom1-5* y *mom1-2* crecidas en distintas condiciones y analizadas a distintas edades. (a-b) El nivel de transcritos de *PR1* se cuantificó por ensayos de RT-sqPCR. Las muestras fueron tomadas a partir de grupos de plantas de 2, 4 u 8 hojas crecidas en esterilidad o tierra (a), o de plantas individuales adultas (20 a 30 hojas) crecidas en tierra (b). El gen de expresión constitutiva *GapC* fue usado como referencia. (c) Contenido de patógeno en plantas salvajes (Col-0) y mutantes *mom1-5* y *mom1-2* que presentaron distintos niveles de transcritos de *PR1* (+ o - *PR1*) previo a la infección con el patógeno. Los tejidos infectados con *Pst* (10^5 ufc ml⁻¹) fueron analizados a los días 1 y 3 post infección (dpi). Los valores representan la media del contenido de bacterias (log₁₀ ufc cm⁻²) de 2 réplicas técnicas \pm el desvío estándar. Los análisis estadísticos fueron realizados como en la Figura 8.

Genes de defensa que podrían ser regulados por MOM1

Los transcriptomas de *mom1* previamente publicados identifican muy pocos genes de defensa contra patógenos expresados en forma basal (Figura 8). A su vez, los resultados hasta aquí obtenidos indican que mutantes *mom1* tendrían una mayor susceptibilidad para inducir a los genes de defensa que promueven la resistencia contra *Pst*. A partir de esto, abordamos la búsqueda de otros genes de respuesta al estrés biótico, candidatos a ser activados en plantas *mom1* no infectadas.

Para ello, re-evaluamos los datos de cuatro de los cinco transcriptomas de la mutante *mom1* ya publicados (Yokthongwattana et al., 2010; Stroud et al., 2012; Moissiard et al., 2014; Habu et al., 2006), aplicando métodos de análisis estadístico más sensibles. Analizamos los datos sin tener en cuenta un valor mínimo de veces de cambio, pero sí diferencias estadísticamente significativas según la comparación de errores estándares y comparación múltiple entre medias del tipo LSD de Fisher. Estos estudios fueron realizados en colaboración con el Mg. Julio Di Rienzo (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC). Posteriormente, clasificamos los genes de acuerdo a su efecto en la cascada de señalización de defensas definiendo 5 conjuntos. Estos corresponden a genes que codifican para receptores de la familia de genes *R* (*R*) y genes *RLK* (*RLK*), componentes involucrados en la acumulación de SA (*SA*), factores de transcripción (*FT*) y compuestos antimicrobianos/proteínas de respuesta al estrés biótico (*REB*) (Figura 12). A partir de los genes que mostraron cambios con este nuevo análisis, evaluamos si existe una o varias rutas génicas inducidas en todos los experimentos.

Observamos que bajo este nuevo análisis, los 4 transcriptomas presentan inducciones marginales de genes de defensas pertenecientes a todas las clases evaluadas. Curiosamente, los distintos transcriptomas inducen distintos grupos de genes en cada categoría (Figura 12). Es decir, no comparten entre ellos la inducción de rutas génicas particulares.

En paralelo, analizamos los valores de co-expresión de los genes detectados en este análisis utilizando el programa ATTED II (<http://atted.jp/>), que permite inferir la posible co-regulación de distintos grupos de genes. Los valores de correlación son obtenidos a partir del análisis de los niveles de expresión de los genes de interés *in silico*, y de los datos previamente obtenidos a partir de numerosos transcriptomas disponibles. Observamos una correlación directa en la activación de genes de distintos grupos (*R*, *RLK*, *SA*, *FT* y *REB*) que corresponden a una misma vía, dentro de un

mismo transcriptoma. Por el contrario, no detectamos activación de las mismas rutas en los distintos transcriptomas (Figura 12). Es decir, en los distintos estudios realizados sobre plantas *mom1-2* y *mom1-1*, se detecta la inducción leve de distintos grupos de genes, sugiriendo la activación de diferentes rutas génicas de señalización en *mom1-2* y *mom1-1*. La ruta podría depender de las condiciones experimentales de cada estudio, los efectos asociados a cada alelo mutante (*mom1-2* y *mom1-1*) u otros factores.

En base a la falta de inducción de una única ruta génica o unas pocas rutas en común entre los distintos transcriptomas, sugerimos que los genes de defensa no serían blancos directos del silenciamiento mediado por MOM1. Esto significa que es poco probable que MOM1 regule la acción de los genes mencionados por un mecanismo que involucre su unión directa sobre los mismos.

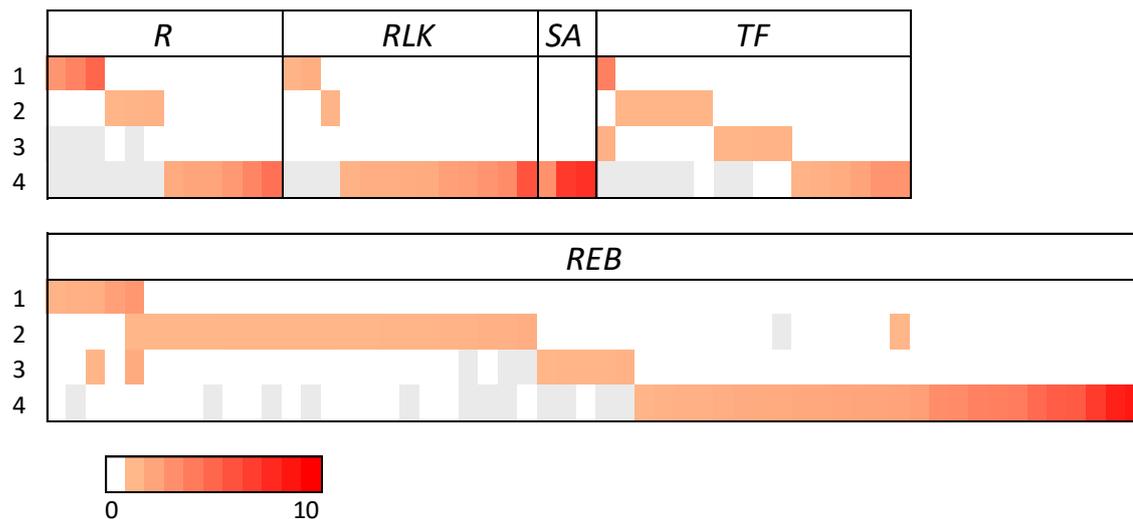


Figura 12: Análisis de los datos derivados de cuatro transcriptomas reportados para las mutantes *mom1-2* y *mom1-1*. Fila 1: Stroud et al., 2012; 2: Yokthongwattana et al., 2010; 3: Moissiard et al., 2014; 4: Habu et al., 2006. Los genes se agruparon en *R*, *RLK*, involucrados en la acumulación de SA (*SA*), factores de transcripción (*TF*) y de respuesta a estrés biótico (*REB*). En cada grupo, la inducción de los genes en las mutantes respecto a plantas salvajes está representada en escala de color rojo (veces de cambio de 1 a 10). Las celdas grises corresponden a genes no presentes en los transcriptomas.

"Priming" de genes *R* en mutantes *mom1*

Algunos genes *R* presentan activación transcripcional en las mutantes *mom1* (Figura 12). Estos genes actúan en etapas tempranas de la señalización de las defensas y su sobre-expresión puede ser suficiente para inducir defensas contra patógenos, incluso en ausencia de elicitores o efectores patogénicos (Tao et al., 2000; Heidrich et al., 2013; Palma et al., 2010; Stokes et al., 2002; Yi y Richards, 2009; Grant et al., 2003; Collier et al., 2011; Bonardi et al., 2011). Las mutantes *mom1* presentan "priming" para la activación de genes *R* por lo que la resistencia a *Pst* de estas mutantes podría deberse a una mayor expresión y/o activación temprana de estos genes.

Muchos de los genes *R* que identificamos en el nuevo análisis de transcriptomas de plantas *mom1* (Figura 12) permanecen sin haber sido estudiados (Tabla 2). Hasta el momento, se desconoce si poseen alguna función y en qué tipo de interacción con patógenos participan. Debido a esto, evaluamos si otros genes *R* previamente caracterizados a nivel funcional, podrían presentar "priming" en plantas *mom1-5* aunque su activación no haya sido detectada en la re-evaluación de los transcriptomas. Para ello, estudiamos genes *R* con las siguientes características: que muestren regulación transcripcional mediada por marcas epigenéticas, y que al ser sobre-expresados activen defensas incluso en ausencia de ligando. De este modo seleccionamos y analizamos a los genes *RMG1*, *ADR1*, *RPS4*, *RPS2*, *SNC1*, *Laz5* y *RPM1* descritos en la Tabla 2 (Tao et al., 2000; Stokes et al., 2002; Grant et al., 2003; Yi y Richards, 2009; Palma et al., 2010; Yu et al., 2013; Heidrich et al., 2013). A su vez, estudiamos el gen *RPS5*, que sí mostró activación en la re-evaluación del transcriptoma de *mom1-1* (Tabla 2; Habu et al., 2006). Este gen *R* fue asociado a la activación de la PTI y ETI en *Arabidopsis* (Simonich e Innes, 1995; Boccara et al., 2014).

Evaluamos la capacidad de estos genes *R* de ser inducidos en mutantes *mom1*. Sus niveles de transcriptos fueron analizados por RT-qPCR y sqPCR en grupos de plantas *mom1-5* con distintos niveles de activación de defensas (utilizando el nivel de expresión de *PR1* como marcador), así como en la planta salvaje.

Sorprendentemente, observamos una inducción del gen *RMG1* en *mom1-5* que se intensificó conforme aumentó la abundancia de transcriptos de *PR1* (Figura 13a y b). Por otra parte, *ADR1* fue inducido solo en plantas *mom1-5* que presentaban altos niveles de transcriptos de *PR1* (Figura 13c). A su vez, *RPS4* mostró un leve

incremento en la abundancia de transcritos en la mutante, pero en este caso fue independientemente de la expresión de *PR1* (Figura 13d). Otros genes como *RPS2* (Figura 13e), *SNC1*, *Laz5* y *RPM1* (Figura 13f) mostraron similar expresión en plantas *mom1-5* y salvajes (Figura 13e y f). Además, el gen *RPS5* no se indujo en *mom1-2* o *mom1-1*, ni tampoco en plantas *mom1-5* con alta expresión de *PR1* (Figura 13g). Este último resultado no se correlaciona con lo observado en nuestro análisis del transcriptoma de Habu et al (2006). Notoriamente, las plantas mutantes con niveles no detectables de transcritos de *PR1*, no mostraron activación de ninguno de los genes *R* analizados (Figura 13a-f). Más aún, en esta última condición, la abundancia de transcritos de *RMG1* en *mom1-5* fue menor a la detectada en plantas salvajes (Figura 13b).

Estos resultados son consistentes con los obtenidos en los apartados anteriores, y sugieren que las mutantes *mom1-5* presentan "priming" en genes de defensa y no expresión constitutiva de los mismos. Además este "priming" podría afectar a algunos genes *R* (Tabla 2) que operan aguas arriba en la cascada de defensas contra patógenos.

Tabla 2: Genes *R* activados en mutantes *mom1*

Genes R	Transcriptoma	Asociado a defensas	Referencia
<i>AT5G41540</i>	1	?	-
<i>AT1G29715</i>	1	?	-
<i>AT4G27190</i>	1	?	-
<i>AT5G23400</i>	2	?	-
<i>AT5G42655</i>	2	?	-
<i>AT5G05400</i>	2	?	-
<i>AT1G61100</i>	4	?	-
<i>RPS5</i>	4	Activación de PTI y ETI	Simonich e Innes, 1995; Boccara et al., 2014
<i>AT4G19050</i>	4	?	-
<i>AT3G44630</i>	4	?	-
<i>AT5G63020</i>	4	?	-
<i>RLP23</i>	4	Función desconocida. Interacción con la proteína SOBIR involucrada en la resistencia a hongos patógenos	Bi et al., 2014
<i>RMG1</i>	-	Sobre-expresión asociada a activación de defensas contra <i>Pst</i>	Yu et al., 2013
<i>ADR1</i>	-	Sobre-expresión asociada a activación de defensas contra <i>Pst</i>	Grant et al., 2003
<i>RPS4</i>	-	Reconocimiento del efector AvrRps4. Activación de ETI. Sobre-expresión asociada a activación de defensas contra <i>Pst</i>	Gassmann et al., 1999; Heidrich et al., 2013

*: Transcriptomas publicados por Stroud et al., 2012 (1); Yokthongwattana et al., 2010 (2); Moissiard et al., 2014 (3); Habu et al., 2006 (4).

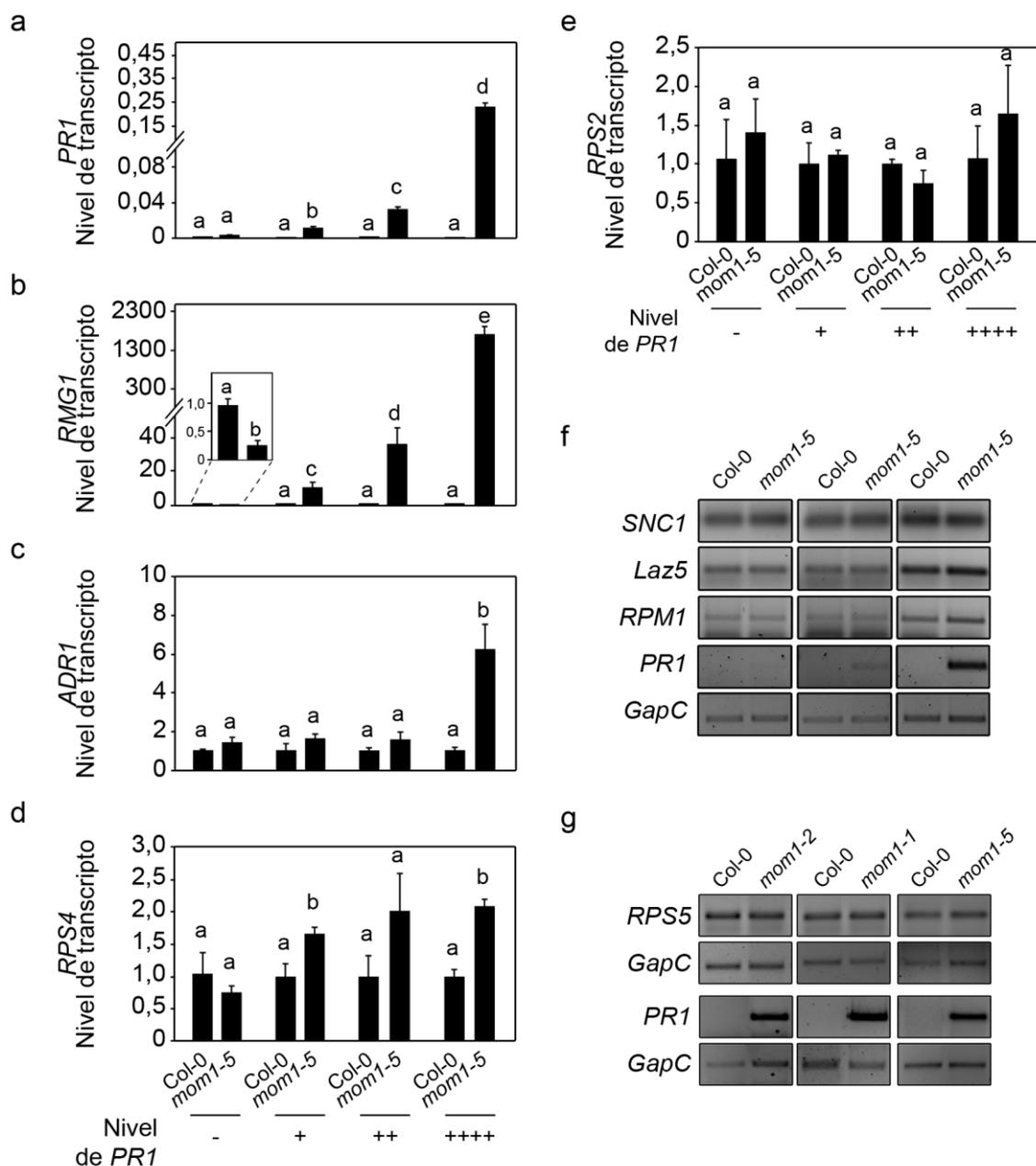


Figura 13: Expresión de genes *R* en mutantes *mom1*. Se comparan plantas *mom1-5* que presentan distintos niveles de activación de *PR1* (a-e) y se analizan plantas *mom1-2* y *mom1-1* (g). Los transcriptos de *PR1* (a), *RMG1* (b), *ADR1* (c), *RPS4* (d) y *RPS2* (e) fueron cuantificados por RT-qPCR, y los de *SNC1*, *Laz5*, *RPM1*, *RPS5* y *PR1* (f, g) por RT-sqPCR. Los valores fueron obtenidos por el método de $2^{-\Delta ct}$ en (a) $2^{-\Delta\Delta ct}$ en (b-d), y Pfaffl en (e), y representan la media de tres réplicas técnicas \pm el desvío estándar. Distintas letras sobre las barras indican diferencias significativas ($p < 0,05$) tras aplicar ANOVA seguido de test de Tukey. Se muestra una réplica biológica representativa de tres experimentos independientes. Los genes de expresión constitutiva *UBQ5* y *GapC* fueron usados como referencia en los ensayos de RT-qPCR y RT-sqPCR respectivamente.

Efectos del estrés biótico sobre la expresión de genes de defensa en *mom1-5*

Para estudiar en mayor detalle el "priming" de las plantas *mom1*, analizamos si la infección activa a los genes de defensa de manera similar a lo observado en plantas salvajes. Con este fin, tomamos muestras de hojas de plantas salvajes y *mom1-5* no tratadas (T0), o tratadas durante 24 horas ya sea con el vehículo (Mock- MgCl_2 10mM) o con el patógeno (*Pst*, 1×10^8 ufc ml^{-1}) y las utilizamos para cuantificar transcritos de genes de defensa por ensayos de RT-sq/qPCR. En particular, analizamos genes *R*, genes involucrados en la acumulación de SA y un gen del grupo *REB* (*PR1*).

En primer lugar se evaluaron los genes *R* que presentan "priming" en la mutante. A las 24 hpi las plantas *mom1-5* infectadas alcanzaron mayores niveles de transcritos de *RMG1* que las plantas salvajes (Figura 14a). Por el contrario, no hubo diferencias significativas en la inducción de *RPS2* (Figura 14a). Curiosamente, *mom1-5* activó tanto a *RMG1* como a *RPS2* en respuesta al estrés de la inoculación del vehículo (Mock; Figura 14a). Por otra parte, plantas mutantes y salvajes alcanzaron similares niveles de transcritos de los genes *RPS4*, *SNC1*, *Laz5*, *RPM1* y *ADR1* (Figura 14b). Esto indica que en las plantas *mom1-5* solo algunos genes *R* tendrían la capacidad de responder más temprana o activamente a *Pst*. Además, otros estreses, como el producido por la inoculación del vehículo, serían suficientes para inducir a un grupo de genes *R* en estas plantas.

Posteriormente analizamos la expresión de genes que controlan la acumulación de SA (*ICS1* y *EDS5*) y de *PR1* que es inducido por esta hormona. A las 24 hpi, la mutante *mom1-5* alcanzó mayores niveles de transcritos de *ICS1* respecto a la planta salvaje (Figura 14c). Nuevamente, a diferencia de la planta control, la mutante acumuló transcritos de *ICS1* en respuesta al tratamiento con el vehículo (Figura 14c). Además, esta planta mostró leve activación basal de *EDS5* (Figura 14d) y a las 8 y 24 hpi alcanzó mayor activación de *PR1* que la planta salvaje induciendo este gen frente al tratamiento con vehículo (Figura 14e, f). Estos resultados son llamativos teniendo en cuenta que en plantas salvajes, *PR1* recién es activado transcripcionalmente a partir de las 24 hpi con *Pst*, y en ningún caso responde al tratamiento control (Mock, Figura 14e).

En resumen, algunos genes de defensa serían inducidos más rápidamente y/o en mayor medida en la mutante. Sumado a esto, el estrés mecánico producto del tratamiento con el vehículo sería suficiente para activar las defensas en estas plantas. Esto sustenta la idea que la resistencia a *Pst* de *mom1-5*, que no presenta expresión

basal de genes de defensa, podría deberse a que la misma manifiesta "priming" en la activación de los genes de defensa.

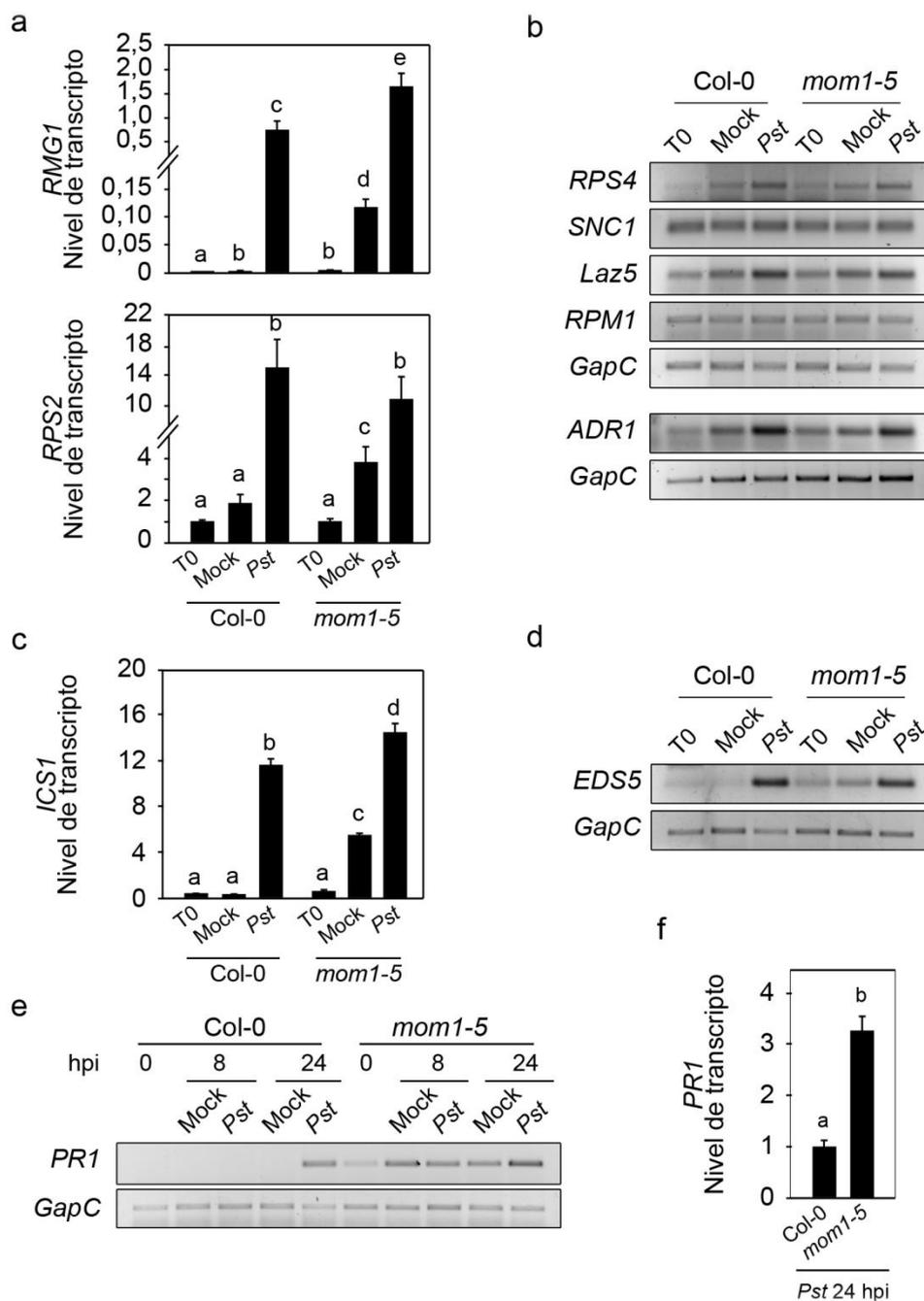


Figura 14: Expresión de genes de defensa en plantas *mom1-5* infectadas. La abundancia de transcritos de los genes *RMG1*, *RPS2* (a), *ICS1* (c) y *PR1* (f) se analizó por ensayos de RT-qPCR. Los valores fueron obtenidos por el método de $2^{-\Delta ct}$ y Pfaffl en (a), y $2^{-\Delta\Delta ct}$ en (c) y (f), y representan la media de tres réplicas técnicas \pm el desvío estándar. El gen de expresión constitutiva *UBQ5* fue utilizado como referencia. Los datos fueron analizados estadísticamente como en la Figura 13 ($p < 0,05$). Abundancia de transcritos de los genes *RPS4*, *SNC1*, *Laz5*, *RPM1*, *ADR1* (b), *EDS5* (d) y *PR1* (e) analizada por ensayos de RT-sqPCR. El gen de expresión constitutiva *GapC* se utilizó como referencia. Las muestras fueron obtenidas a partir de hojas de plantas salvajes y mutantes no tratadas (T0), y tratadas durante 8 y/o 24 horas con vehículo (Mock, $MgCl_2$ 10mM) o *Pst* (1×10^7 ufc ml^{-1}).

Proximidad de los TEs blanco de MOM1 a los genes de defensa inducidos en la mutante

Los TEs blanco de MOM1 fueron identificados como tales a partir del secuenciamiento masivo de mRNAs en plantas *mom1-2*. Estos TEs se encuentran sobre-expresados en la mutante respecto a la planta salvaje. Tal como se describió en la Introducción, la mayor parte de ellos pertenecen a la familia Gypsy (Numa et al., 2010, Yokthongwattana et al., 2010). Por otra parte, algunos genes *R* poseen TEs en regiones adyacentes o incluso dentro de su marco de lectura abierto (ORF). A su vez, para un pequeño grupo de TEs se ha descrito su efecto regulatorio sobre la abundancia y calidad de los mRNAs de los genes *R* (Yi y Richards, 2007; Tsuchiya y Eulgem., 2013; Weiberg et al., 2014). Teniendo en cuenta estos antecedentes, sería posible sugerir que el fenómeno de “priming” que se manifiesta en las plantas *mom1-5* deriva de efectos de los TEs blanco de MOM1 (TE de MOM1) sobre los genes *R* localizados en su proximidad (efecto de TE en “*cis*” sobre los genes *R*).

Para evaluar esta posibilidad, posicionamos a los TE blanco de MOM1 (identificados por Yokthongwattana et al., 2010) respecto a genes *R/RLK* y a los genes de respuesta al estrés biótico en general (*REB*), realizando dos tipos de análisis *in silico*. En primer lugar, llevamos a cabo una búsqueda de genes de defensa (*R/RLK* y *REB*) que son próximos a los TE afectados por MOM1 (Figura 15a). Con estos datos, pudimos evaluar si los TEs de MOM1 podrían eventualmente ejercer un efecto en *cis* sobre la regulación transcripcional de genes de defensa. En segundo lugar, realizamos un estudio inverso, identificando a los TEs que se encuentran localizados próximos a los genes *R* blancos de MOM1 (*R* de MOM1) (Figura 15b). A partir de este segundo estudio, evaluamos si existe alguna familia de TEs enriquecida en las regiones próximas a estos genes *R* y si ésta corresponde a los TEs Gypsy.

Para abordar el primer análisis (Figura 15a), identificamos todos los genes que se encuentran a ± 5000 pb de cada TE de MOM1. Para conocer si estos genes son o no genes de defensa a patógenos, los nombres de los genes identificados fueron comparados con los de los genes *R/RLK* y genes *REB*. A partir de esta comparación se generó un diagrama de Venn que permite observar si los genes próximos a los TE de MOM1 son genes de defensa.

Observamos que ningún gen *R* o *RLK* se encontraba a menos de 5000 pb de algún TE blanco de MOM1 (Figura 15c). Solo el gen de respuesta a estrés biótico *At2g11000* (un homólogo no funcional de *MAK10* de levaduras) se encontraba próximo

a un TE de MOM1. En *Saccharomyces cerevisiae*, MAK10 junto con MAK3 y MAK31 forman el complejo NATc (“N-terminal Acetyltransferase complex C”). Cada una de estas MAK es requerida para la N-acetilación de proteínas, y está involucrado en la propagación de virus. A pesar de esto, no existen evidencias que sugieran que el gen *At2g11000* tenga algún efecto sobre la activación de las defensas contra patógenos microbianos en plantas. Más aún, este gen vegetal ha sido descrito como un homólogo no funcional de MAK10 de levaduras (Pesaresi et al., 2003).

En el segundo análisis (Figura 15b), nos interesó conocer si existe un enriquecimiento de TEs de la familia Gypsy (que estén o no sobre-expresados en mutantes *mom1*) próximos a los genes *R* inducidos en *mom1*. Identificamos todos los TEs localizados entre 5000-2000 pb y 2000-0 aguas arriba y debajo del ORF, como también dentro del ORF de los genes *R* sensibles a *mom1*. Posteriormente, estos TEs fueron agrupados y cuantificados según a la familia a la que pertenecen. Como control para evaluar si la abundancia de una determinada familia de TEs está sobre-representada en alguna posición respecto a los genes *R* afectados en *mom1*, se cuantificó el número de TEs próximos a genes *R* tomados al azar (10 grupos).

Los TEs pertenecientes a la familia Gypsy estuvieron muy poco representados, mientras que los de la familia Helytron fueron los más representados en todas las posiciones próximas a los genes *R* (Figura 15d). A pesar de esto, no se detectaron diferencias significativas (análisis estadístico basado en distribución de Poisson) en la abundancia de ninguna familia de TEs entre los valores obtenidos con los genes *R* analizados respecto a los tomados al azar (Figura 15d).

Estos resultados muestran que los TEs silenciados por MOM1 no son próximos a genes de defensa. Por otra parte, los genes *R* no están enriquecidos en alguna familia de TEs en particular, al menos en la región comprendida entre 5000 pb aguas arriba y debajo del ORF. Es decir, en plantas salvajes la proteína MOM1 podría ejercer una regulación negativa de las defensas sin actuar en *cis* sobre los genes que participan en estas vías. Este efecto podría ser mediado por un mecanismo que opere *en trans* y se muestre alterado en las mutantes *mom1*.

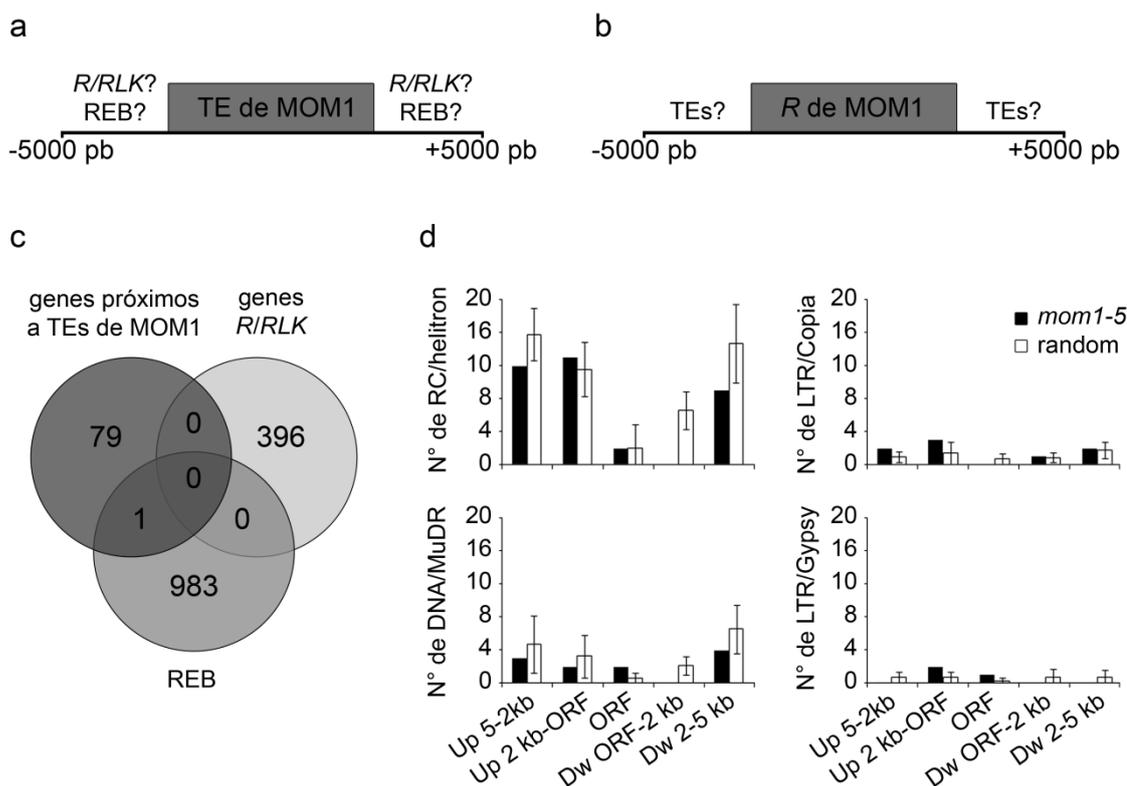


Figura 15: Proximidad de TEs, y TEs de MOM1 a genes de defensa *R*, *RLK* y de respuesta al estrés biótico. (a-b) Esquemas que representan las dos estrategias de los análisis *in silico* utilizados. Los TEs blanco de MOM1 (a) o los genes *R* activados en *mom1* (b) fueron posicionados para identificar la presencia de genes *R/RLK* y *REB* (de respuesta a estrés biótico) (a), o de TEs (b) en 10 kb alrededor del ORF. (c) Diagrama de Venn que relaciona los genes que se encuentran a 5000 pb aguas arriba/debajo de TEs sobre-expresados en *mom1-2* (genes próximos a TEs de MOM1) con genes de defensa *R/RLK* y *REB*. Los números indican *loci* independientes. (d) Disposición y abundancia de TEs de distintas familias localizados en proximidad (5000pb) a los genes *R* de MOM1. Las posiciones discriminan entre 5 y 2 kb aguas arriba del ORF (Up 5-2 kb), entre 2 kb y el ORF (Up ORF-2 kb), dentro del ORF, y aguas abajo de los genes *R* entre el ORF y 2kb (Dw ORF-2 kb), y entre 2 y 5kb (Dw 2-5 kb). Se muestran los valores obtenidos para las 3 familias de TEs más abundantes, y para la familia Gypsy. Las barras negras y blancas representan los valores obtenidos para los genes *R* activados MOM1 y los genes *R* tomados al azar, respectivamente.

Efecto de los dominios CMM2 y NLS de MOM1 sobre el fenómeno de “priming”

La proteína MOM1 de *Arabidopsis* posee siete dominios diferenciados, un dominio de localización nuclear (NLS), dos secuencias repetitivas, un relicto de un dominio remodelador de cromatina de tipo SNF2 y tres dominios conservados entre las proteínas MOM de plantas llamados CMM1 a CMM3 (“Conserved MOM1 Motif” 1 a 3) (Figura 16a). A partir de experimentos de complementación génica, se conoció que un transgén generado a partir de los dominios NLS y CMM2 (*miniMOM*; Figura 16a) restaura la capacidad de mantener reprimidos a un grupo de TEs de MOM1 (Caikovski et al., 2008). A partir de estos antecedentes, decidimos estudiar si estos dominios también están implicados en el fenómeno de “priming” que se estudia en esta Tesis.

En primer lugar, analizamos el efecto de los dominios CMM2/NLS sobre la resistencia a *Pst*. Para ello, se analizó el crecimiento del patógeno tanto en la mutante *mom1-1* como en la misma mutante transformada con el transgén que contiene ambos dominios (planta *miniMOM*). Infectamos plantas de dos meses de edad con el patógeno, y evaluamos los tejidos infectados luego de 1 y 3 días post-tratamiento. En forma paralela analizamos el “priming” de genes de defensa en plantas *miniMOM* y *mom1-1* no infectadas de distintas edades.

Curiosamente, la planta *miniMOM* mostró mayor susceptibilidad a *Pst* que la planta *mom1-1* (Figura 16b) y el desarrollo del patógeno en la primera planta fue prácticamente igual al observado en la planta salvaje (no mostrado). Cuando evaluamos el “priming” de genes de defensa en plantas no tratadas, observamos que a diferencia de las mutantes *mom1-1*, las plantas transgénicas *miniMOM* de 4, 8 o 20-30 hojas perdieron la capacidad de inducir a *PR1* (Figura 16c, d), recuperando el fenotipo salvaje. Más aún, las plantas *miniMOM* adultas no acumularon transcritos de los genes *RMG1* como la planta *mom1-1* (Figura 16e). Tampoco *miniMOM* indujo a los genes *ADR1*, *RPS4* y *RPS2*, previamente analizados (Figura 16f-h).

Estos resultados muestran que los dominios presentes en el transgén *miniMOM* (NLS y CMM2) son suficientes para recuperar la represión de las defensas en plantas *mom1-1*. A partir de estos hallazgos sugerimos que en plantas salvajes, MOM1 podría regular negativamente la activación de las defensas y el “priming” a través de sus dominios CMM2 y NLS, esenciales para que la proteína se acople a la maquinaria de silenciamiento génico que reprime a los TEs.

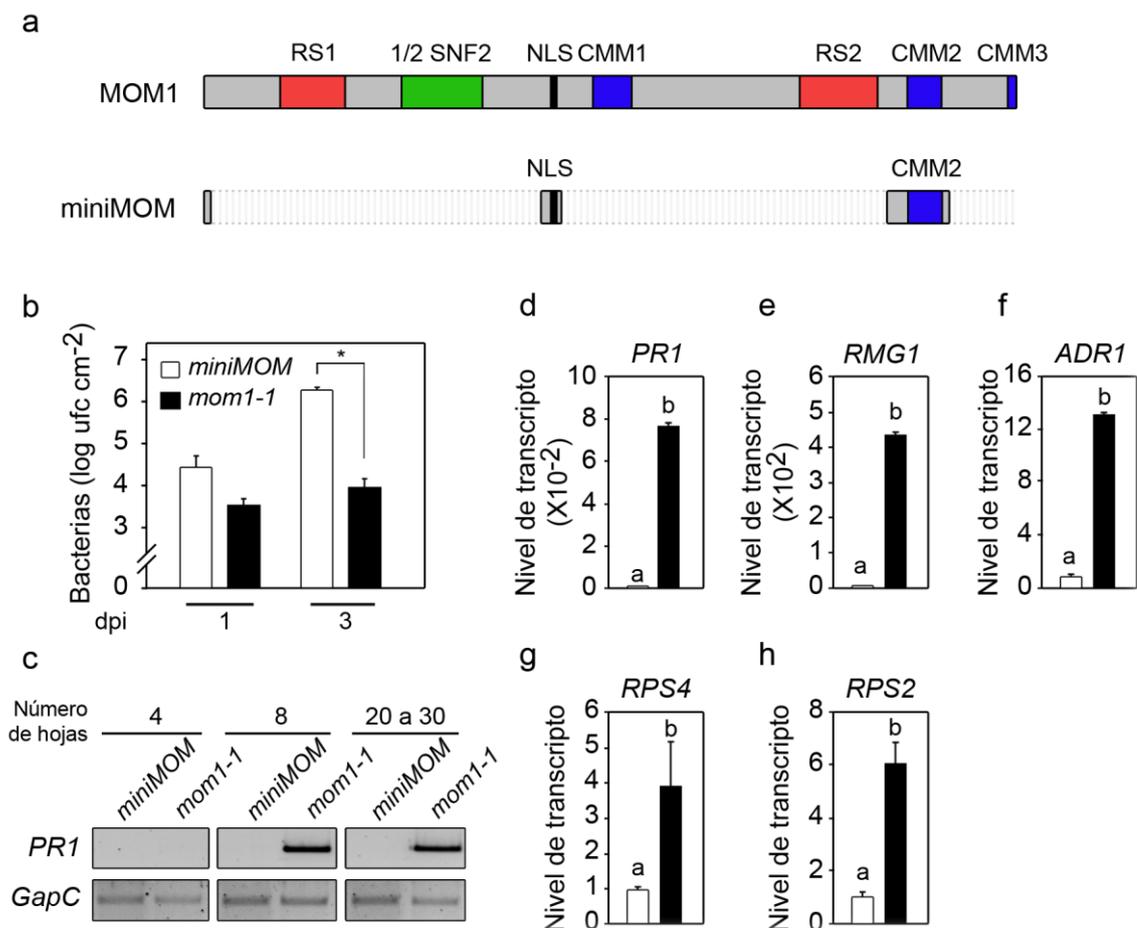


Figura 16: Complementación del fenotipo de resistencia de *mom1-1* con los dominios CMM2/NLS. (a) Esquema de la proteína MOM1 y miniMOM adaptado de Caikiovski y colaboradores (2008). Se representan los 2001 aa de la proteína completa (panel superior) y los 250 aa de miniMOM (panel inferior). Los rectángulos de colores representan a los siete dominios de MOM1: rojos, repeticiones (RS1 y RS2); verde, relicto de dominio SNF2 (1/2 SNF2); negro, dominio de localización nuclear (NLS); azul, dominios conservados de MOM1 (CMM1 a CMM3). (b) Contenido de *Pst* en plantas transgénicas *miniMOM* y mutantes *mom1-1* infectadas. Las hojas fueron tratadas con *Pst* (10^5 ufc ml⁻¹) y analizadas en los días 1 y 3 post-infección (dpi). Los valores representan la media del contenido de bacterias (\log_{10} de ufc cm⁻²) \pm el desvío estándar. El análisis estadístico fue realizado como en la Figura 8. (c) Nivel de transcritos de *PR1* analizados por ensayos de RT-sqPCR en plantas *miniMOM* y *mom1-1* de 4, 8 y 20 a 30 hojas crecidas en tierra. Abundancia de transcritos de *PR1* (d), *RMG1* (e), *ADR1* (f), *RPS4* (g) y *RPS2* (h) analizada por RT-qPCR en plantas *miniMOM* (barras blancas) y *mom1-1* (barras negras) de 20 a 30 hojas crecidas en tierra. Los valores fueron obtenidos utilizando el método de $2^{-\Delta ct}$ en (d) $2^{-\Delta\Delta ct}$ en (e, g) y Pfaffl en (f), y representan la media de tres réplicas técnicas \pm el desvío estándar. El análisis estadístico fue realizado como en la Figura 13 ($p < 0,05$). Los genes de expresión constitutiva *UBQ5* y *GapC* fueron usados como referencia en RT-qPCR y RT-sqPCR, respectivamente.

Regulación de H3K9me2 en el promotor de *ADR1* en plantas salvajes infectadas, mutantes *mom1-5*, *mom1-1* y *miniMOM* no tratadas

MOM1 promueve la metilación de H3K9 en secuencias blanco que fueron identificadas por encontrarse sobre-expresados en las mutantes *mom1-1*, *mom1-2* y *mom1-5* (Amedeo et al., 2000; Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al.; 2010; Won et al., 2012). La mutante *mom1-2*, reduce la metilación de H3K9 en un grupo de TEs blanco sin modificar otras marcas epigenéticas en estos elementos (Habu et al., 2006, Vaillant et al., 2006). Esto sugiere que la reducción de H3K9me2 en los TEs regulados por MOM1, sería suficiente para activar transcripcionalmente a esos blancos (Habu et al., 2006, Vaillant et al., 2006). Actualmente no existen trabajos que describan el perfil de H3K9me2 en el genoma completo de mutantes de MOM1.

Nos preguntamos si durante la infección con *Pst* la activación de algún gen *R* está asociada a la pérdida de H3K9me2 y si MOM1 participa de este cambio. Para evaluar esto analizamos a *ADR1*, que contiene marcas H3K9me2 en su región promotora (Figura 17a; Bernatavichute et al., 2008) y presenta "priming" en mutantes *mom1*.

Para evaluar el nivel de H3K9me2 en *ADR1*, realizamos ensayos de inmunoprecipitación de la cromatina (ChIP) utilizando anticuerpos específicos que reconocen a esta marca, y oligonucleótidos diseñados para amplificar una región del promotor de *ADR1* donde la misma ha sido detectada (Figura 17a). Estos experimentos fueron realizados en colaboración con la Dra. Paula Casati (CEFOBI-CONICET, Universidad Nacional de Rosario). Las muestras fueron obtenidas a partir de plantas salvajes sanas e infectadas, así como de la mutante *mom1-5* con o sin expresión basal de *ADR1* (plantas adultas y jóvenes, respectivamente).

A su vez, evaluamos el eventual requerimiento de CMM2/NLS para la metilación de H3K9 en esta región del promotor, analizando muestras de plantas *miniMOM* y *mom1-1* adultas. En paralelo, cuantificamos el contenido de H3 total como control de la densidad de nucleosomas en la región estudiada y el nivel de H3K9me2 sobre el locus *Ta2*, como control interno del ChIP dado que este locus no presenta variaciones de esta marca en *mom1-1* y *mom1-2* (Habu et al., 2006; Numa et al., 2010; Vaillant et al., 2006).

Las plantas salvajes disminuyeron el contenido de H3K9me2 en el promotor de *ADR1* al ser infectadas con *Pst* (Figura 17b). Las mutantes *mom1-5* y *mom1-1* adultas no infectadas que activan a este gen *R* también redujeron el nivel de esta marca

(Figura 17c, d). Sorpresivamente, la incorporación de los dominios CMM2/NLS en la mutante *mom1-1* fue suficiente para incrementar los niveles de H3K9me2 en esta región promotora (Figura 17d). Estos resultados sugieren que la activación de *ADR1* que ocurre en plantas salvajes infectadas así como en mutantes *mom1* no infectadas podría resultar de la pérdida de H2K9me2 en su promotor. En este sentido, MOM1 podría impedir la disminución de H3K9me2 en *ADR1* en ciertas condiciones de crecimiento o estrés.

Finalmente, evaluamos el contenido de H3K9me2 en el promotor de *ADR1* en plantas *mom1-5* que no activan al gen. En este estudio volvimos a incluir a las plántulas salvajes como control. Llamativamente, el nivel de H3K9me2 en el promotor de *ADR1* fue similar para ambas plantas (Figura 17e). Esto muestra que la remodelación de estas marcas en la planta mutante no es constitutiva sino inducible. Por otra parte, esto sugiere que el promotor de *ADR1* no sería un blanco directo de MOM1, porque si fuera así el promotor de este gen tendría constitutivamente menos H3K9me2 en la mutante, tal como ocurre con sus TEs blanco (Vaillant et al., 2006; Habu et al., 2006).

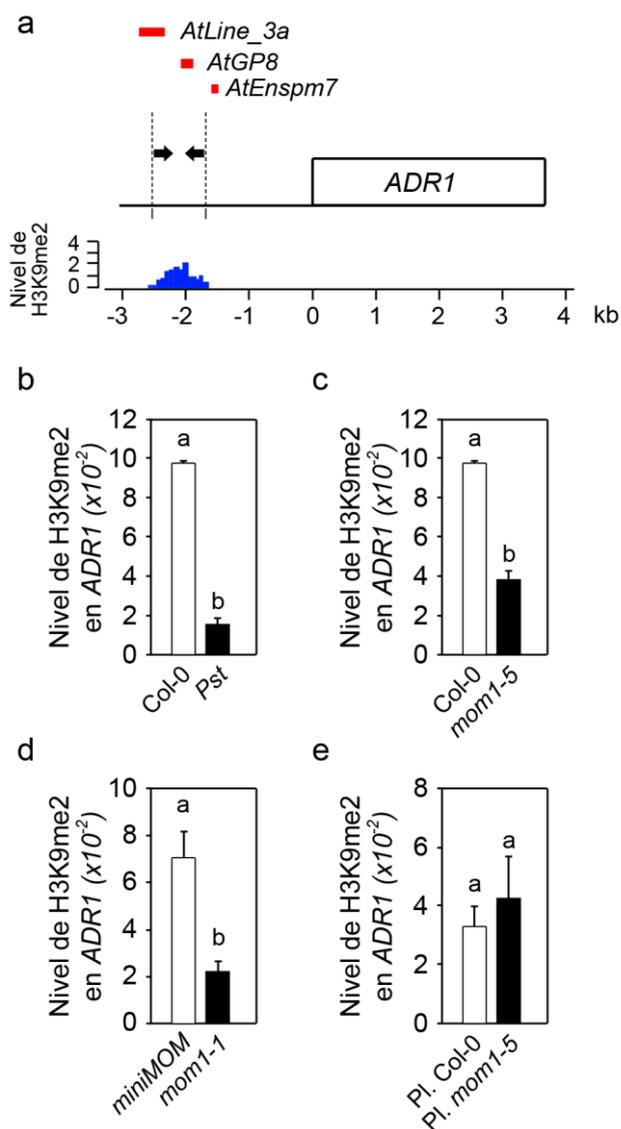


Figura 17: Nivel de H3K9me2 en la región promotora de *ADR1*. (a) Esquema del gen *ADR1* (promotor y ORF). Las barras rojas representan TEs insertos en el promotor. El histograma muestra los niveles de H3K9me2 (Z-score según Bernatavichute y colaboradores, 2008). Las flechas indican la región amplificada por qPCR en las muestras inmuno-precipitadas con anti-H3K9me2 y anti-H3 en nuestros experimentos. Las líneas punteadas marcan la región genómica que podría ser inmunoprecipitada. (b-e) Abundancia de H3K9me2 cuantificada por ensayos de inmuno-precipitación de cromatina. (b) Plantas adultas salvajes (Col-0) no infectadas vs infectadas con *Pst*. (c-d) Plantas adultas no infectadas, salvajes vs *mom1-5* (c) y *miniMOM* vs *mom1-1* (d). (e) Plántulas de 8 hojas (Pl.) salvajes vs *mom1-5* (e). Los valores fueron obtenidos por el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ relacionando el contenido de *ADR1* respecto a *Ta2* inmuno-precipitado con el anticuerpo anti-H3K9me2 y a los obtenidos de las muestras inmuno-precipitación con anti-H3 (H3K9me2/*Ta2*/H3). Los valores representan la media de 3 réplicas técnicas \pm el desvío estándar. Los datos fueron analizados estadísticamente como en la Figura 13 ($p < 0,05$). Se muestra un experimento representativo de dos réplicas biológicas.

Capítulo 3:

Expresión de la cromatina centromérica en plantas salvajes infectadas y su efecto en las defensas

En este capítulo estudiamos el comportamiento transcripcional de los TEs y repeticiones centroméricas en plantas salvajes infectadas con *Pst*. El objetivo fue indagar sobre los mecanismos que eventualmente podrían vincular la regulación transcripcional de TEs centroméricos con la de genes de defensa no centroméricos. En este contexto, evaluamos si la maquinaria de silenciamiento mediada por smRNAs (RdDM) regula la abundancia de transcritos de estos TEs en infección y si los niveles de smRNAs homólogos al centrómero y a genes *R* se alteran en esta condición. Además, analizamos la posibilidad que smRNAs particulares sean requeridos para regular tanto a TEs como a genes *R* en tejidos infectados. En base a los resultados obtenidos, sugerimos que algunos smRNAs homólogos al centrómero podrían afectar la expresión de algunos genes *R* en las plantas salvajes infectadas con *Pst*.

Niveles de transcritos de TEs y repeticiones centroméricas en plantas salvajes infectadas con *Pst*

Seleccionamos tres grupos de TEs que difieren en su localización genómica (centroméricos y no centroméricos) y en su regulación por MOM1 (dependiente o independiente). Estos grupos incluyen a TEs centroméricos dependientes de MOM1 (*Athila6a* y *TSI*), TEs centroméricos independientes de MOM1 (*IS112A*), y TEs no centroméricos que tampoco dependen de MOM1 (*Atlantys*, *Onsen* y *Ta11*). La localización de estos TEs se muestra en la figura 18a. Sus niveles de transcritos fueron cuantificados por RT-PCR a partir de muestras de tejidos sanos (T0), y tejidos tratados con vehículo (Mock, MgCl₂ 10mM) o con *Pst* (10⁷ ufc ml⁻¹).

Los resultados evidenciaron dos comportamientos distintos. Los TEs centroméricos disminuyeron sus niveles de transcritos en tejidos infectados. Por el contrario, los no centroméricos aumentaron sus transcritos en dichos tejidos (Figura 18b). *TSI* fue inducido en tejidos tratados con el vehículo, posiblemente por el estrés mecánico que genera la infiltración de esta solución en las hojas. Aunque el tratamiento con *Pst* produce el mismo estrés, los transcritos de *TSI* disminuyeron en esta muestra respecto a la control (Mock), alcanzando valores similares a los de

muestras no tratadas (T0) (Figura 18b). *IS112A* y *Athila6a* redujeron sus transcritos frente a la infección con *Pst* aunque en algunas réplicas biológicas, el tratamiento con el vehículo no incrementó sus niveles de transcritos de (Figura 18b). Por lo tanto, existen claras diferencias en el comportamiento de los TE centroméricos y no centroméricos frente a la infección de con *Pst*. Mientras los primeros disminuyen sus niveles de transcritos, los segundos los aumentan. Dentro del primer grupo, se comportan de igual modo dos TEs que difieren en el requerimiento de MOM1 para su represión (*Athila6a* e *IS112A*).

Estos dos tipos de respuestas podrían deberse tanto a diferencias en los mecanismos que controlan la expresión de las regiones centroméricas y no centroméricas del genoma, como a la existencia de secuencias regulatorias que controlen diferencialmente en *cis* a los dos grupos de TEs. El análisis de la segunda posibilidad es muy complicado debido a la gran cantidad de repeticiones de estos TEs dispersos en el genoma, cada uno con secuencias regulatorias diferentes. Para analizar de alguna manera esta última posibilidad, evaluamos en qué medida la abundancia de transcritos depende de la posición de un mismo gen dentro o fuera del centrómero. Para ello cuantificamos los transcritos de un transgén que en dos plantas diferentes se encuentra insertado en distintas posiciones del genoma. Utilizamos el transgén de *Luciferasa (LUC)* regulado por el promotor *35S (35S:LUC)*. Si bien este promotor es de expresión constitutiva, su expresión depende del contexto genómico (eucromático o heterocromático) en el que se encuentra (Rosin et al., 2008). Las dos plantas analizadas contienen al transgén ya sea en el centrómero del cromosoma 3 (planta *CCT435*), o en una región no centromérica del cromosoma 2 (planta *CCT366*) (Figura 18c) y en ambos casos en regiones heterocromáticas que reprimen basalmente su expresión (Rosin et al., 2008). En este sentido, el comportamiento del transgén es similar al de los TEs analizados anteriormente.

La abundancia del transcritos *LUC* se analizó en ambas líneas luego tratamiento con vehículo o *Pst* durante 24 horas. La infección con *Pst* provocó una disminución en el nivel de este transcritos en la planta *CCT435* (transgén centromérico), pero generó un aumento del mismo transcritos en la planta *CCT366* (transgén no centromérico) (Figura 18d). Por ello, el comportamiento del transgén en las dos posiciones analizadas fue similar al descrito para los TEs localizados en esos dos tipos de regiones genómicas.

Estos resultados muestran que en plantas salvajes infectadas con *Pst*, los niveles de transcritos de TEs se regulan por mecanismos diferentes para elementos

centroméricos y no centroméricos. En esta condición, un mismo transgén se comporta de manera distinta, sugiriendo que la posición de TEs/transgenes afecta a la abundancia de transcritos independientemente de sus secuencias regulatorias en *cis*.

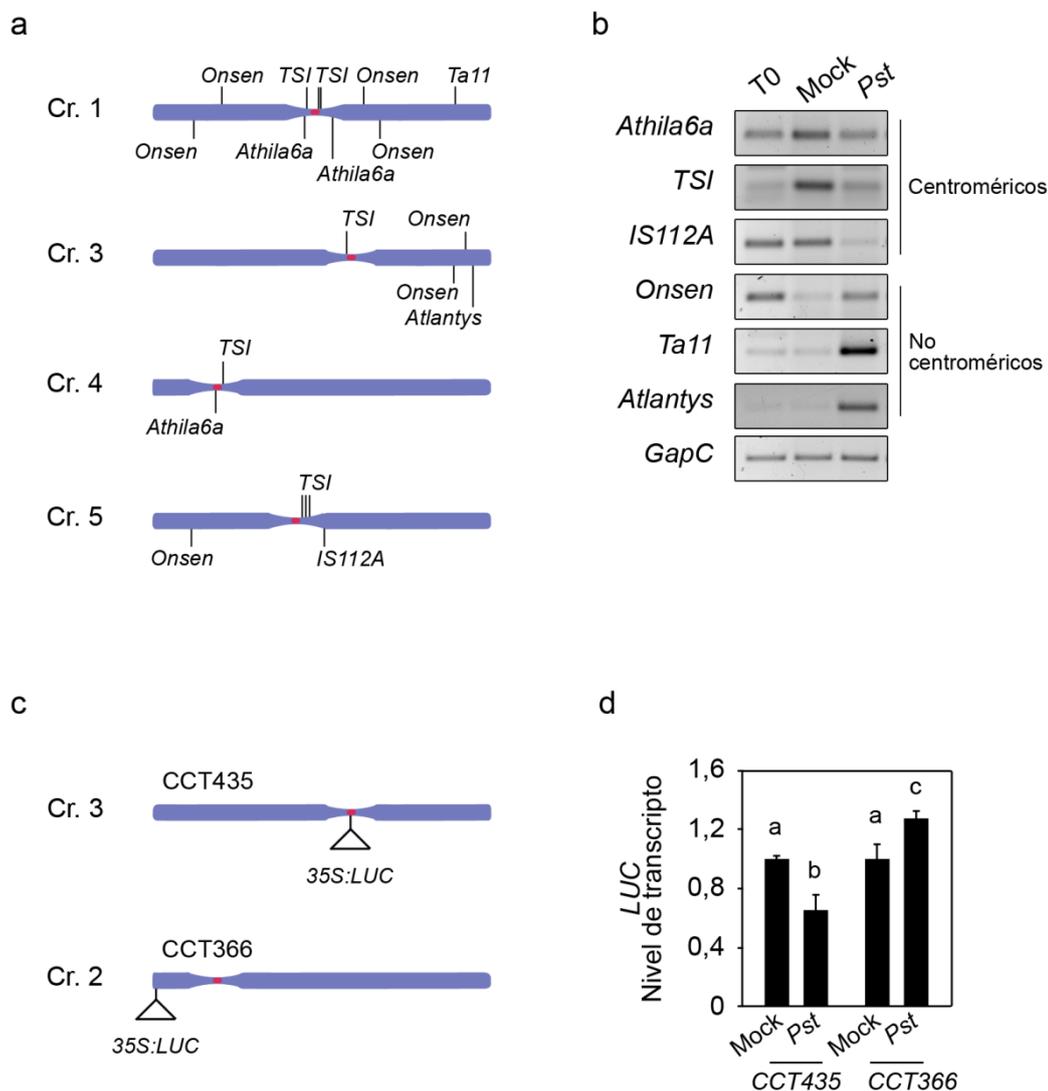


Figura 18: Abundancia de transcritos derivados de *loci* centroméricos y no centroméricos. Se analizaron tres TEs centroméricos (*Athila6a*, *TSI* e *IS112A*) y tres no centroméricos (*Onsen*, *Ta11* y *Atlantys*). Además se evaluó el transgén *LUC* ubicado en el centrómero del cromosoma 3 o en un brazo del cromosoma 2. (a) Posición de los TEs y repeticiones analizados en plantas salvajes. (b) Abundancia de transcritos de los TEs centroméricos y no centroméricos por medio de ensayos de RT-sqPCR. Las muestras fueron obtenidas de plantas salvajes no tratadas (T0), y tratadas durante 24 horas con el vehículo (Mock, $MgCl_2$ 10mM) o *Pst* (10^7 ufc ml^{-1}). El gen de expresión constitutiva *GapC* fue utilizado como referencia. (c) Localización del transgén *35S:LUC* en las líneas transgénicas *CCT435* y *CCT366*. (d) Nivel de transcritos de *LUC* cuantificados por RT-qPCR en plantas transgénicas tratadas durante 24 horas con el vehículo o *Pst*. Los valores fueron obtenidos utilizando el método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ y representan la media de tres réplicas técnicas \pm el desvío estándar. El gen de expresión constitutiva *UBQ5* fue utilizado como referencia. El análisis estadístico fue realizado como en la Figura 13 ($p < 0,05$).

Efecto de la maquinaria de silenciamiento génico sobre la abundancia de transcritos de TEs en plantas salvajes infectadas

En *Arabidopsis* se han caracterizado mecanismos convergentes que ejercen un control negativo sobre la expresión, recombinación y transposición de repeticiones centroméricas y TEs disminuyendo su efecto genotóxico (Wang et al., 2015a; Slotkin y Martienssen, 2007; Numa et al., 2010; Pikaard et al., 2012; Chekanova et al., 2015). Éstos mecanismos incluyen la deposición de marcas epigenéticas represoras tales como 5mC y H3K9me2, así como la compactación de nucleosomas (Slotkin y Martienssen, 2007; Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al., 2010; Pikaard et al., 2012; Chekanova et al., 2015). En plantas salvajes, la maquinaria de silenciamiento que involucra a las RNA polimerasas Pol IV y Pol V, la proteína AGO4 y la endonucleasa DCL3 es la principal responsable de la regulación transcripcional de los TEs centroméricos (Figura 2b). En conjunto, estos componentes guían la deposición de 5mC sobre blancos específicos (Slotkin y Martienssen, 2007; Pikaard et al., 2012; Chekanova et al., 2015). Por su parte, MOM1 es requerida para depositar H3K9me2 en sitios previamente metilados a través de esta maquinaria (Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al., 2010).

Considerando que *TSI* y *Athila6a* son regulados por esta maquinaria de silenciamiento (Slotkin y Martienssen, 2007; Pikaard et al., 2012; Chekanova et al., 2015, Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al., 2010), es posible especular que la misma opere en la infección con *Pst* disminuyendo los transcritos de *TSI* y *Athila6a*. Para evaluar esta posibilidad, comparamos el comportamiento de estos TEs en plantas salvajes y mutantes nulas *pol IV*, *pol V*, *mom1-5* y la mutante hipomórfica *ago4-2* (Tabla 3), bajo condiciones de no infección (T0), tratamiento con vehículo (Mock) e infección con *Pst*. La abundancia de transcritos de los TEs se evaluó por medio de ensayos de RT-PCR.

En presencia del patógeno, las mutantes *pol IV* y *mom1-5* no reprimieron a *TSI* ni a *Athila6a* (Figura 19a y b) y la mutante *pol V* no reprimió a *TSI* (Figura 19a). Más aún, en las mutantes *pol IV* y *pol V* infectadas los transcritos de *TSI* aumentaron. Por otro lado, en la mutante *ago4-2* tratada con el vehículo los transcritos de *TSI* fueron más abundantes que en plantas salvajes (Figura 19a), y cuando esta mutante fue infectada estos transcritos disminuyeron aún más que en plantas salvajes, alcanzando niveles menores a los basales (T0). Por otra parte, los TEs no centroméricos *Atlantys* y *Ta11* fueron inducidos tanto en las plantas salvajes como en

las mutantes en condición de infección, con una menor inducción de estos TEs en plantas *ago4-2* y *mom1-5*.

Estos resultados sugieren que en plantas salvajes infectadas, la maquinaria de silenciamiento que opera a través de siRNAs podría ser responsable del silenciamiento de *TSI* y *Athila6a*. Durante el proceso infeccioso podría desencadenarse la activación transcripcional y posteriormente la represión de estos *loci* mediada por la maquinaria de silenciamiento dependiente de siRNAs. En relación a los dos TEs no centroméricos analizados, esta maquinaria no tendría efectos regulatorios significativos bajo condiciones de infección.

Tabla 3: Mutantes de silenciamiento génico utilizadas en este capítulo.

Alelo mutante	Descripción	Función/actividad	Tipo de alelo	Bibliografía
<i>nripd1a4 (Pol IV)</i>	Subunidad mayor de la RNA polimerasa IV	Generación de ssRNA que dan origen a dsRNAs	Insercional, nulo	Pontier et al., 2005
<i>nripd1b11 (Pol IV)</i>	Subunidad mayor de la RNA polimerasa V	Generación de ssRNAs que reclutan al complejo AGO4-siRNA por homología de secuencia	Insercional, nulo	Pontier et al., 2005
<i>mom1-5</i>	Remodelador de la cromatina	Metilación de H3K9	Insercional, nulo	Won et al., 2012
<i>ago4-2</i>	Componente de la maquinaria de RdDM	Interacción con smRNAs. Direccionamiento de los mismos a su blanco	Puntual, hipomórfico	Agorio y Vera, 2007

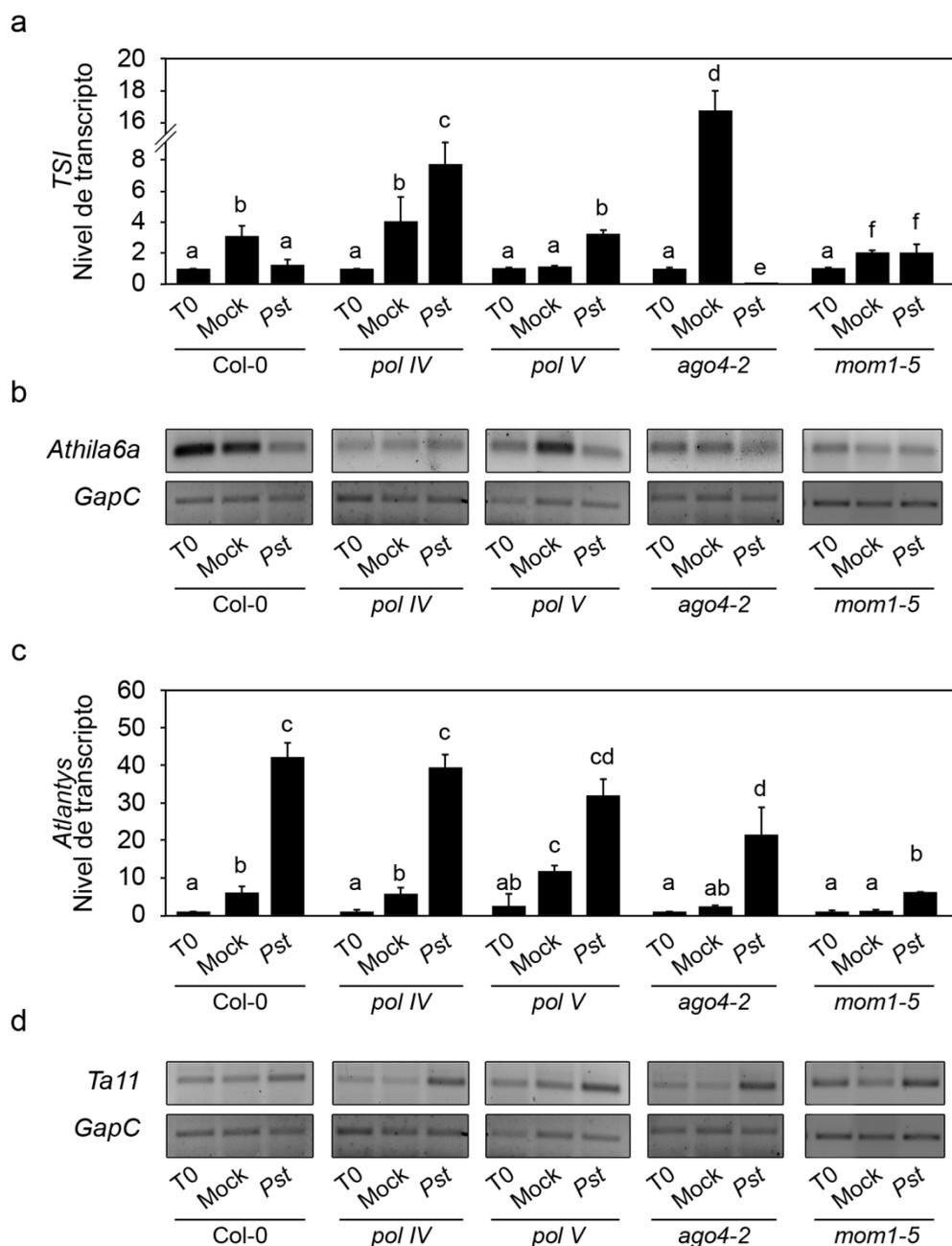


Figura 19: Niveles de transcritpos de TEs centroméricos (a,b) y no centroméricos (c,d) en plantas salvajes y mutantes de la maquinaria de silenciamiento génico. Se utilizó RT-qPCR (a,c) o RT-sqPCR (b,d) para analizar a *TSI* (a), *Athila6a* (b) *Atlantys* (c) y *TA11* (d) en plantas salvajes (Col-0), y mutantes *pol IV*, *pol V*, *ago4-2* y *mom1-5*. Los muestras fueron tomadas a partir de hojas no tratadas (T0), y tratadas durante 24 horas con el vehículo (Mock, $MgCl_2$ 10mM) o *Pst* (10^7 ufc ml^{-1}). En (a) y (c) los valores fueron obtenidos a través del método de $2^{-\Delta\Delta ct}$ y representan la media de tres réplicas técnicas \pm el desvío estándar. Los análisis estadísticos fueron realizados como en la Figura 13 ($p < 0,05$). Los genes de expresión constitutiva *UBQ5* y *GapC* fueron usados como referencia en los ensayos de RT-qPCR y RT-sqPCR, respectivamente.

Expresión de componentes de la maquinaria de síntesis de siRNAs en plantas salvajes infectadas con *Pst*

Yu y colaboradores (2013) describieron que plantas salvajes tratadas con el elicitor flg22 inducen la expresión de TEs (principalmente no centroméricos) mientras reducen la de *AGO4*, *AGO6*, *IDN2* y la de sub-unidades de *Pol IV* y *Pol V*.

A partir de estas evidencias, estudiamos si la disminución de transcritos de TEs centroméricos que es inducida por *Pst* en estas plantas se correlaciona con un incremento en los transcritos de esta maquinaria, lo que podría sugerir una potenciación en el silenciamiento de los TEs. Para ello, cuantificamos los transcritos de *AGO4*, *AGO6* y de las subunidades menores de *Pol IV* (*NRPD7*) y *Pol V* (*NRPE7*) por RT-sqPCR en plantas no tratadas (T0), o tratadas durante 24 horas con el vehículo (Mock) o *Pst* (1×10^7 ufc ml⁻¹).

Los transcritos de *NRPE7* (*Pol V*) aumentaron levemente frente a la infección y curiosamente, los de *AGO4* y de *NRPD7* (*Pol IV*) aumentaron en tratamiento con el vehículo pero disminuyeron en respuesta a *Pst* (Figura 20). La inducción de *NRPE7* se correlacionaría con un mayor silenciamiento de las regiones centroméricas, pero los bajos niveles de *AGO4* y *NRPD7* no eran esperados teniendo en cuenta que al menos *Pol IV* es requerida para silenciar a *TS1* y *Athila6a* en esa condición. A su vez, los transcritos de *AGO6*, cuya proteína podría actuar de manera redundante con *AGO4*, mostraron una respuesta similar a la de *NRPD7* y *AGO4*.

Actualmente estas observaciones están siendo corroboradas por ensayos de RT-qPCR, los resultados sugieren que la infección con *Pst* solo induce la expresión de algunos componentes involucrados en el silenciamiento de los TE centroméricos.

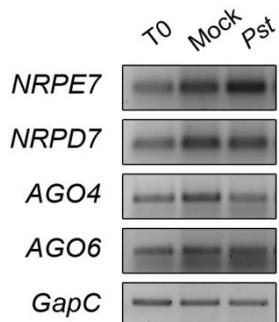


Figura 20: Expresión de componentes de la maquinaria biosintética de siRNAs en plantas salvajes infectadas. Niveles de transcritos de *NRPE7* (subunidad menor del complejo Pol V), *NRPD7* (subunidad menor del complejo Pol IV), *AGO4* y *AGO6* analizados por ensayos de RT-sqPCR. Las muestras fueron obtenidas de plantas salvajes no tratadas (T0), y tratadas durante 24 horas con el vehículo (Mock, MgCl₂ 10mM) o *Pst* (10⁷ ufc ml⁻¹). El gen de expresión constitutiva *GapC* fue utilizado como referencia.

Abundancia de smRNAs en plantas salvajes infectadas

Los smRNAs que dirigen el silenciamiento de genes o transcriptos por complementariedad de bases (Slotkin y Martienssen, 2007; Pikaard et al., 2012; Chekanova et al., 2015), son generados por rutas biosintéticas que involucran a componentes particulares en cada etapa de este proceso. La especificidad en la actividad de cada componente resulta en la generación de smRNAs que varían en su longitud y/o naturaleza de su extremo 5' (Bologna y Voinnet, 2014) (Figura 2). Mediante ensayos de secuenciación masiva de smRNAs (sRNA-seq) se puede determinar la abundancia de distintos smRNAs y discriminar la ruta biosintética que los originó y el posible mecanismo de silenciamiento involucrado (TGS o PTGS).

Nuestros resultados sugerían que la reducción de transcriptos de TEs centroméricos que ocurre en plantas tratadas con *Pst* podría derivar de la activación de la maquinaria de silenciamiento génico. Dado que los TEs centroméricos son basalmente reprimidos por siRNAs de 24nt que poseen una A en su extremo 5', analizamos la abundancia de este tipo de smRNAs homólogos a estas regiones, en la infección con *Pst*. Como control evaluamos en la misma condición, los smRNAs de 24 nt y 21 nt homólogos a todas las posiciones del genoma.

Para este análisis, utilizamos datos de sRNA-seq de plantas salvajes tratadas con vehículo ($MgCl_2$ 10mM) o *Pst* (14 horas post infección) publicados por otros autores, quienes identificaron miRNAs (smRNAs de 21nt) que regulan las vías de señalización de las defensas contra ese patógeno (Zhang et al., 2011). En estos estudios trabajamos en colaboración con el Dr Sebastián Asurmendi (Instituto de Biotecnología de INTA Castelar).

En primer lugar filtramos los smRNAs seleccionando aquellos con número de lecturas igual o mayor que 3. Posteriormente normalizamos los datos para obtener valores relativos de lecturas por millón (RPM). Luego identificamos las posibles secuencias blanco por homología de secuencia y analizamos los cambios de abundancia en las plantas tratadas con el patógeno respecto al control (Mock). Finalmente, generamos histogramas que representan las RPM de los smRNAs de 24 y 21 nt homólogos a las distintas posiciones de cada uno de los cinco cromosomas de *Arabidopsis*, tanto para plantas tratadas con *Pst* como con el vehículo.

Observamos que la infección de plantas salvajes produce un aumento en los valores de RPM de smRNAs de 24 nt principalmente en las regiones centroméricas de los 5 cromosomas. Esto se debe a que en las muestras infectadas incrementan las

lecturas de los smRNAs detectados y aparecen nuevos smRNAs (Figura 21a). Por otra parte, el tratamiento con el patógeno no produce cambios semejantes sobre los smRNAs de 21 nt (Figura 21b).

Esta acumulación de siRNAs homólogos a secuencias centroméricas que ocurre en plantas salvajes infectadas, es consistente con la disminución de transcritos centroméricos ya descrita (Figura 18) y el requerimiento de componentes de la maquinaria de silenciamiento para reprimir a *TS1* y *Athila6a* en infección (Figura 19). Además esta respuesta sugiere que en esta condición los TEs centroméricos son controlados a través de siRNAs de 24 nt.

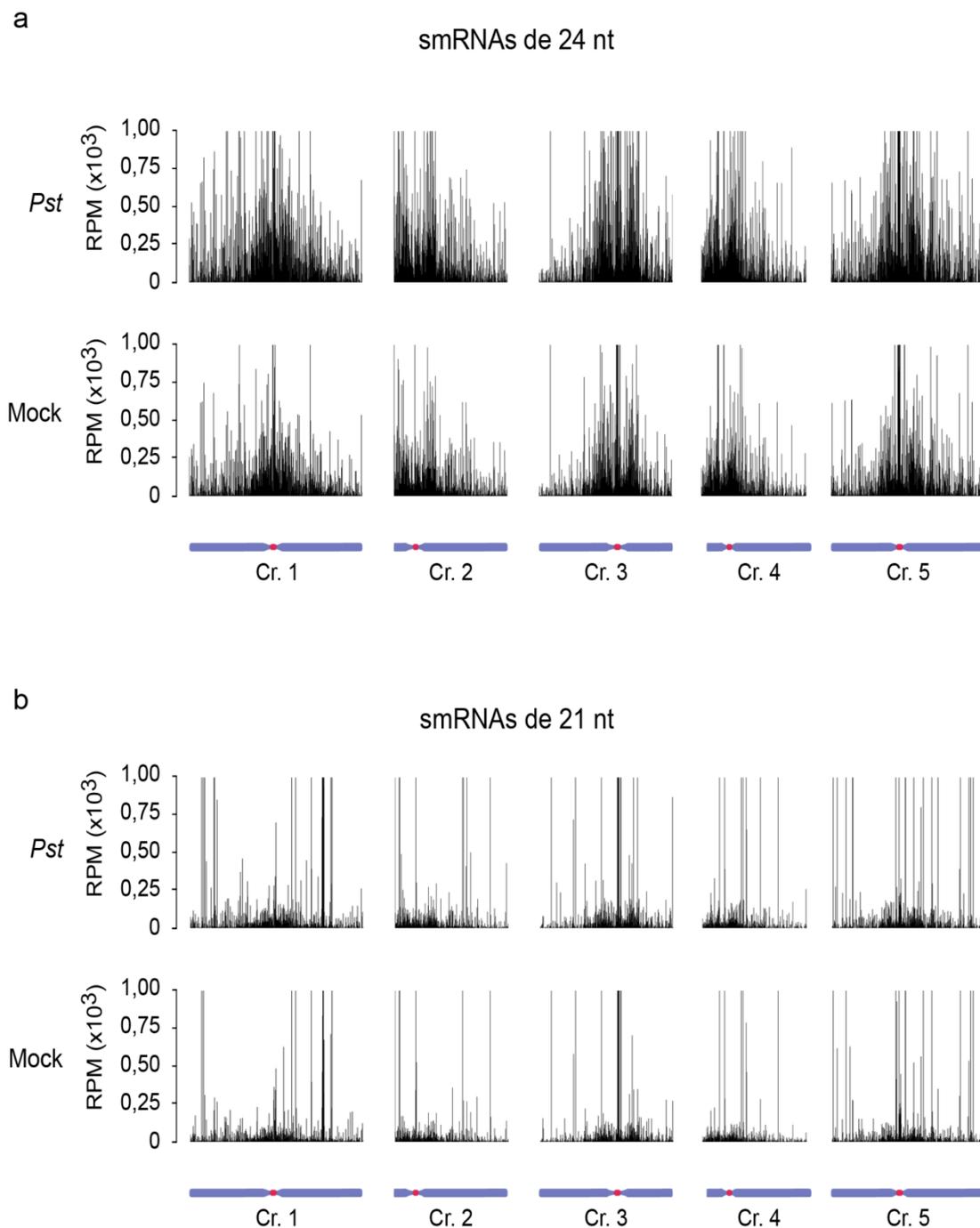


Figura 21: Abundancia de siRNAs de 24 y 21 nt en plantas infectadas con *Pst*. Histogramas de lecturas por millón (RPM) en ventanas de 50 Kb de siRNAs de 24 nt (a) y 21 nt (b) en cada posición del los 5 cromosomas. En la parte inferior y superior de (a) y (b) se muestran datos obtenidos a partir de plantas tratadas durante 14 horas con el vehículo (Mock, MgCl₂ 10mM) o *Pst*, respectivamente (Zhang et al., 2011). Debajo de los histogramas, se encuentran esquematizados los cromosomas 1 a 5, marcando el centrómero con un punto rojo.

Niveles de smRNAs homólogos a genes *R* en plantas salvajes infectadas

La maquinaria de silenciamiento dependiente de Pol IV y Pol V que regula la expresión de TEs centroméricos en infección, es la misma que regula la deposición de marcas epigenéticas sobre TEs que están localizados en las regiones regulatorias de algunos genes *R* (Yi y Richards, 2007; Downen et al., 2012; Wang et al., 2013a; Le et al., 2015; Yang et al., 2014; Tsuchiya y Eulgem, 2013; Weiberg et al., 2014). Sin embargo, sólo los TEs centroméricos se reprimirían por esta maquinaria en la infección con *Pst*. Por ello, es poco factible que estos TEs afecten genes *R* cercanos, porque estos genes no se localizan mayoritariamente en los centrómeros. Alternativamente, los TEs centroméricos podrían modular la expresión de los genes *R* por un proceso “en *trans*” que afecte el funcionamiento o direccionamiento de la maquinaria de silenciamiento.

Para abordar esta hipótesis, realizamos una búsqueda de genes *R* que eventualmente puedan ser regulados (en *trans*) a través de la misma maquinaria de silenciamiento que controla a los TEs centroméricos. Con este fin, analizamos si existen genes *R* cuyas regiones regulatorias sean homólogas a smRNAs (en adelante R-smRNAs), es decir, puedan actuar como blanco de smRNAs que sufren cambios en su abundancia en plantas salvajes infectadas. Para estos estudios *in silico*, utilizamos los datos de un estudio de sRNA-seq previamente descrito (Zhang et al., 2011).

En primer lugar, identificamos a los smRNAs inducidos y/o la aparición de nuevos smRNAs en plantas infectadas. Posteriormente, seleccionamos a los R-smRNAs por ser homólogos a las secuencias de los ORF y a las secuencias localizadas 2000 pb aguas arriba del ORF (región promotora) de genes *R*. Finalmente, cuantificamos los R-smRNAs y los catalogamos de acuerdo a su longitud y a la base que poseen en su extremo 5´.

Detectamos un incremento general de los R-smRNAs, que fue más notorio para los de 21 y 24nt que poseen A en su extremo 5´ (Figura 22). Entre estos, los R-smRNAs de 24 nt aumentaron tanto la cantidad (Figura 22a), como las RPM (Figura 22b). A su vez, y en menor grado, hubo un aumento de R-smRNAs de 21 y 24 nt con C, G o U en su extremo 5´ (Figura 22). Por otro lado, la cantidad y RPM de R-smRNAs reprimidos fue despreciable (no mostrado).

Se estima que los smRNAs de 24 nt iniciados en A serían procesados por la maquinaria dependiente de Pol IV, Pol V, AGO4 y AGO6, sugiriendo que son de la clase de siRNAs que operan principalmente a través del TGS (Bologna y Voinnet,

2014). En general, cuando los genes blanco de esta maquinaria son reprimidos, los smRNAs que ejercen este efecto están aumentados. Por esto, la acumulación de R-smRNAs en tejidos infectados fue inesperada, dado que muchos genes *R* están inducidos en esta condición. Una posible explicación a este resultado sería que en plantas infectadas, los R-smRNAs no estén operando o dirigiendo el TGS sobre los genes *R* sino sobre otras secuencias blanco con las cuales también tienen homología.

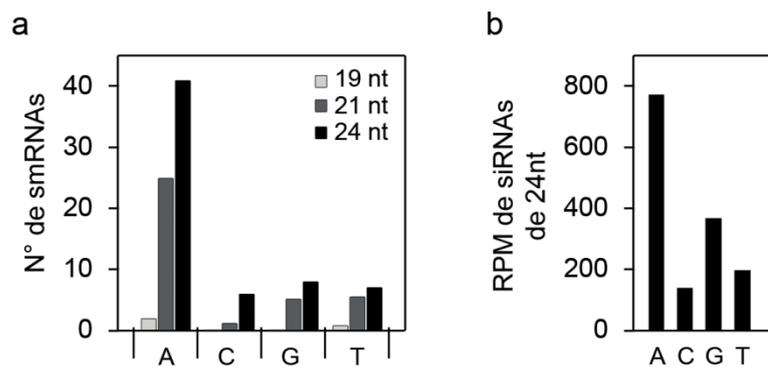


Figura 22: Abundancia de smRNAs homologos a genes *R* (R-smRNAs). (a) Cantidad de R-smRNAs (homologos a ORF y 2000 pb aguas arriba de genes *R*) inducidos en plantas salvajes infectadas con *Pst* (2×10^5 ufc ml^{-1}) relativizado al tratamiento con el vehiculo (MgCl_2 10mM). Los valores obtenidos fueron discriminados segun el tipo de smRNA: 19 a 24 nt y la presencia de distintas bases en sus extremos 5'. (b) Lecturas por millon (RPM) alcanzadas por R-smRNAs de 24 nt.

Otras secuencias homólogas a los R-smRNAs que son inducidos en infección

Los R-smRNAs que aumentan en plantas salvajes infectadas podrían ser homólogos a TEs. A su vez, estos TEs podrían estar localizados en la proximidad de los genes *R* (ORF y 2000pb aguas arriba), o en otras regiones del genoma. De esta manera, los R-smRNAs podrían tener como blanco a TEs de regiones regulatorias de los genes *R*, u otros TEs. El segundo grupo podría incluso contener a los TEs centroméricos y/o de regiones repetitivas, lo que significa que podrían estar presentes en abundantes *loci* genómicos. Eventualmente, los R-smRNAs podrían ser “re-direccionados o secuestrados” por TEs distantes de genes *R*, evitando el silenciamiento de los genes de defensa (efecto en “*trans*”) (ver Introducción, Franco-Zorrilla et al., 2007; Todesco et al., 2010; Ivashuta et al., 2011; Rubio-Somoza et al., 2011; Banks et al., 2012). Para analizar si los R-smRNAs son homólogos a TEs localizados en la región regulatoria o promotora de genes *R* (TEs próximos) o en otras posiciones del genoma (TEs distantes), se evaluó *in silico* la homología de los R-smRNAs inducidos en infección con los TEs de Arabidopsis. Posteriormente, se localizó a los TEs en el genoma para identificar si estos se encuentran próximos o distantes a genes *R*.

Los R-smRNAs se clasificaron en 3 grupos de acuerdo a su homología con: (i) TEs próximos y distantes (47% de los R-smRNAs); (ii) TEs próximos (18%); (iii) secuencias no anotadas localizados dentro de los genes *R* (37%) (Figura 23a). Al analizar en más detalle al total de los TEs pertenecientes a los dos primeros grupos (TE anotados), observamos que el 91% (206 de 226 TEs) son distantes de genes *R* y pertenecen todos al grupo “i”, mientras que el 9% corresponde a TEs próximos de genes *R* (20 TEs) que pertenecen a los grupos “i” y “ii” (5% y 4% respectivamente) (Figura 23a). Cuando analizamos las lecturas de los R-smRNAs, sorprendentemente encontramos que el 70% corresponde a R-smRNAs clasificados dentro del grupo “i”, mientras que el 30% corresponden a R-smRNAs clasificados en los grupos “ii” y “iii” (Figura 23a).

Esto muestra que en plantas infectadas, la mayor cantidad de lecturas corresponde a R-smRNAs que tienen homología a TEs tanto próximos como distantes de genes *R* (grupo “i”) y que los R-smRNAs con mayor cantidad de lecturas pertenecen al grupo “i”, que incluye mayormente TEs distantes a genes *R* (no mostrado).

Para evaluar si los TEs distantes de los genes *R* que son homólogos a R-smRNAs (grupo “i”) podrían secuestrar a estos smRNAs impidiendo su efecto regulatorio sobre los genes *R*, analizamos para cada gen *R* del grupo “i” la cantidad de posiciones homólogas a sus R-smRNAs que son distantes en el genoma y pertenecen a TEs, considerando que esos *loci* serían los secuestrantes de los R-smRNAs.

Observamos que la mayoría de los genes *R* del grupo “i”, presenta R-smRNAs homólogos a 5-20 *loci* de TEs distantes distribuidos en el genoma. Dentro de este grupo, *AT4G33300* (*ADR1-L1*), *AT1G09970* (*RLK7*) y *AT1G33560* (*ADR1*), poseen R-smRNAs homólogos a 730, 624 y 13 posiciones del genoma, respectivamente. En total, suman 1443 secuencias blanco (secuencias incluidas en los 206 TEs identificados anteriormente) (Figura 23b). Curiosamente, *RLK7* codifica a un receptor de inmunidad (Hou et al., 2014) y presentaría “priming” en plantas *mom1-1* (Habu et al., 2006). Por otra parte, *ADR1* presenta “priming” en *mom1-1* y *mom1-5* (Figuras 8c, 11e y 12), siendo su sobre-expresión y la de su homólogo *ADR1-L1* suficiente para inducir defensas contra *Pst* incluso en ausencia de un ligando (Grant et al., 2003; Collier et al., 2011; Bonardi et al., 2011). Estos datos sugieren que *RLK7*, *ADR1-L1* y *ADR1* son genes candidatos a ser regulados por smRNAs en plantas sanas, y sujetos a la distracción de la maquinaria de silenciamiento mediada por TEs distantes en plantas infectadas. Por ello, al menos estos tres genes podrían ser utilizados en futuros estudios para evaluar la potencial distracción de la maquinaria de silenciamiento en la infección con *Pst*.

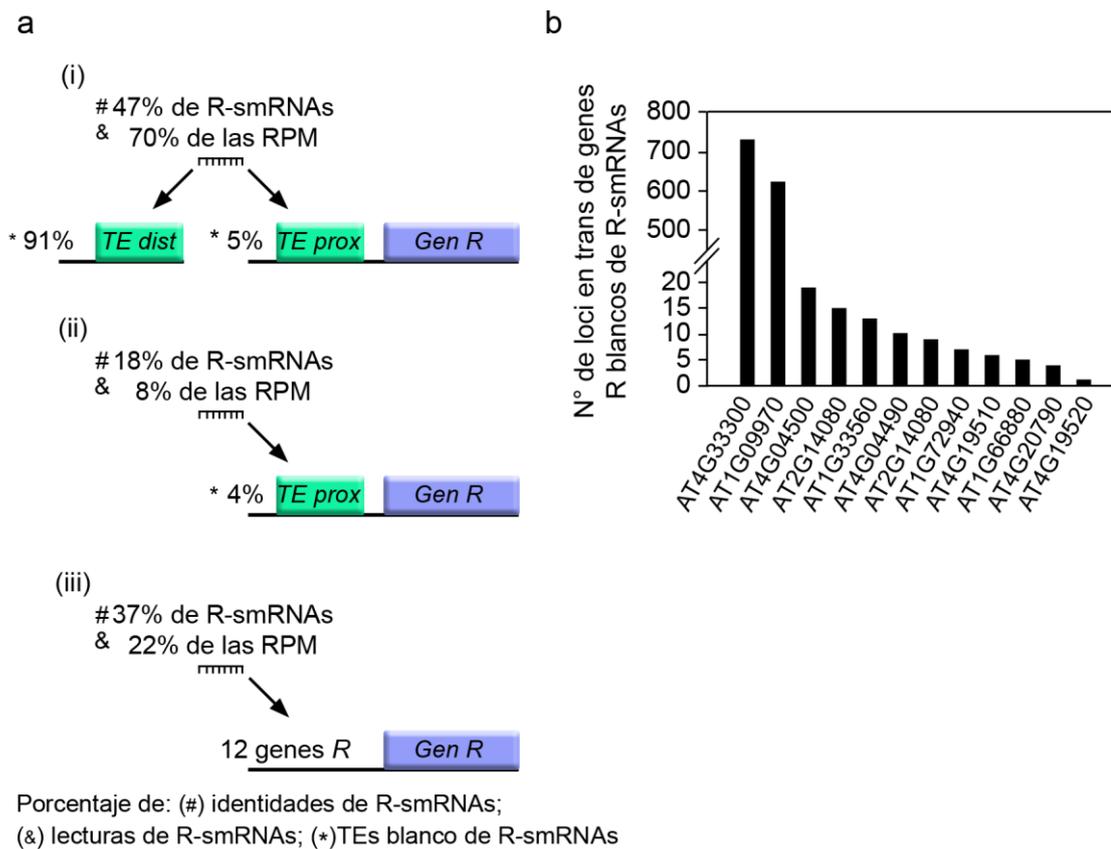


Figura 23: Secuencias homólogas a R-smRNAs. (a) Grupos de genes *R* (i, ii y iii) clasificados de acuerdo a las secuencias homólogas de R-smRNAs en el genoma. TE dist: TEs distantes, TE prox: TEs próximos. En la parte superior de cada modelo se detallan los porcentajes (#) y número de lecturas (&) de los R-smRNAs para cada grupo. Se muestran también los porcentajes de TEs próximos y distantes (*) homólogos a los R-smRNAs. (b) Número de *loci* distantes homólogos a los R-smRNAs de cada gen *R* indicado en el eje x.

Expresión de *RLK7*, *ADR1-L1* y *ADR1* en plantas salvajes infectadas y mutantes de RdDM no tratadas

Nuestros resultados sugieren que por homología de secuencia un grupo de smRNAs tendría como blanco tanto a secuencias regulatorias de genes *R*, como a TEs distantes. En este caso, esos genes *R* deberían ser blanco de la maquinaria de silenciamiento. Otros autores estudiaron el fenómeno de distracción del silenciamiento por secuestro de smRNAs demostrando que los genes afectados, no logran ser silenciados aún cuando sus smRNAs homólogos aumentan (Franco-Zorrilla et al., 2007; Todesco et al., 2010; Ivashuta et al., 2011; Rubio-Somoza et al., 2011; Banks et al., 2012). Teniendo en cuenta estos antecedentes, evaluamos si genes *R* del grupo “i” están basalmente regulados por la maquinaria de silenciamiento, y si en infección incrementan sus transcritos aún cuando simultáneamente aumentan sus R-smRNAs.

En el primer estudio (RT-PCR) cuantificamos los transcritos de *RLK7*, *ADR1-L1* y *ADR1* en plantas salvajes y mutantes *pol IV* y *pol V* no infectadas, y en el segundo (RT-qPCR), los transcritos de estos tres genes en plantas salvajes no tratadas (T0), y tratadas durante 24 horas con vehículo (Mock, MgCl₂ 10mM) o *Pst* (1x10⁷ ufc ml⁻¹).

Detectamos leves aumentos de transcritos de los 3 genes *R* en las mutantes de la maquinaria de silenciamiento, incluyendo al de *ADR1-L1* y *ADR1* en la mutante *pol V* (Figura 24a) y al de *RLK7* en la mutante *pol IV* (Figura 24b). Cuando se analizó la abundancia de transcritos de estos genes en plantas salvajes infectadas, sorprendentemente todos fueron notoriamente inducidos por el patógeno (Figura 24c, d y e). Por el contrario, el gen *RPS5* del grupo “iii” cuyos R-smRNAs no poseen blancos en otras regiones del genoma, no acumuló transcritos en infección (Figura 24f).

Estos resultados son consistentes con que genes *R* que poseen R-smRNAs homólogos a TEs (próximos y distantes) sean basalmente regulados por componentes de la maquinaria de silenciamiento génico, y en infección su regulación por RdDM se pierde aún cuando coexista con incrementos de smRNAs homólogos a sus regiones regulatorias. Este último fenómeno podría deberse al re-direccionamiento de los R-smRNAs para el silenciamiento de los TEs homólogos que son mucho más abundantes.

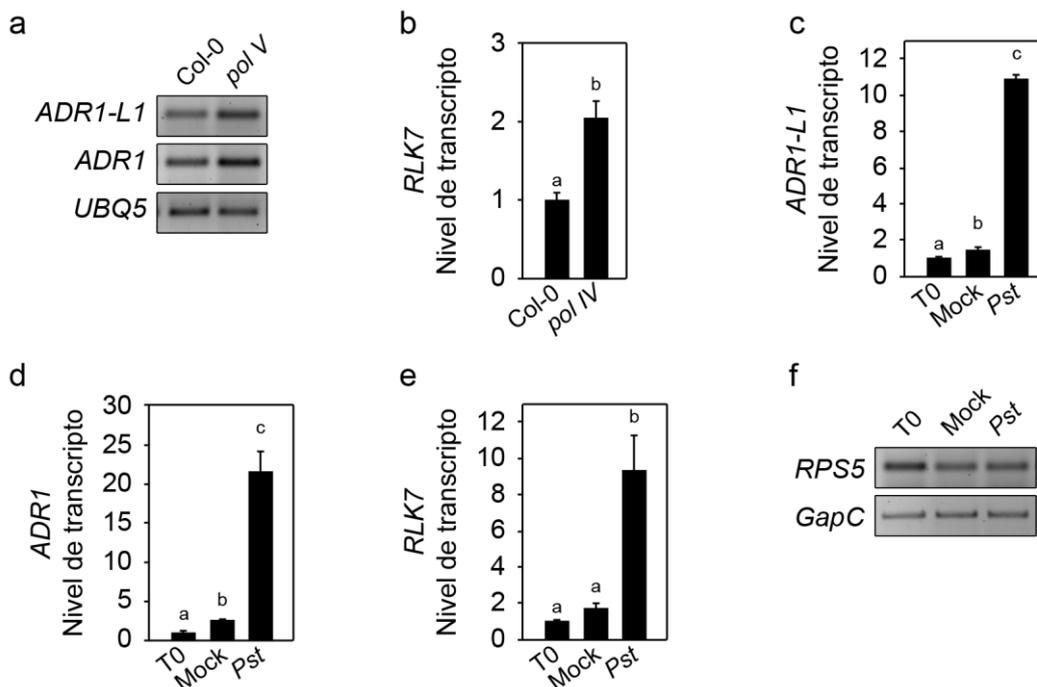


Figura 24: Abundancia de transcritos de genes *R* que poseen R-smRNAs homólogos a TEs próximos y distantes. Nivel de transcritos de *ADR1-L1* y *ADR1* (a) cuantificados por ensayos de RT-sqPCR y de *RLK7* (b) por ensayos de RT-qPCR. Las muestras fueron tomadas a partir de plantas salvajes y mutantes *pol V* (a) y *pol IV* (b) no tratadas. Expresión de *ADR1-L1* (c), *ADR1* (d) y *RLK7* (e) por ensayos de RT-qPCR y de *RPS5* (f) por ensayos de RT-sqPCR en plantas salvajes no tratadas (T0) y tratadas durante 24 horas con vehículo (Mock, MgCl₂ 10mM) o *Pst* (10⁷ ufc ml⁻¹) (c-f). Los valores de los ensayos de RT-qPCR fueron obtenidos por el método de $2^{-\Delta\Delta ct}$ y representan la media de tres réplicas técnicas \pm el desvío estándar. El análisis estadístico fue realizado como en la Figura 13 ($p < 0,05$). Los genes de expresión constitutiva *UBQ5* y *GapC* fueron usados como referencia en RT-qPCR y RT-sqPCR respectivamente.

Discusión y conclusión

La cromatina centromérica está enriquecida en TEs y unidades repetitivas de DNA que adquieren una estructura compacta o heterocromática. Estas secuencias son silenciadas transcripcional y post-transcripcionalmente por mecanismos convergentes (Wang et al., 2015a). Los remodeladores de la cromatina facilitan el acceso de las DNA metil-transferasas (DMTs) y la 5mC depositada recluta a enzimas que catalizan la metilación de histonas. A su vez, esta última marca genera una plataforma de unión de componentes del RdDM produciendo una retroalimentación en el silenciamiento (Soppe et al., 2002; Wierzbicki et al., 2009; Pikaard et al., 2012; Johnson et al., 2014). Conociendo que plantas infectadas con *Pst* decondensan sus CCs y demetilan el DNA correspondiente a TEs y repeticiones centroméricas (Pavet et al., 2006), el primer objetivo de esta Tesis fue estudiar si proteínas que desempeñan las funciones descritas participan en la decondensación de CCs activada por *Pst* y afectan la resistencia a este patógeno.

Resistencia a *Pst* de mutantes de cromatina

En primer lugar, evaluamos si la decondensación de CCs inducida por *Pst* requiere de proteínas que contribuyen a mantener la estructura heterocromática del centrómero. Observamos que las mutantes en DDM1, VIM1, MOM1, SUVH4, SUVH5 y SUVH6 fueron capaces de decondensar los CCs de manera similar a la planta salvaje. Esto sugiere que estas proteínas son dispensables para decondensar masivamente los CCs a las 24 hpi con *Pst*. Sin embargo, estas mutantes podrían manifestar diferencias cinéticas en la decondensación (ser más rápidas) que no hayan sido detectadas con nuestro método de estudio (tinción de núcleos con yoduro de propidio). Este aspecto podría evaluarse a partir de ensayos de FISH que permitan analizar secuencias centroméricas particulares. Estos datos serían relevantes teniendo en cuenta que la disposición dentro del núcleo de las secuencias centroméricas (en la periferia o centro del núcleo, próxima o no al nucléolo) podría estar asociada a la actividad transcripcional de las mismas, y eventualmente a efectos regulatorios sobre secuencias localizadas en otros dominios del genoma (Fang y Spector, 2005; Goetze et al., 2007; Rosin et al., 2008; Moissiard et al., 2012). Además, este estudio permitiría

detectar la relajación de cromatina en secuencias particulares y posicionar temporalmente la relajación de las distintas repeticiones.

Diferencias estructurales en los CCs podrían haber sido observadas en plantas mutantes y salvajes infectadas dado que estas mutantes alteran la estructura basal de la cromatina. *ddm1-1* presenta decondensación basal de los CCs, mientras que *vim1-2* muestra una restructuración de secuencias centroméricas que es solo evidente por ensayos de FISH (Woo et al., 2007). Por otra parte, la doble mutante *mom1-2/ddm1-5* muestra cambios en la estructura de los CCs respecto a las simples mutantes (Mittelsten Scheid et al., 2002). Dado que MOM1 y DDM1 regulan la deposición de marcas epigenéticas represoras y la expresión génica a través de distintos mecanismos, ambas proteínas podrían tener funciones complementarias en el mantenimiento de los CCs (Mittelsten Scheid et al., 2002).

Existen pocos trabajos que estudien cambios estructurales de los CCs ante condiciones de estrés en mutantes de cromatina. De las mutantes aquí evaluadas solo *ddm1* (remodelación de cromatina), *suvh4* y *mom1* (metilación de histonas) fueron estudiadas en relación a otros estreses. *ddm1* y *suvh4* no muestran anomalías en la decondensación de CCs inducida por el estrés de generar protoplastos (Florentin et al., 2013). *mom1-2* no tiene efectos aditivos ni sinérgicos sobre la decondensación de CCs observada en plantas salvajes sometidas a estrés por calor (Wang et al., 2015b). Por esto, el comportamiento de los CCs de los tejidos infectados de estas mutantes es consistente con el descrito en otros estreses. Otras mutantes no descritas en esta Tesis también fueron estudiadas en este aspecto. La mutante *caf1* (“*chromatin assembly factor 1*”) no re-condensa los CCs luego de ser liberada del estrés por calor. A su vez, *det1* y *cop1* (“*de-etiolated 1*” y “*constitutive photomorphogenic 1*”, respectivamente) no inducen la condensación de CCs en cotiledones en desarrollo (Bourbousse et al., 2015). En conjunto, estas evidencias sugieren que los fenómenos de restructuración de los CCs en condiciones de estrés dependerían de mecanismos convergentes mediados por remodeladores de la cromatina.

Las mutantes analizadas poseen expresión basal de TEs y repeticiones centroméricas. Al estudiar su resistencia, observamos que son más resistentes a *Pst* (mutantes en metilación del DNA, estructura de los CCs o metilación de histonas). Esto incluye a las mutantes que tienen fallas en el proceso de RdDM que silencia la heterocromatina y eucromatina tales como *rdr2*, *rdr6*, *dcl2*, *dcl3*, *dcl4*, *pol IV*, *pol V* que son más resistentes a *Pst* (Downen et al., 2012; Lopez et al., 2011). Como se mencionó, las mutantes de DMTs analizadas en el primer capítulo (triple mutante de

DRM1, *DRM2* y *CMT3*) y *met1-3* también son más resistentes a *Pst* (Downen et al., 2012; Yu et al., 2013). Sin embargo, es importante destacar que algunas de estas mutaciones causan deficiencias en la metilación no solo en secuencias centroméricas, sino también no centroméricas, incluidas secuencias codificantes. Es decir, la resistencia a *Pst* de estas mutantes podría estar asociada a la regulación directa de los genes de defensa, como así también a su efecto indirecto sobre estos genes involucrando algún otro mecanismo.

Las mutantes *ddm1-1* y *vim1-2*, que muestran decondensación basal de CCs y/o reorganización de las secuencias allí contenidas, fueron más resistentes a *Pst*. Estas mutantes tendrían como blanco genómico principalmente a regiones centroméricas. Curiosamente, plantas hijas de la mutante *ddm1* manifiestan una ganancia de función del gen *R SNC1* dada por la adquisición del epialelo *bal* luego de varias generaciones (Stokes et al., 2002; Yi y Richards, 2009). La planta *bal* presenta expresión constitutiva de las defensas y al igual que otras plantas con este fenotipo, es enana. Esta mutante posee una duplicación del gen *SNC1* y otros genes de defensa localizados en el "cluster" de genes de defensa *RPP5*, que sería la responsable de los fenotipos de *bal* ya que la generación de una planta hemicingota restaura la condición salvaje (Yi y Richards, 2007; Yi y Richards, 2009). Es decir, los fenotipos de esta mutante también podrían resultar de un efecto directo y específico de la ausencia de DDM1 sobre los genes de defensa del "cluster" *RPP5*.

Finalmente, en las mutantes que afectan la metilación de histonas (triple mutante *suvh4/5/6* y *mom1-5*), observamos fenotipos similares a los anteriores. La planta *suvh4/5/6* tiene disminución de H3K9me2 tanto en TEs como en genes codificantes. Otros autores han descripto que un ejemplo de estos últimos es el gen *R RPP7* el cual afecta a su splicing alternativo en la mutante generando un transcrito no codificante (Ebbs y Bender, 2006; Tsuchiya y Eulgem, 2013). A diferencia de las mutantes mencionadas, *mom1-5* que reduce la metilación de H3K9 pero no la metilación del DNA, e induce a un grupo de TEs centroméricos (Habu et al., 2006; Vaillant et al., 2006; Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al., 2010), no parece tener un efecto directo sobre los genes de defensa. La resistencia a patógenos y activación de genes de defensa no había sido analizada de esta mutante. Nuestros resultados sugieren que al menos en *mom1-5*, la resistencia a *Pst* podría ser consecuencia de alteraciones derivadas de cambios estructurales y expresión de los blancos centroméricos de MOM1.

Las mutantes que estudiamos fueron seleccionadas en base a su capacidad de mantener la heterocromatina centromérica silenciada. La resistencia de estas mutantes podría deberse tanto a un efecto sobre un mismo conjunto de genes de defensa, como a mecanismos regulatorios que no afecten necesariamente a los mismos genes, lo que indicaría un mecanismo independiente de genes específicos. Para distinguir entre estas posibilidades, analizamos transcriptomas publicados por otros autores de mutantes *ddm1-2*, *drm1/2*, *mom1-2*, *met1-3*, *cmt3-11*, *pol V* y *suvh4/5/6* (Stroud et al., 2012; Zhu et al., 2013) y no detectamos inducción o represión de rutas génicas de defensa comunes que pudieran explicar el fenotipo de resistencia. Es decir, si la resistencia de las mutantes es debida a la activación de genes comunes, este fenómeno no sería constitutivo. Por esto sugerimos que estas mutantes podrían utilizar mecanismos similares para activar las defensas contra *Pst* sin afectar necesariamente a los mismos genes. Estos mecanismos podrían responder indirectamente a los cambios estructurales y/o transcripcionales de la cromatina centromérica que ocurren en todas estas mutantes.

En los estudios de transcriptoma evaluamos particularmente a los genes de defensa que manifiestan una regulación epigenética directa. Esto incluye la deposición de marcas 5mC, H3K9me2, H3K4 y K9 Ac, o H3K4me2/me3 mediados por DMTs, remodeladores de cromatina (MET1, DDM1), histona metil-transferasas (SDG8, ATX1; SUVH4/5/6, RSI1) y factores de elongación (ELP2). Estos componentes tendrían efectos directos y/o indirectos sobre la regulación transcripcional de genes de defensa tales como *RMG1*, *WRKY70*, *Laz5*, *RPP7*, *SNC1*, *WRKY6*, *WRKY29*, *WRKY53*, *NPR1*, *PR1*, *EDS5* y *PAD4* (Yu et al., 2013; Alvarez-Venegas., et al., 2007; Tsuchiya y Eulgem, 2013; Yi y Richards, 2009; Jaskiewicz et al., 2011; Singh et al., 2014). Nuestros resultados y los hallazgos de otros autores sugieren que la resistencia de las mutantes analizadas no se explica, al menos en todos los genotipos, por la activación de los genes previamente mencionados. Por esto, evaluamos de qué otra manera la relajación de la cromatina centromérica podría afectar a la inducción de defensas.

Defensas de las mutantes *mom1*

Fenómeno de “priming”

Habiendo detectado el fenotipo de resistencia a *Pst* en siete mutantes que alteran de diferente manera a la cromatina del centrómero y no señalizan la defensa por una única vía, nos centramos en el estudio de una de esas mutantes para evaluar en ella las bases de su inmunidad. La mutante seleccionada fue *mom1-5* que manifiesta “priming” sin activar constitutivamente a los genes de defensa. Como se explica posteriormente, esto permite estudiar el proceso de inducción de defensas y los cambios genéticos y epigenéticos que lo acompañan.

A pesar de los amplios conocimientos existentes sobre la bioquímica y genética del “priming”, hasta el momento se conocen pocas mutantes que presentan este fenotipo. El “priming” es una condición que prepara a la planta para reaccionar más rápida e intensamente ante un estímulo estresante. De acuerdo al agente estresor o incluso al organismo, este fenómeno ha sido designado con diferentes nombres tales como adaptación, aclimatación, resistencia adquirida, entre otros (Hilker et al., 2015). El “priming” para la respuesta al ataque de patógenos puede ser adquirido por pre-activación de PTI/ETI, o incluso por estreses abióticos (Dempsey y Klessig, 2012; Shah y Zeier, 2013; Singh et al., 2014). Recientemente, se han detectado modificaciones de marcas epigenéticas en genes marcadores del “priming”, que incluyen la adquisición de variantes de histonas, la metilación y la acetilación de histonas en regiones promotoras (Singh et al., 2014; March-Díaz et al., 2008; Jaskiewicz et al., 2011; Luna et al., 2012). El estudio de este fenómeno en mutantes de MOM1 permitiría avanzar en el conocimiento de reguladores epigenéticos que contribuyen a su establecimiento.

Por el contrario, numerosas mutantes muestran activación constitutiva de defensas. Algunas de ellas son inviables y otras tienen un alto costo de “fitness” (van Hulten et al., 2006). Entre ellas se encuentran las mutantes *Isd* (“*lesion-simulating disease*”), *acd* (“*accelerated cell death*”), *ssi* (“*suppressor of SA insensitivity 1*”), *cpr* (“*constitutive expressor of PR genes*”) y la variante *bal* en *ddm1* (Dietrich et al., 1994; Greenberg et al., 1993; Greenberg et al., 1994; Brodersen et al., 2002; Shah et al., 1999; Bowling et al., 1994; Stokes et al., 2002). Solo unas pocas afectan a enzimas involucradas en la deposición de marcas epigenéticas. Este es el caso de DDM1 que regula la metilación del DNA de TEs y su carencia lleva a la aparición del epialelo *bal*

(Yi y Richards, 2007). Por otra parte, la mutante *acd11* posee un fenotipo similar, pero debido a la acción de la HMT SDG8 que activa basalmente al gen *R Laz5* (Brodersen et al., 2002; Palma et al., 2010). Otro ejemplo similar es el efecto pleiotrópico de las mutaciones *pie1* (“*photoperiod-independent early flowering 1*”), *sef*, (“*serrated leaves and early flowering*”) y *hta9/hta11* (“*histone H2A protein 9/11*”, respectivamente), que desregulan la deposición de la variante de histona H2A.Z en promotores de genes de defensa, y los activan constitutivamente induciendo resistencia a *Pst* (March-Díaz et al., 2008). Estos ejemplos involucran mecanismos epigenéticos que afectan directa y constitutivamente a la expresión de genes de defensa. Como se mencionó, se conocen menos mutantes con “priming”, y la mayoría no involucra a remodeladores de cromatina o generadores de marcas epigenéticas. En este grupo se encuentran *edr1* (“*enhanced disease resistance 1*”) que es deficiente en una MAPKK (Frye e Innes, 1998; Frye et al., 2001), y *vtc1* (“*vitamin c defective 1*”) que carece de una GTP manosa pirofosforilasa involucrada en la síntesis de vitamina C (Conklin et al., 1999; Christiansen et al., 2011; Pavet et al., 2005), entre otras. Es llamativo que *vtc1* presenta un fenotipo similar a *mom1-5* en cuanto a la activación de genes *PR* durante el desarrollo de la planta (Pavet et al., 2005), sugiriendo que mutaciones que afecten a distintas funciones celulares podrían llevar a un desbalance en la activación de las defensas en estadios similares.

La única mutante de cromatina que manifiesta “priming” descrita hasta el momento es *nprpd1b11* (sub-unidad mayor de Pol V) (Lopez et al., 2011) y *mom1-5* sería la segunda de este grupo. Curiosamente, MOM1 y Pol V tienen secuencias blanco compartidas a las cuales silencian a través de vías comunes e independientes (Yokthongwattana et al., 2010), por lo que algunos de estos blancos podrían ser los responsables del fenómeno de “priming” en ambas mutantes. Además, otras mutantes de cromatina que son más resistentes a patógenos también podrían manifestar “priming” dado que no manifiestan expresión constitutiva de genes de defensa en transcriptomas (Figura 3; Moissiard et al., 2012).

Activación indirecta de los genes de defensas (en *trans*)

Se desconocía si alguna de las mutantes analizadas en el primer capítulo afecta a los genes de defensa a través de su función en el centrómero. La mutante *mom1-5* es un modelo adecuado para evaluar este aspecto dado que no presenta activación basal de genes de defensa, posee un número reducido de secuencias

blanco (alrededor de 90) y todos ellas son centroméricos. Por ello, evaluamos cómo esta mutación que genera modificaciones centroméricas afecta al resto del genoma.

Las mutantes en Pol IV y Pol V también serían buenas candidatas para estudiar el “priming” en la activación de las defensas mediado por el silenciamiento del centrómero. Existen evidencias que Pol V (y posiblemente Pol IV), al igual que MOM1, regula negativamente el “priming”, y al igual que las proteínas recién mencionadas, no se conoce si esta polimerasa ejerce una acción directa o indirecta sobre los promotores de genes de defensa y su transcripción (Lopez et al., 2011). En el TGS, las secuencias blanco directas de Pol V son regiones repetitivas intergénicas dispersas en el genoma (Lee et al., 2012). De acuerdo a los actuales modelos de silenciamiento génico mediado por siRNAs, los blancos directos de Pol V son también blancos de AGO4 (Zheng et al., 2013, Figura 1). Es interesante que muchos de ellos son TEs intergénicos cuya metilación del DNA está modificada en plantas infectadas con *Pst* (Zheng et al., 2013; Downen et al., 2012). Por ello, estas alteraciones podrían afectar la transcripción de genes adyacentes a estos TEs incluidos genes de defensa, si existieran. Estas evidencias nos permiten sugerir que Pol V-AGO4 podrían tener un efecto directo sobre la represión de un grupo de genes de defensa. Alternativamente, estos componentes podrían afectar indirectamente a estos genes a través de la regulación de algunos TEs centroméricos. Sin embargo sería difícil distinguir entre ambos mecanismos en las mutantes de Pol V dado que las mismas poseen numerosas secuencias blanco. Por el contrario, *mom1* es un modelo más simple para estudiar el efecto en *trans* de los TEs centroméricos. Nuestros resultados indican inequívocamente que los TEs inducidos en la mutante *mom1-2* no están próximos a los genes de defensa. Este análisis incluyó a los TEs que son inducidos por MOM1 y Pol V, sugiriendo que si el RdDM está involucrado en el “priming” de las mutantes *mom1*, este operaría en *trans*. AGO4 y Pol V podrían actuar en conjunto con MOM1 en la represión de los TEs centroméricos, cuya sobre-expresión regularía la activación de genes de defensa.

Las mutantes *mom1* activan basalmente a diversos TEs, en su mayoría de la familia Gypsy (Numa et al., 2010; Yokthongwattana et al., 2010). Sin embargo, no se conocen los blancos directos de esta proteína, ya que no existen ensayos de ChIP con anticuerpos que reconozcan a MOM1. A partir de nuestros resultados, sugerimos que los TEs blanco de MOM1 no afectarían en *cis* a los genes de defensa aún cuando estos TEs no estén inducidos en las mutantes, ya que los genes *R* inducidos en las

mutantes *mom1* no están enriquecidos en TEs de la familia Gypsy, ni en ninguna otra familia de TEs. Analizando en detalle un gen *R* activado en *mom1*, *ADR1*, observamos resultados consistentes con esta posibilidad. Este gen es un buen candidato para evaluar si la activación de un gen *R* por TEs ocurre en *cis* o *trans* porque: (i) manifiesta “priming” en las mutantes *mom1*, (ii) posee un TE de la familia Gypsy (*AtGP8*) en su región promotora; y (iii) muestra metilación basal de H3K9 en el promotor en plantas salvajes (Bernatavichute et al., 2008). Los resultados indican que la falta de MOM1 no afecta constitutivamente el nivel de H3K9me2 en el promotor de *ADR1* (en *cis*). Aún así, MOM1 podría tener un efecto en *cis* actuando junto a algún otro componente que se genere o active tardíamente. Por otra parte, MOM1 podría modular la metilación de H3K9me2 del promotor de *ADR1*, de manera no constitutiva por un mecanismo en *trans*. La disminución de H3K9me2 en los TEs blanco de MOM1 es constitutiva en las mutantes, sugiriendo un efecto en *cis* de MOM1 por sí misma sobre estos blancos (Vaillant et al., 2006; Habu et al., 2006). En contraste, la mutante *mom1-5* no parece tener este tipo de efecto sobre la regulación transcripcional de *ADR1* ya que las marcas de H3K9me2 no están alteradas a nivel basal.

En resumen, nuestros hallazgos mostraron que la falta de MOM1 activa a los genes de defensa, pero no parece resultar de un efecto represor basal de la proteína en sí misma sobre estos genes actuando en forma directa sobre su promotor. Los resultados que avalan esto son; (i) la ausencia de genes de defensa adyacentes a las secuencias blanco de MOM1 (TEs), (ii) la falta de enriquecimiento de transposones Gypsy en las regiones promotoras de genes *R* con “priming” en la mutante, (iii) los niveles normales (como en plantas salvajes) de H3K9me2 en el promotor de *ADR1* de plántulas *mom1-5* (Figura 25).

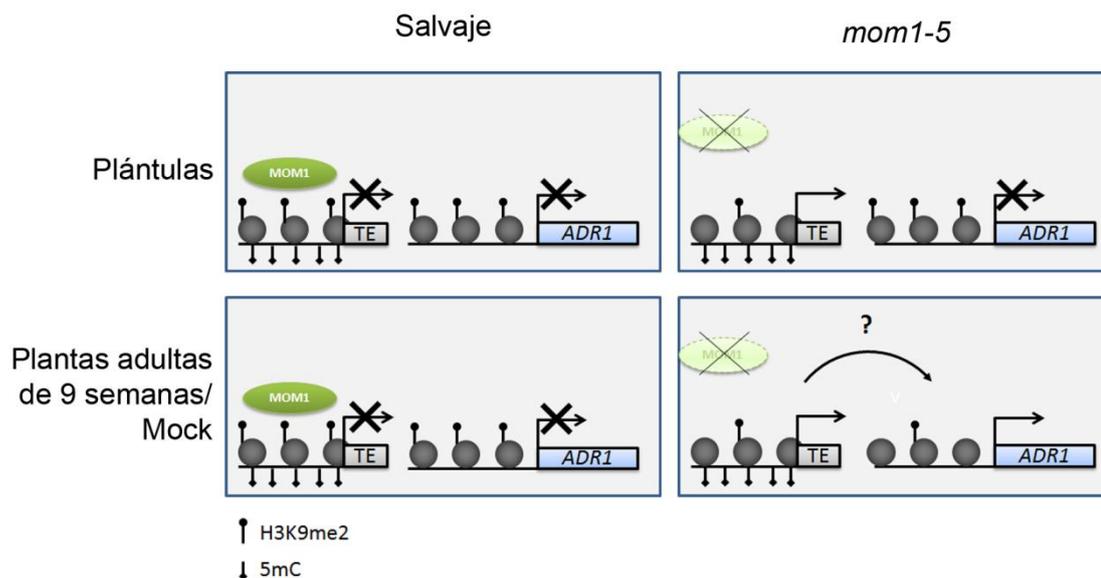


Figura 25: Posible efecto de la mutación *mom1-5* sobre la activación de *ADR1* en ausencia de patógeno. La transcripción de TEs y *ADR1* se reprime en plantas salvajes (paneles izquierdos). Los TEs blanco de MOM1 pierden marcas de H3K9me2 y se activan en la mutante *mom1-5* (paneles derechos). *ADR1* mantiene la represión transcripcional en plántulas *mom1-5* (panel superior derecho), pero la pierde en plantas *mom1-5* adultas (9 semanas) no tratadas o tratadas con vehículo (Mock, MgCl₂ 10mM) (panel inferior derecho). Este fenómeno podría estar asociado a efectos en *trans* mediados por la activación de TEs de MOM1 y posiblemente la maquinaria que involucra el TGS dependiente de smRNAs.

Participación de RdDM en el “priming”

Los dominios CMM2 y NLS de MOM1 presentes en la planta *miniMOM* son suficientes para silenciar a los TE blanco de MOM1 por RdDM, pero no a los TEs blanco de MOM1 que dependen de otro mecanismo (Caikovski et al., 2008; Nishimura et al., 2012). Nuestros resultados indican que estos mismos dominios también restauran los fenotipos de susceptibilidad a *Pst* de la planta salvaje, sugiriendo que el RdDM estaría involucrado en generar los fenotipos de respuesta a patógeno de *mom1*.

Los genes *R* no serían blancos directos de MOM1 pero dependen de su capacidad de participar en el silenciamiento génico. Especulamos que la activación de genes *R* en plantas *mom1* está directamente asociada a la activación masiva de TE que ocurre en esas plantas (Figura 25), quizás por un desplazamiento de la maquinaria de silenciamiento. Este último aspecto será discutido al final de esta sección analizando la participación de RdDM y smRNAs en el silenciamiento de genes *R* en plantas salvajes infectadas. Alternativamente, otros genes que actúen aguas arriba de los genes *R* (factores de transcripción, histona metil-transferasas, otros) podrían ser blanco de este mecanismo en *trans* desencadenado por la falta de MOM1.

Defensas de plantas salvajes

Los resultados hasta aquí discutidos sugieren que los TEs blanco de MOM1 que se activan en las plantas *mom1* podrían modular en *trans* a la activación de genes de defensa. Dado que las plantas salvajes infectadas pierden 5mC en las regiones centroméricas que contienen algunos de estos TEs, es posible que en esta condición estas plantas también sobre-expresen a los TEs centroméricos los cuales podrían afectar la regulación transcripcional de los genes de defensa. En esta sección, discutimos los posibles efectos de la infección con *Pst* sobre la regulación transcripcional de TEs centroméricos, la implicancia del RdDM y su posible efecto regulatorio sobre la activación de genes *R* en plantas salvajes.

Expresión de TEs centroméricos en plantas salvajes infectadas

Observamos que la decondensación de CCs inducida por *Pst* en plantas salvajes está asociada a cambios en la abundancia de transcritos de los TEs centroméricos los cuales disminuyen. Por el contrario, los transcritos de los TEs no centroméricos se acumulan en respuesta al patógeno. Los niveles de transcritos de TEs centroméricos y no centroméricos fueron previamente estudiados en plantas sometidas a estrés abiótico, tales como frío o calor (Hu et al., 2012; Tittel-Elmer et al., 2009; Pecinka et al., 2010; Yu et al., 2013). Pecinka y colaboradores (2010) describieron que plantas salvajes sometidas a altas temperaturas inducen la decondensación de CCs y acumulan transcritos de TEs centroméricos dependientes de MOM1 (*TS1* y *Athila6a*, entre otros) pero reducen los de TE independientes de MOM1 (*IS112A*). Por el contrario, en la infección con *Pst* hay una disminución de transcritos de TEs centroméricos dependientes e independientes de MOM1, sugiriendo que en esta condición la remodelación de la cromatina centromérica podrían terminar activando mecanismos que regulan negativamente la transcripción. Por otra parte, estas evidencias sugieren que los distintos estreses (frío, calor, patógenos) producirían cambios estructurales similares en los CCs afectando la regulación transcripcional de la cromatina centromérica y no centromérica de distintas maneras según la condición.

Otros autores no discriminaron el comportamiento transcripcional de TEs centroméricos y no centroméricos en estrés. Nuestros resultados demuestran que en

plantas infectadas hay un comportamiento diferencial entre ambos tipos de TEs sugiriendo que la cromatina centromérica y no centromérica podrían estar sujetas a distintos mecanismos regulatorios en esta condición. Además observamos el mismo tipo de comportamiento para el transgén *35S:LUC* (represión o activación para una posición centromérica o no centromérica, respectivamente) sugiriendo que la regulación negativa de los *loci* centroméricos actúa independientemente de la secuencia del gen.

Silenciamiento génico de TEs en infección

Las células infectadas con *Pst* demetilan el DNA centromérico (Pavet et al., 2006) por lo que podrían activar a los TE de esta región. Sin embargo, los transcriptos de estos TEs (*TSI* y *Athila6a*) se reducen y esto depende de Pol IV, Pol V y MOM1 (Figura 19), sugiriendo que existe una activación del TGS dependiente de smRNAs en esta condición.

Otros autores que analizaron la metilación *de novo* del DNA encontraron que la activación de TEs puede inducir al TGS por smRNAs (Slotkin et al., 2009; Schoft et al., 2009; McCue et al., 2015). La metilación *de novo* en TEs es muy compleja (Eamens et al., 2008; Nuthikattu et al., 2013; Zhou y Law, 2015). Por ejemplo, Pol IV y Pol V no son requeridas para el silenciamiento basal de *TSI* y *Athila6a* (Figura 4 en Numa et al., 2010; Tabla 1 en Slotkin, 2010; resultados no mostrados), pero ambas actuarían en la metilación *de novo* cuando estos TEs son re-activados (Nuthikattu et al., 2013; Creasey et al., 2014; Tanurdzic et al., 2008; Schoft et al., 2009; Slotkin, 2010). Es interesante que basalmente Pol IV sintetiza siRNAs a partir de TEs centroméricos, los cuales no dirigirían el silenciamiento de estos TEs, pero posiblemente si de otras secuencias homólogas eucromáticas actuando en *trans* (Sigman y Slotkin, 2016). Además, el estado de compactación de la cromatina regularía la actividad del RdDM, activándose en regiones de cromatina accesible (Gent et al., 2014). Estos hallazgos sugieren que el TGS por smRNAs podría activarse o redirigirse en plantas infectadas que decondensan sus CCs y activan transitoriamente a TEs centroméricos.

En la mayoría de los casos la metilación *de novo* es guiada por Pol IV, siRNAs de 24nt, y Pol V (Pikaard et al., 2012; Wierzbicki et al., 2012), pero bajo distintas condiciones, distintos componentes del TGS serían reclutados para el silenciamiento de *Athila6a* y *TSI* a través de la metilación *de novo* mediada por RdDM. En plantas infectadas con *Pst* Pol IV sería requerida para el silenciamiento de *Athila6a*, y Pol

IV/Pol V para el silenciamiento de *TSI*. En núcleos vegetativos de polen, la metilación *de novo* inducida por la previa activación de *Athila6a* y *Athila4* sólo depende de Pol V (Slotkin et al., 2009; Schoft et al., 2009). Por el contrario en *ddm1*, la acumulación de transcritos de *Athila6* conlleva la metilación *de novo* mediada por ambas polimerasas (Pol IV y Pol V) (Nuthikattu et al., 2013). En plantas infectadas con virus se activa el RdDM y se reprime el transgén *35S:GFP* de manera dependiente de Pol IV (NRPD1a) y no Pol V (NRPD1b), aunque el mantenimiento del silenciamiento depende de ambas (Eamens et al., 2008). Estas evidencias en conjunto con nuestros resultados, sugieren que la infección con *Pst* induce mecanismos de silenciamiento de regiones centroméricas (*Athila6a* y *TSI*) que involucran distintos componentes del TGS a los reportados en *ddm1*, núcleos vegetativos de polen, crecimiento de células en cultivo.

Estudios genéticos que incluyen simples y múltiples mutantes de los componentes de la maquinaria de silenciamiento hacen evidente la compleja relación funcional entre los mismos (Ghildiyal y Zamore, 2009; Eun et al, 2011; Havecker et al, 2010; Duan et al., 2015; Eamens et al., 2008; Zhou y Law, 2015; Wang et al., 2015a). Dependiendo del blanco genómico estudiado, se ha descrito redundancia de función y/o interdependencia entre las distintas proteínas involucradas en el TGS por smRNAs. Debido a esto, el uso de estas mutantes podría no ser suficiente para evaluar el requerimiento de los componentes del RdDM en el silenciamiento de TEs centroméricos en infección. Como alternativa, en el laboratorio, se están llevando a cabo estudios con plantas transgénicas para evaluar este aspecto. Estas plantas sobre-expresan componentes de la maquinaria de silenciamiento (AGO4), y serán utilizadas para evaluar los niveles de transcritos de *TSI* y *Athila6a* al ser infectadas con *Pst*. Una mayor represión de estos TEs en estas plantas transgénicas, sugeriría que este componente es limitante para el silenciamiento de los mismos en infección, aportando más evidencias de una eventual distracción de la maquinaria de silenciamiento.

smRNAs homólogos al centrómero y a genes *R* en plantas infectadas

La cuantificación de smRNAs homólogos a TEs centroméricos en plantas infectadas es otra aproximación para evaluar si la maquinaria de silenciamiento está involucrada en la represión de los mismos. El aumento de estos smRNAs sería indicativo de este tipo de control. Con el análisis de sRNA-seq publicados por otros

autores (Zhang et al., 2011), observamos que los smRNAs de 24 nt (siRNAs) centroméricos se incrementan en plantas infectadas, sugiriendo su actividad en el TGS de esta región, posiblemente a través de Pol IV, Pol V y AGO4. Por el contrario, los smRNAs de 21 nt no muestran cambios similares.

Los siRNAs han sido estudiados principalmente en respuestas de defensa contra virus. En estos casos, muchos siRNAs derivan del material genético del patógeno y se desconoce si tienen efecto sobre TEs centroméricos homólogos. La infección con el virus del mosaico del coliflor induce la generación de siRNAs de 21 nt de *Arabidopsis*, homólogos a exones de más de 1000 genes, muchos de los cuales son requeridos para la defensa contra este patógeno, pero no genera siRNAs de 24 nt (Cao et al., 2014). En relación a la defensa contra patógenos bacterianos el nat-siRNAATGB2 fue el primero en ser estudiado. Este siRNA participa en la activación de la ETI inducida por *Pst-AvrRpt2* producto de la superposición de dos genes que codifican para una “GTP-binding protein” (ATGB2) y una “pentatricopeptide protein (PPR)-like”. También se describió que siRNAs regularían la transcripción de los genes *R RPS4* y *SNC1* (Yi y Richards, 2007). Por otra parte, tratamientos con la hormona SA inducen la acumulación de siRNAs de 21 nt, pero no de 24 nt, homólogos a TEs que alteran su contenido de 5mC (Downen et al., 2012). Además, existe un grupo de genes *R* que son regulados por tasiRNAs en *Solanaceae*, *Rosaceae*, *Pinaceae* y *Amborellaceae*, pero muy pocos están presentes en *Arabidopsis* (*Brassicaceae*) (Eckardt et al., 2013; Zhai et al., 2011; Howell et al., 2007; Fei et al., 2013; Boccara et al., 2014).

Nuestros resultados muestran un gran número de smRNAs inducidos homólogos a genes *R*. La mayoría de ellos tienen 24 nt (siRNAs) y en menor grado 21 nt (siRNAs secundarios y/o miRNAs). Ambos tipos poseen A en su extremo 5'. Otros estudios demostraron que plantas salvajes infectadas con *Pst* alteran los niveles de miRNAs que regulan a genes involucrados en vías de señalización por ácido abscísico, jasmónico, auxinas y los genes reprimidos se correlacionan con la activación de miRNAs homólogos (Zhang et al., 2011). Por esto, fue inesperado observar que algunos genes *R* eran inducidos en la infección con *Pst*, donde ocurría un aumento de smRNAs homólogos a sus regiones regulatorias (R-smRNAs). Al evaluar si los R-smRNAs también eran homólogos a otras regiones del genoma, sorprendentemente encontramos que más de la mitad de ellos (que concentran el 78% de las lecturas) reconocerían a TEs. Curiosamente, la mayoría de estos TEs se encuentran localizados en otras regiones del genoma (TEs distantes, pertenecientes al

grupo “i”). Por esto, sugerimos que los smRNAs podrían re-direccionar el silenciamiento hacia los TEs (más abundantes) impidiendo su efecto regulatorio sobre los genes *R*, lo cual sería consistente con observaciones similares realizadas en otros sistemas (Franco-Zorrilla et al., 2007; Khan et al., 2009; Todesco et al., 2010; Ivashuta et al., 2011; Blevins et al., 2011; Banks et al., 2012; McCue et al., 2012). Tres de los genes blanco de estos R-smRNAs (*RLK7*, *ADR1* y *ADR1-L1*) son regulados negativamente por Pol IV y/o Pol V en plantas sanas, pero aumentan su expresión en plantas infectadas aún cuando también aumentan sus R-smRNAs. La presencia de smRNAs homólogos tanto a genes, como a TEs, ha sido asociado a mecanismos evolutivos de los genomas dependiente de la transposición de TEs (Wang et al., 2013a). A diferencia de los resultados obtenidos con *RLK7*, *ADR1* y *ADR1-L1*, los autores propusieron que la presencia de este tipo de smRNAs no está fuertemente correlacionada con la represión de genes vecinos. Sin embargo estos estudios no evaluaron el efecto de la sobre-expresión de estos smRNA en el silenciamiento.

Actualmente se conoce poco acerca de la regulación transcripcional de los genes *RLK7*, *ADR1* y *ADR1-L1*. *ADR1* presenta mayores niveles de transcriptos en la doble mutante *met1/nrpd2* (*met1*: DMT; *nrpd2*: subunidad menor común entre de Pol IV y Pol V) (Yu et al., 2013). Esos resultados sumados a los del presente trabajo sugieren que el TGS por smRNAs controla los niveles de mRNA de este gen *R*. Por su parte, *ADR1-L1* al igual que *RPP7* poseen un sitio de poliadenilación prematuro que genera un mRNA no codificante y un TE inserto en su primer intrón (Tsuchiya y Eulgem, 2013; Le et al., 2015). En *RPP7*, la poliadenilación prematura depende del nivel de H3K9me2 en ese TE, mientras que en *ADR1-L1* este fenómeno no depende de la metilación de H3K9 ni del DNA (Le et al., 2015).

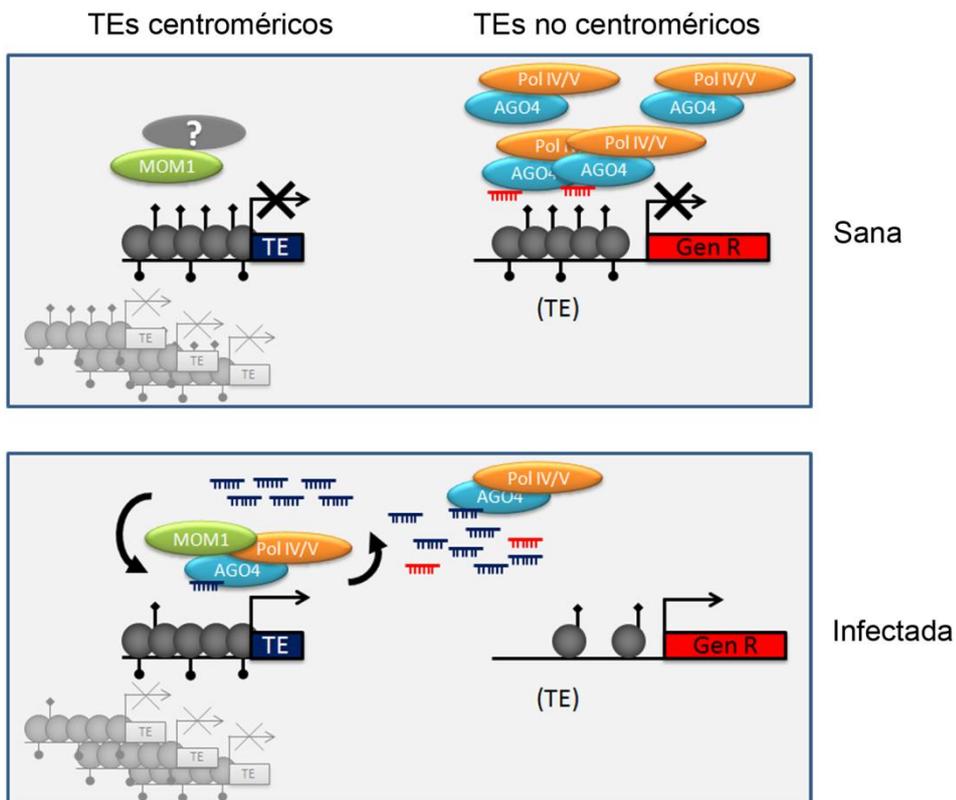
En contraste, entre los genes *R* que poseen R-smRNAs homólogos a TEs distantes, encontramos que *RPS5* (cuyos R-smRNAs no tienen homología con otros *loci* del genoma) no es inducido en plantas salvajes infectadas con *Pst*. Por esto especulamos que sus R-smRNAs podrían regular el nivel de sus transcriptos en esa condición. Seis de los veinte genes *R* pertenecientes al grupo “iii” (*RPS5*, *RSG1*, *RSG2*, *AT5G38850*, *AT1G63360* y *AT5G43740*) son regulados por miRNAs y siRNAs secundarios de 20-21nt (dependientes de RDR6) en plantas salvajes no infectadas (Boccaro et al., 2014). *RPS5*, *RSG1* y *RSG2* son muy poco inducidos en plantas salvajes tratadas con flg22, pero manifiestan una expresión significativamente mayor en plantas mutantes *rdr6* tratadas con este elicitador (Boccaro et al., 2014). En conjunto, estas evidencias sugieren que la maquinaria de silenciamiento dependiente de RDR6

sería suficiente para controlar el nivel de transcritos de algunos genes *R* del grupo “iii” y esta maquinaria no estaría sujeta a la distracción por parte de transcritos de TEs localizados en otras regiones del genoma.

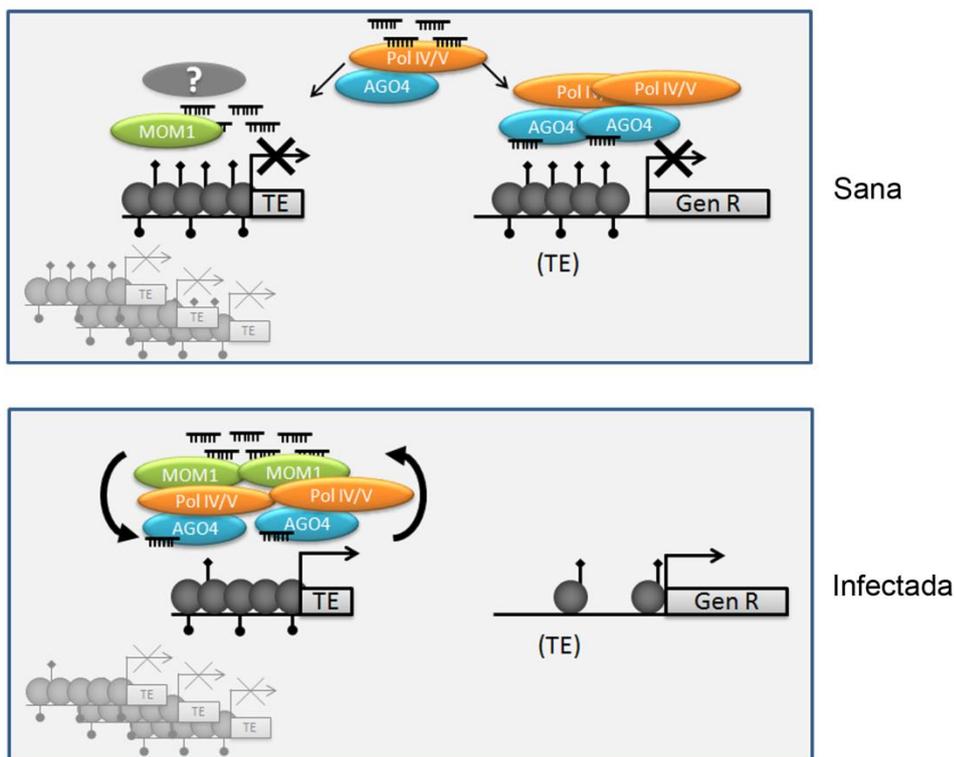
En resumen, los resultados obtenidos en el tercer capítulo sugieren que la maquinaria de silenciamiento génico que mantiene reprimidos a los TE centroméricos seguiría actuando en las plantas salvajes infectadas con *Pst* y sufriría una “distracción” que afectaría su función. Esto podría ocurrir de dos maneras no excluyentes. Por un lado, algunas proteínas que conforman el RdDM (probablemente AGO4) podrían ser saturadas por la gran acumulación de smRNAs homólogos a TEs generada luego del proceso de demetilación genómica. Esto podría reducir el efecto de la maquinaria de silenciamiento sobre sus genes blanco (Figura 26a; Khan et al., 2009). Alternativamente, los TEs más abundantes (aparentemente concentrados en el centrómero) y/o sus smRNAs homólogos podrían reclutar y desplazar el RdDM, el cual dejaría de actuar sobre blancos menos abundantes (Blevins et al., 2011; Franco-Zorrilla et al., 2007; Todesco et al., 2010; Ivashuta et al., 2011; Banks et al., 2012) (Figura 26b). En ambos casos, el silenciamiento de las secuencias blanco menos abundantes se vería desfavorecido. En nuestro sistema de estudio, el silenciamiento de los genes *R* (poco abundantes) podría ser desplazado por la inducción del silenciamiento de TEs previamente demetilados y activados o por smRNAs de TEs (muy abundantes) que podrían funcionar como señuelo.

La demostración directa que uno o los dos mecanismos actúa en plantas infectadas es complejo debido a la gran cantidad de secuencias blanco involucradas y la complejidad del sistema de silenciamiento. Una primera aproximación sería estudiar la expresión de genes *R* en plantas que sobre-expresan AGO4, con el objeto de evadir la eventual “saturación” de este componente. Sumado a esto, sería interesante identificar los smRNAs o mRNAs que desplazarían o saturarían a esta proteína por medio de ensayos de ChIP con anticuerpos anti-AGO4 en plantas infectadas. A pesar de la falta de evidencias directas, los resultados publicados por otros autores y los aquí obtenidos, permiten inferir que este proceso de distracción de la maquinaria de silenciamiento podría ocurrir en planta tratadas con *Pst*.

a



b



↓ H3K9me2 (TE): Transposones o relictos minoritarios
 ↑ 5mC

Figura 26: Distracción de la maquinaria de silenciamiento génico por smRNAs en plantas salvajes infectadas. (a) En plantas sanas, los TEs centroméricos (muy abundantes) se mantienen basalmente reprimidos de manera dependiente de MOM1 e independiente de Pol IV y Pol V, mientras que los genes *R* serían silenciados por el TGS dependiente de las polimerasas a través de TEs localizados en regiones regulatorias (TE) (panel superior). En plantas infectadas, la inducción de estos TEs conlleva la acumulación de smRNAs para su silenciamiento que eventualmente saturaría a los componentes de esta maquinaria, quedando los genes *R* liberados del TGS (panel inferior). (b) Por otra parte, existen smRNAs homólogos tanto a genes *R* (TEs en sus regiones regulatorias) como a TEs localizados en otras regiones del genoma que regularían negativamente a ambos en plantas sanas (panel superior). En plantas infectadas, el aumento de expresión de TEs centroméricos re-direccionaría la maquinaria de silenciamiento hacia estas regiones, liberando del silenciamiento a los genes *R*. Tanto en (a) como en (b), AGO4 y Pol IV podrían disminuir sus niveles (Figura 20).

Materiales y Métodos

Plantas y condiciones de crecimiento

En esta Tesis se utilizaron plantas salvajes de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0. Las mutantes *mom1-5*, *mom1-2*, *mom1-1* y *miniMOM* (las dos últimas de fondo genético Zurich) fueron facilitadas por el Dr. Jerzy Paskowsky. Las mutantes *ddm1-1*, y *vim1-2* fueron cedidas por el Dr. Eric Richard; *suvh4/suvh5-2/suvh6-1* (*suvh4/5/6*) por la Dra. Judith Bender; *nrdp1a-4* (*pol IV*) *nrdp1b-11* (*pol V*) por el Dr. Blake Meyer; *ago4-2* por el Dr. Pablo Vera; CCT435 y CCT366 por el Dr Eric Lam. Las plantas *drm1-2/drm2-2* (*drm1/2*), *cmt3-11*, *drm1-2/drm2-2/cmt3-11* (*ddc*) fueron adquiridas del "Arabidopsis Biological Resource Center".

Las semillas fueron germinadas y crecidas en medio GM (1x sales de Murashige y Skoog -MS-, 1x vitaminas de Gamborg, sacarosa 2 %, agar 1,6 %, agua destilada) en placas de Petri durante 10 días en incubadores con un ciclo de luz/oscuridad de 8/16 hs y temperatura controlada de 22-23 °C. Las plántulas fueron transplantadas a un sustrato compuesto por tierra y vermiculita (1:1) y crecidas en las mismas condiciones de luz y temperatura. En los experimentos de expresión génica de plántulas crecidas en tierra, las semillas fueron germinadas en tierra y vermiculita (1:1).

Manipulación de bacterias

En todos los tratamientos de infección se utilizó la bacteria patogénica *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pst*). Las bacterias fueron cultivadas a 28°C en medio selectivo KB sólido (King's B: proteosa peptona 2% p/v, glicerol 1% v/v, K₂HPO₄ 0.15% p/v, MgSO₄·7H₂O 0.15% p/v, agar 1,5% p/v) suplementado con rifampicina 100 µg/ml y kanamicina 50 µg/ml. Para los tratamientos de infección, las bacterias fueron crecidas en 3 ml de medio selectivo KB líquido a 28°C con agitación durante 16 hs. Las bacterias contenidas en 1 ml del cultivo fueron lavadas dos veces con MgCl₂ 10mM pH 7 y diluidas a la concentración indicada para cada experimento: 1x10⁵ ufc ml⁻¹ para evaluar el crecimiento del patógeno y 1x10⁷ ufc ml⁻¹ para experimentos de expresión génica. Como control del tratamiento, las hojas fueron inoculadas con el vehículo (Mock, MgCl₂ 10mM). La inoculación de bacterias o del vehículo se llevó a cabo con el uso de jeringas de 1ml sin aguja, a través de la cara abaxial de hojas adultas.

Contenido de *Pst* en plantas infectadas

La cuantificación de *Pst* en plantas infectadas fue realizada según lo descrito previamente por Pavet y colaboradores (2006). Tres plantas de cada línea (salvajes, mutantes o transgénicas) fueron infectadas con 1×10^5 ufc ml^{-1} . Por cada día post-infección se tomaron muestras de 6 hojas infectadas de cada línea (dos de cada planta). Con un sacabocado, se cortaron dos discos de 4 mm de cada hoja (12 discos en total). Dos grupos de 6 discos fueron utilizados como réplicas técnicas. Se homogenizaron en MgCl_2 10mM, se realizaron diluciones seriadas (1/10) y se sembraron en placas de Petri con medio selectivo KB. La cuantificación de ufc se realizó luego de 24-48hs de crecimiento a 28 °C, y fue expresada como ufc cm^{-2} .

Expresión génica

La extracción de RNA fue realizada por el método de fenol:cloroformo (adaptado de Verwoerd et al., 1989). Cuatro hojas fueron congeladas en nitrógeno líquido y pulverizado con el disruptor TMD 1500 (Tombo). Para la extracción de RNA se utilizaron 500 μl de la mezcla 1:1 del buffer de extracción (100 mM LiCl, 100 mM Tris-HCL pH 8; 10 mM EDTA, 1 % SDS) con fenol ácido (pH 5, SIGMA). La fase liposoluble e interfase fueron descartadas con dos lavados de 250 μl cada uno de cloroformo. La precipitación de RNA se llevó a cabo con la adición de LiCl (5 M) durante 16 hs. Luego se realizaron lavados para eliminar las sales con etanol 80%. Finalmente el RNA fue resuspendido en agua pre-tratada con DEPC, y conservado a -80 °C.

Para realizar las reacciones de retro-transcripción (RT), en primer lugar las muestras fueron tratadas con DNAsa (RQ1 de Promega) de acuerdo a las instrucciones del proveedor pero utilizando otro buffer (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 20 mM MgCl_2 , 500 mM KCl). Posteriormente, se sintetizó el cDNA utilizando la retro-transcriptasa M-MLV (Promega), siguiendo el protocolo del fabricante y utilizando "random primers" (5' NNNNNN 3').

Para realizar las PCR semicuantitativas (sqPCR), se utilizó 0,5 μl del cDNA sintetizado en un volumen de reacción de 20 μl que contenía: 15 pmol de cada uno de los "primers" específicos, 0,15 μl de Taq DNA polimerasa (Promega), 1x Buffer (Invitrogen) y 500 μM de dNTPs. Las reacciones se realizaron con el siguiente programa: 3 min de desnaturalización del cDNA a 95 °C, y "X" ciclos (x: número de ciclos correspondiente a la fase exponencial de amplificación de cada gen –Tabla 4) de 35 seg de desnaturalización a 95 °C, 35 seg de apareamiento a 60 °C y 45 seg de extensión a 72 °C. Los "primers" específicos utilizados se describen en la Tabla 4. Los productos de PCR fueron sembrados en geles de agarosa 1-2%.

Las reacciones de PCR cuantitativa (qPCR) fueron realizadas utilizando la Mezcla Real de Biodynamic. Las reacciones se llevaron a cabo con 1ul del cDNA obtenido en una reacción de 15 µl de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los valores de veces de cambio fueron calculados por los métodos de $2^{-\Delta Ct}$, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ o Pfaffl, dependiendo del gen analizado, utilizando como referencia al gen *UBQ5*. El análisis estadístico de los datos fue realizado aplicando ANAVA seguido de test de Tukey.

Tabla 4: Primers utilizados en esta Tesis

Gen ("AGI")	Secuencia (5'-3')	Técnica utilizada	Ciclos*
<i>GapC</i> (<i>At3g04120</i>)	F - CACTTGAAGGGTGGTGCCAAG R - CCTGTTGTGCGCCAACGAAGTC	sqPCR	24
<i>PR1</i> (<i>At2g14610</i>)	F - GTAGGTGCTCTTGTTCCTTCCC R - CACATAATTCCCACGAGGATC	sqPCR	26
<i>PR1-FW</i> (<i>At2g14610</i>)	F - ATGAATTTTACTGGCTATTCTC R - AGGGAAGAACAAGAGCAACTA	qPCR	45
<i>SNC1</i> (<i>At4g16890</i>)	F - GCCGGATATGATCTTCGGAA R - CGGCAAGCTCTTCAATCATG	sqPCR	29
<i>Laz5</i> (<i>At5g44870</i>)	F - GAGTCGTGGCAAGTGTTTCATC R - GAAGATGGACAGTGCGATTTTC	sqPCR	25
<i>RPM1</i> (<i>At3g07040</i>)	F - GAAGAGACTTGTGCGATTACAC R - AGCCATACCAATCTAGGAAGC	sqPCR	29
<i>EDS5</i> (<i>At4g39030</i>)	F - CATCAGGTGATGGCTCAGAC R - ACTAATCCAAGCGTGGCTCC	sqPCR	25
<i>Athila6a</i> (múltiples)	F - CAGGTCGAGTAACCTCAGGTCA R - GAGTAACTTGGTAGAGTGAATGGTC	sqPCR en Col-0 sqPCR en <i>mom1</i>	34 27
<i>TSI</i> (múltiples)	F - TGGTTCACCAGATAAGCTCAGTGCCCTC R - GGGAAATGGTATCAGATCCTAACAGTGTGG	sqPCR en Col-0 sqPCR en <i>mom1</i> qPCR	29 23 45
<i>IS112A</i> (<i>At5g35490</i>)	F - GAAGCTATTGCTTATTACGATCTATGGA R - ATTGTAGAAGCTCGAAAGACTCGCTCA	sqPCR	30
<i>Onsen</i> (múltiples)	F - CGGTGCTCACAAAGAGCAACTATG R - ATCCTTGATAGATTAGACAGAGAGCT	sqPCR	35
<i>Ta11</i> (<i>At1g72920</i>)	F - TCATGAGAAAGTAGCTTCGTGGAGA R - AACCTTCAACCAACCAACCTTCAAC	sqPCR	31
<i>Atlantys</i> (<i>At3g60930</i>)	F - GATGCTGAGGTAAATCTTAATCGCT R - TTCGGATGGTCGATTATCCTTGGCA	sqPCR qPCR	33 45
<i>LUC</i>	F - GAAAGGCCCGGGCGCCATTCTATCC R - CGTTCGCGGGCGCAACTGCAACTC	qPCR	45
<i>NRPE7</i> (<i>AT4G14660</i>)	F - GCTACTACGTGGCAGTCACAAC R - AGTCATTCCGCTGAACATTACC	sqPCR	30
<i>NRPD7</i> (<i>AT3G22900</i>)	F - CATTTCGTCTACTCGAAGCCTTT R - GATCTTACCCTCACCGATGTTC	sqPCR	30
<i>AGO4</i> (<i>AT2G27040</i>)	F - TGGAAGTGAAGACGATGGCATT R - TTTTGAGCCACCAACAAAAGGA	sqPCR	30

<i>AGO6</i> (<i>At2G32940</i>)	F - TCGGGCAGATGTTCCCTTCAGTA R - GCCCTGCTTGTCCGATAGAACT	sqPCR	31
<i>UBQ5-FW</i> (<i>At3g62250</i>)	F - GTGGTGCTAAGAAGAGGAAGA R - TCAAGCTTCAACTCCTTCTTT	qPCR	45
<i>RMG1</i> (<i>At4g11170</i>)	F - TCGGTATCTGTCACCTCATCTG R - GCTTTCCTCTTGGTCTACATGG	qPCR	45
<i>ADR1</i> (<i>At1g33560</i>)	F - AGTTTGTGAGCTGCCATGTCTA R - CTC AAGACTCCCTAGCTTTCCA	sqPCR qPCR	30 45
<i>ADR1-L1</i> (<i>At4g33300</i>)	F - AAACCACTCTTGCCAAAGAAC R - GGATTTCCAGCTTCACAACC	sqPCR qPCR	25 45
<i>RLK7</i> (<i>At1g09970</i>)	F - ACCGATAGAGGCAGAGTTTGG R - TGTCCACAATCTCCATCACACT	sqPCR qPCR	25 45
<i>RPS5</i> (<i>AT1G12220</i>)	F - TCTTTGTGGTTTCTGCTCCA R - GGATCTCATCCACATCAGCA	sqPCR	29
<i>RPS4</i> (<i>At5g45250</i>)	F - TGAAACAAGACCCCCATTGTAG R - ATCAGTTCCAGAGTTTCCACC	sqPCR qPCR	30 45
<i>RPS2</i> (<i>At4g26090</i>)	F - CTCATCTCTTATCGTTGGCTG R - TTAGTCTCCGTTACTTGCACC	sqPCR qPCR	30 45
<i>ICS1</i> (<i>At1g74710</i>)	F - TGGTTAGCGTTGCTGGTATC R - CATTCAACAGCGATCTTGCC	sqPCR qPCR	26 45
<i>ADR1</i> (<i>At1g33560</i>)	F - AGGTTCTAGTCGTCACAAAGATG R - ATA ACTTCCCTCACTCTTACTAATC	ChIP (qPCR)	45
<i>Ta2</i> (<i>At1g36850</i>)	F - GCACA ACTTTAGCCCTCTCG R - ACAGCTTTGCCTGGTCAAGT	ChIP (qPCR)	45

* En el caso de las sqPCR, se muestra el número de ciclos óptimos correspondientes al rango de amplificación lineal. Para las qPCR siempre se usaron 45 ciclos, con eficiencias entre 80 y 100%.

Condensación de CCs

El número de CCs fue cuantificado según lo descrito previamente por Pavet y colaboradores (2006) con algunas modificaciones. Hojas de plantas salvajes y mutantes no tratadas y tratadas con *Pst* fueron fijadas en una solución de etanol:ácido acético (3:1) durante 16 horas a 8°C. Posteriormente, se hicieron lavados sucesivos de 30 min con concentraciones decrecientes de etanol. Luego, el material fue teñido con yoduro de propidio 40 µg/µl durante 15 minutos. Finalmente, las hojas fueron montadas en portaobjetos con glicerol 50%. La cuantificación de CCs de núcleos de células próximas a bacterias en crecimiento, se realizó manualmente a partir de imágenes capturadas con el microscopio confocal Olympus FluoView FV1000 Espectral o Zeiss LSM5 Pascal. Para ello, se utilizó un objetivo 60X. Las muestras fueron excitadas con un el laser 633 nm. Los valores fueron representados en histogramas como cantidad de núcleos con “x” número de CCs.

Inmuno-precipitación de la cromatina

Los experimentos de inmuno-precipitación de la cromatina (ChIP) fueron realizados en colaboración con la Dra. Paula Casati, de acuerdo a lo descrito previamente por Gendrel y colaboradores (2005) con algunas modificaciones. Los anticuerpos utilizados fueron específicos para la histona H3 (Abcam ab12079) y H3K9me2 (Abcam ab1220). Previo a la inmunoprecipitación, las muestras de cromatina fueron lavadas con 10 µl proteína G (“Dynabids Protein G” de Invitrogen) en “buffer de dilución de ChIP” con agitación durante 1 hora a 4°C. En paralelo, los anticuerpos utilizados en cada muestra fueron adheridos a 20 µl de proteína G en buffer PBS 1X con agitación durante 1 hora a 4°C. Luego, se colectó el sobrenadante del primer paso y se lo mezcló con la solución que contenía los anticuerpos adheridos a la proteína G (segundo paso), y se los incubó con agitación por 16 horas a 4°C. Las muestras de DNA obtenidas por la inmuno-precipitación fueron resuspendidas en 20 µl de H₂O, y 2 µl de una dilución 1/10 fueron utilizados para cuantificar los niveles de DNA inmuno-precipitados por qPCR. Se utilizaron “primers” específicos (Tabla 4) para amplificar una porción de la región promotora del gen *ADR1* y del gen *Ta2* como control de carga en todas las muestras. Los valores revelan el nivel de H3K9me2 en la región promotora de *ADR1*. Para ello, se utilizó el método $2^{-\Delta\Delta Ct}$, relativizando los valores obtenidos en la amplificación (Ct) de *ADR1* respecto al *Ta2* de cada muestra inmuno-precipitada con el anticuerpo anti-H3K9me2 y a los valores de Ct de ambos genes obtenidos en las muestras inmuno-precipitadas con el anticuerpo anti-H3 (H3K9me2/*Ta2*/H3).

Análisis de transcriptomas

Los transcriptomas fueron obtenidos a partir de la base de datos “Gene Expression Omnibus” con los números de acceso GSE38286 (*ddm1-2*, *met1-3*, *cmt3-11*, *suvh4/5/6*, *mom1-2* y *drm1/2*; Moissiard et al., 2012); GSE38464 (*nripd1b-11*; Zhu et al., 2013), GSE38286, GSE54677 y GSE17940 (*mom1-2*; Stroud et al., 2012; Moissiard et al., 2014; Yokthongwattana et al., 2010, respectivamente) y GSE13092 para (*mom1-1*; Habu et al., 2006). Los datos fueron analizados en colaboración con el Mg. Julio Di Rienzo (Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC). En primer lugar, se generaron listas de los genes *R*, *RLK*, factores de transcripción (*FT*) y de respuesta al estrés biótico (*REB*) a partir del “GO term” llamado “Biological Process response to biotic or abiotic stimulus”, obtenido de www.arabidopsis.org. Para obtener los valores de RPM de cada gen (reads per millon en escala \log_2 , previamente normalizados por los autores), se sumaron los valores de RPM de cada posición detectada en los “arrays” y “RNAseq” utilizando comandos escritos en R (utilizando “Infostat”) y “perl” (ver comandos adjuntos en “CD”). Para ello, se utilizó el genoma ensamblado TAIR8 como genoma de referencia. Los valores de RPM obtenidos para cada gen en las mutantes fueron comparados con los de las plantas salvajes a través del método de errores estándares y comparación múltiple entre medias del tipo LSD de Fisher basada en una prueba de Wald, o la prueba de formación de grupos excluyentes DGC [Di Rienzo et al., 2002]. Las veces de cambio fueron obtenidas como $2^{(\text{media de la mutante} - \text{media de Col-0})}$.

Análisis genómico de blancos de MOM1

La identidad de los TEs sobre-expresados en la mutante *mom1-2* fueron obtenidos de datos publicados por Yokthongwattana y colaboradores (2010). Tanto para identificar la presencia de genes de defensa próximos a los TEs sobre-expresados en las mutantes (TEs de MOM1), como la presencia de TEs próximos a genes *R* sobre-expresados en las mutantes (genes *R* de MOM1), se utilizaron comandos escritos en “perl” y el programa “Galaxy” (galaxy.org) (ver comandos adjuntos en “CD”). En el primer análisis (genes próximos a TEs de MOM1), determinamos si alguno de los genes identificados eran de defensa (de los grupos *R*, *RLK*, *SA* o *REB*). Los resultados se mostraron con diagramas de Venn. En el segundo análisis (TEs próximos a genes *R* de MOM1), los TEs identificados fueron agrupados en familias y cuantificados. Como control, se los comparó con la abundancia de TEs localizados próximos a 10 grupos de genes *R* tomados al azar (distribución de Poisson utilizando el programa “Infostat”).

Análisis de sRNA-seq

Los datos del sRNA-seq publicados por Zhang y colaboradores (2011) fueron obtenidos a partir del GSE19694 en el “Gene Expression Omnibus”. Los análisis bioinformáticos fueron realizados en colaboración con el Dr Sebastián Asurmendi (Instituto de Biotecnología de INTA Castelar). En primer lugar, se seleccionaron los smRNAs con al menos 3 lecturas. Para obtener los valores de lecturas por millón (RPM), las lecturas de cada smRNAs se normalizaron respecto al número total de lecturas de la muestra. Posteriormente, se realizó un índice del genoma de Arabidopsis (TAIR10) y se posicionaron las secuencias de los smRNAs por homología del 100% utilizando el programa “Bowtie”. Con estos datos, se realizaron los histogramas de abundancia (graficando hasta 1000 RPM) de smRNAs a lo largo de cada cromosoma en ventanas de 50 kb, utilizando para ello comandos escritos en “perl” y “R”. Luego se identificaron los smRNAs homólogos a genes *R* (región codificante y promotora - 2000 pb aguas arriba) con comandos escritos en “perl” (ver comandos adjuntos en “CD”). Estos smRNAs (R-smRNAs) fueron analizados de acuerdo a su longitud, nucleótido en el extremo 5' y abundancia en las distintas muestras (tratadas con MgCl₂ 10mM o *Pst*).

Para evaluar la homología de los R-smRNAs a TEs, sus secuencias fueron comparadas con las de TEs anotados (100% de homología) obtenidas del índice del genoma TAIR10, utilizando “Galaxy”. Los TEs homólogos a los R-smRNAs fueron posicionados en el genoma y se los categorizó como TEs próximos o distantes de genes *R* (localizados dentro del ORF y/o en su región promotora de 2000 pb, o fuera de estas regiones, respectivamente). Luego, se cuantificaron los R-smRNAs homólogos a cada tipo de TE (cantidad y RPM). En este análisis, los valores obtenidos a partir del miRNA472 fueron sustraídos debido a que saturaban el análisis, y porque este miRNA ya fue caracterizado por su capacidad de silenciar a *RPS5* (Boccaro et al., 2014). Para todas estas tareas de búsqueda de secuencias homólogas, posicionamiento en el genoma y cuantificación se utilizaron comandos escritos en “perl” y el programa “Galaxy” (galaxy.org), los cuales se presentan adjuntos en un CD.

Referencias

- Agius, F., Kapoor, A. and Zhu, J.K.** (2006) Role of the Arabidopsis DNA glycosylase/lyase ROS1 in active DNA demethylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 11796-11801.
- Agorio, A. and Vera, P.** (2007) ARGONAUTE4 is required for resistance to *Pseudomonas syringae* in Arabidopsis. *Plant Cell* **19**, 3778-3790.
- Alvarez-Venegas, R., Abdallat, A.A., Guo, M., Alfano, J.R. and Avramova, Z.** (2007) Epigenetic control of a transcription factor at the cross section of two antagonistic pathways. *Epigenetics*. **2**, 106-113.
- Alvarez, M.E., Nota, F. and Cambiagno, D.A.** (2010) Epigenetic control of plant immunity. *Mol. Plant Pathol.* **11**, 563-576.
- Amedeo, P., Habu, Y., Afsar, K., Mittelsten, S.O. and Paszkowski, J.** (2000) Disruption of the plant gene MOM releases transcriptional silencing of methylated genes. *Nature* **405**, 203-206.
- Asai, T., Tena, G., Plotnikova, J., Willmann, M.R., Chiu, W.L., Gomez-Gomez, L., Boller, T., Ausubel, F.M. and Sheen, J.** (2002) MAP kinase signalling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Balmer, A., Pastor, V., Gamir, J., Flors, V. and Mauch-Mani, B.** (2015) The 'prime-ome': towards a holistic approach to priming. *Trends Plant Sci.* **20**, 443-452.
- Banks, I.R., Zhang, Y., Wiggins, B.E., Heck, G.R. and Ivashuta, S.** (2012) RNA decoys: an emerging component of plant regulatory networks? *Plant Signal. Behav.* **7**, 1188-1193.
- Bannister, A.J. and Kouzarides, T.** (2011) Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Res.* **21**, 381-395.
- Baulcombe, D.C. and Dean, C.** (2014) Epigenetic regulation in plant responses to the environment. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol* **6**, a019471.
- Berger, S.L.** (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* **447**, 407-412.
- Bernatavichute, Y.V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M. and Jacobsen, S.E.** (2008) Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *PLoS. One.* **3**, e3156.
- Bernstein, E. and Hake, S.B.** (2006) The nucleosome: a little variation goes a long way. *Biochem. Cell Biol* **84**, 505-517.
- Bi, G., Liebrand, T.W., Cordewener, J.H., America, A.H., Xu, X. and Joosten, M.H.** (2014) Arabidopsis thaliana receptor-like protein AtRLP23 associates with the receptor-like kinase AtSOBIR1. *Plant Signal. Behav.* **9**, e27937.
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Aregger, M., Borah, B.K., Schepetilnikov, M., Baerlocher, L., Farinelli, L., Meins, F., Jr., Hohn, T. and Pooggin, M.M.** (2011) Massive production of small RNAs from a non-coding region of Cauliflower mosaic virus in plant defense and viral counter-defense. *Nucleic Acids Res.* **39**, 5003-5014.
- Block, A. and Alfano, J.R.** (2011) Plant targets for *Pseudomonas syringae* type III effectors: virulence targets or guarded decoys? *Curr. Opin. Microbiol.* **14**, 39-46.
- Boccaro, M., Sarazin, A., Thiebauld, O., Jay, F., Voinnet, O., Navarro, L. and Colot, V.** (2014) The Arabidopsis miR472-RDR6 silencing pathway modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-transcriptional Control of Disease Resistance Genes. *PLoS. Pathog.* **10**, e1003883.
- Bologna, N.G. and Voinnet, O.** (2014) The diversity, biogenesis, and activities of endogenous silencing small RNAs in Arabidopsis. *Annu. Rev. Plant Biol* **65**, 473-503.
- Bonardi, V., Tang, S., Stallmann, A., Roberts, M., Cherkis, K. and Dangl, J.L.** (2011) Expanded functions for a family of plant intracellular immune receptors beyond specific recognition of pathogen effectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 16463-16468.

- Bourbousse, C., Mestiri, I., Zabulon, G., Bourge, M., Formiggini, F., Koini, M.A., Brown, S.C., Frasz, P., Bowler, C. and Barneche, F.** (2015) Light signaling controls nuclear architecture reorganization during seedling establishment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **112**, E2836-E2844.
- Bowling, S.A., Guo, A., Cao, H., Gordon, A.S., Klessig, D.F. and Dong, X.** (1994) A mutation in Arabidopsis that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance. *Plant Cell* **6**, 1845-1857.
- Brodersen, P., Petersen, M., Pike, H.M., Olszak, B., Skov, S., Odum, N., Jorgensen, L.B., Brown, R.E. and Mundy, J.** (2002) Knockout of Arabidopsis accelerated-cell-death11 encoding a sphingosine transfer protein causes activation of programmed cell death and defense. *Genes Dev.* **16**, 490-502.
- Brzeski, J. and Jerzmanowski, A.** (2003) Deficient in DNA methylation 1 (DDM1) defines a novel family of chromatin-remodeling factors. *J Biol Chem.* **278**, 823-828.
- Caikovski, M., Yokthongwattana, C., Habu, Y., Nishimura, T., Mathieu, O. and Paszkowski, J.** (2008) Divergent evolution of CHD3 proteins resulted in MOM1 refining epigenetic control in vascular plants. *PLoS. Genet.* **4**, e1000165.
- Calarco, J.P., Borges, F., Donoghue, M.T., Van, E.F., Jullien, P.E., Lopes, T., Gardner, R., Berger, F., Feijo, J.A., Becker, J.D. and Martienssen, R.A.** (2012) Reprogramming of DNA methylation in pollen guides epigenetic inheritance via small RNA. *Cell* **151**, 194-205.
- Cao, M., Du, P., Wang, X., Yu, Y.Q., Qiu, Y.H., Li, W., Gal-On, A., Zhou, C., Li, Y. and Ding, S.W.** (2014) Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **111**, 14613-14618.
- Cao, X. and Jacobsen, S.E.** (2002) Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99 Suppl 4**, 16491-16498.
- Chan, S.W., Henderson, I.R. and Jacobsen, S.E.** (2005) Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 351-360.
- Chekanova, J.A.** (2015) Long non-coding RNAs and their functions in plants. *Curr. Opin. Plant Biol* **27**, 207-216.
- Choi, K. and Henderson, I.R.** (2015) Meiotic recombination hotspots - a comparative view. *Plant J* **83**, 52-61.
- Christiansen, K.M., Gu, Y., Rodibaugh, N. and Innes, R.W.** (2011) Negative regulation of defence signalling pathways by the EDR1 protein kinase. *Mol. Plant Pathol.* **12**, 746-758.
- Collier, S.M., Hamel, L.P. and Moffett, P.** (2011) Cell death mediated by the N-terminal domains of a unique and highly conserved class of NB-LRR protein. *Mol. Plant Microbe Interact.* **24**, 918-931.
- Conklin, P.L., Norris, S.R., Wheeler, G.L., Williams, E.H., Smirnov, N. and Last, R.L.** (1999) Genetic evidence for the role of GDP-mannose in plant ascorbic acid (vitamin C) biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 4198-4203.
- Conrath, U., Beckers, G.J., Langenbach, C.J. and Jaskiewicz, M.R.** (2015) Priming for enhanced defense. *Annu. Rev. Phytopathol.* **53**, 97-119.
- Copenhaver, G.P., Nickel, K., Kuromori, T., Benito, M.I., Kaul, S., Lin, X., Bevan, M., Murphy, G., Harris, B., Parnell, L.D., McCombie, W.R., Martienssen, R.A., Marra, M. and Preuss, D.** (1999) Genetic definition and sequence analysis of Arabidopsis centromeres. *Science* **286**, 2468-2474.
- Craig, J.M., Earnshaw, W.C. and Vagnarelli, P.** (1999) Mammalian centromeres: DNA sequence, protein composition, and role in cell cycle progression. *Exp. Cell Res.* **246**, 249-262.

- Creasey, K.M., Zhai, J., Borges, F., Van, E.F., Regulski, M., Meyers, B.C. and Martienssen, R.A.** (2014) miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*. *Nature* **508**, 411-415.
- Dempsey, D.A., Vlot, A.C., Wildermuth, M.C. and Klessig, D.F.** (2011) Salicylic Acid biosynthesis and metabolism. *Arabidopsis. Book.* **9**, e0156.
- Dempsey, D.A. and Klessig, D.F.** (2012) SOS - too many signals for systemic acquired resistance? *Trends Plant Sci.* **17**, 538-545.
- Di Rienzo, J.A., Guzmán A.W. and Casanoves F** (2002) A Multiple Comparisons Method based on the Distribution of the Root Node Distance of a Binary Tree. *Journal of Agricultural, Biological, and Environment Statistics* **7**, 1-14.
- Dietrich, R.A., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A. and Dangl, J.L.** (1994) *Arabidopsis* mutants simulating disease resistance response. *Cell* **77**, 565-577.
- Ding, B. and Wang, G.L.** (2015) Chromatin versus pathogens: the function of epigenetics in plant immunity. *Front Plant Sci.* **6**, 675.
- Douet, J., Blanchard, B., Cuvillier, C. and Tourmente, S.** (2008) Interplay of RNA Pol IV and ROS1 during post-embryonic 5S rDNA chromatin remodeling. *Plant Cell Physiol* **49**, 1783-1791.
- Downen, R.H., Pelizzola, M., Schmitz, R.J., Lister, R., Downen, J.M., Nery, J.R., Dixon, J.E. and Ecker, J.R.** (2012) Widespread dynamic DNA methylation in response to biotic stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **109**, E2183-E2191.
- Draker, R. and Cheung, P.** (2009) Transcriptional and epigenetic functions of histone variant H2A.Z. *Biochem. Cell Biol* **87**, 19-25.
- Duan, C.G., Zhang, H., Tang, K., Zhu, X., Qian, W., Hou, Y.J., Wang, B., Lang, Z., Zhao, Y., Wang, X., Wang, P., Zhou, J., Liang, G., Liu, N., Wang, C. and Zhu, J.K.** (2015) Specific but interdependent functions for *Arabidopsis* AGO4 and AGO6 in RNA-directed DNA methylation. *EMBO J* **34**, 581-592.
- Eamens, A., Vaistij, F.E. and Jones, L.** (2008) NRPD1a and NRPD1b are required to maintain post-transcriptional RNA silencing and RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Plant J* **55**, 596-606.
- Ebbs, M.L. and Bender, J.** (2006) Locus-specific control of DNA methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* **18**, 1166-1176.
- Eckardt, N.A.** (2013) The plant cell reviews aspects of microRNA and PhasiRNA regulatory function. *Plant Cell* **25**, 2382.
- Elrouby, N., Bonequi, M.V., Porri, A. and Coupland, G.** (2013) Identification of *Arabidopsis* SUMO-interacting proteins that regulate chromatin activity and developmental transitions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **110**, 19956-19961.
- Eun, C., Lorkovic, Z.J., Naumann, U., Long, Q., Havecker, E.R., Simon, S.A., Meyers, B.C., Matzke, A.J. and Matzke, M.** (2011) AGO6 functions in RNA-mediated transcriptional gene silencing in shoot and root meristems in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS. One.* **6**, e25730.
- Fang, Y. and Spector, D.L.** (2005) Centromere positioning and dynamics in living *Arabidopsis* plants. *Mol. Biol Cell* **16**, 5710-5718.
- Fei, Q., Xia, R. and Meyers, B.C.** (2013) Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* **25**, 2400-2415.
- Feschotte, C., Jiang, N. and Wessler, S.R.** (2002) Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nat. Rev. Genet.* **3**, 329-341.
- Fleury, D., Himanen, K., Cnops, G., Nelissen, H., Boccardi, T.M., Maere, S., Beemster, G.T., Neyt, P., Anami, S., Robles, P., Micol, J.L., Inze, D. and Van, L.M.** (2007) The *Arabidopsis thaliana* homolog of yeast BRE1 has a function in cell cycle regulation during early leaf and root growth. *Plant Cell* **19**, 417-432.

- Florentin, A., Damri, M. and Grafi, G.** (2013) Stress induces plant somatic cells to acquire some features of stem cells accompanied by selective chromatin reorganization. *Dev. Dyn.* **242**, 1121-1133.
- Franco-Zorrilla, J.M., Valli, A., Todesco, M., Mateos, I., Puga, M.I., Rubio-Somoza, I., Leyva, A., Weigel, D., Garcia, J.A. and Paz-Ares, J.** (2007) Target mimicry provides a new mechanism for regulation of microRNA activity. *Nat. Genet.* **39**, 1033-1037.
- Fransz, P., de Jong, J.H., Lysak, M., Castiglione, M.R. and Schubert, I.** (2002) Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 14584-14589.
- Frye, C.A. and Innes, R.W.** (1998) An Arabidopsis mutant with enhanced resistance to powdery mildew. *Plant Cell* **10**, 947-956.
- Frye, C.A., Tang, D. and Innes, R.W.** (2001) Negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **98**, 373-378.
- Furner, I.J. and Matzke, M.** (2011) Methylation and demethylation of the Arabidopsis genome. *Curr. Opin. Plant Biol* **14**, 137-141.
- Gassmann, W., Hinsch, M.E. and Staskawicz, B.J.** (1999) The Arabidopsis RPS4 bacterial-resistance gene is a member of the TIR-NBS-LRR family of disease-resistance genes. *Plant J* **20**, 265-277.
- Gehring, M. and Henikoff, S.** (2007) DNA methylation dynamics in plant genomes. *Biochim. Biophys. Acta* **1769**, 276-286.
- Gendler, K., Paulsen, T. and Napoli, C.** (2008) ChromDB: the chromatin database. *Nucleic Acids Res.* **36**, D298-D302.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V. and Martienssen, R.A.** (2002) Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene DDM1. *Science* **297**, 1871-1873.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Martienssen, R. and Colot, V.** (2005) Profiling histone modification patterns in plants using genomic tiling microarrays. *Nat. Methods* **2**, 213-218.
- Gent, J.I., Madzima, T.F., Bader, R., Kent, M.R., Zhang, X., Stam, M., McGinnis, K.M. and Dawe, R.K.** (2014) Accessible DNA and relative depletion of H3K9me2 at maize loci undergoing RNA-directed DNA methylation. *Plant Cell* **26**, 4903-4917.
- Ghildiyal, M. and Zamore, P.D.** (2009) Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 94-108.
- Goetze, S., Mateos-Langerak, J. and van, D.R.** (2007) Three-dimensional genome organization in interphase and its relation to genome function. *Semin. Cell Dev. Biol* **18**, 707-714.
- Goll, M.G. and Bestor, T.H.** (2005) Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Annu. Rev. Biochem.* **74**, 481-514.
- Grant, J.J., Chini, A., Basu, D. and Loake, G.J.** (2003) Targeted activation tagging of the Arabidopsis NBS-LRR gene, ADR1, conveys resistance to virulent pathogens. *Mol. Plant Microbe Interact.* **16**, 669-680.
- Greenberg, J.T. and Ausubel, F.M.** (1993) Arabidopsis mutants compromised for the control of cellular damage during pathogenesis and aging. *Plant J* **4**, 327-341.
- Greenberg, J.T., Guo, A., Klässig, D.F. and Ausubel, F.M.** (1994) Programmed cell death in plants: a pathogen-triggered response activated coordinately with multiple defense functions. *Cell* **77**, 551-563.
- Guillemette, B. and Gaudreau, L.** (2006) Reuniting the contrasting functions of H2A.Z. *Biochem. Cell Biol* **84**, 528-535.
- Haag, J.R., Ream, T.S., Marasco, M., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Pasa-Tolic, L. and Pikaard, C.S.** (2012) In vitro transcription activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 reveal

coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA synthesis in plant RNA silencing. *Mol. Cell* **48**, 811-818.

- Habu, Y., Mathieu, O., Tariq, M., Probst, A.V., Smathajitt, C., Zhu, T. and Paszkowski, J.** (2006) Epigenetic regulation of transcription in intermediate heterochromatin. *EMBO Rep.* **7**, 1279-1284.
- Habu, Y.** (2010) Epigenetic silencing of endogenous repetitive sequences by MORPHEUS' MOLECULE1 in *Arabidopsis thaliana*. *Epigenetics*. **5**, 562-565.
- Hashimoto, H., Zhang, X., Vertino, P.M. and Cheng, X.** (2015) The Mechanisms of Generation, Recognition, and Erasure of DNA 5-Methylcytosine and Thymine Oxidations. *J Biol Chem.* **290**, 20723-20733.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H. and Baulcombe, D.C.** (2010) The *Arabidopsis* RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* **22**, 321-334.
- Heidrich, K., Tsuda, K., Blanvillain-Baufume, S., Wirthmueller, L., Bautor, J. and Parker, J.E.** (2013) *Arabidopsis* TNL-WRKY domain receptor RRS1 contributes to temperature-conditioned RPS4 auto-immunity. *Front Plant Sci.* **4**, 403.
- Hilker, M., Schwachtje, J., Baier, M., Balazadeh, S., Baurle, I., Geiselhardt, S., Hinch, D.K., Kunze, R., Mueller-Roeber, B., Rillig, M.C., Rolff, J., Romeis, T., Schmulling, T., Steppuhn, A., van, D.J., Whitcomb, S.J., Wurst, S., Zuther, E. and Kopka, J.** (2015) Priming and memory of stress responses in organisms lacking a nervous system. *Biol Rev. Camb. Philos. Soc.*
- Hou, S., Wang, X., Chen, D., Yang, X., Wang, M., Turra, D., Di, P.A. and Zhang, W.** (2014) The secreted peptide PIP1 amplifies immunity through receptor-like kinase 7. *PLoS. Pathog.* **10**, e1004331.
- Howell, M.D., Fahlgren, N., Chapman, E.J., Cumbie, J.S., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Kasschau, K.D. and Carrington, J.C.** (2007) Genome-wide analysis of the RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE6/DICER-LIKE4 pathway in *Arabidopsis* reveals dependency on miRNA- and tasiRNA-directed targeting. *Plant Cell* **19**, 926-942.
- Hu, Y., Zhang, L., He, S., Huang, M., Tan, J., Zhao, L., Yan, S., Li, H., Zhou, K., Liang, Y. and Li, L.** (2012) Cold stress selectively unsilences tandem repeats in heterochromatin associated with accumulation of H3K9ac. *Plant Cell Environ.* **35**, 2130-2142.
- Hyde, J.E. and Walker, I.O.** (1975) A model for chromatin sub-structure incorporating symmetry considerations of histone oligomers. *Nucleic Acids Res.* **2**, 405-421.
- Ikeda, Y. and Kinoshita, T.** (2009) DNA demethylation: a lesson from the garden. *Chromosoma* **118**, 37-41.
- Ito, H. and Kakutani, T.** (2014) Control of transposable elements in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosome. Res.* **22**, 217-223.
- Ivashuta, S., Banks, I.R., Wiggins, B.E., Zhang, Y., Ziegler, T.E., Roberts, J.K. and Heck, G.R.** (2011) Regulation of gene expression in plants through miRNA inactivation. *PLoS. One.* **6**, e21330.
- Iwasaki, M. and Paszkowski, J.** (2014) Identification of genes preventing transgenerational transmission of stress-induced epigenetic states. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **111**, 8547-8552.
- Jarillo, J.A. and Pineiro, M.** (2015) H2A.Z mediates different aspects of chromatin function and modulates flowering responses in *Arabidopsis*. *Plant J* **83**, 96-109.
- Jaskiewicz, M., Conrath, U. and Peterhansel, C.** (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep.* **12**, 50-55.

- Jeddeloh, J.A., Bender, J. and Richards, E.J.** (1998) The DNA methylation locus DDM1 is required for maintenance of gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev.* **12**, 1714-1725.
- Johnson, L.M., Du, J., Hale, C.J., Bischof, S., Feng, S., Chodavarapu, R.K., Zhong, X., Marson, G., Pellegrini, M., Segal, D.J., Patel, D.J. and Jacobsen, S.E.** (2014) SRA- and SET-domain-containing proteins link RNA polymerase V occupancy to DNA methylation. *Nature* **507**, 124-128.
- Karimi-Ashtiyani, R., Ishii, T., Niessen, M., Stein, N., Heckmann, S., Gurushidze, M., Banaei-Moghaddam, A.M., Fuchs, J., Schubert, V., Koch, K., Weiss, O., Demidov, D., Schmidt, K., Kumlehn, J. and Houben, A.** (2015) Point mutation impairs centromeric CENH3 loading and induces haploid plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **112**, 11211-11216.
- Khan, A.A., Betel, D., Miller, M.L., Sander, C., Leslie, C.S. and Marks, D.S.** (2009) Transfection of small RNAs globally perturbs gene regulation by endogenous microRNAs. *Nat. Biotechnol.* **27**, 549-555.
- Kim, J., Kim, J.H., Richards, E.J., Chung, K.M. and Woo, H.R.** (2014) Arabidopsis VIM proteins regulate epigenetic silencing by modulating DNA methylation and histone modification in cooperation with MET1. *Mol. Plant* **7**, 1470-1485.
- Kohler, A., Schwindling, S. and Conrath, U.** (2002) Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. *Plant Physiol* **128**, 1046-1056.
- Kornberg, R.D.** (1974) Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. *Science* **184**, 868-871.
- Kuppu, S., Tan, E.H., Nguyen, H., Rodgers, A., Comai, L., Chan, S.W. and Britt, A.B.** (2015) Point Mutations in Centromeric Histone Induce Post-zygotic Incompatibility and Uniparental Inheritance. *PLoS. Genet.* **11**, e1005494.
- Lang-Mladek, C., Popova, O., Kiok, K., Berlinger, M., Rakic, B., Aufsatz, W., Jonak, C., Hauser, M.T. and Luschnig, C.** (2010) Transgenerational inheritance and resetting of stress-induced loss of epigenetic gene silencing in Arabidopsis. *Mol. Plant* **3**, 594-602.
- Law, J.A., Du, J., Hale, C.J., Feng, S., Krajewski, K., Palanca, A.M., Strahl, B.D., Patel, D.J. and Jacobsen, S.E.** (2013) Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature* **498**, 385-389.
- Le, T.N., Miyazaki, Y., Takuno, S. and Saze, H.** (2015) Epigenetic regulation of intragenic transposable elements impacts gene transcription in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.* **43**, 3911-3921.
- Lee, S.I. and Kim, N.S.** (2014) Transposable elements and genome size variations in plants. *Genomics Inform.* **12**, 87-97.
- Lee, T.F., Gurazada, S.G., Zhai, J., Li, S., Simon, S.A., Matzke, M.A., Chen, X. and Meyers, B.C.** (2012) RNA polymerase V-dependent small RNAs in Arabidopsis originate from small, intergenic loci including most SINE repeats. *Epigenetics.* **7**, 781-795.
- Lermontova, I., Koroleva, O., Rutten, T., Fuchs, J., Schubert, V., Moraes, I., Koszegi, D. and Schubert, I.** (2011) Knockdown of CENH3 in Arabidopsis reduces mitotic divisions and causes sterility by disturbed meiotic chromosome segregation. *Plant J* **68**, 40-50.
- Lermontova, I., Sandmann, M., Mascher, M., Schmit, A.C. and Chaboute, M.E.** (2015) Centromeric chromatin and its dynamics in plants. *Plant J* **83**, 4-17.
- Lippman, Z. and Martienssen, R.** (2004) The role of RNA interference in heterochromatic silencing. *Nature* **431**, 364-370.
- Liu, Y., Koornneef, M. and Soppe, W.J.** (2007) The absence of histone H2B monoubiquitination in the Arabidopsis hub1 (rdo4) mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy. *Plant Cell* **19**, 433-444.

- Lopez, A., Ramirez, V., Garcia-Andrade, J., Flors, V. and Vera, P.** (2011) The RNA silencing enzyme RNA polymerase v is required for plant immunity. *PLoS. Genet.* **7**, e1002434.
- Luna, E., Bruce, T.J., Roberts, M.R., Flors, V. and Ton, J.** (2012) Next-generation systemic acquired resistance. *Plant Physiol* **158**, 844-853.
- Macho, A.P. and Zipfel, C.** (2014) Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Mol. Cell* **54**, 263-272.
- March-Diaz, R., Garcia-Dominguez, M., Florencio, F.J. and Reyes, J.C.** (2007) SEF, a new protein required for flowering repression in Arabidopsis, interacts with PIE1 and ARP6. *Plant Physiol* **143**, 893-901.
- March-Diaz, R., Garcia-Dominguez, M., Lozano-Juste, J., Leon, J., Florencio, F.J. and Reyes, J.C.** (2008) Histone H2A.Z and homologues of components of the SWR1 complex are required to control immunity in Arabidopsis. *Plant J* **53**, 475-487.
- March-Diaz, R. and Reyes, J.C.** (2009) The beauty of being a variant: H2A.Z and the SWR1 complex in plants. *Mol. Plant* **2**, 565-577.
- McCLINTOCK, B.** (1946) Maize genetics. *Year B Carnegie. Inst. Wash.* **45**, 176-186.
- McCue, A.D., Nuthikattu, S., Reeder, S.H. and Slotkin, R.K.** (2012) Gene expression and stress response mediated by the epigenetic regulation of a transposable element small RNA. *PLoS. Genet.* **8**, e1002474.
- McCue, A.D., Nuthikattu, S. and Slotkin, R.K.** (2013) Genome-wide identification of genes regulated in trans by transposable element small interfering RNAs. *RNA. Biol* **10**, 1379-1395.
- McCue, A.D., Panda, K., Nuthikattu, S., Choudury, S.G., Thomas, E.N. and Slotkin, R.K.** (2015) ARGONAUTE 6 bridges transposable element mRNA-derived siRNAs to the establishment of DNA methylation. *EMBO J* **34**, 20-35.
- McDowell, J.M. and Simon, S.A.** (2008) Molecular diversity at the plant-pathogen interface. *Dev. Comp Immunol.* **32**, 736-744.
- Mirouze, M., Reinders, J., Bucher, E., Nishimura, T., Schneeberger, K., Ossowski, S., Cao, J., Weigel, D., Paszkowski, J. and Mathieu, O.** (2009) Selective epigenetic control of retrotransposition in Arabidopsis. *Nature* **461**, 427-430.
- Mittelsten, S.O., Probst, A.V., Afsar, K. and Paszkowski, J.** (2002) Two regulatory levels of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **99**, 13659-13662.
- Mizusawa, K., Masuda, S. and Ohta, H.** (2008) Expression profiling of four RelA/SpoT-like proteins, homologues of bacterial stringent factors, in Arabidopsis thaliana. *Planta* **228**, 553-562.
- Plotshwa, S., Pruss, G.J., Gao, Z., Mgutshini, N.L., Li, J., Chen, X., Bowman, L.H. and Vance, V.** (2010) Transcriptional silencing induced by Arabidopsis T-DNA mutants is associated with 35S promoter siRNAs and requires genes involved in siRNA-mediated chromatin silencing. *Plant J* **64**, 699-704.
- Moissiard, G., Cokus, S.J., Cary, J., Feng, S., Billi, A.C., Stroud, H., Husmann, D., Zhan, Y., Lajoie, B.R., McCord, R.P., Hale, C.J., Feng, W., Michaels, S.D., Frand, A.R., Pellegrini, M., Dekker, J., Kim, J.K. and Jacobsen, S.E.** (2012) MORC family ATPases required for heterochromatin condensation and gene silencing. *Science* **336**, 1448-1451.
- Moissiard, G., Bischof, S., Husmann, D., Pastor, W.A., Hale, C.J., Yen, L., Stroud, H., Papikian, A., Vashisht, A.A., Wohlschlegel, J.A. and Jacobsen, S.E.** (2014) Transcriptional gene silencing by Arabidopsis microorchidia homologues involves the formation of heteromers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **111**, 7474-7479.
- Nishimura, T., Molinard, G., Petty, T.J., Broger, L., Gabus, C., Halazonetis, T.D., Thore, S. and Paszkowski, J.** (2012) Structural basis of transcriptional gene silencing mediated by Arabidopsis MOM1. *PLoS. Genet.* **8**, e1002484.

- Nota, F., Cambiagno, D.A., Ribone, P. and Alvarez, M.E.** (2015) Expression and function of AtMBD4L, the single gene encoding the nuclear DNA glycosylase MBD4L in Arabidopsis. *Plant Sci.* **235**, 122-129.
- Numa, H., Kim, J.M., Matsui, A., Kurihara, Y., Morosawa, T., Ishida, J., Mochizuki, Y., Kimura, H., Shinozaki, K., Toyoda, T., Seki, M., Yoshikawa, M. and Habu, Y.** (2010) Transduction of RNA-directed DNA methylation signals to repressive histone marks in Arabidopsis thaliana. *EMBO J* **29**, 352-362.
- Nuthikattu, S., McCue, A.D., Panda, K., Fultz, D., DeFraia, C., Thomas, E.N. and Slotkin, R.K.** (2013) The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiol* **162**, 116-131.
- Ortega-Galisteo, A.P., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R. and Roldan-Arjona, T.** (2008) Arabidopsis DEMETER-LIKE proteins DML2 and DML3 are required for appropriate distribution of DNA methylation marks. *Plant Mol. Biol* **67**, 671-681.
- Palma, K., Thorgrimsen, S., Malinovsky, F.G., Fiil, B.K., Nielsen, H.B., Brodersen, P., Hofius, D., Petersen, M. and Mundy, J.** (2010) Autoimmunity in Arabidopsis *acd11* is mediated by epigenetic regulation of an immune receptor. *PLoS. Pathog.* **6**, e1001137.
- Pandey, R., Muller, A., Napoli, C.A., Selinger, D.A., Pikaard, C.S., Richards, E.J., Bender, J., Mount, D.W. and Jorgensen, R.A.** (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of Arabidopsis thaliana suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res.* **30**, 5036-5055.
- Pavet, V., Olmos, E., Kiddle, G., Mowla, S., Kumar, S., Antoniw, J., Alvarez, M.E. and Foyer, C.H.** (2005) Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in Arabidopsis. *Plant Physiol* **139**, 1291-1303.
- Pavet, V., Quintero, C., Cecchini, N.M., Rosa, A.L. and Alvarez, M.E.** (2006) Arabidopsis displays centromeric DNA hypomethylation and cytological alterations of heterochromatin upon attack by *Pseudomonas syringae*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **19**, 577-587.
- Pecinka, A., Dinh, H.Q., Baubec, T., Rosa, M., Lettner, N. and Mittelsten, S.O.** (2010) Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**, 3118-3129.
- Pecinka, A., Dinh, H.Q., Baubec, T., Rosa, M., Lettner, N. and Mittelsten, S.O.** (2010) Epigenetic regulation of repetitive elements is attenuated by prolonged heat stress in Arabidopsis. *Plant Cell* **22**, 3118-3129.
- Pesaresi, P., Gardner, N.A., Masiero, S., Dietzmann, A., Eichacker, L., Wickner, R., Salamini, F. and Leister, D.** (2003) Cytoplasmic N-terminal protein acetylation is required for efficient photosynthesis in Arabidopsis. *Plant Cell* **15**, 1817-1832.
- Pfluger, J. and Wagner, D.** (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr. Opin. Plant Biol* **10**, 645-652.
- Pikaard, C.S., Haag, J.R., Pontes, O.M., Blevins, T. and Cocklin, R.** (2012) A transcription fork model for Pol IV and Pol V-dependent RNA-directed DNA methylation. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol* **77**, 205-212.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.A., Lerbs-Mache, S., Colot, V. and Lagrange, T.** (2005) Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in Arabidopsis. *Genes Dev.* **19**, 2030-2040.
- Pontvianne, F., Blevins, T. and Pikaard, C.S.** (2010) Arabidopsis Histone Lysine Methyltransferases. *Adv. Bot. Res.* **53**, 1-22.
- Probst, A.V. and Mittelsten, S.O.** (2015) Stress-induced structural changes in plant chromatin. *Curr. Opin. Plant Biol* **27**, 8-16.

- Qi, Y., He, X., Wang, X.J., Kohany, O., Jurka, J. and Hannon, G.J.** (2006) Distinct catalytic and non-catalytic roles of ARGONAUTE4 in RNA-directed DNA methylation. *Nature* **443**, 1008-1012.
- Rafiqi, M., Bernoux, M., Ellis, J.G. and Dodds, P.N.** (2009) In the trenches of plant pathogen recognition: Role of NB-LRR proteins. *Semin. Cell Dev. Biol* **20**, 1017-1024.
- Ramiro-Merina, A., Ariza, R.R. and Roldan-Arjona, T.** (2013) Molecular characterization of a putative plant homolog of MBD4 DNA glycosylase. *DNA Repair (Amst)* **12**, 890-898.
- Rosin, F.M., Watanabe, N., Cacas, J.L., Kato, N., Arroyo, J.M., Fang, Y., May, B., Vaughn, M., Simorowski, J., Ramu, U., McCombie, R.W., Spector, D.L., Martienssen, R.A. and Lam, E.** (2008) Genome-wide transposon tagging reveals location-dependent effects on transcription and chromatin organization in Arabidopsis. *Plant J* **55**, 514-525.
- Rubio-Somoza, I., Weigel, D., Franco-Zorilla, J.M., Garcia, J.A. and Paz-Ares, J.** (2011) ceRNAs: miRNA target mimic mimics. *Cell* **147**, 1431-1432.
- Schoft, V.K., Chumak, N., Mosiolek, M., Slusarz, L., Komnenovic, V., Brownfield, L., Twell, D., Kakutani, T. and Tamaru, H.** (2009) Induction of RNA-directed DNA methylation upon decondensation of constitutive heterochromatin. *EMBO Rep.* **10**, 1015-1021.
- Shah, J., Kachroo, P. and Klessig, D.F.** (1999) The Arabidopsis *ssi1* mutation restores pathogenesis-related gene expression in *npr1* plants and renders defensin gene expression salicylic acid dependent. *Plant Cell* **11**, 191-206.
- Shah, J. and Zeier, J.** (2013) Long-distance communication and signal amplification in systemic acquired resistance. *Front Plant Sci.* **4**, 30.
- Shook, M.S. and Richards, E.J.** (2014) VIM proteins regulate transcription exclusively through the MET1 cytosine methylation pathway. *Epigenetics.* **9**, 980-986.
- Shu, H., Nakamura, M., Siretskiy, A., Borghi, L., Moraes, I., Wildhaber, T., Gruissem, W. and Hennig, L.** (2014) Arabidopsis replacement histone variant H3.3 occupies promoters of regulated genes. *Genome Biol* **15**, R62.
- Sigman, M.J. and Slotkin, R.K.** (2016) The First Rule of Plant Transposable Element Silencing: Location, Location, Location. *Plant Cell.*
- Simon, L., Voisin, M., Tatout, C. and Probst, A.V.** (2015) Structure and Function of Centromeric and Pericentromeric Heterochromatin in Arabidopsis thaliana. *Front Plant Sci.* **6**, 1049.
- Simonich, M.T. and Innes, R.W.** (1995) A disease resistance gene in Arabidopsis with specificity for the *avrPph3* gene of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Mol. Plant Microbe Interact.* **8**, 637-640.
- Singh, P., Yekondi, S., Chen, P.W., Tsai, C.H., Yu, C.W., Wu, K. and Zimmerli, L.** (2014) Environmental History Modulates Arabidopsis Pattern-Triggered Immunity in a HISTONE ACETYLTRANSFERASE1-Dependent Manner. *Plant Cell* **26**, 2676-2688.
- Slotkin, R.K. and Martienssen, R.** (2007) Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat. Rev. Genet.* **8**, 272-285.
- Slotkin, R.K., Vaughn, M., Borges, F., Tanurdzic, M., Becker, J.D., Feijo, J.A. and Martienssen, R.A.** (2009) Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* **136**, 461-472.
- Slotkin, R.K.** (2010) The epigenetic control of the Athila family of retrotransposons in Arabidopsis. *Epigenetics.* **5**, 483-490.
- Soppe, W.J., Jasencakova, Z., Houben, A., Kakutani, T., Meister, A., Huang, M.S., Jacobsen, S.E., Schubert, I. and Fransz, P.F.** (2002) DNA methylation controls histone H3 lysine 9 methylation and heterochromatin assembly in Arabidopsis. *EMBO J* **21**, 6549-6559.

- Steimer, A., Amedeo, P., Afsar, K., Fransz, P., Mittelsten, S.O. and Paszkowski, J.** (2000) Endogenous targets of transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* **12**, 1165-1178.
- Stokes, T.L., Kunkel, B.N. and Richards, E.J.** (2002) Epigenetic variation in Arabidopsis disease resistance. *Genes Dev.* **16**, 171-182.
- Stroud, H., Hale, C.J., Feng, S., Caro, E., Jacob, Y., Michaels, S.D. and Jacobsen, S.E.** (2012) DNA methyltransferases are required to induce heterochromatic re-replication in Arabidopsis. *PLoS. Genet.* **8**, e1002808.
- Stroud, H., Do, T., Du, J., Zhong, X., Feng, S., Johnson, L., Patel, D.J. and Jacobsen, S.E.** (2014) Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in Arabidopsis. *Nat. Struct. Mol. Biol* **21**, 64-72.
- Talbert, P.B., Masuelli, R., Tyagi, A.P., Comai, L. and Henikoff, S.** (2002) Centromeric localization and adaptive evolution of an Arabidopsis histone H3 variant. *Plant Cell* **14**, 1053-1066.
- Tanurdzic, M., Vaughn, M.W., Jiang, H., Lee, T.J., Slotkin, R.K., Sosinski, B., Thompson, W.F., Doerge, R.W. and Martienssen, R.A.** (2008) Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS. Biol* **6**, 2880-2895.
- Tao, Y., Yuan, F., Leister, R.T., Ausubel, F.M. and Katagiri, F.** (2000) Mutational analysis of the Arabidopsis nucleotide binding site-leucine-rich repeat resistance gene RPS2. *Plant Cell* **12**, 2541-2554.
- Tessadori, F., Schulkes, R.K., van, D.R. and Fransz, P.** (2007) Light-regulated large-scale reorganization of chromatin during the floral transition in Arabidopsis. *Plant J* **50**, 848-857.
- Tessadori, F., van, Z.M., Pavlova, P., Clifton, R., Pontvianne, F., Snoek, L.B., Millenaar, F.F., Schulkes, R.K., van, D.R., Voeselek, L.A., Spillane, C., Pikaard, C.S., Fransz, P. and Peeters, A.J.** (2009) Phytochrome B and histone deacetylase 6 control light-induced chromatin compaction in Arabidopsis thaliana. *PLoS. Genet.* **5**, e1000638.
- Tittel-Elmer, M., Bucher, E., Broger, L., Mathieu, O., Paszkowski, J. and Vaillant, I.** (2010) Stress-induced activation of heterochromatic transcription. *PLoS. Genet.* **6**, e1001175.
- Todesco, M., Rubio-Somoza, I., Paz-Ares, J. and Weigel, D.** (2010) A collection of target mimics for comprehensive analysis of microRNA function in Arabidopsis thaliana. *PLoS. Genet.* **6**, e1001031.
- Tsuchiya, T. and Eulgem, T.** (2013) An alternative polyadenylation mechanism coopted to the Arabidopsis RPP7 gene through intronic retrotransposon domestication. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **110**, E3535-E3543.
- Tsuda, K., Mine, A., Bethke, G., Igarashi, D., Botanga, C.J., Tsuda, Y., Glazebrook, J., Sato, M. and Katagiri, F.** (2013) Dual regulation of gene expression mediated by extended MAPK activation and salicylic acid contributes to robust innate immunity in Arabidopsis thaliana. *PLoS. Genet.* **9**, e1004015.
- Vaillant, I., Schubert, I., Tourmente, S. and Mathieu, O.** (2006) MOM1 mediates DNA-methylation-independent silencing of repetitive sequences in Arabidopsis. *EMBO Rep.* **7**, 1273-1278.
- van der Biezen, E.A., Sun, J., Coleman, M.J., Bibb, M.J. and Jones, J.D.** (2000) Arabidopsis RelA/SpoT homologs implicate (p)ppGpp in plant signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 3747-3752.
- van, H.M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C.M. and Ton, J.** (2006) Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 5602-5607.
- van, Z.M., Koini, M.A., Geyer, R., Liu, Y., Brambilla, V., Bartels, D., Koornneef, M., Fransz, P. and Soppe, W.J.** (2011) Seed maturation in Arabidopsis thaliana is characterized by nuclear size reduction and increased chromatin condensation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **108**, 20219-20224.

- Verwoerd, T.C., Dekker, B.M. and Hoekema, A.** (1989) A small-scale procedure for the rapid isolation of plant RNAs. *Nucleic Acids Res.* **17**, 2362.
- Vongs, A., Kakutani, T., Martienssen, R.A. and Richards, E.J.** (1993) Arabidopsis thaliana DNA methylation mutants. *Science* **260**, 1926-1928.
- Wang, J., Meng, X., Yuan, C., Harrison, A.P. and Chen, M.** (2015a) The roles of cross-talk epigenetic patterns in Arabidopsis thaliana. *Brief. Funct. Genomics.*
- Wang, L.C., Wu, J.R., Chang, W.L., Yeh, C.H., Ke, Y.T., Lu, C.A. and Wu, S.J.** (2013b) Arabidopsis HIT4 encodes a novel chromocentre-localized protein involved in the heat reactivation of transcriptionally silent loci and is essential for heat tolerance in plants. *J Exp. Bot.* **64**, 1689-1701.
- Wang, L.C., Wu, J.R., Hsu, Y.J. and Wu, S.J.** (2015b) Arabidopsis HIT4, a regulator involved in heat-triggered reorganization of chromatin and release of transcriptional gene silencing, relocates from chromocenters to the nucleolus in response to heat stress. *New Phytol.* **205**, 544-554.
- Wang, X., Weigel, D. and Smith, L.M.** (2013a) Transposon variants and their effects on gene expression in Arabidopsis. *PLoS. Genet.* **9**, e1003255.
- Weiberg, A., Wang, M., Bellinger, M. and Jin, H.** (2014) Small RNAs: a new paradigm in plant-microbe interactions. *Annu. Rev. Phytopathol.* **52**, 495-516.
- Wessler, S.R.** (2006) Transposable elements and the evolution of eukaryotic genomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 17600-17601.
- Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R. and Pikaard, C.S.** (2009) RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.* **41**, 630-634.
- Wierzbicki, A.T.** (2010) Silencing: new faces of Morpheus' molecule. *EMBO J* **29**, 279-280.
- Wierzbicki, A.T., Cocklin, R., Mayampurath, A., Lister, R., Rowley, M.J., Gregory, B.D., Ecker, J.R., Tang, H. and Pikaard, C.S.** (2012) Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the Arabidopsis epigenome. *Genes Dev.* **26**, 1825-1836.
- Won, S.Y., Li, S., Zheng, B., Zhao, Y., Li, D., Zhao, X., Yi, H., Gao, L., Dinh, T.T. and Chen, X.** (2012) Development of a luciferase-based reporter of transcriptional gene silencing that enables bidirectional mutant screening in Arabidopsis thaliana. *Silence.* **3**, 6.
- Woo, H.R., Pontes, O., Pikaard, C.S. and Richards, E.J.** (2007) VIM1, a methylcytosine-binding protein required for centromeric heterochromatinization. *Genes Dev.* **21**, 267-277.
- Yang, S., Tang, F. and Zhu, H.** (2014) Alternative splicing in plant immunity. *Int. J Mol. Sci.* **15**, 10424-10445.
- Yelina, N., Diaz, P., Lambing, C. and Henderson, I.R.** (2015) Epigenetic control of meiotic recombination in plants. *Sci. China Life Sci.* **58**, 223-231.
- Yi, H. and Richards, E.J.** (2007) A cluster of disease resistance genes in Arabidopsis is coordinately regulated by transcriptional activation and RNA silencing. *Plant Cell* **19**, 2929-2939.
- Yi, H. and Richards, E.J.** (2009) Gene duplication and hypermutation of the pathogen Resistance gene SNC1 in the Arabidopsis bal variant. *Genetics* **183**, 1227-1234.
- Yokthongwattana, C., Bucher, E., Caikovski, M., Vaillant, I., Nicolet, J., Mittelsten, S.O. and Paszkowski, J.** (2010) MOM1 and Pol-IV/V interactions regulate the intensity and specificity of transcriptional gene silencing. *EMBO J* **29**, 340-351.
- Yu, A., Lepere, G., Jay, F., Wang, J., Bapaume, L., Wang, Y., Abraham, A.L., Penterman, J., Fischer, R.L., Voinnet, O. and Navarro, L.** (2013) Dynamics and biological relevance of DNA demethylation in Arabidopsis antibacterial defense. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **110**, 2389-2394.

- Zhai, J., Jeong, D.H., De, P.E., Park, S., Rosen, B.D., Li, Y., Gonzalez, A.J., Yan, Z., Kitto, S.L., Grusak, M.A., Jackson, S.A., Stacey, G., Cook, D.R., Green, P.J., Sherrier, D.J. and Meyers, B.C.** (2011) MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, trans-acting siRNAs. *Genes Dev.* **25**, 2540-2553.
- Zhang, K., Sridhar, V.V., Zhu, J., Kapoor, A. and Zhu, J.K.** (2007) Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS. One.* **2**, e1210.
- Zhang, W., Gao, S., Zhou, X., Chellappan, P., Chen, Z., Zhou, X., Zhang, X., Fromuth, N., Coutino, G., Coffey, M. and Jin, H.** (2011) Bacteria-responsive microRNAs regulate plant innate immunity by modulating plant hormone networks. *Plant Mol. Biol* **75**, 93-105.
- Zhang, Z. and Thomma, B.P.** (2013) Structure-function aspects of extracellular leucine-rich repeat-containing cell surface receptors in plants. *J Integr. Plant Biol* **55**, 1212-1223.
- Zheng, Q., Rowley, M.J., Bohmdorfer, G., Sandhu, D., Gregory, B.D. and Wierzbicki, A.T.** (2013) RNA polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *Plant J* **73**, 179-189.
- Zheng, Z., Mosher, S.L., Fan, B., Klessig, D.F. and Chen, Z.** (2007) Functional analysis of *Arabidopsis* WRKY25 transcription factor in plant defense against *Pseudomonas syringae*. *BMC. Plant Biol* **7**, 2.
- Zhou, M. and Law, J.A.** (2015) RNA Pol IV and V in gene silencing: Rebel polymerases evolving away from Pol II's rules. *Curr. Opin. Plant Biol* **27**, 154-164.
- Zhou, Y., Zhang, J., Lin, H., Guo, G. and Guo, Y.** (2010) MORPHEUS' MOLECULE1 is required to prevent aberrant RNA transcriptional read-through in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **154**, 1272-1280.
- Zhu, J.K.** (2009) Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annu. Rev. Genet.* **43**, 143-166.
- Zhu, Y., Rowley, M.J., Bohmdorfer, G. and Wierzbicki, A.T.** (2013) A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Mol. Cell* **49**, 298-309.
- Zilberman, D., Coleman-Derr, D., Ballinger, T. and Henikoff, S.** (2008) Histone H2A.Z and DNA methylation are mutually antagonistic chromatin marks. *Nature* **456**, 125-129.
- Zlatanova, J. and Thakar, A.** (2008) H2A.Z: view from the top. *Structure.* **16**, 166-179.