



**Centro de Investigación en Alimentación y  
Desarrollo, A.C.**

**ALTERACIONES EN LA EXPRESIÓN DE GENES QUE  
CODIFICAN ADN DEMETILASAS DE VID (*Vitis vinifera* L.) EN  
RESPUESTA A LA CRIOCONSERVACIÓN**

---

Por:

**Juan Luis García Vázquez**

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRO EN CIENCIAS**

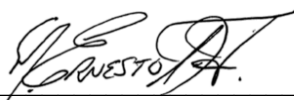
## APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Juan Luis García Vázquez la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestro en Ciencias.



---

Dra. Marisela Rivera Domínguez  
Directora de Tesis



---

Dr. Martín Ernesto Tiznado Hernández  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate  
Integrante del comité de tesis



---

Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez  
Integrante del comité de tesis

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en la tesis “Alteraciones en la Expresión de Genes que Codifican ADN Demetilasas de Vid (*Vitis vinifera* L.) en Respuesta a la Crioconservación” es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor Juan Luis García Vázquez, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita de quien ocupe la titularidad de la Dirección General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director(a) de tesis.



**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN  
ALIMENTACIÓN Y DESARROLLO, A.C.**  
Coordinación de Programas Académicos

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Pablo Wong González", is written over a horizontal line.

Dr. Pablo Wong González  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo económico otorgado para la realización de mis estudios de maestría.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por abrirme sus puertas y permitirme ser parte de su institución para realizar mis estudios de maestría.

A mi comité de tesis por aceptarme como su alumno y por su valiosa contribución para la realización de este proyecto.

A la Dra. María Fernanda Lazo Javalera y Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez por el tiempo y conocimiento brindado.

Al Dr. Martín Ernesto Tizado Hernández por los consejos, enseñanzas y conocimiento transmitido. Por su siempre amable disposición de tiempo, equipos, reactivos y acceso a su laboratorio.

Al Dr. Miguel Ángel Hernández Oñate por estar siempre al pendiente de la realización de este proyecto, apoyo escolar y su siempre disponibilidad por ayudar.

Un agradecimiento especial a la Dra. Marisela Rivera Domínguez por recibirme dentro de su laboratorio y darme la oportunidad de ser su estudiante. Por creer en mí y moldearme como un verdadero científico. Por el conocimiento transmitido, el apoyo económico y su valioso tiempo brindado.

A la QBC. Karen Rosalinda Astorga Cienfuegos por el apoyo técnico y asesorías durante toda la estancia en maestría.

Agradecimiento especial para mis padres el Sr. Juan Carlos García López y la Sra. Olga Araceli

Vázquez Ortiz porque siempre han creído en mis capacidades. Ellos merecen todo el crédito de lo que representa culminar esta etapa de maestría.

A mi pareja M.C. Mariana Quijada Rivera por su apoyo escolar, moral y por siempre creer en mí.

A todos ¡Muchas gracias!

## DEDICATORIA

*A mis padres les dedico este triunfo que, aunque para algunos puede ser pequeño es todo suyo,  
los amo.*

*A mi hermanas y abuela que adoro, siempre estuvieron presentes.*

*A mis abuelos y abuela, esto va para el cielo.*

*A mi novia, una meta cumplida a tu lado y quiero que vengan muchas mas, te amo mucho.*

## CONTENIDO

<b>APROBACIÓN</b> .....	2
<b>DECLARACIÓN INSTITUCIONAL</b> .....	3
<b>AGRADECIMIENTOS</b> .....	4
<b>DEDICATORIA</b> .....	6
<b>CONTENIDO</b> .....	7
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	9
<b>LISTA DE CUADROS</b> .....	11
<b>RESUMEN</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	14
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	15
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	17
2.1 Características e Importancia del Cultivo de Vid ( <i>Vitis vinifera</i> ).....	17
2.2 Técnicas de Crioconservación de Tejidos Vegetales.....	17
2.2.1 Técnica de Crioconservación de Tejidos Vegetales por Vitricación .....	18
2.2.2 Técnica de Crioconservación de Tejidos Vegetales por Encapsulación- Deshidratación.....	19
2.2.3 Técnica de Crioconservación de Tejidos Vegetales por Crioplasmas.....	20
2.3 Epigenética en Plantas .....	21
2.3.1 Modificaciones de las Histonas en Tejidos Vegetales.....	22
2.3.2 ARNi en Tejidos Vegetales .....	23
2.3.3 Metilación del ADN en Tejidos Vegetales.....	24
2.3.4 Desmetilación del ADN en Tejidos Vegetales .....	24
2.3.5 Metilación y Desmetilación del ADN por Estrés Biótico y Abiótico en Tejidos Vegetales .....	26
<b>3. HIPÓTESIS CIENTÍFICA</b> .....	29
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	30
4.1 Objetivo General.....	30
4.2 Objetivos Específicos.....	30
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	31
5.1 Muestreo de Uvas .....	31
5.2 Desinfección de Semillas.....	31
5.3 Extracción de Embriones Cigóticos de Vid.....	31
5.3.1 Tratamientos de Embriones Cigóticos de Vid .....	32
5.3.2 Regeneración <i>in vitro</i> a Planta Completa de los Embriones de Vid Crioconservados	32
5.4 Búsqueda de Genes de ADN Demetilasas de Vid en Base de Datos.....	33
5.5 Análisis Filogenético de ADN Demetilasas .....	33

## CONTENIDO (continuación)

5.6 Análisis de Promotores de Genes de ADN Demetilasas en Vid .....	33
5.7 Búsqueda de Dominios Conservados de Genes de ADN Demetilasas .....	34
5.8 Búsqueda de Regiones Codificantes y Secuencias Motivo de Genes de ADN Demetilasas .....	34
5.9 Diseño de Oligonucleótidos de Genes de ADN Demetilasas de Vid .....	34
5.10 Extracción de ARN Total y Síntesis de ADNc.....	35
5.11 Amplificación y Validación de Genes de Demetilasas de ADN en <i>V. vinifera</i> .....	35
5.12 Análisis de Expresión de ADN Demetilasas. ....	35
5.13 Diseño Experimental y Análisis Estadístico.....	36
<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>37</b>
6.1 Extracción y Regeneración de Embriones Cigóticos de Vid.....	37
6.2 Búsqueda de Genes de ADN Demetilasas de Vid en Base de Datos .....	39
6.3 Análisis Filogenético de Genes de ADN Demetilasas de Vid.....	40
6.4 Análisis de Promotores de Genes de ADN Demetilasas en Vid .....	42
6.5 Búsqueda de Dominios Conservados en Secuencias de aminoácidos de Genes de ADN Demetilasas de Vid.....	43
6.6 Búsqueda de Secuencias Motivo de Genes de ADN Demetilasas de Vid.....	44
6.7 Diseño de Oligonucleótidos de Genes de ADN Demetilasas de Vid .....	46
6.8 Validación de Genes por Amplificación de las Demetilasas del ADN en tejidos de <i>V. vinifera</i> .....	47
6.9 Efecto de la Vitricación y Criopreservación sobre la Expresión de Transcritos Codificando ADN Demetilasas en Vid .....	49
<b>7. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>8. PERSPECTIVAS .....</b>	<b>57</b>
<b>9. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>58</b>



## LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Plántulas regeneradas de vid crioconservadas, después de 32 días. A: regeneración de embriones control (sin tratamiento), B: regeneración de embriones tratados con AG3, C: regeneración de embriones tratados con PVS2, D: regeneración de embriones tratados con PVS2, D: Regeneración de embriones tratados con PVS2 + Nitrógeno Líquido. ....	39
2. Árboles filogenéticos de ADN demetilasas de DME y DML3 en <i>Vitis vinifera</i> . ....	41
3. Árboles filogenéticos de ADN demetilasa ROS1 en distintas especies vegetales. ....	42
4. Dominios conservados de ADN demetilasas en <i>Vitis vinifera</i> (VvDME: gen Demeter de <i>Vitis vinifera</i> , VvROS1: gen ROS de <i>Vitis vinifera</i> , VvDML3: gen Demeter like 3 de <i>Vitis vinifera</i> ). ....	44
5. Secuencias motivo de DME, ROS1 y DML3 en <i>Vitis vinifera</i> en comparación con su homólogo en <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....	46
6. Amplificación de GAPDH (A) DME (B) ROS1 (C) DML3 (D) en ADNg y ADNc de tejidos de embriones cigóticos, yemas y plantas completa de <i>V. vinifera</i> . Pozo 1: Marcador de peso molecular. Pozos 3-5: Muestras con ADNg. Pozos 7-9: Muestras con ADNc. ....	48
7. Curvas de disociación generadas utilizando los oligonucleótidos diseñados específicamente para GAPDH (A), DMT (B), ROS1 (C) y DML3 (D). ....	49
8. Validación del análisis de expresión relativa $\Delta\Delta Ct$ de plantas por rangos dinámicos. A: Análisis de eficiencia de la amplificación de GAPDH. B: Análisis de eficiencia de la amplificación de DMT. C: Análisis de eficiencia de la amplificación de ROS1. D: Análisis de la amplificación de DML3. ....	50
9. Validación del análisis de expresión relativa $\Delta\Delta Ct$ de embriones por rangos dinámicos. A: Análisis de eficiencia de la amplificación de GAPDH. B: Análisis de eficiencia de la amplificación de DMT. C: Análisis de eficiencia de la amplificación de ROS1. D: Análisis de eficiencia de la amplificación de DML3. ....	50
10. Comparación de la cuantificación de expresión relativa de genes ADN demetilasas (DMT, ROS1 y DML3) en tratamiento de vitrificación (PVS2) y crioconservación (PVS2 +NL) en embriones cigóticos de vid ( <i>Vitis vinifera</i> ). Las literales significan diferencias estadísticas entre tratamientos. ....	51
11. Comparación de la cuantificación de expresión relativa de genes ADN demetilasas (DMT, ROS1 y DML3) en tratamiento de vitrificación (PVS2) y crioconservación (PVS2 +NL) en plantas de vid ( <i>Vitis vinifera</i> ). Las literales significan diferencias estadísticas entre tratamientos. ....	52

## LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura	Página
12. Comparación de la expresión entre tejidos de embriones cigóticos y plantas de ADN demetilasas. Imagen A: Tratamiento PVS2 gen DMT, Imagen B: Tratamiento PVS2 gen ROS1, Imagen C Tratamiento PVS2 gen DML3, Imagen D: Tratamiento PVS2+NL gen DMT, Imagen E: Tratamiento PVS2+NL gen ROS1, Imagen D: Tratamiento PVS2+NL gen DML3. El color verde indica la expresión en el tejido de embriones cigóticos, color azul fuerte indica control con valor de 1, el color azul claro indica expresión en tejido de planta. Las literales significan diferencias estadísticas entre tratamientos. ....	53

## LISTA DE CUADROS

Cuadro	Página
1. Identificación de genes ADN demetilasas en <i>Vitis vinifera</i> . Valor de e-value, $1e-5$ .....	40
2. Factores de transcripción involucrados en la expresión de genes de ADN demetilasas en vid.....	43
3. Posibles funciones de secuencias motivo de los genes de ADN demetilasas en vid ( <i>Vitis vinifera</i> ). .....	46
4. Oligonucleotidos diseñados para ADN demetilasas de <i>Vitis vinifera</i> . .....	47

## RESUMEN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es un cultivo expuesto a estres biótico y abiótico, estas condiciones pueden causar alteraciones fenotípicas debido a los cambios genéticos y epigenéticos como metilación y desmetilación del ADN. Con el objetivo de conocer los posibles efectos de la crioconservación de vid en la actividad de las enzimas demetilasas de ADN, en este trabajo se plantea analizar la expresión de genes involucrados en la desmetilación de ADN de vid (*Vitis vinifera*) cv Redglobe post-crioconservación mediante vitrificación. Se obtuvo la caracterización de las ADN demetilasas mediante un análisis profundo *in silico* utilizando *Arabidopsis thaliana* como referencia, realizando un análisis filogenético, búsqueda de secuencias promotoras, dominios y motivos, y la cuantificación de expresión relativa mediante qRT-PCR usando el método de  $\Delta\Delta Ct$ . Se encontraron tres secuencias genéticas: VIT\_13s0074g00450 (DEMETER, DMT), VIT\_08s0007g03920 (Represor del Silenciamiento 1, ROS1), y VIT\_06s0061g01270 (DEMETER LIKE 3, DML3). En el análisis filogenético se encontró que las secuencias de *V. vinifera* y *A. thaliana* tenían la misma ascendencia común. Se estudiaron los promotores de los genes de ADN demetilasas, encontrando elementos de respuesta como AP-2, Myb, bZIP, TBP, y GATA, además se encontraron dominios conservados exclusivos de ADN demetilasas como RRM DME (Motivo de reconocimiento de ARN-DME) y Perm CXXC (Unidad zf-CXXC unica permutada). En la búsqueda de secuencias motivo se encontró que estas están relacionadas con la unión al ADN, la regulación de la expresión génica asociada a procesos de respuesta al estrés abiótico y la regulación del crecimiento celular. Para cada gen de ADN demetilasa (DMT, ROS1 y DML3) se obtuvieron varios conjuntos de cebadores utilizando el programa QuantPrime. Los cebadores fueron validados utilizando ADN genómico y ADNc de tejidos de *V. vinifera*. De acuerdo con los datos encontrados en este estudio se concluyó la caracterización de los genes ADN demetilasa de *V. vinifera* L. (DMT: VIT\_13s0074g00450, ROS1:VIT\_08s0007g03920, y DML3:VIT\_06s0061g01270) y mediante el análisis de expresión relativa se observó que el tratamiento de vitrificación no altera significativamente la expresión de genes de ADN demetilasas, en cambio, se observó que la crioconservación altera la expresión de los genes que codifican para ADN demetilasas (DMT, ROS1 y DML3). Las diferencias en la expresión de los genes dentro de los tratamientos y tejidos pueden ser a causa de las distintas funciones que realizan, alterando los niveles de metilación y

desmetilación del ADN durante la regulación genética en los tejidos.

**Palabras clave:** *Vitis vinifera*, Crioconservación, Genes de demetilasas, Demetilación del ADN.

## ABSTRACT

Grapevine (*Vitis vinifera* L.) is a crop exposed to biotic and abiotic stresses, these conditions can cause phenotypic alterations due to genetic and epigenetic changes such as DNA methylation and demethylation. In order to know the possible effects of grapevine cryopreservation on the activity of DNA demethylase enzymes, in this work we propose to analyze the expression of genes involved in the demethylation of grapevine (*Vitis vinifera*) cv Redglobe DNA after cryopreservation during vitrification. Characterization of DNA demethylases was obtained by a deep in silico analysis using *Arabidopsis thaliana* as reference, performing a phylogenetic analysis, search of promoter sequences, domains and motifs, and quantification of relative expression by qRT-PCR using the Ct method. Three gene sequences were found: VIT\_13s0074g00450 (DEMETER, DMT), VIT\_08s0007g03920 (Repressor of Silencing 1, ROS1), and VIT\_06s0061g01270 (DEMETER LIKE 3, DML3). In the phylogenetic analysis, the sequences of *V. vinifera* and *A. thaliana* were found to have the same common ancestry. The promoters of DNA demethylase genes were studied, finding response elements such as AP-2, Myb, bZIP, TBP, and GATA, and conserved domains unique to DNA demethylases such as RRM DME (RNA recognition motif-DME) and Perm CXXC (permuted single zf-CXXC unit). In the search for motif sequences, these were found to be related to DNA binding, regulation of gene expression associated with abiotic stress response processes and regulation of cell growth. For each DNA demethylase gene (DMT, ROS1 and DML3) several primer sets were obtained using the QuantPrime program. The primers were validated using genomic DNA and cDNA from *V. vinifera* tissues. Based on the data found in this study, the characterization of the DNA demethylase genes from *V. vinifera* L. (DMT: VIT\_13s0074g00450, ROS1:VIT\_08s0007g03920, and DML3:VIT\_06s0061g01270) and by relative expression analysis it was observed that vitrification treatment does not significantly alter the expression of DNA demethylase genes, instead, cryopreservation was observed to alter the expression of genes encoding for DNA demethylases (DMT, ROS1 and DML3). Differences in gene expression within treatments and tissues may be due to the different functions they perform, altering the levels of DNA methylation and demethylation during gene regulation in tissues.

**Key words:** *Vitis vinifera*, Cryopreservation, Demethylase genes, DNA demethylation.

## 1. INTRODUCCIÓN

La vid (*Vitis vinifera* L.) es una planta que tiene tallos sarmentosos y presenta sarcillo opuestos a sus hojas. En el mundo el requerimiento de uva se ha incrementado, incluso, en países que conforman el TLCAN (Tratado de Libre Comercio de América del Norte) y TPP (Tratado Integral y Progresivo de Asociación Transpacífico), China e integrantes de la Unión Europea. En México, su obtención es de gran importancia, el 63% es producida para consumo en fresco; 24.4% para elaborar jugos y vinos, mientras que para la producción de fruta seca se destina el 12.6% de la producción nacional. Las exportaciones por parte de México tuvieron mayor presencia en 2016 en el mercado de uva en Estados Unidos, Canadá, y El Salvador (SAGARPA, 2017). El principal productor de uva de mesa en México, es Sonora con casi 34 mil toneladas al año. Las principales variedades producidas son “Flame”, “Perlette”, “Redglobe” y “Superior” (SIAP, 2020). Las condiciones ambientales de las regiones productoras de uva y en específico la temperatura, tiene mucha importancia en el desarrollo de la vid (Winkler *et al.*, 1975), ya que, estos cultivos son modificados al estar consistentemente sometidos a estrés, abiótico y biótico, lo cual puede dañar la calidad y nivel de producción de los cultivos. Por lo tanto es primordial establecer alternativas para la preservación del germoplasma de vid (Lazo-Javalera *et al.*, 2013). La regeneración de plantas partiendo de callos o células es muy importante para la biotecnología ya que esta puede ser usada en el mejoramiento genético y conservación de la especie, un ejemplo de esto es la técnica de cultivo *in vitro*. Este método se fundamenta en regenerar en una planta a partir de un tejido mediante la utilización de hormonas, medios nutritivos y vitaminas con el fin de obtener grandes cantidades de plantas sanas en menor tiempo (Basail-Pérez *et al.*, 2018).

Por otro lado, la crioconservación es una buena alternativa para el almacenamiento y conservación del germoplasma. En su definición es la conservación del tejido, célula, u otro explante vegetal en nitrógeno líquido a -196°C (Li *et al.*, 2013). Representa una opción viable para la conservación del germoplasma ya que es de bajo costo, no requiere mucho mantenimiento y permite preservar la muestra por un periodo casi indefinido (Lazo-Javalera *et al.*, 2018). En vid se han establecido un número de diferentes protocolos de crioconservación (Tanaka *et al.*, 2019), incluyendo, vitrificación (Orizaba *et al.*, 2018), encapsulación/deshidratación (Wang *et al.*, 2000), encapsulación/vitrificación (Sakai *et al.*, 2008), micro-goteo (Uchendu *et al.*, 2019) y crio-placas

(Rafique *et al.*, 2015). La mayor efectividad del método de conservación depende del tipo de tejido y especie a crioconservar (Peredo *et al.*, 2008). Durante la crioconservación, el tejido se expone a distintos procesos, por lo que el tejido puede ser alterado de forma similar al efecto de ocasionado por distintos tipos de estrés, esto puede contribuir potencialmente a modificaciones genéticas y epigenéticas (Kaity *et al.*, 2008; Peredo *et al.*, 2008). Algunos estudios epigenéticos relacionados con la metilación de ADN en tejidos vegetales como uva, manzana, papaya, fresa que fueron crioconservados han sido reportados (Hao *et al.*, 2001, 2002; Kaity *et al.*, 2008; Peredo *et al.*, 2008; Kaczmarczyk *et al.*, 2010; Sisunandar *et al.*, 2010; Mikuła *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2015). En un estudio previo se logró obtener dos secuencias de expresión etiquetadas que codifican las enzimas de la familia 5-citosina ADN metiltransferasa de dominios alterados (DRM), dos que codifican la 5-citosina ADN metiltransferasa tipo 1 (MET1) y una de la familia de 5-citosina ADN metiltransferasa modificadora de la cromatina (CMT). Mediante el análisis de expresión relativa se observó que los tratamientos de crioconservación y vitrificación evaluados alteran la expresión de los genes que transcriben a las enzimas MET1 y DRM. Se pudo deducir gracias al ensayo de RT-PCR que los genes analizados son parte del mecanismo de regulación epigenética en embriones de uva y que posiblemente los tratamientos de vitrificación y crioconservación alteran el nivel de metilación del ADN en embriones cigóticos de uva crioconservados (García Coronado *et al.*, 2015). Sin embargo, a pesar de que en vid y en otros tejidos se han establecido diferentes protocolos de crioconservación, poco se conoce acerca de cómo las metodologías de crioconservación, el tiempo de mantenimiento en NL y los subsecuentes ciclos de propagación afectan el genoma de las plantas regeneradas después de largo tiempo de almacenamiento en NL (Adu-Gyamfi *et al.*, 2016). Por lo que en el presente trabajo se plantea analizar la expresión de genes involucrados en la desmetilación de ADN de vid (*Vitis vinifera*) cv Redglobe debido al efecto de la crioconservación.



## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Características e Importancia del Cultivo de Vid (*Vitis vinifera*)

La viticultura es uno de los cultivos con más antigüedad en el mundo. Al año se producen más de 65 millones de toneladas, el 80% de las mismas se utiliza para la producción de vino (Antoniolli *et al.*, 2015). El cultivo de uva (*Vitis vinifera*) posee una gran importancia económica, cultural, ya que se destina el 31% de su producción para consumo fresco, 2% comercializada como fruta seca y el resto (67%) empleada en la elaboración de vinos. Borja-Bravo *et al.*, (2016) afirma lo citado anteriormente al decir que una elevada producción de fruto significa, una fuente considerable de divisas y empleo alrededor del mundo.

En México, su historia empieza con las primeras especies de vid traídas por los españoles. Durante la conquista que comenzó a extender el cultivo por todo el territorio mexicano, sin embargo, fue en Baja California y Sonora, donde se vió un gran potencial, se comprobó que estos territorios tenían condiciones ideales para que esta actividad se desarrollara con la mejor calidad posible. Gracias al constante incremento que ha tenido la viticultura en México, es necesario establecer estrategias que contribuyan al correcto desarrollo del cultivo, en especial las relacionadas con la propagación y conservación del germoplasma de vid. Normalmente este cultivo se propaga vegetativamente por medio de acodos, aéreos o terrestres, e injertos (Hartmann y Kester, 1981), sin embargo, existen más formas de propagar la vid como lo es a través de estacas de madera dormante (36 a 46 cm de largo), estas se recolectan durante la temporada de invierno y son plantadas durante la primavera en contenedores y después son trasplantadas a la viña, este proceso tiene sus desventajas ya que es lento y limitado por estacionalidad (Pious Thomas y John W. Schiefelbein, 2001).

### 2.2 Técnicas de Crioconservación de Tejidos Vegetales

Las técnicas de crioconservación son utilizadas como un recurso vital para la conservación del

germoplasma de la planta a largo plazo, ya que requiere espacio y mantenimiento limitados, además se ha reportado que se puede mantener la estabilidad genética de la planta regenerada (Alansi *et al.*, 2019). La criopreservación es un método de conservación de materiales vegetales, utilizando, nitrógeno líquido (NL), a temperaturas ultrabajas ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). A estos niveles, teóricamente todas las actividades metabólicas de las células cesan, por lo que no se producen cambios metabólicos o genéticos durante el almacenamiento (Engelmann, 2004). Los enfoques de criopreservación basados en la vitrificación se combinaron con otros elementos para desarrollar nuevas técnicas, como la encapsulación/vitrificación (Matsumoto *et al.*, 1995) y la vitrificación de gotas (Schäfer-Menuhr *et al.*, 1997). Se han publicado recientemente protocolos de criopreservación utilizando una placa criogénica en aluminio (Sekizawa *et al.*, 2011; Yamamoto *et al.*, 2011; Yamamoto, Rafique, Fukui, *et al.*, 2012; Yamamoto, Rafique, Sekizawa, *et al.*, 2012; Matsumoto *et al.*, 2013). Sin embargo, los científicos han basado sus esfuerzos en evitar posibles cambios fisiológicos, bioquímicos y genéticos en tejidos vegetales criopreservados y regenerados, todo esto con la finalidad de evitar la congelación intracelular que ocurre mientras se realiza el enfriamiento rápido en NL (Sakai *et al.*, 2008).

Las estrategias clásicas de la criopreservación (congelación lenta y congelación rápida) se establecieron en el período de 1970 a 1980 (Kaviani, 2011). En el proceso de congelación lenta, las muestras (embriones y células) se exponen a compuestos crioprotectores (Dimetil-sulfoxido (DMSO), glicerol, etilenglicol y sacarosa), se colocan en criotubos y se sumergen en NL (Kumu *et al.*, 1983). Existen varias técnicas de criopreservación, tales como la vitrificación, la encapsulación deshidratación y el uso de crioplacas (Kulus y Zalewska, 2014), las cuales se describen a continuación.

### **2.2.1 Técnica de Criopreservación de Tejidos Vegetales por Vitrificación**

La vitrificación durante la criopreservación está definida como la transición de la fase líquida del agua a un estado vítrio sin que ocurra la formación de cristales (Uchendu *et al.*, 2019). Se han utilizado distintas soluciones de vitrificación como crioprotectores (Tanaka *et al.*, 2019). Sakai *et al.*, (2008) reporta las soluciones más comunes denominadas como soluciones de vitrificación

de plantas (PVS) # 2: (PVS2) y # 3 (PVS3). La solución PVS2 es la más utilizada y está compuesta de 30% (p/v) de glicerol, 15% (p/v) de etilenglicol, 15% (p/v) de dimetilsulfóxido (DMSO) y 0,4 M de sacarosa (pH 5,8) en MS medio de producción vegetal (Basail Pérez *et al.*, 2018).

El método de crioconservación por vitrificación en tejidos vegetales suele ser más complicado que en tejido de origen animal, esto es debido a la pared celular. El primer paso en la vitrificación es exponer a los explantes con una mezcla diluida de crioprotectores esto, con el objetivo de preparar al tejido para poder soportar ultrabajas temperaturas (nitrógeno líquido a  $-196^{\circ}\text{C}$ ) (Kulus y Zalewska, 2014). Matsumoto, en 2017 reportó que los meristemos de los brotes de muchas plantas no pueden crioconservarse de manera efectiva utilizando la deshidratación directa de PVS2 porque destruye las células o los tejidos debido a los efectos nocivos del estrés osmótico o la toxicidad química de PVS2, lo que resulta en un crecimiento bajo o nulo después de la crioconservación. Sin embargo, otros estudios demostraron que con la utilización de los procedimientos de osmoprotección (pre-cultivo en sacarosa y una combinación de glicerol 2 M + sacarosa 0.4M), se desarrollaron exitosamente varias especies de plantas después de la crioconservación por vitrificación (Pathirana *et al.*, 2016).

### **2.2.2 Técnica de Crioconservación de Tejidos Vegetales por Encapsulación-Deshidratación**

La encapsulación-deshidratación, consiste en el uso de alginato de calcio para la encapsulación y generalmente se utiliza para la formación de semillas artificiales (Benelli *et al.*, 2013). Se puede utilizar distintos tejidos, entre ellos meristemos de brotes *in vitro*; posteriormente, se encapsulan con ayuda de alginato de calcio, se incuban en sacarosa a distintas concentraciones para la deshidratación del material vegetal y finalmente se realiza la congelación a  $-196^{\circ}\text{C}$  en nitrógeno líquido. Para descongelar las muestras se utiliza un calentamiento en un baño de agua a  $38-40^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se regenera el tejido con ayuda de medio de cultivo especial para el tejido en cuestión (Bettoni *et al.*, 2016).

La concentración de alginatos influye en la dureza las perlas y en la capacidad de las puntas de los brotes criotratados para crecer después de la crioconservación (Wang *et al.*, 2018). El tamaño de las perlas afecta el tiempo de deshidratación para alcanzar un contenido de agua apropiado para las

cuentas. Una prueba contundente de que la metodología de encapsulación-deshidratación para la crioconservación es mejor fue reportado por Feng et al., (2013) en el cual realizaron una comparación entre las metodologías de vitrificación por gotas y encapsulación-deshidratación), en este estudio mostraron que el tiempo requerido entre los dos procedimientos fueron similares, sin embargo, el porcentaje de regeneración varió, siendo de 48% post-vitrificación y de 61% de regeneración post-encapsulación-deshidratación.

### **2.2.3 Técnica de Crioconservación de Tejidos Vegetales por Crioplacas**

Otras técnicas de crioconservación más recientes son las combinaciones para la vitrificación de gotas (DV), el procedimiento para la vitrificación utilizando crioplacas de aluminio (crioplacas V) y el procedimiento para la deshidratación del aire utilizando crioplacas (crioplacas D). Los métodos (V-D) son un híbrido entre vitrificación y encapsulación-deshidratación. En estos métodos se utiliza una placa de aluminio para que la transferencia de calor sea más eficiente, con el fin de disminuir la posibilidad de dañar y perder explantes, además de esta forma los explantes pueden tratarse eficientemente con cualquier pretratamiento. Este método incluye pasos similares a los otros métodos de crioconservación, ya que el tejido vegetal se encapsula en pequeñas gotas de alginato que se unen a una placa de aluminio que es introducida en un criotubo de 2 ml. Posterior a la osmoprotección, el material se deshidrata en una campana de flujo laminar de aire en el caso del método de crioplaca D o mediante el uso de una solución de vitrificación en el caso de la crioplaca V (Yamamoto *et al.*, 2015). Con cualquiera de estos nuevos procedimientos, las muestras a crioconservar se sumergen directamente en nitrógeno líquido (NL) en tiras de papel de aluminio o crioplacas de aluminio (Tanaka *et al.*, 2019). En las técnicas de crioplacas V y D, los explantes se tratan con solución de vitrificación y se deshidratan mediante una campana de flujo de aire (Rafique *et al.*, 2015). Los principales beneficios de la crioplaca D son un manejo fácil y rápido durante todo el procedimiento, una reducción en la posibilidad de lesiones y una duración óptima de deshidratación (Niino *et al.*, 2013). En un estudio reciente se demostró la crioconservación efectiva en orquídea utilizando técnicas de crioplacas V y D resultando positiva la germinación (Jitsopakul *et al.*, 2019). Tanaka *et al.*, en el 2019 se utilizó el protocolo de criopreservación por

crioplacas D, indicando ser eficiente para las puntas de brotes de morera subtropicales y tropicales *in vitro* presentando un crecimiento constante, ligeramente más bajo que la técnica de crioplaca V.

### 2.3 Epigenética en Plantas

La epigenética fue definida como "el estudio de la función génica con cambios hereditarios mitóticos y/o meióticos que no pueden explicarse por cambios en la secuencia de ADN" (Waddington, 2012), por lo que los cambios epigenéticos están relacionados con modificaciones genéticas heredables (Feng *et al.*, 2010; Fujimoto *et al.*, 2012). Es ampliamente aceptado que los mecanismos epigenéticos han sido la fuente de variabilidad durante la selección de variedades de cultivo (Amoah *et al.*, 2012). Las modificaciones de ADN e histonas, factores de modulación de la cromatina forman los tipos de modificaciones epigenéticas que las plantas pueden sufrir a lo largo de su desarrollo y estas modificaciones también controlan el desarrollo de muchas eucariotas, particularmente eucariotas complejos.

Las plantas son sésiles o inmóviles por lo que deben reaccionar a los cambios locales de clima y a varios desafíos ambientales, como el estrés biótico y abiótico (Li *et al.*, 2018). En ellas, el control del desarrollo por mecanismos epigenéticos podría considerarse constitutivo (señales internas) u opcional (señales externas). El control constitutivo se basa en las características internas del desarrollo. El control de desarrollo opcional, por otro lado, se basa en indicadores ambientales externas y responden a diferentes ambientes desarrollando plasticidad, dando lugar a fenotipos ambientales específicos (Bräutigam y Cronk, 2018). La metilación el ADN del quinto carbono de los residuos de citosina es una de las modificaciones epigenéticas que cuentan con más estudios tanto en plantas como en mamíferos. (Saze *et al.*, 2012). Puede haber tres tipos de cambios epigenéticos reguladores: metilación del ADN, modificación de histonas o ARN de interferencia (RNAi) que las plantas utilizan para adaptarse y sobrevivir a los diferentes estreses bióticos y abióticos.

### 2.3.1 Modificaciones de las Histonas en Tejidos Vegetales

El ADN forma complejos de nucleoproteínas con las histonas, en lo que se conoce como cromatina. El nucleosoma, el cual es la unidad básica de la cromatina, está compuesto por 146 nucleótidos de ADN envueltos en un octámero de dos copias de cada una de las cuatro proteínas altamente básicas distintas llamadas histonas y conocidas con el nombre de H2A, H2B, H3 y H4 (Kornberg, 1974). Las histonas son susceptibles a una amplia gama de alteraciones posiblemente heredables y reversibles como acetilación, metilación, fosforilación, desaminación e isomerización de prolina (Ding *et al.*, 2014). Las alteraciones de histonas hacen alusión a los cambios covalentes post-traduccionales en las colas de las histonas que son esenciales para la estructura dinámica de cromatina y procesos celulares (Peng y Zhang, 2009). Se han identificado más de 100 modificaciones diferentes de histonas, desde un estudio minucioso de la metilación y acetilación de lisina, fosforilación de treonina y serina (Kouzarides, 2007; Tan *et al.*, 2011).

La metilación de histonas ocurre en residuos de lisina y arginina. La metilación del residuo de lisina en la histona puede tener diferentes funciones biológicas dependiendo de los sitios de metilación y el número de grupos metilo añadidos, puede ser mono, di o trimetilación. Se han identificado proteínas que pueden reconocer la metilación específica de lisina. Dos tipos de histona demetilasa catalizan la eliminación de la metilación en el residuo de lisina: proteínas que contienen un dominio llamado jumonjiC (JmjC) específicas de lisina (Li *et al.*, 2020). La metilación de la lisina, por ejemplo, es catalizada por metiltransferasas (MT) del dominio SET. Una segunda clase de MT estructuralmente no relacionada está representada por la levadura Dot1, pero no se discute más ya que se ha progresado poco en su estudio en hongos (Takahashi *et al.*, 2011). En todo el genoma de la planta, los transposones enriquecidos con heterocromatina (TE) y las secuencias repetitivas se definen mediante mono y dimetilación de la histona H3 lisina 9 (H3K9me1 y H3K9me2), que también conservan continuamente el estado represivo de la heterocromatina (Bernatavichute *et al.*, 2008). La metilación que ocurre en H3K9 está catalizada por H3K9 KRYPTONITE (KYP) / SUVH4, SUVH5 y SUVH6 metiltransferasas (Ebbs *et al.*, 2005).

La acetilación de histonas juega un papel crítico en la arquitectura global de cromatina y la regulación de la expresión génica (Lu y Thompson, 2012). El nivel de acetilación de histonas está regulado dinámicamente por acciones antagónicas entre las acetiltransferasas de histonas (HAT), las desacetilasas de histonas (HDAC) en respuesta a cambios ambientales.

### 2.3.2 ARNi en Tejidos Vegetales

Las plantas han desarrollado sistemas inmunes innatos sofisticados en respuesta a la presión de infección a largo plazo de microbios y plagas. Dichos sistemas inmunes de las plantas son similares en muchas características de la inmunidad innata de los animales, como las proteínas receptoras intracelulares y de la membrana plasmática asociadas al reconocimiento de patógenos, las cascadas de señalización de la proteína quinasa activada por mitógeno (Huang *et al.*, 2019). Si bien la mayoría de los estudios en esta área se han centrado en el papel y la señalización de los receptores PRR y NLR del huésped y las proteínas efectoras microbianas, los pequeños ARN (sRNA) y la maquinaria de ARN de interferencia (RNAi) se han identificado como reguladores esenciales para la reprogramación de la expresión de genes en las respuestas inmunes de las plantas, virulencia de patógenos e interacción planta-microbio (Huang *et al.*, 2019). Los ARN de interferencia (ARNi) participan en procesos de silenciamiento de genes conservados controlados por ARN pequeños (ARNp). Esto ha comenzado a surgir como algunos de los procesos más esenciales a nivel transcripcional o postranscripcional en eucariotas para controlar la expresión génica y reprimir elementos transponibles (TE). En las plantas se han descrito muchas especies de RNAp que difieren en biogénesis y funciones (Fang y Qi, 2015). Los ARN's, producidos por la enzima Dicer de la enzima tipo ribonucleasa III o las proteínas tipo Dicer (DCL) en la mayoría de los eucariotas, se incorporan a las proteínas Argonautas (AGO) para inducir el silenciamiento génico específico de la secuencia, a menudo a través de la escisión y degradación del ARNm (ARN mensajero), la inhibición de la traducción o silenciamiento genético transcripcional (Baulcombe, 2004). Los DCL y los AGO son, con mucho, los componentes más importantes del sistema RNAi, ya que los DCL generan RNA y operan para silenciar los genes objetivo a través de los AGO. DCL1 es esencial para la sobreexpresión de miRNAs (microRNA), siRNAs (small interference RNA) de los cuatro *Arabidopsis* DCL's, y desempeña un papel en la protección de las plantas. Los patógenos virales de plantas involucran genomas diversificados, que incluyen ARN monocatenario (ssRNA), ARN bicatenario (dsRNA), ADN monocatenario (ssADN) o ADN bicatenario (dsADN) (Huang *et al.*, 2016). Las enfermedades infecciosas de las plantas pueden reducir la calidad de los cultivos, contribuyendo a grandes pérdidas globales. La protección antiviral basada en la interferencia de ARN (ARNi) se encuentra entre las vías de defensa primaria más utilizada en las plantas (Yang y Li, 2018).

### 2.3.3 Metilación del ADN en Tejidos Vegetales

La metilación del ADN es una forma rápida de adaptación al medio ambiente, ya que cambios en la metilación del ADN producen fenotipos alterados (Alonso *et al.*, 2016). Hoy en día se consideran a los mecanismos epigenéticos como mediadores de adaptación al medio ambiente. Se han realizado amplios estudios que permiten establecer una relación entre la metilación del ADN en plantas y las condiciones del medioambiente (Alonso *et al.*, 2016). La metilación del ADN generalmente se refiere a la modificación de la citosina para convertirse en 5-metilcitosina (5mC). La metilación del ADN en los dinucleótidos CG es evolucionariamente conservada en plantas, mamíferos y algunos hongos. En *Arabidopsis*, la metilación de CG y CHG se mantiene principalmente mediante ADN metiltransferasa 1 (MET1) (Han *et al.*, 2019). La metilación del ADN ayuda a organizar la cromatina en regiones heterocromáticas compactas, requiere silenciamiento repetido y ha estado involucrada en el control de la expresión génica y la recombinación (Bräutigam y Cronk, 2018). La capacidad de modelar patrones de metilación del ADN en resolución de base única ofrece posibilidades para una mejor comprensión de varios aspectos de la metilación del ADN, como la regulación genética, la herencia transgeneracional, la variabilidad genética y las implicaciones funcionales (He y Li, 2018). En la planta, la metilación del ADN *de novo* es un proceso complejo bajo un estricto control de la vía de metilación del ADN dirigida por ARN (RdDM). RdDM es un proceso de múltiples pasos que consiste en la biogénesis de ARN interferente pequeño dependiente de polimerasa IV (siRNA), la metilación de ADN *de novo* mediada por polimerasa V y la modificación de la cromatina (Elhamamsy, 2016).

### 2.3.4 Desmetilación del ADN en Tejidos Vegetales

La desmetilación del ADN ocurre a través de una fase pasiva o activa. La desmetilación pasiva del ADN corresponde a la pérdida de la metilación del ADN durante la replicación del ADN debido a la reducción o inactivación de las enzimas que conducen a la metilación del ADN (Zhu, 2009). La desmetilación pasiva del ADN se documentó durante la producción de gametofitos en plantas con flores (Li *et al.*, 2018). Se identificaron elementos transponibles (TE) en el polén que se reactivaron inesperadamente solo en la célula vegetativa, que sigue a la célula de esperma, pero no



proporciona ADN al cigoto fertilizado. La desmetilación del ADN activa es iniciada por la familia de ADN glicosilado que incluye Demeter (DME), Silencing Repressor 1 (ROS1), tipo Demeter 2 (DML2) y tipo Demeter 3 (DML3) (Zhu, 2009). Un mecanismo basado en la reparación de escisión basal (BER) (Drohat y Coey, 2016). Además de ser esencial para la reprogramación epigenética de todo el genoma, la desmetilación activa del ADN a menudo media la activación de genes específicos (Li *et al.*, 2018). ROS1, DML2 y DML3 están presentes en todos los tejidos vegetativos, mostrando redundancia funcional parcial. Sin embargo, un triple mutante de *Arabidopsis* ROS1, DML2 y DML3 (rdd) mostró hipermetilación del ADN en casi 9000 loci, que fue un número significativamente mayor que el número de *loci* específicamente dirigido por ROS1 (Han *et al.*, 2019).

Existen varios estudios en diferentes especies de plantas en los que se han aislado y caracterizado ADN demetilinasas como lo son: fresa (Gu *et al.*, 2016), pera (Liu *et al.*, 2018), berenjena (Moglia *et al.*, 2019) y vid (Shangguan *et al.*, 2020). Se ha demostrado que varias enzimas asignadas como glicosilasas de ADN en plantas presentan una actividad de desmetilación del ADN las cuales utilizan la vía de reparación por escisión de bases. DEMETER (DMT) y REPRESOR DE SILENCIO 1 (ROS1) son los fundadores de una familia vegetal de glicosilasas de ADN, que incluye a DEMETER-LIKE 2 (DML2) y DML3 (Law y Jacobsen, 2010). Todas estas enzimas son proteínas grandes las cuales tienen el dominio de la superfamilia de ADN glicosilasas RRM DME, también llamadas enzimas de reparación de ADN (Kiselev *et al.*, 2013). Se ha demostrado que la desmetilación es parte fundamental del desarrollo y envejecimiento de las plantas. En un estudio realizado en *Arabidopsis* se encontró que los niveles de metilación bajaban significativamente durante la expresión genes ADN demetilinasas (DME, ROS1, DML2 y DML3), esto indica que las regiones metiladas del ADN pueden sufrir desmetilación mientras envejecen mediante la reducción de los procesos de metilación del ADN (Ogneva *et al.*, 2016). Los experimentos *in vitro* en distintos tejidos vegetales como embriones cigóticos y plantas han demostrado que las cuatro glicosilasas del ADN vegetal son capaces de cortar el enlace N-glicosídico entre la columna vertebral del ADN y la 5-metilcitosina (Ikeda y Kinoshita, 2009). Aunque las enzimas ADN demetilinasas pueden tener un sustrato específico muy similar, tienen diferentes funciones biológicas dentro de las plantas (Law y Jacobsen, 2010b). Desde que ROS1 se describió por primera vez en plantas de *Arabidopsis* modificadas genéticamente, se designó su papel de eliminar la metilación de la citosina de la secuencia del transgén, y muchos *loci* objetivo de RdDM en plantas mutantes de *ros1* mostraron

una disminución en la metilación de CHG (Gong *et al.*, 2002). Los análisis de knock-down revelaron que en los elementos transponibles y las secuencias repetidas, DML2 y DML3 eliminan la metilación de la citosina, y 179 loci estaban hipermetilados en el triple mutante *ros1 dml2 dml3*. Por otro lado, se ha demostrado que DML2 y DML3 son necesarios para una alta metilación significativa (Kiselev *et al.*, 2013). En 2020 Shangguan *et al.*, aislaron y caracterizaron secuencias de ADN demetiladas durante el desarrollo en vid (*Vitis vinifera*), se realizó una comparación entre genes reportados en *Arabidopsis* y encontraron que DME, ROS1 y DML3 estaban presentes en vid.

### **2.3.5 Metilación y Desmetilación del ADN por Estrés Biótico y Abiótico en Tejidos Vegetales**

El estrés es cualquier situación adversa que impacte en la progresión, crecimiento y rendimiento de un organismo. Puede ser una situación abiótica, ocasionada por luz, temperatura y salinidad, mientras que el estrés biótico es producido por los organismos vivos que tienen influencia en un ecosistema. Varios reportes recientes muestran que diferentes tipos de estrés ocasionan distintas alteraciones epigenéticas tales como la metilación y desmetilación del ADN, (Elhamamsy, 2016). En *Arabidopsis thaliana*, el gen *AtHKT1* que codifica la proteína transportadora de sodio desempeña un papel crucial en la tolerancia a la sal de la planta, esto quiere decir que al no haber metilación hubo expresión de genes de respuesta involucrados (Deinlein *et al.*, 2014). La metilación del ADN en el promotor *AtHKT1* controla la expresión de *AtHKT1*. Por lo tanto, (Baek *et al.*, 2011) reportó que *Arabidopsis* mutante a *MET1* fue hipersensible al estrés salino debido a la pérdida sustancial de metilación de citosina y la expresión modificada del gen *AtHKT1*. En las raíces de maíz, la exposición al estrés por frío disminuye la expresión de genes *MET1* y reduce el nivel de *MET1* que conduce a la desmetilación de los elementos transponibles Activador / Disociación (Ac/Ds). En un estudio realizado por (Hao *et al.*, 2002) donde crioconservaron puntas de brotes de 10 genotipos distintos de fresa por el método de encapsulación-deshidratación, se midió el nivel de metilación de las muestras el cual mostró aumento y se encontró evidencia de que la crioconservación se relaciona con el estado de metilación del ADN. En otro estudio, esta vez en *Arabidopsis thaliana*, expuestas a crioconservación-vitrificación, obtuvieron que los cambios en

los niveles de metilación del ADN está directamente relacionado con el tratamiento de criopreservación, sin embargo, no se observaron alteraciones en los rasgos fenotípicos de las plantas (Wang y He, 2009).

En un estudio en *Quercus robur* se evaluó el nivel global de metilación del ADN después de la crioprotección, la desecación y el almacenamiento y encontraron que la desecación y el almacenamiento en nitrógeno líquido no tuvieron ningún efecto sobre el estado de metilación del ADN de las plúmulas de *Q. robur* (Plitta *et al.*, 2014). Otro estudio similar fue llevado a cabo en semillas de *Quercus robur* y *Fagus sylvatica*, donde se evaluó la metilación del ADN mediante un anticuerpo particular dirigido a la citosina metilada en los dinucleótidos CpG. El ADN extraído de los tejidos fue tratado a deshidratación (control), una combinación de deshidratación y solución de vitrificación de plantas, así como enfriamiento rápido en nitrógeno líquido a una temperatura de -196 °C, los resultados obtenidos fueron una desmetilación del ADN mucho mayor en los tejidos tras la criopreservación en nitrógeno líquido que en los controles o en los tejidos que fueron vitrificados (Nuc *et al.*, 2016).

La desmetilación del ADN tiene dos vías, la vía pasiva se da cuando existe una ausencia de metilación en el ADN durante varios ciclos de replicación del mismo (Kress *et al.*, 2001), por otra parte, existe la desmetilación activa del ADN mediante enzimas que remueven el grupo metil del carbono 5 de la citosina por medio de la vía de reparación por excisión de bases (BER) (Zhang *et al.*, 2018). Los ROS1, DML2 y DML3 de *Arabidopsis* se encuentran en diversos tejidos vegetativos de la planta y parecen contribuir a la estabilidad y flexibilidad del epigenoma, además de proteger el genoma contra la metilación excesiva (Tang *et al.*, 2016). En un estudio se crearon alelos mutantes de pérdida de función de DML2, un gen del tomate que está estrechamente relacionado con el gen de la demetilasa del ADN de *Arabidopsis* ROS1. Muchos genes tuvieron una mayor metilación del ADN en los frutos de los mutantes del tomate. Se detectó que el gen de ADN demetilasa DML3 se está expresando positivamente por lo cual, llegaron a la conclusión de que DML2 es necesario para la maduración del fruto del tomate, y que la desmetilación activa del ADN es necesaria tanto para la activación de los genes inducidos por la maduración como para la inhibición de los genes reprimidos por la maduración (Lang *et al.*, 2017). Satgé *et al.* (2016) reportaron que la relación de trabajo de las leguminosas con las bacterias fijadoras de nitrógeno del suelo está parcialmente regulada por la desmetilación activa del ADN; los autores reportaron que *Medicago truncatula* cuenta con cuatro miembros de la familia DML (Tipo DEMETER) llamadas

(MtDME, MtDML1, MtROS (Represor del Silenciador) y MtROSL1(Tipo Represor del Silenciador) y que en los nódulos inducidos por *Rhizobium*, solo MtDME está regulado positivamente.

De acuerdo a los estudios descritos relacionados con las técnicas de crioconservación de plantas, claramente se puede observar la necesidad de optimizar las técnicas de crioconservación a fin de evitar modificaciones epigenéticas relacionadas con la metilación-desmetilación del ADN durante los procedimientos de crioconservación en *Vitis vinifera* y así mantener la fidelidad fenotípica y genotípica de las plantas crioconservadas.

### **3. HIPÓTESIS CIENTÍFICA**

La crioconservación mediante vitrificación induce la expresión de los genes DMT (DEMETER), ROS1 (Represor del silenciamiento 1), DML3 (Tipo DEMETER 3) relacionados con la desmetilación de ADN en embriones cigóticos y plantas de vid (*Vitis vinifera*).

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo General

Analizar la expresión de genes involucrados en la desmetilación de ADN de vid (*Vitis vinifera*) cv redglobe post-crioconservación.

### 4.2 Objetivos Específicos

Realizar la crioconservación de embriones cigóticos de vid y la regeneración a plantas completas.

Desarrollar el análisis bioinformático de genes de ADN demetilasas de vid.

Analizar mediante RT-qPCR los cambios en expresión de genes de ADN demetilasas de embriones y plantas de vid crioconservadas.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

### 5.1 Muestreo de Uvas

Las frutas de vid del cultivar red globe se obtuvieron del mercado de abasto y de establecimientos comerciales locales en cajas con aproximadamente 10 kg de fruta, en la ciudad de Hermosillo, Sonora, México.

### 5.2 Desinfección de Semillas

Las uvas o bayas se desinfectaron con jabón y agua, posteriormente se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Con ayuda de bisturí estéril se separaron las semillas de las bayas en campana de flujo laminar y se colocaron en cajas Petri estériles. Se realizó una prueba de viabilidad mediante flotación (Ugbede y Hamadina, 2018) en agua. Se desecharon las semillas que flotan y aquellas que precipitaron fueron lavadas con jabón y con agua destilada estéril (3 veces), posteriormente se lavaron con etanol 70% por 5 minutos y NaOCl al 1.5% por 15 minutos y se enjuagaron con agua destilada estéril (3 veces).

### 5.3 Extracción de Embriones Cigóticos de Vid

La extracción del embrión de las semillas de vid se realizó en campana de flujo laminar (Horizontal Laminar Flow Cabinet, Esco Airstream®) bajo condiciones estériles con ayuda de un bisturí y estereoscopio (Daigger Scientific Inc.).

El control positivo fue embriones sin tratamiento, los cuales se colocaron en medio de regeneración de acuerdo a lo reportado (García Coronado *et al.*, 2015).

### **5.3.1 Tratamientos de Embriones Cigóticos de Vid**

En la primera fase del tratamiento se dejaron las semillas de vid en ácido giberélico con concentración de 1 ppm durante 24 horas. Posteriormente se realizaron lavados con jabón y agua, se aplicó etanol 70% por 5 minutos y NaOCl al 1.5% por 15 minutos. Se lavaron 3 veces con agua destilada estéril. Se extrajeron 50 embriones y se colocaron en 10 frascos (5 embriones por frasco) conteniendo medio de regeneración. En la segunda fase del tratamiento se dejaron las semillas de vid en ácido giberélico con concentración de 1 ppm durante 24 horas, posteriormente se separaron de las semillas los embriones (50 embriones), se colocaron en PVS2 (30% (w/v) glicerol, 15% (w/v) etilenglicol, 15% (w/v) DMSO y 0.4 M sacarosa) al 50% a 25°C en agitación durante 10 minutos y después en PVS2 100% a 4°C durante 10 minutos y se colocaron en medio de regeneración.

En la tercera fase del tratamiento se trataron las semillas de vid en ácido giberélico, se separaron 50 embriones y se les aplicó el tratamiento con PVS2 al 50% durante 10 minutos a 25°C y al 100% durante 10 minutos a 4°C, al finalizar, las semillas se congelaron en nitrógeno líquido (NL) durante 30 minutos, se descongelaron en baño María a una temperatura de 38°C durante 3 minutos en baño María, y se colocaron en medio de regeneración hasta la obtención de planta completa para una posterior extracción de ARN total (García Coronado *et al.*, 2015).

### **5.3.2 Regeneración *in vitro* a Planta Completa de los Embriones de Vid Crioconservados**

En campana de flujo laminar horizontal, previamente esterilizada con etanol (70%) e hipoclorito de sodio (1.5%), los embriones se colocaron en medio de cultivo para inducir germinación. El medio de germinación de embriones contiene macronutrientes, micronutrientes y vitaminas del medio MS (García Coronado *et al.*, 2015) suplementado con 0.035 mg de ácido giberélico, 50 mg de mio-inositol, 50 mg de hidrolizado de caseína, 30 g de sacarosa, 8 g de agar y 3 g de carbón activado. Los embriones se incubaron a 25°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad en una cámara de crecimiento hasta obtener planta completa (García Coronado *et al.*, 2015).



#### 5.4 Búsqueda de Genes de ADN Demetilasas de Vid en Base de Datos

Se realizó una búsqueda de genes relacionados con desmetilación de ADN a partir de lo reportado en bibliografía utilizando la base de datos The Arabidopsis Information Resource (TAIR) (<https://www.arabidopsis.org/>). Se seleccionaron las secuencias de los genes DEMETER AT5G04560.2, ROS1 AT2G36490.1, y DEMETER-LIKE 3 AT4G34060.1 de *Arabidopsis thaliana* como secuencias referencia para alineamiento contra genoma de vid.

Se realizó una búsqueda de secuencias conservadas en vid en la página web <https://plants.ensembl.org/index.html> introduciendo las secuencias de genes seleccionadas y haciendo un alineamiento en BLAST contra el genoma de vid.

#### 5.5 Análisis Filogenético de ADN Demetilasas

Con las secuencias identificadas por BLAST de ADN demetilasas en vid y las secuencias de referencia de *Arabidopsis thaliana*, se realizó un análisis filogenético con el programa “Clustal Omega” en el cual se ingresaron las secuencias de ADN demetilasas en vid y secuencias control (genes de *Arabidopsis thaliana*) (Madeira *et al.*, 2019).

#### 5.6 Análisis de Promotores de Genes de ADN Demetilasas en Vid

Dentro de la secuencia de genes de ADN se aislaron 1200 pb de la region 5' del gen a partir de codón de inicio (ATG), para identificar los elementos en cys conservados. Una vez obtenida esta secuencia se analizó con el programa PlantPAN 3.0 (Chow *et al.*, 2019).

## 5.7 Búsqueda de Dominios Conservados de Genes de ADN Demetilinas

Se realizó una búsqueda de dominios conservados de genes de ADN demetilinas en vid, utilizando la secuencia de aminoácidos de cada gen, comparando con la secuencia de referencia de *Arabidopsis thaliana* en la página del NCBI <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

## 5.8 Búsqueda de Regiones Codificantes y Secuencias Motivo de Genes de ADN Demetilinas

La identificación de los ORF`s (Marco de lectura abierto) de las secuencias que codifican para ADN demetilasa (DEMETER, ROS1 y DEMETER LIKE 3) se realizó con la herramienta Orffinder del NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>).

Para las secuencias motivo se utilizó el programa MEME, en el cual se introdujeron las secuencias de aminoácidos de las ADN demetilinas identificadas in vivo y las secuencias de referencia en *Arabidopsis thaliana* (Timothy y Charles, 1994).

## 5.9 Diseño de Oligonucleótidos de Genes de ADN Demetilinas de Vid

Se realizó el diseño de oligonucleótidos para qRT-PCR mediante el programa “QuantPrime”, obteniéndose 10 pares de primers para los genes DEMETER VIT\_13s0074g00450, ROS1 VIT\_08s0007g03920, y DEMETER-LIKE 3 VIT\_06s0061g01270. La anotación utilizada fue EnsemblGenomes release 14 (genoma +) con el organismo *Vitis vinifera*, el protocolo fue SYBR Green real-time qPCR (no splice variant hits).

## 5.10 Extracción de ARN Total y Síntesis de ADNc

Los tejidos crioconservados se colocaron en microtubos estériles de 1.5 ml y se pulverizaron con micropistilos para extraer el ARN total utilizando el ‘RNeasy plant mini kit’, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (QIAGEN México, D.F.). Se determinó la pureza, concentración e integridad del ARN total mediante cuantificación espectrofotométrica en NanoDrop ND-1000 UV-Vis y electroforésis en gel de agarosa en buffer TAE al 1% teñido con gel red, visualizándolo con luz U.V. en un transiluminador. Se registraron los resultados de la electroforésis mediante un fotodocumentador digital. Posteriormente, se realizó la síntesis del cDNA utilizando el ARN total según lo indica el kit ‘SMARTer PCR cDNA synthesis kit’ (Clontech Laboratories USA, CA).

### 5.11 Amplificación y Validación de Genes de Demetilasas de ADN en *V. vinifera*

La amplificación de las demetilasas de ADN (DME, DML3 y ROS1) se realizó utilizando ADN genómico y ADNc de yemas, plantas y embriones cigóticos de *V. vinifera*. Se utilizó GAPDH como gen constitutivo. La condición de PCR se realizó para GAPDH (1- 94°C 2 min, 2c- 94°C 15 s, 3c- 66 °C 30 s , 4c- 68 °C 1 min, 5- 4°C --:-- , 35 ciclos 2-4), DME (1- 94°C 2 min, 2c- 94°C 15 s, 3c- 69 4 °C 30 s , 4c- 68 °C 1 min, 5- 4°C --:-- , 35 ciclos 2-4), ROS1 (1- 94°C 2 min, 2c- 94°C 15 s, 3c- 68 °C 30 s , 4c- 68 °C 1 min, 5- 4°C --:-- , 35 ciclos 2-4), DML3 (1- 94°C 2 min, 2c- 94°C 15 s, 3c- 67 °C 30 s , 4c- 68 °C 1 min, 5- 4°C --:-- , 35 ciclos 2-4). Se obtuvieron las condiciones de análisis de la qRT-PCR para cada gen (GAPDH, DMT, ROS1 y DML3) (1- 94°C 5 min, 2c- 94°C 15 s, 3c- 68 °C 1 min, 4- 95 °C 15 s, 5- 60°C 1 min, 6-95 °C 15 s, 40 ciclos 2-3).

### 5.12 Análisis de Expresión de ADN Demetilasas.

Se realizó el análisis de expresión relativa ( $\Delta\Delta C_t$ ) por qRT-PCR con el kit “Luna® Universal qPCR Master Mix (New England)” en un termociclador ‘StepOne™ Real Time PCR System de Applied

Biosystems en plántulas de vid durante la crioconservación. El gen que codifica para la enzima gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) de *V. vinifera* se utilizó como gen constitutivo o normalizador (VvGAPDH-F y VvGAPDH-R) de acuerdo a (Reid *et al.*, 2006).

Las condiciones de reacción de qRT-PCR utilizadas fueron las especificadas en el kit “Luna® Universal qPCR Master Mix (New England)” con 100 ng de oligonucleótidos y 50 ng de cDNA. La cuantificación se realizó por duplicado incluyendo controles negativos sin templado para cada uno de los transcritos evaluados. Asimismo, se construyó una curva de disociación para verificar la especificidad de amplificación de los oligonucleótidos y se analizó la eficiencia de amplificación respecto al gen endógeno para cada uno de los genes.

### 5.13 Diseño Experimental y Análisis Estadístico

Todos los experimentos presentaron un diseño completamente al azar con al menos 5 réplicas biológicas en cada tratamiento. Las medias de los resultados de expresión se compararon utilizando una prueba de Dunnett con el programa NCSS 2021 con un 95% de confianza.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1 Extracción y Regeneración de Embriones Cigóticos de Vid

En el tratamiento control se empezó a observar inicios de regeneración a partir del día 3 y finalmente se obtuvo un porcentaje de regeneración del 88%; para el tratamiento 1 (ácido giberélico, AG3) se empezó a partir del día 4 y logrando un porcentaje de regeneración del 90%, en el tratamiento 2 (AG3+PVS2) se empezó a ver regeneración a partir del día 7 alcanzando un porcentaje de regeneración del 24% y por último, en el tratamiento 3 (AG3+PVS2+NL) la regeneración empezó a partir del día 7 consiguiendo un porcentaje de regeneración del 4%. La rapidez en la regeneración de los embriones mostro una relación inversa con las etapas del procedimiento de crioconservación: control $\geq$ tratamiento AG<sub>3</sub>>PVS2>PVS2+NL.

Se llevó a cabo un experimento de regeneración en meristemos apicales de *V. vinifera* en el cuál el porcentaje de regeneración disminuyó con el aumento de la exposición de PVS2 (Shatnawi *et al.*, 2011). Otro estudio similar realizado por Markovic *et al.*, (2015), utilizando como tejido meristemos apicales de *V. vinifera* demostraron que la capacidad de desarrollo de los embriones disminuyó con el aumento en los tiempos de vitrificación.

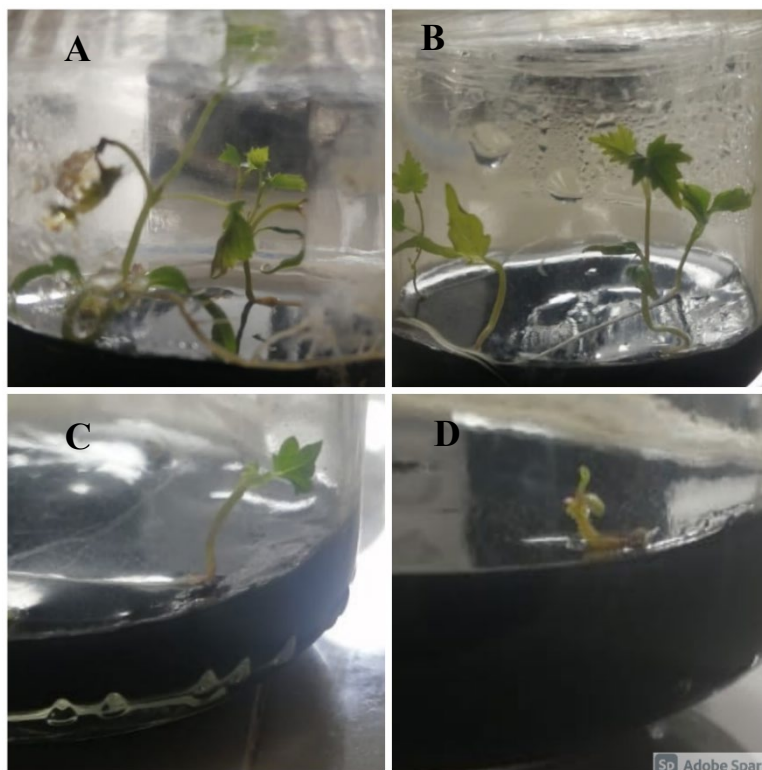
En la **Figura 1** se observa que la regeneración de embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera*) después de 32 días de la regeneración control, tratamiento con AG<sub>3</sub>, PVS2 y del tratamiento de crioconservación (PVS2+NL), ha sido efectiva en todos los tratamientos, eaunque se observaron diferencias significativas en cuanto a tiempo de crecimiento y a proceso de regeneración. En el Control + (**Figura 1A**): Se observan plántulas más grandes con hojas y un enraizamiento más pronunciado, se obtuvo un 88% de regeneración, en el tratamiento con AG<sub>3</sub> (**Figura 1B**) se puede observar un tallo menos vigoroso que contrasta con la imagen de la **Figura 1A**, obteniendo un porcentaje de regeneración del 90%, en el tratamiento con AG<sub>3</sub>+PVS2 el porcentaje de germinación obtenido fue 24% (**Figura 1C**), en esta etapa se ve claramente que hay una disminución del tamaño de la plántula, así como el número de explantes regenerados y en el tratamiento con AG<sub>3</sub>+PVS2+NL (**Figura 1D**) se registró una regeneración del 4% y un retraso evidente en el crecimiento de la planta. Los resultados obtenidos en este trabajo coinciden con los reportados por García-Coronado *et al.*, en 2015, considerando que estos autores obtuvieron mas del 75% de

regeneración en tratamiento control y disminuyó en el tratamiento con PVS2 a un 30% de regeneración, por lo que se puede decir que una posible causa por la cual la regeneración fue disminuyendo a lo largo de los tratamientos es el estrés causado por la exposición a crioprotectores, ya que esto ocasiona deshidratación en las células con la finalidad de que no se formen cristales de hielo y también el estrés generado por el proceso de crioprotección, ya que el embrión está sometido a ultra bajas temperaturas. Datos similares fueron reportados por Lazo, *et al.*, (2018) en un estudio en el cual utilizó el método de crioprotección por vitrificación en yemas de vid de 0-420 min. Los resultados mostraron un 30 % de regeneración utilizando PVS3, un 25 % utilizando solo glicerol y >10 % utilizando PVS2 sugiriendo que el tiempo de exposición a PVS2 es esencial para la viabilidad de los tejidos. En 2018 un estudio realizado por Lineros *et al.*, en *P. radiata* en el cual se evaluó la viabilidad del tejido crioprotectado con crioprotectores y el porcentaje de reactivación del tejido. Los resultados mostraron que la viabilidad de los tejidos tratados fueron menores que el control, utilizando como crioprotectores una combinación de 0.4 M de sorbitol, 5% (p/v) dimetilsulfóxido y 0.09 M de L-prolina. Lo anterior demuestra la necesidad de la optimización de la metodología de crioprotección.

En el presente trabajo, se observó un retraso en los tiempos de crecimiento de las plantas tratadas en comparación a las plantas control, también se observaron cambios morfológicos debido al estrés sometido por vitrificación y crioprotección de las plantas después de 32 días de germinación en cultivo *in vitro*, los resultados sugieren diferencias evidentes en la longitud de los tallos de plantas tratadas en comparación con aquellas sin tratar, también encontramos diferencias en el número de hojas y la longitud de las raíces primarias de las plantas vitrificadas y crioprotectadas (**Figura 1**) En otro estudio realizado en coco, la longitud de la raíz primaria mostró un retraso significativo en el desarrollo morfológico de las plántulas recuperadas de los embriones crioprotectados (Sisunandar *et al.*, 2010).

En contraste a lo anterior, se han realizado estudios en los cuales no existe evidencia de cambios morfológicos después del tratamiento de crioprotección a diferentes tejidos vegetales. En 2011, se realizó un estudio en plátano en el cual los meristemas fueron tratados con el método de crioprotección mediante un protocolo denominado método simple, basado en un precultivo de los agregados de meristemas en medio enriquecido con 0.4-0.5 M de sacarosa, durante tres semanas, seguido de enfriamiento rápido, lo cuales fueron desarrollados a plantas de campo. Este estudio reportó no haber encontrado diferencias significativas de variaciones morfológicas en plantas crioprotectadas (Torres *et al.*, 2011).

Debido a los resultados obtenidos en el presente trabajo y a que existen varios estudios relacionados con la vitrificación y crioconservación, podemos aseverar que aún falta trabajo para que el método utilizado sea efectivo en cuanto a regeneración y viabilidad se refiere, ya que se necesita optimizar los tiempos de exposición a nitrógeno líquido y también se requiere la optimización para el mejoramiento de la técnica de descongelación, además, se podría ayudar a los embriones añadiendo elementos antioxidantes para evitar la acumulación de especies reactivas de oxígeno provocadas por la exposición al estrés de la crioconservación.



**Figura 1.** Plántulas regeneradas de vid crioconservadas, después de 32 días. A: regeneración de embriones control (sin tratamiento), B: regeneración de embriones tratados con AG3, C: regeneración de embriones tratados con PVS2, D: regeneración de embriones tratados con PVS2 + Nitrógeno Líquido.

## 6.2 Búsqueda de Genes de ADN Demetilasas de Vid en Base de Datos

Las modificaciones epigenéticas en la planta son comunes cuando la planta es sometida a un estrés

biotico o abiótico. El estrés que causa estar expuesto a bajas o ultrabajas temperaturas puede inducir la expresión de ADN demetilasas en la planta (Sirohi *et al.*, 2016). Roldan-Arjona *et al.*, (2009) generaron reportes genéticos y bioquímicos, que indican la existencia de dos proteínas de *Arabidopsis thaliana* las cuales tienen dominio ADN glicosilasa llamadas represor del silenciamiento 1 (ROS1) y DEMETER (DME). Estas proteínas tienen como función desmetilar el ADN y están relacionadas con la expresión positiva de los genes que han sido silenciados con anterioridad, por la acción de la metilación. En la actualidad, el único organismo donde se ha visto reportado la presencia de enzimas pertenecientes a la familia DML (DEMETER-LIKE) es en *Arabidopsis thaliana* (Mart, 2012). Debido a lo anterior se realizó la búsqueda en la base de datos TAIR (<https://www.arabidopsis.org/>) y se encontraron secuencias de ADN demetilasas DEMETER AT5G04560.2, ROS1 AT2G36490.1, y DEMETER-LIKE 3 AT4G34060.1 de *Arabidopsis thaliana*. Después de realizado un BLAST con el genoma de vid (*Vitis vinifera*), se obtuvieron las siguientes secuencias para cada uno de los genes seleccionados DEMETER VIT\_13s0074g00450, ROS1 VIT\_08s0007g03920, y DEMETER-LIKE 3 VIT\_06s0061g01270 en vid (**Cuadro 1**). Esto coincide con un reporte en el cual se realizó la caracterización de genes de ADN metiltransferasas y ADN demetilasas en vid, ellos indican que los genes reportados como DEMETER, ROS1 y DEMETER-LIKE 3 en *Arabidopsis thaliana* son VIT\_13s0074g00450, VIT\_08s0007g03920 y VIT\_06s0061g01270 en *Vitis vinifera*, respectivamente (Shangguan *et al.*, 2020).

**Cuadro 1.** Identificación de genes ADN demetilasas en *Vitis vinifera*. Valor de e-value,  $1e^{-5}$

Gen ID	Tamaño en aminoácidos	Localización en el cromosoma	órtologo en <i>A. thaliana</i>	Anotación
VIT_13s0074g00450	1873	13:8239220–8249559	AT5G04560.2	DMT
VIT_08s0007g03920	1775	8:17914203–17923902	AT2G36490.1	ROS1
VIT_06s0061g01270	932	6:19096083–19101208	AT4G34060.1	DML3

### 6.3 Análisis Filogenético de Genes de ADN Demetilasas de Vid

Existen estudios en los cuales se han observado homólogos de DMT, ROS1 y DML3 en *Arabidopsis thaliana* (Penterman *et al.*, 2007; Nie *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2019; Khouider *et al.*,



2021). Con el objetivo de encontrar secuencias (hits) en *vid* dentro de la misma familia de genes que las secuencias referencia (*Arabidopsis*), se alinearon y obtuvieron resultados de análisis filogenéticos que se muestran en la **Figura 2**, para DMT y DML3 respectivamente. Se puede observar cómo los hits pertenecen a la misma familia de genes que los de la referencia (*Arabidopsis thaliana*). Los resultados arrojados por el programa “Clustal Omega” muestran que VIT\_13s0074g00450 (DMT) fue el más cercano a la secuencia de referencia de *Arabidopsis thaliana* (AT5G04560.2), así mismo, VIT\_06s0061g01270 (DML3) mostró más semejanza a las secuencias referencia de *Arabidopsis thaliana* (AT4G34060.1) (**Figura 2**). Para la secuencia de VIT\_08s0007g03920 (ROS1) se tomó como referencia lo reportado donde indican que el homólogo en *Arabidopsis thaliana* es AT2G36490 (Shangguan *et al.*, 2020). Las secuencias de *Vid* identificadas se compararon con otras a través de un análisis filogenético, para ello se tomaron varias secuencias de ADN demetilinasas en distintas especies de plantas (*Arabidopsis thaliana*, *Camelina sativa*, *Carica papaya*, *Citrus clementina*, *Brassica napus*, *Vitis riparia*) y se realizó un análisis filogenético con a todas las secuencias resultando en cercanía o ascendencia común entre el gen de referencia y gen de *Vitis* (**Figura 3**).



**Figura 2.** Árboles filogenéticos de ADN demetilinasas de DME y DML3 en *Vitis vinifera*.

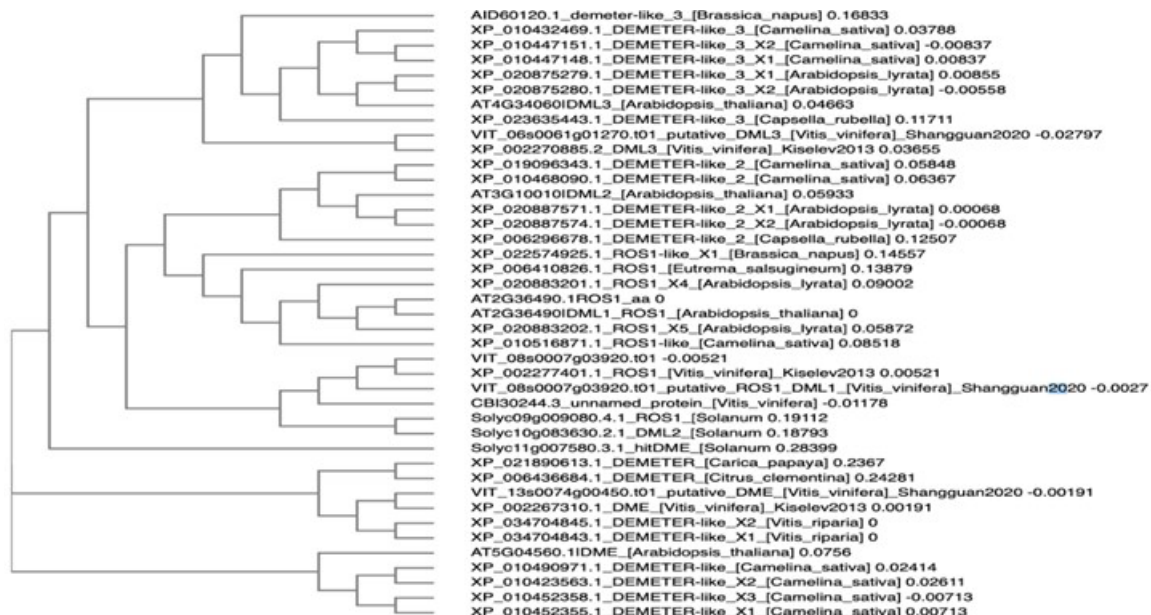


Figura 3. Árboles filogenéticos de ADN demetilasa ROS1 en distintas especies vegetales.

#### 6.4 Análisis de Promotores de Genes de ADN Demetilasas en Vid

Los resultados arrojados por el programa PlanPAN 3.0 nos indican que existen regiones en el promotor a donde se unen factores de transcripción (FT) que influyen en la expresión de los genes de ADN demetilasas. En el **Cuadro 2**, se muestran los FT mostrados por el programa, a los cuales se les relaciona con la regulación de la expresión de genes debido al estímulo a diversos factores, tales como: estrés por infecciones, factores de crecimiento, regulación de la expresión génica asociada con procesos de respuesta a estrés abiótico. Los factores de transcripción AP2/ERF (APETALA2) son una amplia categoría de factores de transcripción que se encuentran principalmente en las plantas. Muchos procesos biológicos y fisiológicos, como la morfogénesis de las plantas, los mecanismos de respuesta al estrés, la transducción de señales hormonales y la regulación de metabolitos, están regulados por factores de transcripción de esta familia (Zhang *et al.*, 2012; Feng *et al.*, 2020). La clase más diversa de factores de transcripción en eucariotas es la proteína básica de hélice-bucle-hélice (bHLH), que regula la expresión de los genes al interactuar con un motivo específico en los genes objetivo. El factor de transcripción bHLH también es importante en la respuesta al estrés de las plantas. En el estudio reportado por Sun *et al.*, (2018) se analizó el papel de bHLH en las plantas en respuesta a estímulos como la sequía, la sal y el estrés

por frío. Otro de los factores de transcripción encontrados en el análisis de promotores realizado fue el de Myb, la familia de proteínas MYB es amplia y funcionalmente diversa. La familia de proteínas MYB son factores de transcripción, con diferentes cantidades de repeticiones del dominio MYB que confieren capacidad de unión al ADN. Las plantas han aumentado selectivamente la familia MYB, en particular a través de la familia R2R3-MYB. Como indica su amplia caracterización funcional en *Arabidopsis*, los miembros de esta familia están implicados en una serie de actividades específicas de las plantas (*Arabidopsis thaliana*). Las proteínas MYB son componentes importantes de las redes reguladoras que controlan el desarrollo, el metabolismo y las respuestas al estrés biótico y abiótico (Dubos *et al.*, 2010). En las especies eucariotas, las cremalleras básicas de leucina (bZIP) son factores de transcripción evolutivamente conservados. Se ha visto que los factores de transcripción bZIP en *Arabidopsis thaliana* desempeñan un papel en el desarrollo de la planta, respuesta ambiental y la respuesta al estrés, entre otras cosas (Jakoby *et al.*, 2002; Dröge-Laser *et al.*, 2018). Es debido a lo anterior que es posible decir que lo encontrado en este trabajo sugiere que las ADN demetilases, cumplen una función ante el estrés biótico y abiótico.

**Cuadro 2.** Factores de transcripción involucrados en la expresión de genes de ADN demetilases en vid.

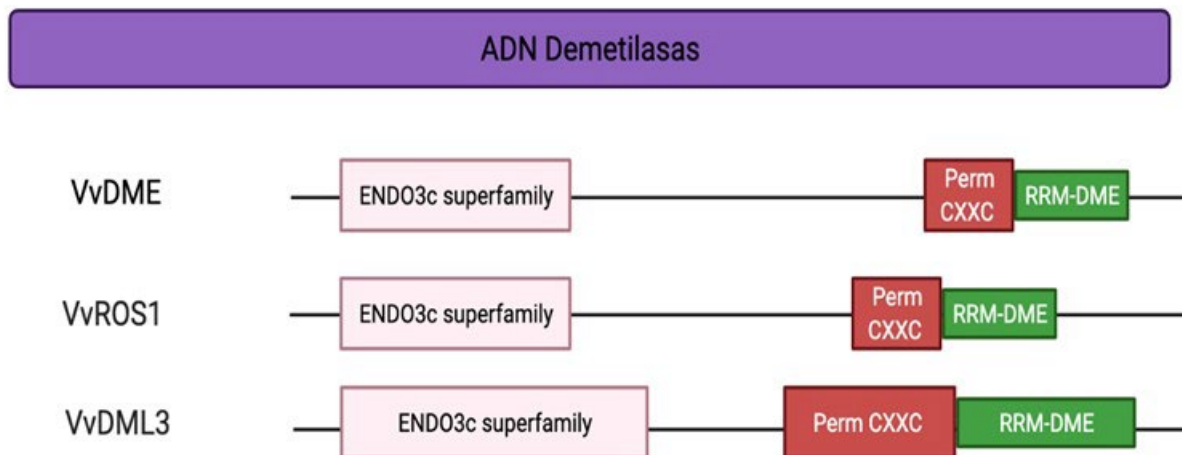
ADN demetilases ( <i>Vitis vinifera</i> )	
GEN ID	Familia de FT
GSVIVG00002262001	AP-2
GSVIVG00013553001	bHLH
GSVIVG00005816001	Myb
GSVIVG00017011001	GATA
GSVIVG00000175001	MADS box
GSVIVG00025497001	TBP
GSVIVG00009846001	bZIP

## 6.5 Búsqueda de Dominios Conservados en Secuencias de aminoácidos de Genes de ADN

### Demetilases de Vid

Dentro de las secuencias de aminoácidos seleccionadas en el presente estudio se encontraron dominios que nos permiten decir que estos genes codifican para proteínas con función de ADN

demetilinas en vid, los dominios conservados que se encontraron fueron RRM DME, el cual es un dominio de pliegues de RRM predicho presente en el extremo C-terminal de glicosilasas similares a Demeter (**Figura 4**). Estas proteínas están involucradas en la desmetilación del ADN en plantas donde catalizan la eliminación de la base 5mC y posteriormente escinden la base a través de la actividad liasa y Perm CXXC, la cual es una versión permutada de una sola unidad del dominio zf-CXXC que se detecta en las proteínas similares a Demeter de las plantas terrestres. Gianoglio *et al.*, en el 2017 realizó una evaluación de los niveles transcripcionales de ADN metiltransferasas y ADN demetilinas en *Globe artichoke*, los resultados mostraron que existían dominios RRM DME y Perm CXXC en los genes detectados. En 2020, se trabajó con *Quercus suber L.* y se realizó una identificación y clasificación de ADN demetilinas en la planta, encontrando los dominios RRM DME y Perm CXXC (Silva *et al.*, 2020).



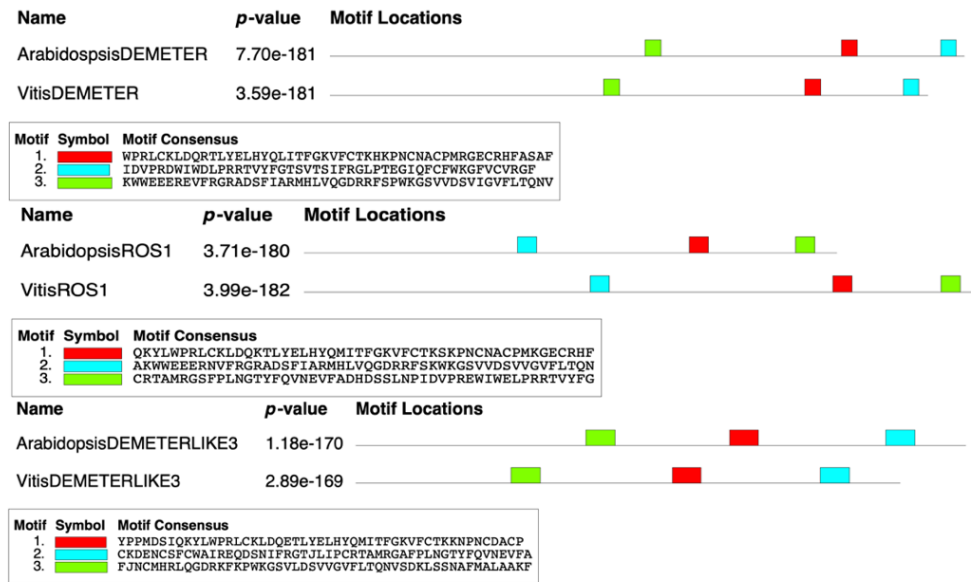
**Figura 4.** Dominios conservados de ADN demetilinas en *Vitis vinifera* (VvDME: gen Demeter de *Vitis vinifera*, VvROS1: gen ROS de *Vitis vinifera*, VvDML3: gen Demeter like 3 de *Vitis vinifera*).

## 6.6 Búsqueda de Secuencias Motivo de Genes de ADN Demetilinas de Vid

Se compararon las secuencias peptídicas de los genes control en *Arabidopsis thaliana* contra las secuencias peptídicas que los genes encontrados en *Vitis vinifera*, esto con el objetivo de poder tener una referencia de las secuencias motivos en genes homólogos. Los resultados del programa MEME

muestran secuencias de aminoácidos similares (**Figura 5**) entre las dos especies, tanto en *Arabidopsis thaliana* como en *Vitis vinifera*. Por otro lado, el programa Tomtom nos arrojó probables funciones de esas secuencias de aminoácidos para cada uno de los genes en vid (**Cuadro 3**). Este último paso se realizó con el objetivo de encontrar regiones dentro de los genes que pudieran indicar uniones al ADN, y regulación al estrés causado por la crioconservación. En base a los tratamientos que se tomaron en cuenta para realizar este trabajo, los resultados arrojados muestran sitios de unión al ADN, lo que es necesario para que las ADN demetilases puedan llevar a cabo la desmetilación de manera eficiente, además, existen secuencias de regulación al estrés abiótico.

Los patrones cortos y recurrentes en el ADN que se cree que tienen importancia biológica se conocen como motivos de secuencia. A menudo indican sitios de unión específicos de la secuencia para nucleasas y factores de transcripción (FT). Otras proteínas intervienen en la unión a los ribosomas, el procesamiento del ARNm (empalme, edición, poliadenilación) y la terminación de la transcripción a nivel del ARN (D'Haeseleer, 2006). En un estudio realizado por Qiu *et al.*, (2019) se identificó el factor de transcripción que se unía a una secuencia motivo en *Arabidopsis thaliana*. Según este estudio, REF6 se une preferentemente a patrones hipo-metilados del ADN *in vivo*, mientras que la metilación CHG reduce la afinidad de unión de REF6 al ADN *in vitro*. Además, las estructuras cristalinas de los grupos de ZnF en asociación con oligonucleótidos de ADN sugieren que la 5-metilcitosina inhibe la unión de REF6. También encontraron que la unión de REF6 puede disminuir en los *loci* heterocromáticos debido a la metilación del ADN, que probablemente actúe en concierto con otros cambios epigenéticos. Lo anterior nos indican que efectivamente existen secuencias conservadas en las cuales se unen los factores de transcripción para llevar a cabo una función específica en el tejido.



**Figura 5.** Secuencias motivo de DME, ROS1 y DML3 en *Vitis vinifera* en comparación con su homólogo en *Arabidopsis thaliana*.

**Cuadro 3.** Posibles funciones de secuencias motivo de los genes de ADN demetilasas en vid (*Vitis vinifera*).

ADN demetilasa DEMETER			
Motif	Symbol	Motif consensus	Probable función
1	■	WPRLCKLDQRILYELHYQLITFGKVFCTKHKPNCNACPMRGEGRHFASAF	Unión a ADN, Regulación del desarrollo y crecimiento celular
2	■	IDVPRDWLWDLPRRTVYFGTISVTSIFRGLPTEGLQFCFWKGFVFCVRGF	Regulación del desarrollo y crecimiento celular, Relacionado con la respuesta a estrés abiótico
3	■	KWWEEREVFRGRADSFARMHLVQGDRRFSPWKGSVVDSVIGVFLTQNV	Unión a ADN
ADN demetilasa ROS1			
Motif	Symbol	Motif consensus	Probable función
1	■	QKYLWPRLCKLDQKILYELHYQMITFGKVFCTKSKPNCNACPMKGEGRHF	Regulación del desarrollo y crecimiento celular, Se une a ciertas secuencias de ADN llamadas "elementos de respuesta a AMP" (CreB2)
2	■	AKWWEERNVFRGRADSFARMHLVQGDRRFSPWKGSVVDSVIGVFLTQNV	Unión a ADN
3	■	CRTAMRGSFPLNGTYFQVNEVFADHDSLSLNPIDVPREWVWELPRRTVYFG	Regulación del desarrollo y crecimiento celular
ADN demetilasa DEMETER LIKE 3			
Motif	Symbol	Motif consensus	Probable función
1	■	YPPMDSIQKYLWPRLCKLDQETLYELHYQMITFGKVFCTKKNPNCDCAP	Regulación de la expresión génica asociada con procesos de respuesta a estrés abiótico
2	■	CKDENCSFCWAIREQDSNIFRGTJLIPCRTAMRGAFFPLNGTYFQVNEVFA	Regulación de la expresión génica asociada con procesos de respuesta a estrés abiótico
3	■	FJNCMHLRQGDGRKFKPWKGSVLDVSVVGVFLTQNVSDKLSNAPMALAAKF	Unión a la secuencia de ADN

### 6.7 Diseño de Oligonucleótidos de Genes de ADN Demetilasas de Vid

Al haber realizado un análisis filogenético y seleccionado la secuencia más apta (hits) se diseñaron los primers para los genes ADN demetilasas de vid. De los primeros 10 primers arrojados por el programa “QuantPrime” se seleccionaron los mejores 3 pares de primers para cada gen de ADN

demetilasa de vid (*Vitis vinifera*). Se seleccionaron estos primers tomando en cuenta su contenido GC oscila entre el 50%, la longitud del amplicón está entre 60-104 y su Tm alrededor de 60°C con variación de 3 °C. Se probaron los distintos pares de cebadores arrojados por el programa para la amplificación en tejidos de *Vitis vinifera*, pero el mejor resultado se obtuvo con DME-2, ROS1-2 y DML3-1 (Cuadro 4).

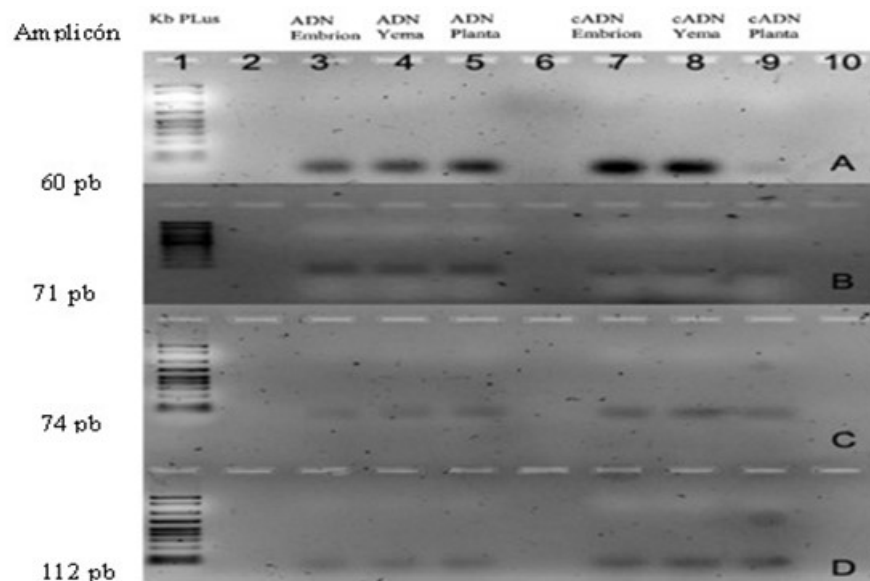
**Cuadro 4.** Oligonucleotidos diseñados para ADN demetilasa de *Vitis vinifera*.

ADN Demetilasa DEMETER <i>Vitis vinifera</i>							
# Secuencia	Forward	Tm Fw	%GC Fw	Reverse	Tm Rv	%GC Rv	Tamaño amplicon
DMT-1	AGCCACTGAAGAGAAAGGAGTGC	63.048	52.174	TCCTCAGCCAGTACTTCATTGGTC	62.502	50	72
DMT-2	AGCCACTGAAGAGAAAGGAGTGC	63.048	52.174	CCTCAGCCAGTACTTCATTGGTC	61.287	52.174	71
DMT-3	GCCACTGAAGAGAAAGGAGTGC	61.801	54.545	TCCTCAGCCAGTACTTCATTGGTC	62.502	50	71
DMT-4	GCCACTGAAGAGAAAGGAGTGC	61.801	54.545	CCTCAGCCAGTACTTCATTGGTC	61.287	52.174	70
DMT-5	ACCCAAGAAAGTGGAAATCACG	62.73	50	ACTACTGTTGCTTGCACTCAGG	61.164	50	77
ADN Demetilasa ROS1 <i>Vitis vinifera</i>							
# Secuencia	Forward	Tm Fw	%GC Fw	Reverse	Tm Rv	%GC Rv	Tamaño amplicon
ROS1-1	TGCCCTCAACCTCCAGCACAAC	63.904	54.545	CAGTCGATGCTTATGAACCCCTGG	62.1	50	78
ROS1-2	TCAACCTCCAGCACAACCATCC	63.566	52.174	CAGTCGATGCTTATGAACCCCTGG	62.1	50	74
ROS1-3	CAACCTCCAGCACAACCATCC	62.333	54.545	CAGTCGATGCTTATGAACCCCTGG	62.1	50	73
ROS1-4	CAACCTCCAGCACAACCATCC	62.333	54.545	AGTCGATGCTTATGAACCCCTGG	61.043	47.826	72
ROS1-5	CAACCTCCAGCACAACCATCC	62.333	54.545	ACAGTCGATGCTTATGAACCCCTGG	61.517	45.833	74
ADN Demetilasa DEMETER-LIKE3 <i>Vitis vinifera</i>							
# Secuencia	Forward	Tm Fw	%GC Fw	Reverse	Tm Rv	%GC Rv	Tamaño amplicon
DML3-1	AGGTGTGTTCTCTCCACAAGCC	61.611	47.826	TCCGAATCCTTTGCCATCACC	63.195	54.545	112
DML3-2	AAGGTGTGTTCTCTCCACAAGCC	62.071	45.833	TCCGAATCCTTTGCCATCACC	63.195	54.545	113
DML3-3	AGGTGTGTTCTCTCCACAAGCC	61.611	47.826	TTCGGAATCCTTTGCCATCACC	63.604	52.174	113
DML3-4	AAGGTGTGTTCTCTCCACAAGCC	62.071	45.833	TTCGGAATCCTTTGCCATCACC	63.604	52.174	114
DML3-5	AGGTGTGTTCTCTCCACAAGCC	61.611	47.826	TTCGGAATCCTTTGCCATCACC	61.49	50	113

## 6.8 Validación de Genes por Amplificación de las Demetilasa del ADN en tejidos de *V. vinifera*

Los estudios han identificado que las demetilasa de ADN en las plantas tienen un papel importante en la regulación positiva de los genes (Sateg *et al.*, 2016). En 2016 se realizó un estudio en nódulos de *Medicago truncatula* sobre la importancia de la metilación del ADN durante el desarrollo de los nódulos, los resultados sugieren que la expresión del gen DMT es esencial para varios procesos biológicos como el desarrollo de nódulos fijadores de nitrógeno (Sateg *et al.*, 2016). En *Arabidopsis thaliana*, la desmetilación activa del ADN depende del represor del silenciamiento 1 (ROS1), que elimina la 5-metilcitosina del ADN. Los resultados de la investigación realizada por Kim *et al.*, en 2019 indican que ROS1 toma el papel de activador transcripcional en la respuesta al estrés ambiental mediada por el ácido abscísico (ABA) (Kim *et al.*, 2019). DML3 se ha

caracterizado e identificado en plantas como *Arabidopsis thaliana*, *Vitis vinifera* y *Solanum lycopersicum* (Penterman *et al.*, 2007; Kiselev *et al.*, 2013; Cui y Cao, 2014; Shangguan *et al.*, 2020). La amplificación de los cebadores diseñados para los genes de las demetilinas de *V. vinifera* fue validado usando ADN genómico y ADNc, en diferentes tejidos de la vid (embriones, yemas y plantas completa). El GAPDH utilizado como control (gen constitutivo) amplificó sólo una banda con un tamaño del amplicón de 60 pb en las muestras analizadas (**Figura 6A**). Por otra parte, se observó una banda para los genes de demetilinas seleccionados DML3 con un tamaño del amplicón de 112 pb (**Figura 6D**), ROS1 con un tamaño del amplicón de 74 pb (**Figura 6C**), y DME con un tamaño del amplicón de 71pb (**Figura 6B**) amplificados en el ADNg y ADNc de embrión cigótico, yema y plantas completas. Estos resultados nos muestran que estos cebadores pueden ser utilizados en la evaluación de la expresión génica de las demetilinas del ADN en tejidos de *Vitis vinifera*. Los cambios en la intensidad de las bandas en las muestras de ADNc en los diferentes tejidos muy probablemente se debe a diferencias en expresión de los genes debidos al tipo de tejido, el bajo contraste, altos niveles de ruido y variaciones de intensidad en los niveles de grises contenidas en las imagenes (Salazar-Centeno *et al.*, 2017).

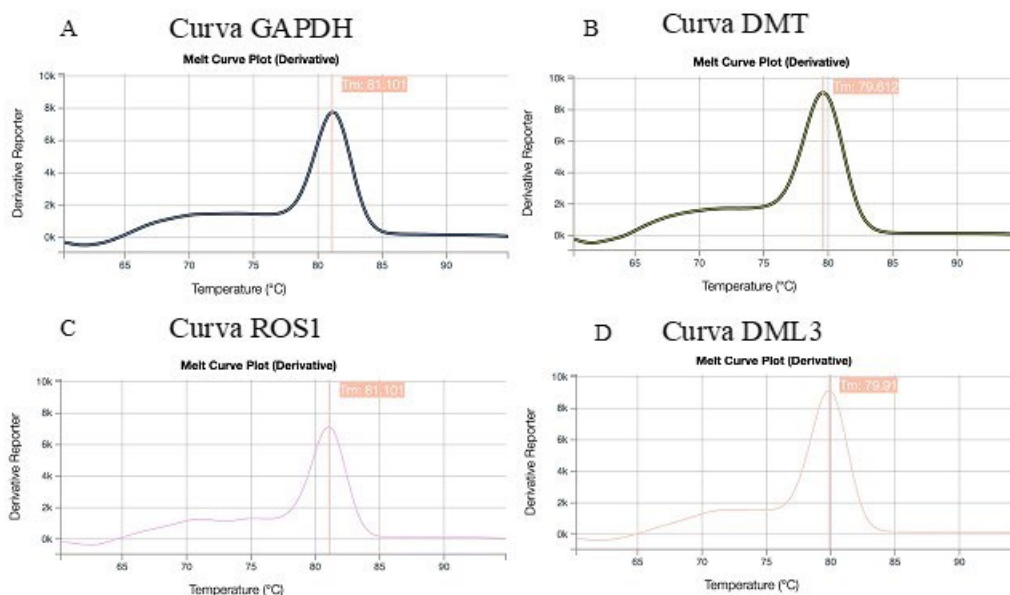


**Figura 6.** Amplificación de GAPDH (A) DME (B) ROS1 (C) DML3 (D) en ADNg y ADNc de tejidos de embriones cigóticos, yemas y plantas completa de *V. vinifera*. Pozo 1: Marcador de peso molecular. Pozos 3-5: Muestras con ADNg. Pozos 7-9: Muestras con ADNc.

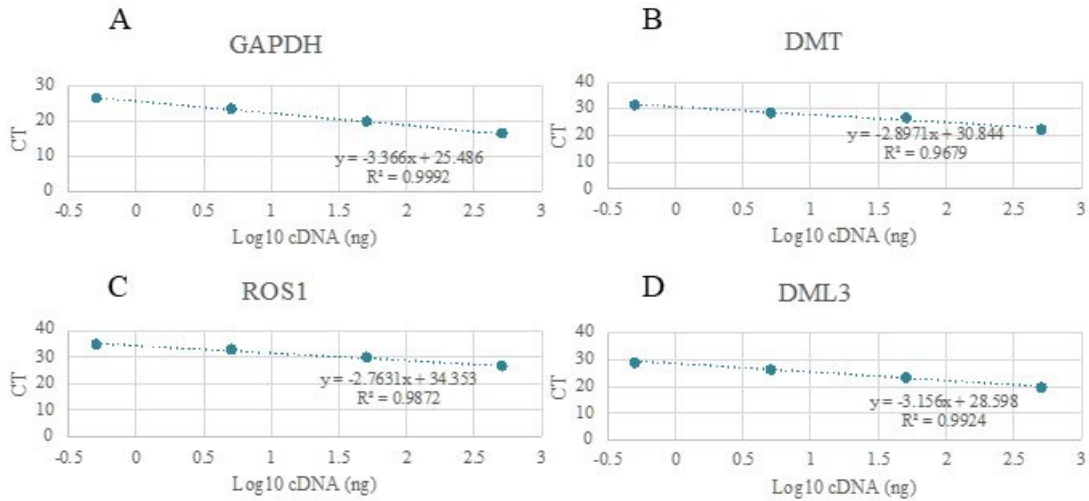


## 6.9 Efecto de la Vitrificación y Crioconservación sobre la Expresión de Transcritos Codificando ADN Demetiladas en Vid

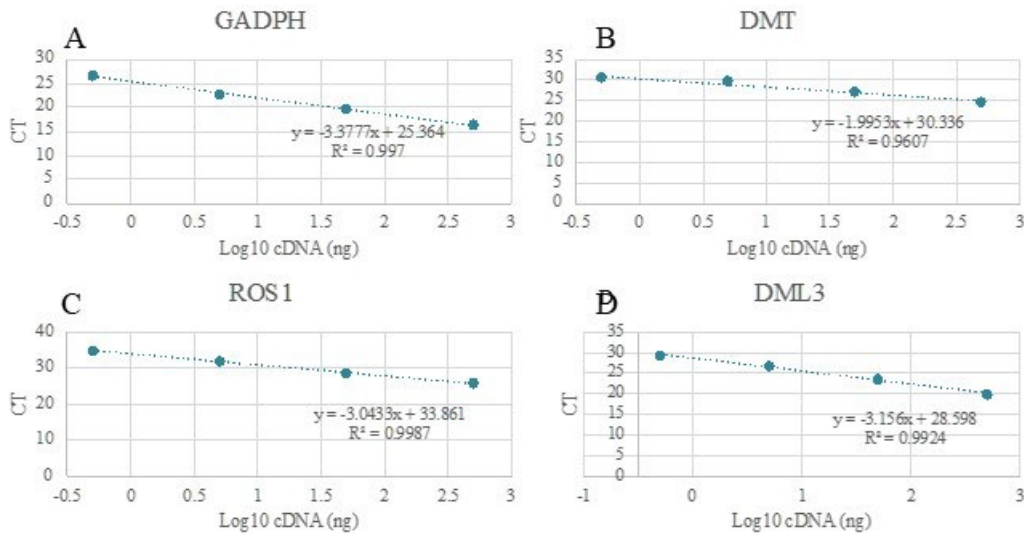
Se diseñaron primers específicos para qPCR partiendo de las secuencias de nucleótidos obtenidas de DMT, ROS1 y DML3. El ARN total extraído de embriones cigóticos y plantas control (sin tratamiento), embriones y plantas tratadas con PVS y con PVS + NL, se utilizó para cuantificar la expresión relativa. Las concentraciones de ARN estuvieron entre 141.6 y 740.7 ng/μl. Se realizó el análisis de los rangos dinámicos para cada uno de los genes seleccionados, incluyendo al gen normalizador GAPDH en cada uno de los tejidos analizados. Estas curvas mostraron el rango de amplificación específico para cada uno de los genes, sin la formación de dímeros o productos inespecíficos (**Figura 7**). Este análisis mostró que DMT, ROS1, DML3 y GAPDH tienen una eficiencia de amplificación similar al 100% en plantas (**Figura 8**). El análisis de rangos dinámicos mostró que DMT, ROS1, DML3 y GAPDH tienen una eficiencia de amplificación similar al 100% en embriones (**Figura 9**). Estos resultados permitieron continuar con el análisis de cuantificación de la expresión mediante qRT-PCR.



**Figura 7.** Curvas de disociación generadas utilizando los oligonucleótidos diseñados específicamente para GAPDH (A), DMT (B), ROS1 (C) y DML3 (D).



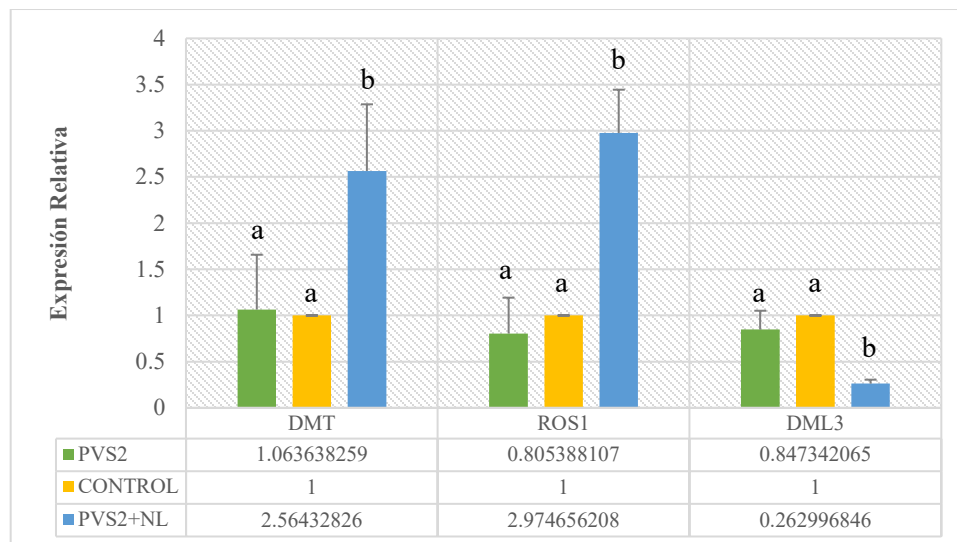
**Figura 8.** Validación del análisis de expresión relativa  $\Delta\Delta C_t$  de plantas por rangos dinámicos. A: Análisis de eficiencia de la amplificación de GAPDH. B: Análisis de eficiencia de la amplificación de DMT. C: Análisis de eficiencia de la amplificación de ROS1. D: Análisis de la amplificación de DML3.



**Figura 9.** Validación del análisis de expresión relativa  $\Delta\Delta C_t$  de embriones por rangos dinámicos. A: Análisis de eficiencia de la amplificación de GAPDH. B: Análisis de eficiencia de la amplificación de DMT. C: Análisis de eficiencia de la amplificación de ROS1. D: Análisis de eficiencia de la amplificación de DML3.

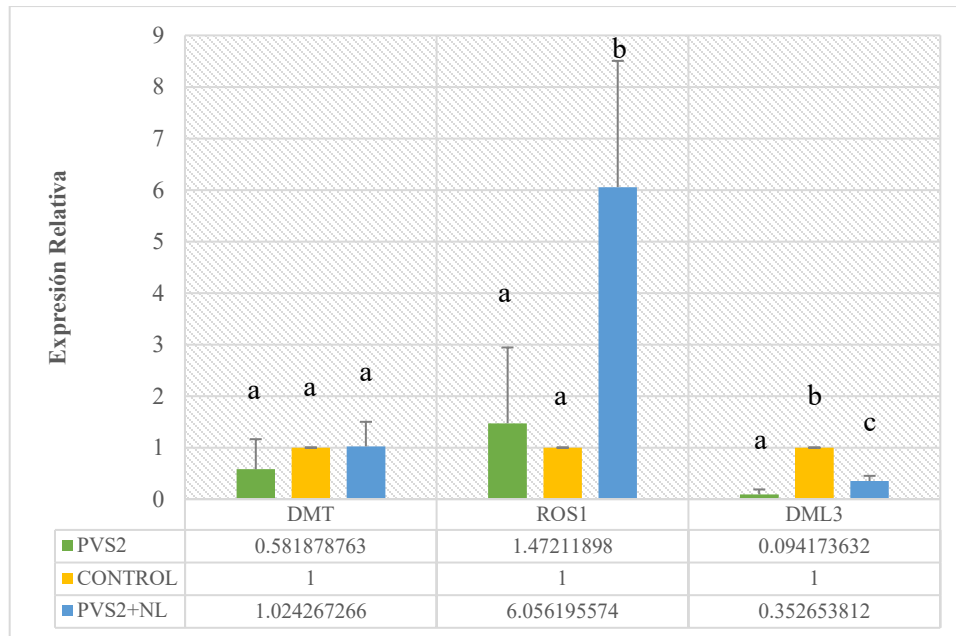
Los resultados del análisis de expresión relativa de los genes de ADN demetiladas en embriones cigóticos (**Figura 10**) muestran que en el tratamiento de vitrificación (PVS2) no existen diferencias

estadísticas en la expresión ( $p < 0.05$ ) de los genes de ADN demetilasas DMT, ROS1 y DML3 con respecto al tratamiento control, por lo tanto, no hay efecto por el tratamiento PVS2 en el tejido de embriones cigóticos de vid respecto al tratamiento control, esto se podría deber a que la exposición a la solución crioprotectora no representa un estrés para el tejido. Por otro lado, en el caso del análisis de expresión relativa de los genes en embriones cigóticos de vid con tratamiento de crioconservación (PVS2+NL) si se encontraron diferencias significativas respecto al tratamiento control. Como muestra la **Figura 10**, los genes que codifican para las ADN demetilasa DMT y ROS1 se inducen y el gen DML3 se reprime en comparación con la muestra control.



**Figura 10.** Comparación de la cuantificación de expresión relativa de genes ADN demetilasas (DMT, ROS1 y DML3) en tratamiento de vitrificación (PVS2) y crioconservación (PVS2 +NL) en embriones cigóticos de vid (*Vitis vinifera*). Las literales significan diferencias estadísticas entre tratamientos.

Los resultados del análisis de expresión relativa de los genes de ADN demetilasas en plantas (**Figura 11**) muestran que el tratamiento de vitrificación (PVS2) disminuye la expresión ( $p < 0.05$ ) de DML3, mientras que encontraron diferencias estadísticas de los genes DMT, ROS1 con respecto al tratamiento control. En cuanto al análisis de expresión relativa de los genes en plantas con tratamiento de crioconservación (PVS2+NL) se encontraron diferencias en la expresión del gen de ADN demetilasa ROS1, no hubo cambios significativos en la expresión de DMT y DML3 se reprimió en comparación al tratamiento control.



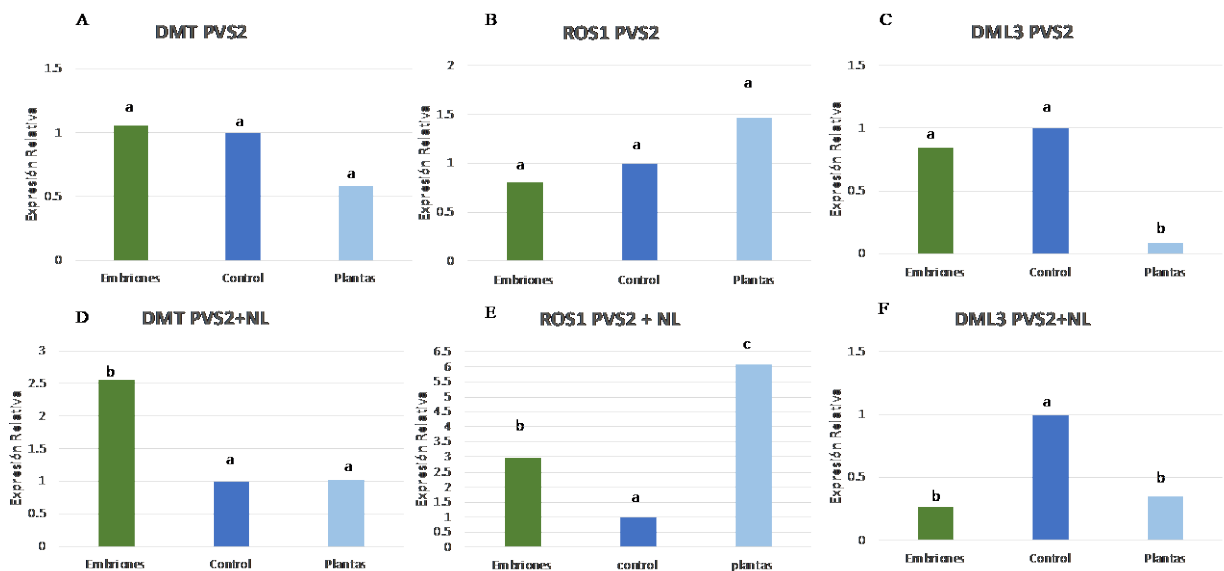
**Figura 11.** Comparación de la cuantificación de expresión relativa de genes ADN demetiladas (DMT, ROS1 y DML3) en tratamiento de vitrificación (PVS2) y criopreservación (PVS2 +NL) en plantas de vid (*Vitis vinifera*). Las literales significan diferencias estadísticas entre tratamientos.

Las diferencias en la expresión de los genes dentro de los tratamientos y tejidos pueden ser a causa a las distintas funciones que realizan (**Figura 12.**) . Esto podría explicarse debido a que el gen DMT tiene como características reportadas que se expresa específicamente en tejidos reproductivos (Park *et al.*, 2017), se le relaciona con la regulación de genes de defensa (Kim *et al.*, 2021), involucrada en el mantenimiento de las células por regulación epigenética transgeneracional y que se ha visto indetectable su expresión en tejidos de hojas (Schumann *et al.*, 2019). Mismas características que coinciden con la inducción en embrión por el tratamiento PVS2+NL ya que se trata de un tejido reproductivo sometido a un estrés.

Por otro lado, se conoce que ROS1 es el gen más dominante de las demetiladas, presenta una expresión alta en tejidos de plántulas jóvenes (Schumann *et al.*, 2019), se le relaciona con regulación de latencia en semillas y respuesta a ácido abscísico (Zhu *et al.*, 2018), también se expresa de manera ubicua entre los tejidos (Gong *et al.*, 2002). Mismas características que coinciden, al observar un comportamiento similar indiferenciado entre tejidos, es decir, el factor tejidos no influyó el nivel de expresión del gen, además se identificó en este trabajo por ser la demetilada más activa en la regulación epigenética al exponer al tejido a estrés por el tratamiento de PVS2+NL. Y por último, se ha caracterizado a DML3 por funcionar como un gen específico de

antera (Schumann *et al.*, 2019), expresado especialmente durante la senescencia de la hoja (Yuan *et al.*, 2020), relacionado con alteraciones fenotípicas y regulador de metilación (Ortega Galisteo, 2008). Estas características ayudan a explicar el comportamiento identificado en el presente trabajo, ya que DML3 presentó principalmente una expresión reprimida o baja, se podría adjudicar que el tejido utilizado es joven, o en etapa de desarrollo, donde se identifican las otras demetilinas como principales reguladoras epigenéticas. Además como se mencionó el funcionamiento de DML3 se ha identificado como muy específico.

Lo anterior sugiere que existe un aumento en la expresión de genes ADN demetilinas en vid debido al estrés al que se ha sometido el tejido al estar expuesto a un tratamiento de criopreservación (PVS2 +NL). En estudios previos se ha demostrado que la desmetilación es esencial para el desarrollo y envejecimiento de las plantas, en *Arabidopsis* se encontró que los niveles de metilación disminuían durante la expresión genes ADN demetilinas DME, ROS1, DML2 y DML3, esto indica que las regiones pueden sufrir desmetilación mientras envejecen mediante la reducción de los procesos de metilación del ADN (Ogneva *et al.*, 2016).



**Figura 12.** Comparación de la expresión entre tejidos de embriones cigóticos y plantas de ADN demetilinas. Imagen A: Tratamiento PVS2 gen DMT, Imagen B: Tratamiento PVS2 gen ROS1, Imagen C Tratamiento PVS2 gen DML3, Imagen D: Tratamiento PVS2+NL gen DMT, Imagen E: Tratamiento PVS2+NL gen ROS1, Imagen D: Tratamiento PVS2+NL gen DML3. El color verde indica la expresión en el tejido de embriones cigóticos, color azul fuerte indica control con valor de 1, el color azul claro indica expresión en tejido de planta. Las literales significan diferencias estadísticas entre tratamientos.

La desmetilación crea la activación de genes relacionados con el estrés abiótico (Satgé *et al.*, 2016). En 2015 García-Coronado y colaboradores indicaron que entre tratamiento de vitrificación y el de crioconservación de embriones de vid, no hubo una diferencia significativa de la expresión de MET1-2 ADN Metiltransferasa. En raíces de maíz, la exposición al estrés por frío disminuye la expresión de genes MET1 y reduce el nivel de MET1 que conduce a la desmetilación de los elementos transponibles, lo que coincide con los resultados obtenidos en el tratamiento de crioconservación. Otros estudios han indicado que las bajas temperaturas alcanzadas como en nitrógeno líquido (-196 °C) causan en los tejidos una desmetilación del ADN mucho mayor en comparación los controles o en los tejidos que fueron vitrificados (Nuc *et al.*, 2016).

Los resultados de la expresión (comparados entre tejidos (**Figura12**)) muestran que la crioconservación (PVS2 +NL) aumenta los niveles de expresión en embriones cigóticos de ADN demetilasa DMT, ROS1 en comparación con el tratamiento de vitrificación (PVS2) lo que sugiere que el tejido está siendo sometido a un estrés y disminuye la expresión en DML3 respecto a el tratamiento de vitrificación (PVS2). En plantas se encontró que la crioconservación (PVS2 +NL) aumenta los niveles de expresión de ADN demetilasa ROS1 en comparación con el tratamiento de vitrificación (PVS2). No existió un cambio significativo en el gen de DMT contra vitrificación (PVS2), pero si un ligero aumento en la expresión en DML3 respecto a el tratamiento de vitrificación (PVS2). Al tratarse de dos tratamientos (PVS2 y PVS2+NL) que en teoría representan un estrés para los tejidos que son sometidos a estos, es lógica la expresión positiva del gen de ADN demetilasa ROS1, ya que este cuenta con la función de evitar el silenciamiento de genes y al controlar la expresión génica las células o tejidos pueden controlar las proteínas que le sean funcionales en un momento dado. Esto último puede estar relacionado con la baja viabilidad y los cambios morfológicos evidentes que presentan las plantas regeneradas después de haber sido sometidas al tratamiento de crioconservación, ya que se podría deducir que el tejido esta luchando por sobrevivir a condiciones que no son favorables en su entorno.

Es conveniente mencionar que al momento de la escritura de este trabajo no hay estudios reportados relacionados con la expresión de genes de las ADN demetilasas en plantas y son escasos los estudios reportados dónde se reporte los niveles de demetilación del ADN en tejidos bajo estrés, en este sentido, un estudio realizado en plantas de *Nicotiana tabacum* las cuales fueron sometidas a procesos de estrés abiótico por salinidad y por frío, se obtuvo como resultado un incremento en los niveles de desmetilación (Sano, 2007).

Los resultados anteriores sugieren que existe una respuesta epigenética rápida al estrés causado por la crioconservación (PVS2+NL), muy probablemente debido al constante estrés que ocasiona estar sometido a ultrabajas temperaturas. Sin embargo, se necesitan más estudios para poder corroborar lo dicho anteriormente. La expresión de las ADN demetilasas en el tratamiento de crioconservación (PSV2+NL) nos da un indicio de que los genes se expresan o reprimen cuando el tejido es sometido al estrés de las bajas temperaturas a las que se sometió al embrión y al choque térmico que se podría haber causado en la descongelación. De igual forma son necesarios mayores estudios para la comprobación de lo anterior.

## 7. CONCLUSIONES

Como parte de la regulación génica de la desmetilación las ADN demetilases mostraron expresión condicionada por el tipo de tejido analizado, la etapa de desarrollo del mismo en respuesta a la crioconservación (PVS2+NL), esto debido a que los embriones cigóticos de vid mostraron aumento en la expresión de los genes DMT y ROS1, además de la represión de DML3, en cambio, en plantas la expresión de DMT no sufre un cambio significativo, en ROS1 existe un claro aumento de su expresión y DML3 disminuye.



## **8. PERSPECTIVAS**

Es necesario realizar estudios que permitan evaluar los niveles de metilación y desmetilación del genoma en plantas de vid como respuesta a la criopreservación y vitrificación, esto con el objetivo de desglosar los mecanismos por los cuales las plantas regulan esta respuesta, del mismo modo se podría analizar los efectos de la desmetilación del ADN ya que se ha encontrado en estudios previos un aumento en la expresión de enzimas glicosilasas por efecto del congelamiento descongelamiento durante la criopreservación. Así mismo, las futuras evidencias experimentales servirán como apoyo a la estandarización de protocolos para la correcta criopreservación de especies vegetales.

## 9. BIBLIOGRAFÍA

- Adu-Gyamfi, R., Wetten, A., Rodríguez López, C.M. 2016. Effect of cryopreservation and post-cryopreservation somatic embryogenesis on the epigenetic fidelity of cocoa (*Theobroma cacao* L.). *PLoS ONE* 11: .
- Alansi, S., Al-Qurainy, F., Nadeem, M., Khan, S., Tarroum, M., Alshameri, A., Gaafar, A.R.Z. 2019. Cryopreservation: A tool to conserve date palm in Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences* 26: 1896-1902.
- Alonso, C., Pérez, R., Bazaga, P., Medrano, M., Herrera, C.M. 2016. MSAP markers and global cytosine methylation in plants: A literature survey and comparative analysis for a wild-growing species. *Molecular Ecology Resources* 16: 80-90.
- Amoah, S., Kurup, S., Rodriguez Lopez, C.M., Welham, S.J., Powers, S.J., Hopkins, C.J., Wilkinson, M.J., King, G.J. 2012. A Hypomethylated population of *Brassica rapa* for forward and reverse Epi-genetics. *BMC Plant Biology* 12: 193.
- Antoniolli, A., Fontana, A., Piccoli, P., Bottini, R. 2015. Characterization of polyphenols and evaluation of antioxidant capacity in grape pomace of the cv. Malbec Secondary Metabolism View project Development of analytical approaches for the determination of compounds of interest in wines, grapes and winemaking by-products View project.
- Baek, D., Jiang, J., Chung, J.S., Wang, B., Chen, J., Xin, Z., Shi, H. 2011. Regulated *AtHKT1* gene expression by a distal enhancer element and DNA methylation in the promoter plays an important role in salt tolerance. *Plant and Cell Physiology* 52: 149-161.
- Basail Pérez, M., Rubio Cabrera, A., Torres Núñez, Y., Santos Pino, A., Rayas Cabrera, A. 2018. Establecimiento y multiplicación in vitro de embriones cigóticos de guanabana (*Annona muricata* L.). *Rev. Agricultura Tropical* 4: 48-57.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
- Benelli, C., De Carlo, A., Engelmann, F. 2013. Recent advances in the cryopreservation of shoot-derived germplasm of economically important fruit trees of *Actinidia*, *Diospyros*, *Malus*, *Olea*, *Prunus*, *Pyrus* and *Vitis*. *Biotechnology Advances* 31: 175-185.
- Bernatavichute, Y. V., Zhang, X., Cokus, S., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E. 2008. Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* Dilkes, B. P. (ed.),. *PLoS ONE* 3: e3156.
- Bettoni, J.C., Costa, M.D., Gardin, J.P.P., Kretzschmar, A.A., Pathirana, R. 2016. Crioterapia: Uma nova técnica para obtenção de plantas de videira livres de viroses. *Revista Brasileira de Fruticultura* 38: .
- Borja-Bravo, M., García-Salazar, J.A., Reyes-Muro, L., Arellano-Arciniega, S. 2016. Rentabilidad de los sistemas de producción de uva (*vitis vinífera*) para mesa e industria en Aguascalientes, México. *Agricultura Sociedad y Desarrollo* 13: 151.
- Bräutigam, K., Cronk, Q. 2018. DNA methylation and the evolution of developmental complexity in plants. *Frontiers in Plant Science* 9: .

- Chow, C.N.L., Hung, T.Y., Li, Y.C., Tseng, G.Z., Liu, K.C., Kuo, Y.H., Zheng, P.L. et al. 2019. Plantpan3.0: A new and updated resource for reconstructing transcriptional regulatory networks from chip-seq experiments in plants. *Nucleic Acids Research* 47: D1155-D1163.
- Cui, X., Cao, X. 2014. Epigenetic regulation and functional exaptation of transposable elements in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* 21: 83-88.
- D'Haeseleer, P. 2006. What are DNA sequence motifs? *Nature Biotechnology* 24: 423-425.
- Ding, H., Gao, J., Qin, C., Ma, H., Huang, H., Song, P., Luo, X. et al. 2014. The dynamics of DNA methylation in maize roots under Pb stress. *International Journal of Molecular Sciences* 15: 23537-23554.
- Dröge-Laser, W., Snoek, B.L., Snel, B., Weiste, C. 2018. The Arabidopsis bZIP transcription factor family. *Current Opinion in Plant Biology* 45: 36-49.
- Drohat, A.C., Coey, C.T. 2016. Role of Base Excision «repair» Enzymes in Erasing Epigenetic Marks from DNA. *Chemical Reviews* 116: 12711-12729.
- Dubos R, S tracke E, Grotewold B, Weisshaar C, Martin L, L. 2010. MYB transcription factors in Arabidopsis. *Trends in plant science* 15: 573-581.
- Ebbs, M.L., Bartee, L., Bender, J. 2005. H3 Lysine 9 Methylation Is Maintained on a Transcribed Inverted Repeat by Combined Action of SUVH6 and SUVH4 Methyltransferases. *Molecular and Cellular Biology* 25: 10507-10515.
- Elhamamsy, A.R. 2016. DNA methylation dynamics in plants and mammals: overview of regulation and dysregulation. *Cell Biochemistry and Function* 34: 289-298.
- Engelmann, F. 2004. Plant cryopreservation: Progress and prospects. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40: 427-433.
- Fang, X., Qi, Y. 2015. Rnai in plants: An argonaute-centered view. *Plant Cell* 28: 272-285.
- Feng, K., Hou, X.L., Xing, G.M., Liu, J.X., Duan, A.Q., Xu, Z.S., Li, M.Y. et al. 2020. Advances in AP2/ERF super-family transcription factors in plant. *Critical Reviews in Biotechnology* 40: .
- Feng, S., Jacobsen, S.E., Reik, W. 2010. Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* 330: 622-627.
- Feng, Z., Fang, G., Korlach, J., Clark, T., Luong, K., Zhang, X., Wong, W., Schadt, E. 2013. Detecting DNA Modifications from SMRT Sequencing Data by Modeling Sequence Context Dependence of Polymerase Kinetic. *PLoS Computational Biology* 9: .
- Fujimoto, R., Sasaki, T., Ishikawa, R., Osabe, K., Kawanabe, T., Dennis, E.S. 2012. Molecular mechanisms of epigenetic variation in plants. *International Journal of Molecular Sciences* 13: 9900-9922.
- Garcia Coronado, H. 2015. *Análisis de la regulación en la expresión de genes que codifican para ADN metiltransferasas en embriones de uva (vitis vinifera) cv. red globe crioconservados*. CIAD, Hermosillo.
- Gong, Z., Morales-Ruiz, T., Ariza, R.R., Roldán-Arjona, T., David, L., Zhu, J.K. 2002. ROS1, a repressor of transcriptional gene silencing in Arabidopsis, encodes a DNA glycosylase/lyase. *Cell* 111: 803-814.

- Gu, T., Ren, S., Wang, Y., Han, Y., Li, Y. 2016. Characterization of DNA methyltransferase and demethylase genes in *Fragaria vesca*. *Molecular Genetics and Genomics* 291: 1333-1345.
- Han, Q., Bartels, A., Cheng, X., Meyer, A., Charles An, Y.Q., Hsieh, T.F., Xiao, W. 2019. Epigenetics regulates reproductive development in plants. *Plants* 8: 1-21.
- Hao, Y.J., Liu, Q.L., Deng, X.X. 2001. Effect of cryopreservation on apple genetic resources at morphological, chromosomal, and molecular levels. *Cryobiology* 43: 46-53.
- Hao, Y.J., You, C.X., Deng, X.X. 2002. Analysis of ploidy and the patterns of amplified fragment length polymorphism and methylation sensitive amplified polymorphism in strawberry plants recovered from cryopreservation. *Cryo-Letters* 23: 37-46.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E. 1981. Propagación de plantas. Principios y prácticas.
- He, Y., Li, Z. 2018. Epigenetic Environmental Memories in Plants: Establishment, Maintenance, and Reprogramming. *Trends in Genetics* 34: 856-866.
- Huang, C.Y., Wang, H., Hu, P., Hamby, R., Jin, H. 2019. Small RNAs – Big Players in Plant-Microbe Interactions. *Cell Host and Microbe* 26: 173-182.
- Huang, J., Yang, M., Zhang, X. 2016. The function of small RNAs in plant biotic stress response. *Journal of Integrative Plant Biology* 58: 312-327.
- Ikeda, Y., Kinoshita, T. 2009. DNA demethylation: A lesson from the garden. *Chromosoma* 118: 37-41.
- Jakoby, M., Weisshaar, B., Dröge-Laser, W., Vicente-Carbajosa, J., Tiedemann, J., Kroj, T., Parcy, F. 2002. bZIP transcription factors in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 7: 106-111.
- Jitsopakul, N., Sangyojarn, P., Homchan, P., Thammasiri, K. 2019. Efficiency of aluminum cryoplates for cryopreservation of *Dendrobium signatum* Rchb. F. Pollinia. En *Acta Horticulturae*, pp. 279-286. International Society for Horticultural Science.
- Kaczmarczyk, A., Houben, A., Joachim Keller, E.R., Mette, M.F. 2010. Influence of cryopreservation on the cytosine methylation state of potato genomic DNA. *Cryo-Letters* 31: 380-391.
- Kaity, A., Ashmore, S.E., Drew, R.A., Dulloo, M.E. 2008. Assessment of genetic and epigenetic changes following cryopreservation in papaya. *Plant Cell Reports* 27: 1529-1539.
- Kaviani, B. 2011. Conservation of plant genetic resources by cryopreservation. *Australian Journal of Crop Science* 5: 778-800.
- Khouider, S., Borges, F., LeBlanc, C., Ungru, A., Schnittger, A., Martienssen, R., Colot, V., Bouyer, D. 2021. Male fertility in Arabidopsis requires active DNA demethylation of genes that control pollen tube function. *Nature Communications* 12: .
- Kim, J.S., Lim, J.Y., Shin, H., Kim, B.G., Yoo, S.D., Kim, W.T., Huh, J.H. 2019. ROS1-dependent DNA demethylation is required for ABA-inducible NIC3 expression. *Plant Physiology* 179: 1810-1821.
- Kim, S., Park, J.S., Lee, J., Lee, K.K., Park, O.S., Choi, H.S., Seo, P.J. et al. 2021. The DME demethylase regulates sporophyte gene expression, cell proliferation, differentiation, and meristem resurrection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

States of America 118: 2026806118.

- Kiselev, K. V., Tyunin, A.P., Karetin, Y.A. 2013. Influence of 5-azacytidine and salicylic acid on demethylase gene expression in cell cultures of *Vitis amurensis* Rupr. *Acta Physiologiae Plantarum* 35: 1843-1851.
- Kornberg, R.D. 1974. Chromatin structure: A repeating unit of histones and DNA. *Science* 184: 868-871.
- Kouzarides, T. 2007. Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* 128: 693-705.
- Kress, C., Thomassin, H., Grange, T. 2001. Local DNA demethylation in vertebrates: How could it be performed and targeted? *FEBS Letters* 494: 135-140.
- Kulus, D., Zalewska, M. 2014. Cryopreservation as a tool used in long-term storage of ornamental species - A review. *Scientia Horticulturae* 168: 88-107.
- Kumu, Y., Harada, T., Akuw, T.Y. 1983. Development of a whole plant from a shoot tip of asparagus opple/nalis l. frozen down to -196°C. *Journal of the Faculty of Agriculture, Hokkaido University* 61: 285-294.
- Lang, Z., Wang, Y., Tang, K., Tang, D., Datsenka, T., Cheng, J., Zhang, Y. et al. 2017. Critical roles of DNA demethylation in the activation of ripening-induced genes and inhibition of ripening-repressed genes in tomato fruit. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: E4511-E4519.
- Law, J.A., Jacobsen, S.E. 2010a. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* 11: 204-220.
- Law, J.A., Jacobsen, S.E. 2010b. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews Genetics* 11: 204-220.
- Lazo-Javalera, M.F. 2013. *Crioconservación y su efecto sobre el genoma y el estrés oxidativo en vid (Vitis vinifera L.) CV. Flame*. Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Hermosillo.
- Lazo, F., Tiznado, E., Hernandez, M., Rivera, M. 2018. Análisis de la pérdida iónica de yemas de vid (*Vitis vinifera* L.) crioconservadas.
- Li, Y., Kumar, S., Qian, W. 2018. Active DNA demethylation: mechanism and role in plant development. *Plant Cell Reports* 37: 77-85.
- Li, Z., Du, Y., Wang, Z. 2013. Effect of cryopreservation on the efficiency of exogenous gene, genetic transformation and expression level of *Arabidopsis thaliana*. *Electronic Journal of Biotechnology* 16: .
- Li, Z., Jiang, G., Liu, X., Ding, X., Zhang, D., Wang, X., Zhou, Y. et al. 2020. Histone demethylase SIJM6 promotes fruit ripening by removing H3K27 methylation of ripening-related genes in tomato. *New Phytologist* 227: 1138-1156.
- Lineró Fuentealba Yenny Anabela. 2018. *Efecto de la crioconservación en la respuesta morfo-fisiológica del tejido embriogénico para la producción de embriones somáticos de pinus radiata D.Don*. Universidad de Concepción. Facultad de Ciencias Forestales.
- Liu, C., Li, H., Lin, J., Wang, Y., Xu, X., Cheng, Z.-M. (Max), Chang, Y. 2018. Genome-Wide Characterization of DNA Demethylase Genes and Their Association with Salt Response in

Pyrus. Genes 9: 398.

- Lu, C., Thompson, C.B. 2012. Metabolic regulation of epigenetics. Cell Metabolism 16: 9-17.
- Madeira, F., Park, Y.M., Lee, J., Buso, N., Gur, T., Madhusoodanan, N., Basutkar, P. et al. 2019. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. Nucleic Acids Research 47: W636-W641.
- Markovic, Z., Preiner, D., Andabaka, Ž. *Cryopreservation and cryotherapy of grapevine (Vitis vinifera L.) Complementary conservation and use of plant genetic resources.*
- Mart, I. 2012. Identificación de proteínas que participan en una ruta de desmetilación activa de DNA en Arabidopsis thaliana.
- Matsumoto, T., Akihiro, T., Maki, S., Mochida, K., Kitagawa, M., Tanaka, D., Yamamoto, S.I., Niino, T. 2013. Genetic stability assessment of wasabi plants regenerated from long-term cryopreserved shoot tips using morphological, biochemical and molecular analysis. Cryo-Letters 34: 128-136.
- Matsumoto, T., Sakai, A., Takahashi, C., Yamada, K. (Shimane A.E.S. 2440 A.I.S. 693 (Japan)). 1995. Cryopreservation of in vitro-grown apical meristems of wasabi (Wasabia japonica) by encapsulation-vitrification method. Cryo-letters (United Kingdom).
- Mikuła, A., Tomiczak, K., Rybczyński, J.J. 2011. Cryopreservation enhances embryogenic capacity of Gentiana cruciata (L.) suspension culture and maintains (epi)genetic uniformity of regenerants. Plant Cell Reports 30: 565-574.
- Moglia, A., Gianoglio, S., Acquadro, A., Valentino, D., Milani, A.M., Lanteri, S., Comino, C. 2019. Identification of DNA methyltransferases and demethylases in Solanum melongena L., and their transcription dynamics during fruit development and after salt and drought stresses Wu, K. (ed.), PLOS ONE 14: e0223581.
- Nash, H.M., Bruner, S.D., Schärer, O.D., Kawate, T., Addona, T.A., Spooner, E., Lane, W.S., Verdine, G.L. 1996. Cloning of a yeast 8-oxoguanine DNA glycosylase reveals the existence of a base-excision DNA-repair protein superfamily. Current Biology 6: 968-980.
- Nie, W.F., Lei, M., Zhang, M., Tang, K., Huang, H., Zhang, C., Miki, D. et al. 2019. Histone acetylation recruits the SWR1 complex to regulate active DNA demethylation in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 116: 16641-16650.
- Niino, T., Yamamoto, S.I., Fukui, K., Martínez, C.R.C., Valle Arizaga, M., Matsumoto, T., Engelmann, F. 2013. Dehydration improves cryopreservation of mat rush (Juncus decipiens Nakai) basal stem buds on cryo-plates. Cryo-Letters 34: 549-560.
- Nuc, K., Marszałek, M., Pukacki, P.M. 2016. Cryopreservation changes the DNA methylation of embryonic axes of Quercus robur and Fagus sylvatica seeds during in vitro culture. Trees - Structure and Function 30: 1831-1841.
- Ogneva, Z. V., Dubrovina, A.S., Kiselev, K. V. 2016. Age-associated alterations in DNA methylation and expression of methyltransferase and demethylase genes in Arabidopsis thaliana. Biologia Plantarum 60: 628-634.
- Orizaba, V., Alejandra, M., Morales, R., Carlos, A., Cruz, C., Fcq-Orizaba, D., Delia, H. et al. 2018. Análisis de la acumulación de osmolitos compatibles y del comportamiento térmico

del agua durante la crioconservación de ápices de vainilla (*Vanilla insignis*).

- Ortega Galisteo, A.P. 2008. Mecanismos moleculares de control epigenético en *Arabidopsis thaliana*: aislamiento y caracterización funcional de las dna glicosilasas DML2 y DML3.
- Park, J.S., Frost, J.M., Park, K., Ohr, H., Park, G.T., Kim, S., Eom, H. et al. 2017. Control of DEMETER DNA demethylase gene transcription in male and female gamete companion cells in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: 2078-2083.
- Parrilla-Doblas, J.T., Roldán-Arjona, T., Ariza, R.R., Córdoba-Cañero, D. 2019. Active DNA Demethylation in Plants. *International Journal of Molecular Sciences* 20: .
- Pathirana, R., McLachlan, A., Hedderley, D., Panis, B., Carimi, F. 2016. Pre-treatment with salicylic acid improves plant regeneration after cryopreservation of grapevine (*Vitis* spp.) by droplet vitrification. *Acta Physiologiae Plantarum* 38: 1-11.
- Peng, H., Zhang, J. 2009. Plant genomic DNA methylation in response to stresses: Potential applications and challenges in plant breeding. *Progress in Natural Science* 19: 1037-1045.
- Penterman, J., Zilberman, D., Jin, H.H., Ballinger, T., Henikoff, S., Fischer, R.L. 2007. DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104: 6752-6757.
- Peredo, E.L., Arroyo-García, R., Reed, B.M., Revilla, M.Á. 2008. Genetic and epigenetic stability of cryopreserved and cold-stored hops (*Humulus lupulus* L.). *Cryobiology* 57: 234-241.
- Plitta, B.P., Michalak, M., Naskręt-Barciszewska, M.Z., Barciszewski, J., Chmielarz, P. 2014. DNA methylation of *Quercus robur* L. plumules following cryo-pretreatment and cryopreservation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 117: 31-37.
- Qiu, Q., Mei, H., Deng, X., He, K., Wu, B., Yao, Q., Zhang, J. et al. 2019. DNA methylation repels targeting of *Arabidopsis* REF6. *Nature Communications* 10: .
- Rafique, T., Yamamoto, S. ichi, Fukui, K., Mahmood, Z., Niino, T. 2015. Cryopreservation of sugarcane using the V cryo-plate technique. *Cryo-Letters* 36: 51-59.
- Reid, K.E., Olsson, N., Schlosser, J., Peng, F., Lund, S.T. 2006. An optimized grapevine RNA isolation procedure and statistical determination of reference genes for real-time RT-PCR during berry development. *BMC Plant Biology* 6: 27.
- Roldán-Arjona, García-Ortiz, Morales-Ruiz, T., Ap, O.-G., Mi, M.-M., Mi, P.-M., E, S. 2009. *Desmetilación activa del ADN: un mecanismo epigenético para la reactivación de genes silenciados*.
- SAGARPA. 2017. UVA Mexicana. Planeación agrícola nacional. Planeación agrícola nacional. 2017-2030.
- Sakai, A., Hirai, D., Niino, T. 2008. Development of PVS-based vitrification and encapsulation-vitrification protocols. En *Plant Cryopreservation: A Practical Guide*, pp. 33-57. Springer New York.
- Salazar-Centeno, C.A., Niño-Niño, C.A., Díaz-Suárez, R.A. 2017. Detección de bandas en color en una imagen de electroforesis en gel de una dimensión usando un algoritmo de

localización basado en máximos y mínimos. ITECKNE Innovación e Investigación en Ingeniería 14: 122.

- Sano, C. 2007. Abiotic-stress induces demethylation and transcriptional activation of a gene encoding a glycerophosphodiesterase-like protein in tobacco plants. *Molecular genetics and genomics* : MGG 277: 589-600.
- Satgé, C., Moreau, S., Sallet, E., Lefort, G., Auriac, M.C., Remblière, C., Cottret, L. et al. 2016. Reprogramming of DNA methylation is critical for nodule development in *Medicago truncatula*. *Nature Plants* 2: 1-10.
- Saze, H., Tsugane, K., Kanno, T., Nishimura, T. 2012. DNA methylation in plants: Relationship to small rnas and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant and Cell Physiology* 53: 766-784.
- Schäfer-Menuhr, A., Schumacher, H.M., Mix-Wagner, G. 1997. Cryopreservation of potato cultivars-design of a method for routine application in genebanks. En *Acta Horticulturae*, pp. 477-482. International Society for Horticultural Science.
- Schumann, U., Lee, J.M., Smith, N.A., Zhong, C., Zhu, J.K., Dennis, E.S., Millar, A.A., Wang, M.B. 2019. DEMETER plays a role in DNA demethylation and disease response in somatic tissues of *Arabidopsis*. *Epigenetics* 14: 1074-1087.
- Sekizawa, K., Yamamoto, S. ichi, Rafique, T., Fukui, K., Niino, T. 2011. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) by vitrification method using aluminium cryo-plates. *Plant Biotechnology* 28: 401-405.
- Shangguan, L., Fang, X., Jia, H., Chen, M., Zhang, K., Fang, J. 2020. Characterization of DNA methylation variations during fruit development and ripening of *Vitis vinifera* (cv. 'Fujiminori'). *Physiology and Molecular Biology of Plants* 26: 617-637.
- Shatnawi, M., Anfoka, G., Shibli, R., Al-Mazra'awi, M., Shahrour, W., Arebiat, A. 2011. Clonal propagation and cryogenic storage of virus-free grapevine (*Vitis vinifera* L.) via meristem culture. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* 35: 173-184.
- SIAP. 2020. Producción de uva en México. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, México6. Disponible en: <https://www.gob.mx/siap> [Accedido 1 de febrero de 2021].
- Silva, H.G., Sobral, R.S., Magalhães, A.P., Morais-Cecílio, L., Costa, M.M.R. 2020. Genome-Wide Identification of Epigenetic Regulators in *Quercus suber* L. *International journal of molecular sciences* 21: 1-24.
- Sirohi, G., Pandey, B.K., Deveshwar, P., Giri, J. 2016. Emerging Trends in Epigenetic Regulation of Nutrient Deficiency Response in Plants. *Molecular Biotechnology* 58: 159-171.
- Sisunandar, Rival, A., Turquay, P., Samosir, Y., Adkins, S.W. 2010. Cryopreservation of coconut (*Cocos nucifera* L.) zygotic embryos does not induce morphological, cytological or molecular changes in recovered seedlings. *Planta* 232: 435-447.
- Takahashi, Y.H., Schulze, J.M., Jackson, J., Hentrich, T., Seidel, C., Jaspersen, S.L., Kobor, M.S., Shilatifard, A. 2011. Dot1 and Histone H3K79 Methylation in Natural Telomeric and HM Silencing. *Molecular Cell* 42: 118-126.



- Tan, M., Luo, H., Lee, S., Jin, F., Yang, J.S., Montellier, E., Buchou, T. et al. 2011. Identification of 67 histone marks and histone lysine crotonylation as a new type of histone modification. *Cell* 146: 1016-1028.
- Tanaka, D., Yamamoto, S., Matsumoto, T., Valle Arizaga, M., Niino, T. 2019. Development of effective cryopreservation protocols using aluminium cryo-plates for mulberry. En *Acta Horticulturae*, pp. 263-268. International Society for Horticultural Science.
- Tang, K., Lang, Z., Zhang, H., Zhu, J.K. 2016. The DNA demethylase ROS1 targets genomic regions with distinct chromatin modifications. *Nature Plants* 2: 1-10.
- Thomas, P., Schiefelbein, J.W. 2001. Combined in vitro and in vivo propagation for rapid multiplication of grapevine cv. Arka Neelamani. *HortScience* 36: 1107-1110.
- Timothy, B.L., Charles, E. 1994. Fitting a mixture model by expectation maximization to discover motif in biopolymers. 28-36.
- Torres, Á., Román, M.I., González, C., Manzano, A.R., Fundora Mayor, Z. 2011. Evaluación fenotípica y bioquímica de plantas regeneradas de meristemas proliferantes crioconservados de plátano (*Musa SPP.*). *Agrotecnia de Cuba* 35: 1-11.
- Uchendu, E., Lata, H., Chandra, S., Khan, I.A., Elsohly, M.A. 2019. Cryopreservation of Shoot Tips of Elite Cultivars of *Cannabis sativa* L. By Droplet Vitrification. *Medical Cannabis and Cannabinoids* 2: 29-34.
- Waddington, C.H. 2012. The epigenotype. *International journal of epidemiology* 41: 10-13.
- Wang, H., Beyene, G., Zhai, J., Feng, S., Fahlgren, N., Taylor, N.J., Bart, R. et al. 2015. CG gene body DNA methylation changes and evolution of duplicated genes in cassava. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 112: 13729-13734.
- Wang, M.R., Chen, L., Zhang, Z., Blystad, D.R., Wang, Q.C. 2018. Cryotherapy: A Novel Method for Virus Eradication in Economically Important Plant Species. En *Methods in Molecular Biology*, pp. 257-268. Humana Press Inc.
- Wang, Q., Tanne, E., Arav, A., Gafny, R. 2000. Cryopreservation of in vitro-grown shoot tips of grapevine by encapsulation-dehydration. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 63: 41-46.
- Wang, Z., He, Y. 2009. Effect of cryopreservation on the development and DNA methylation patterns of *Arabidopsis thaliana*. *Life Science Journal* 6: 55-60.
- Winkler, A.J., Cook, J.A., Kliewer, W.M., Lider, L.A. 1975. General Viticulture. *Soil Science* 120: 462.
- Yamamoto, S., Rafique, T., Sekizawa, K., Koyama, A., Ichihashi, T., Niino, T., 新野孝男. 2012. Development of an effective cryopreservation protocol using aluminum cryo-plates for in vitro-grown shoot tips of mulberries (*Morus spp.*) originated from the tropics and subtropics. *Sanshi-Konchu Biotec* 81: 1-1.
- Yamamoto, S.I., Rafique, T., Fukui, K., Sekizawa, K., Niino, T. 2012. V-cryo-plate procedure as an effective protocol for cryobanks: Case study of mint cryopreservation. *Cryo-Letters* 33: 12-23.
- Yamamoto, S.I., Rafique, T., Priyantha, W.S., Fukui, K., Matsumoto, T., Niino, T. 2011. Development of a cryopreservation procedure using aluminium cryo-plates. *Cryo-Letters*

32: 256-265.

- Yamamoto, S.I., Wunna, Rafique, T., Arizaga, M.V., Fukui, K., Gutierrez, E.J.C., Martinez, C.R.C. et al. 2015. The Aluminum Cryo-plate Increases Efficiency of Cryopreservation Protocols for Potato Shoot Tips. *American Journal of Potato Research* 92: 250-257.
- Yang, Z., Li, Y. 2018. Dissection of RNAi-based antiviral immunity in plants. *Current Opinion in Virology* 32: 88-99.
- Yuan, L., Wang, D., Cao, L., Yu, N., Liu, K., Guo, Y., Gan, S., Chen, L. 2020. Regulation of Leaf Longevity by DML3-Mediated DNA Demethylation. *Molecular Plant* 13: 1149-1161.
- Zhang, C., Hung, Y.H., Rim, H.J., Zhang, D., Frost, J.M., Shin, H., Jang, H. et al. 2019. The catalytic core of DEMETER guides active DNA demethylation in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116: 17563-17571.
- Zhang, H., Lang, Z., Zhu, J.K. 2018. Dynamics and function of DNA methylation in plants. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 19: 489-506.
- Zhang, J.Y., Wang, Q.J., Guo, Z.R. 2012. [Progresses on plant AP2/ERF transcription factors]. *Yi chuan = Hereditas / Zhongguo yi chuan xue hui bian ji* 34: 835-847.
- Zhu, H., Xie, W., Xu, D., Miki, D., Tang, K., Huang, C.F., Zhu, J.K. 2018. DNA demethylase ROS1 negatively regulates the imprinting of DOGL4 and seed dormancy in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115: E9962-E9970.
- Zhu, J.K. 2009a. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual Review of Genetics* 43: 143-166.
- Zhu, J.K. 2009b. Active DNA demethylation mediated by DNA glycosylases. *Annual Review of Genetics* 43: 143-166.