



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

EFECTO DEL AIA Y EL 2,4-D EN LA MODULACIÓN EPIGENÉTICA DE LOS GENES ARF EN Agave spp.

Tesis que presenta

VÍCTOR JESÚS CANCINO GARCÍA

En opción al título de

MAESTRO EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

ABRIL, 2015





RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado "EFECTO DEL AIA Y EL 2,4-D EN LA MODULACIÓN EPIGENÉTICA DE LOS GENES *ARF* EN *Agave* spp." fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Clelia De la Peña Seaman, dentro de la opción de Biotecnología de Plantas, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,

ALLI

Dr. Mànuel Martínez Estevez Director de Docencia Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Mérida, Yucatán, México; a 27 de abril de 2015.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C., y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica, A.C., y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se regirán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.

Firma:

I.B.T. Victor Jesús Cancino Garcia

AGRADECIMIENTOS

Mi más profundo agradecimiento a mis padres Leobardo y Elsa y a mi hermana Stephanie; por el apoyo incondicional que me han brindado a lo largo de mi formación tanto académica como personal. Gracias por los esfuerzos que han hecho para que yo siga adelante, siempre les estaré agradecido. ¡Los quiero mucho mi familía hermosa!

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por la beca otorgada No. 486053 y al Proyecto de Ciencia Básica No. 178149, para la realización de mis estudios de Maestría.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C., por las instalaciones prestadas, en especial a la Unidad de Biotecnología y a la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas por haberme proporcionado los equipos y espacios necesarios para la realización de esta tesis.

A la Dra. Clelia De la Peña Seaman, directora de se esta tesis de maestría. Gracias primeramente por haberme permitido desarrollar este trabajo bajo su dirección; así también por sus consejos, el apoyo, paciencia y tiempo brindados durante mi estancia en su grupo de investigación.

A mi comité revisor, integrado por el Dr. Luis Alfonso Saénz Carbonell, Dr. Rolffy Rubén Ortíz Andrade, Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, Dr. Jorge Manuel Santamaría Fernández y a la Dra. Clelia De la Peña Seaman, por sus valiosas observaciones realizadas durante la realización de esta tesis.

Agradecimientos especiales al Dr. Jorge Humberto Ramírez Prado, por su valioso tiempo y asesoría prestados en la parte de los análisis bioinformáticos durante la realización de esta tesis.

Al Dr. Víctor M. Loyola Vargas y al Dr. Manuel L. Robert Díaz, por haberme permitido hacer uso de sus laboratorios y el apoyo brindado por el personal de cada laboratorio, para la realización de esta tesis.

A mis compañeras del Laboratorio de Epigenética y Cromatina de Plantas, M. en C. Rosa Y. Us Camas, M. en C. Fátima P. Duarte Áke y M. en C. Sara Hernández Castellano, Inés Arana Guevara, Biol. Augusto I. Almeyda Cen y al Dr. Geovany I. Nic Can, por su apoyo y consejos prestados a lo largo de la realización de esta tesis. Pero sobre todo, por la amistad brindada.

Al técnico Eduardo G. Castillo Castro, por el apoyo técnico, sus incomparables consejos y por la amistad que me brindó en mi durante mi estadía en la laboratorio de Propagación Clonal en la parte de micropropagación del *Agave*.

Agradecimientos especiales al Dr. José Ramón Pacheco Arjona, M. en C. Lilia Pérez Oyosa, M. en C. Ángeles G. Mayorga López, I.B.T. Carlos I. Cruz Cárdenas y a la I.B.T. Gabriela Sandoval Cancino, por sus consejos, apoyo y amistad durante la realización de esta tesis.

A mis amigos (as) de SanCris: Iván, George, Aymer, Alejandro, Willy, Manlio, Ana, Walu, Oli y Mesh por su amistad y apoyo durante todos estos años y por los que faltan.

En especial a mis tíos Gustavo García Utrilla, Margarita Ravelo Virgen, Ma. Leticia García Utrilla por todo el apoyo y consejos que siempre me han brindado.

A aquellas personas que a lo largo de mi formación académica tanto dentro del CICY como de fuera, he logrado conocer y que de manera directa o indirecta han contribuido en la realización de esta tesis.

Esta tesis no es solo mía, sino de todas las personas que me ofrecieron su amistad y apoyo cuando más lo necesite...;Gracias Siempre!

DEDICATORIAS

A mis padres Leobardo y Elsa; a mi hermana Stephanie, que son mis pilares en la vida; por todo el apoyo, comprensión, confianza y amor que me han brindado a lo largo de mi formación. Sin ello, no se hubiera podido realizar esta tesis. ¡Gracias Siempre!

A mi abuela Petra de los Ángeles Bermúdez Ramos (Q.E.P.D). Que donde quiera que esté, se que estaría feliz de hojear esta tesis aunque no le entendiese.

A Lilia, por todo el amor, apoyo, comprensión, cariño, amistad y horas que pasaste a mi lado acompañándome durante la realización de esta tesis.

A mis tios (as) Tavis, Magy y Lety, por todo el apoyo que me ha brindado durante mi formación.

A toda mi familia y amigos (as) en general, por sus palabras de motivación, el cariño y el apoyo que siempre me han brindado.

Y a todas esas personas especiales, a las cuales siempre les tendré un cariño muy especial.

[[Gracias!!

IN	DI.	r	
11.4	$\boldsymbol{\nu}$	s	

INDICE DE FIGURAS
ÍNDICE DE CUADROS
ABREVIATURAS
INTRODUCCIÓN
Capitulo I
ANTECEDENTES
1.1. LA MICROPROPAGACIÓN
1.2. LA BIOSÍNTESIS, TRANSPORTE Y SEÑALIZACIÓN DE LAS AUXINAS
1.3. Los genes ARF
1.4. EPIGENÉTICA Y CULTIVO IN VITRO
1.5. AGAVE
JUSTIFICACIÓN
HIPÓTESIS
OBJETIVO GENERAL
OBJETIVOS PARTICULARES
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL
BIBLIOGRAFÍA
Capítulo II

Caracterización fenotípica de las especies Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul, en condiciones de AIA, 2,4-D y sin auxinas ... 39

2.1. INTRODUCCIÓN.	
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS	2.1. INTRODUCCIÓN
2.2.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DEL CULTIVO DE AGAVE. 41 2.2.2. TRATAMIENTOS CON AUXINAS 44 2.2.2. TRATAMIENTOS CON AUXINAS 44 2.2.2.1. EVALUACIÓN FENOTÍPICA. 44 2.2.3. ANALISIS ESTADÍSTICO. 47 2.3. RESULTADOS. 48 2.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW., A. FOURCROYDES LEM. Y A. TEQUILANA WEBER VAR. AZUL. 48 2.4. DISCUSIÓN 62 2.5. BIBLIOGRAFÍA. 65 Capítulo III 69 Análisis filogenético de los genes ARF en Agave angustifolía Haw., A. fourcroydes Lem., A. tequilana Weber var. Azul, en presencia de AIA, 2,4-D y sin auxinas	2.2. MATERIALES Y MÉTODOS
2.2.2. TRATAMIENTOS CON AUXINAS 44 2.2.2.1. EVALUACIÓN FENOTÍPICA. 44 2.2.3. ANALISIS ESTADÍSTICO. 47 2.3. RESULTADOS. 48 2.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE Agave angustifolia Haw., A. FOURCROYDES LEM. Y A. TEQUILAMA WEBER VAR. AZUL 48 2.4. DISCUSIÓN. 62 2.5. BIBLIOGRAFÍA. 65 Capitulo III. 69 Antálisis filogenético de los genes ARF en Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem., A. tequilana Weber var. Azul, en presencia de AIA, 2,4-D y sín auxinas. 69 3.1 INTRODUCCIÓN. 69 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS. 71 3.2.1. AISLAMIENTO MÚLTIPLE DE LOS GENES ARF. 71 3.2.2. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LOS GENES ARF. 71 3.2.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE DOMINIOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE ÁGAVE 71 3.2.5. ANÁLISIS NUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE ÁGAVE 71 3.2.5. ANÁLISIS NUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE ÁGAVE 71	2.2.1. MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DEL CULTIVO DE AGAVE
2.2.2.1. EVALUACIÓN FENOTÍPICA	2.2.2. TRATAMIENTOS CON AUXINAS
2.2.3. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	2.2.2.1. EVALUACIÓN FENOTÍPICA
2.3. RESULTADOS. 48 2.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE Agave angustifolia Haw., A. FOURCROYDES LEM. Y A. TEQUILANA WEBER VAR. AZUL. 48 2.4. DISCUSIÓN 62 2.5. BIBLIOGRAFÍA. 65 Capítulo III 69 Análisis filogenético de los genes ARF en Agave angustifolía Haw., A. fourcroydes Lem., A. tequilana Weber var. Azul, en presencia de AIA, 2,4-D y sin auxinas. 69 3.1 INTRODUCCIÓN. 69 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS. 71 3.2.1. AISLAMIENTO IN SILICO DE LOS GENES ARF. 71 3.2.2. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE DOMINIOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE AGAVE 71 3.2.5. ANÁLISIS IN SILICO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS. 72	2.2.3, ANÁLISIS ESTADÍSTICO
2.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE Agave angustifolia Haw., A. FOURCROYDES LEM. Y A. TEQUILANA WEBER VAR. AZUL	2.3. RESULTADOS
A. TEQUILANA WEBER VAR. AZUL	2.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW., A. FOURCROYDES LEM. Y
2.4. DISCUSIÓN 62 2.5. BIBLIOGRAFÍA 65 Capitulo III 69 Análisis filogenético de los genes ARF en Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem., A. tequilana Weber var. Azul, en presencia de AIA, 2,4-D y sin auxinas. 69 3.1 INTRODUCCIÓN 69 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS 71 3.2.1. AISLAMIENTO IN SILICO DE LOS GENES ARF. 71 3.2.2. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE DOMINIOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE ÁGAVE 71 3.2.5. ÁNÁLISIS IN SILICO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS.	A. TEQUILANA WEBER VAR. AZUL
2.5. BIBLIOGRAFÍA	2.4. DISCUSIÓN
Capitulo III	2.5. BIBLIOGRAFÍA
Análisis filogenético de los genes ARF en Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem., A. tequilana Weber var. Azul, en presencia de AIA, 2,4-D y sin auxinas	Capítulo III
Lem., A. tequilana Weber var. Azul, en presencia de AIA, 2,4-D y sin auxinas	Análisis filogenético de los genes ARF en Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes
3.1 INTRODUCCIÓN 69 3.2. MATERIALES Y MÉTODOS 71 3.2.1. AISLAMIENTO IN SILICO DE LOS GENES ARF. 71 3.2.2. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE DOMINIOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE AGAVE TEQUILANA. 71 3.2.5. ANÁLISIS IN SILICO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS. 72	Lem., A. tequilana Weber var. Azul, en presencia de AIA, 2,4-D y sin auxinas 69
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS. 71 3.2.1. AISLAMIENTO IN SILICO DE LOS GENES ARF. 71 3.2.2. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.3. ANÁLISIS FILOGENÈTICO Y DE DOMINIOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE ÁGAVE 71 3.2.5. ANÁLISIS IN SILICO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS. 72	3.1 INTRODUCCIÓN
3.2.1. AISLAMIENTO IN SILICO DE LOS GENES ARF. 71 3.2.2. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE DOMINIOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE AGAVE TEQUILANA. 71 3.2.5. ANÁLISIS IN SILICO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS. 72	3.2. MATERIALES Y MÉTODOS
3.2.2. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.3. ANÁLISIS FILOGENÈTICO Y DE DOMINIOS DE LOS GENES ARF. 71 3.2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE AGAVE TEQUILANA. 71 3.2.5. ANÁLISIS IN SILICO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS. 72	3.2.1. AISLAMIENTO IN SILICO DE LOS GENES ARF
3.2.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE DOMINIOS DE LOS GENES ARF	3.2.2. ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LOS TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF
3.2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE ÁGAVE TEQUILANA	3.2.3. ANÁLISIS FILOGENÉTICO Y DE DOMINIOS DE LOS GENES ARF,
TEQUILANA	3.2.4. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS A PARTIR DE TRANSCRITOS DE LOS GENES ARF DE AGAVE
3.2.5. ANÁLISIS IN SILICO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS	TEQUILANA
	3.2.5. ANÁLISIS IN SILICO DE LOS OLIGONUCLEÓTIDOS

Índice

3.2.6. TRADUCCIÓN DE LAS SECUENCIAS Y PREDICCIÓN DE LOS MARCOS ABIERTO	S DE LECTURA (RF).72
3.2.7. MATERIAL VEGETAL	
3.2.8. EXTRACCIÓN DE ARN.	
3.2.9. SÍNTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNC)	73
3.2.10. SECUENCIACIÓN.	
3.3. RESULTADOS	
3.4. DISCUSIÓN	
3.5. BIBLIOGRAFÍA	
Capítulo IV	
auxinas	
4.1 INTRODUCCIÓN	
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.2.1 MATERIAL VEGETAL	
4.2.2. EXTRACCIÓN DE ARN	
4.2.3. SINTESIS DE ADN COMPLEMENTARIO (ADNC)	
4.3. RESULTADOS	
4.4. DISCUSIÓN	
4.5. BIBLIOGRAFÍA	

5.11	NTRODUCCIÓN 125
5.2	MATERIALES Y MÉTODOS
5.3	RESULTADOS
5.4	DISCUSIÓN
5.5	BIBLIOGRAFÍA
Capitu	ılo VI
DISC	CUSIONES Y CONCLUSIONES
6.1	DISCUSIÓN GENERAL
6.2	CONCLUSIONES GENERALES
6.3	PERSPECTIVAS
6.4	BIBLIOGRAFIA

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 Principales métodos de la micropropagación5
Figura 1.2 Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV)
Figura 1.3 Transporte polar de las auxinas 10
Figura 1.4 Señalización de las auxinas
Figura 1.5 Familia de los Factores de Respuesta a Auxinas (ARF)
Figura 1.6 Modificaciones en la estructura de la cromatina
Figura 1.7 Distribución en la República Mexicana de las especies Agave angustifolia
Haw., A. fourcroydes Lem y A. tequilana Weber var. Azul
Figura 1.8 Estructura general de una planta de Agave
Figura 2.1 Selección del material vegetal in vitro de Agave spp
Figura 2.2 Selección de las plántulas para cada experimento43
Figura 2.3 Diagrama de los tratamientos en medios sin reguladores
Figura 2.4 Establecimiento de los tratamientos en medio sin reguladores
Figura 2.5 Plántulas de Agave angustifolia, evaluadas al día cero (T ₀)
Figura 2.6 Plántulas de Agave angustifolia al día tres (T ₃)
Figura 2.7 Plántulas de Agave angustifolia al día 21 (T ₂₁)50
Figura 2.8 Evaluación de la altura, peso y el número de hojas en Agave angustifolia Haw.,
a los cero (T ₀), tres (T ₃) y veintiuno (T ₂₁) días en ausencia (S/R) y presencia de AIA y 2,4-
D

Figura 2.9 Evaluación de las plántulas de Agave fourcroydes en el tiempo cero (T ₀) 52
Figura 2.10 Plántulas de Agave fourcroydes al día tres (T ₃)
Figura 2.11 Plántulas de Agave fourcroydes al día 21 (T ₂₁)54
Figura 2.12 Evaluación de la altura, peso y el número de hojas en Agave fourcroydes
Lem., a los cero (T ₀), tres (T ₃) y veintíuno (T ₂₁) días en ausencia (S/R) y presencia de AIA
y 2,4-D
Figura 2.13 Evaluación de las plántulas de Agave tequilana en el tiempo cero (T ₀) 56
Figura 2.14 Plántulas de Agave tequilana al dia tres (T ₃)
Figura 2.15 Plántulas de Agave tequilana al dia 21 (T ₂₁)57
Figura 2.16 Evaluación de la altura, peso y el número de hojas en Agave tequilana
Weber var Azul a los cero (T ₀), tres (T ₃) y veintiuno (T ₂₁) dias en ausencia (S/R) y
presencia de AIA y 2,4-D,
Figura 2.17 Evaluación fenotípica de las plántulas de las especies Agave angustifolia
Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul; en el tiempo veintiuno (T_{21}) en
medios sin auxinas (S/R), con AIA y con 2,4-D
Figura 3.1 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los 32 transcritos de ARF en
Agave tequilana
Figura 3.2 Análisis filogenético de las secuencias nucleotídicas de los 32 transcritos de
ARF en Agave tequilana
Figura 3.3 Análisis estructural y de dominios conservados de los 32 transcritos de Agave
tequilana
Figura 3.4 PCR in silico de los 12 genes ARF de Agave tequilana
Figura 3.5 Análisis filogenético de los 32 transcritos de los ARF en Agave tequilana 86

1.7

Índice

INDICE DE FIGURAS

Figura 3.6 Extracción de ARN de las 7 condiciones experimentales
Figura 3.7 Amplificación de los transcritos de ARF7a, ARF5, ARF1, ARF2a, ARF17 y
UBQ11 en las tres especies de Agave spp
Figura 3.8 Análisis filogenético de los 32 transcritos de los ARF en Agave tequilana 89
Figura 3.9 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de ARF1 91
Figura 3.10 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de ARF5
Figura 3.11 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de ARF7a 93
Figura 3.12 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de ARF1794
Figura 3.13 El análisis molecular filogenético con el método de máxima verosimilitud (Maximun likelihood)
Figura 4.1 Extracción de ARN de las 7 condiciones experimentales: 1T ₀ S/R; 2T ₃ S/R;
3T3 AIA; 4T3 2,4-D; 5T21 S/R; 6T21 AIA; y 7T21 2,4-D en las 3 especies Agave
angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul. Se utilizó un
marcador molecular de 1000pb (M) 112
Figura 4.2 Análisis de la expresión de los genes ARF7a, 5, 2a, 1 y 17 en las especies
Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul
Figura 4.3 Nivel de expresión del gen ARF1 en Agave spp
Figura 4.4 Nivel de expresión del gen ARF2a en Agave spp
Figura 4.5 Nivel de expresión del gen ARF5 en Agave spp
Figura 4.6 Nivel de expresión del gen ARF7a en Agave spp
Figura 4.7 Nivel relativo de expresión del gen ARF17 en Agave spp

INDICE DE FIGURAS

1.4

igura 5.1 Vista frontal del nucleosoma
Figura 5.2 Esquematización del proceso de Immunoprecipitación de la Cromatina (ChIP)
figura 5.3 Procedimiento de la técnica de ChIP-qPCR
Figura 5.4 Perfiles de metilación de la histona H3 de Agave angustifolia Haw., A.
ourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul utilizando la técnica de
mmunoprecipitación de la cromatina (ChIP)

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1 Genes requeridos en la biosíntesis, transporte y señales de transducción de
auxinas en Arabidopsis thaliana y sus homólogos en maíz (Zea mays) y arroz (Oryza
sativa)
Cuadro 2.1 Cantidades requeridas para preparar un litro del Medio MS con reducción de
nitratos (MSB)
Cuadro 2.2 Concentraciones para la preparación de un litro de medio de multiplicación
MSB-5
Cuadro 2.3 Concentraciones para la preparación de un litro de medio de enraizamiento
MSB-R
Cuadro 2.4 Concentraciones para la preparación del medio MSB-AIA
Cuadro 2.5 Concentraciones para la preparación del medio MSB-2,4-D
Cuadro 2.6 Análisis estadístico t de Student
Cuadro 2.7 Análisis estadístico Factorial
Cuadro 3.1 Números de accesión del NCBI de los 32 transcritos de los genes ARF de
Agave tequilana
Cuadro 3.2 Oligonucleótidos generados a partir de los 12 transcritos de cada subclado de
ARF en Agave tequilana
Cuadro 3.3 Resultado del análisis bioinformático a partir de los resultados del National
Center for Biotechnology Information (NCBI) de las secuencias ARFs de A. tequilana 95

ÍNDICE DE CUADROS

Índice

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

- ARF Factor de Respuesta a Auxina.
- RCV Reguladores de Crecimiento Vegetal.
- AlA Ácido Indól-3-acético.
- 2,4-D Ácido 2,4-diclorofenoxiacético,
- ANA Ácido 1-naftalenacético.
- MS Medio Musrashige y Skoog.
- MSB Medio MS con reducción de nitratos.
- RF Marco de lectura.
- NCBI Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
- SNPs Polimorfismo de Nucleótido Simple.
- ADN Ácido Desoxirribonucleico.
- ARN Ácido Ribonucleico.
- ADNc ADN complementario.
- MPH Modificaciones postraduccionales en las Histonas.
- HPLC Cromatografia Líquida de Alta Eficiencia.
- ChIP Immunoprecipitación de la Cromatina.

RESUMEN

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán, dentro de su programa de mejoramiento del género Agave, se ha desarrollado exitosamente la técnica para su micropropagación. El Agave es una especie originaria de México con un alto valor comercial, va que especies pertenecientes a este género como A. tequilana, A. angustifolia y A, fourcroydes son usadas en la industria tequilera, mezcalera y textil, respectivamente. Este programa se ha desarrollado exitosamente mediante protocolos de micropropagación, con el uso de diferentes reguladores de crecimiento; sin embargo, se ha observado que las plantas presentan diferentes fenotipos dependiendo de las auxinas a las que son expuestas durante la micropropagación, las cuales son más evidentes una vez que las plantas están en condiciones de campo. Estudios en otras especies han demostrado que los reguladores de crecimiento, principalmente de naturaleza auxínica, promueven la metilación del ADN, causando cambios epigenéticos. Estudios en el laboratorio han mostrado que las auxinas, en particular el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), propicia una mayor altura en A. tequilana, un mayor número de hojas en A. fourcroydes y un mayor peso en A, angusfifolia y A, fourcroydes. Todos estos resultados se obtuvieron a los 21 días del experimento (Duarte-Ake, 2013). Se realizó un análisis filogenético de los transcritos que codifican a los Factores de Respuesta a Auxinas (ARF) en Agave tequilana Weber var. azul y se encontraron 32, de los cuales 23 fueron transcripcionalmente activos. Se lograron aislar cinco genes ARF putativos ARF1, ARF2a, ARF5, ARF7a y ARF17 en las tres especies de Agave, a los cuales se les midió su expresión relativa a los 0, 3 y 21 días en presencia y ausencia de las auxinas ácido 3indolacético (AIA) y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Se encontró que ARF1 y ARF5 mostraron una expresión diferencial dependiendo de la especie y el tiempo de tratamiento con las auxinas. Se encontró por medio de la immunoprecipitación de la cromatina (ChiP) que éstos genes estaban regulados por las marcas H3K9me2 y que esa regulación es diferente en cada especie.

ABSTRACT

At Centro de Investigación Científica de Yucatán's, Agave breeding program a micropropagation system, it has been successfully developed. Agave is native to Mexico and has a high commercial value. Species such as A. tequilana, A. angustifolia and A. fourcroydes have been used in the tequila, mezcal and textile industries, respectively. Micropropagation protocols have been successfully developed for those species, using different growth regulators; however, it has been observed that plants have different phenotypes depending on the auxin at which they are exposed to this condition become more noticeable when plants are transferred to the field. Studies have shown that other plant growth regulators, such as those from auxin nature, can promote DNA methylation causing epigenetic changes. Laboratory studies have shown that auxins, including 2,4- D, promotes greater plant height in A. teguilana, a greater number of leaves in A. fourcrovdes and weight gain in both A. angustifolia and A. fourcroydes; all these results were obtained at 21 days of the experiment (Duarte-Ake, 2013). On the other hand, phylogenetic analysis of transcripts encoding ARF genes in Agave teguilana Weber var. Azul revealed 32 ARF, from which 23 are transcriptionally active. Likewise, here we isolated five putative ARF genes in the three species of Agave, ARF1, ARF2a, ARF5, ARF7a and ARF17. From these genes, only ARF1 and ARF5 showed differential expression between absence and presence of indole-3-acetic acid (IAA) and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D). Furthermore, it was found that these genes, through Cromatin Immunoprecipitation (ChIP) studies, were regulated by H3K9me2 at different level for each species.

INTRODUCCIÓN

La micropropagación es una herramienta biotecnológica eficaz para la producción de plantas elite a gran escala (Robert *et al.*, 1987). Durante este proceso se inducen diferentes mecanismos bioquímicos y moleculares implicados en el rejuvenecimiento de las células vegetales, lo que provoca un mejor desarrollo de estas plantas en el campo a diferencia de las plantas cultivadas de manera tradicional. Las plantas rejuvenecidas poseen mayor calidad genética que las hacen capaces de tolerar mejor las condiciones ambientales adversas a las que están constantemente sometidas (Bairu *et al.*, 2011). Hoy en día se conoce qué condiciones ambientales tienen repercusiones importantes en la epigenética de las plantas para defenderse en ambientes estresantes (LoSchiavo *et al.*, 1989), éstas incluso pueden ser heredadas a las siguientes generaciones.

Actualmente, se sabe que las plantas propagadas y regeneradas por cultivo de tejidos *in vitro* pueden presentar cambios genéticos y epigenéticos (Bairu *et al.*, 2011; Baranek *et al.*, 2010; Varga *et al.*, 1988). Dentro de los cambios epigenéticos se encuentra involucrada la metilación en el ADN y las modificaciones en las histonas provocando así una regulación génica derivada del proceso del cultivo *in vitro* (LoSchiavo *et al.*, 1989). La metilación del ADN (adición de grupos metilo en la posición 5° del anillo pirimidínico de la citosina) es un mecanismo epigenético regulatorio de la expresión de genes, algunos de éstos asociados con las fases de desarrollo y la competencia morfogénica en plantas (Fraga *et al.*, 2002). Por otro lado, entre las modificaciones postraduccionales de las histonas se encuentran la adición de grupos metilos (metilación), acetilos (acetilación), fosfatos (fosforilación), ubiquitina (ubiquitinación), entre otros.

Si bien es cierto que el cultivo de tejidos ofrece una rápida producción de nuevas variedades y clonas para plantaciones, se ha encontrado que los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), principalmente de naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del ADN causando cambios epigenéticos en las plantas (George *et al.*, 2008; LoSchiavo *et al.*, 1989). Estudios recientes en *Agave angustifolia* y *Agave fourcroydes* han demostrado que durante el cultivo *in vitro*, se provocan acumulaciones en la metilación de la lisina 9 dimetilada en la histona H3 (De-la-Peña *et al.*, 2012). Por ahora no se cuenta con un análisis claro del efecto de los RCV en la fase de micropropagación del *Agave* a

nivel molecular y si las modulaciones epigenéticas son alteradas en las plantas. Los Factores de Respuesta a Auxinas (ARFs, por sus siglas en inglés) son factores de transcripción que juegan un papel importante en el desarrollo de las plantas. Estos genes se activan minutos después de una estimulación con auxinas (Finet *et al.*, 2013; Rademacher *et al.*, 2011; Guilfoyle y Hagen, 2007; Tiwari *et al.*, 2003; Liscum y Reed, 2002; Ulmasov *et al.*, 1999a; Ulmasov *et al.*, 1999b). Se ha reportado que la regeneración de plantas empleando organogénesis de manera *in vitro*, generalmente se asocia con la presencia de cierta variabilidad entre las plantas (Duncan, 1996). Sin embargo, las implicaciones epigenéticas aún no han sido abordadas a profundidad por lo que sería de gran beneficio conocer cómo los RCV, especialmente las auxinas, empleados en la organogénesis pueden intervenir en la epigenética y cómo se afectan los genes involucrados en la señalización.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

El mejoramiento en el rendimiento y la productividad de los cultivos agrícolas y el desarrollo de variedades de plantas mejoradas que proporcionen alimentos de mejor calidad y productos naturales a bajos costos, es un importante reto para la sociedad actual (Yuan et al., 2011). La biotecnología vegetal ha demostrado ampliamente su potencial en la comprensión de muchos aspectos bioquímicos y fisiológicos básicos en las plantas (Niggeweb et al., 2004), además de que sirve como herramienta para la generación de plantas más eficientes para la producción de alimentos, compuestos biológicamente activos ó insumos para la industria; siendo la alternativa más viable para hacer frente a los problemas actuales como la escases de alímento y suministro de energía. Una herramienta muy eficiente para dicha problemática es el cultivo de células y tejidos vegetales, la cual se refiere al conjunto de técnicas usadas para cultivar células, tejidos u órganos vegetales in vitro bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos en un medio de cultivo (Thorpe, 1990; Street, 1977). La formación de tejidos a partir de una célula se basa en el principio de la totipotencialidad, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia integra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella y por lo tanto tiene el potencial para generar una nueva planta completa (Ferl y Paul, 2000). Teniendo el potencial para generar una nueva planta completa, el cultivo in vitro puede llevarse a cabo a través de estructuras organizadas (meristemos, ápices, nodos, raíces y embriones) y de tejidos desorganizados (callos, suspensiones celulares, protoplastos y de anteras) (George et al., 2008).

Entre las técnicas más usadas en el cultivo *in vitro* se encuentra la micropropagación, la cual es utilizada para multiplicar plantas de interés comercial o agronómico. La micropropagación es una herramienta biotecnológica eficaz para la producción de plantas elite a gran escala. Se sabe que los reguladores del crecimiento, en particular las auxinas, pueden alterar el metabolismo en los cultivos vegetales provocando diferentes respuestas fenotípicas en los cultivos (Letham y Palni, 1983; Skoog y Miller, 1957). Durante el desarrollo de la planta, la regulación de la transcripción se lleva a cabo por mecanismos epigenéticos (Martienssen y Colot, 2001). Estos mecanismos epigenéticos son

Capitulo I

principalmente la metilación del ADN y modificaciones postraduccionales de las histonas (Goldberg et al., 2007; Henderson y Jacobsen, 2007; Huettel et al., 2007; Holliday, 2006; Egger et al., 2004)

Los últimos estudios sugieren la presencia de mecanismos epigenéticos relacionados con el cultivo *in vitro* y al uso de reguladores del crecimiento vegetal (RCV) (Zhao, 2010; Mazari y Camm, 1993). Aunque se han estudiado algunos eventos epigenéticos en el ADN provocados por el cultivo *in vitro*, las modificaciones en la estructura de la cromatina no han sido del todo abordadas. Por otro lado, aún se desconoce cuál es el papel que juegan los RCV en la regulación epigenética de los genes involucrados en la señalización de auxinas. Es por ello que en este estudio se pretende investigar si las auxinas usadas comunmente en la micropropagación de *Agave* (ácido indolacético (AIA) y el ácido 2,4diclorofenoxiacético (2,4-D)), provocan cambios en la cromatina de uno de los principales grupos de genes involucrados en la señalización de auxinas, los Factores de Respuesta a Auxinas (*ARF*, por sus siglas en inglés) para así proponer un modelo de regulación epigenética durante la exposición de las plantas a auxínas naturales y sínteticas.

1.1. La micropropagación

Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han mostrado ser un importante procedimiento en la multiplicación, el mejoramiento y la conservación de plantas útiles al hombre (Bunn *et al.*, 2011; Pijut *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011; Bonga *et al.*, 2010; Debnath *et al.*, 2006). La propagación *in vitro* está basada en la proliferación de células meristemáticas que son capaces de regenerar una planta completa (Ziv *et al.* 1998) o a través de las células somáticas de cualquier tejido que puedan formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo a la competencia que posean y al estímulo que reciban (Murashige, 1974). Dentro del proceso de micropropagación, se pueden obtener clonas de la planta madre, obtenidas de tres maneras diferentes: mediante el uso de yemas axilares o meristemos, organogénesis (directa o indirecta) o, a partir de la embriogénesis somática directa o indirecta (George, *et al.*, 2008). Los métodos utilizados en la actualidad para la propagación de plantas *in vitro* son esencialmente por multiplicación de brotes a partir de yemas axilares, por la formación de brotes adventicios y/o embriones somáticos, ya sea de manera directa a partir de tejidos u órganos (explantes) retirados de la planta madre; o de manera indirecta a partir de células no organizadas (cultivos en suspensión)

Capítulo I

o tejidos (cultivo de callos), creada por la proliferación de las células dentro de los explantes; en tejidos de callos semi-organizados o cuerpos de propagación (tales como protocormos o pseudo-bulbillos) que se pueden obtener a partir de explantes, particularmente aquellas de ciertos órganos especializados de la planta (Figura 1.1).





El proceso de la micropropagación comprende cuatro principales fases: la preparativa, en la cual se selecciona el material que se quiere multiplicar tomando en cuenta sus características fenotípicas, genéticas y fitosanitarias (Debergh y Maene, 1981); la fase de establecimiento o iniciación de los cultivos; a esta etapa le sigue la fase de multiplicación o proliferación que tiene como objetivo la multiplicación de vástagos. Después está la etapa de enraizamiento en la cual se prepara a las plantas *in vitro* para su establecimiento en condiciones *ex vitro* y por último, la fase de aclimatación la cual es establecer las plantas en campo para su normal desarrollo. Los RCV son uno de los factores esenciales dentro del proceso de micropropagación (Bishopp *et al.*, 2011). Estos compuestos son

Capítulo I

importantes para las plantas y dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico se agrupan en once diferentes categorías: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, ácido jasmónico, ácido salicílico, brasinoesteroides, estrigolactonas, óxido nítrico y poliaminas (Santner *et al.*, 2009) (Figura 1.2).



Figura 1.2 Los reguladores de crecimiento vegetal (RCV) regulan todos los aspectos de crecimiento y desarrollo en las plantas (Santner *et al.*, 2009).

Cada uno de estos RCV tiene diferentes efectos en la planta, ya que median las respuestas a estreses tanto bióticos como abióticos y controlan diferentes procesos fisiológicos en las plantas (Hirsh y Fang, 1994). Sin embargo, los RCV más utilizados en el cultivo *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas, de los cuales se sabe que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo en el cultivo de tejidos vegetales (Zhao, 2010; Mazari y Camm, 1993).

Los RCV y específicamente el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la benciladenina (BA) han sido relacionados con la variabilidad inducida en el cultivo de tejidos (Evans *et al.,* 1984). A altas concentraciones, las auxinas son usadas para inducir la desdiferenciación y la rediferenciación en los tejidos y también son útiles para promover el enraizamiento de plantas provenientes de la germinación de embriones somáticos (Eeuwens *et al.,* 2002). Se sabe que la concentración óptima y la relación precisa de auxinas y citocininas son esenciales para una eficiente micropropagación (Letham y Palni, 1983; Skoog y Miller 1957). La tasa de variabilidad inducida en el cultivo de tejidos puede crecer al aumentar la concentración de los RCV en el medio de cultivo (Karp, 1995; D'Amato, 1985). El uso de concentraciones que van desde 0.05 hasta 0.5 µM de 2,4-D se ha visto implicado en la variación fenotípica de cultivos de interés comercial como la fresa (Nehra *et al.,* 1992), la soya (Gesteira *et al.,* 2002) y el algodón (Jin *et al.,* 2008).

1.2. La biosíntesis, transporte y señalización de las auxinas

Las auxinas controlan una gran variedad de procesos fisiológicos y de desarrollo en plantas, como la organogénesis, diferenciación del tejido vascular, elongación celular, dominancia apical, gravitropismo y formación de embriones y raices (Zhao, 2010; Robert y Friml 2009; Leyser, 2005; Woodward y Bartel, 2005). Los genes que codifican a las enzimas necesarias para la síntesis, transporte y señalización de auxinas se han identificado en maíz, arroz y *Arabidopsis thaliana* (Cuadro 1.1) (McSteen, 2010; Sugawara *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2001). Las auxinas juegan un papel esencial, al actuar como una señal versátil para la coordinación espacio-temporal del desarrollo en las plantas (Aloni *et al.*, 2006; Esmont *et al.*, 2005). La principal auxina natural es el ácido 3-indolacético (IAA), la cual es un ácido débil derivado del triptófano.

Capitulo I

Proteínas	Arabidopsis	Maíz	Arroz	Referencias
BIOSÍNTESIS				
Triptófano sintasa β	TRP2	ORP1,2		Wrigth <i>et al.</i> , 1991
Amidasa	AM11			
Aldehido oxidasa	AAO1	ZmA01	OsAO1	Sekimoto et al., 1997
Flavin monoxigenasa	YUC1-11	SP11	OsYUC1	Fujino et al., 2007; Woo et al., 2007; Yamamoto et al., 2007; Gallavotti et al.,
Citocromo P450	CYP79B2/3		COW1/NAL7	2008a.
Nitrilasa	NIT1	ZmNIT1,2	OsNIT	Park <i>et al.</i> , 2003; Kriechbaumer <i>et al.</i> , 2007
TRANSPORTE		1-1-2010		
Transporte de entrada de auxinas	AUX1	ZmAUX1		Hochholdinger <i>et al.</i> , 2000; Brooks <i>et al.</i> , 2009
Flujo transportador de auxinas	PIN1	ZmPIN1a ZmPIN1b ZmPIN1c	OsPIN1	Xu <i>et al.</i> , 2005; Carraro <i>et al.</i> , 2006; Gallovotti <i>et al.</i> , 2008b
Tranportadores ABC	ABCB1,19	BR2		Multani <i>et al.,</i> 2003
ARF-GAP	VAN3/SFC	ZmSFC	OsAGAP RCN1	Zhuang <i>et al.</i> , 2006; Zhang <i>et al.</i> , 2007 Yasuno <i>et al.</i> , 2009
SENALES DE TRAN	ISDUCCIÓN			
Factor de transcripción Aux/AIA	IAA1-25	RUM1	IAAI IAAI/3 IAA3/31	Thakur <i>et al.</i> , 2001; Nakamura <i>et al.</i> , 2006; Song <i>et al.</i> , 2009
OTRAS				
ARF	ARF (1-23)	ARF (1-22)		Finet et al., 2012; Wang et al., 2012;
Proteinas de				Wang et al., 2007
unión a auxinas	AtABP1	ZmABP1-4		Im et al., 2000
SAUR	SAUR	ZmSAUR2	OsSAUR	Knauss et al., 2003; Jain et al., 2006

Cuadro 1.1 Genes requeridos en la biosíntesis, transporte y señales de transducción de auxinas en Arabidopsis thaliana y sus homólogos en maíz (Zea mays) y arroz (Oriza sativa).

Capítulo I

El AIA, es la auxina que mayormente se encuentra en las plantas superiores (Bennett et al., 1996) y es sintetizada a partir de un precursor del Triptófano (Trp), por dos vías: la Independiente de Trp y la dependiente de Trp donde existen 4 vías: indol-3-acetamida (IAM), ácido indol-3-pirúvico (IPA), la triptamina (TAM) y el indol-3-acetaldoxima (IAOx) (Mano y Nemoto, 2012; Strader y Bartel, 2008; Wright *et al.*, 1992; Wright *et al.*, 1991). La distribución del AIA es a través del floema, junto con un transporte lento de célula a célula que es altamente regulado por proteínas transportadoras específicas como los AUX1/LAX (de entrada), los ABCB/PGP y los PIN (de salida) (Cho *et al.*, 2007; Petrásek, 2006). El modelo quimiosmótico del transporte de auxinas está basado en la diferencia de pH entre el apoplasto (pH 5,5) y el citoplasma (pH 7,0). El AIA protonado (IAAH) puede difundirse a través de la membrana plasmática o ser llevado por los transportadores de entrada AUX1/LAX en la célula. Ya estando en el citosol, el IAAH se disocia y se queda atrapado dentro de la célula en su forma desprotonada (IAA), pudiendo así salir de la célula por la acción de los transportadores de salida tipo PGP o PIN (Robert y Friml, 2009; Petrášek y Friml, 2009) (Figura 1.3).

Las auxinas aumentan la transcripción de varios genes tempranos, como por ejemplo: los genes Auxinas/AIA (Aux/IAA), Gretchen Hagen 3 (GH3) v los SMALL AUXIN UP RNA (SAUR) que regulan la fisiología de las plantas modulando la interacción de los factores de transcripción con los elementos de respuesta a auxinas (AuxREs) de los genes (Abel y Theologis, 1996). Un número importante de AuxREs han sido implicados definidos dentro de regiones promotoras río arriba de genes primarios/tempranos de respuesta a auxinas (Ulmasov et al., 1995; Li et al., 1994; Liu et al., 1994; Hagen et al., 1991). Las proteínas Aux/AIA se caracterizan por tener cuatro dominios conservados (domínios I-IV) (Thakur et al., 2005; Thakur et al., 2001). El papel del dominio I es aún desconocido, sin embargo, el dominio II es necesario para la característica de degradación rápida (Ramos et al., 2001; Worley et al., 2000). Existe cierta similitud entre los dominios III y IV, donde se encuentra otra familia de proteínas implicadas en la señalización, los ARFs. Los dominios III y IV funcionan como un dominio de interacción proteina-proteina, permitiendo a los Aux/IAA formar homo- y heterodimeros con otras proteinas Aux/AIA o con los ARFs (Kim et al., 1997). En respuesta a las auxinas, los Aux/IAA son objeto de proteólisis a través de la vía mediada por la Ubiquitina (Ubq), mientras que los ARFs ayudan a regular la transcripción de genes río abajo (Serino y

Capítulo I

Deng, 2003; Gray *et al.*, 2001). Los genes de respuesta temprana a auxinas, son aquellos que son activados o reprimidos aproximadamente dentro de 2 a 20 minutos después de exponer ya sea un órgano extirpado o una célula a concentraciones de auxinas exógenas (Guilfoyle *et al.*, 1998).



Figura 1.3 Transporte polar de las auxinas. A) Distribución de la auxina a través del sistema vascular desde diferentes tejidos (hojas jóvenes y brotes) de la zona meristemática a la raíz (basipetal). B) Modelo quimiosmótico del transporte de auxinas célula-célula. (Modificado de Robert y Friml, 2009).

A nivel molecular, la auxina activa rápidamente la transcripción de tres familias de genes: *Aux/IAA, SAUR* y *GH3.* Las proteínas Aux/IAA son proteínas que se unen a los dominios III y IV (Figura 1.5), que sirven para formar dímeros o heterodímeros para reprimir la actividad del factor de transcripción ARF (Tian *et al.*, 2002). Un aumento en la auxina provoca la proteólisis mediada por la Ubiquitina de Aux/IAA a través de la ligasa de ubiquitina SCF-TIR1. Esta eliminación inducida de las proteínas Aux/IAA conduce a una
desrepresión de la función ARF y la expresión de los genes diana, que incluyen Aux/IAA (Santner *et al.*, 2009; Leyser 2005; Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski y Leyser 2005) (Figura 1.4).



Figura 1.4 Señalización de las auxinas a bajas y altas concentraciones y la degradación de Aux/IAA después de la activación de los genes de respuesta temprana a auxinas por los factores de transcripción ARF (Modificado de Santner *et al.*, 2009 y Korasik *et al.*, 2014).

1.3. Los genes ARF

Los genes *ARF* codifican para factores de transcripción, los cuales juegan un papel importante en el desarrollo de las plantas. Estos genes se activan minutos después de una estimulación con auxinas, en un proceso independiente de la síntesis de *novo* de proteínas, activando o reprimiendo la expresión de genes río abajo (Guilfoyle y Hagen, 2007). Los *ARF* se han relacionado con el crecimiento de raíces laterales (Marín *et al.*, 2010; Okushima *et al.*, 2007; Tatematsu *et al.*, 2004), la embriogénesis (Weijers *et al.*, 2006; Hamann *et al.*, 2002), la expansión de las hojas (Wilmoth *et al.*, 2005), la

senescencia (Lim et al., 2010), desarrollo del fruto (de Jong et al., 2009; Guillon et al., 2008; Goetz et al., 2007) y en respuesta a otros RCV, como por ejemplo el etileno (Li et al., 2006), los brasinoesteróides (Vert et al., 2008) y el ácido abscisico (Yoon et al., 2010). Los ARFs representan el núcleo de la señalización de las auxinas activando o reprimiendo la expresión de genes de desarrollo río abaio (Chapman y Estelle, 2009). Se han encontrado genes de respuesta primaria a auxinas codificando pequeñas proteínas de corta duración, denominadas Aux/IAA (Abel y Theologis, 1996; Abel et al., 1994). Estas proteínas se unen a las regiones 5'-TGTCTC-3' de los elementos de respuesta a auxinas (AuxREs) y funcionan en combinación con los represores Aux/IAA (Guifoyle y Hagen, 2001: Guilfoyle, 1999; Guilfoyle et al., 1998; Ulmasov et al., 1995). La función de activación de las proteínas ARF está habilitada por su arquitectura de cuatro dominios. que incluye regiones de dimerización o heterodimerización. En la región N-terminal se encuentra el dominio de unión al ADN (llamado DBD), el cual es muy conservado entre los genes ARF y se une a los AuxRes (Hagen and Guilfoyle, 2002; Ulmasov et al., 1997). En A. thaliana la mayor parte de la proteína ARF, excepto ARF3 y ARF17, contienen un dominio C-terminal en las regiones III y IV homólogas a dominios en las proteínas Aux/IAA, siendo capaces de formar heterodímeros a través de estos dominios (Tiwari et al., 2003; Nagpal et al., 2000).

Se ha reportado que los genes *ARF* codifican para una gran familia de 23 miembros en *A. thaliana*, especie en la cual ya se les tiene bien caracterizados tanto en su estructura como en su función (Okushima *et al.*, 2005; Remington *et al.*, 2004; Hagen y Guilfoyle, 2002; Liscum y Reed, 2002). Por ejemplo, algunos miembros de la familia ARF (5, 6, 7, 8 y 19) en su región media (dominio II) presentan regiones ricas en glutamina (Q), actuando como activadores transcripcionales, mientras que ARF 1, 2, 3 y 4, contienen regiones ricas en prolina/serina/treonina (P/S/T) las cuales reprimen la transcripción (Ouellet *et al.*, 2001; Guilfoyle *et al.*, 1998; Ulmasov *et al.*, 1997) (Figura 1.5). ARF 1 y 3 están involucrados en el desarrollo del fruto (de Jong *et al.*, 2009; Guillon *et al.*, 2008; Goetz *et al.*, 2007); ARF2 está involucrado en la senescencia (Lim *et al.*, 2010); ARF 5, 17 y 23 en la embriogénesis (Weijers *et al.*, 2006; Weijers y Jürgens, 2005; Hamann *et al.*, 2002); ARF 6 y 8 en la expansión de las hojas (Wilmoth *et al.*, 2005; Nagpal *et al.*, 2005; Tian *et al.*, 2004); ARF 7, 10, 16 y 19 en el crecimiento de las raíces laterales y de la corona (Marin *et al.*, 2010; Okushima *et al.*, 2007; Tatematsu *et al.*, 2004); y los ARF 12, 13, 14,

20, 21 y 22 en respuesta a otros RCV como por ejemplo al etileno (Li *et al.*, 2006), brasinoesteroides (Vert *et al.*, 2008) y al ácido abscísico (Yoon *et al.*, 2010).



Figura 1.5 Familia de los Factores de Respuesta a Auxinas (ARF) y sus dominios de interacción al ADN (DBD), ricos en aminoácidos Glutamina (Q), Prolina (P), Serina (S) y Treonina (T) en A. *thaliana* (Guilfoyle y Hagen, 2007).

La interacción entre la proteína Aux/IAA y ARF ha demostrado resultar en la represión de la expresión de los *ARF* (Ulmasov *et al.*, 1997) y la represión de la acción *ARF* sólo puede ser liberada por la degradación de la proteína Aux/IAA (Weijers y Jurgens, 2004). La mayoría de las proteínas Aux/IAA son de corta duración y todas las mutaciones de ganancia de función da como resultado genes Aux/IAA con un cambio específico de aminoácido en el dominio II, lo que modifica a la proteína codificada, y por lo tanto reprime la respuesta a auxina, que se refleja en fenotipos con insensibilidad (Liscum y Reed, 2002).

1.4. Epigenética y cultivo in vitro

La epigenética se puede definir, como las modificaciones covalentes que se producen en la cromatina permitiendo a las células mantener características distintas a pesar de que contienen el mismo material genético (Cheung y Lau, 2005), con efectos que son heredables entre las divisiones celulares e incluso entre generaciones (Us-Camas *et al.*, 2013; Grant-Downton y Dickinson, 2005). La epigenética es señalada como la encargada de establecer, mantener y revertir los estados transcripcionales, los cuales son fundamentales para la habilidad celular de "recordar" eventos pasados; como podrian ser cambios en el medio ambiente externo o señales de desarrollo (Grant-Downton y Dickinson, 2005). Los mecanismos epigenéticos actúan en conjunto para favorecer la expresión o represión, por medio de la compactación o relajación de la cromatina, de uno o varios genes, de forma estable y heredable en los genomas de organismos eucariotas superiores (Chen *et al.*, 2010; Feil, 2009; Rottach *et al.*, 2009; Bird, 2007; Zhang *et al.*, 2007; Egger *et al.*, 2004; Wolffe y Matzke, 1999).

La cromatina esta organizada a través de unidades estructurales llamadas nucleosomas, los cuales son capaces de permitir el acceso de ciertas proteínas específicas de unión al ADN a través de las modificaciones de las histonas, regulando así la transcripción de genes y la replicación (Kornberg, 1974; Phillips, 1963). Debido no sólo a las modificaciones de las histonas sino también a la metilación en el ADN, la estructura de la cromatina es modificada compactándose (heterocromatina) o relajándose (eucromatina). El estado de eucromatina incrementa la accesibilidad del genoma hacia la maguinaria transcripcional activando la transcripción; por el contrario, la compactación de la cromatina limita la accesibilidad hacia el genoma reprimiendo la transcripción. La heterocromatina se puede encontrar en cualquier lugar del cromosoma, inactivando un loci en específico. Sin embargo, la heterocromatina puede existir en forma facultativa y constitutiva, siendo la primera en la que la actividad transcripcional es espacial y temporalmente regulada a través de procesos como la metilación del ADN y la modificación de histonas, mientras que la segunda se encuentra compuesta de una gran cantidad de metilaciones en el ADN y en la dimetilación de la lisina (K) 9 de la histona H3 (H3K9me2) y la trimetilación de la lisina (K) 9 de la histona H3 (H3K9me3) (Sajan y Hawkins, 2012). Por el contrario, la eucromatina representa la forma sin condensar de la cromatina, que es donde ocurre una gran actividad transcripcional (Cheung y Lau, 2005).

Entre las principales modificaciones que sufren las histonas se incluyen: la acetilación, la fosforilación, la ubiquitinación, la sumoilación, la metilación, entre otras (Kouzarides, 2007; Kouzarides, 2002). Estas modificaciones, principalmente metilaciones y acetilaciones, provocan un rearreglo de la cromatina para favorecer la expresión o represión de los genes. Por ejemplo, las metilaciones en la lisina (K) 4 de la histona H3 y en la K36, y las acetilaciones en la K14 en la H3 provocan la expresión de genes mientras que las metilaciones de las K9 y K27 están relacionadas mayormente con la represión de genes (Cheung y Lau, 2005; Hebbes *et al.*, 1988) (Figura 1.6).



Figura 1.6 Modificaciones en la estructura de la cromatina. Marcas de eucromatina (activación de la transcripción) y de heterocromatina (represión de la transcripción) (Duarte-Aké, 2013; Modificado de Hebbes *et al.*, 1988).

Las histonas son en su mayoría del tipo globulares, a excepción de su región N-terminal o "cola", que no son estructuradas. Una característica notable de las histonas, y en particular de la "cola", es el gran número y tipo de modificaciones de los residuos que poseen. Hay por lo menos ocho diferentes tipos de modificaciones que se encuentran en las histonas. Los extremos N-terminal de las histonas pueden ser covalentemente modificados por acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación (Bannister y Kouzarides, 2011; Kouzarides, 2007). Se ha encontrado que las metilaciones

son más estables y están involucradas en el mantenimiento a largo plazo del estado de la expresión en regiones del genoma. Esas modificaciones ocurren en varios sitios específicos en las histonas; esto sugiere que las histonas pueden actuar como plataformas de señalización, integrando rutas de señalización río arriba, para provocar respuestas nucleares, tales como la activación de la trascripción o su represión (Cheung y Lau, 2005). Cabe señalar que pueden ocurrir posibles combinaciones de las modificaciones en las histonas, a esta hipótesis se le conoce como "Código de las Histonas" (Strahl y Allis, 2000; Turner, 2000). El repertorio de modificaciones y sus combinaciones (código de las histonas) juega un papel esencial en la regulación de los cambios dinámicos en la estructura de la cromatina, influenciando últimamente la transcripción de genes (Berger, 2007) en respuesta a diversos estímulos exógenos y endógenos incluyendo el estrés, ataque de patógenos, temperatura, luz y hormonas (Anzola et al., 2010; Chen v Tian, 2007). Existen reportes que revelan evidencia indicando que la variación epigenética es una importante base mecanística durante el cultivo in vitro (Kaeppler et al., 2000), el cual puede afectar la metilación en el ADN posiblemente debido al estrés ambiental al que están sujetos los cultivos y a las modificaciones en las histonas (Zhou y Hu, 2010). Se sabe que uno de los componentes del medio de cultivo que induce variación epigenética son los RCV. Evidentemente, los mecanismos de respuesta a estrés, debido al uso de RCV, podrían ser algunos de los mecanismos candidatos a ser regulados por factores epigenéticos. Por ejemplo, aquellos provocados en sistemas de micropropagación, pueden producir modificaciones epigenéticas en las histonas (De-la-Peña et al., 2012) principalmente por metilaciones que son las que más se han visto que afectan la transcripción. La importancia de estos cambios epigéneticos en condiciones in vitro debido a la vulnerabilidad de algunas plantas a estas condiciones se han estudiado en diferentes sistemas como Coffea canephora (Nic-Can et al., 2013); Beta vulgaris (Causevic et al., 2006), Agave spp. (De-la-Peña et al., 2012), Cannabis sativa (Santamaría et al., 2009), Camellia sinensis (Margues et al., 2012) y Oryza sativa (He et al., 2010). Se han reportado variaciones epigenéticas en varios niveles durante y después de la exposición a condiciones de cutivo in vitro (De-la-Peña et al., 2012; Miguel y Marum, 2011; Smykal et al., 2007; Valledor et al., 2007).

Aunque la propagación masiva de plantas elite, para lo cual es necesario asegurar la integridad genética de las regenerantes, está bien establecida, se desconoce su

Capitulo I

integridad epigenética. Estudios recientes demuestran que las auxinas, en particular el 2,4-D, afectan los mecanismos epigenéticos en las plantas *in vitro*, afectando el desarrollo de las plantas (LoSchiavo *et al.*, 1989). Sin embargo, aun se desconoce si los genes involucrados en la señalización de auxinas son regulados epigenéticamente.

La importancia de los sistemas epigéneticos para la agricultura se está incrementando con rapidez, ya que pueden tener un importante impacto en los programas de mejoramiento vegetal que se están desarrollando en la actualidad y que interfieren con la respuesta de las plantas a cambios medioambientales (Krizova *et al.*, 2009; Lisch, 2009), al ígual que conocer los principales mecanismos epigenéticos que ocurren durante el cultivo *in vitro* para maximizar la producción de variedades vegetales de alta calidad (Us-Camas *et al.*, 2014).

1.5. Agave

El genero Agave fue descrito por Linneo en 1753, su nombre proviene del griego agavos, que significa noble o admirable y se encuentra ubicado dentro de la familia Agavaceae; el cual, es el género más grande de esta familia. Este se encuentra distribuido principalmente al suroeste de Estados Unidos, Centro América, las Islas Canarias y México y cuenta con más de 160 especies (Slauson, 2000), del cual 75% se encuentran presentes en México y el 51% son endémicas (Eguiarte *et al.*, 2000; García-Mendoza y Galván, 1995) (Figura 1.7). Las plantas de este género, presentan un periodo de vida media que fluctúa entre 8 y 25 años, dependiendo de la especie. Presentan un amplio sistema de raíces que juegan un papel muy importante ya que previenen la erosión del suelo en zonas áridas y semi áridas. Las hojas se desarrollan a partir de la región meristemática del ápice del tallo, en forma de espiral, formando una roseta. Las hojas son gruesas, suculentas y fibrosas, con la base dilatada y carnosa. La forma de la hoja puede variar de linear a lanceolada u ovada; a menudo presentan márgenes espinosos y generalmente terminan en una afilada espina en el ápice (Gentry, 1982).

Los agaves pueden reproducirse tanto sexualmente como vegetativamente pero por razones como podrían ser las características de su hábitat (condiciones no favorables para la germinación de semillas) y su naturaleza genética, éstos usan la propagación asexual (formación de bulbillos en el tallo floral y rizomas en el tallo subterráneo) como

principal medio de multiplicación y conservación de su especie (Torres-Morán *et* al., 2010; Robert *et al.*, 2004; Figura 1.8).



Figura 1.7 Distribución en la República Mexicana de las especies Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem y A. tequilana Weber var. Azul. Tomado de CONABIO, 2014.

El agave ha sido importante para los pobladores de México desde tiempos remotos y se mantienen como una opción productiva interesante en diversas zonas áridas y semiáridas del país. Esto se debe a la amplia diversidad de usos que tienen estas plantas, ya que son productoras de alimento, de fibras naturales, de materia prima para elaborar bebidas alcohólicas y de materiales para la construcción, y por su importancia reciente como plantas ornamentales (García-Mendoza, 2002; Madrigal-Lugo *et al.*, 1989).



Figura 1.8 Estructura general de una planta de *Agave*, mostrando sus estructuras reproductivas sexuales y vegetativas (modificado de Eastmond *et al.*, 2000).

Los agaves tienen gran importancia por su papel como fuente de materia prima en la industria de fibras, tal es el caso de *A. fourcroydes* (triploide o pentaploide), esta especie es la más importante en las áreas tropicales y subtropicales de África; en la industria licorera, para la producción de tequila (Torres-Morán *et al.*, 2010) como es el caso de *A. tequilana* Weber (variedad azul, diploide), cuya denominación de origen pertenece a México (NOM-V-1978) y *A. angustifolia* Ham (variedad bacanora, diploide) usada para la elaboración de mezcal (García-Mendoza, 2002). Los productores tradicionalmente

seleccionan hijuelos vigorosos propagados vegetativamente, algunos poliploides y cuando crecen y se convierten en plantas adultas (Garcia-Mendoza, 2002). Por el contrario, en las poblaciones manejadas en plantaciones comerciales su diversidad ha disminuido cada vez más, hasta llegar prácticamente a la homogeneidad genética. Esta tendencia ha sido favorecida por la posibilidad de propagar vegetativamente las variedades seleccionadas y, más recientemente, por la utilización de técnicas de propagación clonal. Tal es el caso del henequén (Galindo-Jaimes *et al.*, 2002; Robert *et al.*, 1992; Robert *et al.*, 1987) y el agave tequilero (Rodríguez-Sahagún *et al.*, 2011; Portillo *et al.*, 2007; Gil-Vega *et al.*, 2006).

Por otro lado, algunos de los productos industriales son extraídos masivamente de poblaciones de agaves silvestres lo que pone en riesgo la sobrevivencia del recurso; tal es el caso de *A. angustifolia* en los estados del norte de México. Entre las alternativas biotecnológicas para resolver estos problemas se encuentra el cultivo de tejidos. Las técnicas de micropropagación están disponibles para la rápida producción de nuevas variedades de agave y clones elite para plantaciones, así como para el rescate de variedades en peligro de extinción (Robert *et al.*, 2006; Robert *et al.*, 1992). El implementar técnicas de micropropagación es benéfico para los agaves y para las industrias que dependen de ellos (Robert *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 1985). En el género Agave se reportan diferencias entre plantas micropropagadas, entre hijuelos de rizoma y brotes micropropagados en *A. tequilana* (Torres-Morán et al. 2005), en *A. fourcroydes* (Infante *et al.*, 2003).

JUSTIFICACIÓN

Hasta ahora el estudio epigenètico en los genes *ARF* ha sido escasamente abordado, y no se sabe como diferentes tipos de auxinas pueden afectar su regulación. Para ello en este estudio se pretende investigar el efecto de las auxinas, ácido indol-3-acético (AIA), una auxina natural, y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), una auxina sintética, en la expresión y regulación de los genes *ARF* en tres diferentes especies de *Agave*: *A. angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul.

Los resultados de este trabajo permitirán un mayor entendimiento de la regulación de los genes *ARF* durante el proceso *in vitro* y se podrán optimizar las herramientas biotecnológicas para cultivos de interés comercial que se propagan por métodos *in vitro*.

HIPÓTESIS

Si los genes ARF son factores de transcripción importantes en la señalización de auxinas endógenas, entonces la adición exógena de AIA y 2,4-D afectará la regulación de estos genes en sistemas in *vitro*.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si la presencia de las auxinas AIA y 2,4-D modifican la regulación epigenética de los genes *ARF* en *A. angustifolia Haw.*, *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul en condiciones *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Caracterizar fenotipicamente las especies A. angustifolia Haw., A. fourcroydes
 Lem. y A. tequilana Weber var. Azul, en presencia y ausencia de AIA y 2,4-D.
- · Analizar bioinformáticamente los genes ARF en Agave spp.
- Determinar la expresión de los genes ARF en A. angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul, en presencia y ausencia de AIA y 2,4-D a los días 0, 3 y 21.
- Evaluar la regulación de los genes ARF en A. angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul, en presencia y ausencia de AIA y 2,4-D a los días 0 y 21, mediante la Immunoprecipitación de la Cromatina (ChIP).



22

Capítulo I

BIBLIOGRAFÍA

- Abel, S., Oeller, P.W. y Theologis A. (1994). Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 91; 326-330.
- Abel, S. y Theologis, A. (1996). Early genes and auxin action. Plant Physiology. 111: 9-17.
- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M. y Ullrich, C. (2006). Role of auxin in regulating Arabidopsis flower development. Planta, 223, 315–328.
- Anzola, J.M., Sieberer, T., Ortbauer, M., Butt, H., Korbei, B., Weinhofer, I., Mullner A.E. y Luschnig, C. (2010). Putative Arabidopsis transcriptational adaptor protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin, Proceedings of the national Academy of Sciences, 107(22): 10308-10313.
- Bairu, M., Aremu, A. y Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation, 63(2), 147-173.
- Bannister, A.J. y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Research, 21(3), 381-395.
- Baránek, M., Křižan, B., Ondrušíková, E. y Pidra, M. (2010). DNA-methylation changes in grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 101(1): 11-22.
- Bennett, M.J, Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., Walker, A.R., Schulz, B. y Feldmann, K.A. (1996) Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism.Science 273 948–950.
- Berger, S.L. (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription, Nature, 447: 407-412.
- Bird, A. (2007). Perceptions of epigenetics. Nature, 447(7143), 396-398.
- Bishopp, A., Lehesranta, S., VatÈn, A., Help, H., El-Showk, S., Scheres, B., Helariutta, K., Mähönen, A.P., Sakakibara, H. y Helariutta, Y. (2011). Phloem-transported cytokinin regulates polar auxin transport and maintains vascular pattern in the root meristem. Current Biology, 21(11), 927-932.
- Bonga, J.M., Klimaszewska, K.K., y Aderkas, P. (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 100(3), 241-254.

Capitulo I

- Bunn, E., Turner, S. y Dixon, K. (2011). Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 47(1), 188-200.
- Brooks, L.-III, Strable, J., Zhang, X., Ohtsu, K., Zhou, R., Sarkar, A., Hargreaves, S., Elshire, RJ., Eudy, D., Pawlowska, T., Ware, D., Janick-Buckner, D.Buckner, B., Timmermans, M.C.P., Schnable, P.S., Nettleton, D. y Scanlon, M.J. (2009). Microdissection of shoot meristem functional domains. PLoS Genet. 5(5), e1000476.
- Bunn, E., Turner, S. y Dixon, K. (2011). Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 47(1), 188-200.
- Causevic, A., Gentil, M.V., Delaunay, A., El-Soud, W., Garcia, Z., Pannetier, C., Brignolas, F., Hagège, D. y Maury, S. (2006) Relationship between DNA methylation and histone acetylation levels, cell redox and cell differentiation states in sugarbeet lines. Planta, 224:812–827.
- Carraro, N., Forestan, C., Canova, S., Traas, J. y Varotto, S. (2006). ZmPIN1a and ZmPIN1b encode two novel putative candidates for polar auxin transport and plant architecture determination of maize. Plant Physiology,142(1), 254–264.
- Chapman E.J. y Estelle M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. Annual Review of Genetics, 43:265-285.
- Chen, M., Lv, S. y Meng, Y. (2010). Epigenetic performers in plants‡. Development, Growth & Differentiation, 52(6), 555-566.
- Chen, Z.J. y Tian, L. (2007). Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy, Biochimica et Biophysica Acta, 1769: 295-307.
- Cheung, P. y Lau, P. (2005). Epigenetic Regulation by histone methylation and histone variants. Molecular Endocrinology, 19(3), 563-573.
- Cho, M., Lee, S.H. y Cho, H.T. (2007). P-glycoprotein4 displays auxin efflux transporterlike action in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. Plant Cell, 19, 3930–3943.
- de Jong, M., Mariani, C. y Vriezen, W.H. (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. Journal of Experimental Botany, 60 (5): 1523-1532.
- De-la-Peña, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J.L., López-Torres, A., Wrobel K. y Robert, M.L. (2012). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in Agave spp. Bio Medical Central Plant Biology. 12: 1-11.

- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S. y Estelle, M. (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature, 435: 441–445.
- Debergh, P.L. y Maene, L.J. (1981). Ascheme for comercial propagation of ornamental plant by tissue culture. Scientia Horticulturae. 14: 335-345.
- Debnath, M., Malik, C. y Bisen, P. (2006). Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology, 7(1), 33-49.
- Duarte-Ake, F.P (2013). Estudio epigenético de en dos especies de Agave en condiciones in vitro y de invernadero. Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.Tesis de Maestría.
- Duncan, R.R., en Advances in Agronomy, L.S. Donal Ed. (Academic Press, 1996), pp. 201-240.
- D'Amato, F. (1985) Cytogenetics of differentiation in tissue and cell culture. In: Reinert J, Bajaj YPS (eds.) Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture. New York : Springer; 1977, p 343-464.
- Eastmond, S.A., Robert, M.L. y Herrera, J.L. (2000). La biotecnología aplicada al henequén: alternativas para el futuro. Centro de Investigaión Científica de Yucatán (CICY). Mérida, Yucatán. México. pp.40-52.
- Eeuwens, C.J., Lord, S., Donough, C.R., Rao, V., Vallejo, G. y Nelson, S. (2002). Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm. Plant Cell Tissue and Organ Culture. 70: 311 – 323.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. y Jones P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. Nature. 429: 457-463.
- Eguiarte, L., Souza, V. y Silva-Montellano, A. (2000). Evolución de la familia Agavaceae: filogenia, biología reproductiva y genetica de poblaciones. Boletín de la Sociedad Botánica de México, 66, 131-150.
- Esmon, C.A., Pedmale, U.V. y Liscum, E. (2005). Plant tropisms: providing the power of movement to a sessile organism. International Journal of Developmental Biology, 49: 665–674.
- Evans, D.A., Sharp, W.R. y Medina-Filho H.P. (1984). Somaclonal and gametoclonal variation. American Journal of Botany. 71: 759 774.
- Fell, R. (2009). Epigenetics: ready for the marks. Nature, 461(7262), 359-360.

Capitulo I

Felsenfeld, G. y Groudine, M. (2003). Controlling the double helix, Nature, 421: 448-453.

- Ferl, R. y Paul, A.L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) Biochemistry and Molecular Biology of Plants. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.
- Finet, C., Berne-Dedieu, A., Scutt, C.P. y Marlétaz, F. (2013). Evolution of the ARF gene family in land plants: old domains, new tricks. Molecular Biology and Evolution, 30(1), 45-56.
- Fraga, M., Cañal, M. y Rodríguez, R. (2002). Phase-change related epigenetic and physiological changes in *Pinus radiate* D. Planta, 215: 672-678.
- Fujino, K., Matsuda, Y., Ozawa, K., Nishimura, T., Koshiba, T., Fraaije, M.W. y Sekiguchi, H. (2007). NARROW LEAF 7 controls leaf shape mediated by auxin in rice. Molecular Genetics and Genomics, 279: 499–507.
- Gallavotti, A, Barazesh, S., Malcomber, S., Hall, D., Jackson, D., Schmidt, R.J. y McSteen P. (2008a). Sparse inflorescence1 encodes a monocot-specific YUCCA-like gene required for vegetative and reproductive development in maize. Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A., 105:15196-15201.
- Gallavotti, A., Yang, Y., Schmidt, R. J. y Jackson, D. (2008b). The relationship between auxin transport and maize branching. Plant Physiology, 147(4), 1913-1923.
- Galindo-Jaimes, L., González-Espinoza, M., Quintana-Ascencio, P. y García-Barrios, L. (2002). Tree composition and structure in disturbed stands with varying dominance by *Pinus* spp. in the highlands of Chiapas, Mexico, Plant Ecology, 162: 259-272.
- Garcia-Mendoza, A. (2002). Distribution of the genus Agave (Agavaceae) and its endemic species in Mexico, en Cactus and Succulent Journal (US), núm. 74, pp. 177-187.
- García-Mendoza, A. y Galván, R.V. (1995). Riqueza de las familias Agavaceae y Nolinaceae en México. Boletin de la Sociedad Botánica de México. 56; 7-24. Agavaceae y Nolinaceae en México. Bol. Soc. Bot. Méx. 56: 7-24.
- Gentry, H.S. (1982). Agaves of continental North America. The University of Arizona Press, Tucson, Arizona. 70 p.
- George, E.F., Hall, M.A. y De-Klerl, G.J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture 3rd Edition. Vol. 1 The Background. Springer, Dordrecht, The Netherlands. 477 p.
- Gesteira A.S., Otoni, W.C., Barros, E.G. y Moreira, M.A. (2002). RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis, Plant Breeding, 121: 269-271.

- Gil-Vega, K., Díaz, C., Nava-Cedrillo, A. y Simpson, J. (2006). AFLP Analysis of Agave tequilana varieties. Plant Science, 170: 904-909.
- Goldberg, A., Allis, C. y E. Bernstein, E. (2007). Epigenetics: A landscape Takes Shape. Cell, 128: 635-638.
- Goetz, M., Hooper, L.C., Johnson, S.D., Rodrigues, J.C.M., Vivian-Smith, A. y Koltunow, A.M. (2007). Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. Plant Physiology, 145(2), 351-366.
- Grant-Downton, R. y Dickinson, H. (2005). Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. Annals of Botany, 96: 1143-1162.
- Guilfoyle, T.J. y Hagen, G. (2007). Auxin response factors. Current Opinion in Plant Biology, 10(5), 453-460.
- Guilfoyle, T.J. y Hagen, G. (2001). Auxin response factors. Journal of Plant Growth Regulation, 20: 281–291.
- Guilfoyle, T.J. (1999). Auxin-regulated genes and promoters. In Biochemistry and Molecular Biology of Plant Hormones, P.J.J. Hooykaas, M.A. Hall, and K.R. Libbenga, eds (Leiden, The Netherlands: Elsevier), pp. 423–459.
- Guilfoyle, T.J., Ulmasov, T. y Hagen, G. (1998). "How does auxin turn on genes?" Plant Physiology, 118(2): 341-347.
- Guillon, F., Philippe, S., Bouchet, B., Devaux, M. F., Frasse, P., Jones, B., Bouzayen, M. y Lahaye, M. (2008). Down-regulation of an auxin response factor in the tomato induces modification of fine pectin structure and tissue architecture. Journal of Experimental Botany, 59(2), 273-288.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. y Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature, 414, 271–276.
- Hagen, G. y Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Molecular Biology, 49(3-4), 373-385.
- Hagen, G., Martin, G., Li, Y. y Guilfoyle, T.J., (1991). Auxin-induced expression of the soybean GH3 promoter in transgenic tobacco plants. Plant Molecular Biology, 17: 567–579.
- Hamann, T., Benkova, E., Bäurle, I., Kientz, M. y Jürgens, G. (2002). The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROSmediated embryo patterning. Genes & Development, 16(13), 1610–1615.

- He, G., Zhu, X., Elling, A., Chen, L., Wang, X., Guo, L., Liang, M., He, H., Zhang, H., Chen, F., Qi, Y., Chen, R. y Deng, X.W. (2010). Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. Plant Cell, 22:17–33.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W. y Crane-Robinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. The EMBO Journal, 7(5), 1395-1402.
- Henderson, I.R. y Jacobsen, S.E. (2007). Epigenetic inheritance in plants. Nature, 447: 418-424.
- Hirsch, A.M. y Fang, Y. (1994). Plant hormones and nodulation: what's the connection?. Plant Molecular Biology, 26(1): 5-9.
- Hochholdinger, F., Wulff, D., Reuter, K., Park, W.J. y Feix, G. (2000). Tissue-specific expression of AUX1 in maize roots. Journal of Plant Physiology, 157(3), 315-319.
- Holliday, R. (2006). Epigenetics. A Historical Overview. Epigenetics, 1: 76-80.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Bucher, E., van der Winden, J., Matzke, A.J.M. y Matzke, M. (2007). RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptational gene silencing in plants. Biochimica et Biophysica Acta, 1769: 358-374.
- Im, K.H., Chen, J.G., Meeley, R.B. y Jones, A.M. (2000). Auxin-binding protein mutants in maize. Maydica 45: 319 – 325.
- Infante, D., González, G., Peraza-Echeverria, L. y Keb-Llanes, M. (2003). Asexual genetic variability in Agave fourcroydes. Plant Science, 164: 223-230.
- Jain, M., Tyagi, A.K. y Khurana, J.P. (2006a). Genome-wide analysis, evolutionary expansion, and expression of early auxin-responsive SAUR gene family in rice (*Oryza sativa*). Genomics, 88(3), 360-371.
- Jain, M., Kaur, N., Tyagi, A. y Khurana, J. (2006b). The auxin-responsive *GH3* gene family in rice (*Oryza sativa*). Functional & Integrative Genomics, 6(1), 36-46.
- Jin S., Mushke, R., Zhu, R.H., Tu, L., Lin, Z., Zhang, Y. y Zhang, X. (2008). Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers, Plant Cell Reports, 27: 1303-1316.
- Kaeppler, S., Kaeppler, H. y Rhee, Y. (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology, 43(2-3), 179-188.
- Karp, A. (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement, Euphytica, 85: 295-302.

- Kepinski, S. y Leyser, O. (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. Nature, 435(7041), 446-451.
- Kim, J., Harter, K. y Theologis A. (1997). Protein–protein interactions among the Aux/IAA proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(22): 11786-11791.
- Knauss, S., Rohrmeier, T. y Lehle, L. (2003). The auxin-induced maize gene ZmSAUR2 encodes a short-lived nuclear protein expressed in elongating tissues. Journal of Biological Chemistry, 278(26), 23936-23943.
- Korasick, D.A., Westfall, C.S., Lee, S.G., Nanao, M.H., Dumas, R., Hagen, G., Guilfoyle, T.J, Jez, J.M y Strader, L.C. (2014). Molecular basis for AUXIN RESPONSE FACTOR protein interaction and the control of auxin response repression. Proceedings of the National Academy of Sciences, 111(14), 5427-5432.
- Kornberg, R.D. (1974). Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA. Science, 184(4139), 868-871.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. Cell, 128(4), 693-705.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. Current Opinion in Genetics & Development, 12(2), 198-209
- Kriechbaumer, V., Park, W. J., Gierl, A. y Glawischnig, E. (2007). Auxin biosynthesis in maize. Plant Biology, 8(3), 334-339.
- Krizova, K., Fojtova, M., Depicker, A. y Kovarik, A. (2009). Cell culture-induced gradual and frequent epigenetic reprogramming of invertedly repeated tobacco transgene epialleles. Plant Physiology, 149(3): 1493-1504.
- Letham, D.S. y Palni L.M.S. (1983). The biosynthesis and metabolism of cytokinins. Annual Review of Plant Physiology, 34(1): 163-197.
- Leyser, O. (2005). Auxin distribution and plant pattern formation: How many angels can dance on the point of PIN?. Cell, 121: 819-822.
- Li, Y., Liu, Z.B., Shi, X., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1994). An auxin-inducible element in soybean SAUR promoters. Plant Physiology, 106: 37–43.
- Li, J., Dai, X. y Zhao, Y. (2006). A Role for Auxin Response Factor 19 in Auxin and Ethylene Signaling in Arabidopsis, Plant Physiology, 140(3), 899-908
- Lim, P.O., Lee, I.C., Kim, J., Kim, H.J., Ryu, J.S., Woo, H.R. y Nam, H.G. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. Journal of Experimental Botany, 61(5), 1419-1430.

- Lisch, D. (2009). Epigenetic regulation of transposable elements in plants. Annual Review of Plant Biology, 60: 43-66.
- Liscum, E. y Reed, J. W. (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. In C. Perrot-Rechenmann y G. Hagen (Eds.), Auxin Molecular Biology (pp. 387-400): Springer Netherlands.
- Liu, Z.B., Ulmasov, T., Shi, X., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1994). Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. Plant Cell, 6: 645–657.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S. y Terz, M. (1989). "DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs," Theoretical and Applied Genetics, vol. 77, no. 3, pp. 325– 331.
- Madrigal-Lugo, R., Pineda-Estrada, F. y De la O-Rodríguez, J. L. (1989). Agave. In: Handbook of Plant Cell Cult. Ornamental Species. Ammirato, P.V., Evans, D.A., Sharp, W.R., Bajaj, Y.P.S. (eds). McGraw Hill Publ. Co. New York. pp:206-227.
- Mano, Y. y Nemoto, K. (2012). The pathway of auxin biosynthesis in plants. Journal of Experimental Botany, 63(8), 2853-2872.
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D. y Maizel, A. (2010). miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. Plant Cell, 22(4), 1104-1117.
- Marques, A., Fuchs, J., Ma, L., Heckmann, S., Guerra, M. y Houben, A. (2012). Characterization of eu- and heterochromatin of citrus with a focus on the condensation behavior of 45s rDNA chromatin. Cytogenetis Genome Research, 134:72–82
- Martienssen, R.A. y Colot, V. (2001) DNA methylation and epigenetic inheritance in plants and filamentous fungi. Science, 293:1070–1074.
- Mazari, A. y Camm, E.L. (1993). Effect of cytokinins on plastid development and photosynthetic polypeptides during organogenesis of Pinus ponderosa Dougl. cotyledons cultured in vitro. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 33(1): 81-89.
- McSteen, P. (2010). Auxin and monocot development. Cold Spring Harbor Perspectives in Biology, 2(3), a001479.

- Miguel, C. y Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. Journal of Experimental Botany.
- Monja-Mio, K. y Robert, M.L. (2013). Direct somatic embryogenesis of Agave fourcroydes Lem. through thin cell layer culture. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 49(5), 541-549.
- Multani, D.S., Briggs, S.P., Chamberlin, M.A., Blakeslee, J.J., Murphy, A.S. y Johal, G.S. (2003). Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize br2 and sorghum dw3 mutants, Science 302; 81–84.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1974). Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology, 25(1):135-165.
- Nagpal, P., Walker, L.M., Young, J.C., Sonawala, A., Timpte, C., Estelle, M. y Reed, J.W. (2000). AXR2 encodes a member of the Aux/IAA protein family. Plant Physiology, 123: 563-574.
- Nagpal, P., Ellis, C.M., Weber, H., Ploense, S.E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, T.J., Hagen, G., Alonso, J.M., Cohen, J.D, Farmer, E.E, Ecker, J.R. y Reed, J.W. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. Development, 132(18), 4107-4118.
- Nehra, N.S., Kartha, K.K., Stushnoff, C. y Giles, K.L. (1992). The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry, Plant Cell Tissue and organ Culture, 29: 257-268.
- Nakamura, A., Umemura, I., Gomi, K., Hasegawa, Y., Kitano, H., Sazuka, T. Y Matsuoka, M. (2006). Production and characterization of auxin-insensitive rice by overexpression of a mutagenized rice IAA protein. The Plant Journal, 46(2), 297-306.
- Nic-Can, G.I. (2013). Análisis de los cambios epigenéticos asociados con la diferenciación celular en la embriogénesis somática de Coffea canephora. Tesis Doctorado. Doctorado Institucional en Ciencias Químicas y Bioquímicas. Universidad Autónoma de Yucatán.
- Nic-Can, G.I., López-Torres, A., Barredo-Pool, F., Wrobel, K., Loyola-Vargas, V.M., Rojas-Herrera, R. y De-la-Peña, C. (2013). New insights into somatic embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEOBOX4 are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. PLoS ONE 8(8): e72160.

- Niggeweb, R., Michael, A.J. y Martin, C. (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. Nature Biotechnology, 22(6): 746-754.
- Ouellet, F., Overvoorde, P. J. y Theologis, A. (2001), IAA17/AXR3; Biochemical insight into an auxin mutant phenotype. Plant Cell 13(4), 829-841.
- Okushima, Y., Overvoorde, P.J., Arima, K., Alonso, J.M., Chan, A., Chang, C., Ecker, J.R., Hughes, B., Liu, A., Nguyen, D., Onodera, C., Quach, H., Smith, A., Yu, G. y Theologis, A. (2005). Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in Arabidopsis thaliana: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. Plant Cell 17, 444–463.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A. y Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in Arabidopsis. Plant Cell, 19(1), 118–130.
- Park, W.J., Kriechbaumer, V., Müller, A., Piotrowski, M., Meeley, R. B., Gierl, A. y Glawischnig, E. (2003). The nitrilase ZmNIT2 converts Indole-3-Acetonitrile to Indole-3-Acetic acid. Plant Physiology, 133(2), 794–802.
- Petrášek, J. y Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. Development, 136(16), 2675-2688.
- Phillips, D.M.P. (1963). The presence of acetyl groups in histones. Biochemical Journal, 87(2), 258-263.
- Pijut, P., Lawson, S. y Michler, C. (2011). Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 47(1), 123-147.
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba, F., Gutiérrez-Mora, A. y B. Rodriguez-Garay (2007). Somatic embryogenesis in Agave tequilana Weber cultivar azul, In Vitro Cell Development Biology-Plant, 43: 569-575.
- Rademacher, E. H., Möller, B., Lokerse, A. S., Llavata-Peris, C. I., van den Berg, W. y Weijers, D. (2011). A cellular expression map of the Arabidopsis AUXIN RESPONSE FACTOR gene family. The Plant Journal, 68(4), 597-606
- Ramos, J.A., Zenser N., Leyser, O. y Callis, J. (2001). Rapid degradation of Auxin/Indoleacetic acid proteins requires conserved amino acids of domain II and Is proteasome dependent. Plant Cell, 13(10): 2349-2360.

- Remington, D.L., Visionm, T.J., Guilfoyle, T.J. y Reedm, J.W. (2004). Contrasting modes of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. Plant Physiology, 135: 1738–1752.
- Robert, H.S. y Friml, J. (2009). Auxin and other signals on the move in plants. Nature Chemical Biology, 5(5), 325-332.
- Robert, M.L., Herrera, J.L., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M.A. y Fuentes-Carrillo, P. (2006). A new temporay immersion bioreactor system for micropropagation, en: Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition, Loyola-Vargas, V. y Vázguez-Flota, F. (eds). Humana Press Inc., Totowa, NJ, 318, 121-129.
- Robert, M.L., Herrera, J.L., Herrera-Alamillo, M.A., Quijano, A. y Balám, U. (2004). Manual for the *in vitro* culture of *Agaves*. Technical paper Nº 38. United Nations Indutrial Development Organization.
- Robert, M.L., Herrera, J.L. y Contreras, F. (1992). Micropropagation of Agave spp. en: Biotechnology in agricultura and forestry, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 307-329.
- Robert, M.L., Herrera, J.L., Contreras, F. y Scorer K.N. (1987). In vitro propagation of Agave fourcroydes Lem. (Henequén). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 8: 37-48.
- Robert, M.L. y García, A. (1985). El cultivo de tejidos vejetales y su posible aplicación en el mejoramiento genético de las Agavaceas, en: Biología y Aprovechamiento Integral del Henequén y otros Agaves, Cruz, C., Del Castillo, L., Robert, M. y Ondarza, R. N. (eds). Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. México. Pp. 83-90.
- Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo-Hernández, G., Rodríguez-Domínguez, J., Rodríguez-Garay, B., Cervantes-Martínez, J. y Castellanos-Hernández, O. (2011). Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequiliana* Weber var. Azul, Plant Cell, Tissue and organ Culture, 104: 271-275.
- Rottach, A., Leonhardt, H. y Spada, F. (2009). DNA methylation-mediated epigenetic control. Journal of Cellular Biochemistry, 108(1), 43-51.
- Sajan, S.A. y Hawkins, R.D. (2012). Methods for identifying higher-order chromatin structure. Annual Review of Genomics and Human Genetics, 13(1), 59-82.
- Santamaría, M.E., Hasbún, R., Valera, J., Meijón, M., Valledor, L., Rodríguez, J., Toorop, P., Cañal, M.J. y Rodriguez, R. (2009). Acetylated H4 histone and genomic DNA

methylation patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*. Journal Plant Physiology, 166:1360–1369.

- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I. y Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Nature Chemical Biology 5(5): 301-307.
- Sekimoto, H., Seo, M., Dohmae, N., Takio, K., Kamiya, Y. y Koshiba, T. (1997). Cloning and molecular characterization of plant aldehyde oxidase. Journal of Biological Chemistry, 272(24), 15280-15285.
- Serino, G., y Deng, X.W. (2003). The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. Annual Review Plant Biology. 54, 165–182.
- Skoog, F. y Miller, C.O. (1957). Chemical regularion of growth and organ formation in plant tissue cultured. In vitro. Symposia of the Society Experimental Biology., v.11, p.118-131.
- Slauson, L.A. (2000). Pollination biology of two *Chiropterophilous agaves* in Arizona. American Journal of Botany 87 (6): 825-836.
- Smýkal, P., Valledor, L., Rodriguez, R., y Griga, M. (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). Plant Cell Reports, 26(11), 1985-1998.
- Strader, L.C. y Bartel, B (2008) . A new path to auxin. Nature Chemical Biology 4, 337-339.
- Strahl, B.D. y C. D. Allis, C.D. (2000). The language of covalent histone modifications, Nature, 403: 41-45.
- Street, H.E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H.E. (Ed). Plant Tissue and Cell Culture. Blackwell Scientific Publishing. Oxford, England. pp. 61-102.
- Song, Y., Wang, L. y Xiong, L. (2009). Comprehensive expression profiling analysis of OsIAA gene family in developmental processes and in response to phytohormone and stress treatments. Planta, 229(3), 577-591.
- Sugawara, S., Hishiyama, S., Jikumaru, Y., Hanada, A., Nishimura, T., Koshiba T., Zhao Y., Kamiya Y., Kasahara H. (2009). Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. Proceedings of the National Academy of Sciences, 106: 5430 – 5435.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M., Liscum, E. y Yamamoto, K.T. (2004). MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated

protein that functions together with the transcriptional sativator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell, 16(2), 379-393.

- Thakur, J.K., Tyagi, A.K. y Khurana, J.P. (2001). OsIAA1 an Aux/IAA cDNA from rice and changes in its expression as influenced by auxin and light. DNA Research 8: 193– 203.
- Thakur, J.K., Jain, M., Tyagi, A.K. y Khurana, J.P. (2005). Exogenous auxin enhances the degradation of a light down-regulated and nuclear-localized OsIAA1, an Aux/IAA protein from rice, via proteasome. Biochimica et Biophysica Acta, 1730: 196 – 205.
- Thorpe, T.A. (1990). The current status of plant tissue culture, en: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations, Bhojwani S.S. (ed). Elsevier, Amsterdam. Pp. 1-33.
- Tian, C.-en., Muto, H., Higuchi, K., Matamura, T., Tatematsu, K., Koshiba, T. y Yamamoto, K.T. (2004). Disruption and overexpression of auxin response factor 8 gene of Arabidopsis affect hypocotyl elongation and root growth habit, indicating its possible involvement in auxin homeostasis in light condition. The Plant Journal, 40(3), 333-343.
- Tian, Q., Uhlir, N.J. y Reed J.W. (2002). Arabidopsis SHY2/IAA3 inhibits auxin-regulated gene expression. Plant Cell 14: 301 – 319.
- Torres-Moran, M. I., Escoto-Delgadillo, M., Molina-Moret, S., Rivera-Rodriguez, D. M., Velasco-Ramirez, A. P., Infante, D. y Portillo, L. (2010). Assessment of genetic fidelity among Agave tequilana plants propagated asexually via rhizomes versus in vitro culture. Plant Cell Tissue Organ Culture, 103(3), 403 - 409.
- Torres-Morán, M.I., Morales-Rivera, M.M. y Santerre A. (2005). Diversidad genética en Agave tequilana Weber var. azul proviniente de micropropagación. Bol. NAKARI Vol. 16 (ISSN: 1405-1613).
- Tiwari, S.B., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. Plant Cell. 15:533-543.

Turner, B. M. (2000). Histone acetilation and epigenetic code, Bioessays, 22: 836-845.

- Ulmasov, T., Hagen, G. y Guilfoyle T. (1999)a. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. Proceedings of the National Academy of Sciences 96(10): 5844-5849.
- Ulmasov, T., Hagen, G. y Guilfoyle, T. J. (1999)b. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. The Plant Journal, 19(3), 309-319.

- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. y Guilfoyle T. J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell 9:1963-1971.
- Ulmasov, T., Llu, Z.B., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. Plant Cell 7, 1611–1623.
- Us-Camas, R., Rivera-Solis, G., Duarte-Aké, F. y De-la-Peña, C. (2014). In vitro culture: an epigenetic challenge for plants. Plant Cell Tissue and Organ Culture (PCTOC), 118(2), 187-201.
- Valledor, L., Hasbún, R., Meijón, M., Rodríguez, J., Santamaría, E., Viejo, M., Berdasco, M. Feito, I., Fraga, M.F., Cañal, M.J. y Rodríguez, R. (2007). Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 91(2): 75-86.
- Varga, A., Thoma, L. H. y Bruinsma, J. (1988). Effects of auxins and cytokinins on epigenetic instability of callus-propagated *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 15(3), 223-231.
- Vert, G., Walcher, C.L., Chory, J. y Nemhauser, J.L. (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(28), 9829-9834.
- Wang, X., Wu, R., Lin, X., Bai, Y., Song, C., Yu, X., Xu, C., Zhao, N., Dong, Y y Liu, B. (2012). Tissue culture-induced genetic and epigenetic alterations in rice pure-lines, F1 hybrids and polyploids. BMC Plant Biology, 13(1), 77.
- Wang, D., Pei, K., Fu, Y., Sun, Z., Li, S., Liu, H., Tang, K., Han, B. Y Tao, Y. (2007). Genome-wide analysis of the auxin response factors (ARF) gene family in rice (*Oryza sativa*). Gene, 394(1–2), 13-24.
- Weijers, D., Schlereth, A., Ehrismann, J.S., Schwank, G., Kientz, M. y J
 ürgens, G. (2006). Auxin triggers transient local signaling for cell specification in Arabidopsis embryogenesis. Developmental Cell, 10(2), 265-270.
- Weijers, D. y Jürgens, G. (2005). Auxin and embryo axis formation: the ends in sight? Current Opinion in Plant Biology, 8(1), 32-37.
- Weijers, D. y Jürgens, G. (2004). Funneling auxin action: specificity in signal transduction. Current Opinion in Plant Biology, 7(6), 687-693.

- Wilmoth, J.C., Wang, S., Tiwari, S.B., Joshi, A.D., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Alonso, J.M, Ecker, J.R. y Reed, J.W. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. The Plant Journal, 43(1), 118-130.
- Wolffe, A.P. y Matzke, M.A. (1999) Epigenetics: regulation through repression. Science 286(5439):481–486.
- Woo, Y.-M., Park, H.-J., Su'udi, M., Yang, J.-I., Park, J.-J., Back, K., Park, Y-M y An, G. (2007). Constitutively wilted 1, a member of the rice YUCCA gene family, is required for maintaining water homeostasis and an appropriate root to shoot ratio. Plant Molecular Biology, 65(1-2), 125-136.
- Woodward, A.W. y Bartel B. (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. Annals of Botany, 95: 707–735.
- Worley, C.K., Zenser, N., Ramos, J., Rouse, D., Leyser, O., Theologis. A. y Callis, J. (2000). "Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling." The Plant Journal, 21(6): 553-562.
- Wright, A.D., Moehlenkamp, C.A., Perrot, G.H., Neuffer, M.G., Cone, K.C. (1992). The maize auxotropic mutant orange pericarpis defective in duplicate genes for tryptophan synthase β. Plant Cell, 4:711–719.
- Wright, A.D., Sampson, M.B., Neuffer, M.G., Michalczuk, L., Slovin, J.P. y Cohen, J.D. (1991). Indole-3-acetic-acid biosynthesis in the mutant maize orange pericarp, a tryptophan auxotroph. Science, 254: 998–1000.
- Xiao, Y., Niu, G. y Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 105(2): 149-158.
- Xu, M., Zhu, L., Shou, H. y Wu, P. (2005). A PIN1 Family Gene, OsPIN1, involved in Auxin-dependent adventitious root emergence and tillering in rice. Plant and Cell Physiology, 46(10), 1674-1681.
- Yamamoto, Y., Kamiya, N., Morinaka, Y., Matsuoka, M. y Sazuka, T. (2007). Auxin biosynthesis by the YUCCA genes in rice. Plant Physiology, 143(3), 1362-1371.
- Yasuno, N., Takamure, I., Kidou, S.-i., Tokuji, Y., Ureshi, A.-n., Funabiki, A., Ashikaga, K., Yamanouchi, U, Yano, M. y Kato, K. (2009). Rice shoot branching requires an ATPbinding cassette subfamily G protein. New Phytologist, 182(1), 91-101.

- Yoon, E.K., Yang, J.H., Lim, J., Kim, S.H., Kim, S.-K. y Lee, W.S. (2010). Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in Arabidopsis lateral root development. Nucleic Acids Research, 38(4), 1382-1391.
- Yuan, D., Bassie, L., Sabalza, M., Miralpeix, B., Dashevskaya, S., Farre, G., Rivera, S.M., Banaka, r R., Bai, C., Sanahuja, G., Arjó, G., Avilla, E., Zorrilla-López, U., Ugidos-Damboriena, N., López, A., Almacellas, D., Zhu, C., Capell, T., Hahne, G., Twyman, R.M. y Christou, P. (2011) The potential impact of plant biotechnology on the millenium development goals. Plant Cell Reports. 30(3): 249-265.
- Zhao, Y.D. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annual Review of Plant Biology, 61(1), 49-64.
- Zhao, Y.D., Christensen, S.K., Fankhauser, C., Cashman, J.R., Cohen, J.D., Weigel, D. y Chory J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. Science 291: 306–309.
- Zhang, K., Sridhar, V. V., Zhu, J., Kapoor, A., and Zhu, J.K. (2007). Distintive core of histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. PLoS ONE, 2(11), 1 - 11.
- Zhou, D-X. y Hu, Y. (2010). Regulatory function of histone modifications in controlling rice gene expression and plant growth. Rice, 3(2-3): 103-111.
- Zhuang, X., Jiang, J., Li, J., Ma, Q., Xu, Y., Xue, Y., Xu, Z. Y Chong, K. (2006). Overexpression of OsAGAP, an ARF-GAP, interferes with auxin influx, vesicle trafficking and root development. The Plant Journal, 48(4), 581-591.
- Ziv, M., Ronen G. y Raviv M. (1998). Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 34(2): 152-158.

CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE LAS ESPECIES Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul, EN CONDICIONES DE AIA, 2,4-D Y SIN AUXINAS

2.1. INTRODUCCIÓN

La principal problemática del cultivo de agaves, son los largos ciclos de vida, la sobreexplotación de las especies silvestres, la falta de material elite y la falta de programas de mejoramiento genético (Robert *et al.*, 2004). La propagación *in vitro*, a través de sus diferentes técnicas, representa una buena alternativa para producir plantas seleccionadas libres de patógenos en forma masiva y en un período corto (Murashige y Skoog, 1962). Las técnicas de cultivo de tejidos vegetales han mostrado ser un importante procedimiento en la multiplicación, el mejoramiento y la conservación de plantas útiles al hombre (Bunn *et al.*, 2011; Pijut *et al.*, 2011; Xiao *et al.*, 2011; Bonga *et al.*, 2010; Debnath *et al.*, 2006). La micropropagación está basada en la proliferación de células meristemáticas que son capaces de regenerar una planta completa (Ziv *et al.* 1998) o a través de las células somáticas de cualquier tejido que pueda formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo a la competencia que posean y al estimulo que reciban (Murashige y Skoog, 1974).

La regulación génica depende en gran medida de las condiciones en la que están creciendo las plantas, tales como el estrés, la manipulación del material vegetal bajo condiciones *in vitro* así como otros factores propios de los sistemas *in vitro* (Peredo *et al.*, 2009), ya que un gran número de genes que están implicados en el crecimiento y desarrollo de las plantas responden a los reguladores de crecimiento de crecimiento vegetal (RCV), sobre todo a las auxinas y citocininas (Vanstraelen y Benková, 2012). Los RCV tienen diferentes efectos en la planta ya que median las respuestas a estreses tanto bióticos como abióticos y controlan diferentes procesos fisiológicos en las plantas (Hirsh y Fang, 1994). Los RCV más utilizados en el cultivo *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas, de los cuales se conoce que regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo en el cultivo de tejidos vegetales (Zhao, 2010; Mazari y Camm, 1993). Se sabe que la concentración óptima y la relación precisa de auxinas y citocininas son esenciales para una eficiente micropropagación (Skoog y

Miller 1957; Letham y Palni, 1983).

Estudios en *Agave* han demostrado una alta eficiencia de micropropagación en presencia del 2,4-D, (Robert *et al.*, 2006) el cual se utiliza en la fase de multiplicación a una concentración de 0,11 µM en el medio de cultivo. También se ha reportado que esta auxina síntética puede tener un efecto inhibitorio a altas concentraciones, lo cual puede deberse a que el 2,4-D es metabolizado más lentamente que las auxinas naturales, dándole su naturaleza de herbicida (Bukowska, 2006). Para procesos de organogénesis y embriogénesis, el 2,4-D ha sido utilizado sólo o en combinación con citocininas, pero también se han utilizado otros reguladores como la benciladenina (BA) y la kinetina (KIN). La concentración óptima y la relación precisa de auxinas y citocininas son esenciales para una eficiente micropropagación (Robert *et al.*, 2006; Robert *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 1992; Robert *et al.*, 1987). Se conoce que no todos los cultivos, ni todos los explantes responden ígual a la relación o tipo de RCV. Es por ello que en éste capítulo se describe la evaluación de la caracterización fenotípica de *Agave* spp. bajo los tratamientos de 0.5 µM de AIA, 2,4-D y un testigo sin auxinas (S/R) a diferentes tiempos.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal y condiciones del cultivo de Agave

Las plantas cultivadas *in vitro* de las variedades *A. angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul; fueron expuestas a dos diferentes tipos de auxinas (AIA y 2,4-D) a una concentración de 0.5 µM de AIA y 2,4-D y sin auxinas (S/R). Las plantas fueron evaluadas fenotípicamente a los 0, 3 y 21 días; los parámetros a medir fueron: peso fresco, la altura de la planta y el número de hojas.

Las plantas utilizadas en este proyecto fueron obtenidas de clonas ya establecidas de *Agave angustifolia* Haw. (clona 26S), *Agave fourcroydes* Lem. (clona P66) y *Agave tequilana* Weber var. Azul (clona S156), todas del Laboratorio de Propagación Clonal del CICY (Figura 2.1). La micropropagación por cultivo de tejidos es una técnica bien establecida en el laboratorio y es utilizada rutinariamente, usando en todas las fases, el medio de cultivo de Murashige y Skoog (1962), modificado por Robert *et al.*, (1987) denominado MSB. Las plantas se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo 12/12 hrs. Todos los medios de cultivo fueron preparados en base a las soluciones enlistadas en el Cuadro 2.1.



Figura 2.1 Selección del material vegetal in vitro de Agave spp.

Cuadro 2.1 Cantidades requeridas para preparar un litro del Medio MS con reducción de nitratos (MSB).

No. Stock	Compuesto	Cant. pesada/litro de Stock	ml stock/litro de medio	
	Glicina	200 mg		
	Ácido nicotínico	50 mg		
1	Piridoxina	50 mg	10	
	Tiamina	10 mg	-	
	Inositol	10 g		
2	KI	83 mg		
	MnSO ₄ ,H ₂ O	1690 mg		
	H ₃ BO ₃	620 mg		
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	860 mg	10	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	25 mg		
	CuSO ₄ .5H ₂ O	2.5 mg *		
	CoCl ₂ .6H ₂ O	2.5 mg *		
3	MgSO ₄ .7H ₂ O	37 g	10	
	KH ₂ PO ₄	17 g	Ĩŭ	
4	KNO3	182 g	10	
	NH ₄ NO ₃	40 g		
5	CaCl ₂ , 2H ₂ O	44 g		
6	EDFS	3.672 g	10	

* Para la preparación del stock a 2.5 mg/ml, se pesan 0.025 mg de $CoCl_2.6H_2O$ y 0.025 de $CuSO_4.5H_2O$, se disuelve y se afora a 10 ml.

Las clonas de las diferentes especies de *Agave* utilizadas en este proyecto fueron seleccionadas por presentar características homogéneas (Figura 2.2) y estas fueron cultivadas en medio MSB-5 (Cuadro 2.2), el cual contiene lo mismo que el medio MSB pero suplementado con 0.1 µM de 2,4-D y 2.22 µM de 6-BAP. Una vez multiplicadas las plantas, éstas se seleccionaron con un tamaño de entre 1.5 y 2 cm de altura con el fin de homogenizar la población de plantas a utilizar en el experimento. Una vez seleccionadas las plantas, alrededor de 500 por especie se resembraron en un medio MSB-R (Cuadro 2.3), el cual no contiene reguladores de crecimiento. Estas plantas se mantuvieron en este medio durante 8 semanas, con 2 resiembras de 4 semanas cada una, esto con el fin de que la planta no estuviera en contacto con RCV exógenos que pudieran interferir con el experimento. Las plantas de dos meses de edad fueron las utilizadas para los experimentos con auxinas.



Figura 2.2 Selección de las plántulas para cada experimento.

Cuadro 2.2 Concentraciones	para la prepa	iración de un li	tro de medio de	multiplicación MSB-5.
o dadi o alla o di lo di dolla di di di di	porte la propo	Interest of the second of the second s	no do modio do	indiciplication in the b.

Medio MSB-5				
Azúcar: 30 g	2,4-D: 0.25 ml			
Stock 1: 10 ml	6-BAP: 5 ml			
Stock 2: 10 ml				
Stock 3; 10 ml	pH: 5.75			
Stock 4: 10 ml	Agar: 1.75 g			
Stock 5: 10 ml	Gelrite: 1.75 g			
Stock 6: 10 ml	Aforar a 1 Lt			

Cuadro 2.3 Concentraciones para la preparación de un litro de medio de enraizamiento MSB-R.

Medio MSB-R				
Azúcar: 30 g	_			
Stock 1: 10 ml	pH: 5.75			
Stock 2: 10 ml	Agar: 8 g			
Stock 3: 10 ml	Aforar à 1 Lt			
Stock 4: 10 ml				
Stock 5: 10 ml				
Stock 6: 10 ml				

2.2.2. Tratamientos con auxinas

2.2.2.1. Evaluación fenotípica

La estrategia experimental para el tratamiento de auxinas consistió en utilizar dos tipos de auxinas, una natural (AIA) y otra sintética (2,4-D) a una concentración de 0.5 µM en las clonas de las tres especies: *A. angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul (Figura 2.3).

Se seleccionaron al azar 100 plántulas, de 475 en total, para el tiempo cero (T₀) (Figura 2.3); 125 plántulas como testigo, las cuales estuvieron en medio MSB-R; 60 plántulas para ser evaluadas a los 3 días; y 50 plántulas para ser evaluadas a los 21 días. De igual forma se utilizaron 125 plántulas para el tratamiento de AIA a una concentración de 0.5 μ M y 125 plántulas para el tratamiento de 2,4-D a una concentración de 0.5 μ M para ser

evaluadas al día 3 y 21 (Figura 2.3). A todas estas plántulas se les evaluó el tamaño, el número de hojas y el peso fresco.

Cuadro 2.4 Concentraciones para la preparación del medio MSB-AIA a 0.5 µM de AIA.

Medio MSB-AIA				
Azúcar: 15 g	AIA: 438 µl			
Stock 1: 10 ml	6-BAP: 250 µl			
Stock 2: 10 ml	pH: 5.75			
Stock 3: 10 ml	Agarosa: 0.5 g			
Stock 4: 10 ml	Gelrite: 0.5 g			
Stock 5: 10 ml	Aforar a 500 ml			
Stock 6: 10 ml				

Cuadro 2.5 Concentraciones para la preparación del medio MSB-2,4-D a 0.5 µM de 2,4-D.

Medio MSB-2,4-D		
Azúcar: 15 g	2,4-D: 550 µl	
Stock 1: 10 ml	6-BAP: 250 µl	
Stock 2: 10 ml	pH: 5.75	
Stock 3: 10 ml	Agarosa: 0.5 g	
Stock 4: 10 ml	Gelrite: 0.5 g	
Stock 5: 10 ml	Aforar a 500 ml	
Stock 6: 10 ml		

presencia y ausencia de auxinas. µM de AlA (MSB-AlA) y 0.5 µM de 2,4-D (MSB-2,4-D) al tiempo cero, tres días y 21 días en Figura 2.3 Diagrama de los tratamientos en medios sin reguladores S/R (testigo; MSB-R), con 0.5



Capitulo II

46


Figura 2.4 Establecimiento de los tratamientos en medio sin reguladores S/R (testigo; amarillo, MSB-R), con 0.5 µM de AIA (azul, MSB-AIA) y 0.5 µM de 2,4-D (verde, MSB-2,4-D).

2.2.3. Análisis estadístico

Con todos los datos cuatitativos de las tres especies bajo las diferentes condiciones (S/R, AIA y 2,4-D) y días de cultivo (T₀, T₃ y T₂₁), se realizó un análisis estadístico basado en la prueba t de Student (Cuadro 2.6) con la finalidad de poder observar si existen diferencias significativas por cada tratamiento en base a los días a los cuales se hizo la evaluación del tamaño, peso y número de hojas; utilizando el programa estadístico Statistical Analysis System (SAS). De la misma manera, se realizó un análisis estadístico factorial (Cuadro 2.7) para explicar las correlaciones entre nuestras fuentes de variación (la especie, el tipo de auxina y el tiempo) y nuestros factores a evaluar (altura, peso y número de hojas). En este modelo estadístico se hace una comparación de todos nuestros datos en general. Con base en los resultados de las pruebas estadísticas, en la prueba t de Student (Cuadro 2.6), en la cual evaluamos si existe diferencias significativas entre los dos tipos de auxinas que se utilizaron en nuestro experimento a los días de toma de muestra (3 y 21).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA DE Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul

Para determinar si las diferentes auxinas utilizadas en las tres especies tenían algún efecto diferencial en el fenotipo de estas, se evaluaron el peso fresco, la altura de las plantas y el número de hojas en presencia y ausencia de 0.5 μ M de AIA y 2,4-D al tiempo cero (T₀), 3 (T₃) y 21 días (T₂₁).

2.3.1.1. Agave angustifolia Haw

De un total de 475 plántulas de *A. angustifolia* Haw, las cuales ya habían pasado por 8 semanas sin auxinas, 100 plántulas fueron evaluadas en el tiempo cero (T_0). Estas tenían una altura promedio de 2.80 cm, un peso promedio de 0.1759 gr y alrededor de 4.3 hojas (Figuras 2.5 y 2.8), El resto de las plantas, 375, se dividieron para los tratamientos de 0.5 μ M de AIA y 2,4-D, así como el testigo al que no se le añadió ninguna auxina.





Del día 3 (T₃) fueron evaluadas un total de 125 plántulas. Las plántulas testigo (sin auxinas) presentaron una altura promedio de 2.84 cm, un peso de 0.2686 gr y un promedio de 4.4 hojas por planta (Figuras 2.6a y 2.8). Por otro lado, las plántulas que estuvieron en presencia de AIA, se obtuvo un promedio en la altura de 2.88 cm, 0.3001 g en el peso de las plántulas y un promedio de 4.6 en el número de hojas (Figuras 2.6b y 2.8). Las plántulas cultivadas por 3 días con 2,4-D presentaron una altura promedio de 2.88 cm, un peso de 0.2457 g y 4 hojas en promedio (Figuras 2.6c y 2.8). En general, a los tres días en presencia o ausencia de auxina no se observó una diferencia significativa en el peso ni la altura pero si en el número de hojas en presencia de 2,4-D usando un análisis estadístico t de Student (Figura 2.8).



Figura 2.6 Plántulas de *Agave angustifolia* al día tres (T_3) en medio a) sin auxinas S/R (testigo), b) 0.5 μ M AIA y c) 0.5 μ M de 2,4-D.

Capítulo II

Para el día 21, se evaluaron un total de 250 plántulas. La altura, el peso y el número de las hojas para para la plántulas testigo (sin reguladores de crecimiento), fue 3.25 cm, 0.3516 g y 4.86, respectivamente (Figuras 2.7a y 2.8). Cabe resaltar que a los 21 días, las plantas mostraron fenotipos diferentes dependiendo del tratamiento. Por ejemplo, todas las plantas que estaban en ausencia de auxinas (S/R) desarrollaron raíces, las que estuvieron expuestas a AIA formaron brotes y las plántulas con 2,4-D desarrollaron callos. Para las plántulas que se establecieron en medio suplementado con AIA, se obtuvo un promedio en la altura de 3.39 cm, 0.4798 g en el peso y un promedio de 5.13 hojas por planta (Figuras 2.7b y 2.8). Por otro lado, las plántulas cultivadas en medio suplementado con 2,4-D presentaron una altura promedio de 3.55 cm, un peso de 0.5863 g y un promedio de 4.46 hojas (Figuras 2.7c y 2.8).



Figura 2.7 Plántulas de Agave angustifolia al día 21 (T_{21}) en medio a) sin auxinas S/R (testigo), b) 0.5 μ M AlA y c) 0.5 μ M de 2,4-D.

En general se pudo observar que el tratamiento con 2,4-D a los 21 días tenía un mayor crecimiento el cual se veía reflejado con un peso mayor (Figura 2.8). Sin embargo, el número de hojas fue menor que el testigo o el AIA tanto en el día 3 como en el día 21.



Figura 2.8 Evaluación de la altura, peso y el número de hojas en *Agave angustifolia* Haw., a los cero (T_0), tres (T_3) y veintiuno (T_{21}) días en ausencia (S/R) y presencia de AIA y 2,4-D.

2.3.1.2. Agave fourcroydes Lem.

De igual manera que *A. angustifolia*, *A. fourcroydes* fue evaluada por la altura de la planta, peso fresco y el número de hojas al tiempo cero (T_0) , a los tres días (T_3) y a los 21 días (T_{21}) en ausencia y presencia de AIA y 2,4-D.

Las plántulas que fueron seleccionadas para ser evaluadas en el tiempo cero (T_0) del experimento eran plántulas que se encontraban en la misma fase de crecimiento y que se mantuvieron en medio sin reguladores (Figura 2.9a). A un total de 100 plántulas se les midió la altura (2.28 cm en promedio), el peso (0.1623 g en promedio) y el número de hojas (4.84 en promedio). A diferencia de *A. angustifolia*, *A. fourcroydes* al dia cero ya presentaba formación de raíces pequeñas (Figura 2.9b).



Figura 2.9 Evaluación de las plántulas de *Agave fourcroydes* en el tiempo cero (T₀) en medio sin auxinas; a) muestras representativas en las Magentas; b) variación de las plantas seleccionadas al azar.

Por otro lado, para el día 3 (T_3) se evaluaron un total de 125 plántulas, las cuales se dividieron en los diferentes medios, el medio sin auxinas, 0.5 µM de AlA y 0.5 µM de 2,4-D (Figura 2.10). En los resultados fenotípicos se encontró que las plántulas que se cultivaron sin auxinas tuvieron una altura promedio de 2.40 cm, un peso fresco de 0.2231 g y 4 hojas (Figuras 2.10a y 2.12). En el caso de las plántulas con AlA, estas tenían una altura promedio de 2.36 cm, un peso de 0.2678 g y un promedio de 5.3 hojas por plántula (Figuras 2.10b y 2.12). Por otro lado, las plántulas que estuvieron en 2,4-D tuvieron una altura promedio de 2.33 cm, un peso de 0.2962 g y 5.2 hojas por plántula (Figuras 2.10c y 2.12). En general se observó que en la altura y el peso no había diferencias; sin embargo, el número de hojas en las plántulas que estuvieron en ausencia de auxinas fue significativamente menor que las plántulas en presencia de AlA o 2,4-D usando un análisis estadístico t de Student (Figura 2.12).



Figura 2.10 Plántulas de *Agave fourcroydes* al día tres (T₃) en medio a) sin auxinas S/R (testigo), b) 0.5 μM AIA y c) 0.5 μM de 2,4-D.

Las plántulas que fueron evaluadas a los 21 días (T_{21}), un total de 250, al igual que en el T_3 , eran plántulas que se encontraban en medio sin auxinas, en presencia de 0.5 µM AIA y en 0.5 µM 2,4-D. Las plántulas que estuvieron sin auxinas (testigo) tenían un promedio en la altura de 2.69 cm, un peso de 0.3121 g y 5.9 hojas; cabe señalar que estas plantas presentaban formación de raices (Figuras 2.11a y 2.12). Para las plántulas que se mantuvieron en el medio con AIA, se obtuvo un promedio en la altura de 3.24 cm, un peso de 0.3351 g y alrededor de 7 hojas por plántula (Figuras 2.11b y 2.12). Por otro lado, las plántulas cultivadas en presencia de 2,4-D presentaron una altura promedio de 3 cm, un peso fresco de 0.5722 g y un número promedio de hojas de 7.5 (Figuras 2.11c y 2.12).



Figura 2.11 Plántulas de *Agave fourcroydes* al día 21 (T_{21}) en medio a) sin auxinas S/R (testigo), b) 0.5 μ M AIA y c) 0.5 μ M de 2,4-D.

En general se observó que en presencia de 2,4-D, las plántulas tenían mayor peso y más hojas al final del experimento de 21 días (Figura 2.12).

Capitulo II



Figura 2.12 Evaluación de la altura, peso y el número de hojas en *Agave fourcroydes* Lem., a los cero (T_0), tres (T_3) y veintiuno (T_{21}) días en ausencia (S/R) y presencia de AIA y 2,4-D.

2.3.1.3. Agave tequilana Weber var. Azul

De igual manera que *A. angustifolia* y *A. fourcroydes, A. tequilana* fue evaluada por el peso fresco, la altura de la planta y el número de hojas al tiempo cero (T0), a los tres días (T3) y a los veintiuno días en ausencia y presencia de AIA y 2,4-D.

Para la evaluación del tiempo cero (T0), se midieron un total de 100 plántulas cultivadas en un medio de cultivo sin auxinas (Figura 2.13). Las plántulas tuvieron una altura promedio de 3 cm, un peso de 0.2453 g y alrededor de 4.3 hojas (Figura 2.16).



Figura 2.13 Evaluación de las plántulas de *Agave tequilana* en el tiempo cero (T₀) de la clona S156; a) muestras representativas en las Magentas; b) variación de las plantas seleccionadas al azar.

Para la evaluación del día 3 en ausencia y presencia de auxinas, se seleccionaron en total 125 (Figura 2.14). Para las plántulas testigo, sin auxinas, se midió la altura, el peso fresco y el número de hojas y éstas tuvieron valores promedio de 3.2 cm, 0.3839 g y 4.4, respectivamente (Figuras 2.14a y 2.16). En el caso de las plántulas con AIA, estas tenían una altura promedio de 3.32 cm, 0.3708 g. de peso freso y 4.1 hojas (Figura 2.14b y 2.16) y para las plántulas en 2,4-D, éstas tenían una altura promedio de 3.30 cm, 0.3126 g de peso fresco y 4.1 hojas (Figura 2.14c y 2.16).



Figura 2.14 Plántulas de *Agave tequilana* al día tres (T_3) en medio a) sin auxinas S/R (testigo), b) 0.5 μ M AIA y c) 0.5 μ M de 2,4-D

Las plántulas que fueron evaluadas a los 21 días (T21), 250 en total, al igual que en el T3, eran plántulas que se encontraban en medio sin auxinas (S/R), con AIA y con 2,4-D (Figura 2.15). Las plántulas testigo (sin auxinas) tuvieron una altura promedio de 3.64 cm, un peso de 0.4393 g y 5.6 hojas; cabe señalar que estas plantas presentaban formación de raices largas (Figura 2.15a y 2.16). Para las plántulas que se establecieron en medio suplementado con AIA, se obtuvo un promedio en la altura de 3.92 cm, un peso fresco de 0.4098 g y 5.6 hojas (Figura 2.15b y 2.16). En el caso de las plántulas que estuvieron en presencia de 2,4-D, tuvieron una altura promedio de 3.74 cm, un peso fresco de 0.3634 g y 5 hojas (Figura 2.15c y 2.16).



Figura 2.15 Plántulas de Agave tequilana al día 21 (T_{21}) en medio a) sin auxinas S/R (testigo), b) 0.5 μ M AlA y c) 0.5 μ M de 2,4-D.

Capítulo II



Figura 2.16 Evaluación de la altura, peso y el número de hojas en *Agave tequilana* Weber var Azul a los cero (T_0), tres (T_3) y veintiuno (T_{21}) días en ausencia (S/R) y presencia de AIA y 2,4-D.

En la figura 2.17 se muestra una comparación fenotípica de las tres especies al día 21 sin auxinas, con AIA y con 2,4-D y se puede observar que la respuesta de la planta fue diferente en todos los casos. Por ejemplo, *A. angustifolia* Haw desarrolló raíces sin auxinas, brotes con AIA y callos con 2,4-D mientras que *A. fourcroydes* Lem sólo desarrolló pequeñas raíces en ausencia de auxinas. Para el caso de *A. tequilana*, ésta especie tuvo un desarrollo de raíces mucho mayor que las otras dos especies en ausencia de auxinas. También se pudo observar que en presencia de 2,4-D, las plántulas *A. tequilana* eran más vigorosas que en las otras especies o en los demás tratamientos.

Capítulo II



Figura 2.17 Evaluación fenotípica de las plántulas de las especies *Agave angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul; en el tiempo veintiuno (T₂₁) en medios sin auxinas (S/R), en presencia de AIA y 2,4-D.

Observamos que al día tres no existen diferencias significativas entre nuestras variables (altura, pero y número de hojas) en la especie *A. angustifolia*. Caso contrario se observó en *A. fourcroydes*, donde hubo diferencias significativas en el peso tanto en la condición de S/R y 2,4-D; y en el número de hojas solo la condición de S/R presento diferencias significativa en comparación de AIA y 2,4-D. En *A. tequilana*, se observó diferencias significativas en los tratamientos S/R y 2,4-D en la variable de peso de la planta. Al día 21, *A. angustifolia* presento diferencias significativas en los tratamientos S/R y 2,4-D en la variable de peso de la planta. Al día 21, *A. angustifolia* presento diferencias significativas en los tratamientos de S/R y 2,4-D para la altura y para el peso. En *A. fourcroydes*, se pudo observar una clara diferencia del tratamiento con 2,4-D en el peso con respecto a los otros tratamientos; y para el número de hojas, hubo diferencias significativas entre las condiciones de S/R y 2,4-D. Para *A. tequilana*, solo se observó diferencias entre la condición de S/R y 2,4-D para el peso de la planta.

	A. a	ngustifolia Ha	aw.	A. j	fourcroydes Le	em.	A. tequi	lana Weber va	ar. Azul
Reguladores	Altura	Peso	No. de Hojas	Altura	Peso	No. de Hojas	Altura	Peso	No. de Hojas
					Día 3				
S/R	2.84 a	0.26865 a	4.4000 a	2.40667 a	0.22317 b	4.0000 b	3.2067 a	0.38395 a	4.4767 a
AIA	2.88 a	0.30012 a	4.6000 a	2.36000 a	0.26787 ab	5.3333 a	3.3267 a	0.37008 ab	4.2000 a
2,4-D	2.88 a	0.24576 a	4.0000 a	2.33333 a	0.29624 a	5,2000 a	3,3067 a	0.31261 b	4.1333 a
					Día 21				
S/R	3.2533 b	0.35168 b	4.8667 a	2.6933 a	0.31214 b	5.9333 b	3.6467 a	0.43936 a	5.6667 a
AIA	3,3933 ab	0.47981 ab	5.1333 a	3.2400 a	0.33515 b	7.0000 ab	3.9267 a	0.40984 ab	5.6000 a
2,4-D	3.5533 a	0.58639 a	4,4667 a	3.0800 a	0.57221 a	7.5333 a	3.7400 a	0.36340 b	5.0000 a

Cuadro 2.6 Análisis estadístico t de Student. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos.

Para tener una idea más general (englobando día 0, 3 y 21), se realizó el análisis estadístico Factorial (Cuadro 2.7), el cual nos arrojó que en relación de la altura, cada especie presenta diferencias significativas, para el peso solo *A. tequílana* presenta una mayor ganancia de peso en relación a las otras dos especies y para el número de hojas, *A. fourcroydes* tiene una mayor producción de hojas. En relación al tratamiento con auxinas, para la variable de altura no existen diferencias significativas; para el peso existe una diferencia significativa entre la condición de S/R y 2,4-D. Para el peso, existe una diferencia significativa tanto en la condición de S/R como en la de 2,4-D.

Con relación al número de hojas las condiciones de S/R y de AIA presentan diferencias significativas. Para el caso de los días en que se realizaron los muestreos, hubo diferencias en todos los tratamientos; solamente para el número de hojas tanto en el día 0 como en el día 3 no existió una diferencia significativa.

Cuadro 2.7 Análisis estadístico Factorial. Letras diferentes significan diferencias significativas entre los tratamientos.

Fuente de variación	Altura (cm)	Peso (g)	No. de hojas
Especie	1		
A. angustifolia Haw.	3.02444 b	0.30670 b	4.4963 b
A. fourcroydes Lem.	2.55259 c	0.28310 b	5.5037 a
A. tequilana Weber var. Azul	3.36074 a	0.33504 a	4.6667 b
Tipo de Auxina			
S/R	2.90519 a	0.28903 b	4.7259 b
AIA	3.03037 a	0.30837 ab	5.1111 a
2,4-D	3.00222 a	0.32744 a	4.8296 ab
Tiempo			
Día 0	2.70815 c	0.20057 c	4.4963 b
Día 3	2.83778 b	0.29650 b	4.4815 b
Día 21	3.39185 a	0.42778 a	5.6889 a

2.4. DISCUSIÓN

En México, ha sido utilizada satisfactoriamente la propagación clonal como herramienta para el mejoramiento del proceso de revigorización y rejuvenecimiento en plantaciones de *Agave* (Díaz-Martínez *et al.*, 2012, Sánchez-Teyer *et al.*, 2009, Infante *et al.*, 2006). El uso de técnicas de propagación *in vitro* de plantas ha permitido el escalamiento de cultivos de interés comercial y a su vez mantener una uniformidad genética entre las clonas. En el laboratorio de Propagación Clonal del CICY se cuenta con plantas de *Agave* que han sido micropropagadas por muchos años; este sistema de micropropagación produce un excelente material vegetal para estudiar la influencia del ambiente *in vitro*, como es el estrés y los reguladores de crecimiento que se aplican de manera exógena al medio de cultivo, así como las características fenotípicas que adquieren las plantas (Robert *et al.*, 2006; Robert *et al.*, 2004; Robert *et al.*, 1992; Robert *et al.*, 1987). Se ha observado que utilizando diferentes sistemas *in vitro* los agaves desarrollan diferencias fenotípicas debido a los reguladores de crecimiento y la multiplicación en el cultivo de tejidos (Varga *et al.*, 1988; Morcillo *et al.*, 2006; Gaspar *et al.*, 1996).

En la micropropagación del Agave (Robert et al., 2006) normalmente se utiliza el 2,4-D en la fase de multiplicación a una concentración de 0.11 µM en el medio de cultivo. En este estudio se decidió evaluar el efecto de las auxinas, ácido indol-3-acético (AIA) como auxina natural y al 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) como auxina sintetica a una concentración cinco veces mayor (0.5 µM) a tres tiempos diferentes (0, 3 y 21 dias) en 3 especies diferentes de Agave: A. angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul. En los tratamientos al día 21 (T21) se observaron plantas de mayor peso en A. angustifolia y A. fourcroydes en comparación con A. tequilana (Figura 2.17). Para la altura, en A. tequilana se favorece notablemente, en A. angustifolia y A. fourcroydes no fue tan evidente la diferencia al día 21 (T21) del experimento. Para la producción de hojas, A. fourcroydes presentó una evidente ganancia en el número de hojas en comparación a A, angustifolia y A, tequilana al dia 21. Todas las comparaciones se hicieron respecto a las plántulas testigo sin auxinas al día 0 (T₀). Cabe señalar que en A. angustifolia, al día 21 (T₂₁) se presentó en la condición S/R la formación de raices, con AIA la formación de brotes y con 2,4-D la formación de callos (Figura 2.17). En las plantas, el 2,4-D funciona manteniendo altos niveles endógenos de auxinas, resultando en la sobre-estimulación del

crecimiento en la planta y por último causa la muerte; en este caso se observó que el 2,4-D en *A. fourcroydes* favoreció en el número de hojas y en *A. angustifolia* favoreció un aumento en el tamaño. Se sabe que después de la aplicación del 2,4-D, éste es absorbido rápidamente por las hojas y raíces y luego es translocado a toda la planta (Aksakal et al., 2013).

El crecimiento y el desarrollo de una planta es un proceso complicado, en el cual existen determinados programas de desarrollo presentes en su genoma, la respuesta a estreses bióticos y abióticos, y finalmente el efecto de las hormonas vegetales en los procesos biológicos (Smulders y Klerk, 2011; Chynnusamy y Zhu, 2009). Los RCV han sido relacionados en la expresión génica, ya que depende en gran medida de las condiciones en la que están creciendo las plantas, tales como el estrés, la manipulación del material vegetal bajo condiciones in vitro así como otros factores propios de los sistemas in vitro (Jaenisch y Bird, 2003; Frugis et al., 1999); ya gue gran número de genes que están implicados en el crecimiento y desarrollo de las plantas responden a los reguladores de crecimiento, sobre todo a las auxinas y citocininas (Vanstraelen y Benková, 2012). A bajas concentraciones éstas regulan varios aspectos del desarrollo de una planta, como: la germinación y la dormancia de las semillas, la formación y elongación de ápices y raíces, la dominancia apical, el tropismo, la diferenciación de los órganos y tejidos, el floramiento, el desarrollo y maduración del fruto (Santner y Stelle, 2009) y altas concentraciones para inducir la desdiferenciación y la rediferenciación en los tejidos y también son útiles para promover el enraizamiento de las plantas provenientes de la germinación de embriones somáticos (Eeuwens et al., 2002). En otro estudio realizado en Zantedeschia albomaculata (Chang et al., 2003), una planta ornamental monocotiledónea de interés comercial y micropropagada, se observó que al aumentar las concentraciones de auxinas, tanto naturales como sintéticas, la respuesta morfogénica es menor, respecto a bajas concentraciones.

También se ha reportado que el 2,4-D a altas concentraciones induce anormalidades genéticas *in vivo* e *in vitro*; ya que es un fuerte componente citotóxico y mutagénico en células animales y vegetales; afectando los procesos de división celular e induciendo anormalidades mitóticas en forma de aberraciones cromosómicas (Pavlica *et al.*, 1991) y es probable que *A. angustifolia* Haw haya sido más suceptible a esta auxina produciendo

Capitulo II

la formación de callos (Figura 2.17). Algunos fenotipos que se han encontrado, por el uso de este regulador de crecimiento son: variantes en el número y tamaño de las flores en *Begonia x elatior y Saintpaulia ionantha* L. (Jain, 1997), diferencias en el peso y morfologia de las hojas y tallos en *Bromus inermis* Leyss. (Wattanasiri y Walton, 1993), alta respuesta embriogénica entre las clonas obtenidas en *Freesia hybrida* Klatt (Gao *et al.*, 2010); variaciones fenotípicas como altura, número de flores y órganos sexuales fusionados en *Torenia fournieri* Linden ex E. Fourn. (Hadi y Bridgen, 1996) y diferencias en el tamaño de las espigas y el número de semillas por espiga en trigo (Hashim *et al.*, 1990).

2.5. BIBLIOGRAFIA

- Aksakal, O., Erturk, F.A, Sunar, S., Bozari, S. y Agar, G. (2013). Assessment of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on maize by using RAPD analysis. Industrial Crops and Products, 552-557.
- Bonga, J.M., Klimaszewska, K.K., y Aderkas, P. (2010). Recalcitrance in clonal propagation, in particular of conifers. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 100(3), 241-254.
- Bukowska, B. (2006). Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetuc acid-molecular mechanisms. Polish Journal of Environmental Studies, 15: 365-374.
- Bunn, E., Turner, S. y Dixon, K. (2011). Biotechnology for saving rare and threatened flora in a biodiversity hotspot. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 47(1), 188-200.
- Chang, H.S., Charkabarty, D., Hahn, E.J. y Paek, K.Y. (2003). Micropropagation of calla lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 39(2), 129-134.
- Chynnusamy, V. y Zhu, J.-K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants, Current Opinion in Plant Biology, 133-139.
- Debnath, M., Malik, C. y Bisen, P. (2006). Micropropagation: a tool for the production of high quality plant-based medicines. Current Pharmaceutical Biotechnology, 7(1), 33-49.
- De-la-Peña C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J.L., López-Torres, A., Wrobel, K. y Robert, M.L. (2012). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave* spp., Bio Medical Central Plant Biology, 12: 1-11.
- Díaz-Martínez, M., Nava-Cedillo, A., Guzmán-López, J.A., Escobar-Guzmán, R. y Simpson J. (2012). Polymorphism and methylation patterns in Agave tequilana Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods. Plant Science, 3:185-186.
- Eeuwens, C.J., Lord, S., Donough, C.R., Rao, V., Vallejo, G. y Nelson, S. (2002). Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm, Plant Cell Tissue and Organ

Culture, 70: 311-323,

- Frugis, G., Giannino, D., Mele, G., Nicolodi, C., Innocenti, A.M., Chiappetta, A., Bitonti, M.B., Dewitte, W., Van-Onckelen, H. y Mariotti, D. (1999). Are homeobox knottedlike genes and cytokinins the leaf architects?. Plant Physiology, 119:371–374.
- Gao, X., Yang, D., Cao, D., Ao, M., Sui, X., Wang, Q., Kimatu J.N. y Wang, L. (2010). In vitro micropropagation of Freesia hybrida and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. Journal of Plant Growth Regulators, 257-267.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. y Thorpe, T.A. (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell Development Biology- Plant, 272-289.
- Hadi, M.Z. y Bridgen, M.P.(1996). Somaclonal variations as a tool to develop pest resistant plants of *Torenia fournieri* Compacta Blue. Plant Cell Tissue and organ Culture, 43-50.
- Hashim, Z. N., Campbell, W.F. y Carman, J.G. (1990). Morphological analyses of spring wheat (CIMMYT cv. PCYT-10) somaclones, Plan cell, Tissue and Organ Culture, 95-99.
- Hirsch, A. y Fang, Y. (1994). Plant hormones and nodulation: what's the connection? Plant Molecular Biology, 26(1), 5-9.
- Infante, D., Molina, S., Demey J.R. y Gámez, E. (2006). Asexual genetic variability in Agavaceae determined with inverse sequence-tagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis. Plant Molecular Biology Reports, 24: 205-217.
- Jaenisch, R. y Bird, A. (2003). Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. Nature Genetics Suplement, 33: 245-254.
- Jain, S.M. (1997). Micropropagation of selected somaclones of Begonia and Saintpaulia , Journal of Bioscience, 22: 585-592.
- Letham, D.S. y Palni L.M.S. (1983). The biosynthesis and metabolism of cytokinins. Annual Review of Plant Physiology, 34(1): 163-197.
- Mazari, A. y Camm, E.L. (1993). Effect of cytokinins on plastid development and photosynthetic polypeptides during organogenesis of *Pinus ponderosa* Dougl. cotyledons cultured *in vitro*. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 33(1): 81-89.

- Morcillo, F., Gagneur, C., Adam, H., Richaud, F., Singh, R., Cheah, S.C., Rival, A., Duval, Y. y Tregear, J.W. (2006). Somaclonal variation in micropropagated oil palm. characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. Tree Physiology, 26:585–594.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15(3), 473-497.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1974). "Plant propagation through tissue cultures." Annual Review of Plant Phisiology, 25(1):135-165.
- Pavlica, M., Papeš, D. y Nagy, B. (1991). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. Mutation Research Letters, 263(2): 77-81.
- Peredo, E.L., Arroyo-Garcia, R., Revilla, M.A. (2009). Epigenetic changes detected in micropropagated hop plants. Journal of Plant Physiology, 166:1101–1111.
- Pijut, P., Lawson, S. y Michler, C. (2011). Biotechnological efforts for preserving and enhancing temperate hardwood tree biodiversity, health, and productivity. In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant, 47(1), 123-147.
- Robert, M.L., Herrera-Herrera J.L., Castillo E. Ojeda G. y Herrera-Alamillo M.A. (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species, en: Plant Cell Culture Protocols, (Loyola-Vargas V. M. y Vázquez-Flota, F., eds.), 165-178.
- Robert, M.L., Herrera-Herrera, J.L., Herrera-Alamillo, M.A., Quijano, A. y Balám, U. (2004). Manual for the *in vitro* culture of *Agaves*. technical paper No. 3. United Nations Industrial Development Organization.
- Robert, M.L., Herrera, J.L. y Contreras, F. (1992). Micropropagation of Agave spp. en: Biotechnology in agricultura and forestry, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 307- 329.
- Robert, M.L., Herrera, J.L., Contreras, F. y Scorer, K.N. (1987). In vitro propagation of Agave fourcroydes Lem. (Henequen). Plant Cell Tissue and Organ Culture, 8(1).
- Sánchez-Teyer, F., Moreno-Salazar, S., Esqueda, M., Barraza, A. y Robert, M. L. (2009). Genetic variability of wild Agave angustifolia populations based on AFLP: A basic study for conservation. Journal of Arid Environments, 73(6–7), 611-616
- Santner, A., y Estelle, M. (2009). Recent advances and emerging trends in plant hormone signalling. Nature, 459(7250), 1071-1078.

- Skoog, F. y Miller, C.O. (1957). Chemical regularion of growth and organ formation in plant tissue cultured. In vitro. Symposia of the Society Experimental Biology., v.11, p.118-131.
- Smulders, M. y Klerk, G. (2011). Epigenetics in plant tissue culture. Plant Growth Regulation, 63:137–146. .
- Vanstraelen, M. y Benková, E. (2012). Hormonal Interactions in the regulation of plant development, Annuals Review Cell Developmental Biology, 463-487.
- Varga, A., Thoma, L.H. y Bruinsma, J. (1988). Effects of auxins and cytokinins on epigenetic instability of callus-propagated *Kalanchoe blossfeldiana* Poelln. Plant Cell Tissue Organ Culture, 15:223–231.
- Wattanasiri, C. y Walton, P.D. (1993). Effects of growth regulators on callus cell growth, plant regeneration, and somaclonal variation of smooth bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.), Euphytica, 77-82.
- Xiao, Y., Niu, G. y Kozai, T. (2011). Development and application of photoautotrophic micropropagation plant system. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 105(2): 149-158.
- Zhao, Y.D. (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annual Review of Plant Biology, 61(1), 49-64.
- Ziv, M., Ronen G. y Raviv M. (1998). Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for the large-scale micropropagation of plants. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant, 34(2): 152-158.

CAPÍTULO III

ANÁLISIS FILOGENÉTICO DE LOS GENES ARF EN Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem., A. tequilana Weber var. Azul, EN PRESENCIA DE AIA, 2,4-D Y SIN AUXINAS.

3.1 INTRODUCCIÓN

Los Factores de Respuesta a Auxinas (ARF, por sus siglas en inglés) son factores de transcripción que juegan un papel importante en el desarrollo de las plantas y que se activan minutos después de una estimulación con auxinas (Guilfovle y Hagen, 2007). La respuesta de las plantas a las auxinas, implica a las proteínas Auxinas/ácido-indol-3-acético (Aux/AIA), que se unen a los ARF (Dharmasiri y Estelle, 2004; Tiwari et al., 2001). Los Aux/AIA son objeto de proteólisis a través de la vía mediada por la Ubiquítina (Ubg), mientras que los ARFs ayudan a regular la transcripción de genes tempranos a la respuesta de auxinas como por ejemplo: los genes Auxinas/ácidoindol-3-acético (Aux/AIA), Gretchen Hagen 3 (GH3) y los SMALL AUXIN UP RNA (SAUR) que regulan la fisiología de las plantas; modulando la interacción de los factores de transcripción con los elementos de respuesta a auxinas (AuxREs) (Serino y Deng, 2003; Gray et al., 2001; Ulmasov et al., 1999; Abel y Theologis, 1996; Abel et al., 1994). Los ARFs han sido relacionados en el crecimiento de raíces laterales (Marín et al., 2010; Okushima et al., 2007; Tatematsu et al., 2004), la embriogénesis (Weijers et al., 2006; Hamann et al., 2002), la expansión de las hojas (Wilmoth et al., 2005), la senescencia (Lim et al., 2010), desarrollo del fruto (de Jong et al., 2009; Guillon et al., 2008; Goetz et al., 2007), y en respuesta a otros RCV, como por ejemplo al etileno (Li et al., 2006), a los brasinoesteróides (Vert et al., 2008) y al ácido abscísico (Yoon et al., 2010).

La función de activación de las proteínas ARF está habilitada por su arquitectura de cuatro dominios, que incluye regiones de dimerización o heterodimerización. Los ARF contienen tres dominios conservados, es decir, un dominio de dimerización carboxilo-terminal (CTD) similar a los que se encuentran en el extremo carboxilo de los Aux/AIA (Ulmasov *et al.*, 1997a; Shin *et al.*, 2007); el dominio de unión al ADN (DBD) en la región N-terminal; y una región media conocida como dominio de represión (RD) o un dominio de activación (AD) (Ulmasov *et al.*, 1997a; Ulmasov *et al.*, 1999). Se ha

Capitulo III

demostrado que estos residuos distribuidos en la región media, también pueden afectar el proceso de degradación dependiente del proteosoma de los ARF. Finet *et al.*, 2013, reportan la existencia de un dominio localizado en la región media de los ARF, río arriba del domino III, que contiene la firma de un motivo LFG (L por leucina, F por fenilalanina y G por glicina) altamente conservado. El dominio C-terminal es responsable de la homodimerización ARF y la heterodimerización de Aux/IAA y ARF. La mayoría de los dominios C-terminales son necesarios para la respuesta de las plantas a las auxinas (Ouellet *et al.*, 2001). En la región N-terminal de unión al ADN (DBD), el cual es muy conservado y se une a los AuxRes (Hagen y Guilfoyle, 2002; Ulmasov *et al.*, 1997b). La mayor parte de las proteínas ARF de A. *thaliana*, excepto ARF3 y ARF17, contienen un dominio C-terminal en las regiones III y IV homólogas a los dominios en las proteínas Aux/IAA, siendo capaces de formar heterodímeros a través de estos dominios (Tiwari *et al.*, 2003).

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Aislamiento in silico de los genes ARF

La búsqueda de genes ARF de Agave se hizo a partir de secuencias de transcritos de A. tequilana reportados por Gross et al., 2013 que se encontraban en la base de datos del National Center of Biotechnology Information (NCBI). Así mismo se procedío a realizar un análisis con la herramienta BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) para conocer su relación, por homología, con otros genes ARFs reportatos (Cuadro 3.1).

3.2.2. Alineamiento múltiple de los transcritos de los genes ARF

Se realizó un alineamiento múltiple de las secuencias de nucleótidos de los 32 transcritos encontrados en el transcriptoma de *A. tequilana* (Gross *et al.*, 2013) (Figura 3.1), usando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) implementado en el software Geneiuos[®] R7 usando los valores por defecto (http://www.geneious.com/) (Figura 3.1).

3.2.3. Análisis filogenético y de dominios de los genes ARF

Se realizó un anàlisis filogenético de las 32 secuencias para determinar como se asociaban los 32 transcritos, usando el Método de inferencia filogenética de Neighborjoining con el Modelo Tamura-Nei (Tamura *et al.*, 2011), con 1000 repeticiones bootstrap (Figura 3.2). El modelo se determino utilizando la herramienta Geneiuos[®] R7 (Hunter *et al.*, 2012).

Al mismo tiempo, se hizo un análisis estructural y de dominios conservados de los 32 transcritos, comparando contra las bases de datos de dominios Pfam (http://pfam.xfam.org/), Gene3D (http://gene3d.biochem.ucl.ac.uk/Gene3D/), Interpro (http://www.ebi.ac.uk/interpro/), SMART (http://smart.embl-heidelberg.de/), Phanter (http://www.pantherdb.org/),Superfamily (http://supfam.org/SUPERFAMILY/hmm.html), a través del plugin InterPro implementado en Geneious R7 (Hunter *et al.*, 2012) (Figura 3.3).

3.2.4. Diseño de oligonucleótidos a partir de transcritos de los genes ARF de Agave tequilana

Para el diseño de las secuencias se partió de las secuencias del transcriptoma de

Capitulo III

Agave tequilana publicadas (Gross et al. 2013; Cuadro 3.1). Para el diseño de los oligonucleótidos específicos para los genes ARF en las especies A. angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul, se llevó a cabo un alineamiento de las secuencias de nucleótidos (Figura 3.1), obtenidas del banco de datos del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/) con las secuencias del transcriptoma de A. tequilana; usando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) en el programa Geneious[®] R7 (http://www.geneious.com/).

3.2.5. Análisis in silico de los oligonucleótidos

Con base en el análisis filogenético (Figura 3.2), se alslaron 12 secuencias a las cuales se les hizo un análisis de homología usando la herramienta BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) y se les asigno un nombre putativo. Posteriormente se corrió un gel *in silico* con el software Geneious R7, para observar el patrón de bandeo esperado (Figura 3.4).

3.2.6. Traducción de las secuencias y predicción de los marcos abiertos de lectura (RF)

Se realizó la traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos con la herramienta de traducción "Translate" en el servidor ExPASy (http://www.expasy.org/) del Portal de Recursos Bioinformáticos (SIB por sus siglas en inglés) y al mismo tiempo se realizaron las predicciones de los RF, donde el mismo software genera los 6 posibles RFs (+1, +2, +3, -1, -2 y -3), de la secuencia problema.

3.2.7. Material vegetal

El material vegetal utilizado para este trabajo consistió en hojas de Agave de las especies A. angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul, las cuales fueron expuestas a dos diferentes tipos de auxinas (AIA y 2,4-D) a una concentración de 0.5 µM y sin auxinas (S/R). Las muestras fueron evaluadas a los 0, 3 y 21 días. Las muestras de cada condición fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su posterior uso en la extracción de ácidos nucleicos.

3.2.8. Extracción de ARN

Se pesó entre 0.3 y 0.5 g de tejido de hoja de las especies A. angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul y fueron macerados en un mortero

con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml y se agregó 1 ml de Tripure Isolation Reagent (TRI). La muestra se homogenizó y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron a cada muestra 100 µl de bromocloropropano y se homogenizó con un vortex. La muestra se dejó reposar por 15 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,500 rpm por 15 min a 4 °C. Para la precipitación del ARN, se separó la fase acuosa y ésta se pasó a un tubo eppendorf limpio al cual se le agregó 500 µl de isopropanol y se agitó ligeramente. Seguido de esto, la muestra se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,500 rpm por 8 min a 4 °C. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol frio (70 %) y se centrifugó a 8,500 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min y ésta luego se resuspendió en 30 µl de ddH₂O y se incubó a 55 °C por 10 min. Se cuantificó la concentración del ARN en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso. (Figura 3.6).

3.2.9. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis de ADNc, se partió de 1.5 µg de ARN total al cual se le agregó 1 µl de oligo dT (50 mM), 1 µl de dNTPs (10 mM) y se llevó la reacción a 12 µl totales con ddH₂O. Las muestras fueron incubadas a 65°C por 5 min para linearizar a los ARN mensajeros. Transcurrido el tiempo, las muestras se colocaron en hielo por 5 min y se le añadió 4 µl de 5X First Strand Buffer (buffer de enzima), 2 µl de DTT (100 mM), y 0.5 µl de inhibidor de RNasa Out (40 U/µl.). Posteriormente, la muestra se incubó a 42°C por 2 min y a continuación, se agregó 1 µl de la enzima reversa transcriptasa (Super Script II RT, 200 U/µl.) y se mezcló. La muestra se incubó a 42°C durante una hora y posteriormente se inactivó la enzima a 70°C por 15 min. Finalmente, la muestra se colocó en hielo por 5 min y se almacenó a - 20°C hasta su uso.

3.2.10. Secuenciación

Para la secuenciación, se realizó el corte de la banda correspondiente a cada gen amplificado una vez separado electroferéticamente en un gel de agarosa al 1% (Figura 3.6). Posteriormente se procedió a purificar los fragmentos usando el kit QIAquick® de QIAGEN y se cuantificaron los purificados de cada uno de los 6 genes (*ARF1, ARF2a, ARF5, ARF7a, ARF17 y UBQ11*) usando un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). Las muestras fueron enviadas al Instituto de Genómica de la Universidad de

Capitulo III

Clemson (CUGI) en EUA, donde se llevó a cabo la secuenciación mediante el método de Sanger.

Cuadro 3.1 Números de accesión del NCBI de los 32 transcritos de los genes ARF de Agave tequilana, reportados por Gross et al., 2013.

No.	Nombre del locus	No. de accesión GenBank	No. pb	Probable ARF (BLAST NCBI)
1	TSA: <i>Agave</i> <i>tequilana</i> Locus1985413v1rpk m13.02 transcribed RNA se14quence	GAHU01042083.1	2706	ARF3 ARF18
2	TSA: <i>Agave tequilana</i> Lo15cus31465v1rpkm5.34 transcribed RNA16 sequence	GAHU01064529.1	1622	ARF13 ARF17 ARF18
3	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locu1718s36268v1rpkm3.65 transcribed RNA sequence	GAHU01073181.1	3207	ARF16 ARF18
4	TSA: Agave tequilana Locus8030v1rpkm37 .42 transcribed RNA sequence	GAHU01017508.1	2573	ARF1 ARF7 ARF13
5	TSA: <i>Agave</i> <i>tequilana</i> Locus35770v1rpkm3 .80 transcribed RNA sequence	GAHU01072281.1	4051	ARF16
6	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus9114v1rpkm33.06 transcribed RNA sequence	GAHU01019718.1	3072	ARF1 ARF2 ARF6 ARF8 ARF9 ARF25

Capitulo III

7	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus17266v1rpkm15.86 transcribed RNA sequence	GAHU01036963.1	2318	ARF2 ARF3 ARF8 ARF22
8	TSA: Agave tequilana Locus28611v1rpkm6.66 transcribed RNA sequence.	GAHU01059165.1	3379	÷
9	TSA: Agave tequilana Locus12504v1rpkm2 3.71 transcribed RNA sequence	GAHU01027178.1	2674	ARF2 ARF3 ARF4 ARF24
10	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus29753v1rpkm6.09 transcribed RNA sequence	GAHU01061328.1	3672	ARF19
11	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus21203v1rpkm11.76 transcribed RNA sequence	GAHU01044804.1	2091	ARF13 ARF17 ARF18
12	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus7292v1rpkm41.07 transcribed RNA sequence	GAHU01016017.1	1833	ARF1
13	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus7068v1rpkm42.25 transcribed RNA sequence	GAHU01015477.1	833	÷
14	TSA: Agave tequilana Locus4331v1rpkm66.11 transcribed RNA sequence	GAHU01009791.1	2357	ARF3 ARF6 ARF8 ARF12

Capitulo III

15	TSA: Agave tequilana Locus26307v1rpkm7.95 transcribed RNA sequence	GAHU01054801.1	3638	ARF6 ARF19
16	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus54454v1rpkm1.35 transcribed RNA sequence	GAHU01101468.1	2524	ARF6 ARF8
17	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus38447v1rpkm3.09 transcribed RNA sequence	GAHU01076973.1	3011	
18	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus8706v1rpkm34.58 transcribed RNA sequence	GAHU01018880.1	1771	ARF1 ARF2
19	TSA: Agave tequilana Locus24217v1rpkm9.35 transcribed RNA sequence	GAHU01050701.1	2774	ARF10 ARF18
20	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus15910v1rpkm17.63 transcribed RNA sequence	GAHU01034284.1	1650	4
21	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus9914v1rpkm30.43 transcribed RNA sequence	GAHU01021381.1	2349	+
22	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus4828v1rpkm60.36 transcribed RNA sequence	GAHU01010818.1	3384	ARF1 ARF2 ARF24
23	TSA: Agave tequilana Locus14749v1rpkm19.44	GAHU01031919.1	3017	ARF3 ARF8

Capitulo III

	transcribed RNA sequence			ARF12 ARF30
24	TSA: Agave tequilana Locus31272v1rpkm5.41 transcribed RNA sequence	GAHU01064202.1	2391	ARF2 ARF18
25	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus4067v1rpkm69.76 transcribed RNA sequence	GAHU01009186.1	2023	ARF6 ARF7 ARF9
26	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus23562v1rpkm9.86 transcribed RNA sequence	GAHU01049445.1	2054	ARF4 ARF6 ARF8 ARF17
27	TSA: Agave tequilana Locus8507v1rpkm35.35 transcribed RNA sequence	GAHU01018502.1	3142	ARF8 ARF9 ARF19 ARF23
28	TSA: Agave tequilana Locus44034v1rpkm2.15 transcribed RNA sequence	GAHU01086204.1	2252	ARF1 ARF7 ARF11 ARF18
29	TSA: Agave tequilana Locus6215v1rpkm47.55 transcribed RNA sequence	GAHU01013606.1	2478	ARF4 ARF6 ARF7 ARF8 ARF26
30	TSA: Agave tequilana Locus15254v1rpkm18.61 transcribed RNA sequence	GAHU01033026.1	2896	÷

Capítulo III

31	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus8241v1rpkm36.50 transcribed RNA sequence	GAHU01017933.1	3414	ARF2 ARF5 ARF19 ARF21
32	TSA: <i>Agave tequilana</i> Locus24796v1rpkm8.95 transcribed RNA sequence	GAHU01051896.1	2869	•

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Clasificación por dominios estructructurales específicos de los genes ARF de Agave tequilana y análisis filogenético

A partir del análisis filogénetico se observó que los 32 transcritos de los genes ARF de A. tequilana, se agruparon en tres clados principales, similar a lo reportado por Finet et al., (2013) donde después de hacer el anàlisis filogenètico de los genes ARF de 21 especies, observaron que se agruparon en tres grandes clados. Posteriormente se decidió hacer una búsqueda de dominios conservados entre los transcritos de los genes ARF (Figura 3.1). Puesto que la función de activación de las proteínas ARF está habilitada por su arquitectura de cuatro dominios, los cuales incluyen motivos de dimerización tanto de unión al ADN (DBD) como con proteínas (regiones ricas en aminoácidos) y regiones III y IV (Guilfoyle y Hagen, 2007). en A. tequilana del Cuadro 3.1; usando el programa Geneiuos® R7. Figura 3.1 Alineamiento de las secuencias nucleotídicas de los 32 transcritos de ARF



Capitulo III

81






Figura 3.3 Análisis estructural y de dominios conservados de los 32 transcritos de *Agave tequilana* enlistados en el cuadro 3.1. Se utilizó el programa Geneiuos[®] R7 para su análisis.

Con base en el análisis de dominios estructurales y lo reportado por Zhang et al., (2012) los genes que no presentaron el Dominio de Unión al ADN (DBD por sus siglas en inglés) se consideraron como pseudogenes y por tanto no son funcionales; por lo cual se descartaron. Entonces de los 32 genes ARF encontrados en el transcriptoma de A. tequilana, se descartaron 9, haciendo un total de 23 genes ARF posiblemente funcionales. Nuestro análisis filogenético (Figura 3.2) dividió a las secuencias en 12 subclados. De cada uno de los subclados (de diferente color en la Figura 3.5), se seleccionó un gen representativo, siendo un total de 12 transcritos de ARF. seleccionados por presentar una alta identidad. Seleccionados los 12 transcritos, se realizó un análisis de cada uno usando la herramienta BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) del NCBI, para ver con qué genes ARF de otras especies tenían mayor homología (Cuadro 3.1) y en base a eso se les asigno un nombre putativo para el diseño de los oligonucleótidos específicos de cada uno de los 12 genes, quedando de la siguiente manera: ARF 7A, ARF 7B, ARF 5, ARF 2A, ARF 2, ARF 7C, ARF 7D, ARF 7E, ARF 1, ARF 7F, ARF 7 y ARF 17 (Cuadro 3.2). Las secuencias de estos genes se corrieron in silico con el software Geneious R7, para poder observar el patrón de bandeo esperado (Figura 3.4)



Figura 3.4 PCR in silico de los 12 genes ARF de Agave tequilana.

Nombre de la secuencia	Nombre Primers	Número de accesión	Secuencia	Posición	Largo	Direction	% GC	Tamaño del Producto de PCR	Tm	
ARF_7A	ARF7a_VFwd	gi 533026245 gb GAHU01072281.1	5'-CTATGGTGAAGCTGATGACCAG-3'	1094 - 1115	22.	forward	54.55	603	57.89	
	AKE/a_VKev		5'-AGECTGCGGTAAGGGTTTCACA-3'	1675 - 1696	22	reverse	54.55	603	58.43	
ARE 78	ARF7b_VFwd	PI15330432641eb164HU0106420211	5'-GCAGCAATGGAAACAGGAATCAGC-3'	50-73	24	forward	50	620	57,34	
ANG_IG	ARF7b_VRev	P(1222042504180104100100420511]	5'-GAGCAAAATGAAAGCATCCCCAGC-3'	669-646	24	reverse	50	620	57.32	
	ARFS_VFwd		5'-AGTTGCGGCGTGCTGTTAGT-3'	2,020-2,039	20	forward	55	459	57.21	
AKF_0	ARF5_VRev	RI1222022221 RD1044001024901.11	5'-TCGGTGGAGAGGCAGATGTTGA-3'	2,478-2,457	22	reverse	54,55	459	57.39	
	ARF2a VFwd		5'-TGGGATGGCAGTTGGGAGGGCGGT-3'	1,766-1789	24	forward	54.17	515	58.16	
ARF_2A	ARF2a_VRev	gi[533058019]gb]GAHU01050701.1]	5'-GCGAAAGTTAAGGGCCTGGCTCTG-3'	2,280-2,257	24	reverse	54.17	515	59.69	
405.0	ARF2_VFwd		5'-GCAGCATAAAGAGGCAGGCACA-3'	1,641-1662	22	forward	54.55	444	57.82	
ARF_2	ARF2_VRev	gi[533064162 gb GAH001044804.1	5'-CTTCAACACAACCAACGCAAGCA-3'	2,084-2,062	23	reverse	47.83	444	57.24	
ADE 20	ARF7c VFwd		5'-GCACAAAAGTCCACAAGCAAGGGA-3'	1,705-1,728	24	forward	50	466	58.3	
ARP_10	ARF7c_VRev	Bil222012002[Boll04H0010302031]	5'-CGAACAAGGAACCAAGAACAGCGA-3'	2,170-2,147	24	reverse	50	466	57.92	
ADE 10	ARF7d_VFwd		5'-TGCTTCCGATTGCCTCTCTCTCT-3'	23-45	23	forward	52.17	421	57.32	
ARF_/D	ARF7d_VRev	BI1222014095180104H001034584.11	5'-TGTGTCCCTCAACCTCTTTGTTCG-3'	443-420	24	reverse	50	421	57.07	
ADE JE	ARF7e_VFwd		5'-AGGCTTGTTGCTGGGGGATGCTTTT-3'	812-835	24	forward	50	854	59.58	
ARF_/E	ARF7e_VRev	BU222012240180104H00102202611	5'-AAATACGGCGAGGCAGAACTGTGA-3'	1665-1,642	24	reverse	50	854	58.71	
ADC 4	ARF1_VFwd		5'-ACCAAAGGAGATCCAGAGCAAGCA-3'	1,174-1,197	24	forward	50	372	58.08	
ARP_1	ARF1_Vrev	gi 533087585 gb GAH001021381.1	5'-GCAGCAGCATTATCACAACCACCA-3'	1,545-1,522	24	reverse	50	372	58.25	
100 30	ARE7f VFwd		5'-GGCACAATCCACGCAACAATCTCA-3'	2,096-2,119	24	forward	50	435	58.49	
ARF_/F	ARF7f_Vrev	gi 533090464 gb GAH001018502.1	5'-TCCTGTGTAACTGTGTTGCGTTGC-3'	2,530-2,507	24	reverse	50	435	58.39	
100.0	ARF7 VFwd	(19944551951) (1993) (1913) (19165) (1916)	5'-GCTEACCAGTGCCATTAAGA-3'	1,862-1881	20	forward	57.1	599	62.6	
ARF_7	ARF7_Vrev	BI1233031428 BD104H00101/2081	5'-CTTTCTCACCTCCCACTACAATAC-3'	2,460-2,437	24	reverse	57.1	599	62.4	
744.74	ARF17 VFwd		5'-TTCCGAGGTCAACCCAAAAGGCAT-3'	982-1.005	24	forward	50	755	58.8	
ARF_17	ARF17_Vrev	gi[533095360]gb[GAHU01013606.1]	5'-TGCTCATTTCCAACCGCCAAAGGT-3'	1,736-1,713	24	reverse	50	755	59.58	

Cuadro 3.2 Oligonucleótidos generados a partir de los 12 transcritos de cada subclado de ARF en Agave tequilana que se escogieron después del análisis filogenético.







Figura 3.6 Extracción de ARN de las 7 condiciones experimentales 1) tiempo cero (T_0) sin auxinas (S/R), 2) día 3 (T_3) en ausencia (S/R) y 3) presencia de AIA y 4) 2,4-D; y 5) día 21 (T_{21}) en ausencia (S/R) y 6) presencia de AIA y 7) 2,4-D. Se utilizó un marcados molecular de 100pb (M).

Posteriormente se hizo un PCR para ver la integridad de la amplificación de los oligonucleótidos diseñados y así poder escoger los que mejor amplifiquen y se encuentren en el tamaño esperado. De la amplificación se escogieron los genes: *ARF1, ARF2a, ARF5, ARF7a y ARF17*, por ser los genes que mejor amplificación (especificidad) en las 3 especies (Figuras 3.7 y 3.8).



Figura 3.7 Amplificación de los transcritos de *ARF7a*, *ARF5*, *ARF1*, *ARF2a*, *ARF17* y *UBQ11* en las tres especies de *Agave* spp. El marcador molecular (M) es de 1000 pb. Las bandas fueron cortadas y purificadas para mandar a secuenciar a CUGI de la especie *A. tequilana* Weber var. Azul. Para la secuenciación se utilizó el ADNc de la condición T_0 S/R de *A. tequilana*.

utilizaron para generar los oligonucleótidos y el nombre que se les asignó a cada uno (ARF1, Neighbor-joining con 100 bootstrap. En los recuadros rojos, se muestran las accesiones que se programa Geneious R7 usando el Modelo Tamura-Nei, Método de inferencia filogenética de Figura 3.8 Análisis filogenético de los 32 transcritos de los ARF en A. tequilana. Se usó ARF2a, ARF5, ARF7a y ARF17). 0



Para corroborar la identidad de los *ARF* a estudiar, las cinco secuencias se enviaron a secuenciar al Instituto de Genômica de la Universidad de Clemson (CUGI por sus siglas en inglés en EUA). Después de obtener los resultados de la secuenciación, se hicieron varios análisis bioinformáticos para verificar con que genes *ARF* previamente reportados tenían homología.

Los resultados obtenidos de la secuenciación fueron analizados por medio del programa Geneiuos[®] R7 (http://www.geneious.com/). Se analizaron los cromatogramas generados y se hizo una limpieza de las secuencias usando la herramienta del NCBI VecScreen, (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/vecscreen/), corroborando o rechazando los SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) presentes en los alineamientos así como descartando secuencias de mala calidad en los extremos de los fragmentos.

Para el gen ARF1, ARF2a, ARF5, ARF7a y ARF17, primeramente se hizo un analisis de homología usando el BLASTn de la secuencia de nucleótidos usando la herramienta BLAST (http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) del NCBI. Posteriormente, al presentar homología con genes ARF de diferentes especies de la base de datos del NCBI, se hizo la traducción de la secuencia de nucleótidos a aminoácidos con la herramienta ExPASy (http://www.expasy.org/) del Portal de Recursos Bioinformáticos (SIB por sus siglas en inglés) y al mismo tiempo el programa genera los 6 (+1, +2, +3, -1, -2 y -3) posibles marcos abiertos de lectura (ORFs) de las 5 secuencias de Agave. De los marcos abiertos de lectura encontrados, se tomó aquella secuencia de aminoácidos que no tuviera codones de paro dentro del posible ORF mostrado por el programa. Ya conociendo la secuencia de aminoácidos y el marco abierto de lectura de los transcritos de A. tequilana reportados por Gross et al., (2013), se hizo un alineamiento de las secuencias obtenidas de Agave en esta tesis; de las cuales se diseñaron los oligonucleótidos y estos se alinearon con la secuencia de aminoácidos obtenida: utilizó el CLUSTAL W se software en línea (http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)(Thompson et al., 1994) para tal fin, todo esto para corroborar que región de la proteina se había amplificado con el oligonucleótido de los cinco ARF (Figuras 3.9 - 3.11). Sin embargo, el fragmento que se envió a secuenciar del gen ARF2a, no tuvo ninguna homología con ningún ARF reportado con A. tequilana u otras especies hasta el momento, por tal motivo se descartó de los siguientes experimentos.

JS_ARF1 VC_ARF1	MRGETGGLSVGVRRLARQQSTMPSSVISSQSMHLGVLATASHAVSTLTLFTVYYKPRTSQ	60
JS_ARF1 VC_ARF1	FILGVNKYLEAVNNRFMVGTRFKMRFEGEDVPEKRFTGTITGIGDISAQWIGSKWRSLNV	120
JS_ARF1 VC_ARF1	QWDEPANIQRPERVSPWEIEPFSASAPIPNVSQLLPLKNKRARSAIDLSSLSREDATSGS	180
JS_ARF1 VC_ARF1	WYPGATWSQESTNTSSTEVLNCEMKGVWTRRLLETTGNGSASFLDSPNSCSARVSDVWSI	240
JS_ARF1 VC_ARF1	DIHSPMKSSSSAVDDVSLKLFQEREGVTKATLGSGADEPPSKLGNISERWKKPDGSTGCR	300
JS_ARF1 VC_ARF1	LFGIDLISHSSSIYPVHAPISDSTDPFPAAATMKDSEQQSEISKVSKKEKPGLQVSPKEI	360
JS_ARF1 VC_ARF1	QSKQNSSTRSRAKVHMQGIAVGRAIDLAALEGYEELITELEEMFEIKGELQHRTKWEMVF 	420 45
JS_ARF1 VC_ARF1	TDDEGDMMLVGDDFWPEFCKMAKKIFIYPSEEVKKMRPDSKFPSCAEDGGSCGGCDNAAA SEDEGXMMLVGDDPWFEFCXMATKSFIFPDDFAFXXKFDNLLLSG	480 90
JS_ARF1 VC_ARF1	SLVKEP 486 PFYXGP 96	

Figura 3.9 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de ARF1 con el programa en línea ExPASy, contra la secuencia reportada de *A. tequilana* (Gross *et al.*, 2013). El asterisco (*) significa identidad entre las dos secuencias de aminoácidos.

ARF5JuneSimpson VC_ARF5_COGI	MEVPGANGFSANSAEGERKTINSELWHACACPLVSLPPVGSLVVYFPQGHSEQVAASHHK	60
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	EIDSIPSYPSLPSKLICVLLSVILBADGEIDEVYAQMILQPVNKYDRDALLASENGLKQN	120
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUCI	XQPAEFFCXTLTASDTSTHOGFSVPRPAAEXIFPPLDFSMQPPAQELGAXDLHDASWTFR	180
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	HIYRGGPKRHLLTTGKEVFVSTKRLFACDSVLFILDEKSGLLLGIRRANRGGPALASSVL	240
ARFSJuncSimpson VC_ARFS_CUCI	SEDEMHIGILAAAAHAAANNSPETIFYNPRASPSEFVVPLAXYNXAMYTQVSLGNRFRMM	300
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	PETEDSGVRRYNGTITGISDLDPHRWKNSGWRNLGVGWDESTTTERRTRVSLWEIEPVTT	360
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	PFYICPPPFFRPKPPKQPGMPDDGSDVETAFKRAMPWLNDDFGMKGNQSSFFPGLSLVQW	420
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	MAMQQNPQLVPSTSQPSYIPSISQSGIQDSLCNDSTSRILSFQSQTSLFPNLQFPQKQQT	480
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	QQLDQPQQLPISWPQQQQQQQQSSIHLLQQQQQHQXXQPQEPQQQHQQHQQQQNSVLLLQ	540
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	QQQQQQQLRRAVSEEVIDQXQHQSFNXQVISQSQLQNQNMQVPPYLNSPPVLPXPSTQLQ HQVPPyLNSPPVLPXPSTQLQ	600 21
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_COGI	QPESQANPISPQPSVSPQVPQF00000000000LQLQLQQ0000PPPSQLLP8SQPQLC QPESQANPISPQPSVSPQVFQF000000000CQLQLQQ0000PPPSQLLP8SQPQLC	660 81
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	QQIPANNIAGHQKPQLLARAHSNLTEIDAPSCSTSASPPSLPNRIQEDEVVRPVDSLLQE QQIPANNIAGHQKPQLLARAHSNLTEIDAPSCSTSASPPX	720 121
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	FQTXPEARLXHETRESDBLDASSATSFCLDGRAMECFPFPPVCLDSDVQVGGVSSDGLLP	780
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	DVMMSRGFFGNQRDVETQISTTTIGSFGVPDMAFRPGCSNDAAWNENGFLSRGINANQPQ	840
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_COGI	RMRTYTRVQKRGSVGRSIDVTRYRGYDDLRHDLARMFGIEGQLEDPHRTDWKLVYVDHEN	900
ARF5JuneSimpson VC_ARF5_CUGI	DILLVGDDPHEEFVTCVQSIKILSAAEVQQISLNGELVGVPVQNQQYDDNSAASFHR 95	7

Figura 3.10 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de aminoácidos de ARF5 con el programa en línea ExPASy, contra la secuencia (reportada por Gross *et* al., 2013) del transcrito de donde fueron diseñados los oligonucleótidos. El asterisco (*) significa identidad entre las dos secuencias de aminoácidos.

ARF7a_JuneSimpson VC_ARF7a_CUGI	MASGSSSTILNEMRPLGEVOGNPGGRKVLNSELWYACAGPLVSLPQPGSLVYYFPQGHSE	60
ARF7a_JuneSimpson VC_ARF7a_CUGI	QVTASTRKISNSHIPNYPTLPSQLLCQVHSVTLHADRDTDEIYAQMTLQPVNSEGDVFLI	120
ARF7a_JuneSimpson VC_ARF7a_CUGI	PNFGHASKQPNEFFCKNLTASDTSTHGGFSVPRRAAEKLFPQLDYSVQPPNQELIVRDLH	180
ARF7a_JuneSimpson	DNVWTFRHIYRGQPKRHLLTTGWSLFVGTKRLKAGDSVLFIRDEKSQLRLGMRRANRQQT	240
VC_ARF7a_CUGI	-MRRANRQQT	9
ARF7a_JuneSimpson	TLPSSVLSTDSMHIGVLAAAAHAAASRSPFTIYYNPRACPSEFIIPLAKYHKAVYTQVSI	300
VC_ARF7a_CUGI	TLPSSVLSTDSMHIGVLAAAAHAAASRSPFTIYYNPRACPSEFIIPLAKYHKAVYTQVSI	69
ARF7a_JuneSimpson	GMRFGMMFETEESTKCRYTGTIIGISDYDPLRWPNSKWRNLQVEWDEHGYGERPDRISLW	360
VC_ARF7a_CUGI	GMRFGMMFETEESTKCRYTGTIIGISDYEPLRWPNSKWRNLQVEWDEHGYGERPDRISLW	129
ARF7a_JuneSimpson	EFETPENLFVFPTPSLKRQCLPGYMVPGAETGFRNVKPLPQALENGAGNMHPIISGVGSD	420
VC_ARF7a_CUGI	EIETPENLFVFPTPSLKRQCLPGYMVPGAETGFRNVKPLPQA	171
ARF7a_JuneSimpson	QLLKMLLTSQNLSPDNQFICHQSIYASILQKIRG 454	

Figura 3.11 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de ARF7a con el programa en línea ExPASy, contra la secuencia (reportada por Gross *et al.*, 2013) del transcrito de donde fueron diseñados los oligonucleótidos. El asterisco (*) significa identidad entre las dos secuencias de aminoácidos.

JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	MNSSVSLGEQDQEGGEKRCLNSELWHACAGPLVCLPTLGTRVVYFPQGHSEQVAASTNKE	60
JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	VEGHIPNYPNLPPOLICOLHNVTMHADVETDEVYAOMTLOPLSPKEOKDTYIPIEMGTAS	120
JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	KQPTNYFCKTLTASDTSTHGGFSVPRRAAEKVFPPLDFTQQPPAQELIAWDIHDVEWKFR	180
JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	HIFRGOPKRHLLTTGWSVFVSAKRLVAGDSVIFIWNEKNOLLLGIRRASRPOTIMPSSVL MPSSVL ******	240 6
JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	SSDSMHIGLLAAAAHAAATNSRFTIFYNPRACPSEFVIPLSRYVKAVYHTRVSVGMRFRM SSDSMHIGLLAAAAHAAATNSRFTIFYNPRACPSEFVIPLSRYVKAVYHTRVSVGMRFRM	300 66
JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	LFETEESSVRRYMGTITGIGDLDPVRWPNSQWRSVKVGWDESTAGDRQPRVSLWEIEPLI LFETEESSVRRYMGTITGIGDLDPVRWPNSQWRSVKVGWDESTAGDRQPRVSLWEIEPLI	360 126
JE_ARF17 VC_ARF17_CUGI	TFPMYPSLFPLRLKRPWHPGRPFPPESMEDECNAFMWLRGDARERGLHSLNYQSLGMSPW TFPMYPSLFPLRLKRPWHPGRPFPPESMEDECNAFMWLRGDARERGLHSLNYQSLGMSPW	420 186
JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	IQORLEPLAVGNEHDQYQVMSAAALQDIRGGVFLKQQLLHYQQPLQFLQQSGITSPLLQQ IQORLEPLAVGK	480 198
JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	OFIQ0IDPOOIICSOPOSISENHNVLTOOLOOPCNEORKOOAQEIONYAOMFPFONNYLO	540
JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	QQKSSVPSQLSQNLVFPDSGSNFSSVLTPNCVQSILSDNQPDKRAIVLNLSRGGQPISEQ	600
JS_ARF17 VC_ARF17_CUGI	NRQPWEPKLTMSQVTPLGSTVLLQSPPEKDGSVEADNCTVDTQNHNIFGANIDSSSLLSN	660
JS_ARF17 VC ARF17 CUGI	GVPNLSASAFETNVSPAPYAA 681	

Figura 3.12 Alineamiento de la secuencia de aminoácidos de la secuencia de ARF17 con el programa en línea ExPASy, contra la secuencia (reportada por Gross *et al.*, 2013) del transcrito de donde fueron diseñados los oligonucleótidos. El asterisco (*) significa identidad entre las 2 secuencias de aminoácidos.

Para el gen *ARF1* se obtuvo una identidad del 71 % con *ARF9* de *Vitis vinifera*, 67 % con *ARF9* de *Glycine max* y 67 % con *ARF9* de *Fragaria vesca*. En el caso de *ARF5*, se obtuvo una identidad de 63 % con *ARF19 Vitis vinifera*, 61 % con *ARF5* de *Camellia sinensis*. *ARF7a* obtuvo un identidad del 75 % con *ARF11* de *Brachypodium distachyon*, 72 % con *ARF11* de *Oryza brachyantha*, 70 % con *ARF 11* de *Triticum urartu* y para *ARF17*, se obtuvo una identidad de 83 % con *ARF8* de *Theobroma*

cacao, 81 % con ARF8 de Vitis vinifera, 81 % con ARF8 de Illicium parviflorum, 81 % con ARF8 de Cucumis sativus y 79 % con ARF8 de Glycine max (Cuadro 3.3).

Cuadro 3.3 Resultado del análisis bioinformático a partir de los resultados del National Center for Biotechnology Information (NCBI) de las secuencias ARFs de *A. tequilana* que se secuenciaron.

Nombre	Homología/ especie	Query Cover (%)	E Value	% Identidad	No. Accesión	Dominio
ARF1	ARF9 V. vinifera	75	1e-26	71	XP_002265162	AUX/IAA
ARF2a	Cholobium lumicola DMS-245	13	1e-7	86	CP001097.1	÷
ARF5	ARF19 V. vinifera	28	0.003	63	XP_002276637. 1	÷
ARF7a	ARF11 B. distachyon	98	1e-76	75	XP_003379438, 1	Auxin_resp Superfamily
ARF17	ARF8 V. vinifera	100	7 e-105	81	XP_002266678. 2	Auxin_resp Superfamily

Para realizar el análisis comparativo de la filogénia de los transcritos de *ARF* de *A*. *tequilana* (Gross *et al.*, 2013) junto con otros ARFs reportados se obtuvieron los números de accesión y se obtuvieron del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nlh.gov/) las secuencias de *A. thaliana* (Gullfoyle y Hagen, 2007), *O. sativa* (Wang *et al.*, 2007), *Solanum lycopersicum* (Wu *et al.*, 2011), *Cucumis sativus* (Liu y Hu, 2013), *V. vinifera* (Wan *et al.*, 2014) y *Z. mays* (Xing *et al.*, 2011).

Se decidió utilizar el algoritmo MUSCLE para el alineamiento de las secuencias de aminoácidos de los genes ARF de *A. thaliana* (23 ARFs), *O. sativa* (25 ARFs), *S. lycopersicum* (19 ARFs), *C. sativus* (15 ARFs), *V. vinifera* (19 ARFs), *Z. Mays* (31 ARFs) y *A. tequilana* (32 ARFs), ya que este permite hacer un alineamiento se secuencias de tamaño variable local y global. Para el alineamiento se utilizó el software MEGA v.6.0 (http://www.megasoftware.net/) la cual es una herramienta

integrada para llevar a cabo la alineación de secuencias, inferir árboles filogenéticos, bases de datos, las tasas de estimación de la evolución molecular, inferir secuencias ancestrales, y las pruebas de hipótesis evolutivas (Tamura *et al.*, 2011). Posteriormente se realizó la búsqueda del mejor modelo evolutivo, utilizando el software libre ProtTest3 (https://code.google.com/p/prottest3/) (Darriba *et al.*, 2011). Con base en los resultados de la búsqueda del mejor modelo se decidió utilizar el Jones-Taylor-Thomson JTT+G (con una distribución Gamma de 0.5) y un número de categorías discretas de 4 para realizar el árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud (Maximum likelihood); el programa vuelve a recalcular los datos e infiere un número cercano al Gamma que nos reporta el análisis del mejor modelo. Se decidió realizar el árbol, con una prueba de filogenia usando el método de Bootstrap con un valor de 100 con el software libre PhyML 3.0[©] (http://www.atgc-montpellier.fr/phyml) (Guindon *et al.*, 2010; Guindon y Gascuel, 2003) (Figura 3.13) en el cual se puede observar que se forman 3 clados principalmente, dentro de los cuales se encuentran los 31 transcritos de *A. tequilana*.



Figura 3.13 El análisis molecular filogenético con el método de máxima verosimilitud (Maximun likelihood). La historia evolutiva se dedujo utilizando el método de máxima verosimilitud basado en el modelo de matriz JTT (Jones *et al.*, 1992) con una Gamma de 0.71, usando el software libre PhyML 3.0[©]. En círculos de color azul se marcan los 31 transcritos de *A. tequilana* reportados por Gross *et al.*, 2013 y en color rojo los 5 ARFs con los que se trabajo. El porcentaje de árboles en que están agrupados los taxones se muestran junto a las ramas. El árbol inicial (s) para la búsqueda heurística se obtiene de forma automática mediante la aplicación de algoritmos Neighbor-Join y BioNJ en una matriz de distancias estimadas mediante un modelo de JTT, y luego seleccionar la topología de valor diario de probabilidad superior. Una distribución gamma discreta se utilizó para modelar las diferencias de tipo evolutivas entre sitios (4 categorias + G, parámetro = 0.710)). El árbol está dibujado a escala, las longitudes de las ramas se miden en el número de sustituciones por sitio. Se analizaron 160 secuencias de aminoácidos.

En el análisis filogenético se encontró que ARF1 se agrupó principalmente con ARF1 de *O. sativa* y ARF7 de *Z.mays* y ARF11 y 18 de *A. thaliana*. Para ARF2a se observó que se agrupo con ARF17, 19, 21 y 22 de *Z. Mays* y ARF18 de *O. sativa*. Para ARF5, se agrupo en el mismo clado con ARF27 de *Z. Mays*, ARF7 de *S. lycopersicum* y ARF7 y 19 de *A. thaliana*. Para ARF7a se observó que se agrupo con ARF11 de *O. sativa* y ARF4 y 29 de *Z. Mays*. ARF17 se agrupo con ARF8 y ARF12 de *O. sativa* y ARF3 y 30 de *Z. mays*. Estos resultados eran de esperarse ya que *O. sativa* y *Z. mays* son monocotiledóneas al igual que *Agave*.

3.4. DISCUSIÓN

El análisis de la evolución de los genes *ARF* es muy importante para el entendimiento que tienen en la señalización de las auxinas en la evolución de las plantas terrestres. Sin embargo, la familia de los genes *ARF* es muy grande y presentan redundancia funcional entre ellas lo que hace complicado entender su evolución y en consecuencia su posible función. Finet *et al.* (2013) reportaron que los resultados de una análisis filogenético de genes *ARF* de diferentes especies como *Arabidopsis thaliana, Brachypodium distachyon, Carica papaya, Citrus clementina, Cucumis sativus, Eucalyptus grandis, Glycine max, Manihot. esculenta, Medicago truncatula, Mimulus guttatus, Oryza sativa, Populus trichocarpa, Physcomitrella patens, Prunus persica, Ricinus communis, Selaginella moellendorffii, Setaria italica, Sorghum bicolor, Vitis vinifera y Zea mays* se agruparon en tres clados que podrian remontarse al origen de las plantas terrestres y que eventos repetidos de duplicación de genes contribuyeron a la expansión de las 3 subfamilias originales; este mismo resultado se obtuvo en el análisis filogenético (Figura 3.2) donde claramente se observa como se dividieron en 3 clados principales los 32 transcritos de *ARF*.

En el análisis filogenético se encontró que ARF1 se agrupó principalmente con ARF1 de *O. sativa* y ARF7 de *Z. mays* y ARF11 y 18 de *A. thaliana* (Figura 3.13). Para ARF2a se observó que se agrupó con ARF17, 19, 21 y 22 de *Z. mays* y ARF18 de *O. sativa*. Para ARF5, se agrupo en el mismo clado con ARF27 de *Z. mays*, ARF7 de *S. lycopersicum* y ARF7 y 19 de *A. thaliana*. Para ARF7a se observó que se agrupo con ARF11 de *O. sativa* y ARF4 y 29 de *Z. mays*. ARF17 se agrupó con ARF8 y ARF12 de *O. sativa* y ARF3 y 30 de *Z. mays*.

Este arreglo en la filogénia de los *ARF* es resultado de una amplia duplicación de genes y el reordenamiento de los dominios, especialmente por eventos de truncamiento genómico y splicing alternativo (Kopelman *et al.*, 2005; Su *et al.*, 2006) en el proceso de evolución de las plantas y esto ha contribuido a la expansión de estos 3 clados y consecuentemente a modificar el número de genes *ARF* en diferentes especies (Finet *et al.*, 2012; Zhang *et al.*, 2012). La pérdida de alguno de los cuatro dominios que caracterizan a los *ARF* ha promovido cambios funcionales dentro de la familia *ARF*, mediante la interrupción de eventos de dimerización o de unión al ADN. De igual forma, los resultados presentados aquí en el número de genes *ARF*

esperados en *A. tequilana* es aproximadamente de 23 genes transcripcionalmente activos, lo cual esta dentro del rango de genes *ARF* reportados para las monocotiledoneas (Finet *et al.*, 2013).

De un trabajo reportado por Gross *et al.* (2013) en el transcriptoma de *A. tequilana* se pudieron encontrar 32 transcritos, a los cuales se le hizo un análisis de dominios (Figura 3.3), donde se observaron que 9 transcritos no contenían el dominio de unión al ADN (dominio B3), esos 9 fueron considerados pseudo genes (genes sin función) en base al criterio reportado por Zhang *et al.*, (2012), quienes consideran que secuencias de *ARF* de *B. rapa* que no contienen al domino B3 son considerados como genes con perdida de función.

Con base en los resultados de identidad contra otras secuencias *ARF* en la base de datos del NCBI y después del alineamiento múltiple usando el algoritmo MUSCLE (Edgar, 2004) que se les hízo a las secuencias que se aislaron de los transcritos reportados por Gross *et al.*, 2013, se decidió llamarlos de la siguiente manera: ARF1 (9-like), *ARF5* (19-like), *ARF7a* (11-like) y *ARF17* (Figura 3.4). Cabe señalar que los resultados dieron homología en su mayoria con genes *ARF* de *V.* vinífera, donde Wan *et al.*, 2014 reportaron 19 *ARFs* transcripcionalmente activos (Cuadro 3.2). Sin embargo, en el análisis filogenético más amplio donde se usaron 7 especies diferentes: 15 *ARFs* en *C. sativus* (Liu y Hu, 2013), 19 en *V. vinífera* (Wan *et al.*, 2014), 21 en *S. lycopersicum* (Wu *et al.*, 2011), 23 en *A. thaliana* (Guilfoyle y Hagen, 2007), 25 en *O. sativa* (Wang *et al.*, 2007), 31 en *P. trichocarpa* (Kalluri *et al.*, 2007) y 35 en *Z. mays* (Liu *et al.*, 2011), los genes *ARF* de la presente tesis se agruparon en su mayoria con genes *ARF* 1, *5*, 7, y 17 se tiene contemplado realizar la técnica del Rapid Amplifications of cDNA (RACE) para mapear el gen completo.

3.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abel, S. y Theologis, A. (1996). Early genes and auxin action. Plant Physiology. 111: 9-17.
- Abel, S., Oeller P.W. y Theologis A. (1994). Early auxin-induced genes encode shortlived nuclear proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 91; 326-330.
- Darriba, D., Taboada, G. L., Doallo, R. y Posada, D. (2011). ProtTest 3: fast selection of best-fit models of protein evolution. Bioinformatics, 27 (8): 1164-1165.
- Dharmasiri, N. y Estelle, M. (2004). Auxin signaling and regulated protein degradation. Trends in plant science, 9(6), 302-308.
- de Jong, M., Mariani, C. y Vriezen, W.H. (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. Journal of Experimental Botany, 60 (5): 1523-1532.
- De-la-Pena, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J., Lopez-Torres, A., Wrobel, K., y Robert-Diaz, M. (2012). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in Agave spp. BMC Plant Biology, 12(1), 203.
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. Nucleic Acids Research, 32(5), 1792-1797.
- Finet, C., Berne-Dedieu, A., Scutt, C. P. y Marlétaz, F. (2013). Evolution of the ARF Gene Family in Land Plants: Old Domains, New Tricks. Molecular Biology and Evolution, 30(1), 45-56.
- Goetz, M., Hooper, L.C., Johnson, S.D., Rodrigues, J.C.M., Vivian-Smith, A. y Koltunow, A.M. (2007). Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. Plant Physiology, 145(2), 351-366.
- Gray, W.M., Kepinski, S., Rouse, D., Leyser, O. y Estelle, M. (2001). Auxin regulates SCFTIR1-dependent degradation of AUX/IAA proteins. Nature, 414, 271–276.
- Gross, S., Martin, J., Simpson, J., Abraham-Juarez, M., Wang, Z. y Visel, A. (2013). *De* novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave tequilana*. BMC Genomics, 14(1), 563.
- Guilfoyle, T.J., y Hagen, G. (2007). Auxin response factors. Current Opinion in Plant Biology, 10(5), 453-460.

Guindon, S., Dufayard, J.-F., Lefort, V., Anisimova, M., Hordijk, W. y Gascuel, O.

(2010). New algorithms and methods to estimate Maximum-Likelihood phylogenies: assessing the performance of PhyML 3.0. Systematic Biology, 59(3), 307-321.

- Guindon, S. y Gascuel, O. (2003). A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximun likelihood. Systematic Biology, 52(5): 696-704.
- Guillon, F., Philippe, S., Bouchet, B., Devaux, M. F., Frasse, P., Jones, B., Bouzayen, M. y Lahaye, M. (2008). Down-regulation of an Auxin Response Factor in the tomato induces modification of fine pectin structure and tissue architecture. Journal of Experimental Botany, 59(2), 273-288.
- Guilfoyle, T.J. y Hagen, G. (2007). Auxin response factors. Current Opinion in Plant Biology, 10(5), 453-460.
- Hagen, G. y Guilfoyle, T. (2002). Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. Plant Molecular Biology, 49(3-4), 373-385.
- Hamann, T., Benkova, E., Bäurle, I., Kientz, M. y Jürgens, G. (2002). The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROSmediated embryo patterning. Genes & Development, 16(13), 1610–1615.
- Jones D.T., Taylor W.R. y Thornton J.M. (1992). The rapid generation of mutation data matrices from protein sequences. Computer Applications in the Biosciences, 8: 275-282.
- Kalluri, U., DiFazio, S., Brunner, A. y Tuskan, G. (2007). Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in Populus trichocarpa. BMC Plant Biology, 7(1), 59.
- Kopelman, N.M., Lancet, D. y Yanai, I. (2005). Alternative splicing and gene duplication are inversely correlated evolutionary mechanisms. Nature Genetics, 37(6), 588-589.
- Li, J., Dai, X. y Zhao, Y. (2006). A Role for Auxin Response Factor 19 in auxin and ethylene signaling in Arabidopsis. Plant Physiology, 140(3), 899-908.
- Lim, P.O., Lee, I.C., Kim, J., Kim, H.J., Ryu, J.S., Woo, H.R. y Nam, H. G. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. Journal of Experimental Botany, 61(5): 1419-1430.
- Liu, S.Q. y Hu, H.F. (2013). Genome-wide analysis of the auxin response factor gene family in cucumber. Genetics and Molecular Research, 12(4): 4317-4331.
- Llu, Y., Jiang, H., Chen, W., Qian, Y., Ma, Q., Cheng, B. y Zhu, S. (2011). Genomewide analysis of the auxin response factor (ARF) gene family in maize (Zea

mays). Plant Growth Regulation, 63(3), 225-234.

- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D. y Maizel, A. (2010). miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. Plant Cell, 22(4), 1104-1117.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A. y Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of *LBD/ASL* genes in Arabidopsis. Plant Cell, 19(1), 118–130..
- Ouellet, F., Overvoorde, P.J. y Theologis, A. (2001). IAA17/AXR3: biochemical insight into an auxin mutant phenotype. Plant Cell, *13*(4), 829-841.
- Serino, G. y Deng, X.W. (2003). The COP9 signalosome: regulating plant development through the control of proteolysis. Annual Review of Plant Biology. 54, 165–182.
- Shin, R., Burch, A.Y., Huppert, K.A., Tiwari, S. B., Murphy, A.S., Guilfoyle, T.J. y Schachtman, D.P. (2007). The Arabidopsis transcription factor MYB77 modulates auxin signal transduction. Plant Cell, 19(8), 2440-2453.
- Su, Z., Wang, J., Yu, J., Huang, X. y Gu, X. (2006). Evolution of alternative splicing after gene duplication. Genome Research, 16(2), 182-189.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., y Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum-Likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Molecular Biology and Evolution, 28: 2731-2739.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M., Liscum, E. y Yamamoto, K.T. (2004). MASSUGU2 encodes Aux/IAA19, an auxinregulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in Arabidopsis thaliana. Plant Cell, 16(2), 379-393
- Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J. (1994). CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research, 22: 4673–4680.
- Tiwari, S.B., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. Plant Cell. 15:533-543.
- Tiwari, S.B., Wang, X.J., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (2001). AUX/IAA proteins are active repressors, and their stability and activity are modulated by auxin. Plant

Cell, 13(12), 2809-2822.

- Ulmasov, T., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1999). Dimerization and DNA binding of auxin response factors. The Plant Journal, 19:309–319.
- Ulmasov, T., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1997)a. ARF1, a transcription factor that binds to auxin response elements. Science, 276:1865–1868.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1997)b. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements, Plant Cell, 9: 1963–1971.
- Vert, G., Walcher, C.L., Chory, J. y Nemhauser, J.L. (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(28), 9829-9834.
- Wan, S., Li, W., Zhu, Y., Liu, Z., Huang, W. y Zhan, J. (2014). Genome-wide identification, characterization and expression analysis of the auxin response factor gene family in *Vitis vinifera*. Plant Cell Reports. 1-11.
- Wang, D., Pei, K., Fu, Y., Sun, Z., Li, S., Liu, H., Tang, K., Han, B. Y Tao, Y. (2007). Genome-wide analysis of the auxin response factors (*ARF*) gene family in rice (*Oryza sativa*). Gene, 394(1–2), 13-24.
- Weijers, D., Schlereth, A., Ehrismann, J.S., Schwank, G., Kientz, M. y Jürgens, G. (2006). Auxin triggers transient local signaling for cell specification in Arabidopsis embryogenesis. Developmental Cell, 10(2), 265-270.
- Wilmoth, J.C., Wang, S., Tiwari, S.B., Joshi, A.D., Hagen, G., Guilfoyle, T. J., Alonso, J.M, Ecker, J.R. y Reed, J.W. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. The Plant Journal, 43(1), 118-130.
- Wu, J., Wang, F., Cheng, L., Kong, F., Peng, Z., Liu, S., Yu, X. y Lu, G. (2011). Identification, isolation and expression analysis of auxin response factor (ARF) genes in *Solanum lycopersicum*. Plant Cell Reports, 30(11), 2059-2073.
- Xing, H., Pudake, R., Guo, G., Xing, G., Hu, Z., Zhang, Y., Sun, Q. y Ni, Z. (2011). Genome-wide identification and expression profiling of auxin response factor (ARF) gene family in maize. BMC Genomics, 12(1), 178.
- Yoon, E.K., Yang, J.H., Lim, J., Kim, S.H., Kim, S.-K. y Lee, W.S. (2010). Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in Arabidopsis lateral root development. Nucleic Acids Research,

38(4), 1382-1391.

Zhang, T., Li, R.-c., Zhao, J.-h., Zheng, X.-m., Yuan, Z.-h. y Yang, C.-y. (2012). Bioinformatic analysis of Auxin Response Factor (ARF) gene family in Rape. 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. pags. 86-89.



CAPÍTULO IV

ANÁLISIS EN LA EXPRESIÓN DE LOS GENES ARF EN Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem., A. tequilana Weber var. Azul, EN PRESENCIA DE AIA, 2,4-D Y SIN AUXINAS

4.1 INTRODUCCIÓN

La señalización de auxinas es clave para el crecimiento y desarrollo de las plantas desde la embriogénesis hasta la senectud (Petrášek y Friml, 2009). Los efectos de las auxinas dependen de su síntesis, transporte, percepción y señalización, ya que la mayor parte de estas funciones están controladas por genes con diferente especificidad celular (Kieffer et al., 2010; Ulmasov et al., 1995). Las auxinas aumentan la transcripción de varios genes tempranos, como por ejemplo: los genes Auxinas/ácido-indol-3-acético (Aux/AIA), Gretchen Hagen 3 (GH3) y los SMALL AUXIN UP RNA (SAUR) que regulan la fisiología de las plantas; modulando la interacción de los factores de transcripción con los elementos de respuesta a auxinas (AuxREs) (Ulmasov et al., 1999a; Abel y Theologis, 1996; Abel et al., 1994). Se conocen varios procesos que ocurren minutos después de la aplicación de auxinas en tejidos vegetales; estos varían desde rápidos cambios en la actividad enzimática (Morre et al., 2003; Droog et al., 1995; Bilang y Sturm 1995), la expresión génica (Guilfoyle et al., 1998; Abel y Theologis, 1996), cambios en las actividades de transportadores, lo que lleva a la acidificación de la pared celular (Grebe, 2005), un rápido aumento en el potencial de membrana (Karcz y Burdach, 2002) y/o los niveles de calcio citosólico (Gehring et al., 1990).

La respuesta de las plantas a las auxinas, implica a las proteínas Aux/AIA, que se unen a los *ARF* (Guilfoyle y Hagen, 2007; Dharmasiri y Estelle, 2004; Remington *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2004; Tiwari *et al.*, 2001; Ulmasov *et al.*, 1997b). Posteriormente los Aux/AIA son objeto de proteólisis por la Ubiquitina (Ubq), mientras que los ARFs ayudan a regular la transcripción de genes río abajo (*GH3*, *SAUR*).Se han hecho esfuerzos para conocer mejor de manera individual la importancia de los ARF y los Aux/AIA en los procesos dependientes de auxina. Teale *et al.*, (2006) y Weijers *et al.*, (2005), reportan un alto grado de especificidad funcional entre los ARF y los Aux/AIA sugiriendo que existe una

Capítulo IV

relación tejido-específica.

En *A. thaliana*, los ARF y Aux/AIA codifican para 23 y 29 genes, respectivamente (Okushima *et al.*, 2005; Remington *et al.*, 2004; Guilfoyle y Hagen 2001; Liscum y Reed, 2002). Los *ARF*, son genes de respuesta a las auxinas y pueden clasificarse ya sea como activadores o represores de la transcripción de genes de respuesta a auxinas (Guilfoyle y Hagen, 2007; Ulmasov *et al.*, 1999a; Ulmasov *et al.*, 1999b) ya que juegan un papel importante en el desarrollo de las plantas regulando la expresión de los genes de respuesta a auxinas (Chapman y Estelle, 2009; Tiwari *et al.*, 2003; Guilfoyle y Hagen, 2007). Se les ha relacionado en el crecimiento de raíces laterales (Marín *et al.*, 2010; Okushima *et al.*, 2007; Tatematsu *et al.*, 2004), la embriogénesis (Weijers *et al.*, 2005; Hamann *et al.*, 2002), la expansión de las hojas (Wilmoth *et al.*, 2005), la senescencia (Lim *et al.*, 2010), desarrollo del fruto (de Jong *et al.*, 2009; Guillon *et al.*, 2008; Goetz *et al.*, 2007), y en respuesta a otros RCV, como por ejemplo al etileno (Li *et al.*, 2006), a los brasinoesteróides (Vert *et al.*, 2008) y al ácido abscísico (Yoon *et al.*, 2010).

Se han reportados diferentes fenotipos mutantes de los *ARF*, como por ejemplo *ARF3/ETTIN* el cual se ha asociado con el desarrollo del gineceo (Sessions *et al.*, 1997), *ARF5/MONOPTEROS* con la embriogénesis temprana y el desarrollo vascular (Hardtke y Berleth, 1998), *ARF7/NON PHOTOTROPIC-HYPOCOTYL4* con las respuestas de crecimiento diferenciales en tejidos aéreos (Liscum y Reed, 2002; Liscum y Briggs, 1995) y *ARF8/FRUIT WITHOUT-FERTILIZATION* con la iniciación de la formación de los frutos (Goetz *et al.*, 2006). De igual manera se ha demostrado en ensayos de doble híbrido en levadura que combinaciones específicas entre ARF y Aux/IAA dan una mejor interacción (Kim *et al.*, 1997; Hardtke *et al.*, 2004). De la misma forma se ha reportado que *ARF19, ARF4* y *ARF16* en *A. thaliana* presentan una expresión diferencial en función de la concentración (0.1, 1, 5 y 10 µM) y el tiempo de exposición (30 min, 1 y 3 hrs) a la auxina AIA y se encontró que *ARF19* y *ARF16* se expresaban mayormente a elevadas concentraciones de auxinas y su expresión aumentaba con respecto al tiempo (Paponov *et al.*, 2008).

Con lo anteriormente mencionado, en este trabajo se pretendío conocer la expresión de los genes *ARF* en *A. angustifolia* Haw., *A. forucroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul expuestas a diferentes auxinas una natural (AIA) y una sintética (2,4-D) a los 0, 3 y 21 días.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

Habiendo corroborado que las amplificaciones obtenidas con los diferentes ARF (1, 2a, 5, 7a y 17) tenían homología con genes ARF de la base de datos del del NCBI (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), se procedió a realizar el análisis de expresión de éstos cinco genes y Ubiquitina (UBQ11), gen constitutivo usado como testigo interno (De-la-Peña *et al.*, 2012).

4.2.1 Material vegetal

El material vegetal utilizado para este trabajo consistió en hojas de *Agave* de las especies *A. angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul, las cuales fueron expuestas a dos diferentes tipos de auxinas (AIA y 2,4-D) a una concentración de 0.5 µM y sin auxinas. Las muestras fueron evaluadas a los 0 (T₀), 3 (T₃) y 21 (T₂₁) días. Las muestras de cada condición fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su posterior uso en la extracción de ácidos nucleicos.

4.2.2. Extracción de ARN

Se pesó entre 0.3 y 0.5 g de tejido de hoja de las especies *A. angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul y fueron macerados en un mortero con nitrógeno líquido. El tejido pulverizado se colocó en un tubo eppendorf de 2 ml y se agregó 1 ml de Tripure Isolation Reagent (TRI). La muestra se homogenizó y se dejó reposar por 5 min a temperatura ambiente. Se añadieron a cada muestra 100 µl de bromocloropropano y se homogenizó con un vortex. La muestra se dejó reposar por 15 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,500 rpm por 15 min a 4 °C. Después de la centrifugación, se separó la fase acuosa (conteniendo al ARN) y se pasó a un tubo eppendorf limpio al cual se le agregó 500 µl de isopropanol y se agitó ligeramente. Seguido de esto, la muestra se dejó reposar por 10 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 13,500 rpm por 8 min a 4 °C. La pastilla se lavó con 1 ml de etanol frio (70 %) y se centrifugó a 8,500 rpm por 5 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente por 5 min. Ésta se resuspendió en 30 µl de ddH₂O y se incubó a 55 °C por 10 min. Se cuantificó la concentración del ARN en un NanoDrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA) y las muestras se almacenaron a -20°C hasta su uso.

Capítulo IV

4.2.3. Síntesis de ADN complementario (ADNc)

Para la síntesis de ADNc, se partió de 1.5 µg de ARN total. Se agregó 1 µl de oligo dT (50 mM), 1 µl de dNTPs (10 mM) y se llevó la reacción a 12 µl totales con ddH₂O. Las muestras fueron incubadas a 65 °C por 5 min para linearizar a los ARN mensajeros. Transcurrido el tiempo, las muestras se colocaron en hielo por 5 min y se le añadió 4 µl de 5X First Strand Buffer (buffer de enzima), 2 µl de DTT (100 mM), y 0.5 µl de inhibidor de RNasa Out (40 U/µl). Posteriormente, la muestra se incubó a 42°C por 2 minA continuación, se agregó 1 µl de la enzima reversa transcriptasa (Super Script II RT, 200 U/µl) y se mezcló. La muestra se incubó a 42°C por 15 min. Finalmente, la muestra se colocó en hielo por 5 min y se almacenó a -20°C para su posterior uso.

4.2.4. Reacción en Cadena de la Polimerasa Punto Final (RT-PCR)

La reacción de RT-PCR se realizó con 6 µl de cDNA. Se realizó una RT-PCR, en la primera reacción se desnaturalizó a 95°C por 5 min, seguido de 38 ciclos de 95 °C por 40 seg, 62 °C por 40 seg y 72 °C por 2 min, con una extensión final a 72°C por 10 min. Como testigo positivo se utilizó al gen constitutivo de la Ubiquitina (*UBQ11*) de un tamaño de 220 pb. Los oligonucleótidos que se utilizaron para la PCR se muestran en el Cuadro 4.1.

Cuadro 4.1 Oligonucleótidos específicos para ARFs diseñados a partir de transcritos reportados del transcriptoma de *Agave tequilana* (Gross *et al.*, 2013). El oligonucleótido *UBQ11* fue usado como testigo positivo (De-la-Peña *et al.*, 2012).

Nombre	Secu	encia de los oligonucleótidos diseñados
ADE1	Forward	5'-ACCAAAGGAGATCCAGAGCAAGCA-3'
ABET	Reverse	5'-GCAGCAGCATTATCACAACCACCA-3'
ADE25	Forward	5'-AGGGGTGAGAGCAGGTATGAGGAT-3'
ARF28	Reverse	5'-TTGAGGGTGGAGTTGGGTGGTTGA-3'

Capítulo IV

ADEE	Forward	5'-AGTTGCGGCGTGCTGTTAGT-3'
ARFO	Reverse	5'- TCGGTGGAGAGGCAGATGTTGA-3'
4057-	Forward	5'- GGTTGGAGTTTGTTCGTGGGCA-3'
ARF7a	Reverse	5'- AGCCTGCGGTAAGGGTTTCACA-3'
10517	Forward	5'- TTCCGAGGTCAACCCAAAAGGCAT-3
AREIT	Reverse	5'- TGCTCATTTCCAACCGCCAAAGGT-3
UPO44	Forward	5'-GACGGGCGCACCCTTGCGGATTA-3'
UBQTT	Reverse	5'-TCCTGGATCTTCGCCTTGACATT-3'

4.3. RESULTADOS

Para conocer si el ARN extraído de las tres especies *A. angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul, en las 7 condiciones experimentales: al día 0 (T_0), al día 3 (T_3), en las condiciones sin auxinas (S/R), AIA y 2,4-D y al día 21 (T_{21}), en la condición S/R, AIA y 2,4-D estaba íntegro, se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1% (Figura 4.1).



Figura 4.1 Extracción de ARN de las 7 condiciones experimentales: 1.-T₀ S/R; 2.-T₃ S/R; 3.-T₃ AIA; 4.-T₃ 2,4-D; 5.-T₂₁ S/R; 6.-T₂₁ AIA; y 7.-T₂₁ 2,4-D en las 3 especies *Agave angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul. Se utilizó un marcador molecular de 1000pb (M)

Una vez confirmada la integridad de las muestras de ARN, se sintetizó el ADNc, el cual sirvió para evaluar la expresión de los cinco transcritos (Figura 4.2). Para todos los genes, a excepción de *ARF1* en *A. tequilana* Weber var. Azul, se pueden observar cambios notorios en la expresión únicamente al día 21 (T₂₁) con respecto al control que es T₀ S/R.

En *A. angustifolia* Haw. podemos observar que en *ARF1* (*ARF 9*; confirmado por el análisis filogenético), se observó que únicamente en la condición sin reguladores de crecimiento (S/R) se presenta una baja expresión de este gen. Cabe señalar que aunque no se encontró homología de *ARF2a* en el capítulo III, se realizó el análisis de expresión de este gen para conocer su expresión. Se observó que *ARF2a* solamente en esta especie presentó una pequeña disminución de la expresión, en las tres condiciones del día 21 (T₂₁ S/R, T₂₁ AIA y T₂₁ 2,4-D). Para *ARF5* (*ARF19*; confirmado por el análisis filogenético) existe una baja disminución en la condición T₀ S/R y en 2,4-D del día 21. *ARF7a* (*ARF 11*; confirmado por el análisis filogenético), hay una baja expresión al día 3 con AIA, esto se puede deber a que al día 3 las plántulas aún están absorbiendo los RCV

presentes en el medio de cultivo. Posteriormente se vuelve a observar una disminución en la expresión al día 21, pero ahora con 2,4-D. De la misma forma con ARF17 (ARF 8; confirmado por el análisis filogenético) se observó que existe un cambio en la expresión en la condición del día 21 con 2,4-D.

En *A. fourcroydes* Lem, se pudo observar que *ARF1* (*ARF9*; confirmado por el análisis filogenético) presenta un cambio en la expresión al dia 21 en las tres condiciones experimentales (T₂₁ S/R, T₂₁ AIA y T₂₁ 2,4-D). Para *ARF2a* no se observó ningún cambio en la expresión. Para *ARF5* (*ARF19*; confirmado por el análisis filogenético) de igual que *ARF2a*, no se observó cambios en su expresión. En el gen ARF7a (*ARF11*; confirmado por el análisis filogenético) se observó que hubo una disminución en los tratamientos del dia 21 (T₂₁ S/R, T₂₁ AIA y T₂₁ 2,4-D), para *ARF17* (*ARF8*; confirmado por el análisis filogenético) se observó que hubo una disminución en los tratamientos del dia 21 (T₂₁ S/R, T₂₁ AIA y T₂₁ 2,4-D), para *ARF17* (*ARF8*; confirmado por el análisis filogenético) se observó un cambio en la expresión al T₃ 2,4-D.

Por otro lado, en *A. tequilana* Weber var. Azul, *ARF1* (*ARF9*; confirmado por el análisis filogenético) presento cambios únicamente en las condiciones AIA y 2,4-D del día 3. *ARF2a* no presentó cambios en la expresión en ninguno de los tratamientos. Para *ARF5* (*ARF19*; confirmado por el análisis filogenético) se vio disminuido en los tratamientos del día 21 (S/R, AIA y 2,4-D) fue disminuyendo. El gen ARF7a (*ARF11*; confirmado por el análisis filogenético) solo en la condición S/R del día 21, presentó una disminución en su expresión. *ARF17* (*ARF8*; confirmado por el análisis filogenético) presentó cambios en su expresión (disminución) en las condiciones T₀ S/R y al día 21 con AIA y 2,4-D.

Capitulo IV

	A. angustifolia Haw.						A. fourcroydes Lem.						A. tequilana Weber var. Azul.								
	E	Día 3 Dia 21				Dia 3			Dia 21		17	Dia 3			Dia 21						
	T ₀ S/R	S/R	AIA	2,4-D	S/R	AIA	2,4-D	T ₀ S/R	S/R	AIA	2,4-D	S/R	AIA	2,4-D	T ₀ S/R	S/R	AIA	2.4-D	S/R	AIA	2,4-D
ARF 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARF 2a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-
ARF 5	-	-	~	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARF 7a	-	w	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.64	-	-
ARF 17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	here
UBQ11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		-	-	-		-	-	-

Figura 4.2 Análisis de la expresión de los genes ARF7a, 5, 2a, 1 y 17 en las especies A. angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul. Las muestras de ARN para los análisis por RT-PCR fueron aisladas a partir de plántulas en condiciones sin auxinas (S/R) y en presencia de AIA y 2,4-D en los días 0, 3 y 21 días. El gen de UBQ11 (211 pb) fue utilizado como gen de referencia. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% y teñido con GelRed.

Para tener una idea más clara de los cambios en la expresión de los genes *ARF*, se decidió hacer un análisis de densitometría utilizando el software Quantity $One^{i\theta}$ de Bio-Rad a partir de las imágenes tomadas del análisis de expresión de la figura 4.2 (Figuras 4.3 - 4.7).

El gen *ARF1* mostró cambios en su expresión al tiempo tres (T₃) en la condición con AIA solo para *A. tequilana* Weber var. Azul y con 2,4-D con *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul y al día 21 (T₂₁) hubo un aumento en la expresión en *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul en la condición con AIA y una disminución en su expresión en *A. angustifolia* Haw. en la condición S/R y con 2,4-D con respecto al día cero (T₀) (Figura 4.3).

Capítulo IV



Figura 4.3 Nivel de expresión del gen ARF1 en Agave spp. Se muestran las unidades relativas de expresión del gen ARF1 de cada especie A. angustifolia Haw. (azul), A. fourcroydes Lem. (verde) y A. tequilana Weber var. Azul (amarillo) en las condiciones sin auxinas (S/R), AIA y 2.4-D y en los tiempos 0, 3 y 21 días.

Para el gen ARF2a, se observó que en el día 3 (T₃) hubo un aumento en la expresión en A. tequilana Weber var. Azul en función de la auxina utilizada, viéndose con 2,4-D la mayor expresión que con respecto al día cero (T_0) (Figura 4.4).



Niveles de expresión del gen ARF2a en Agave spp.

Figura 4.4 Nivel de expresión del gen ARF2a en Agave spp. Se muestran las unidades relativas de expresión del gen ARF2a de cada especie A. angustifolia Haw. (azul), A. fourcroydes Lem. (verde) y A. tequilana Weber var. Azul (amarillo) en las condiciones sin auxinas (S/R), AIA y 2,4-D y en los tiempos 0, 3 y 21 días.

Capítulo IV

Para el gen *ARF5* se observó un aumento en su expresión al día 3 (T₃) tanto en *A. fourcroydes* y *A. tequilana* con 2,4-D. Para el día veintiuno (T₂₁) se observó que únicamente en *A. angustifolia* se vio una disminución en su expresión con las tres condiciones experimentales, siendo con 2,4-D la expresión más baja en comparación con el día cero (T₀) (Figura 4.5).



Niveles de expresión del gen ARF5 en Agave spp.

Figura 4.5 Nivel de expresión del gen *ARF5* en Agave spp. Se muestran las unidades relativas de expresión del gen *ARF5* de cada especie *A. angustifolia* Haw. (azul), *A. fourcroydes* Lem. (verde) y *A. tequilana* Weber var. Azul (amarillo) en las condiciones sin auxinas (S/R), AIA y 2,4-D y en los tiempos 0, 3 y 21 dias.

Para el gen *ARF7a* se observó un aumento en la expresión con respecto al tiempo, a partir del día 3 (T_3) en la condición con 2,4-D y siguiendo con el día 21 (T_{21}) en las condiciones S/R y AIA de la especie *A. angustifolia* Haw. De manera contraria se observó una disminución en la expresión en los mismos días pero en la especie *A. fourcroydes* Lem. con respecto al día cero (T_0) (Figura 4.6).



Figura 4.6 Nivel de expresión del gen *ARF7a* en *Agave* spp. Se muestran las unidades relativas de expresión del gen *ARF7a* de cada especie *A. angustifolia* Haw. (azul), *A. fourcroydes* Lem. (verde) y *A. tequilana* Weber var. Azul (amarillo) en las condiciones sin auxinas (S/R), AIA y 2,4-D y en los tiempos 0, 3 y 21 días.

Para el gen *ARF17* en *A. angustifolia* Haw. se observó un incremento en la expresión en las condiciones S/R, AIA y 2,4-D del día tres (T₃) y una disminución al día 21 (T₂₁) en la condición con 2,4-D. Para *A. fourcroydes* Lem. se observó una disminución en la expresión tanto al día tres (T₃) como al día veintiuno (T₂₁) en *A. fourcroydes* Lem. (Figura 4.7).



Figura 4.7 Nivel relativo de expresión del gen *ARF17* en *Agave* spp. Se muestran las unidades relativas de expresión del gen *ARF17* de cada especie *A. angustifolia* Haw. (azul), *A. fourcroydes* Lem. (verde) y *A. tequilana* Weber var. Azul (amarillo) en las condiciones sin auxinas (S/R), AIA y 2,4-D y en los tiempos 0, 3 y 21 días.

Capitulo IV

4.4. DISCUSIÓN

Inukai et al., 2005, reportan que en O. sativa, el gen crown rootless1 (Cr/1) codifica a un regulador positivo para la formación de raíces de la corona y laterales, en respuesta a tratamientos de 10⁻⁵ a10⁻⁹ M de AIA, 2.4-D v ANA, además su expresión es directamente regulada por el gen OsARF1 en la vía de señalización de auxinas (Waller et al., 2002). Lo anterior concuerda con lo observado en el analisis de expresión con ARF1 en las tres especies (Figura 4.3), va que se presentó la formación de raíces (Figura 2.15) y su expresión se ve elevada en las condiciones con 0.5 µM de AIA y 2,4-D en el día 3 (T₃) en A. angustifolia Haw, y A. fourcroydes Lem.; caso contrario en A. tequilana Weber var. Azul, donde se observa una disminución de su expresión en las condiciones con AlA v 2,4-D en el dia 3 (T₃) con respecto al dia 21 (T₂₁). Por otro lado, Paponov et al., (2008) encontraron que ARF19, ARF4 y ARF16 está presente en una mayor expresión en función de la concentración (0.1, 1, 5 y 10 µM) de AIA y el tiempo de exposición. Se observó que ARF19 era la más sensible a AIA en su expresión (Paponov et al., 2008). En Brassica rapa, Mun et al., (2012) obsevó algo similar en la expresión de 27 genes ARF. donde la expresión de los genes se vió regulada por el tiempo (0, 30 min, 1 y 2 hrs) en medio con ácido 1-naftalenacético (ANA) que es una auxina sintética.

Yoon *et al.*, (2010) midió por PCR en Tiempo Real la expresión de ARF4 en raíces laterales de *A. thaliana* a varias concentraciones (0. 0.01, 0.1 1 y 10 µM), donde observaron que la mayor expresión se vió en la concentración de 10 µM. En Agave, en nuestro estudio encontramos que *ARF5* se agrupó con los genes *ARF7* y *ARF19* de *A. thaliana* (Figura 3.13), lo cual sugiere que ARF5 también podría expresarse dependiendo de la concentración de auxina; lo cual fue confirmado con el análisis de expresión de este gen (Figuras 4.2 y 4.5). También, se ha observado que ARF7 y *ARF19* regulan directamente la formación de raíces laterales y la expansión de las hojas en *A. thaliana* (Weijers *et al.*, 2005; Okushima *et al.*, 2005; Wilmoth *et al.*, 2005) mediando la transcripción de los genes *LATERAL ORGAN DOMAIN BOUNDARIES-DOMAIN16/ASYMMETRIC LEAVES2-LIKE18* (*LBD16/ASL18*) y *LBD29/ASL16*. En nuestro caso, para los homólogos en *Agave* (Figura 4.2), se encontró que *ARF1* y *ARF5* presentan cambios en su expresión en las condiciones S/R, AIA y 2,4-D al dia 21 (T₂₁) del experimento.

En la presente tesis se encontraron resultados novedosos sobre los ARF y su posible
regulación con diferentes auxinas ya que para *ARF2a*, *ARF7a* y *ARF17* y sus homólogos en *Z. mays* (*ARF*s 17, 19, 21 y 22) y *O.* sativa (ARF18) que resultaron del análisis filogenético no se tiene reportado nada hasta el momento.

4.5. BIBLIOGRAFÍA

- Abel, S., y Theologis, A. (1996). Early genes and auxin action. Plant Physiology, 111(1), 9-17.
- Abel, S., Oeller P.W. y Theologis A. (1994). Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences. USA. 91; 326-330.
- Bilang, J. y Sturm, A. (1995). Cloning and characterization of a glutathione S-transferase that can be photolabeled with 5-azido-indole-3-acetic acid. Plant Physiology, 109(1), 253-260.
- Chapman, E.J., y Estelle, M. (2009). Mechanism of auxin-regulated gene expression in plants. Annual Review of Genetics, 43(1), 265-285.
- de Jong, M., Mariani, C., y Vriezen, W.H. (2009). The role of auxin and gibberellin in tomato fruit set. Journal of Experimental Botany, 60 (5): 1523-1532.
- De-la-Pena, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J., Lopez-Torres, A., Wrobel, K. y Robert-Diaz, M. (2012). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in Agave spp. BMC Plant Biology, 12(1), 203.
- Dharmasiri, N. y Estelle, M. (2004). Auxin signaling and regulated protein degradation. Trends in plant science, 9(6), 302-308.
- Droog, F., Hooykaas, P. y Van Der Zaal, B.J. (1995). 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid and related chlorinated compounds inhibit two auxin-regulated Type-III tobacco glutathione S-transferases. Plant Physiology, 107(4), 1139–1146.
- Gehring, C.A., Irving, H. R. y Parish, R.W. (1990). Effects of auxin and abscisic acid on cytosolic calcium and pH in plant cells. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 87(24), 9645–9649.
- Goetz, M., Hooper, L. C., Johnson, S.D., Rodrigues, J.C.M., Vivian-Smith, A., y Koltunow, A.M. (2007). Expression of aberrant forms of AUXIN RESPONSE FACTOR8 stimulates parthenocarpy in Arabidopsis and tomato. Plant Physiology, 145(2), 351-366.
- Goetz, M., Vivian-Smith, A., Johnson, S.D. y Koltunow, A.M. (2006). AUXIN RESPONSE FACTOR8 is a negative regulator of fruit initiation in Arabidopsis. Plant Cell, 18(8), 1873-1886.

Grebe, M. (2005). Growth by auxin: when a weed needs acid. Science, 310(5745), 60-61.

- Gross, S., Martin, J., Simpson, J., Abraham-Juarez, M., Wang, Z. y Visel, A. (2013). *De* novo transcriptome assembly of drought tolerant CAM plants, *Agave deserti* and *Agave teguilana*, BMC Genomics, 14(1), 563.
- Guilfoyle, T.J. y Hagen, G. (2007). Auxin response factors. Current Opinion in Plant Biology, 10(5), 453-460.
- Guilfoyle, T.J. y Hagen, G. (2001). Auxin response factors. Journal Plant Growth Regulation. 20, 281–291.
- Guilfoyle, T., Hagen, G., Ulmasov, T. y Murfett, J. (1998). How does auxin turn on genes?. Plant Physiology, 118(2), 341-347.
- Guillon, F., Philippe, S., Bouchet, B., Devaux, M.F., Frasse, P., Jones, B., Bouzayen, M. y Lahaye, M. (2008). Down-regulation of an Auxin Response Factor in the tomato induces modification of fine pectin structure and tissue architecture. Journal of Experimental Botany, 59(2), 273-288.
- Hamann, T., Benkova, E., Bäurle, I., Kientz, M., y Jürgens, G. (2002). The Arabidopsis BODENLOS gene encodes an auxin response protein inhibiting MONOPTEROSmediated embryo patterning. Genes & Development, 16(13), 1610-1615.
- Hardtke, C. S., Ckurshumova, W., Vidaurre, D. P., Singh, S. A., Stamatiou, G., Tiwari, S. B., Hagen, G., Guilfoyle, T.J. y Berleth, T. (2004). Overlapping and non-redundant functions of the Arabidopsis auxin response factors MONOPTEROS and NONPHOTOTROPIC HYPOCOTYL 4. Development, 131(5), 1089-1100.
- Hardtke, C.S. y Berleth, T. (1998). The Arabidopsis gene MONOPTEROS encodes a transcription factor mediating embryo axis formation and vascular development. The EMBO Journal, 17(5), 1405–1411.
- Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H. y Matsuoka, M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. Plant Cell, 17(5), 1387-1396.
- Karcz, W. y Burdach, Z. (2007). Effect of temperature on growth, proton extrusion and membrane potential in maize (*Zea mays* L.) coleoptile segments. Plant Growth Regulation, 52(2), 141-150.
- Kieffer, M., Neve, J., y Kepinski, S. (2010). Defining auxin response contexts in plant development. Current Opinion in Plant Biology, 13(1), 12-20.
- Kim, J., Harter, K. y Theologis, A. (1997). Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. Proceedings of the National Academy of Sciences, 94(22),

Capítulo IV

11786-11791.

- Li, J., Dai, X. y Zhao, Y. (2006). A role for auxin response factor 19 in auxin and ethylene signaling in Arabidopsis. Plant Physiology, 140: 899–908.
- Lim, P.O., Lee, I.C., Kim, J., Kim, H.J., Ryu, J.S., Woo, H.R., y Nam, H.G. (2010). Auxin response factor 2 (ARF2) plays a major role in regulating auxin-mediated leaf longevity. Journal of Experimental Botany, 61(5), 1419-1430.
- Liscum, E., y Reed, J.W. (2002). Genetics of Aux/IAA and ARF action in plant growth and development. Plant Molecular Biology, 49: 3-4, 387-400.
- Liscum, E. y Briggs, W. R. (1995). Mutations in the NPH1 locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. Plant Cell, 7(4), 473–485.
- Marin, E., Jouannet, V., Herz, A., Lokerse, A.S., Weijers, D., Vaucheret, H., Nussaume, L., Crespi, M.D. y Maizel, A. (2010). miR390, Arabidopsis TAS3 tasiRNAs, and their AUXIN RESPONSE FACTOR targets define an autoregulatory network quantitatively regulating lateral root growth. Plant Cell, 22(4), 1104-1117.
- Moore, B., Zhou, L., Rolland, F., Hall, Q., Cheng, W.H., Liu, Y.X., Hwang, I., Jones, T. y Sheen, J. (2003) Role of the Arabidopsis glucose sensor HXK1 in nutrient, light, and hormonal signaling. Science 300: 332–336
- Mun, J.-H., Yu, H.-J., Shin, J. Y., Oh, M., Hwang, H.-J., y Chung, H. (2012). Auxin response factor gene family in Brassica rapa: genomic organization, divergence, expression, and evolution. Molecular Genetics and Genomics, 287(10), 765-784.
- Okushima, Y., Fukaki, H., Onoda, M., Theologis, A. y Tasaka, M. (2007). ARF7 and ARF19 regulate lateral root formation via direct activation of LBD/ASL genes in Arabidopsis. Plant Cell, 19(1), 118-130.
- Okushima, Y., Overvoorde P.J., Arima K., Alonso J.M., Chan A., Chang C., Ecker J.R., Hughes B., Liu A., Nguyen D., Onodera C., Quach H., Smith A., Yu G. y Theologis A. (2005). Functional genomic analysis of the auxin response factor gene family members in *Arabidopsis thaliana*: unique and overlapping functions of ARF7 and ARF19. Plant Cell 17, 444–463.
- Paponov, I.A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J.A.H., y Palme, K. (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. Molecular Plant, 1(2), 321-337.
- Petrášek, J. y Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. Development, 136(16), 2675-2688.

Remington, D.L., Visionm, T.J., Guilfoylem, T.J. y Reedm, J.W. (2004). Contrasting modes

of diversification in the Aux/IAA and ARF gene families. Plant Physiology. 135, 1738-1752.

- Sessions, A., Nemhauser, J.L., McColl, A., Roe, J. L., Feldmann, K. A. y Zambryski, P.C. (1997). ETTIN patterns the Arabidopsis floral meristem and reproductive organs. Development, 124(22), 4481-4491.
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M.K., Harper, R.M., Liscum, E. y Yamamoto, K.T. (2004). MASSUGU2 Encodes Aux/IAA19, an auxin-regulated protein that functions together with the transcriptional activator NPH4/ARF7 to regulate differential growth responses of hypocotyl and formation of lateral roots in *Arabidopsis thaliana*. Plant Cell 16(2), 379-393.
- Teale, W.D., Paponov, I.A. y Palme, K. (2006). Auxin in action: signalling, transport and the control of plant growth and development. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 7(11), 847-859
- Tiwari, S.B., Hagen, G., y Guilfoyle, T.J. (2004). Aux/IAA proteins contain a potent transcriptional repression domain. Plant Cell, 16(2), 533-543.
- Tiwari, S.B., Hagen, G., y Guilfoyle, T.J. (2003). The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription. Plant Cell,, 15(2), 533-543.
- Ulmasov, T., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1999)a. Dimerization and DNA binding of auxin response factors. The Plant Journal, 19:309–319.
- Ulmasov, T., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1999)b. Activation and repression of transcription by auxin-response factors. Proceedings of the National Academy of Sciences 96(10): 5844-5849.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G. y Gullfoyle, T.J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. Plant Cell, 9: 1963–1971.
- Ulmasov, T., Liu, Z.B., Hagen, G. y Guilfoyle, T.J. (1995). Composite structure of auxin response elements. Plant Cell, 7(10): 1611-23.
- Vert, G., Walcher, C.L., Chory, J. y Nemhauser, J.L. (2008). Integration of auxin and brassinosteroid pathways by Auxin Response Factor 2. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105(28), 9829-9834.
- Waller, F., Furuya, M., y Nick, P. (2002). OsARF1, an auxin response factor from rice, is auxin-regulated and classifies as a primary auxin responsive gene. Plant Molecular Biology, 50(3), 415-425.
- Weijers, D., Benkova, E., Jager, K.E., Schlereth, A., Hamann, T., Kientz, M., Wilmoth,

J.C., Reed, J.W. y Jurgens, G. (2005). Developmental specificity of auxin response by pairs of ARF and Aux/IAA transcriptional regulators. EMBO Journal, 24: 1874– 1885.

- Wilmoth, J.C., Wang, S., Tiwari, S.B., Joshi, A.D., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Alonso, J.M., Ecker, J.R. y Reed, J.W. (2005). NPH4/ARF7 and ARF19 promote leaf expansion and auxin-induced lateral root formation. Plant Journal, 43: 118–130.
- Yoon, E.K., Yang, J.H., Lim, J., Kim, S.H., Kim, S.-K., y Lee, W.S. (2010). Auxin regulation of the microRNA390-dependent transacting small interfering RNA pathway in Arabidopsis lateral root development. Nucleic Acids Research, 38(4), 1382-1391.

CAPÍTULO V

EVALUACIÓN DE LA REGULACIÓN DE LOS GENES ARF EN Agave angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul, EN CONDICIONES DE AIA, 2,4-D Y SIN AUXINAS POR MEDIO DE LA IMMUNOPRECIPITACIÓN DE LA CROMATINA (ChIP)

5.1 INTRODUCCIÓN

Existen varios niveles de regulación de la expresión génica. El más común se da a nivel de la síntesis de ácido ribonucleico (ARN) a partir de ADN (transcripción), aunque también existe una regulación a nivel post-transcripcional (corte y empalme), traduccional (síntesis de proteínas a partir de un ARN mensajero) y post-traduccional (modificaciones post-traduccionales de proteínas) (Holliday, 2006; Grant-Downton y Dickinson, 2005; Egger *et al.*, 2004). Pero sin lugar a dudas, la forma de regular la expresión génica que ha revolucionado el modo de interpretar la relación de los genes con el medio ambiente, está a cargo de los distintos mecanismos epigenéticos (Bird, 2007; Goldberg *et al.*, 2007; Henderson y Jacobsen, 2007; Huettel *et al.*, 2007). Estos mecanismos incluyen la metilación del ADN, las modificaciones post-traduccionales de las histonas, el silenciamiento génico mediado por ARN no codificantes, los complejos de remodelado de cromatina basados en adenosín trifosfato (ATP) y los complejos proteicos Polycomb y Trithorax, entre otros (Bell y Spector, 2011).

En las plantas, los mecanismos epigenéticos tales como la metilación de ADN y la modificación de las histonas son importantes para la regulación génica; regulando el desarrollo (Ruíz-García *et al.*, 2005; Valledor *et al.*, 2007), la floración (Dennis y Peacock, 2007), la defensa contra patógenos (De-la-Peña *et al.*, 2012a), la senescencia (Ay *et al.*, 2009) y la variación somacional (Baranek *et al.*, 2010; Miguel y Marum, 2011). Un punto fundamental de la regulación epigenética es la modulación de la estructura de la cromatina, ya que los mecanismos epigenéticos impactan directamente en su organización y mantenimiento. Por lo tanto, es imprescindible comprender cómo está estructurada la cromatina.

La cromatina consiste en complejos formados por ADN y unas proteínas denominadas histonas (H1, H2A, H2B, H3 y H4). Alrededor de 146 pares de bases de ADN se enrollan

sobre un octámero de histonas (dos H2A, dos H2B, dos H3 y dos H4) formando el centro de un nucleosoma (Lugger, 2003) y unidos por la histona H1 (Figura 5.1). Los nucleosomas están separados como si fueran las cuentas de un collar.



Figura 5.1 Vista frontal del nucleosoma. Los dominios de las histonas H2A (amarillo), H2B (rojo), H3 (morado) y H4 (verde). Las colas de las histonas y las extensiones (blanco) y el ADN (azul) (Luger, 2003).

Debido a la alta condensación de la cromatina, la transcripción no se puede llevarse a cabo, sin embargo cuando la cromatina se descompacta, ésta se torna accessible a los factores de transcripción y a los complejos ARN-polimerasa (Lafos y Schubert, 2009). En general, las modificaciones de las histonas pueden activar o reprimir la actividad transcripcional, generando una estructura abierta o cerrada en la configuración de la cromatina. El estado de eucromatina (cromatina abierta) incrementa la accesibilidad del genoma hacia la maquinaria transcripcional activando la transcripción; por el contrario, la heterocromatina (cromatina cerrada o compactada) reprime la transcripción limitando la accesibilidad hacia el genoma.

Es bien sabido que las histonas, particularmente las histonas H3 y la H4 son metiladas en

un número elevado de residuos de lisinas (Lys; K) y argininas (Arg; R). La mayoría de los sitios de metilación de la Lys en las histonas identificadas hasta ahora son: K4, K9, K27, K36, K79 en H3 y K20 en la histona H4. Además, los residuos de Lys pueden ser metilados una, dos o tres veces y esta metilación diferencial provee después una diversidad funcional para cada sitio de metilación en las Lys (Kouzarides, 2007). Por otro lado, las Lys no sólo se metilan sino también se pueden acetilar dando una conformación abierta a la cromatina. Se ha observado que la acetilación en la lisina 14 (H3K14 Ac), la fosforilación en la serina 10 (H3PS10) y la metilación en la lisina 4 (H3K4me) están asociadas con la activación de la expresión de genes; mientras que las metilaciones en las Lys 9 y 27 (H3K9me y H3K27me) y la fosforilación en la serina 28 (H3PS28), se relacionan con la represión de genes (Cheung, 2005; Hebbes *et al.*, 1988).

La H3K4me es una modificación muy conservada y que se encuentra presente en los promotores de los genes transcritos activamente en el que parecen tener un papel en la Iniciación de la transcripción (Kouzarides, 2007; Kouzarides, 2002)). Se ha encontrado en A. thaliana que la distribución de las marcas H3K4me1 es de 6.45%, H3K4me2 con 6% y la H3K4me3 con un 12.1%; lo cual indica que estas marcas se encuentran altamente enriquecidas en regiones eucromáticas ricas en genes (Zhang et al., 2009). Estas marcas epigenéticas se distribuyen tanto en las regiones promotoras, como en las regiones transcritas. La H3K4me1 está presente en bajos niveles en las regiones terminales 5 y 3 de los genes, pero se encuentran enriquecidas dentro de las regiones transcritas; por el contrario, ambas, la H3K4me2 y H3K4me3, se encuentran enriquecidas en los promotores, y a mitad del extremo 5 dentro de las regiones transcritas pero ausentes a la mitad del extremo 3 particularmente en los genes grandes (Kouzarides, 2007), A diferencia de la H3K4me2/me3, la H3K4me1 se encuentra muy relacionada con las regiones metiladas CG en el ADN lo que sugiere que la H3K4me se reguiere para regular la expresión de genes y el desarrollo normal de la planta (Lauria y Rossi, 2011). Caso contrario la H3K9me es una modificación altamente conservada, generalmente asociada con la heterocromatina y se encuentra en casi todos los eucariotas con la notable excepción de la levadura S. cerevisiae (Krauss, 2008). La H3K9me es una marca crítica para el silenciamiento y la metilación del ADN (Jackson et al., 2004).

Una manera para poder conocer qué marcas epigenéticas en las histonas están activando o inactivado un gen en específico es mediante la Immunoprecipitación de la Cromatina

(ChIP; por sus siglas en inglés), la cual es generalmente utilizada para estudiar las interacciones *in vivo* entre factores de transcripción u otro tipo de proteínas que puedan estar asociadas al ADN (Kaufmann *et al.*, 2010) (Figura 5.2). Esta técnica fue establecida por primera vez en células cultivadas de *Drosophila* (Solomon *et al.*, 1988) y desde entonces ha demostrado proporcionar información muy valiosa sobre los procesos asociadas a la cromatina en eucariotas, incluyendo las plantas y los seres humanos.



Figura 5.2 Esquematización del proceso de Immunoprecipitación de la Cromatina (ChIP). Anticuerpos específicos para reconocer las modificaciones en las histonas son usados para precipitar locis específicos unidos a esas proteínas.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología del ChiP se basa principalmente en la utilización de anticuerpos para identificar la presencia de modificaciones específicas de las histonas en regiones de ADN. La cromatina se extrae a partir de células o tejidos, posteriormente se fragmenta y se incuba con anticuerpos específicos contra las modificaciones en las histonas. Los fragmentos de cromatina se unen a los anticuerpos que se capturaron con la utilización de perlas con proteína A/G y por ultimo el ADN se aísla precipitándolo. Este ADN se suele analizar utilizando PCR (cuantitativo), para determinar la abundancia de una región de interés en el material precipitado (Figura 5.3).





Para el ChiP se partió de 1 g de tejido proveniente de A. angustifolia Haw, A. fourcroydes Lem. y A. tequilana var. Azul, (plántulas de 0, 3 y 21 días bajo condiciones sin auxinas, con AIA v 2,4-D). Las proteínas junto con el ADN del tejido vegetal, fueron fijados in vivo poniendo a las plantas con 50 ml de amortiguador de fijación (sacarosa 400 mM, Tris-HCI 10 mM pH 8.0, EDTA 1 mM, PMSF 1 mM, formaldehido 1%), aplicando vacío durante 10-15 min. La reacción de fijación fue detenida con glicina 0.125 M y las plántulas fueron lavados tres veces con ddH2O estéril. Posteriormente, las muestras fueron maceradas con nitrógeno líquido y el material fue resuspendido en 25 ml de amortiguador de extracción de núcleos (PIPES 15 mM pH 6.8, MgCl2 5 mM, KCl 60 mM, sacarosa 0.25 M, NaCl 15 mM, CaCl2 1 mM, Triton X-100 0.8 % y como inhibidores de proteasas: PMSF 1 mM y pepstatina 0.7 µg/ml). La mezcla tejido-amortiguador fue agitada fuertemente hasta lograr la homogenización. Luego el homogenizado fue filtrado a través de tres capas de gasa estéril y centrifugado a 12,000 rpm por 20 min a 4°C. La pastilla obtenida fue resuspendida en 2 ml de amortiguador de lisis de núcleos (HEPES 50 mM, NaCI 150 mM, EDTA 1 mM, Triton-X100 1%, deoxicolato Na 0.1%, SDS 1%, PMSF 1 mM, butirato de Na 10 mM, pepstatina 1 µg/ml v aprotinina 1 µg/ml). Se dividieron alicuotas de 500 µl de cromatina, las cuales fueron sonicadas en 15 ocasiones durante 12 s hasta romper la cromatina en fragmentos de aproximadamente 200 y 1000 pares de bases. La cromatina fragmentada fue centrifugada a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo. La eficacia de la sonicación se determinó mediante un gel de agarosa al 1% teñido con GelRed. Posteriormente, alicuotas de 100 µl de la cromatina sonicada fueron diluídas 10 veces en el amortiguador de lisis de núcleos, y pre-lavadas, con 50 µl de Salmon Sperm DNA/Protein A Agarose (Millipore). La mezcla fue centrifugada a 4,000 rpm durante 2 min a 4°C y el sobrenadante fue incubado con 5 µl de los siguientes anticuerpos primarios: Anti-trimethyl-histone H3 lysine 4 (H3K4me3) y Antidimethyl-histone H3 lysine 9 (H3K9me2). Las muestras fueron mantenidas en agitación a 4°C toda la noche y las perlas de agarosa unidas con el complejo anticuerpo-histona fueron centrifugadas a 4,000 rpm durante 2 min a 4°C. La pastilla obtenida fue lavada durante 5 min cada vez y en agitación constante con cada uno de los siguientes amortiguadores: una vez con el amortiguador de lavado bajo en sales (NaCl 150 mM, Tris-HCI 20 mM pH 8, SDS 0.1%, Triton X-100 1% y EDTA 2 mM), una vez con el amortiguador de lavado alto en sales (NaCl 500 mM, Tris-HCl 20 mM pH 8, SDS 0.1%, Triton X-100 1% y EDTA 2 mM), una vez con el amortiguador de LiCI (LiCI 0.25 M, deoxicolato Na 1%, Tris-HCl 10 mM pH 8, NP-40 1% y EDTA 1 mM) y dos veces con el

amortiguador TE (EDTA 1 mM, Tris-HCI 10 mM pH 8). Posteriormente, el complejo anticuerpo-histona fue eluido de las esferas de agarosa adicionando 250 µl de amortiguador de elución (SDS 1%, bicarbonato de sodio 0.1 M) manteniéndolo en agitación constante y a temperatura ambiente por 30 min. El immuno-complejo fue centrifugado a 4.000 rpm durante 2 min a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo eppendorf. El paso de elución fue repetido una vez más, adicionando 250 µl de amortiguador de elución a las esferas de agarosa y manteniéndolo en agitación constante y a temperatura ambiente durante 20 min y después durante 10 min a 65°C. Las dos fracciones eluídas (~500 µl) fueron combinadas. En este paso, se utilizó como testigo positivo 200 µl de cromatina sonicada mezclados con 300 µl de amortiguador de elución. En ambos casos fueron adicionados 20 µl NaCl 5 M a cada tubo y la mezcla fue incubada a 65°C toda la noche para revertir la interacción ADN-proteína. Por último una digestión proteica fue llevada a cabo adicionando 10 µl EDTA 0.5 M, 20 µl Tris-HCl 1 M pH 6.5 y 1 µl de proteinasa K (20 mg/ml) y la muestra fue incubada durante 3 h a 45°C. Para la precipitación del ADN, las muestras fueron mezcladas fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1) en cada tubo y centrifugadas a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C y el sobrenadante (~500 µl) fue transferido en tubos eppendorf de 2 ml. Se les adicionaron 1.25 ml de etanol al 100%, 50 µl acetato de sodio 3M pH 5.2 y 16 µl glucógeno (5 mg/ml), e incubaron toda la noche a -20°C. Luego se centrifugaron a 14,000 rpm durante 15 min a 4°C y la pastilla obtenida fue lavada con 500 µl EtOH 70% siendo centrifugada de nuevo a 14,000 rpm durante 10 min a 4°C. Finalmente el exceso de etanol se eliminó dejando secar la pastilla a temperatura ambiente, y el ADN obtenido fue resuspendido en 50 µl de buffer TE (Tris-HCI 1 M, EDTA 0.5 M pH 8). Las reacciones de PCR fueron llevadas a cabo en un volumen total de 12.5 µl, utilizando como templado 100 ng de ADN y las siguientes condiciones de amplificación para ARF1, ARF5 y UBQ11 (Cuadro 5.1): 95°C durante 5 min, 48 ciclos de 95°C durante 40 s, 60°C durante 50 s, 72°C durante 2 min y un paso de extensión final a 72°C durante 10 min. Se utilizó el oligo de UBQ11, el cual es un gen constitutivamente activo en Agave (De-la-Peña et al., 2012b) y se ha observado que contiene ambas marcas epigenéticas de H3K4me3 y H3K9me2 por lo cual fue utilizado como un testigo positivo para los análisis del ChIP.

Para la parte de la immunoprecipitación se utilizó como marca de activación de la transcripción a la H3K4me3 ya que se sabe que esta marca es una modificación muy conservada y que se encuentra presente en los promotores de los genes transcritos

activamente en el que parecen tener un papel en la activación de la transcripción (Kouzarides, 2007; Grendel *et al.*, 2002). Y como marca de represión de la transcripción se utilizó a la H3K9me2, la cual es una marca crítica para el silenciamiento y la metilación del ADN (Jackson et al., 2004)

Nombre	Secuencia de los oligonucleótidos diseñados		Tamaño del producto (pb)
ARF1	Forward	5'-ACCAAAGGAGATCCAGAGCAAGCA-3'	372
	Reverse	5'-GCAGCAGCATTATCACAACCACCA-3'	
ARF5	Forward	5'-AGTTGCGGCGTGCTGTTAGT-3'	459
	Reverse	5'- TCGGTGGAGAGGCAGATGTTGA-3'	
UBQ11	Forward	5'-GACGGGCGCACCCTTGCGGATTA-3'	211
	Reverse	5'-TCCTGGATCTTCGCCTTGACATT-3'	

Cuadro 5.1 Oligonucleótidos utilizados en las pruebas de Immunoprecipitación de la cromatina (ChIP).

5.3 RESULTADOS

Debido a que *ARF1* y *ARF5* mostraron una mayor diferencia en el análisis de expresión entre el día 0 (T_0) y el día 21 (T_{21}) en las condiciones de S/R, AlA y 2,4-D en las tres especies *A. angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul (Figuras 4.2, 4.3 y 4.5); se decidió realizar la técnica de ChiP, sólo en el día 21, comparándolo con el tiempo cero, para conocer si estos genes están siendo regulados epigenéticamente con H3K9me2 (marca de represión) y/o H3K4me3 (marca de expresión).

Los resultados del ChIP (Figura 5.4) mostraron que en *Agave angustifolia* Haw. para el gen *ARF1* hubo presencia únicamente de la marca H3K4me3 en las tres condiciones: sin auxinas (S/R), AIA y 2,4-D al día 21 (T₂₁), y para *ARF5* se obtuvo presencia de ambas marcas (H3K4me3 y H3K9me2). Para la H3K4me3 en todos los tratamientos al día 0 (T₀) y al día 21 (T₂₁) y en el caso de la H3K9me2 únicamente se presentó en los tratamientos S/R y 2,4-D.

En *Agave fourcroydes* Lem., se presentó el mismo patrón de presencia de las marcas H3K4me3 y H3K9me2 en los genes *ARF1* y *ARF5* en todos los tratamientos del experimento. Se observó que para *ARF1* y *ARF5* hubo presencia de la marca H3K4me3 únicamente al día 0 (T₀) y para la marca H3K9me2 se presentó en las condiciones S/R, AIA y 2,4-D del día 21 (T₂₁).

De la misma forma en *Agave tequilana* Weber var. Azul, se presentó el mismo patrón de presencia de las marcas H3K4me3 y H3K9me2 en los genes *ARF1* y *ARF5* en todos los tratamientos del experimento; la marca H3K4me3 se observó presencia en el día 0 (T0) y en las condiciones S/R y AIA del día 21 (T_{21}) y la marca H3K9me2 se observó únicamente en la condición S/R del día 21 (T_{21}) (Figura 5.4).



Figura 5.4 Perfiles de metilación de la histona H3 de *A. angustifolia* Haw., *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul utilizando la técnica de immunoprecipitación de la cromatina (ChIP). Las muestras fueron colectadas a partir de plántulas al inicio del experimento al día 0 sin auxinas $(T_0 S/R)$ y a los 21 días (T_{21}) en condiciones sin auxinas (S/R) y en presencia de AIA y 2,4-D. El input representa el testigo positivo que corresponde a la cromatina no immunoprecipitada. El testigo negativo (-Ab) corresponde a las muestras en ausencia de anticuerpo que fueron tratadas en la misma forma como la cromatina immunoprecipitada con H3K4me3 y H3K9me2. La amplificación de *UBQ11* fue utilizada como testigo para la verificar la calidad de las muestras y la misma cantidad fue utilizada para amplificar las secuencias correspondientes a *ARF1* y *ARF5*.

Posteriormente se realizó un análisis densitométrico (Cuadros 5.2 y 5.3), esquematizado como presencia y ausencia, con base a la figura 5.4 con el software Quantity One[®] de Bio-Rad. Para el gen *ARF1* se observó que en *A. angustifolia* Haw. la marca de activación H3K4me3 se encontraba presente en los tres tratamiento al día 21 (T₂₁), de manera contraria se observó en *A. fourcroydes* Lem. en el cual únicamente estaba presente al día cero (T₀) del experimento; y en *A. tequilana* Weber var. Azul esta marca se encontraba en todas las condiciones a excepción de 2,4-D. Para la marca de represión H3K9me2 en *ARF1*, ésta se encontró únicamente en *A. fourcroydes* Lem en las tres condiciones del día veintiuno (T₂₁) y en *A. tequilana* Weber var. Azul solo en la condición sin auxinas (S/R) del día veintiuno (T₂₁); en *A. angustofolia* no estaba presente esta marca en ninguna condición (Cuadro 5.2)

Cuadro 5.2 Presencia (azul) o ausencia (amarillo) de las marcas H3K4me3 y H3K9me2 en el gen *ARF1* de *Agave* spp., evaluados en condiciones *in vitro* al día cero (T_0) y a los 21 días sin auxinas (S/R) o en presencia de AIA y 2,4-D.



ARF1

En *ARF5* se observó un patrón muy similar al encontrado en *ARF1*, a excepción de *A*. *angustifolia* (Cuadro 5.3). Por ejemplo, se observó que en *A*. *angustifolia* Haw., la marca de activación H3K4me3 se encontraba presente en todos tratamientos, mientras que en

A. fourcroydes Lem. únicamente estaba en el día cero (T_0) del experimento y en *A. tequilana* Weber var. Azul estaba presente en todas las condiciones a excepción de 2,4-D. Por otro lado, la marca de represión H3K9me2, en *A. angustifolia* Haw., solo se encontraba en la condición sin auxinas (S/R) y con 2,4-D del dia veintiuno (T_{21}) del experimento; para *A. fourcroydes* Lem. se encontró en las tres condiciones en T_{21} y en *A. tequilana* Weber var. Azul solo en la condición sin auxinas (S/R) del T_{21} (Cuadro 5.3). Estos resultados sugieren que la regulación de *ARF1* y *ARF5* es diferente en *A. angustifolia* que en las otras dos especies y que la regulación de estos genes es igual en *A. fourcroydes* y *A. tequilana*.

Cuadro 5.3 Presencia (azul) o ausencia (amarillo) de las marcas H3K4me3 y H3K9me2 en el gen *ARF5* de *Agave* spp., evaluados en condiciones *in vitro* al día cero (T_0) y a los 21 días sin auxinas (S/R) o en presencia de AIA y 2,4-D.



ARF5

5.4 DISCUSIÓN

La variación epigenética, la cual incluye cambios persistentes en el fenotipo, da como resultado la expresión o represión de genes que regulan el crecimiento y desarrollo de la planta. Se ha visto que las auxinas utilizadas durante el cultivo de los callos o de suspensiones celulares de *D. carota* aumentan la variación epigenética (LoSchiavo *et al.*, 1989). Del mismo modo, la síntesis de la auxina 2,4-D, que con frecuencia es utilizada en cultivos de callos y células se asocia a menudo con anomalías genéticas, como la inducción a la poliploidía y la estimulación de la síntesis de ADN (Ahmed *et al.*, 2004; Bouman y De Klerk, 2001; Mohanty *et al.*, 2008).

En los sistemas de cultivo de tejidos y células vegetales se han realizado estudios epigenéticos sobre las modificaciones en la histona H3 en suspensiones celulares de *Arabidopsis* (Tanurdzic *et al.,* 2008) en los que se ha observado que debido al largo periodo de cultivo, las células sufren cambios epigenéticos tales como la metilación del ADN y modificaciones en las histonas. También se ha encontrado que el estrés provocado en los sistemas de micropropagación pueden producir modificaciones epigenéticas en las histonas principalmente por metilaciones que son las que más se han visto afectan la transcripción. Por ejemplo, De-la-Peña et al., (2012b) reportaron que la expresión reguladora de *AtqKNOX1* es epigenéticamente regulado por las marcas H3K4me3 y H3K9me2 durante el cultivo *in vitro*. Tanurdzic et al. (2008) encontraron que la pérdida de H3K9me2 y una ganancia de la marca H3K4me2 reactiva elementos transponibles como *Athila y Copia-like* en suspensiones de células de *Arabidopsis*.

En la presente tesis se determinó que no sólo el cultivo *in vitro* en sí puede estar estimulando cambios en la metilación de las histonas de la cromatina, si no que también las auxinas y el tiempo de exposición a esas auxinas tienen un efecto epigenético en los genes *ARF1* y *ARF5* que pudiera estar provocando cambios fenotípicos a largo plazo. Por ejemplo, se encontró que en *A. angustifolia* Haw., el gen *ARF1* (Figura 5.3; Cuadro 5.2), presentó un enriquecimiento de la marca H3K4me3 en las condiciones del dia 21 (T₂₁) S/R, AIA y 2,4-D. En *A. fourcroydes* Lem. la presencia de la marca H3K9me2 que se relacionó a la represión de este gen (Figura 5.2). Se ha observado en arroz que *ARF1* puede controlar la expresión de genes involucrados en la formación de raíces (Inukai *et al.*, 2005; Waller *et al.*, 2002).

En cuanto al gen ARF5 se observó que en A. angustifolia Haw., en el análisis de ChiP demostró que hubo un enriquecimiento de la marca H3K4me3 en todas las condiciones

(Figura 5.3; Cuadro 5.3). En *A. fourcroydes* Lem. se observó en los perfiles de metilación de la H3 un enriquecimiento de la marca H3K9me2 en los 3 tratamientos del día 21, sugiriendo que podría estarse reprimiendo la expresión de este gen. Para *A. tequilana* Weber var. Azul, se observó un perfil de metilaciones en la marca H3H4me3 solo presente al día 0 (T₀) y al día 21 (T₂₁) en las condiciones S/R y AlA y la H3K9me2 solo al día 21 (T₂₁) en la condición S/R; esto podría estar sugiriendo que otra marca de represión como la H3K27me3 pudiera estar presente en los tratamientos del tiempo 0 y 21. Cabe señalar, que tanto en *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul, *ARF1* y *ARF5* se presentaron el mismo patrón de enriquecimiento de las marcas H3K4me3 y H3K9me2; siendo *A. angustifolia* la única en presentar cambios sobre todo con la marca H3K9me2 en la condición S/R y con 2,4-D al día 21 (T₂₁) del experimento.

En particular, se encontró que en A. angustifolia Haw. la concentración de 0.5 µM de AIA y 2,4-D pudiera estar regulando diferencialmente la expresión de los genes ARF bajo mecanismos epigenéticos y es por eso que en la condición sin auxinas (S/R) se observaron producción de raíces, en AIA la producción de brotes y con 2,4-D la producción de callos.

5.5 BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed, E.U., Hayashi, T. y Yazawa, S. (2004). Auxins increase the occurrence of leafcolour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants. Science Horticulture, 100: 159.
- Ay, N., Irmler, K., Fisher, A., Uhlemann, R., Reuter, G. y Humbeck, K. (2009). Epigenetic programming via histone methylation at WRKY53 controls leaf senescence in *Arabidopsis thaliana*. Plant Journal, 58:333–346.
- Baranek, M., Krizan, B., Ondrusikova, E., Pidra, M. (2010). DNA-methylation changes in grapevine somaclones following *in vitro* culture and thermotherapy. Plant Cell Tissue Organ Culture, 101:11–22.
- Bell, J.T. y Spector, T.D. (2011). A twin approach to unraveling epigenetics. Trends in Genetics, 27(3), 116-125.
- Bird, A. (2007). Perception of epigenetics. Nature, 447: 396-398.
- Bouman H. y De Klerk, G.J. (2001) Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions comparision of three assays. Theoretical and Applied Genetics, 102: 111-117.
- Cheung, P. (2005) Epigenetic regulation by histone methylation and histone variants. Molecular Endocrinology, 19: 563-573.
- Dennis, E.S. y Peacock, W.J. (2007). Epigenetic regulation of flowering. Current Opinion Plant Biology, 10:520–527.
- De-la-Peña, C., Rangel-Cano, A. y Alvarez-Venegas, R. (2012a). Regulation of diseaseresponsive genes mediated by epigenetic factors: interaction of Arabidopsis– Pseudomonas. Molecular Plant Pathology, 13:388–398.
- De-la-Peña, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J.L., López-Torres, A., Wrobel, K. y Robert-Diaz, M.L. (2012b). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in Agave spp. BMC Plant Biology, 12, 203.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A. y Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy, Nature, 429: 457-463.
- Grant-Downton, R. y Dickinson, H. (2005). Epigenetics and its implications for plant biology. The epigenetic network in plants. Annals of Botany, 96: 1143-1162.
- Gendrel, A.V., Lippman, Z., Yordan, C., Colot, V. y Martienssen, R.A. (2002). Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the Arabidopsis gene

DDM1. Science, 297: 1871-1873.

- Goldberg, A., Allis, C. y Bernstein, E. (2007). Epigenetics: a landscape takes shape. Cell, 128: 635-638.
- Haring, M., Offermann, S., Danker, T., Horst, I., Peterhansel, C. y Stam, M. (2007). Chromatin immunoprecipitation: optimization, quantitative analysis and data normalization. Plant Methods, 3(1), 11.
- Hebbes, T.R., Thorne, A.W. y Cranerobinson, C. (1988). A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. EMBO Journal, 7: 1395-1402.
- Henderson, I.R. y Jacobsen S.E. (2007). Epigenetic inheritance in plants, Nature, 447: 418-424.
- Holliday, R. (2006). Epigenetics. A Historical overview. Epigenetics, 1: 76-80.
- Huettel, B., Kanno, T., Daxinger, L., Bucher, E., van der Winden, J., Matzke, A.J.M. y Matzke, M. (2007). RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptational gene silencing in plants. Biochimica et Biophysica Acta, 1769: 358-374.
- Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H. y Matsuoka, M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. Plant Cell, 17(5), 1387-1396.
- Jackson, J.P., Johnson, L., Jasencakova, Z., Zhang, X., Perez-Burgos, L., Singh, P.B., Cheng, X., Schubert, I., Jenuwein, T. y Jacobsen, S.E (2004). Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*, Chromosoma, 308-315.
- Kaufmann, K., Muino, J. M., Osteras, M., Farinelli, L., Krajewski, P. y Angenent, G. C. (2010). Chromatin immunoprecipitation (ChIP) of plant transcription factors followed by sequencing (ChIP-SEQ) or hybridization to whole genome arrays (ChIP-CHIP). Nature Protocols, 5(3), 457-472.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. Cell, 128: 693-705.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. Current Opinion in Genetics & Development, 12(2), 198-209.
- Krauss, V. (2008). Glimpses of evolution: heterochromatic histone H3K9 methyltransferases left its marks behind. Genetics, 133: 93-106.

Lafos, M. y Schubert, D. (2009). Balance of power-dynamic regulation of chromatin in

plant development. The Journal of Biological Chemistry., 390, 1113-1123.

- Lauria, M., y Rossi, V. (2011). Epigenetic control of gene regulation in plants. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Gene Regulatory Mechanisms, 1809(8):369-378.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S. y Terzi, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theoretical and Applied Genetics, 77(3), 325-331.
- Luger K. (2003). Structure and dynamic behavior of nucleosomes. Current Opinion in Genetics & Development, 13:127.
- Miguel, C. y Marum, L. (2011). An epigenetic view of plant cells cultured *in vitro*: somaclonal variation and beyond. Journal of Experimental Botany, 62:3713–3725.
- Mohanty, S., Panda, Subudhi, M.E. y Nayak, S. (2008). Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and *in vitro* detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis. Biology Plant, 52: 783-786.
- Ruiz-Garcia, L., Cervera, M.T. y Martinez-Zapater, J.M. (2005). DNA methylation increases throughout Arabidopsis development. Planta, 222:301–306.
- Solomon, M.J., Larsen, P.L. y Varshavsky, A. (1988). Mapping protein DNA interactions in vivo with formaldehyde: evidence that histone H4 is retained on a highly transcribed gene. Cell, 53(6), 937-947.
- Tanurdzic, M., Vaughn, M.W., Jiang, H., Lee, T.-J., Slotkin, R.K., Sosinski, B., Thompson, W.F., Doerge, R.W. y Martienssen, R.A. (2008). Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. PLoS Biology, 6(12), e302.
- Valledor, L., Hasbún, R., Meijón, M., Rodríguez, J.L., Santamaria, E., Viejo, M., Berdasco, M., Feito, I., Fraga, M., Cañal, M. J. y Rodríguez, R. (2007). Involvement of DNA methylation in tree developmental and micropropagation. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 91, 75-86.
- Waller, F., Furuya, M., y Nick, P. (2002). OsARF1, an auxin response factor from rice, is auxin-regulated and classifies as a primary auxin responsive gene. Plant Molecular Biology, 50(3), 415-425.
- Zhang, X., Bernatavichute, Y.V., Cokus, S., Pellegrini, M. y Jacobsen, S.E. (2009). Genome-wide analysis of mono-, di- and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. Genome Biology, 10(6), R62-R62.

CAPÍTULO VI

DISCUSIONES Y CONCLUSIONES

6.1 DISCUSIÓN GENERAL

Para las plantas es fundamental tener una respuesta rápida ante cambios bióticos y/o abióticos (He *et al.*, 2011) y esto ha sido posible debido a que los tejidos somáticos diferenciados de las plantas pueden ser reprogramados para generar nuevos órganos. Esta enorme capacidad regenerativa que poseen las plantas a través de la capacidad de las células somáticas para diferenciarse viene acompañada de una reorganización global de la cromatina asociada a una reprogramación en la expresión génica (Grafi *et al.*, 2007). Por tal motivo, cambios rápidos en la estructura de la cromatina tienen un papel fundamental en la regulación de la expresión de genes los cuales permiten a las plantas responder y adaptarse al estrés que se produce frente a situaciones adversas o de estrés, como es el caso del cultivo *in vitro* (Bruce *et al.*, 2007; Zhou y Hu, 2010).

Dentro del cultivo *in* vitro, la micropropagación es una poderosa herramienta para escalar la producción de plantas de importancia económica y agronómica, potenciando así la productividad de los cultivos (Díaz-Martínez *et al*; 2012; De-la-Peña *et al.*, 2012b; Robert *et al.*, 1992). Se sabe que la epigenética de un organismo puede cambiar dependiendo del desarrollo (Kaufmann *et al.*, 2010) y de las interacciones bióticas (De-la-Peña *et al.*, 2012a) y abióticas (Gutzart y Mittelsten, 2012; Kim *et al.*, 2010). Por lo tanto, el mecanismo de respuesta al estrés, debido a la exposición de reguladores de crecimiento durante las condiciones *in vitro*, podrían ser clave en la regulación por factores epigenéticos. Las plantas propagadas y regeneradas por cultivo *in vitro* pueden presentar cambios genéticos y epigenéticos (Bairu *et al.*, 2011; Baranek *et al.*, 2010; Varga *et al.*, 1988). Se ha encontrado que los reguladores de crecimiento vegetal (RCV), principalmente las auxinas, pueden promover cambios epigenéticos en las plantas (LoSchiavo *et al.*, 1989). El proceso de regulación génica depende en gran manera de las modificaciones postranscripcionales de las histonas (Bannister y Kouzarides, 2011; Chynnusamy y Zhu, 2009; Shen y Xu, 2009; Kouzarides, 2007; Kozarides, 2002).

Es por esta razón que en esta tesis, se avaluó el efecto de la auxinas, el AIA como auxina

natural y el 2.4-D como auxina síntetica a una concentración de 0.5uM, en la regulación de los genes ARF, por medio de la técnica del ChiP, en condiciones in vitro en tres especies de Agave. En la micropropagación del Agave (Robert et al., 2006) se utiliza el 2,4-D en la fase de multiplicación a una concentración de 0.11 uM en el medio de cultivo. En los experimentos realizados se observó que las plantas con 2,4-D, presentaron una mayor altura en A. tequilana, un mayor número de hojas en A. fourcroydes y un mayor de peso en A. angusfifolia y A. fourcroydes (Figuras 2.8, 2.12, 2.16 y 2.17). Resultados similares por el uso de este regulador de crecimiento son variantes en el número y tamaño de las flores en Begonia x elatior y Saintpaulia ionantha L. (Jain, 1997), diferencias en el peso y morfología de las hojas y tallos en Bromus inermis Leyss. (Wattanasiri y Walton, 1993), alta respuesta embriogénica entre las clonas obtenidas en Freesia hybrida Klatt (Gao et al., 2010); variaciones fenotipicas como altura, número de flores y órganos sexuales fusionados en Torenia fournieri Linden ex E. Fourn. (Hadi y Bridgen, 1996), diferencias en el tamaño de las espigas y el número de semillas por espiga en trigo (Hashim et al., 1990) y es probable que A. angustifolia Haw. haya sido más susceptible al 2,4-D produciendo la formación de callos (Figura 2.17).

El análisis de la evolución de los genes ARF es muy importante para el entendimiento de la señalización de las auxinas en la evolución de las plantas terrestres. Sin embargo, la familia de los genes ARF es muy grande y presentan redundancia funcional entre ellas; lo que hace complicado entender su evolución (Finet et al., 2013). De igual manera, en esta tesis se realizó un análisis filogenético de los transcritos que codifican a los ARF en variedades de Agave y se encontraron 32. Finet et al, 2013, reportó que los resultados de una análisis filogenético de genes ARF de diferentes especies: A. thaliana, B. distachvon, C. papaya, C. clementina, C. sativus, E. grandis, G. max, M. esculenta, M. truncatula, M. guttatus, O. sativa, P. trichocarpa, P. patens, P. persica, R. communis, S. moellendorffii, S. italica, S. bicolor, V. vinifera y Z. mays se agrupaban en tres clados que podrian remontarse al origen de las plantas terrestres; este mismo resultado lo obtuvimos en nuestro análisis filogenético de los 32 ARFs putativos (Figura 3.7), a los cuales se le hizo un análisis de dominios (Figura 3.3), donde se observó que 9 de estos transcritos no contenian el dominio de unión al ADN (dominio B3), por lo que esos 9 fueron considerados pseudo genes (genes sin función) en base a lo reportado por Zhang et al., (2012), donde consideran que secuencias ARF de Brassica rapa que no contienen al domino B3, son genes con perdida de función. De la misma forma para nosotros los 23

transcritos restantes tienen todos los dominios para ser considerados como potencialmente transcripcionalmente activos. Para corroborar si efectivamente los 9 transcritos que carecen del domininio B3 son potencialmente pseudogenes es necesario realizar un RT-PCR.

Se lograron aislar 5 cinco genes *ARF* putativos *ARF1*, *ARF2a*, *ARF5*, *ARF7a* y *ARF17* en las tres especies de *Agave*, *a* los cuales se les midió su expresión relativa a los 0, 3 y 21 días en presencia y ausencia de las auxinas 2,4-D y ácido indolacético (AIA). Se encontró que *ARF1* y *ARF5* mostraron una expresión diferencial dependiendo de la especie y el tiempo de tratamiento con las auxinas (Figura 4.2). Inukai *et al.*, 2005, reportaron que en *O. sativa*, el gen crown rootless1 (*Crl1*) codifica a un regulador positivo para la formación de raíces de la corona y laterales, en respuesta a tratamientos de 10⁻⁵ a10⁻⁹ M de AIA, 2,4-D y ANA y su expresión es directamente regulada por el gen *OsARF1* en la via de señalización de auxinas (Waller *et al.*, 2002). Lo anterior concuerda con lo observado en el análisis de expresión con *ARF1* en las 3 especies (Figura 3.14), ya que se presentó la formación de raíces (Figura 2.15). Se ha reportado que la expresión de los genes *ARF4*, *ARF16* y *ARF19* en *A. thaliana* se expresan en función de la concentración y el tiempo de exposición a auxinas (Paponov *et al.*, 2008).

Estudios en varias especies han confirmado que el estrés provocado en los sistemas de micropropagación pueden producir modificaciones epigenéticas en las histonas principalmente por metilaciones que son las que más se han visto afectan la transcripción. Por ejemplo, De-la-Peña *et al.*, 2012b, reportaron que la expresión reguladora de *AtqKNOX1* es epigenéticamente regulada por las marcas H3K4me3 y H3K9me2 durante el cultivo *in vitro*. En la presente tesis se encontró que en *A. angustifolia* Haw., el gen *ARF1* (Figura 5.3; Cuadro 5.2), presentó un enriquecimiento de la marca H3K4me3 en las condiciones del día 21 (T₂₁) S/R, AIA y 2,4-D. Esto sugiere que para *ARF1* hubo un cambio en la modulación de la cromatina, favoreciendo el estado de eucromatina a los 21 días (T₂₁) en todos los tratamientos (S/R, AIA y 2,4-D) aunado a un incremento en su expresión en la condición T₂₁ AIA (Figura 4.4). En el caso de *A. fourcroydes* Lem., la marca H3K4me3 solo está presente en el día 0 (T₀) y posteriormente en los tratamientos del día 21, aparace la marca H3K9me2 que se relacionó a la represión de este gen (Figura 5.2) en este caso, existe igual un cambio en la modulación de la cromatina) y se presenta tambien una disminución en su

expresión (Figura 4.4). Para *A. tequilana* Weber var. Azul, se observó un cambio de eucromatina a heterocromatina en el tratamiento al día 21 (T₂₁) con 2,4-D; aunque en su expresión se observa un aumento en los tratamientos del día 21 (T₂₁), cabe la posibilidad que otra marca de represion como la H3K9me3 o H3K21me pudieran estar presentes.

En cuanto al gen *ARF5* se observó que en *A. angustifolia* Haw., hubo un total enriquecimiento de la marca H3K4me3 en todas las condiciones esto indica que esta en estado de eucromatina y de igual forma que en *ARF1*, su expresión se ve aumentada en la condición con AIA al día 21 (T₂₁) (Figura 4.4). En *A. fourcroydes* Lem. y *A. tequilana* Weber var. Azul, se observó el mismo patrón que ARF1 en el enriquecimiento de las marcas H3K4me3 y H3K9me2 (Figura 5.3; Cuadro 5.3).

6.2 CONCLUSIONES GENERALES

Con los resultados generados de este estudio, se llegaron a las siguientes conclusiones:

- Se demostró que en la parte del análisis fenotípico, existe una diferencia estadísticamente significativa en la altura, peso y número de hojas dependiendo de la especie en el tipo de auxinas y al tiempo de exposición a estas.
- A. tequilana Weber var. Azul, tuvo la mayor altura así como el mayor peso de las tres especies, aunque A. fourcroydes Lem. presentó el mayor número de hojas.
- Se encontraron 23 genes ARF con posibilidad de ser transcripcionalmente activos, y 9 fueron considerados pseudo genes. Se aislaron los genes ARF1, ARF2a, ARF5, ARF7a y ARF17, los cuales tuvieron homología con genes ARF de Z. mays y O. sativa.
- ✓ La expresión de los genes ARF1, ARF2a, ARF5, ARF7a y ARF17 depende de la especie (A. angustifolia Haw., A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul) y el tiempo de exposición a las condiciones sin auxinas (S/R), el ácido indol-3-acético (AIA) y el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D).
- ✓ Se encontró que ARF1 y ARF5 presentan el mismo perfil de metilación en la histona H3 en las especies A. fourcroydes Lem. y A. tequilana Weber var. Azul, el cual fue diferente para A. angustifolia Haw.

6.3 PERSPECTIVAS

Al concluir este trabajo de investigación surgieron las siguientes perspectivas:

- Medir la cantidad de auxinas (libres y conjugadas) endógenos antes, durante y después de los tratamientos con AIA, 2,4-D y sin auxinas.
- Corroborar los resultados de expresión mediante la técnica de RT-PCR cuantitativo de ARF 1, 2a, 5, 7a y 17.
- Realizar el ChIP del gen ARF17 por su interesante respuesta a AIA y 2,4-D al día 21 en A. tequilana Weber var. Azul.
- Realizar la técnica del Rapid Amplifications of cDNA Ends (RACE), en los extremos 5'y 3-PCR de los genes ARF1 y ARF5 para así conocer (mapear) el gen completo de los genes ARF1 y ARF5
- 5. Analizar la expresión y el ChiP de otros genes ARF en las tres especies.
 - Analizar la metilación global del ADN así como de los pequeños ARN para tener una visión más completa de los tres mecanismos epigenéticos

6.4 BIBLIOGRAFIA

- Baránek, M., Křížan, B., Ondrušíková, E., y Pidra, M. (2010). DNA-methylation changes in grapevine somaclones following *in vitro* culture and thermotherapy. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 101(1): 11-22.
- Bairu, M., Aremu, A., and Van Staden, J. (2011). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. Plant Growth Regulation, 63(2), 147-173.
- Bannister, J. y Kouzarides, T. (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. Cell Research. 21: 381-395.
- Bruce, T., Mazur, E., Napier, J. y Pickett, J. (2007). Stressful "memories" of plants: evidence and possible mechanisms. Plant Science. 173: 603-608.
- Chynnusamy, V. y Zhu, J-K. (2009). Epigenetic regulation of stress responses in plants. Current Opinion in Plant Biology, 133-139.
- De-la-Peña, C., Rangel-Cano, A. y Alvarez-Venegas, R. (2012a). Regulation of diseaseresponsive genes mediated by epigenetic factors: interaction of Arabidopsis-Pseudomonas, Molecular Plant Pathology, 388-398.
- De-la-Pena, C., Nic-Can, G., Ojeda, G., Herrera-Herrera, J., Lopez-Torres, A., Wrobel, K. y Robert-Diaz, M. (2012b). KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during in vitro conditions in Agave spp. BMC Plant Biology, 12(1), 203.
- Díaz-Martínez, M., Nava-Cedillo, A., Guzmán-López, J.A., Escobar-Guzmán, R., y Simpson, J. (2012). Polymorphism and methylation patterns in Agave tequilana Weber var. 'Azul' plants propagated asexually by three different methods. Plant Science, 185–186(0), 321-330.
- Finet, C., Berne-Dedieu, A., Scutt, C.P. y Marlétaz, F. (2013). Evolution of the ARF gene family in land plants: old domains, new tricks. Molecular Biology and Evolution, 30(1), 45-56.
- Gao, X., Yang, D., Cao, D., Ao, M., Sui, X., Wang, Q., Kimatu J.N. y Wang, L. (2010). In vitro micropropagation of Freesia hybrida and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. Journal of Plant Growth Regulators, 257-267.
- Grafi, G., Ben-Meir, H., Avivi, Y., Moshe, M., Dahan, Y. y Zemach, A. (2007). Histone methylation controls telomerase-independent telomere lengthening in cells undergoing dedifferentiation. Developmental Biology, 306 (2), 838-846.

- Gutzart, R. y Mittelsten, S.O. (2012). Epigenetic responses to stress: triple defense?. Current Opinion in Plant Biology, 15(5): 568-573.
- Hadi, M.Z. y Bridgen, M.P.(1996). Somaclonal variations as a tool to develop pest resistant plants of *Torenia fournieri* Compacta Blue. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 43-50.
- Hashim, Z. N., Campbell, W.F. y Carman, J.G. (1990). Morphological analyses of spring wheat (CIMMYT cv. PCYT-10) somaclones, Plan Cell Tissue and Organ Culture, 95-99.
- He, X., Chen, T. y Zhu, J. (2011). Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. Cell Research. 21: 442-465.
- Inukai, Y., Sakamoto, T., Ueguchi-Tanaka, M., Shibata, Y., Gomi, K., Umemura, I., Hasegawa, Y., Ashikari, M., Kitano, H. y Matsuoka, M. (2005). Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. Plant Cell, 17(5), 1387-1396.
- Jain, S.M. (1997). Micropropagation of selected somaclones of Begonia and Saintpaulia , Journal of Bioscience, 22: 585-592.
- Kaufmann, K., Pajoro, A. y Angenet G.C. (2012). Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches, Natural Reviews Genetic, 830-824.
- Kim, J.M., To, T.K., Nishioka, T. y M. Seki, M. (2010). Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses, Plant Cell Enviroment, 604-611.
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. Cell, 128: 693-705.
- Kouzarides, T. (2002). Histone methylation in transcriptional control. Current Opinion in Genetics & Development, 12(2), 198-209.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., Giuliano, G., Torti, G., Nuti-Ronchi, V., Marazziti, D., Vergara, R., Orselli, S. y Terz, M. (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theoretical and Applied Genetics, vol. 77, no. 3, pp. 325– 331.
- Paponov, I.A., Paponov, M., Teale, W., Menges, M., Chakrabortee, S., Murray, J.A.H. y Palme, K. (2008). Comprehensive transcriptome analysis of auxin responses in Arabidopsis. Molecular Plant, 1(2), 321-337.
- Robert, M.L., Herrera, J.L., Herrera-Herrera, G., Herrera-Alamillo, M.A. y Fuentes-Carrillo, P. (2006). A new temporay immersion bioreactor system for micropropagation, en:

Methods in Molecular Biology: Plant Cell Culture Protocols, Second Edition, Loyola-Vargas, V. y Vázquez-Flota, F. (eds). Humana Press Inc., Totowa, NJ. 318, 121-129.

- Robert, M., Herrera, J., Chan, J. y Contreras, F. (1992). Micropropagation of Agave spp. Biotechnology in Agriculture and Forestry, 306 - 329.
- Shen, W.H. y Xu, L. (2009). Chromatin remodelling in stem cell maintenance in Arabidopsis thaliana. Molecular Plant, 2(4): 600-609.
- Varga, A., Thoma, L. H. y Bruinsma, J. (1988). Effects of auxins and cytokinins on epigenetic instability of callus-propagated Kalanchoe blossfeldiana Poelln. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 15(3), 223-231.
- Waller, F., Furuya, M. y Nick, P. (2002). OsARF1, an auxin response factor from rice, is auxin-regulated and classifies as a primary auxin responsive gene. Plant Molecular Biology, 50(3), 415-425.
- Wattanasiri, C. y Walton, P.D. (1993). Effects of growth regulators on callus cell growth, plant regeneration, and somaclonal variation of smooth bromegrass (*Bromus inermis* Leyss.), Euphytica, 77-82.
- Zhang, T., Li, R.-c., Zhao, J.-h., Zheng, X.-m., Yuan, Z.-h. y Yang, C.-y. (2012). Bioinformatic analysis of Auxin Response Factor (ARF) gene family in Rape. 2012 International Conference on Biomedical Engineering and Biotechnology. pp. 86-89.
- Zhou, D, y Hu, Y. (2010). Regulatory function of histone modifications in controlling rice gene expression and plant growth. Rice, 3: 103-111.