



Centro de Investigación Científica de
Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO MOLECULAR Y EPIGENÉTICO DEL
ALBINISMO EN CULTIVOS *in vitro* DE *Agave
angustifolia* Haw.**

Tesis que presenta

Rosa Yazmín Us Camas

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México, 2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

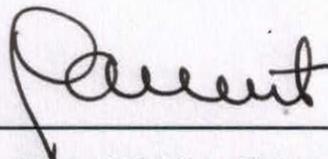
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de ROSA YAZMIN US CAMAS titulado ESTUDIO MOLECULAR Y EPIGENÉTICO DEL ALBINISMO EN CULTIVOS, fue realizado en 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, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Manuel Martínez Estevez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, junio de 2018.

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 registrarán 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:



M. en C. Rosa Yazmín Us Camas

AGRADECIMIENTOS

A mi asesora, la Dra. Clelia De la Peña Seaman, por su mucha paciencia, por su confianza, corrección y dirección en el proceso de formación del doctorado.

A mi comité tutorial integrado por la Dra. Clelia De la Peña Seaman, el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, el Dr. Manuel L. Robert y el Dr. Raúl Álvarez Venegas, por sus consejos y orientación para la realización de un mejor proyecto de investigación.

A mi comité predoctoral, integrado por la Dra. Renata Rivera Madrid, la Dra. Blondy Beatriz Canto Canché, la Dra. Virginia Aurora Herrera Valencia, el Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, el Dr. Manuel L. Robert y el Dr. Raúl Álvarez Venegas, por sus valiosos consejos para mi formación académica.

A Eduardo Castillo, por su ayuda en el mantenimiento de las plantas y en la realización de algunos experimentos.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), por la beca otorgada (# 242997) para la realización de mis estudios de doctorado y al financiamiento proporcionado por el proyecto CB2016-285898 para la realización de los experimentos y la finalización de esta tesis.

A las Maestras en Ciencias Sara Hernández Castellanos y Fátima Patricia Duarte Aké, por su amistad, por el tiempo compartido en el laboratorio, por el apoyo técnico brindado por cada una de ellas, pero sobre todo porque gracias a su compañía el doctorado fue ameno, divertido y agradable.

A todos mis compañeros y amigos del CICY (Sara, Fátima, Eduardo Castillo, Doris, Daniel, Inés, Miguel Canseco, Margarita Aguilar y Verónica Limones), que de alguna manera contribuyeron con su opinión, ayuda y compañía en la finalización de esta etapa de mi formación académica.

DEDICATORIAS

Primeramente a Dios, por proveerme de salud, fuerza, inteligencia y sabiduría para finalizar este trabajo.

A mis padres, por su apoyo incondicional y porque siempre han puesto su confianza en mí.

En especial a mi madre por sus consejos, confianza, apoyo y motivación para la finalización del doctorado.

A mi hermana y a toda mi familia por su apoyo y confianza.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	vi
LISTADO DE TABLAS.....	ix
ABREVIATURAS	xi
RESUMEN.....	xiii
ABSTRACT	xv
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES	3
1.1. FOTOSÍNTESIS Y BIOSÍNTESIS DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS.....	3
1.1.1. FOTOSÍNTESIS EN PLANTAS.....	3
1.1.2. BIOSÍNTESIS DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS.....	5
1.1.2.1. Biosíntesis de clorofilas.....	5
1.1.2.1.1. Ciclo de las clorofilas.....	7
1.1.2.2. Biosíntesis de carotenoides	8
1.2. EL ALBINISMO EN LAS PLANTAS.....	11
1.2.1. FACTORES QUE CAUSAN ALBINISMO EN PLANTAS.....	12
1.2.2. VARIEGACIÓN EN PLANTAS.....	16
1.3. EPIGENÉTICA	18
1.3.1. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA	19
1.3.2. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN LAS HISTONAS.....	20
1.3.2.1. Metilación en las histonas	22
H3K4.....	22
H3K36.....	23
H3K9.....	24
H3K27	25
1.3.2.2. Acetilación en las histonas.....	26

H3K9ac	26
Deacetilasas de histonas (HDACs)	27
1.3.3. METILACIÓN EN EL ADN	29
1.4. MODELO DE ESTUDIO: AGAVES	32
1.4.1. <i>Agave angustifolia</i> Haw.	33
JUSTIFICACIÓN	34
PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN	35
HIPÓTESIS	36
OBJETIVO GENERAL	37
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	37
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	38
CAPÍTULO II	39
PERFIL DE CAROTENOIDES Y CLOROFILAS DE LOS CULTIVOS CON FENOTIPOS VERDE, VARIEGADO Y ALBINO DE <i>A. angustifolia</i> Haw.....	39
2.1. INTRODUCCIÓN	39
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	40
2.2.1. Material vegetal.....	40
2.2.2. Cuantificación de carotenoides y clorofilas por HPLC	41
2.2.3. Análisis estadístico	42
2.3. RESULTADOS.....	42
2.3.1. Micropropagación de <i>Agave angustifolia</i> Haw.....	42
2.3.2. Cuantificación de carotenoides y clorofilas.....	43
2.4 DISCUSIÓN	46
CAPÍTULO III	49
NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES, BIOSÍNTESIS/DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS Y FOTOSÍNTESIS EN LOS CULTIVOS CON FENOTIPO VERDE, VARIEGADO Y	

ALBINO DE <i>A. angustifolia</i> Haw.	49
3.1. INTRODUCCIÓN	49
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	50
3.2.1. Material vegetal.....	50
3.2.2. Diseño de oligos	51
3.2.3. Medición de los niveles de expresión por PCR de punto final y tiempo real (RT-qPCR).....	51
3.2.4. Purificación de fragmentos de ADN	54
3.2.5. Análisis de los datos	54
3.3. RESULTADOS	54
3.3.1. Secuenciación de los fragmentos amplificados	54
3.3.2. Análisis de los niveles de expresión de genes que codifican a enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides	55
3.3.3. Análisis de los niveles de expresión de genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en biosíntesis/degradación de clorofila y fotosíntesis	59
3.4. DISCUSIÓN	62
CAPÍTULO IV	67
ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE LOS CULTIVOS CON FENOTIPO VERDE, VARIEGADO Y ALBINO DE <i>A. angustifolia</i> Haw.	67
4.1. INTRODUCCIÓN	67
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS	68
4.2.1. Material vegetal.....	68
4.2.2. Análisis de AFLP	69
4.2.3. Análisis de los datos	70
4.3. RESULTADOS	71
4.3.1. Análisis de la variabilidad genética.....	71
4.4. DISCUSIÓN	73
CAPÍTULO V	75
ANÁLISIS DE LA METILACIÓN GLOBAL EN EL ADN Y DE LA ACUMULACIÓN DE	

DIFERENTES MARCAS EN HISTONAS EN LOS CULTIVOS CON FENOTIPO VERDE, VARIEGADO Y ALBINO DE <i>A. angustifolia</i> Haw.....	75
5.1. INTRODUCCIÓN	75
5.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	76
5.2.1. Material vegetal.....	76
5.2.2. Extracción de ADN.....	76
5.2.3. Metilación global del ADN por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)	77
5.2.4. Aislamiento de histonas y western blot	78
5.2.5. Análisis de los datos	79
5.3. RESULTADOS.....	80
5.3.1. Metilación global del ADN	80
5.3.2. Acumulación de diferentes marcas en histonas involucradas en la activación y represión transcripcional de genes	81
5.4. DISCUSIÓN	83
CAPÍTULO VI.....	87
NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN A DEACETILASAS DE HISTONAS (HDACS) Y METILTRANSFERASAS DE ADN EN LOS CULTIVOS CON FENOTIPO VERDE, VARIEGADO Y ALBINO DE <i>A. angustifolia</i> Haw.....	87
6.1. INTRODUCCIÓN	87
6.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	90
6.2.1. Material vegetal.....	90
6.2.2. Diseño de oligos	91
6.2.3. Medición de los niveles de expresión por PCR en tiempo real (RT-qPCR)	93
6.2.4. Purificación de fragmentos de ADN	93
6.2.5. Análisis de los datos	94
6.3. RESULTADOS.....	94
6.3.1. Secuenciación de los fragmentos amplificados	94
6.3.2. Análisis de expresión de genes que codifican a deacetilasas de histonas (HDACs)	95
6.3.3. Análisis de expresión de genes que codifican a metiltransferasas de ADN	97

6.4. DISCUSIÓN	99
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	107
CONCLUSIONES	107
PERSPECTIVAS	109
ARTÍCULOS PUBLICADOS	111
BIBLIOGRAFÍA.....	113

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Ruta de biosíntesis de las clorofilas.....	6
Figura 1.2 Ciclo de las clorofilas.....	8
Figura 1.3. Ruta de biosíntesis de los carotenoides en las plantas..	10
Figura 2.1 Fenotipos encontrados durante la micropropagación de la clona 26S de <i>A. angustifolia</i> Haw.	42
Figura 3.1 Expresión relativa de los genes que codifican a enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides y en la regulación epigenética de la biosíntesis de carotenoides.....	58
Figura 3.2 Expresión relativa de genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en biosíntesis/degradación de clorofilas y fotosíntesis..	60
Figura 3.3 Expresión relativa de genes que codifican a las enzimas involucradas en la fotosíntesis.).....	62
Figura 4.1 Dendograma UPGMA que muestra la similitud genética entre los diferentes fenotipos de <i>A. angustifolia</i> Haw. y <i>A. tequilana</i> Weber var. “Azul” mediante AFLP.....	72
Figura 5.1 Porcentaje de la 5-metil-2´-desoxicitidina del ADN genómico de tejidos con diferente fenotipo de <i>A. angustifolia</i> Haw.....	80
Figura 5.2 Inmunodetección de diferentes marcas en las histonas involucradas en la activación (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3) transcripcional de genes en tejidos de <i>A. angustifolia</i> Haw.....	82
Figura 5.3 Análisis densitométrico de las marcas en las histonas involucradas en la activación (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3) transcripcional de genes en tejidos de <i>A. angustifolia</i> Haw.....	82
Figura 6.1 Expresión relativa de los genes que codifican a las deacetilasas de histonas (<i>HDA5</i> , <i>HDA6</i> , <i>HDA8</i> y <i>HDA9</i>).....	96

Figura 6.2 Expresión relativa de los genes que codifican a las deacetilasas de histonas (*HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*)..... 97

Figura 6.3 Expresión relativa de los genes que codifican a metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *CMT3* y *DRM3*)..... 99

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2.1 Niveles de carotenoides y clorofilas en los tejidos de <i>A. angustifolia</i> Haw. con diferente fenotipo analizados por HPLC.....	45
Tabla 3.1 Secuencias utilizadas para el diseño de los oligos de los diferentes genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en la biosíntesis de carotenoides, en la regulación epigenética de la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación de clorofila y fotosíntesis.....	52
Tabla 3.2 Secuencia de los oligos diseñados para los análisis de expresión de genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en la ruta de biosíntesis de carotenoides, en la regulación epigenética de la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación de clorofila y fotosíntesis enlistados en la tabla 3.1.....	53
Tabla 3.3 Resultados del análisis bioinformático de los fragmentos correspondientes a genes que codifican a enzimas y/o proteínas de la biosíntesis de carotenoides, de la regulación epigenética de la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación clorofila y fotosíntesis.....	55
Tabla 4.1 Secuencia de los oligos específicos y las combinaciones utilizadas para el análisis de AFLP.....	70
Tabla 4.2 Niveles de polimorfismo observados por combinación de oligos entre los fenotipos de <i>A. angustifolia</i> Haw.	71
Tabla 4.3 Similitud genética dentro de los diferentes fenotipos de <i>A. angustifolia</i> Haw. y entre <i>A. tequilana</i> Weber var. “Azul”.	73
Tabla 5.1 Especificaciones de los anticuerpos utilizados para los análisis de Western blot.	79
Tabla 6.1 Secuencias utilizadas para el diseño de los oligos de genes que codifican a deacetilasas de histonas (<i>HDA5</i> , <i>HDA6</i> , <i>HDA8</i> , <i>HDA9</i> , <i>HDA14</i> , <i>HDA15</i> , <i>HDA18</i> y <i>HDA19</i>) y metiltransferasas de ADN (<i>MET1</i> , <i>MET1B</i> , <i>CMT3</i> y <i>DRM3</i>).....	91

Tabla 6.2 Secuencia de los oligos diseñados para los análisis de expresión de genes que codifican a deacetilasas de histonas (*HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) y metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *CMT3* y *DRM3*)..... 92

Tabla 6.3 Resultados del análisis bioinformático de los fragmentos enviados a secuenciar correspondientes a las deacetilasas de histonas (*HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) y metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *DRM3* y *CMT3*).. 95

ABREVIATURAS

A	Tejido albino
ABA	Ácido abscísico
AFLP	Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados
ARNi	ARN de interferencia
ARNr	ARN ribosomal
AV	Región albina del tejido variegado
5-Azc	5-azacitidina
β -OHasa	BETA CAROTENO HIDROXILASA
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
Chl <i>a</i>	Clorofila <i>a</i>
Chl <i>b</i>	Clorofila <i>b</i>
CLH2	Clorofilasa 2
CMT3	CROMOMETILASA 3
CRTISO	CAROTENO ISOMERASA
DRM2	METILTRANSFERASAS CON DOMINIO REAREGLADO 2
G	Tejido verde
GGPP	Geranylgeranyl difosfato
GV	Región verde del tejido variegado
H3	Histona H3
H3K9ac	Acetilación de la lisina 9 de la histona H3
H3K4me2	Dimetilación de la lisina 4 de la histona H3
H3K9me2	Dimetilación de la lisina 9 de la histona H3
H3K36me2	Dimetilación de la lisina 36 de la histona H3
H3K27me3	Trimetilación de la lisina 27 de la histona H3
HATs	Acetiltransferasas de histonas
HDACs	Deacetilasas de histonas
HDA5	DEACETILASA DE HISTONA 5
HDA6	DEACETILASA DE HISTONA 6
HDA8	DEACETILASA DE HISTONA 8
HDA9	DEACETILASA DE HISTONA 9

HDA10	DEACETILASA DE HISTONA 10
HDA14	DEACETILASA DE HISTONA 14
HDA15	DEACETILASA DE HISTONA 15
HDA18	DEACETILASA DE HISTONA 18
HDA19	DEACETILASA DE HISTONA 19
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia
K	Lisina
LCY β	LICOPENO BETA CICLASA
LCY ϵ	LICOPENO ÉPSILON CICLASA
LHCP	PROTEÍNA DE UNIÓN A CLOROFILA A/B
5mdc	5-metil-2'-desoxicitidina
MET1	METILTRANSFERASA DE ADN 1
MET1B	METILTRANSFERASA DE ADN 1B
Mgche	MAGNESIO QUELATASA
PEPCasa	FOSFOENOL PIRUVATO DESCARBOXILASA
PDS	FITOENO DESATURASA
PSY	FITOENO SINTASA
RUBISCO	RIBULOSA 1,5 BIFOSFATO CARBOXILASA OXIGENASA
rubL	SUBUNIDAD MAYOR DE LA RUBISCO
rubS	SUBUNIDAD MENOR DE LA RUBISCO
SDG8	METILTRANSFERASA DE HISTONA SDG8
TSA	Tricosantina A
V	Tejido variegado
VDE	VIOLAXANTINA EPOXIDASA
ZDS	ZETA CAROTENO DESATURASA

RESUMEN

En las plantas el albinismo se caracteriza por la pérdida parcial o total de los pigmentos de clorofila en tejidos normalmente verdes. En las plantas, las causas del albinismo son diversas, desde factores genéticos, como mutaciones de genes, hasta factores ambientales como la luz, la temperatura y alteraciones en las condiciones del medio de cultivo durante el cultivo *in vitro*. De forma general, las plantas albinas presentan una reducción en el contenido de clorofilas y carotenoides así como un desarrollo incorrecto de los cloroplastos. A nivel molecular y genético se han realizado diversos avances que han permitido entender parte de los mecanismos que pudieran estar involucrados en la generación del albinismo. Por ejemplo, se sabe que mutaciones en genes que codifican a enzimas involucradas en la biosíntesis de clorofilas y carotenoides pueden generar un fenotipo albino que incluso puede llegar a ser letal. Por otro lado, existen algunas evidencias de la regulación epigenética y su relación con la generación del albinismo en plantas, sin embargo, hasta el momento poco se ha explorado sobre los cambios generados en la metilación en el ADN y las modificaciones en las histonas y de cómo estos mecanismos epigenéticos pueden influenciar la generación del albinismo en las plantas.

La mayoría de los estudios sobre albinismo se han realizados a partir de mutantes obtenidas por métodos laboriosos y con altas probabilidades de presentar un fenotipo letal. Sin embargo, las plantas albinas y variegadas de *Agave angustifolia* Haw. utilizadas como modelo en este estudio se produjeron de manera natural durante la micropropagación *in vitro* de plantas verdes de la misma especie, representando un excelente sistema para el estudio del albinismo en plantas.

Con el fin de entender los procesos regulatorios involucrados en el albinismo de *A. angustifolia* Haw., el objetivo del presente trabajo se centró en analizar los cambios moleculares y epigenéticos de los cultivos verdes (G), variegados (V) y albinos (A) de *A. angustifolia* Haw. propagados *in vitro*. Los resultados sugieren que los cultivos albinos presentan una ausencia y/o disminución en la acumulación de la mayoría de los carotenoides analizados (licopeno, β -caroteno, zeaxantina, luteína y ácido abscísico (ABA)), así como de las Chl *a* y *b*. Además, las plantas albinas de *Agave* presentan una disminución en la expresión de genes cruciales en la biosíntesis de carotenoides y

fotosíntesis tales como *PSY*, *PDS*, *LCYE*, *LCYβ*, *rubS*, *PEPCasa* y *LCHP*, sugiriendo una drástica interrupción de estos procesos en dichas plantas. Por otra parte, la acumulación de pigmentos fotosintéticos y un incremento en la expresión de genes en la región verde del tejido variegado (GV), sugiere un mecanismo fotosintético compensatorio y de fotoprotección de GV hacia la región albina del tejido variegado (AV).

La alta similitud genética encontrada entre los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* Haw. sugiere que podrían estar involucrados mecanismos epigenéticos en el albinismo de *A. angustifolia* Haw., por lo que en este trabajo se analizaron la metilación global del ADN y las modificaciones postraduccionales en histonas relacionadas con la activación transcripcional de genes (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3). Aunque no se determinaron diferencias significativas en los niveles de metilación global del ADN, si se observaron incrementos de 1.5 a 4.5 veces de la marca de expresión H3K9ac en los tejidos AV y A, respectivamente, sugiriendo que existe una relajación en la compactación de la cromatina que podría estar relacionada con el fenotipo albino de *A. angustifolia* Haw. Por último y con base en los resultados obtenidos antes descritos, se analizaron los niveles de expresión de diferentes deacetilasas de histonas (*HDACs*) y metiltransferasas de ADN. Los resultados mostraron cambios en los niveles de expresión de las diferentes *HDACs* (*HDA5*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) y metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *CMT3* y *DRM3*) en las plantas albinas, comparadas con las plantas verdes o variegadas lo que sugiere una participación activa de la acetilación de las histonas y de la metilación en regiones específicas del ADN ante la ausencia de clorofila.

ABSTRACT

In plants albinism is characterized by the partial or total loss of chlorophyll pigments in normally green tissues. The causes of albinism are diverse from gene mutations to environmental factors such as light, temperature and alterations in the *in vitro* conditions of the culture medium during *in vitro* culture. In general, albino plants have a reduction in the content of chlorophylls and carotenoids as well as an incorrect development of chloroplasts. At the molecular and genetic level, several advances have been made in order to understand part of the mechanisms that could be involved in the generation of albinism. For instance, it is known that mutations in genes that encode to enzymes involved in the biosynthesis of chlorophylls and carotenoids can generate albino phenotypes, which are not able to survive. On the other hand, there is some evidence of epigenetic regulation and the generation of albinism in plants, but so far little has been explored on the changes generated in DNA methylation and histone modifications and how these epigenetic mechanisms can influence the generation of albinism in plants.

Most studies on albinism are made from mutations obtained by laborious methods and with high probabilities to develop a lethal phenotype. However, the albino and variegated plantlets of *Agave angustifolia* Haw., used as a model in this work, were naturally generated during *in vitro* micropropagation of green plants of the this species, representing an excellent system to study the albinism in plants.

In order to understand the regulatory processes involved in the albinism occurred in *A. angustifolia*, the purpose of the present work was focused on the analysis of the molecular and epigenetic changes of the green (G), variegated (V) and albino (A) *A. angustifolia* Haw plantlets obtained by *in vitro* propagation. The results suggest that albino cultures showed an absence and/or decrease in the accumulation of most of the carotenoids analyzed (lycopene, β -carotene, zeaxanthin, lutein and ABA) as well as Chl *a* and *b*. In addition, the albino plants of *Agave* showed a decrease in the expression of crucial genes of the carotenoids biosynthesis and photosynthesis such as *PSY*, *PDS*, *LCYE*, *LCY β* , *rubS*, *PEPCasa* and *LCHP*, suggesting a drastic disruption of these processes in the plants. Furthermore, pigments accumulation and an increase in the expression of genes in the green region of the variegated tissue (GV), suggested a compensatory photosynthetic mechanism and photoprotection of GV toward the albino region of the variegated tissue

(AV).

The high genetic similarity found among the different phenotypes of *A. angustifolia* Haw. suggest that epigenetic mechanisms could be involved in the albinism of *A. angustifolia* Haw., Therefore, in this work the global DNA methylation and the posttranslational histone modifications related with the transcriptional activation (H3K4me2, H3K36me2 and H3K9ac) and repression (H3K9me2 and H3K27me3) of genes were analyzed. Although no significant differences were found in global DNA methylation, a 1.5 to 4.5 fold increases of the H3K9ac expression mark were found in AV and A tissues, respectively, suggesting that there is a relaxation in the compaction of chromatin that could be related to albinism in *A. angustifolia* Haw. Finally, based on the results obtained previously, the expression levels of different histone deacetylases (*HDACs*) and *DNA* methyltransferases were analyzed. The results showed changes in the expression levels of the different *HDACs* (*HDA5*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) and *DNA* methyltransferases (*MET1*, *MET1B*, *CMT3* y *DRM3*) in A plants compared to G or V plants, suggesting an active participation of histone acetylation and methylation in specific regions of DNA in the absence of chlorophyll.

INTRODUCCIÓN

En plantas, el albinismo se caracteriza por la pérdida parcial o total de los pigmentos participantes en la fotosíntesis, por ello las plantas albinas presentan una muerte prematura (Kumari *et al.*, 2009; Mohanty *et al.*, 2005). El albinismo en plantas puede ser generado por diversos factores, tales como el genotipo de la planta, mutaciones en genes de la biosíntesis de las clorofilas *a* y *b*, incompatibilidad entre el genoma nuclear y el plastídico, alteraciones en el desarrollo correcto del aparato fotosintético y por cambios en las condiciones del medio de cultivo durante el cultivo *in vitro*, entre otros (Kumari *et al.*, 2009).

Además de las clorofilas, también se afecta el contenido de carotenoides en las plantas albinas. Mutantes de diferentes genes que codifican para enzimas involucradas en la ruta de biosíntesis de carotenoides presentan fenotipo albino (Laule *et al.*, 2003; Eisenreich *et al.*, 2001). En cultivos de arroz y tabaco, el silenciamiento del gen que codifica para la enzima PDS (FITOENO DESATURASA) genera un fenotipo albino (Wang *et al.*, 2009; Miki y Shimamoto, 2004). En arroz, las mutantes de la *PDS*, *ZDS* (*ZETA CAROTENO DESATURASA*) y *LCY β* (*LICOPENO BETA CICLASA*) presentan una drástica disminución en los niveles de clorofilas y varios carotenoides y tienen un fenotipo albino letal (Fang *et al.*, 2008).

Por otro lado, existen pocos trabajos que estudian la regulación epigenética del albinismo en las plantas. Por ejemplo, Cazzonelli *et al.* (2009) determinaron que la expresión de *CRTISO* (*CAROTENO ISOMERASA*), la cual codifica para una enzima de la biosíntesis de los carotenoides, es regulada por la METILTRANSFERASA DE HISTONA SET DOMAIN GROUP 8 (*SDG8*). Las plantas mutantes *sdg8* presentaron una disminución en la expresión de *CRTISO* y en el contenido de luteína además de un fotoblanqueo en las hojas (Cazzonelli *et al.*, 2009). Recientemente, en nuestro laboratorio se determinó que la generación de brotes albinos y variegados de *A. angustifolia* Haw. coincidía con una disminución en los niveles de metilación global del ADN de la planta madre (Duarte-Aké *et al.*, 2016). Durante la micropropagación de *A. angustifolia* se generaron brotes albinos y variegados, fenotipos con características definidas y claramente distinguibles del fenotipo verde. La obtención natural, rápida, eficiente y poco laboriosa de plantas albinas de *A. angustifolia* ha representado un excelente modelo para investigar la biología molecular y

los mecanismos epigenéticos que permitan entender los mecanismos que causan el albinismo en la naturaleza.

Con el fin de entender los procesos regulatorios involucrados en el albinismo presente en *A. angustifolia* cultivado *in vitro*, en el presente trabajo se analizaron los cambios moleculares y epigenéticos generados en los fenotipos verdes (G), variegados (V) y albinos (A) de esta planta. Como un primer acercamiento, se analizó el perfil de carotenoides y clorofilas en los tres fenotipos. Así mismo, se analizó el nivel de expresión de diferentes genes que codifican para enzimas y/o proteínas involucradas en la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación de clorofilas y fotosíntesis tales como *PSY*, *PDS*, *LCYE*, *LCYβ*, *VDE*, *β-OHase*, *MgChe*, *rubS*, *rubL*, *PEPCasa* y *LCHP*. También se analizó la variabilidad genética existente entre los fenotipos, mientras que a nivel epigenético se determinó el nivel de metilación global en el ADN y la acumulación de diferentes marcas en histonas relacionadas con la activación transcripcional de genes (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3). Por último y con el fin de tener una comprensión más completa de los resultados epigenéticos obtenidos, se analizaron los niveles de expresión de diferentes deacetilasas de histonas (*HDACs*) y metiltransferasas de ADN en los tres fenotipos estudiados.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1.1. FOTOSÍNTESIS Y BIOSÍNTESIS DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

1.1.1. FOTOSÍNTESIS EN PLANTAS

El término fotosíntesis significa literalmente “síntesis usando luz”. Los organismos fotosintéticos usan la energía solar para sintetizar compuestos de carbono que no pueden ser formados sin energía. Específicamente, la energía luminosa es utilizada para sintetizar ATP y poder reductor en la forma de NADPH y ferredoxina, para posteriormente llevar a cabo la síntesis de carbohidratos a partir de dióxido de carbono (CO_2) y agua, con la generación de oxígeno (Taiz & Zeiger, 2010). Las diferentes especies de plantas utilizan tres rutas bioquímicas para la fijación de CO_2 . El 85% de las plantas utiliza la fotosíntesis tipo C_3 , la cual es un proceso de una etapa que tiene lugar dentro del cloroplasto y utiliza el ciclo de Calvin. La fijación del CO_2 es realizada por la RIBULOSA 1,5 BIFOSFATO CARBOXILASA OXIGENASA (RUBISCO) la cual genera como primer producto orgánico estable al ácido 3-fosfoglicérico una molécula de tres átomos de carbonos, este compuesto de tres carbonos es utilizado para la síntesis de los carbohidratos producto de la fotosíntesis (Taiz y Zeiger, 2010; Edwards y Walker, 1983).

Por muchos años se pensó que ésta era la única forma de fotosíntesis en las plantas. Sin embargo, luego se descubrió una ruta alterna denominada metabolismo C_4 . Las plantas que tienen este tipo de fotosíntesis, tienen una estructura diferente en las hojas. Cuando se realiza un corte transversal de la hoja de una planta con fotosíntesis C_4 , se puede ver que tiene dos tipos de célula que contienen cloroplastos, las células del mesófilo, y las células de la vaina vascular, organizadas en un tipo de anatomía conocida como anatomía Kranz (del alemán anillo).

En estas plantas la incorporación de carbono inorgánico, en productos orgánicos, se lleva a cabo en dos diferentes pasos. Primero, el CO_2 es fijado en las células del mesófilo por medio de la enzima FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPCasa), cuyo verdadero sustrato es el HCO_3^- (anión bicarbonato). El producto de esta reacción es un compuesto de cuatro átomos de carbono, el oxalacetato, el cual es convertido en malato o aspartato dependiendo de la planta. El malato es bombeado dentro de las células de la

vaina vascular y ahí su carbono número cuatro es descarboxilado. El CO_2 producto de esta reacción se convierte en el carbono número uno del 3-fosfoglicerato por medio de la RUBISCO presente en este tipo de células. La PEPCasa y la PIRUVATO-ORTOFOSFATO DICINASA (PPDK) están restringidas a las células del mesófilo; las descarboxilasas y las enzimas del ciclo de Calvin están confinadas a las células de la vaina vascular. La ventaja de la fotosíntesis C_4 es que se produce una mayor concentración de CO_2 en las células de la vaina vascular para la RUBISCO, lo que evita que fotorrespire, haciéndola más eficiente (Taiz y Zeiger, 2010; Edwards y Walker, 1983).

La tercera ruta fotosintética es conocida como el metabolismo ácido de las crasuláceas o CAM, la cual existe en plantas suculentas. Las plantas con metabolismo CAM se pueden encontrar en los géneros *Crassula*, *Kalanchoe*, *Sedum* de la familia de las crasuláceas, así como en numerosas familias de angiospermas, tales como cactáceas y en especies como la piña, la vainilla y la familia agavácea. Este mecanismo le permite a las plantas CAM ser entre cinco y seis veces más eficientes en el uso del agua que las plantas C_3 y C_4 .

Durante la noche las plantas CAM abren sus estomas y el CO_2 difunde dentro de las células del mesófilo de la hoja y es fijado por la enzima PEPCasa usando al fosfoenolpiruvato (PEP) como sustrato y producir oxalacetado como producto en el citoplasma. El oxalacetato es rápidamente convertido en malato, el cual es transportado a las vacuolas. Debido a la acidez de las vacuolas el malato es convertido a ácido málico. Durante el día, cuando los estomas se encuentran cerrados, el ácido málico es transportado desde la vacuola hasta el cloroplasto, en donde la enzima málica-NADP lo descarboxila produciendo CO_2 el cual es fijado por el Ciclo de Calvin (Taiz y Zeiger, 2010; Edwards y Walker, 1983).

En suma, el mecanismo CAM es muy parecido al mecanismo C_4 . En las plantas C_4 la formación de los ácidos de cuatro átomos de carbono está separada espacialmente de su descarboxilación en las células de la vaina vascular. En tanto que en las plantas CAM, la formación de los ácidos de cuatro átomos de carbono está separa tanto espacialmente, como temporalmente.

1.1.2. BIOSINTÉSIS DE PIGMENTOS FOTOSINTÉTICOS

1.1.2.1. Biosíntesis de clorofilas

Los compuestos tetrapirrólicos se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza funcionando como grupos prostéticos en muchas rutas metabólicas y en la absorción de la energía luminosa (Tanaka y Tanaka, 2007). La biosíntesis de los magnesio tetrapirroles, también denominadas clorofilas, se da por una red de rutas que se entrecruzan. Las clorofilas tienen un papel esencial en la fotosíntesis al absorber la energía luminosa y transferir esa energía o electrones a otras moléculas (Tanaka y Tanaka, 2007; Rüdiger y Grimm, 2006).

La biosíntesis de las clorofilas puede ser subdividida en tres partes principales: 1) la formación del ácido 5-aminolevulínico (ALA), 2) la formación de protoporfirina IX y 3) la formación de las clorofilas por la vía dependiente de magnesio (Mg) (Eckhardt *et al.*, 2004) (**Figura 1.1**).

El primer precursor específico para la formación de las clorofilas es el ALA. En las plantas, la formación de ALA inicia con la activación del glutamato mediante la ligación de un ARNt (ARN de transferencia), esta reacción es catalizada por el GLUTAMIL ARNt SINTASA (GluTS), produciendo el glutamil ARNt. Posteriormente la enzima GLUTAMIL ARNt REDUCTASA (GluTR) reduce el grupo carboxilo del glutamil ARNt produciendo el glutamato-1-semialdehído (GSA). El ALA es sintetizada a partir del GSA mediante una serie de reacciones de intercambio de grupos amino catalizadas por el GLUTAMATO-1-SEMIALDEHÍDO AMINOTRANSFERASA (GSA-AT) (Tanaka y Tanaka, 2007; Day *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1996). La condensación de dos moléculas de ALA por la actividad del ALA DEHIDRATASA (ALAD) permite la formación de la molécula de porfobilinógeno (PBG). Posteriormente cuatro moléculas de PBG son polimerizadas por el PBG DEAMINASA (HMSB) dando lugar a la formación de 1-hidroximetilbilano (HMB), el primer tetrapirrol de cadena lineal (Tanaka y Tanaka, 2007; Lim *et al.*, 1994). HMB es ciclado por la actividad del UROPORFIRINÓGENO III SINTASA (UROS) formando uroporfirinógeno III. Posteriormente, el uroporfirinógeno III es convertido a coproporfirinógeno III por la actividad del UROPORFIRINÓGENO III CARBOXILASA (UROD). El coproporfirinógeno III generado es descarboxilado por la actividad del COPROPORFIRINÓGENO III OXIDASA (CPOX) produciendo el protoporfirinógeno IX. Subsecuentemente, el

PROPORFIRINÓGENO IX OXIDASA (PPOX) cataliza la reacción de conversión del proporfirinógeno IX a protoporfirina IX (Tanaka y Tanaka, 2007; Narita *et al.*, 1996). La biosíntesis de las clorofilas continúa con la inserción de Mg al anillo de protoporfirina IX generando Mg-protoporfirina IX, la enzima MAGNESIO QUELATASA (MgChe) realiza esta función (Rüdiger y Grimm, 2006; Willows, 2003) (**Figura 1.1**).

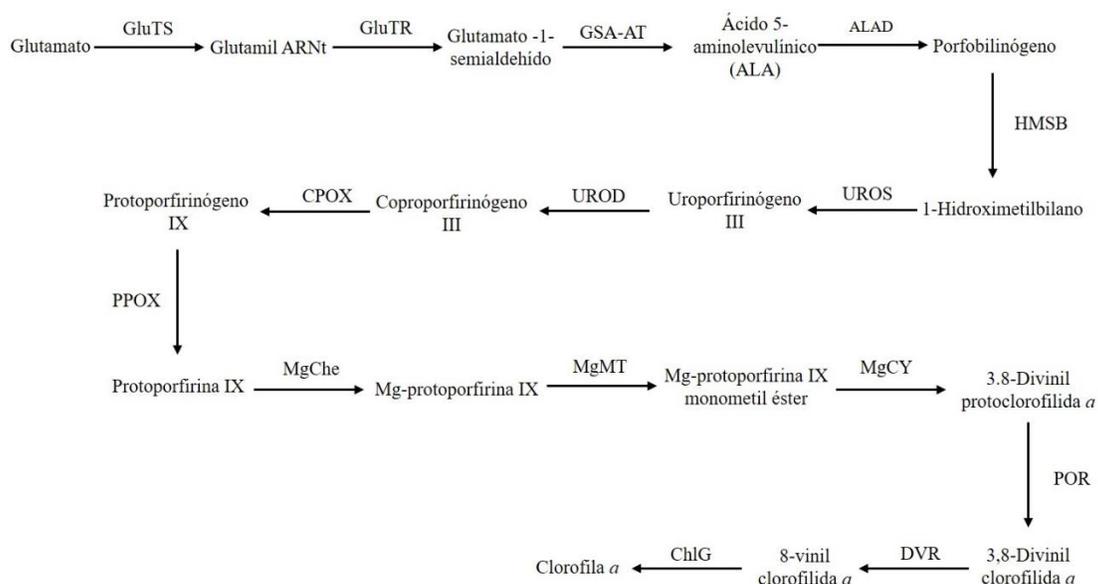


Figura 1.1 Ruta de biosíntesis de las clorofilas. GluTS: GLUTAMIL ARNt SINTASA, GluTR: GLUTAMIL ARNt REDUCTASA, GSA-AT: GLUTAMATO-1-SEMIALDEHÍDO AMINOTRANSFERASA, ALAD: ALA DEHIDRATASA, HMSB: PORFOBILINÓGENO DEAMINASA, UROS: UROPORFIRINÓGENO III SINTASA, UROD: UROPORFIRINÓGENO III CARBOXILASA, CPOX: COPROPORFIRINÓGENO III OXIDASA, PPOX: PROPORFIRINÓGENO IX OXIDASA, MgChe: MAGNESIO QUELATASA, MgMT: Mg-PROTOPORFIRINA IX METILTRANSFERASA, MgCY: Mg-PROTOPORFIINA IX MONOMETIL ÉSTER CICLASA, POR: PROTOCLOROFILIDA REDUCTASA, DVR: DIVINIL CLOROFILIDA REDUCTASA y ChlG: CLOROFILA SINTASA. Modificado de Tanaka y Tanaka (2007).

La transferencia del grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina a la Mg-protoporfirina IX permite la formación de Mg-protoporfirina IX monometil éster, esta reacción es catalizada por la Mg-PROTOPORFIRINA IX METILTRANSFERASA (MgMT). En la siguiente reacción la Mg-PROTOPORFIINA IX MONOMETIL ÉSTER CICLASA (MgCY) incorpora

un átomo de oxígeno a la Mg-protoporfina IX monometil éster formando el 3,8- divinil protoclorofilida *a*. Seguidamente el anillo del 3,8- divinil protoclorofilida *a* es reducido por la PROTOCLOROFILIDA REDUCTASA (POR) formando el 3,8- divinil clorofilida *a*. El grupo 8-vinil de la 3,8- divinil clorofilida *a* es reducido por el DIVINIL CLOROFILIDA REDUCTASA (DVR) dando lugar al 3-vinil clorofilida *a*, también conocida como clorofilida *a*. El último paso involucra la formación de la clorofila *a* mediante la esterificación del anillo D de la clorofilida *a* con el grupo fitol pirofosfato por la actividad de la CLOROFILA SINTASA (ChG) (**Figura 1.1**) (Tanaka y Tanaka, 2007; Su *et al.*, 2001; Armstrong *et al.*, 1995; Benli *et al.*, 1991)

1.1.2.1.1. Ciclo de las clorofilas

El conjunto completo de reacciones de conversión entre la clorofila *a* y la clorofila *b* se conoce como el ciclo de las clorofilas (Tanaka y Tanaka, 2011) (**Figura 1.2**). Se ha sugerido que el 3-vinil clorofilida *a* también conocida como clorofilida *a* es un intermediario de la biosíntesis de la clorofila *b* (Tanaka y Tanaka, 2011, 2007). Las reacciones de conversión de la clorofilada *a* a clorofila *b* son iniciadas por la CLOROFILIDA A OXIGENASA (CAO): La oxigenación de la clorofilida *a* por la CAO genera el intermediario 7-hidróximetil clorofilida *a*, que posteriormente es convertida a clorofilida *b* por la misma CAO. Subsecuentemente, la clorofilida *b* es fitilada por la CLOROFILA SINTASA (ChG) para la formación de clorofila *b* (Tanaka y Tanaka, 2011, 2007) (**Figura 1.2**).

La clorofila *b* puede convertirse de manera reversible a clorofila *a* mediante su conversión a 7-hidróximetil clorofila *a*, las reacciones de conversión son catalizadas por la CLOROFILA B REDUCTASA (CBR) y la 7-HIDRÓXIMETIL CLOROFILA A REDUCTASA (HMChI) (Tanaka y Tanaka, 2011, 2007) (**Figura 1.2**). Por otro lado, la cadena fitol de la clorofila *a* puede ser removida por la CLOROFILASA (ChIasa) para dar lugar a la clorofilida *a*, la cuál puede ser usada nuevamente como sustrato por la CAO e iniciar la formación de clorofila *b*. De manera contraria, la CLOROFILA SINTASA puede catalizar la adición de la cadena fitol a la clorofilida *a* y completar la biosíntesis de la clorofila *a* (Tanaka y Tanaka, 2011, 2007) (**Figura 1.2**).

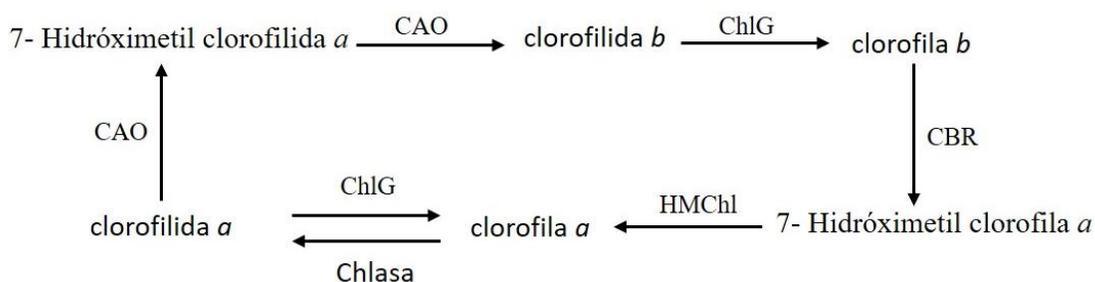


Figura 1.2 Ciclo de las clorofilas. CAO: CLOROFILA A OXIGENASA, ChlG: CLOROFILA SINTASA, CBR: CLOROFILA B REDUCTASA, HMChl: 7-HIDRÓXIMETIL CLOROFILA A REDUCTASA, ChlG: CLOROFILA SINTASA y ChlG: CLOROFILASA. Modificado de Tanaka y Tanaka (2007).

1.1.2.2. Biosíntesis de carotenoides

En las plantas superiores, los carotenoides son sintetizados a partir del IPP que es sintetizado por la vía del gliceraldehído fosfato/piruvato (Lichtenthaler *et al.*, 1997; Rohmer *et al.*, 1996). La mayoría de los carotenoides tienen una estructura basal de 40 carbonos (40 C) que incluye enlaces dobles aunque algunos organismos como las bacterias producen moléculas de 30 y 50 carbonos (Walter y Strack, 2011). En las plantas, los carotenoides juegan un papel estructural en el ensamblaje de los complejos de absorción de luz, protegiendo al aparato fotosintético del daño foto-oxidativo (Telfer, 2005). Su biosíntesis está enteramente localizada en los plástidos. Dentro de los tilacoides, los carotenoides se encuentran unidos a proteínas específicas de los fotosistemas I (PS I) y II (PS II), aumentando la capacidad de absorción de luz (450-550 nm) y transfiriendo la energía a los cloroplastos (Holt *et al.*, 2005).

El primer paso de la biosíntesis de los carotenoides involucra la condensación de dos moléculas de geranilgeranil difosfato (GGDP) para producir fitoeno, esta reacción es catalizada por la enzima FITOENO SINTASA (PSY) (Bartley *et al.*, 1991). Subsiguientes conversiones enzimáticas dan lugar al licopeno, estas reacciones son catalizadas por las enzimas FITOENO DESATURASA (PDS) (Bartley *et al.*, 1991), ZETA CAROTENO DESATURASA (ZDS) (Albrecht *et al.*, 1995) y la CAROTENO ISOMERASA (CRTISO) (Park *et al.*, 2002). CRTISO cataliza las reacciones *cis-trans* para revertir cuatro enlaces *cis*

introducidos por las desaturasas, generando trans-licopeno o licopeno (Isaacson *et al.*, 2004). La ciclación del licopeno representa un punto de bifurcación central de la ruta de biosíntesis de carotenoides. La actividad de la enzima LICOPENO ϵ CICLASA (LCY ϵ) y la LICOPENO β CICLASA (LCY β) permiten la síntesis del α -caroteno, mientras que la LCY β sintetiza al β -caroteno, ambas moléculas sirven como precursores para la biosíntesis de otros carotenoides (Pecker *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1996). La hidroxilación del β -caroteno por la β -CAROTENO HIDROXILASA (β -OHasa) resulta en la formación de zeaxantina y la hidroxilación del α -caroteno, por la acción de la misma β -OHasa y de la ϵ -CAROTENO HIDROXILASA (ϵ -OHasa) produce luteína, la xantofila más abundante en los plástidos de las plantas (Sun *et al.*, 1996) (**Figura 1.3**).

Bajo condiciones de alta intensidad de luz, la violaxantina es convertida de regreso a zeaxantina por la enzima VIOLAXANTINA DE-EPOXIDASA (VDE), esta enzima participa en la disipación de la energía térmica generada por el exceso de energía luminosa absorbida (Demmig-Adams *et al.*, 1996). La violaxantina es convertida a neoxantina, la oxidación de la neoxantina genera a la xantonina, un intermediario de 15 carbonos, la cual es convertida a ABA (ácido abscísico) en dos pasos por la actividad del ALCOHOL DE CADENA CORTA DESHIDROGENASA/REDUCTASA (SDR) y la ABA ALDEHÍDO DESHIDROGENASA (AAO), utilizando a la ABA aldehído como intermediario de la reacción (Xiong y Zhu, 2003) (**Figura 1.3**).

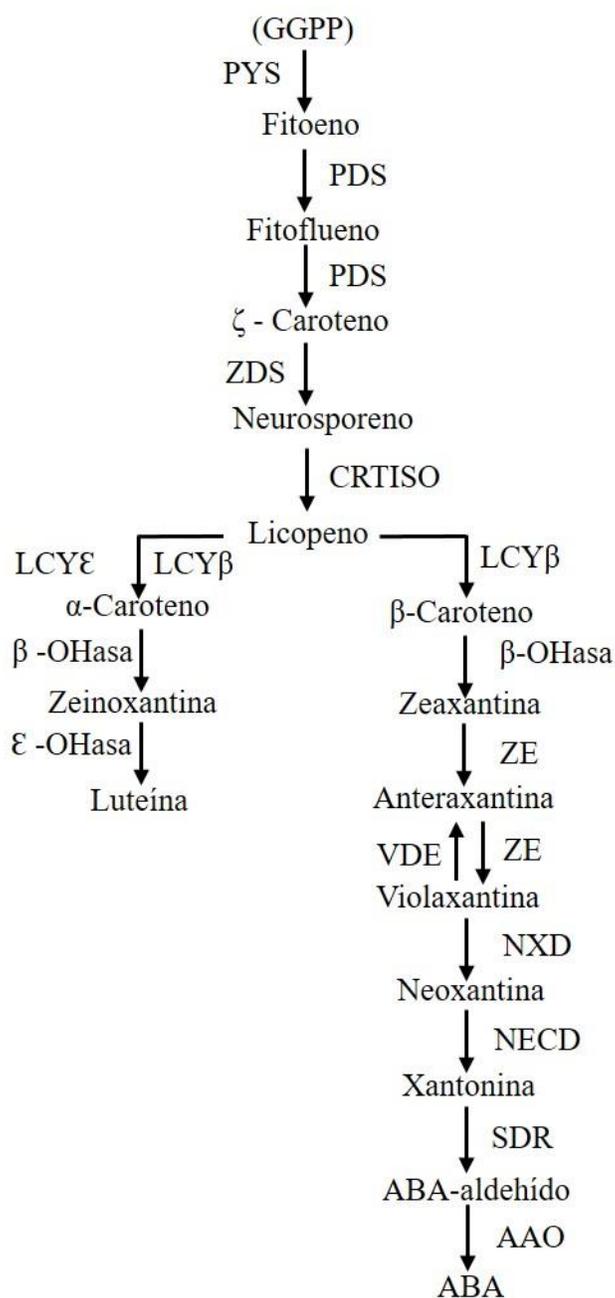


Figura 1.3. Ruta de biosíntesis de los carotenoides en las plantas. GGPP: geranylgeranyl difosfato, PSY: FITOENO SINTASA, PDS: FITOENO DESATURASA, ZDS: ZETA CAROTENO DESATURASA, CRTISO: CAROTENO ISOMERASA, LCYε: LICOPENO ε CICLASA, LCYβ: LICOPENO β CICLASA, ε-OHasa: ε-CAROTENO HIDROXILASA, β-OHasa: β-CAROTENO HIDROXILASA, ZE: ZEAXANTINA EPOXIDASA, VDE: VIOLAXANTINA DE EPOXISADA, NXD: NEOXANTINA SINTASA, NECD: EPOXICAROTENO DIOXIGENASA, SDR: ALCOHOL DE CADENA CORTA

DESHIDROGENASA/REDUCTASA, AAO: ABA ALDEHÍDO
DESHIDROGENASA y ABA: ácido abscísico. Modificado de Cazzonelli et al.
(2009).

1.2. EL ALBINISMO EN LAS PLANTAS

El albinismo en las plantas es causado por la pérdida parcial o total de los pigmentos de clorofilas en tejidos normalmente verdes, así como por un desarrollo incompleto de los cloroplastos (Kumari *et al.*, 2009). Abadie *et al.* (2006) determinaron que el contenido de clorofila total en plantas albinas de *Cephalanthera longifolia* ($1.9 \pm 5 \times 10^{-2}$ µg/mg peso fresco) fue significativamente menor a los niveles encontrados en las plantas verdes (2.97 ± 0.56 µg/mg peso fresco). La clorofila se requiere para la captación de la energía solar y la fotosíntesis. Sin fotosíntesis, las plantas no pueden crecer autotróficamente lo que provoca un gasto de las reservas almacenadas necesarias para su crecimiento y reproducción, generando así una muerte prematura (Mohanty *et al.*, 2005). Esto nos sugiere que la fotosíntesis y la biosíntesis de clorofilas son procesos estrechamente relacionados y que la desregulación de alguno de estos procesos puede afectar el fenotipo de la planta. Por ejemplo, en arroz se determinó que la eliminación de regiones del gen que codifica para la RUBISCO, una enzima vital para la fijación de carbono y la vida de las plantas, generó una disminución en el contenido de clorofila y un fenotipo albino (Rodermel *et al.*, 1988).

Además de las clorofilas, se ha reportado una disminución en el contenido de diferentes carotenoides en los cultivos albinos (Yao y Cohen, 2000). Por ejemplo, en plantas con mutaciones inducidas en los genes que codifican para enzimas de la ruta 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP), de la cual derivan los carotenoides y la cadena fitol de las clorofilas, pueden presentar un fenotipo albino letal (Wang *et al.*, 2009; Fang *et al.*, 2008; Estevez *et al.*, 2001; Mandel *et al.*, 1996).

En *Arabidopsis thaliana*, la mutante *cla1*, la cual codifica para la enzima 1-DEOXY-D-XYLULOSA-5-FOSFATO SINTASA (DXS), primera enzima de la ruta MEP, produce plantas albinas con un desarrollo anormal de los cloroplastos (Estevez *et al.*, 2000; Mandel *et al.*, 1996). En *Arabidopsis*, los alelos mutantes denominados *ggps1-2* y *ggps1-3* producen plántulas albinas letales y embriones que no logran germinar, mientras que el alelo mutante *ggps1-1* presenta una mayor sensibilidad a la temperatura y una

variegación en las hojas (Lange y Ghassemian, 2003).

En cuanto a la ruta de biosíntesis de los carotenoides y la generación de albinismo en las plantas, se ha determinado que el silenciamiento del gen *PDS* en plantas de arroz produce un fenotipo albino (Miki y Shimamoto, 2004), en tanto que en tabaco, el silenciamiento del mismo gen, generó una disminución en el contenido de carotenoides, además de una disminución en el contenido de las Chl *a* y *b* (Wang *et al.*, 2009). De igual manera, la mutante de girasol (*Helianthus annuus L.*) *nd-1*, en el cual la *ZDS* no es funcional, presentó un fenotipo albino y una disminución de las Chl *a* y *b*, de la neoxantina, la violaxantina, la luteína y del β -caroteno (Conti *et al.*, 2004; Fambrini *et al.*, 1993). En arroz, se ha visto que las mutantes en los genes *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* y *LCY β* producen un fenotipo albino y una disminución casi indetectable en los niveles de clorofilas y carotenoides, reforzando la importancia de la participación de estas enzimas en la biosíntesis de los pigmentos fotosintéticos (Fang *et al.*, 2008).

1.2.1. FACTORES QUE CAUSAN ALBINISMO EN PLANTAS

El albinismo en las plantas se puede generar debido a una combinación de factores, entre los que se encuentran el genotipo, el ambiente, el desbalance en los reguladores del crecimiento, la incompatibilidad entre el genoma nuclear y el plastídico, así como eliminaciones en el ADN plastídico (Kumari *et al.*, 2009; Babiychuk *et al.*, 2008).

Durante la obtención de plantas híbridas, con características agronómicas deseables, a partir de cultivos de anteras y microesporas, se presenta una alta frecuencia de aparición de plantas albinas (Datta, 2005). El albinismo se ha reportado en la progenie de cruza de cultivos como cebada (Jørgensen *et al.*, 1986), centeno (Deimling y Flehingham-Roux, 1997), trigo (Cistue *et al.*, 2006), arroz (Yamagishi *et al.*, 1998), avena (Rines *et al.*, 1997) y garbanzo (Mallikarjuna, 1999; Badami *et al.*, 1997), así como en cruza inter-específicas de especies no cultivables como *Pongamia pinnata* (Mohanty *et al.*, 2005) y *Cephalanthera longifolia* (Abadie *et al.*, 2006). Durante la obtención de plantas haploides a partir de anteras, la edad y el tamaño de los embriones tiene un efecto en la regeneración de plantas albinas, los embriones viejos tienden a una mayor incidencia a regenerar plántulas albinas (Haliloglu y Baenziger, 2003). En cebada, las suspensiones celulares que tardaban más de un año en producir callo embriogénico son más propensas a regenerar

solamente plántulas albinas (Jähne *et al.*, 1991).

Se ha sugerido que, de manera natural, el albinismo puede ser de carácter genético y recesivo, persistiendo en las poblaciones con una frecuencia muy baja. En maíz y en soya el control del albinismo es llevado a cabo por un gen con dos alelos recesivos (Buckner *et al.*, 1990; Barwale y Widholm, 1987). En maíz, el producto del locus *y1* está involucrado en la biosíntesis del β -caroteno en el endospermo y las hojas. Cuando el alelo es recesivo y homocigoto, los granos del endospermo presentan un fenotipo albino o verde pálido (Buckner *et al.*, 1990). Por otro lado, el color de la cubierta de la semilla de soya es controlado por el gen *R*, involucrado en la síntesis de antocianinas. Cuando el alelo *R* es recesivo (*r-m*) se produce un fenotipo variegado en las semillas (Boerma y Specht, 2004). Se ha observado que las plantas regeneradas de las soya de las generaciones R_1 , R_2 y R_3 presentaron variaciones fenotípicas que incluyen deficiencia de clorofila y albinismo (Barwale y Widholm, 1987). Los resultados sugieren que estas variaciones presentaban herencia Mendeliana recesiva, son heredadas de manera estable y que es posible que aparezcan debido a cambios genéticos durante el proceso del cultivo *in vitro* (Boerma y Specht, 2004; Barwale y Widholm, 1987)

Adicionalmente, se han observado alteraciones en la organización del genoma de las mitocondrias de plantas albinas de trigo derivadas del cultivo *in vitro* de anteras (Aubry *et al.*, 1989). Aubry *et al.* (1989) determinaron que las plantas albinas de trigo regeneradas de dos cultivares (Chinese Spring y DH Aquila) presentaban rearrreglos (principalmente eliminaciones) en el genoma mitocondrial, además, observaron que estos rearrreglos dependían del origen del explante utilizado (tejido somático o células gaméticas) y del tiempo en que el tejido es mantenido en cultivo.

También se han observado alteraciones en genes del ADN plastídico de plántulas albinas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de anteras de trigo, cebada y arroz (Harada *et al.*, 1991; Day y Ellis, 1985; Day y Ellis, 1984). Las plantas albinas de trigo presentan eliminaciones de más del 70% (39 kbp) del genoma plastídico, estas eliminaciones se encuentran cerca o dentro de las regiones invertidas repetidas, sin embargo, el genoma plastídico aún mantiene al menos un origen de replicación funcional (Day y Ellis, 1984).

Algo similar se observó en cebada, el genoma plastídico de las plantas albinas presenta

tamaños de 50 kpb, sin embargo, todas mantienen la región necesaria para la replicación del genoma (Day y Ellis, 1985). De manera similar a trigo y cebada, en arroz Harada et al. (1991) determinaron que las plantas albinas presentan eliminaciones a gran escala en su genoma (hasta 100 kpb), y algunas de las plantas carecen de la región codificante de la subunidad mayor de la *RUBISCO* (*rubL*) (Harada et al., 1991).

Una baja concentración así como el tipo de azúcares usados en el medio de cultivo puede influir en la aparición del albinismo en plantas. Se ha sugerido que los azúcares funcionan como una fuente de energía para la síntesis de clorofila (Nishiyama y Motoyoshi, 1966; Wolff y Price, 1960). En plantas etioladas de *Phaseolus vulgaris* la adición de glucosa, sacarosa y maltosa al medio de cultivo fueron igualmente de efectivos al reestablecer los sustratos necesarios para la biosíntesis de pigmentos de las hojas (Wolff y Price, 1960). Sin embargo, se sugirió que los disacáridos permiten una respuesta prolongada debido a que no son tan rápidamente metabolizados como la glucosa (Wolff y Price, 1960). También se ha sugerido que los azúcares funcionan como reguladores del potencial osmótico, generando las condiciones adecuadas para el proceso de diferenciación de los plástidos hasta cloroplastos funcionales (Wojnarowicz et al., 2004). En cebada, se ha propuesto que el albinismo androgénico observado es debido a la degradación temprana de los plástidos (Caredda et al., 2000). Sin embargo, la suplementación con manitol al medio de cultivo de anteras de cebada, los plástidos lograron diferenciarse hasta cloroplastos, mejorando la eficiencia en la generación de plantas verdes. Se sugirió que para el cultivo androgénico de cebada el manitol es la mejor fuente de azúcar para la regulación osmótica y la reducción de la incidencia del albinismo (Wojnarowicz et al., 2004).

La composición del medio de cultivo es otro factor importante. Se ha sugerido un papel importante de las citocininas en la síntesis de clorofilas, biogénesis de cloroplastos y en conversión de etioplastos a cloroplastos (Chory et al., 1994; Chory et al., 1991; Solís et al., 1989). Las citosinas son reguladores del crecimiento vegetal derivados de la adenina con distintas sustituciones en la posición N⁶ (nitrógeno 6) del anillo de adenina (Kieber y Schaller, 2014). La citocininas se encuentra involucrada en procesos biológicos como el crecimiento ya que estimula la división celular, promueve la expansión de los cotiledones, la generación de brotes laterales, el desarrollo de las hojas y los cloroplastos, un balance

adecuado con las auxinas influye en la respuesta morfogénica celular, mantiene la dominancia apical, promueve la apertura estomática y la senescencia, entre varias otras funciones (Kieber y Schaller, 2014; Ciesielska *et al.*, 2014; Werner *et al.*, 2001). En plantas se han identificado como citoquininas naturales al N⁶-(Δ^2 -isopentenil) adenina (iP), *trans*-zeatina (tZ), *cis*-zeatina (cZ), dihidrozeatina y las topolinas (Osugi y Sakakibara, 2015; Sakakibara, 2006). En *Arabidopsis* iP y tZ juegan un papel biológico importante, siendo la tZ la más abundante (Osugi y Sakakibara, 2015). La aplicación de citoquininas naturales (iP y kinetina) y sintéticas (6-BAP) al medio de cultivo de plantas etioladas de *Arabidopsis* produjo su reverdecimiento, sugiriendo un papel importante de las citoquininas en la conversión de etioplastos a cloroplastos (Chory *et al.*, 1994; Chory *et al.*, 1991). Por otro lado, el incremento en la concentración de 6-bencilaminopurina (6-BAP) al medio de cultivo de callos de especies de plantas con metabolismo C₄ (*Zea mays*) y C₃ (*Canavalia ensiformis*) indujo la biosíntesis de clorofila y la biogénesis de los cloroplastos (Solís *et al.*, 1989). Además, las plantas albinas obtenidas del cultivo de anteras de híbridos de *C. arietinum* × *C. pinnatifidum* reverdecieron después de varios sub-cultivos en un medio rico en zeatina (Mallikarjuna, 1999; Badami *et al.*, 1997). Todas estas evidencias podrían sugerir una posible relación concentración dependiente entre las citoquininas y el desarrollo del albinismo en plantas.

Una baja concentración así como el tipo de azúcares usados en el medio de cultivo puede influir en la aparición del albinismo en plantas. Se ha sugerido que los azúcares funcionan como una fuente de energía para la síntesis de clorofila (Nishiyama y Motoyoshi, 1966; Wolff y Price, 1960). En plantas etioladas de *Phaseolus vulgaris* la adición de glucosa, sacarosa y maltosa al medio de cultivo fueron igualmente efectivos al reestablecer los sustratos necesarios para la biosíntesis de pigmentos de las hojas (Wolff y Price, 1960). También se ha sugerido que los azúcares funcionan como reguladores del potencial osmótico, permitiendo la generación de las condiciones adecuadas para el proceso de diferenciación de los plástidos hasta cloroplastos funcionales (Wojnarowicz *et al.*, 2004). En cebada, se sabe que el albinismo androgénico observado es debido a la degradación temprana de los plástidos (Careda *et al.*, 2000). Sin embargo, al suplementar el medio de cultivo con manitol los plástidos lograron diferenciarse hasta cloroplastos y se mejoró la eficiencia en la generación de plantas verdes. Se sugirió que para el cultivo androgénico de cebada el manitol es la mejor fuente de azúcar para la regulación

osmótica y la reducción de la incidencia del albinismo (Wojnarowicz *et al.*, 2004).

Se ha observado que la temperatura y la luz también pueden favorecer la aparición del albinismo. Collins (1927) observó que una temperatura menor a 15 °C, en cebada, favorece la generación de plantas albinas, en tanto que temperaturas mayores a 15 °C promueven su pigmentación. En fresa, bajas intensidades de luz generaban albinismo afectando el rendimiento en este cultivo (Sharma *et al.*, 2006), contrario a lo observado en *Phleum pratense* en el que bajas intensidades de luz reducen, de forma significativa, la formación de brotes albinos (Guo *et al.*, 1999). Todos estos resultados muestran que el albinismo puede ser provocado por diferentes factores, dependiendo de la especie vegetal en estudio.

1.2.2. VARIEGACIÓN EN PLANTAS

La variegación es un tipo de albinismo que se caracteriza por la pérdida parcial de la pigmentación. Las plantas variegadas se caracterizan por tener secciones verdes y blancas (o amarillas) en los tejidos u órganos normalmente verdes (Yu *et al.*, 2007; Aluru *et al.*, 2006; Rodermel, 2002). Las células de la sección verde contienen cloroplastos morfológicamente normales, mientras que la sección blanca contiene cloroplastos defectuosos o no desarrollados que carecen de estructuras membranales internas bien desarrolladas y que además son deficientes de clorofilas y carotenoides (Rodermel, 2002).

La variegación puede ser heredable o no heredable y se puede generar por diferentes mecanismos. La variación no heredable puede ser inducida por agentes externos como el ataque de patógenos o por deficiencias nutricionales. La variegación heredable se genera por mutaciones en los genes del núcleo, cloroplasto y/o mitocondria que afectan de manera directa la acumulación de los pigmentos fotosintéticos en los plástidos (Yu *et al.*, 2007; Aluru *et al.*, 2006; Rodermel, 2002). Estos plástidos anormales pueden heredarse de manera permanente y no-mendeliana por la vía materna o biparentalmente (Connett, 1986; Tilney-Bassett, 1975). Además, se han descrito algunos ejemplos de variegación generados por quimerismo, elementos móviles, silenciamiento de ARN, tratamiento con mutágenos e incompatibilidad entre los plástidos y el núcleo (Yu *et al.*, 2007).

En *Arabidopsis* se han descritos muy pocas mutantes con variegación, a pesar de que se han obtenido un gran número durante los tamizados mutagénicos (Kuromori *et al.*, 2006; Wisman *et al.*, 1998; Reiter *et al.*, 1994; McKelvie, 1963). Dos de las mutantes de *Arabidopsis* mejor descritas con fenotipo variegado son la *immutans* (*im*) y la *var2* (Yu *et al.*, 2007; Aluru *et al.*, 2006; Rodermel, 2002). La *im* es una de las mutantes más antiguas generada por un gen recesivo nuclear que se transmite por herencia mendeliana (Wetzel *et al.*, 1994). La región verde de la mutante *im* contiene células con cloroplastos morfológicamente normales, mientras que la región blanca contiene plástidos vacuolados y carece de estructuras membranales internas (Wetzel *et al.*, 1994). Al principio se sugirió que *im* presenta una interrupción en la actividad de la PDS debido a que la región albina acumula fitoeno y presenta un daño foto-oxidativo por la ausencia de los otros carotenoides, mientras que la región verde contiene clorofilas y carotenoides en niveles normales (Wu *et al.*, 1999; Wetzel *et al.*, 1994). Sin embargo, un estudio más profundo demostró que el gen causante de la mutante *im* codifica a una proteína con similitud elevada a una OXIDASA ALTERNATIVA DE MITOCONDRIA (AOX) (Wu *et al.*, 1999; Carol *et al.*, 1999). La AOX es una proteína de membrana interna que funciona como una oxidasa terminal en la ruta alterna de la respiración mitocondrial donde genera ubiquinol y agua (Vanlerberghe y McIntosh, 1997). Se ha sugerido que la AOX es un componente importante para la ruta de desaturación del fitoeno y funciona como una oxidasa terminal que implica a la PDS, al plastoquinol y al oxígeno como aceptor final de los electrones. Se sabe que la actividad de la PDS requiere de varios componentes redox, incluyendo a la plastoquinona y al oxígeno molecular (Yu *et al.*, 2007; Aluru *et al.*, 2006; Wu *et al.*, 1999; Carol *et al.*, 1999).

Var2 es otra mutante nuclear recesiva (Chen *et al.*, 1999), la cual presenta sectores blanco/amarillos en órganos normalmente verdes de la planta. Al igual que *im*, *var2* presenta cloroplastos normales en la región verde mientras que las regiones albinas o amarillas presentan plástidos poco desarrollados que carecen de las membranas tilacoídales (Takechi *et al.*, 2000; Chen *et al.*, 1999). Sin embargo, algunas células de las regiones blancas y amarillas son heteroplástidas y contienen plástidos con estructuras membranales internas rudimentarias, así como cloroplastos que parecen normales, sugiriendo que los plástidos son afectados de manera diferencial en cada célula (autónomo de plástido) (Chen *et al.*, 1999). Un análisis más profundo indicó que *var2*

presenta homología a FtsH, una metaloproteasa de zinc del cloroplasto dependiente de ATP, que se encuentra embebida en la membrana de los tilacoides (Chen *et al.*, 2000). En *Arabidopsis* se han reportado 12 genes *FtsH*, de los cuales se han formado cuatro pares filogenéticos altamente conservados (*AtFtsH1/5*, *AtFtsH2/8*, *AtFtsH3/10* y *AtFtsH7/9*) (Yu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2004; Sakamoto *et al.*, 2003). Las evidencias sugieren que FstH (*AtFtsH1*, *AtFtsH2* y *AtFtsH5*) se encuentra involucrado en los procesos de renovación de D1 (Lindahl *et al.*, 2000). D1 es una proteína del centro de reacción del fotosistema II (PSII) y es blanco de las especies reactivas de oxígeno (ROS), por lo que su degradación y reemplazamiento por una copia nueva es de vital importancia como mecanismo de fotoprotección de los plástidos (Nixon *et al.*, 2005). Con estas evidencias se ha propuesto un mecanismo de la variegación provocada por *var2*. Se ha sugerido que *AtFtsH1-5* y *AtFtsH2-8* forman complejos oligoméricos en la membrana de los tilacoides, se requiere de un nivel umbral de estos complejos para la función normal de los cloroplastos y la formación de la región verde. Cuando los niveles de estos complejos disminuyen más allá del nivel umbral, la función de los cloroplastos se altera y se forma la región albina, probablemente por el daño foto-oxidativo causado por la ausencia de las proteínas D1 (Yu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2004).

A diferencia de las plantas albinas, las plantas variegadas no son letales y ofrecen la oportunidad de realizar estudios a nivel molecular y bioquímico sobre el desarrollo de los cloroplastos y la comunicación retrógrada (núcleo a organelo) y anterógrada (organelo a núcleo).

1.3. EPIGENÉTICA

La epigenética es el estudio de los cambios heredables de la expresión genética que no se deben a cambios en la secuencia del ADN (Holliday, 2006). El llamado padre de la epigenética fue Conral Han Waddington quién se refirió a la “epigénesis” como una interpretación del genotipo durante el desarrollo para dar lugar a un fenotipo (Lees y Waddington, 1942). Por el contrario, Riggs (1975) definió a la epigenética como el estudio de los cambios mitótica y/o meióticamente heredables de la función genética que no pueden explicarse por cambios en la secuencia del ADN (Riggs, 1975).

En todos los organismos vivos el control epigenético es esencial para el desarrollo normal

y la diferenciación celular. En las plantas, las modificaciones epigenéticas juegan un papel importante para el desarrollo normal. Mutantes de genes responsables del mantenimiento de las modificaciones epigenéticas presentaron anomalías en el desarrollo de las plantas, las cuales se relacionaron directamente con una desorganización en la estructura de la cromatina (Fujimoto *et al.*, 2012; Tariq y Paszkowski, 2004). Por mucho tiempo se pensó que la cromatina solamente era un dispositivo de almacenamiento del ADN, sin embargo ahora se sabe que la cromatina es una estructura dinámica, que controla procesos celulares como la transcripción, replicación, recombinación y la segregación de los cromosomas (Sequeira-Mendes y Gutierrez, 2015; Zamariola *et al.*, 2014; Li *et al.*, 2002). Los cambios dinámicos en la estructura de la cromatina son directamente influenciados por mecanismos epigenéticos como son la metilación del ADN, las modificaciones en las histonas y el ARN no codificante (Henderson y Jacobsen, 2007; Huettel *et al.*, 2007). La desregulación de alguno de estos mecanismos influye en la expresión genética, afectando en última instancia los fenotipos.

1.3.1. ORGANIZACIÓN DE LA CROMATINA

La organización de la cromatina ayuda a las limitaciones del espacio dentro del núcleo y además provee un medio de regulación de la actividad genética (Horn y Peterson, 2002). La cromatina no es simplemente una herramienta de empaque, es también una unidad dinámica que refleja las señales regulatorias necesarias para una programación celular apropiada (Margueron y Reinberg, 2010).

El ADN de los eucariotas se encuentra estrechamente enrollado alrededor de proteínas denominadas histonas, formando el nucleosoma (Woodcock y Ghosh, 2010). El nucleosoma es la unidad básica de la organización de la cromatina y consiste en 147 pb (pares de bases) de ADN enrolladas a un octámero de histonas, cada una de las cuales contiene dos proteínas denominadas H2A, H2B, H3 y H4 (Arents *et al.*, 1991). La histona conectora H1 ha sido considerada como un componente estructural de la cromatina que puede funcionar como un represor transcripcional y como un elemento estabilizador de la estructura de orden superior de la cromatina (Happel y Doenecke, 2009).

Las histonas H2A, H2B, H3 y H4 están sujetas a una gran cantidad de modificaciones covalentes. La porción amino terminal es rica en residuos de arginina (R) y lisina (K), los

cuales pueden ser modificadas por diferentes marcas químicas, como metilación, acetilación, ubiquitinación, fosforilación, biotilación, SUMOilación y ADP-ribosilación (Zhang *et al.*, 2007a; Jackson *et al.*, 2004). Las diferentes combinaciones de modificaciones en las histonas pueden generar interacciones sinérgicas o antagonistas en su interacción con la cromatina, lo que a su vez dicta la dinámica de las transiciones entre los estados transcripcionalmente activos o inactivos de la cromatina. La hipótesis del código de las histonas predice que estas modificaciones covalentes pueden proporcionar especificidad de unión de las proteínas efectoras que interpretan el código en resultados funcionales (Jenuwein y Allis, 2001). Generalmente, la acetilación se relaciona con la activación transcripcional de genes, en tanto que la metilación, dependiendo del grado y del residuo modificado, puede dar lugar a una represión o una activación transcripcional de genes (Roudier *et al.*, 2009; Pfluger y Wagner, 2007). Basados en el grado de compactación y la actividad transcripcional, la cromatina se divide en eucromatina y heterocromatina. La eucromatina está menos condensada y es transcripcionalmente más activa, mientras que la heterocromatina se encuentra altamente condensada y es transcripcionalmente inactiva (Richards y Elgin, 2002). La metilación en la lisina 9 de la histona H3 (H3K9me) normalmente se relaciona con la formación de la heterocromatina, en tanto que la metilación en la H3K4 se relaciona con la eucromatina (Tariq y Paszkowski, 2004; Richards y Elgin, 2002; Jenuwein y Allis, 2001).

Además de las diversas modificaciones covalentes de las histonas, el grado de compactación y actividad transcripcional de la cromatina son regulados por la metilación en el ADN (Richards y Elgin, 2002), específicamente en la posición 5' de las citosinas. Dependiendo del grado de metilación y el lugar de las citosinas metiladas en el gen, éste podría ser activado o reprimido (Cokus *et al.*, 2008).

1.3.2. MODIFICACIONES EPIGENÉTICAS EN LAS HISTONAS

Las modificaciones post-traduccionales de las histonas afectan las interacciones inter nucleosomales y por lo tanto el grado de compactación y la actividad transcripcional de la cromatina (Bannister y Kouzarides, 2011).

Dos de las modificaciones post-traduccionales de histonas más estudiadas en plantas son la metilación y la acetilación de las histonas (Roudier *et al.*, 2009; Pfluger y Wagner,

2007). La metilación de las histonas se encuentra involucrada en la activación o represión transcripcional de genes dependiendo del residuo modificado y del grado de la metilación (Liu *et al.*, 2010; Pfluger y Wagner, 2007). Desde el descubrimiento de la metilación en las histonas hace más de 50 años (Murray, 1964) se han realizado grandes avances en el entendimiento del papel biológico de esta modificación epigenética. Se ha propuesto que la metilación de residuos específicos de lisina de las colas de las histonas funcionan como marcas epigenéticas estables que dirigen funciones biológicas particulares (Liu *et al.*, 2010; Rice y Allis, 2001). Durante los últimos años, un número creciente de trabajos realizados en plantas han demostrado el impacto de la metilación de las histonas en el control de procesos biológicos como la proliferación y diferenciación celular, formación de heterocromatina y eucromatina, regulación de la transcripción y replicación, silenciamiento de elementos móviles y en la respuesta al estrés biótico y abiótico, entre otros. (Bobadilla Landey y Berr, 2016; Liu *et al.*, 2010; Berr y Shen, 2010; Jackson *et al.*, 2004; Jackson *et al.*, 2002).

Por otra parte, la acetilación de las histonas generalmente se encuentra relacionada con la activación transcripcional de genes (Pfluger y Wagner, 2007; Berger, 2007). La acetilación de los residuos de lisina neutraliza la carga positiva de las histonas, disminuyendo así su afinidad por la carga negativa del ADN, promoviendo de esta manera la accesibilidad del ADN a los reguladores de la transcripción (Yang y Seto, 2007; Luger y Richmond, 1998). En plantas, la acetilación de las histonas se encuentra involucrada en la regulación de procesos biológicos como la regulación del ciclo celular, la diferenciación celular, el crecimiento, el ciclo celular, la poliploidía y la fotosíntesis (Liu *et al.*, 2016; Heimann *et al.*, 2013; Chen y Tian, 2007). También se ha sugerido que las plantas son capaces de regular su crecimiento y desarrollo a través de la modulación de la acetilación de las histonas en respuesta al estrés ocasionado por los factores bióticos y abióticos (Chen y Tian, 2007). Trabajos recientes han mostrado que la acetilación de la lisina es una modificación post-traducciona que ocurre en un gran número de proteínas involucradas en procesos celulares como la fotosíntesis y la respiración (Liu *et al.*, 2016; Shen *et al.*, 2015),

En la siguiente parte de este trabajo se abordará de manera más detallada la metilación y acetilación de las histonas, así como algunas de las principales marcas de metilación y

acetilación de las histonas encontradas en las plantas.

1.3.2.1. Metilación en las histonas

La metilación de las histonas es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados y complejos que puede silenciar o activar transcripcionalmente dominios de la cromatina y ocurre principalmente en los residuos de lisina y arginina de las histonas (Liu *et al.*, 2010). Las lisinas pueden ser mono, di o trimetiladas, mientras que las argininas pueden ser mono o dimetiladas (Ng *et al.*, 2009; Lan y Shi, 2009). La metilación de las lisinas de las histonas ocurre por la actividad de las enzimas metiltransferasas de lisina (HKMT), éstas contienen el dominio SET (SUPRESOR OF VARIATION (SU(VAR)3-9), ENHANCER-OF-ZESTE (E(z)) y TRITHORAX) que cataliza la transferencia del grupo metilo a partir de la S-adenosil-L-metionina al grupo ϵ -amino de la lisina (Jenuwein y Allis, 2001). En *Arabidopsis*, la metilación de las histonas ocurre principalmente en la Lys4 (K4), Lys36 (K36), Lys9 (K9) y Lys27 (K27) de la histona H3 y en la Lys 20 (K20) de la histona H4. Las metilaciones mayormente estudiadas han sido la H3K4 y la H3K36, las cuales son asociadas a la activación transcripcional de genes, mientras que la metilación de la H3K9, la H3K27 y la H3K420 son asociadas al silenciamiento de regiones del ADN (Liu *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2009).

H3K4

La metilación de la H3K4 es característica de la cromatina activa. En *Arabidopsis* la mono, di y trimetilación de la H3K4 regulan 2/3 partes de todos los genes y se encuentra ausente en las regiones de la heterocromatina (Zhang *et al.*, 2009). Además, cada marca es característica de ciertas regiones del gen, la marca H3K4me1 se encuentra enriquecida principalmente en el cuerpo del gen mientras que las marcas H3K4me2 y H3K4me3 se encuentran enriquecidas en las regiones promotoras y en las regiones terminales del gen, respectivamente (Zhang *et al.*, 2009). Se han observado patrones similares de la distribución de la H3K4me1, la H3K4me2 y la H3K4me3 en otros organismos, sugiriendo que el mecanismo de metilación de la H3K4 es altamente conservado (Li *et al.*, 2008b; Barski *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2005). Adicionalmente se ha sugerido que la H3K4me2 es una marca general de regiones que se transcriben, debido a que no se encontró en regiones intergénicas (Alvarez-Venegas y Avramova, 2005). Sin embargo, Alvarez-

Venegas *et al.* (2007) encontraron que para algunos genes la presencia de la H3K4me2 no necesariamente indica un incremento sustancial en su expresión. Se sugirió que a pesar de que H3K4me2 es una marca de expresión, es posible que la expresión pueda ser afectada por otros factores como reguladores específicos (activadores o represores) que afectan a la transcripción independientemente de la metilación de la histona H3 o por una coexistencia de la H3K4me2 con otras marcas de represión (H3K27me2 y H3K9me2) en las regiones promotoras, en el cuerpo del gen o en ambas (Alvarez-Venegas y Avramova, 2005).

La metilación de la H3K4 es llevada a cabo por el grupo de proteínas TRITORAX (TrxG), las cuales presentan el dominio SET (~150 amino ácidos). En *Arabidopsis*, la ATX1 es la encargada de la trimetilación de la H3K4 y de la regulación epigenética del represor de la floración *FLOWERING LOCUS C (FLC)*. La mutante *atx1* presentó una reducción en los niveles de la H3K4me3 así como una reducción en los niveles de expresión de *FLC*. Además, se observó que antes de la floración ATX1 interactuaba directamente con la región codificante de *FLC* y que ésta interacción era liberada durante la transición al estado de floración. La mutante *atx1* presentó una floración temprana, una reducción en el tamaño de las rosetas, así como una reducción en el número de hojas (Pien *et al.*, 2008). Por otra parte, ATX2 es la encargada de la dimetilación de la H3K4. En *Arabidopsis*, la doble mutante *atx1-2 atx2-1* presentó una reducción más severa en la expresión de *FLC* que la mutante simple *atx1-2*. Estos resultados sugiriendo que en *Arabidopsis*, ATX2 regula junto con ATX1 la expresión de *FLC* y la transición al estado de floración (Pien *et al.*, 2008; Saleh *et al.*, 2008).

H3K36

Las marcas H3K36me2 y H3K36me3 están relacionadas con la elongación de la transcripción (Berger, 2007). Las metiltransferasas de histona que realizan éstas metilaciones incluyen la SET DOMAIN GROUP 8/ EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS (SDG8/ EFS), la SET DOMAIN GROUP 26 (SDG26) y la SET DOMAIN GROUP 4/ ASH1-RELATED 3 (SDG4/ ASHR3). SDG8 es la enzima encargada de realizar la di y trimetilación de la H3K36 (Xu *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, la metilación de la H3K36 juega un papel importante en la regulación de la floración (Xu *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). En *Arabidopsis*, la mutante *sdg8* presenta una

reducción de la marca H3K36me2, particularmente, en las regiones de la cromatina asociadas con la región promotora y del primer intrón de *FLC* produciendo de esta manera una floración temprana. La mutante *sdg8* también presenta efectos pleiotrópicos, como una reducción en el tamaño y la fertilidad de la planta (Xu *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2005). Por otro lado, la mutante *sdg26* muestra una floración tardía debido a una sobreexpresión de *FLC* (Xu *et al.*, 2008). Estos resultados sugieren un papel antagónico entre SDG26 y SDG8 en la regulación de *FLC* y del tiempo de floración en *Arabidopsis* (Xu *et al.*, 2008). La SDG8 también regula la expresión de *CRTISO* y por lo tanto la biosíntesis de carotenoides. Las plantas mutantes *sdg8* presentaron una disminución en la expresión de *CRTISO* y en el contenido de luteína además de un fotoblanqueo en las hojas (Cazzonelli *et al.*, 2009).

Por otro lado, la enzima SDG4 está involucrada en la metilación de H3K4 y H3K36, se expresa de manera específica en los órganos florales y contribuye a la regulación epigenética del crecimiento del tubo del polen, afectando de esta manera la fertilización (Cartagena *et al.*, 2008).

H3K9

La metilación de H3K9 es considerada una marca de heterocromatina en diversos organismos (Fuchs *et al.*, 2006). En plantas, las marcas relacionadas con la formación de la heterocromatina son la H3K9me1 y la H3K9me2, siendo esta última la más importante debido a que está implicada en el silenciamiento de los transposones y en el control de la metilación en el ADN de regiones heterocromáticas (Fuchs *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2004). Un análisis mediante el uso de la técnica ChiP (Inmunoprecipitación de la cromatina)-chip reveló que la marca H3K9me2 se encuentra altamente enriquecida en las regiones pericentroméricas/centroméricas de los cromosomas, en regiones repetidas y en los elementos móviles presentes en la eucromatina (Bernatavichute *et al.*, 2008). Por otro lado, en *Arabidopsis* la marca H3K9me3 fue detectada en regiones de eucromatina (Turck *et al.*, 2007; Fuchs *et al.*, 2006; Naumann *et al.*, 2005). Un análisis de ChiP-chip indicó que la marca H3K9me3 se encuentra enriquecida en regiones del inicio de la transcripción de los genes. Además, se encontró una correlación positiva entre la expresión de genes y la acumulación de la marca H3K9me3, sugiriendo una participación de la H3K9me3 en la activación transcripcional de genes (Charron *et al.*, 2009).

Las enzimas encargadas de la metilación de la H3K9 pertenecen a la familia de proteínas SU (VAR) 3-9 (Rea *et al.*, 2000). El genoma de *Arabidopsis* contiene múltiples proteínas homologas a SU (VAR) 3-9 denominadas proteínas SU (VAR) 3-9 HOMOLOGA (SUVH), como por ejemplo KRIPTONITA (KYP), también conocida como SUVH4 (Jackson *et al.*, 2004). La marca H3K9me2 se encuentra unida a la CROMOMETILASA 3 (CMT3) encargadas del mantenimiento de la metilación de las islas CHG (donde H puede ser A, T o C) en el ADN, sugiriendo que la H3K9me2 ejerce algún tipo de control en la metilación del ADN. Esta aseveración es consistente con el efecto de la mutación de *KYP* que permite la reducción de la marca H3K9me2 y de los niveles de metilación de las islas CHG (Jackson *et al.*, 2002; Lindroth *et al.*, 2001). A diferencia de *Arabidopsis* en donde la marca H3K9me2 se encuentra enriquecida en los centrómeros, en arroz (que presenta un tamaño de genoma mayor con más del 40% de elementos repetidos) la marca H3K9me2 se distribuye a lo largo de los cromosomas, reforzando su papel en la regulación del movimiento de los elementos repetidos (Houben *et al.*, 2003).

H3K27

La metilación de la H3K27 es otra marca de represión encontrada en plantas. La H3K27 puede ser mono, di o trimetilada, siendo la H3K27me3 la más importante (Jacob *et al.*, 2009; Schubert *et al.*, 2006). A diferencia de la H3K9me2 que está fuertemente asociada a la metilación del ADN, la H3K27me3 parece ser independiente de los estados de metilación del ADN (Zhang *et al.*, 2007b; Mathieu *et al.*, 2005).

En *Arabidopsis*, un análisis ChIP-on-chip mostró que un número grande de genes (~4,400), incluyendo varios factores de transcripción, son regulados por la H3K27me3 (Zhang *et al.*, 2007b). Genes importantes en los patrones de desarrollo como *FLC*, *AGAMOUS* y *MEDEA* también son regulados por H3K27me3 (Jullien *et al.*, 2006; Schubert *et al.*, 2006; Bastow *et al.*, 2004), reforzando la idea del papel crucial de esta marca durante el desarrollo de la planta (Schubert *et al.*, 2005; Chanvivattana *et al.*, 2004; Kinoshita *et al.*, 2001).

Las enzimas del grupo Policomb (PcG), son las encargadas de la metilación de la H3K27, son proteínas represivas, estructuralmente no relacionadas que forman complejos denominados Complejos Represivos Policomb (PRC1 y PRC2) (Müller y Verrijzer, 2009).

En plantas, PRC2 es conservada y está involucrada en la tri-metilación de la H3K27 (Pien y Grossniklaus, 2007). El núcleo catalítico de la PRC2 comprende dos proteínas con dominios SET, CURLY LEAF (CLF) y SWINGER (SWN). La doble mutante *clf swn* produce una fuerte distorsión en la diferenciación celular (Schubert *et al.*, 2005; Chanvivattana *et al.*, 2004). Por otro lado, varios genes involucrados en el desarrollo de las hojas como *PIN1* (*PIN-FORMED 1*) y *CUC2* (*CUP-SHAPED COTYLEDON 2*) son blanco de la H3K27me₃, lo que muestra la importancia de las proteínas PcG en la regulación del desarrollo correcto de la planta (Lafos *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2007b).

1.3.2.2. Acetilación en las histonas

La acetilación en histonas es una de las modificaciones mejor caracterizadas que se relaciona con la activación transcripcional de genes (Chen y Tian, 2007; Sterner y Berger, 2000). La acetilación de la lisina es un mecanismo dinámico, regulado por la acción de dos familias de enzimas, las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las deacetilasas de histonas (HDACs) (Yang y Seto, 2007). Las HATs utilizan acetil-CoA como cofactor y catalizan la transferencia de un grupo acetilo en el grupo ε-amino de la cadena lateral de la lisina neutralizando la carga positiva, debilitando de esta manera las interacciones electrostáticas entre las histonas-ADN y facilitando el inicio de la transcripción (Yang y Seto, 2007; Luger y Richmond, 1998). Las HDACs tienen un efecto contrario a las HATs al restaurar la carga positiva de las histonas, estabilizando la arquitectura de la cromatina y actuando como represores de la transcripción (Yang y Seto, 2007; Luger y Richmond, 1998).

H3K9ac

La H3K9ac es una de las principales marcas de acetilación encontradas en las plantas y se encuentra asociada a la activación transcripcional de genes (Chen y Tian, 2007; Berger, 2007). Varias evidencias indican que los cambios en la acetilación de la H3K9 juegan un papel importante en respuesta a diferentes factores bióticos y abióticos y en gran variedad de procesos biológicos como la diferenciación celular, el crecimiento, el ciclo celular, la poliploidía y la fotosíntesis (Charron *et al.*, 2009; Chen y Tian, 2007).

En *Arabidopsis*, un análisis ChiP-on-chip mostró que la expresión de genes, cuyos productos están involucrados en la fotosíntesis, correlaciona con cambios en la H3K9ac

en respuesta a la luz (Charron *et al.*, 2009). Se ha sugerido que la acetilación de la H3K9 ayuda a la unión de la ARN polimerasa II a las regiones promotoras y de esta manera regula la expresión genética. En maíz (*Zea mays*), la actividad del promotor de la *PEPCasa*, la cual codifica para una enzima clave para la fijación del CO₂ en plantas con fotosíntesis C₄ y CAM, es regulada por la H3K9ac de manera dependiente de luz (Charron *et al.*, 2009). Una respuesta similar se observa en sorgo y en *Setaria italica* (Heimann *et al.*, 2013; Offermann *et al.*, 2008; Offermann *et al.*, 2006). La expresión del gen que codifica a la subunidad menor de la *RUBISCO* (*rubS*) también es regulada por la marca H3K9ac de manera dependiente de luz (Heimann *et al.*, 2013).

Deacetilasas de histonas (HDACs)

La acetilación es un proceso reversible controlado por las HATs y las HDACs. Las HDACs generan un efecto contrario a las HATs al remover el grupo acetil del residuo de K y restaurar su carga positiva, estabilizando de esta manera la arquitectura de la cromatina y actuando como represores de la transcripción (Yang y Seto, 2007; Luger y Richmond, 1998) (Yang y Seto, 2007; Luger y Richmond, 1998).

Basándose en el grado de similitud de secuencias y su dependencia a cofactores, en todos los eucariotas las HDACs se han agrupado en tres familias: RPD3/HDA1 (REDUCED POTASSIUM DEPENDENCE 3/HISTONE DEACETILASE 1), SIR2 (SILENT INFORMATION REGULATION 2) y HD2 (HISTONE DEACETYLASE 2) (Pandey *et al.*, 2002). En plantas se han identificado aproximadamente 18 HDACs (Alinsug *et al.*, 2009; Hollender y Liu, 2008), de las cuales 12 pertenecen a la familia RPD3/HDA1. Basándose en el similitud de secuencias, la superfamilia RPD3/HDA1 se ha dividido en tres clases: la clase I está conformada por la HDA19, HDA6, HDA7 y HDA9, la clase II está conformada por la HDA5, HDA15 y HDA18 mientras que la clase III está conformada por la HDA2 y sus dos isoformas. HDA8, HDA14, HDA10 y HDA17 son miembros no clasificados de la superfamilia RDP3-like. HDA10 y HDA17 presenta una similitud a HDA9 (Liu *et al.*, 2014; Alinsug *et al.*, 2009; Hollender y Liu, 2008; Pandey *et al.*, 2002).

Algunas evidencias sugieren una relación entre la actividad de las HDACs y la regulación de la biosíntesis de pigmentos y la fotosíntesis (Liu *et al.*, 2013). Por ejemplo, en plantas etioladas de *Arabidopsis*, la mayoría de los genes que codifican para proteínas

involucradas en la fotosíntesis y la biosíntesis de clorofila fueron reprimidos debido a la interacción física de la DEACETILASA DE HISTONA 15 (HDA15) con el factor de transcripción PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 (PIF3) en respuesta a la luz (Liu *et al.*, 2013). Un estudio reciente sugiere que la DEACETILASA DE HISTONA 14 (HDA14) se localiza en los cloroplastos y que además tiene un papel regulatorio en la fotosíntesis (Hartl *et al.*, 2017). La actividad enzimática de la RUBISCO presentó un incremento del 90% en la mutante *hda14*. Además, los estados de acetilación de varias proteínas localizadas en los plástidos, incluyendo las subunidades alfa y beta de la ATPasa, así como de proteínas que forman parte de los fotosistemas I (PSI) y II (PSII) fueron afectados en la mutante *hda14*. (Hartl *et al.*, 2017). Adicionalmente, en arroz, la DEACETILASA DE HISTONA 6 (HDA6) y la DEACETILASA DE HISTONA 10 (HDA10) se localizaron en cloroplasto, sugiriendo una posible función de éstas HDACs en la regulación de la fotosíntesis (Chung *et al.*, 2009).

La inhibición de las HDACs ha sido utilizada para evaluar el papel de la acumulación de las formas acetiladas de las histonas. Los inhibidores de las HDACs alteran selectivamente la transcripción genética, en parte, remodelando la cromatina y cambiando la estructura de las proteínas en los complejos de transcripción (Gui *et al.*, 2004). Se han descrito diversos agentes químicos que inhiben la actividad de las HDACs (tricosantina A (TSA), butirato de sodio, nicotinamida, dialil disulfuro y la toxina HC (*Helminthosporium carbonum*)) (Kim y Bae, 2011; Xu *et al.*, 2007; Richon *et al.*, 1996; Yoshida *et al.*, 1990), siendo la TSA una de las más utilizadas (Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Bond *et al.*, 2009; Earley *et al.*, 2007; Tsuji *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005; Chua *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2000). Los análisis cristalográficos han mostrado que la TSA interactúa directamente con el sitio catalítico de la HDAC inhibiendo su actividad enzimática (Finnin *et al.*, 1999). La TSA inhibe la actividad de las HDACs de tipo I y II, en tanto que las HDACs de tipo III representan al único grupo que no son inhibidos (Xu *et al.*, 2007; Grozinger *et al.*, 2001). En plantas, la tricosantina A (TSA) ha sido utilizada en diversidad de trabajos con la finalidad de evaluar el papel de la acetilación en diferentes procesos biológicos (Van Zanten *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014; Tanaka *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2005). Por ejemplo, en trigo, la adición de TSA (0.1 μ M) al medio de cultivo de microsporas mejoró de manera significativa la eficiencia de la embriogénesis y la regeneración de plantas verdes sobre las albinas. Se sugirió que la aplicación de TSA

permite la transición al estado embriogénico de manera eficiente debido a que induce la expresión de genes involucrados en la división celular y que son responsables de la identidad embriogénica (Jiang *et al.*, 2017).

1.3.3. METILACIÓN EN EL ADN

En el año 1975 se propuso que la metilación del ADN podría ser el responsable del mantenimiento estable de la expresión genética durante la división celular mitótica (Riggs, 1975). Ahora se sabe que la metilación de la citosina también contribuye al control de las funciones genéticas como la transcripción, replicación, movimiento de transposones y diferenciación celular (Vanyushin y Ashapkin, 2011; Finnegan *et al.*, 1998). Esta modificación altera la unión de los factores de transcripción y de otras proteínas que regulan la expresión del ADN, previniendo la transcripción de diversos genes y causando su silenciamiento (Finnegan *et al.*, 1998). En plantas, la metilación de las citosinas ocurre en tres islas o contextos: CG, CHG y CHH (en las que H puede ser A, C o T) (Chan *et al.*, 2005; Cao y Jacobsen, 2002a; Gruenbaum *et al.*, 1981). En *Arabidopsis*, cerca de una tercera parte de los genes se encuentran metilados en las islas CG (24%) mientras que la metilación es menor en las islas CHG (6.7%) y CHH (1.7%) (Cokus *et al.*, 2008). Si bien todos los sitios de metilación se encuentran en las regiones pericentroméricas, las regiones que se transcriben (también conocidas como el cuerpo del gen) están exclusivamente enriquecidas en las islas CG (Cokus *et al.*, 2008). Generalmente, los niveles de metilación del ADN en plantas se encuentran entre el 6 y el 30% (Chen y Li, 2004).

La metilación del ADN es catalizada por enzimas conocidas como metiltransferasas de ADN que transfieren el grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina al carbono 5' de la citosina (Finnegan y Kovac, 2000). Basándose en el arreglo del dominio, en las plantas las metiltransferasas de ADN han sido clasificadas en cuatro principales familias: las METILTRANSFERASAS DE ADN (METs), las CROMOMETILASAS (CMTs), las METILTRANSFERASAS DE DOMINIO REARREGLADO (DRMs) y la METILTRANSFERASA DE ADN HOMÓLOGA 2 (Dnmt2) (Pavlopoulou y Kossida, 2007). En las plantas superiores, la metilación de las citosinas puede ser *de novo* y de mantenimiento. La metilación *de novo* es un proceso en el que los residuos de citosina metilados resultan en la formación de patrones nuevos de metilación. Por otro lado, la

metilación de mantenimiento es un proceso mediante el cual un patrón preexistente de metilación es mantenido después de la replicación del ADN (Law y Jacobsen, 2010; Chen y Li, 2004; Finnegan y Kovac, 2000). La metilación *de novo* es catalizada por las enzimas DRM1 y DRM2 (homologas a Dnmt3 de mamíferos), mediante el mecanismo de metilación del ADN dirigido por ARN (RdDM) (Matzke *et al.*, 2009; Cao y Jacobsen, 2002b; Cao *et al.*, 2000). RdDM induce la metilación *de novo* en todos los contextos en la regiones homólogas de secuencias a ARNi (pequeños ARN de interferencia)-ADN (Matzke *et al.*, 2009). Un análisis realizado en *Arabidopsis* muestra que ~30% de la metilación de las citosinas son reguladas por el ARNi (Cokus *et al.*, 2008; Lister *et al.*, 2008).

Por otro lado, las METs y CMTs son las enzimas responsables de la metilación de mantenimiento de las islas CG y CHG, respectivamente (Law y Jacobsen, 2010; Pavlopoulou y Kossida, 2007; Lindroth *et al.*, 2001). La METILTRANSFERASA 1 (MET1) es una de las metiltransferasas más estudiadas, es homóloga a la Dnmt1 de mamíferos y es la responsable del mantenimiento de las islas CG (Finnegan y Kovac, 2000). El silenciamiento de *MET1* en *Arabidopsis*, además de causar una reducción sustancial de las islas CG genera diversas anomalías en el desarrollo, como la reducción en la dominancia apical, disminución en el tamaño de la planta, alteraciones en el tamaño y la forma de las hojas, disminución de la fertilidad y alteraciones en el tiempo de la floración (Finnegan *et al.*, 1996).

La mutación de *MET1* de *Arabidopsis* provoca que las regiones metiladas se reduzcan ~64%. La mayor reducción se encuentra en los genes transcripcionalmente activos, se elimina cerca del 97% de la metilación (Zhang *et al.*, 2006). Las regiones residuales metiladas encontradas en *met1* se localizan en regiones de la heterocromatina, principalmente en regiones de secuencias repetidas (~92%), en agrupaciones de genes asociadas con ARNi y con alto contenido de las islas CHG, sugiriendo que la metilación residual en *met1* es mantenida por CMT3 y DRM1/2 (Zhang *et al.*, 2006; Chan *et al.*, 2005). Además de MET1, la metilación de las islas CG también es controlada por la VARIANTE EN LA METILACIÓN 1 (V1M1), la METILTRANSFERASA DE ADN DISMINUIDO 1 (DDM1) y la DEACETILASA EN HISTONA 6 (HDA6) (Woo *et al.*, 2008; Chan *et al.*, 2005).

Por otra parte, la metilación de las islas CHG es mantenida por la enzima

CROMOMETILASA 3 (CMT3) (Cao y Jacobsen, 2002a; Lindroth *et al.*, 2001; Bartee *et al.*, 2001). La enzima CMT3 es única de las plantas y codifica a una metiltransferasa que contiene un cromodominio (Henikoff y Comai, 1998). La mutación de *CMT3* genera la pérdida de la metilación en las islas CHG en las regiones centroméricas y genera la reactivación de elementos móviles, en algunos casos también reduce la metilación en las islas CHH (Lindroth *et al.*, 2001; Bartee *et al.*, 2001). La metilación de las islas CHG también puede ser regulada por la metiltransferasa de histona KYP, encargada de la metilación de la H3K9 (Jackson *et al.*, 2002). En algunos casos la metilación de la isla CHG también puede ser catalizada por la DRM2 (Cao y Jacobsen, 2002a). En plantas, la metilación de la isla CHH puede ser catalizada por las enzimas DRM2 y CMT3 (Law y Jacobsen, 2010; Chan *et al.*, 2005). La función de Dnmt2 aún no se ha elucidado (Pavlopoulou y Kossida, 2007).

El papel de la metilación del ADN en diferentes procesos biológicos ha sido evaluado mediante el uso de la 5-azacitidina (5-Azc) (Massoumi *et al.*, 2017; Nic-Can *et al.*, 2013; Kondo *et al.*, 2007; Thomas y Jiménez, 2006; Vanyushin *et al.*, 2002; Fieldes, 1994; Brown *et al.*, 1989). La 5-Azc es un potente inhibidor de las citosinas-metiltransferasas de ADN. La 5-Azc inhibe la metilación del ADN mediante su unión covalente con las metiltransferasas de ADN, reduciendo así la actividad enzimática y dando como resultado la desmetilación del ADN (Juttermann *et al.*, 1994; Santi *et al.*, 1984). La aplicación de la (5-Azc) causa una hipometilación global que resulta en la expresión de un conjunto de genes que normalmente no se expresan en esa condición (Griffin *et al.*, 2016; Chang y Pikaard, 2005; Finnegan *et al.*, 1993). El tratamiento con 5-Azc de plantas de *Arabidopsis* tuvo un efecto desmetilante en todo el genoma, afectando principalmente la metilación en las islas CHH y CG. El análisis transcriptómico de las plantas tratadas mostró que un número sustancial de genes que codifican a proteínas y elementos móviles fueron sobreexpresados (Griffin *et al.*, 2016). Por otro lado, el tratamiento con 5-Azc de cultivos de arroz sugirió que el albinismo ocasionado por el movimiento de los elementos móviles se debía a una disminución en los estados de metilación del ADN de la planta (Hayashi-Tsugane *et al.*, 2014; Eun *et al.*, 2012).

1.4. MODELO DE ESTUDIO: AGAVES

En México, el género *Agave* spp. representa un cultivo de importancia económica, ya que se le utiliza para la elaboración de bebidas alcohólicas y para la obtención de fibras (Good-Avila *et al.*, 2006). Se han reportado 197 especies de *Agave* spp., de las cuales 136 se encuentran en México, por lo anterior, nuestro país es considerado como centro de origen y diversidad del género. El centro de diversificación de los Agaves se encuentra principalmente en gran parte del territorio mexicano, parte del suroeste de Estados Unidos, América Central, el Caribe y el norte de Sudamérica (Chase *et al.*, 2009; Nobel, 2003; Herppich, 1997).

La mayoría, si es que no todas de las aproximadamente 200 especies del genero *Agave* pp. exhiben absorción nocturna de CO₂ y la acumulación de ácido málico, característico del metabolismo CAM (Nobel, 2003). El metabolismo tipo CAM de los agaves ha facilitado su adaptación a la sequía en la zona ecológica más extensa del país: la árida y la semiárida (Nobel, 2003). Debido a que son extraordinariamente resistentes al calor y ambientes áridos (Davis *et al.*, 2011; Somerville *et al.*, 2010) los agaves han sido propuestos como fuente de materia prima de material lignocelulósico con potencial bioenergético (Nobel y Smith, 1983).

Las especies del genero *Agave* spp. tienen tres mecanismos de reproducción: por semillas, por vástagos a partir de rizomas y por plántulas a partir de los bulbillos (Zapata y Nabhan, 2003; Vega *et al.*, 2001). Las especies del genero *Agave* spp. son propagadas principalmente de forma asexual por medio de los rizomas, debido a que muchas de las especies producen semillas recalcitrantes y los cultivos son aprovechados antes de su floración cortando el vástago floral para obtener el almacén rico de polisacáridos en los tallos y en la base de las hojas, inhibiendo así su reproducción sexual (Palomino *et al.*, 2003).

Debido a la adaptación a entornos áridos, los Agaves han sido considerados como modelos de investigación de la respuesta de las plantas al estrés biótico y abiótico. Recientemente, se han reportado los transcriptomas de *A. tequilana* y *A. deserti* a partir de hojas colectadas en campo, representando una fuente importante para la realización de estudios moleculares sobre la adaptación a las condiciones bióticas y abióticas de las

plantas, sobre la fisiología y desarrollo de la hoja, fotosíntesis y biosíntesis de pigmentos, entre otros (Gross *et al.*, 2013). Por otro lado, se estima que el tamaño del genoma de los Agaves es de aproximadamente 4 Gpb (Palomino *et al.*, 2003) y que presenta una cantidad significativa de genes duplicados debido a su poliploidía (McKain *et al.*, 2012) y de elementos repetidos (Bousios *et al.*, 2007).

1.4.1. *Agave angustifolia* Haw.

A. angustifolia Haworth, es una especie utilizada para la elaboración de mezcal o bacanora, una bebida alcohólica tradicional (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009; Gentry, 1982). Se han descrito variedades hexaploides ($6x = 180$) de *A. angustifolia* (*A. angustifolia* Haw. sensu Gentry y *A. angustifolia* Haw. var. Chelem ki), diploides ($2x = 60$) (*A. angustifolia* Haw. var. marginata Hort.) y tetraploides ($4x = 120$) (*A. angustifolia* Haw. var. Letona) (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009; Barraza-Morales *et al.*, 2006; Piven *et al.*, 2001; Castorena-Sánchez *et al.*, 1991). *A. angustifolia* tiene un ciclo de vida de 20 a 25 años y alcanza su edad reproductiva en los primeros 7 - 8 años de vida (Piven *et al.*, 2001; Gentry, 1982). Generalmente, produce semillas no viables por lo que es propagada vegetativamente mediante la separación de hijuelos y de forma eficiente utilizando métodos de micropropagación *in vitro* (Robert *et al.*, 2006; Gentry, 1982). Las diferentes especies de *A. angustifolia* se distribuyen a lo largo del océano Pacífico, desde el estado de Sonora hasta Costa Rica, encontrándose en hábitats muy diversos, que incluso abarcan dunas costeras que se encuentran a más de 1500 m de altura (Gentry, 1982). Los diferentes cultivares de *A. angustifolia* han mostrado altos niveles de variabilidad genética y se ha sugerido que esta variabilidad es una respuesta adaptativa a los factores bióticos y abióticos presentes en las diferentes regiones (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009). En la península de Yucatán, *A. angustifolia* muestra una importante variación morfológica relacionada con su distribución geográfica. En la duna costera las plantas son más pequeñas; en los bosques caducifolios tropicales las plantas son de tamaño intermedio, en tanto que en los bosques sub-caducifolios tropicales las plantas más grandes (Colunga-Garciamarin y May-Pat, 1997; Orellana *et al.*, 1985).

JUSTIFICACIÓN

El albinismo en las plantas es un fenómeno raro que ocurre de manera azarosa en la naturaleza. Si bien se han realizado grandes avances para entender este fenómeno, principalmente a nivel molecular, las causas exactas y las bases biológicas aún se desconocen. Por otro lado, existen algunas evidencias que sugieren una posible regulación epigenética en la generación del albinismo en las plantas, sin embargo, hasta el momento poco se ha explorado este tema.

La mayoría de los estudios realizados sobre albinismo ha sido mediante el uso de mutantes que se obtienen por sistemas laboriosos y que pueden presentar un fenotipo letal o efectos pleiotrópicos no deseados, por lo que un sistema natural, rápido y eficiente de obtención de plantas albinas, como el que se tiene de *A. angustifolia*, representa un excelente sistema de estudio que nos permitirá explorar los cambios moleculares y epigenéticos en estos fenotipos, además de generar conocimiento que nos permitirá entender con mayor profundidad las causas del albinismo durante el cultivo *in vitro* de plantas.

PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

- I. ¿Cuáles son los niveles de carotenoides y clorofilas en los diferentes fenotipos (verdes, variegados y albinos) de *A. angustifolia*?
- II. ¿Cómo se relaciona la expresión de los genes que codifican a enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides y en la biosíntesis/degradación de las clorofilas, con la acumulación de estos pigmentos en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*?
- III. ¿Cuáles son los niveles de expresión de genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en la fotosíntesis en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*?
- IV. ¿Existe variabilidad genética entre los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*?
- V. ¿Cuáles son los niveles de metilación global en el ADN genómico en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*?
- VI. ¿Cuál es la acumulación de las diferentes marcas en histonas involucradas en la activación (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3) transcripcional de genes en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*?
- VII. ¿Cuáles son los niveles de expresión de las diferentes deacetilasas de histonas (HDACs) y metiltransferasas de ADN en los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*?

HIPÓTESIS

Si el albinismo en plantas está relacionado principalmente a cambios moleculares y en algunos casos epigenéticos, entonces es posible que el fenotipo albino observado en cultivos *in vitro* de *A. angustifolia* presente cambios no sólo a nivel de expresión de los genes que codifican a enzimas de la biosíntesis de clorofilas, carotenoides y fotosíntesis, sino que también sea el resultado de cambios en la metilación del ADN y la acumulación de diferentes marcas en histonas involucradas en la activación y represión transcripcional de genes, así como en la expresión de los genes que codifican a las enzimas encargadas de modular estos dos mecanismos epigenéticos.

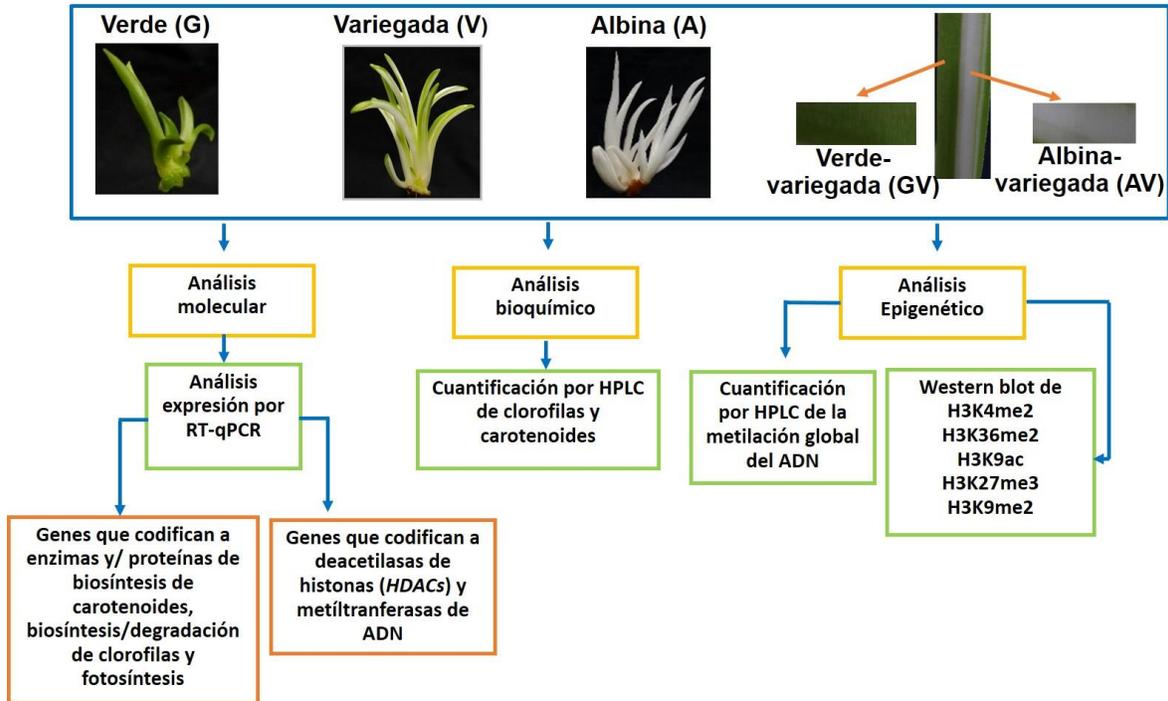
OBJETIVO GENERAL

Analizar los cambios moleculares y epigenéticos en los cultivos verdes, variegados y albinos de *A. angustifolia* propagados *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ❖ Analizar el perfil de carotenoides y clorofilas de los tejidos verdes (G), variegados (V) y albinos (A) así como de la región verde (GV) y albina (AV) de los tejidos variegados de *A. angustifolia*.
- ❖ Determinar los niveles de expresión de genes que codifican a enzimas y/o proteínas que participan en la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación de clorofilas y la fotosíntesis de los tejidos G, V, A, GV y AV de *A. angustifolia*.
- ❖ Determinar los niveles de variabilidad genética entre los tejidos G, V, A, GV y AV de *A. angustifolia*.
- ❖ Determinar los niveles de metilación global del ADN genómico de los tejidos G, V, A, GV y AV de *A. angustifolia*.
- ❖ Evaluar los niveles de acumulación de las diferentes marcas en histonas involucradas en la activación (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3) transcripcional de genes de los tejidos G, V, A, GV y AV de *A. angustifolia*.
- ❖ Determinar los niveles de expresión de genes que codifican para diferentes deacetilasas de histonas (*HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) y metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *CTM3* y *DRM3*) en los tejidos albinos de *A. angustifolia*.

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

PERFIL DE CAROTENOIDES Y CLOROFILAS DE LOS CULTIVOS CON FENOTIPOS VERDE, VARIEGADO Y ALBINO DE *A. angustifolia* Haw.

2.1. INTRODUCCIÓN

El albinismo en las plantas se caracteriza por la pérdida total o parcial de clorofilas y carotenoides (Careda *et al.*, 2000; Jähne *et al.*, 1991), pigmentos esenciales para la absorción de luz y la transferencia de energía durante la primera fase de la fotosíntesis. En organismos fotosintéticos, los carotenoides son sintetizados en los plástidos, como los cloroplastos, y se acumulan en las membranas tilacoidales (Cunningham y Gantt, 1998). Los carotenoides juegan un importante papel estructural en el ensamblaje de los complejos que absorben, luz protegiendo al aparato fotosintético del daño foto-oxidativo. Dentro de los tilacoides, los carotenoides se encuentran unidos a proteínas específicas de los PSI y PSII, aumentando la capacidad de absorción de luz (450-550 nm) y transfiriendo la energía a las clorofilas (Holt *et al.*, 2005). Los carotenoides son isoprenoides que tienen una estructura basal de 40 átomos de carbono (40 C), que incluye enlaces dobles dentro de su estructura y son probablemente los pigmentos naturales más ampliamente distribuidos en la naturaleza (Walter y Strack, 2011).

La biosíntesis de los carotenoides se realiza en los plástidos. El primer paso de su biosíntesis involucra la condensación de dos moléculas de geranylgeranyl difosfato (GGDP) para producir fitoeno, un compuesto incoloro (Bartley *et al.*, 1991). Subsiguientes conversiones enzimáticas realizadas por la PDS y ZDS dan lugar al licopeno, el primer carotenoide que presenta una coloración (rojo) (Bartley *et al.*, 1991). Posteriormente la ruta se bifurca permitiendo la síntesis de los α -caroteno y β -caroteno, ambas moléculas sirven como precursores para la producción de otros carotenoides (Pecker *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1996). A partir del α -caroteno se produce luteína, la xantofila más abundante en los plástidos de las plantas (Sun *et al.*, 1996), mientras que a partir del β -caroteno se sintetizan la zeaxantina, la violaxantina y la xantonina, un precursor del regulador del crecimiento ABA (Demmig-Adams *et al.*, 1996).

Por otro lado, la biosíntesis de las clorofilas se realiza a partir de una red de rutas que se entrecruzan (Rüdiger y Grimm, 2006). Todas las clorofilas presentan una estructura de

anillo tetrapirrólico, el cual contiene Mg unido a una cola larga de hidrocarburo. La cola ancla a la clorofila a la parte hidrofóbica del entorno y la estructura de anillo participa en las transiciones de electrones y reacciones redox (Taiz y Zeiger, 2010). El primer precursor específico para la formación de la molécula del tetrapirrol es el ALA. En las plantas, el ALA es sintetizado a partir de la conversión del L-glutamato a glutamato 1-semialdehído y varias reacciones enzimáticas subsecuentes (Tanaka y Tanaka, 2007). La condensación de dos moléculas de ALA permite la formación de la molécula de porfobilinógeno (PBG). Posteriormente la polimerización de cuatro moléculas de PBG da lugar a la formación de una molécula de 1-hidroximetilbilano (HMB), el primer tetrapirrol de cadena lineal. Los siguientes pasos enzimáticos permiten la formación de la protoporfirina IX. La inserción de Mg al anillo de la protoporfirina IX por la MAGNESIO QUELATASA da lugar a la Mg-protoporfirina IX. Los pasos intermediarios incluyen la formación de la Mg-protoporfirina IX monometil éster, la formación de un anillo cíclico para producir 8-vinil protoclorofilida *a* también conocida como clorofilida *a* y, por último la conversión de clorofilida *a* a clorofila *a* mediante la adición de un grupo fitol catalizada por la CLOROFILA SINTASA (Tanaka y Tanaka, 2007). La clorofila *b* difiere de la clorofila *a* por la presencia de un grupo formilo en lugar de un grupo metilo dentro de su estructura (Espineda *et al.*, 1999). La clorofilida *b* es el principal pigmento de absorción de luz presente en los cuerpos prolamelares de los etioplastos (Reinbothe *et al.*, 2003).

En el presente capítulo de esta tesis se describen los resultados obtenidos de la cuantificación, por HPLC, de los diferentes carotenoides y de las Chl *a* y *b*, con el fin de determinar qué pigmentos fotosintéticos se encuentran disminuidos en los tejidos albinos de *A. angustifolia* en comparación con el contenido de los mismos pigmentos en los tejidos verdes y variegados.

2.2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1. Material vegetal

Los cultivos de *Agave angustifolia* clona 26S se mantuvieron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad de su fuerza iónica (MSB-5) suplementado con 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético) (0.11 μ M), 6-BAP (6-bencilaminopurina) (22.2 μ M) y gelificado con agar (0.2%) y gelrite (0.2%) (Robert *et al.*, 2006). Se partió de brotes de 0.5 cm, los cuales fueron sub-cultivados cada 4 semanas, utilizando el mismo medio de cultivo hasta

alcanzar una altura de 4-5 cm. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad a 25 ± 2 °C. La cuantificación de Chls y carotenoides se realizó utilizando las hojas de las plántulas de 4-5 cm de altura con fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). Los cultivos G y V alcanzaron esta altura al quinto ciclo de cultivo (cuatro semanas por ciclo), mientras que los cultivos A al sexto ciclo de cultivo. Las hojas de las plántulas variegadas fueron separadas manualmente con la ayuda de un bisturí en las secciones verde (GV) y albina (AV) para los análisis correspondientes. Las muestras fueron colectadas y almacenadas a -80 °C hasta realizar los análisis correspondientes.

2.2.2. Cuantificación de carotenoides y clorofilas por HPLC

Los tejidos G, V, A, GV y AV fueron liofilizados por 48 h, posteriormente las muestras se maceraron y pulverizaron con la ayuda de un pistilo. Diez miligramos de tejido liofilizado de cada muestra se resuspendieron en un ml de la mezcla acetonitrilo/metanol/isopropanol (75:10:15 v/v/v). Las muestras se homogenizaron y se centrifugaron a 14,000 rpm (centrífuga, sorval legend micro 21R, rotor 24 x 1.5/2.0ml) por 10 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de PVDF con tamaño de poro de 0.22 μ m. Los analitos fueron separados en un HPLC (Agilent 1200) siguiendo el método descrito por Rodríguez-Ávila *et al.* (2011). Veinte μ L de cada muestra se inyectaron en una columna de fase reversa Hypersil ODS C₁₈ (250 x 4.6 mm, 5 μ m, Phenomenex). La fase móvil consistía en una mezcla de acetonitrilo/metanol/isopropanol (75:10:15 v/v/v), mientras que el solvente B consistió en acetonitrilo al 100%. La separación se realizó a una velocidad de flujo de 1 mL/min siguiendo el siguiente método: paso 1, 100% de solvente A por 30 min y paso 2 un incremento hasta el 100% del solvente B por 2 min; se utilizó un post-time de 2 min con 100% de solvente B. La detección se realizó con un fotodetector de arreglo de diodos (PAD)-UV/VIS. El fitoeno, el ABA y la luteína fueron analizados utilizando una longitud de onda de 280 nm, mientras que para el licopeno, el β -caroteno y la zeaxantina la longitud de onda utilizada fue de 450 nm, para las Chl *a* y *b* se utilizaron 645 y 663 nm, respectivamente. La identificación se realizó basándose en los tiempos de retención de los estándares correspondientes. La cuantificación de los pigmentos se llevó a cabo a partir de una curva estándar para cada uno de ellos. Todos los reactivos utilizados fueron grado HPLC.

2.2.3. Análisis estadístico

Se realizaron tres replicas biológicas por muestra y los resultados se expresaron en $\mu\text{g/g}$ PS. Los valores obtenidos entre el tejido G y los demás tejidos se sometieron a la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes valores de significancia ($*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$).

2.3. RESULTADOS

2.3.1. Micropropagación de *Agave angustifolia* Haw.

Durante los periodos de micropropagación de *A. angustifolia* los brotes de cada fenotipo fueron separados y mantenidos en cajas diferentes, con base en los fenotipos observados y tamaños similares (**Figuras 2A, 2B y 2C**). Las **figuras 2D, 2E y 2F** muestran un acercamiento de los tres fenotipos producidos durante la micropropagación de *A. Angustifolia*.

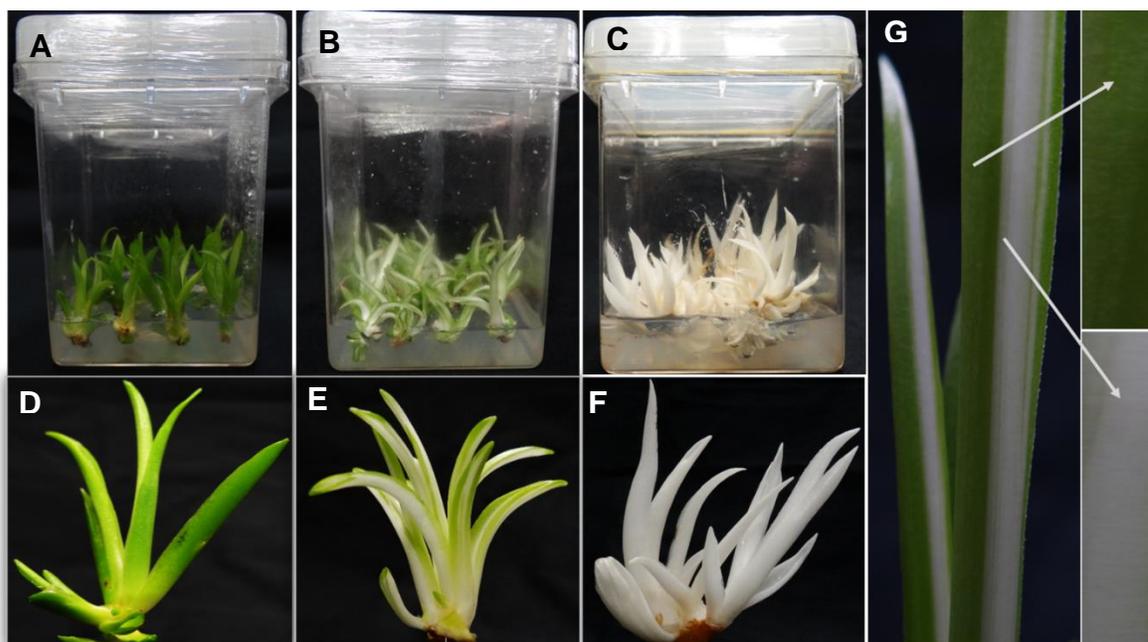


Figura 2.1 Fenotipos encontrados durante la micropropagación de la clona 26S de *A. angustifolia* Haw. A) Plántulas verdes de 3 meses de edad; B) plántulas variegadas de 3 meses de edad y C) plántulas albinas de 3 meses de edad. D y E) acercamiento de una plántula con fenotipo verde y variegado,

respectivamente, de 5 meses de edad y F) acercamiento de una plántula con fenotipo albino de 6 meses de edad. G) acercamiento de una hoja con fenotipo variegado mostrando las regiones verde y albina.

2.3.2. Cuantificación de carotenoides y clorofilas

Una de las características del albinismo es la pérdida de la pigmentación. Con la intención de conocer el perfil de pigmentos fotosintéticos en los tejidos G, V, A, GV y AV, se analizaron los niveles de los diferentes carotenoides y de las Chl *a* y *b* por HPLC. Los resultados obtenidos se muestran en la **Tabla 2.1**.

El primer pigmento incoloro de la ruta de biosíntesis de los carotenoides es el fitoeno. En los tejidos A, AV y V se detectó su acumulación en el tejido A (**Tabla 2.1**), seguido de los tejidos AV y V los cuales no presentaban diferencias significativas entre ellas al compararse con el tejido G. En los tejidos G y GV no se detectó el fitoeno. El siguiente pigmento analizado fue el licopeno, a partir de este pigmento se genera la bifurcación de la ruta para la generación de α y β -caroteno. En todos los tejidos analizados no se detectó a este pigmento (**Tabla 2.1**). Posteriormente, se determinaron los niveles de β -caroteno, precursor de diferentes carotenoides incluidos la zeaxantina y ABA. En el tejido A no se detectó β -caroteno pero sí en el tejido AV, si bien con valores inferiores a los niveles encontrados en los tejidos G, V y GV. El tejido GV presentó el nivel más alto de β -caroteno comparado con los demás tejidos, en tanto que el tejido V presentó un valor ligeramente inferior al 50% del valor encontrado en el tejido G (**Tabla 2.1**). Por otro lado, los niveles de zeaxantina en los diferentes tejidos presentaron un patrón similar al del β -caroteno, a diferencia del contenido de este pigmento en los tejidos GV que no presentaron una diferencia significativa respecto al tejido G (**Tabla 2.1**).

En todos los tejidos analizados se detectaron niveles variables de ABA, encontrándose en menor cantidad en tejido A al compararse con el tejido G y los demás tejidos (**Tabla 2.1**). Los niveles de ABA en los tejidos AV y V no presentaron diferencia significativa entre ellos pero si valores inferiores a los encontrados en los tejidos verdes (G y GV). El tejido GV presentó la mayor acumulación de ABA (**Tabla 2.1**).

Después de la bifurcación de la ruta de los carotenoides, el α -caroteno da origen a la luteína, una de las xantofilas más abundantes en los cloroplastos de las plantas (Sun *et al.*, 1996). En todos los tejidos analizados se detectaron niveles de luteína (**Tabla 2.1**).

Los niveles de luteína en los tejidos A y AV no presentaron diferencias significativas entre ellos pero sí valores inferiores a los encontrados en los tejidos G, V y GV. De igual manera, los tejidos G y GV no presentaron diferencias significativas entre ellos mientras que el tejido V presentó un valor intermedio entre los niveles encontrados en los tejidos verdes y albinos (**Tabla 2.1**). Por último, se analizaron los niveles de Chl *a* y *b*. Ninguno de estos pigmentos fue detectado en el tejido A. En los tejidos AV se detectaron niveles muy inferiores de Chl *a* y *b* a los encontrados en los tejidos G, V y GV. El tejido V presentó niveles de Chl *a* y *b* ligeramente inferiores a la mitad de los niveles encontrados en los tejidos G y GV, los cuales presentaron los valores más altos de estos pigmentos (**Tabla 2.1**).

Tabla 2.1 Niveles de carotenoides y clorofilas en los tejidos de *A. angustifolia* Haw. con diferente fenotipo analizados por HPLC. Los valores mostrados son los promedios \pm ES de tres replicas biológicas. Las diferencias significativas se obtuvieron comparando el tejido G con los demás tejidos mediante la prueba estadística de Tukey y utilizando diferentes valores de significancia (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, respectivamente), nd: no detectada, PS: peso seco y mAUS: miliunidades de absorbancia.

PIGMENTO	FENOTIPO				
	G	V	A	GV	AV
Fitoeno (mAUS)	Nd	99.22 \pm 3.44***	169.39 \pm 9.68***	Nd	107.36 \pm 5.68***
Licopeno ($\mu\text{g/ g PS}$)	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
β -caroteno ($\mu\text{g/ g PS}$)	1236.86 \pm 81.24	520.26 \pm 20.44***	Nd	1491.52 \pm 25.67**	84.52 \pm 1.68***
Zeaxantina ($\mu\text{g/ g PS}$)	2788.53 \pm 90.86	1018.29 \pm 25.14***	Nd	2658.07 \pm 74.57	208.32 \pm 12.99***
ABA ($\mu\text{g/ g PS}$)	65.15 \pm 7.63	41.80 \pm 5.039*	21.95 \pm 1.95***	92.33 \pm 1.43**	42.86 \pm 1.8*
Luteína ($\mu\text{g/ g PS}$)	9061.71 \pm 474.75	5754 \pm 156*	1271 \pm 164.4	11789.3 \pm 3414.3*	1478.5 \pm 11.5*
Chl a ($\mu\text{g/ g PS}$)	3229.15 \pm 117.44	1258.14 \pm 41.65***	nd	3423.77 \pm 54.52	236.60 \pm 12.23***
Chl b ($\mu\text{g/ g PS}$)	988.29 \pm 30.51	396.11 \pm 7.37***	nd	993.06 \pm 16.55	112.57 \pm 3.58***
Chl a/b	3.28	3.18	nd	3.45	2.1

2.4 DISCUSIÓN

En plantas superiores los carotenoides y las clorofilas son los principales pigmentos fotosintéticos. Ante la ausencia de estos pigmentos las plantas no pueden realizar la fotosíntesis, sufren un daño foto-oxidativo y por lo tanto mueren (Bode *et al.*, 2009; Mohanty *et al.*, 2005). El análisis de los pigmentos fotosintéticos mostró que el tejido A presenta una acumulación de fitoeno, una ausencia completa de β -caroteno, zeaxantina, Chl *a* y *b* así como una deficiencia parcial en el contenido de luteína y ABA (**Tabla 2.1**). Resultados similares se han encontrado en mutantes albinas inhibidas en la insaturación del fitoeno. La mutante de la *pds* presentó una acumulación de fitoeno, una ausencia completa de β -caroteno, luteína así como Chl *a* y *b* (Qin *et al.*, 2007; Norris *et al.*, 1995). De igual manera, mutantes albinas de *Helianthus annuus* que presentan una mutación en el gen de la *ZDS* no contienen β -caroteno, luteína, Chl *a* y *b*, además de mostrar una reducción significativa en el contenido de ABA (Conti *et al.*, 2004; Fambrini *et al.*, 1993).

Sin embargo, la acumulación de fitoeno en los tejidos albinos (A y AV) y la ausencia de este pigmento en los tejidos verdes (G y GV) (**Tabla 2.1**) sugiere que la biosíntesis de carotenoides en los tejidos albinos se encuentra interrumpida en los pasos subsiguientes al fitoeno, causando así la acumulación de este pigmento (Qin *et al.*, 2007). Esta idea se ve reforzada por la ausencia y/o reducción de β -caroteno, zeaxantina, luteína y ABA en los tejidos albinos (A y AV), los cuales necesitan del fitoeno para su biosíntesis. Algo interesante es que en el tejido A se detectaron niveles de luteína y ABA aun cuando sus precursores (licopeno, β -caroteno y zeaxantina) se encontraban ausentes (**Tabla 2.1**). Resultados similares se han observado en plantas albinas de *H. annuus* en los que no se detectó β -caroteno, pero sí una reducción significativa de ABA (Conti *et al.*, 2004; Fambrini *et al.*, 1993). Los autores sugirieron la existencia de una ruta indirecta alternativa involucrada en la biosíntesis de ABA además de la ruta de los carotenoides (Hartung y Gimmler, 1994; Fambrini *et al.*, 1993; Zeevaart y Creelman, 1988). Algo similar podría estar sucediendo con el contenido de luteína en el tejido A, sin embargo, hasta el momento no existen reportes de una ruta alterna para la biosíntesis de luteína.

Por otro lado, es posible que la acumulación de luteína observada en los tejidos albinos (A y AV) sea consecuencia de la ausencia o reducción de zeaxantina en éstos tejidos (**Tabla 2.1**). La luteína, junto con la zeaxantina, funcionan como pigmentos fotoprotectores por el

exceso de energía luminosa (Li *et al.*, 2009). Se ha sugerido que la luteína puede sustituir la función de la zeaxantina ante la ausencia de ésta última, como un mecanismo de fotoprotección causado por el exceso de energía luminosa (Li *et al.*, 2009). En *Arabidopsis*, la ausencia de zeaxantina generó un aumento en la acumulación de luteína como un mecanismo de fotoprotección (Li *et al.*, 2009). Aunque aún se desconoce el origen de la luteína en los tejidos albinos, los resultados presentados en esta investigación podrían sugerir que los tejidos albinos podrían encontrarse bajo un estrés foto-oxidativo (Aluru *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2007). Esta idea es reforzada por la ausencia o disminución del β -caroteno en los tejidos albinos (A y AV) (**Tabla 2.1**). Al igual que la luteína, el β -caroteno funciona como fotoprotector al mitigar el daño oxidativo causado por el oxígeno singulete (Telfer, 2005),

De forma general, el tejido V presentó niveles intermedios en el contenido de carotenoides y Chls a los encontrados entre los tejidos G y A (**Tabla 2.1**). Sin embargo, el contenido de pigmentos de la región albina (AV) presentó grandes diferencias respecto a la región verde del tejido variegado (GV) (**Tabla 2.1**). Resultados similares se observaron en tejidos variegados del género *Zantedeschia*, la región albina sólo presentó del 2–4% del contenido de clorofilas y carotenoides a los determinados en la región verde (Yao y Cohen, 2000). Adicionalmente, la región albina de la mutante variegada *immutans* (*im*) presentó una acumulación de fitoeno y una reducción de varios carotenoides incluidos β -caroteno y luteína (Carol *et al.*, 1999), similar a lo observado en el tejido AV (**Tabla 2.1**). De manera contraria, el tejido GV de *A. angustifolia* presentó un aumento en la acumulación de Chl *b* y de la relación de Chl *a/b* (**Tabla 2.1**). Algo similar se observó en la región verde de *im*. La región verde de *im* presentó más clorofila que las plantas silvestres y un incremento en la relación de Chl *a/b*, sugiriendo un incremento en la actividad fotosintética de la región verde como un mecanismo compensatorio debido a la ausencia de pigmentos y de fotosíntesis de la región albina (Aluru *et al.*, 2001). Los resultados encontrados en este trabajo podrían sugerir un mecanismo compensatorio fotosintético de GV debido a la disminución de los pigmentos en la región albina (AV) de *A. angustifolia*, similar al encontrado en *im*.

Por otro parte, también se ha sugerido que los cambios morfológicos y bioquímicos observados en la región verde de *im* son una manera de contrarrestar el daño foto-

oxidativo ocasionado por la ausencia de pigmentos en la región albina (Foudree *et al.*, 2012; Rodermel, 2002; Aluru *et al.*, 2001; Carol *et al.*, 1999). El incremento en los niveles de β -caroteno y luteína en el tejido GV comparados con el tejido G, sugieren la existencia de un posible mecanismo de fotoprotección desde los tejidos GV a los tejidos AV en las plantas V (**Tabla 2.1**). El β -caroteno mitiga el daño oxidativo causado por el oxígeno singulete, mientras que la luteína desactiva el estado triple de la clorofila, ambos carotenoides mitigan el daño foto-oxidativo (Jahns y Holzwarth, 2012; Telfer, 2005).

Por último, en el tejido A no se detectaron niveles de Chl *a* y *b* (**Tabla 2.1**) al igual que en otras plantas albinas, sugiriendo una interrupción en la biosíntesis de clorofilas y la ausencia de la actividad fotosintética en estos tejidos (Qin *et al.*, 2007; Abadie *et al.*, 2006; Norris *et al.*, 1995; Fambrini *et al.*, 1993).

CAPÍTULO III

NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN PARA ENZIMAS DE LA BIOSÍNTESIS DE CAROTENOIDES, BIOSÍNTESIS/DEGRADACIÓN DE CLOROFILAS Y FOTOSÍNTESIS EN LOS CULTIVOS CON FENOTIPO VERDE, VARIEGADO Y ALBINO DE *A. angustifolia* Haw.

3.1. INTRODUCCIÓN

La pérdida de la pigmentación de las plantas puede generar una muerte prematura debido a una disminución en la capacidad fotosintética de la planta (Kumari *et al.*, 2009; Mohanty *et al.*, 2005). La disminución de la capacidad fotosintética puede generarse por mutaciones o el silenciamiento de los genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de los pigmentos fotosintéticos y/o de la fotosíntesis. Diversos trabajos sugieren que la afectación en la expresión de genes que codifican a las enzimas que participan en la biosíntesis de los carotenoides y parte de la estructura de las clorofilas por la ruta MEP, pueden generar algún tipo de albinismo (Laule *et al.*, 2003; Eisenreich *et al.*, 2001; Estevez *et al.*, 2001; Mandel *et al.*, 1996).

En arroz, el silenciamiento del gen que codifica para la *PDS* genera un fenotipo albino (Miki y Shimamoto, 2004), en tanto que en tabaco, el silenciamiento del mismo gen, genera una disminución en el contenido de carotenoides y Chl *a* y *b* (Wang *et al.*, 2009). De igual manera, la mutante del gen que codifica para la *ZDS* de girasol, presenta un fenotipo albino y una disminución de Chl *a* y *b*, neoxantina, violaxantina, luteína y β -caroteno (Conti *et al.*, 2004; Fambrini *et al.*, 1993). En arroz, se ha observado que las mutantes de los genes que codifican para las enzimas *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* y *LCY β* presentan un fenotipo albino y una disminución casi indetectable en los niveles de clorofilas y carotenoides (Fang *et al.*, 2008). Al mismo tiempo, Cazzonelli *et al.* (2009) determinaron que la expresión de *CRTISO* es regulada por la METILTRANSFERASA DE HISTONA SDG8 (SET DOMAIN GROUP 8). Las plantas mutantes *sdg8* presentan una disminución en la expresión de *CRTISO* y en el contenido de luteína, además de presentar un fotoblanqueo en las hojas (Cazzonelli *et al.*, 2009). En otros trabajos la sobreexpresión de los genes que codifican para las enzimas *PDS*, *ZDS*, *CRTISO* y *LCY β* provocan un aumento en los niveles de varios isoprenoides, incluyendo las clorofilas y los carotenoides, reforzando la importancia de tienen estas enzimas en la biosíntesis de carotenoides y su relación con el albinismo (Carretero-Paulet *et al.*, 2006; Carretero-

Paulet *et al.*, 2002).

En arroz, al albinismo se ha relacionado con la eliminación de regiones del gen que codifica a la subunidad pequeña de la RUBISCO, una enzima vital para la fotosíntesis y la vida de las plantas (Harada *et al.*, 1991). En otros trabajos se ha demostrado que el gen que codifica para la subunidad mayor de la RUBISCO (*rubL*) no se expresa o se expresa en niveles muy bajos en tejidos albinos (Ankele *et al.*, 2005; Zubko y Day, 1998). Esto probablemente se debe a que existe una coordinación entre la expresión del gen que codifica para la subunidad pequeña (codificada en el núcleo) y la expresión del gen que codifica para la subunidad grande (codificada en el cloroplasto). De igual manera, en líneas celulares no-fotosintéticas y albinas de *Acer pseudoplatanus* no se expresan los genes *rubL* y *PEPCasa*, así como de otros genes cuyos productos participan en la fotosíntesis (Ngernprasirtsiri *et al.*, 1988), lo que sugiere que existe una relación entre la expresión de genes que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis y el albinismo.

En este capítulo de la tesis se describen los resultados obtenidos de los análisis de expresión de genes que codifican a enzimas y/o proteínas implicadas en la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación de clorofilas y en la fotosíntesis. El análisis de expresión se realizó con el fin de determinar cómo se afecta la expresión de estos genes y determinar si existe una relación entre esta expresión, la acumulación de carotenoides y clorofilas y el albinismo.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Material vegetal

Los tres diferentes fenotipos de *Agave angustifolia* clona 26S se mantuvieron en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad de su fuerza iónica (MSB-5) suplementado con 2,4-D (0.11 μ M), 6-BAP (22.2 μ M) y gelificado con agar (0.2%) y gelrite (0.2%) (Robert *et al.*, 2006). Se utilizaron brotes de 0.5 cm los cuales fueron sub-cultivados, cada 4 semanas utilizando el mismo medio de cultivo, hasta alcanzar una altura de 4-5 cm. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad a 25 ± 2 °C. Los análisis de expresión se realizaron utilizando las hojas de las plántulas de 4-5 cm de altura con fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). Las hojas de las plántulas V fueron separadas manualmente con la ayuda de un bisturí en las secciones verde (GV)

y albina (AV) para los análisis correspondientes. Las muestras fueron colectadas y almacenadas a -80 °C hasta realizar los análisis correspondientes.

3.2.2. Diseño de oligos

Se diseñaron oligos específicos para los genes que codifican a enzimas y/o proteínas implicadas en la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación clorofila y fotosíntesis. Los oligos fueron diseñados con base en las secuencias reportadas en el transcriptoma de *Agave* (Gross *et al.*, 2013) y de secuencias anotadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Para algunos genes el diseño de los oligos se realizó con las regiones altamente conservadas resultantes de los alineamientos de varias secuencias reportadas del gen de interés (**Tabla 3.1**). Los alineamientos se realizaron utilizando el programa ClustalW2-Multiple Sequence (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Los oligos fueron diseñados utilizando los programas Oligo explore 1.1.2. y Oligo Analyzer 1.0.3. Las secuencias de los oligos generados para los análisis de expresión se describen en la **tabla 3.2**.

3.2.3. Medición de los niveles de expresión por PCR de punto final y tiempo real (RT-qPCR)

El ARN total se extrajo de los tejidos G, V, A, GV y AV usando el método de TRI Reagent y siguiendo las especificaciones del proveedor (Sigma). La integridad del ARN se verificó en un gel de agarosa al 1.5%. Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit SuperScript III First-Strand Synthesis System (Invitrogen) partiendo de 1.5 µg de ARN total hasta un volumen final de reacción de 25 µl. Para las reacciones de PCR punto final se utilizó 1000 ng/µl del ADNc, 2.5 µl de amortiguador Dream taq 10X, 0.5 µl de cada oligo (10 µM), 0.25 de dNTP (10 mM) y 0.2 µl de la polimerasa Dream taq hasta un volumen final de reacción de 25 µl. Para las reacciones de RT-qPCR se utilizaron 0.125 µl de cada oligo (5 µM), 6.25 µl de PCR SYBR Master Mix (Applied biosystems) y una concentración de 20 ng/µl of ADNc en un volumen final de reacción de 12.5 µl. El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial de 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 40 s, una Tm específica de cada juego de oligos (**Tabla 3. 2**) por 40 s y 72 °C por 1 min. Como gen normalizador se utilizó *UBIQUITINA (UBI11)* (Delgado-Sandoval *et al.*, 2012) siguiendo el programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 40 s, 62 °C por 40 s y 72 °C por 2 min. Las reacciones

de RT-qPCR se realizaron utilizando el equipo StepOne Software v2.2.2 -Real Time PCR system (Applied Biosystems).

Tabla 3.1 Secuencias utilizadas para el diseño de los oligos de los diferentes genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en la biosíntesis de carotenoides, en la regulación epigenética de la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación de clorofila y fotosíntesis.

Gen	Número de accesoión	Especie	Base de datos
FITOENO SINTASA (PSY)	NM_121729.2 AF251015.1 AY613925.1 AJ715786.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Tagetes erecta</i> <i>Bixa orellana</i> <i>Oryza sativa</i>	Genebank
FITOENO DESATURASA (PDS)	SRR1371238.310666.2	<i>A. americana</i>	Transcriptoma de Agave/Genebank
ZETA CAROTENO DESATURASA (ZDS)	JQ797378.1	<i>Narcissus tazetta</i>	Genebank
METILTRANSFERASA DE HISTONA SDG8	GAHU01052512.1	<i>A. tequilana</i> y <i>deserti</i>	Transcriptoma de Agave/Genebank
LICOPENO β CICLASA (LCY β)	GAHU01040106.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de Agave /Genebank
LICOPENO ϵ CICLASA (LCY ϵ)	AF251016.1	<i>T. erecta</i>	Genebank
β -CAROTENO HIDROXILASA (β -OHasa)	Y14809.1 NM_001247419.1 NM_001112437.1 AF125576.1 AF049356.1 AY099483.1	<i>L. esculentum</i> <i>S. sicum</i> <i>Z. mays</i> <i>A. thaliana</i> <i>Oryza Sativa</i> <i>T. erecta</i>	Genebank
VIOLAXATINA DE EPOXIDASA (VDE)	GAHU01060198.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de Agave /Genebank
SUBUNIDAD MENOR DE LA RUBISCO (<i>rubS</i>)	GAHU01011045.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de Agave /Genebank
SUBUNIDAD MAYOR DE LA RUBISCO (<i>rubL</i>)	JX903133.1	<i>A. Americana</i>	Genebank
FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPCasa)	GAHU01000827.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de Agave /Genebank
MAGNESIO QUELATASA(Mgche)	GAHU01023648.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de Agave /Genebank
CHLOROFILASA-2(CLH2)	GAHU01052953.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de Agave /Genebank

<i>PROTEÍNA DE UNIÓN A CLOROFILA A/B (LHCP)</i>	GAHU01013478.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
---	----------------	---	---

Tabla 3.2 Secuencia de los oligos diseñados para los análisis de expresión de genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en la ruta de biosíntesis de carotenoides, en la regulación epigenética de la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación de clorofila y fotosíntesis enlistados en la tabla 3.1.

<i>Gen</i>	Secuencia (5' →3')	Tamaño teórico	Tm (°C)
<i>PSY</i>	PSYF2: ATGGGCCATCTATGTGTGGT PSYR2: CCGCATCCCTTCTATCATGT	217	58
<i>PDS</i>	PDSF: TGGAGGCAAGAGATGTTC PDSR: ATGGCTGGCAAAGTC	324	58
<i>ZDS</i>	ZDSF: GCCCTCGGATTTATTGACTG ZDSR: CTCTCTACACCCCCACCTTA	196	59
<i>SDG8</i>	SDG8F2: GGTTCCGTTGTGGAAAGAAA SDG8R2: TCACCACCATTCAACGTCAT	172	58
<i>LCYβ</i>	LCYbF: TGAGGCCATGGACTTTTAG LCYbR: CCACTTGATATCCGGGATTG	326	58
<i>LCYξ</i>	LYCEF2: CTCGATGTTAGCATGGACGA LYCER2: GAGCGTTGAGCCAAGAAATC	175	58
<i>β-OHasa</i>	bOHasaF: TCCTGTAACCGAAATGTTGG bOHasaR: AGTGATGAAGCGAATGAGC	341	58
<i>VDE</i>	VDEF: GACTCCTGATGGTGGTTTC VDER: TCTGTGCTGCCTTCTCTA	281	58
<i>rubS</i>	RUBSF1: TTACCTCCCTCCCTTGTC RUBSR1: GTCCTTCACAACCTGG	193	55
<i>rubL</i>	RUBLF: TATGGTCGTCCCCTATTG RUBLR: TGATTTGCGCTGTTTCG	215	55
<i>PEPCasa</i>	PEPCF1: TCAGCCACCAGACACAATC PEPRC1: CCACAACAGCCATCTCATC	197	55
<i>Mgche</i>	MgcheF: GAGGTGTGATGATAATGGG MgcheR: GCCTTCTCAATGTCAATGG	266	58
<i>CLH2</i>	CLH2F: GTTCCCTGTGCTTGTGTTG CLH2R: ACGGCGAATGCTACTTTGC	276	62
<i>LHCP</i>	LCHPF: AGAACATCCCATCAACC LCHPR: GCCCTTCTCCAGTGACATA	255	58

3.2.4. Purificación de fragmentos de ADN

Se cortaron y pesaron los fragmentos deseados del gel de agarosa y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml. Por cada 100 mg de peso se adicionaron 300 μ l del amortiguador ADB del kit Zymoclean Gel Recovery Kit. Posteriormente se incubó a 55 °C por 10 min o hasta fundir completamente la agarosa. Se adicionó la solución de agarosa en la columna Zymo-Spin y la columna se colocó dentro de los tubos de colecta de 2 ml. Se centrifugó a 13,000 x g por 30 s y se vació el tubo de colecta. Después, a la columna se le adicionaron 200 μ l del amortiguador de lavado y se centrifugó a 10,000 x g por 30 s, a continuación se vació el tubo de colecta. Este paso se repitió dos veces. Por último, la columna Zymo-Spin se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml y el ADN se eluyó adicionando de 6 a 10 μ l de amortiguador de elución o agua bidestilada estéril a la columna y centrifugando a 10,000 x g por 45 s. El ADN purificado fue enviado a secuenciar (Clemson University Genomic Institute). Los resultados de los fragmentos secuenciados fueron analizados mediante alineamientos (Blastn y Blastx) con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar su identidad.

3.2.5. Análisis de los datos

Los resultados obtenidos se analizaron usando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Se emplearon dos replicas biológicas para la cuantificación de la expresión relativa. Los valores obtenidos de cada gen del tejido G fueron comparados con los demás tejidos y los resultados se sometieron a la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes valores de significancia (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

3.3. RESULTADOS

3.3.1. Secuenciación de los fragmentos amplificados

Una vez establecidas las condiciones de amplificación de los oligos diseñados, los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciar con la finalidad de confirmar su identidad. Los resultados de la secuenciación se analizaron mediante alineamientos con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los resultados y los porcentajes de similitud obtenidos para cada fragmento se muestran en la **tabla 3.3**. Se lograron secuenciar los fragmentos correspondientes a genes que codifican a enzimas de la ruta de carotenoides, síntesis/degradación de clorofila y fotosíntesis y los resultados del

análisis bioinformático confirmaron la identidad de éstos (**Tabla 3.3**).

Tabla 3.3 Resultados del análisis bioinformático de los fragmentos correspondientes a genes que codifican a enzimas y/o proteínas de la biosíntesis de carotenoides, de la regulación epigenética de la biosíntesis de carotenoides, biosíntesis/degradación clorofila y fotosíntesis. En la tabla se indica la proteína ortóloga, el porcentaje de similitud con dicha proteína, el valor de E y el número de accesión en la base datos de dicha la proteína.

Gen	Proteína ortóloga	Valor de E	% De similitud	# De accesión
PSY	PSY- <i>Yucca filamentosa</i>	9e-95	95	AIU48730.1
PDS	PDS- <i>Lilium hybrid</i> division I	1e-58	98	BAH10587.1
ZDS	ZDS- <i>Manihot esculenta</i>	1e-25	94	KDO39266.1
LCYβ	LCY β - <i>Narcissus tazetta</i> var. chinensis	5e-19	83	AFH53819.1
LCYϵ	LCY ϵ - <i>Jatropha curcas</i>	4e-20	87	XP_01207694 8.1
β-OHasa	β -OHasa- <i>Medicago sativa</i>	8e-20	98	AIT98181.1
VDE	VDE- <i>Glycine max</i>	8e-16	97	NP_00124094 9.1
SDG8	SDG8- <i>Phoenix dactylifera</i>	9e-20	85	XP_00878162 2.1
rubS	rubS- <i>Coptis quinquesecta</i>	6-34	98	AKE43557.1
rubL	rubL- <i>Oryza sativa</i> Indica Group	2e-27	89	AAB70543.1
PEPCasa	PEPCasa- <i>Montia linearis</i>	6e-20	84	AIF35305.1
Mgche	Mgche- <i>Elaeis guineensis</i>	6e-34	86	XP_01091559 3.1
CLH2	CLH2- <i>Cucumis melo</i>	2e-20	82	XP_00844931 9.1
LHCP	LHCP- <i>Musa acuminata</i> subsp. malaccensis	3e-41	93	XP_00937989 0.1

3.3.2. Análisis de los niveles de expresión de genes que codifican a enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides

Una vez establecidas las condiciones de amplificación de los genes, se realizó el análisis de la expresión relativa de los genes que codifican a enzimas de biosíntesis de

carotenoides: *FITOENO SINTASA (PSY)*, *FITOENO DESATURASA (PDS)*, *ZETA CAROTENO DESATURASA (ZDS)*, *METILTRANSFERASA DE HISTONA SDG8 (SDG8)*, *LICOPENO β CICLASA (LCY β)*, *LICOPENO ϵ CICLASA (LYC ϵ)*, *β -CAROTENO HIDROXILASA (β -OHasa)* y *VIOLAXANTINA DE-EPOXIDASA (VDE)*. Los resultados obtenidos se muestran en la **figura 3.1**.

El primer paso de la biosíntesis de carotenoides es mediada por la *PYS* (Bartley *et al.*, 1991). El nivel de expresión más bajo de *PSY* se determinó en el tejido A, mientras que el tejido V presentó casi el doble de expresión, comparado con el tejido G. El tejido G no presentó diferencia significativa con los tejidos GV y AV (**Figura 3.1**). Conversiones enzimáticas subsiguientes, las cuales son realizadas por las enzimas *PDS* y *ZDS* dan lugar al licopeno, el primer carotenoide con coloración (Bartley *et al.*, 1991). Los niveles de expresión de los genes que codifican para las enzimas *PDS* y *ZDS* en los tejidos V, A, GV y AV muestran una disminución cuando se les compara con el tejido G, siendo esta disminución más pronunciada para el gen que codifica para la *PDS* (**Figura 3.1**).

La *LYC ϵ* es una enzima clave en la bifurcación de la ruta de carotenoides, está involucrada en la síntesis del α -caroteno, un precursor de la luteína (Pecker *et al.*, 1996; Cunningham *et al.*, 1996). La expresión del gen que codifica para la *LYC ϵ* presentó una disminución de más de la mitad en los tejidos A y AV, cuando se le compara con el tejido G. En tejido V, la expresión de este gen presentó un valor ligeramente superior al tejido G, el cual no presentó diferencia significativa con la expresión en el tejido GV (**Figura 3.1**).

La *LCY β* es otra enzima clave que participa en la bifurcación de la ruta de carotenoides y que es necesaria para la síntesis de β -caroteno, un precursor de diferentes carotenoides. En los tejidos V, A, GV y AV los niveles de expresión del gen que codifica para la *LCY β* fueron mayores a los encontrados en el tejido G y la diferencia más significativa se determinó en el tejido V donde la expresión de *LCY β* presentó un incremento del doble comparado con el tejido G (**Figura 3.1**).

La hidroxilación del β -caroteno por la β -OHasa resulta en la formación de Zeaxantina, mientras que la hidroxilación de la α -caroteno por la acción de la misma enzima produce luteína, una de las xantofilas más abundante en los plástidos de las plantas (Sun *et al.*, 1996). No se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de este gen

en todos los tejidos analizados (**Figura 3.1**).

La VDE es una enzima involucrada en la disipación de calor causada por excesos de intensidad luminosa mediante la conversión de violaxantina a zeaxantina (Rossel et al., 2002). Los niveles de expresión de la *VDE* en tejido V y A fueron ligeramente superiores a los encontrados en tejido G. No se encontraron diferencias significativas entre G, GV y AV (**Figura 3.1**).

Por último, se analizó la expresión de *SDG8*, una metiltransferasa de histona que regula la expresión de *CRTISO* y la síntesis de luteína (Cazzonelli et al., 2009). Cazzonelli et al. (2009) encontraron que las plantas mutantes *sdg8* de *Arabidopsis* presentaron una disminución en la expresión de *CRTISO* y el contenido de luteína además de un fotoblanqueo en las hojas. Esto sugería una relación similar entre la *SDG8* y *CRTISO* en las plantas albinas *A. angustifolia*. Un acercamiento a esta idea consistió en analizar los niveles de expresión de la *CRTISO* y la *SDG8*. Lamentablemente sólo se logró la amplificación exitosa de *SDG8* y no de *CRTISO*. Los resultados de la expresión de *SDG8* indicaron que los tejidos V, A y AV presentan un incremento de casi el doble comparados con G y GV, los cuales no presentaron diferencias significativas entre ellas (**Figura 3.1**).

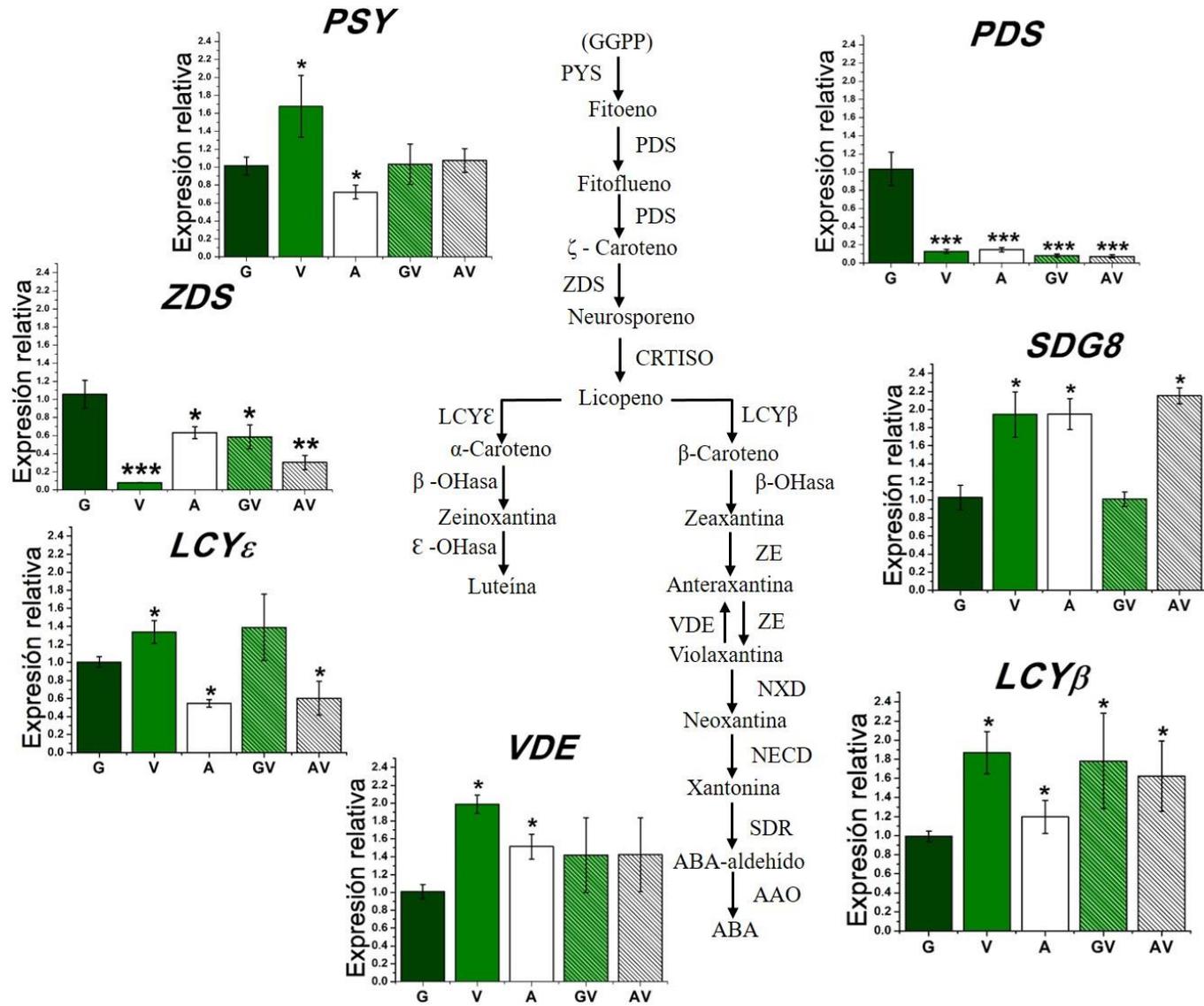


Figura 3.1 Expresión relativa de los genes que codifican a enzimas involucradas en la biosíntesis de carotenoides y en la regulación epigenética de la biosíntesis de carotenoides. *PYS*: FITOENO SINTASA, *PDS*: FITOENO DESATURASA, *ZDS*: ZETA CAROTENO DESATURASA, *SDG8*: METILTRANSFERASA DE HISTONA *SDG8*, *LCYβ*: LICOPENO β CICLASA, *LCYε*: LICOPENO ε CICLASA, *β-OHase*: β-CAROTENO HIDROXILASA y *VDE*: VIOLAXANTINA DE-EPOXIDASA. G: tejido verde, V: variegado, A: albino, GV: verde-variegado y AV: albino-variegado. Las diferencias significativas entre el tejido G y los demás tejidos fue obtenida mediante la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes valores de significancia (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, respectivamente).

3.3.3. Análisis de los niveles de expresión de genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en biosíntesis/degradación de clorofila y fotosíntesis

Se analizaron los niveles de expresión relativa de los genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en la biosíntesis/degradación de clorofilas y fotosíntesis. Los resultados obtenidos se muestran en las **figuras 3.2 y 3.3**.

La biosíntesis de las clorofilas se realiza a partir de una red de rutas que se entrecruzan (Rüdiger y Grimm, 2006). Uno de los primeros pasos para la formación de la clorofila consiste en la inserción de Mg^{2+} dentro del anillo de protoporfirina IX. Este paso es catalizado por la MG-PROTOPORFIRINA IX QUELATASA o MAGNESIO QUELATASA (*Mgche*) (Papenbrock *et al.*, 2000). El análisis de expresión de *Mgche* mostró que el tejido A presentó una disminución, mientras que un incremento de más del doble se observó en tejido V al compararse con el tejido G. También se observó un incremento en la expresión de *Mgche* en los tejidos GV y AV al compararse con el tejido G (**Figura 3.2**).

La CLOROFILASA-2 (*CLH2*) es una enzima localizada en la membrana de los tilacoides de los cloroplastos, realiza la oxidación de la clorofila generando Chl *a*-1, un producto de la degradación de clorofila (Lüthy *et al.*, 1984; Schoch *et al.*, 1984). En plantas la actividad de esta enzima ha sido relacionada con la senescencia debido a la pérdida del verdor causado por la degradación de clorofila (Yamauchi y Watada, 1991). La diferencia más significativa de la expresión de *CLH2* se encontró en tejido V, el cual presentó un incremento del doble comparado con el tejido G, los demás tejidos no presentaron diferencias significativas respecto al tejido G (**Figura 3.2**).

Los pigmentos fotosintéticos como las clorofilas y carotenoides se encuentran unidos a proteínas especializadas denominadas PROTEÍNAS DE UNIÓN A CLOROFILA A/B

(LHCP) formando complejos esenciales para la captación de energía del fotosistema II (Yang *et al.*, 2000; Krol *et al.*, 1995). Las LHCP son las proteínas más abundantes de los cloroplastos con más de la mitad involucradas en fotosíntesis (Liu *et al.*, 2012a). En el análisis de expresión de un gen que codifica a una LHCP mostró que los tejidos albinos (A y AV) presentaban una reducción en la expresión de este gen comparados con el tejido G. Los niveles de expresión de LHCP en los tejidos G, GV y AV no presentaron diferencias significativas entre ellas (Figura 3.2).

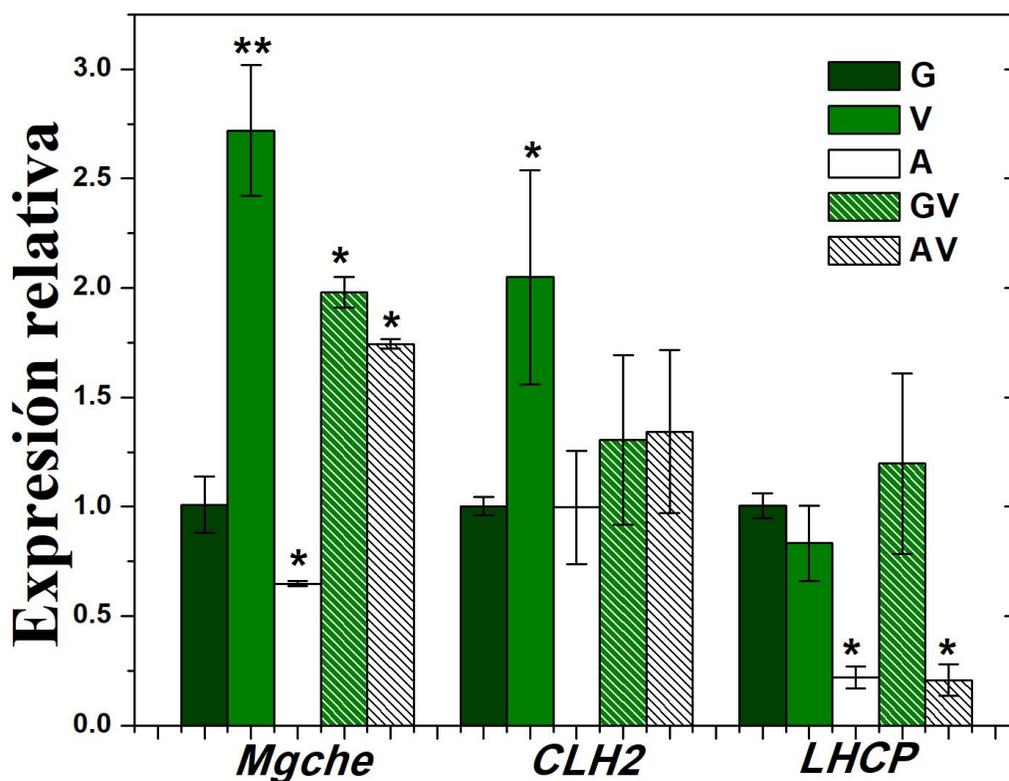


Figura 3.2 Expresión relativa de genes que codifican a enzimas y/o proteínas involucradas en biosíntesis/degradación de clorofilas y fotosíntesis. *Mgche*: MAGNESIO QUELATASA, *CLH2*: CLOROFILASA-2 y *LHCP*: PROTEÍNA DE UNIÓN A CLOROFILA A/B. G: tejido verde, V: variegado, A: albino, GV: verde-variegado y AV: albino-variegado. Las diferencias significativas entre el tejido G y los demás tejidos fue obtenida mediante la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes valores de significancia (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, respectivamente).

La RUBISCO es una enzima clave para la fotosíntesis en plantas, cataliza la reacción de fijación del CO_2 y también participa en la fotorrespiración (Spreitzer y Salvucci, 2002). La

caracterización bioquímica de plántulas albinas de *Erythrina crista-galli* L. indicó la ausencia de la subunidad menor (*rubS*) y mayor (*rubL*) de la RUBISCO (Guglielminetti *et al.*, 2012). En otros trabajos se ha encontrado que *rubL* no se expresa o se expresa en niveles muy bajos en los tejidos albinos, sugiriendo una disminución en la capacidad fotosintética de estos tejidos (Ankele *et al.*, 2005; Zubko y Day, 1998). Para conocer si dicho mecanismo es afectado en las plantas albinas de *A. angustifolia*, se determinaron los niveles de expresión de la *rubS* y mayor (*rubL*). Los niveles de transcritos de *rubS* presentaron una disminución en los tejidos albinos (A y AV) al comparárseles con los demás tejidos. Por el contrario, los niveles de expresión de *rubL* sólo presentaron diferencias significativas entre el tejido G y AV. La diferencia más significativa de la expresión de *rubS* y *rubL* se observó en el tejido GV, el cual fue de más del doble a los encontrados en los demás tejidos (**Figura 3.3**).

En las plantas superiores la FOSFOENOLPIRUVATO CARBOXILASA (PEPCasa) es una enzima clave en las fotosíntesis tipo C₄ y CAM. Esta enzima cataliza la β-carboxilación irreversible del fosfoenolpiruvato utilizando como sustrato al HCO₃⁻ y usa Me²⁺ como cofactor para producir oxalacetato (OAA) (O'Leary, 1982, Lepiniec *et al.*, 1994, Chollet *et al.*, 1996). Los resultados de la medida de su expresión muestran una drástica reducción en los tejidos V, A, GV y AV cuando se les compara con su expresión en el tejido G (**Figura 3.3**).

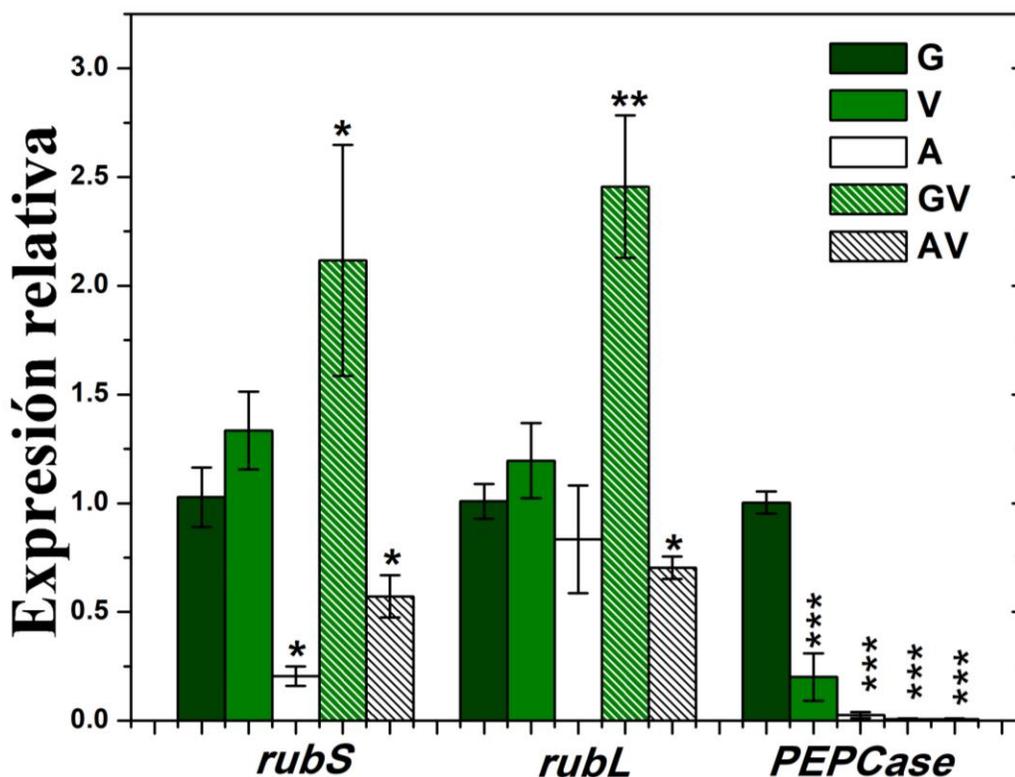


Figura 3.3 Expresión relativa de genes que codifican a las enzimas involucradas en la fotosíntesis. *rubS*: RIBULOSA-1,5-BIFOSFATO CARBOXILASA/OXIGENASA SUBUNIDAD MENOR, *rubL*: RIBULOSA-1,5-BIFOSFATO CARBOXILASA/OXIGENASA SUBUNIDAD MAYOR y *PEPCasa*: FOSFOENOL PIRUVATO CARBOXILASA. G: tejido verde, V: variegado, A: albino, GV: verde-variegado y AV: albino-variegado. Las diferencias significativas entre el tejido G y los demás tejidos fue obtenida mediante la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes valores de significancia (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, respectivamente).

3.4. DISCUSIÓN

Debido a la reducción en el contenido de carotenoides y de clorofilas en los tejidos albinos, es de suponer que la expresión de los genes que codifican a las enzimas involucradas en la biosíntesis de estos pigmentos se encuentre afectada. Se ha reportado que plantas deficientes en enzimas involucradas en la biosíntesis de los carotenoides pueden presentar albinismo (Fang *et al.*, 2008; Lange y Ghassemian, 2003; Okada *et al.*, 2000).

El primer paso de la biosíntesis de los carotenoides es mediada por la enzima PYS, la cual cataliza la síntesis de fitoeno (Bartley *et al.*, 1991). La PSY es considerada una de las enzimas más importantes de la ruta de los carotenoides, su expresión puede ser regulada por diferentes estímulos y generalmente un aumento en su expresión correlaciona con un incremento en la biosíntesis de carotenoides y de ABA (Li *et al.*, 2008a; Welsch *et al.*, 2008; Welsch *et al.*, 2000; Shewmaker *et al.*, 1999).

En tejidos A los niveles de expresión de *PSY* presentaron una reducción significativa, similares a los observados en la mutante albina *pds3* (Qin *et al.*, 2007). Se ha sugerido un mecanismo de retroalimentación negativa en la mutante *pds3*, debido a la acumulación de fitoeno, lo que produce una reducción en los niveles de expresión, no sólo del gen que codifica para la *PSY*, sino que también de los genes que codifican para la *ZDS* y la *LCY* (Qin *et al.*, 2007). Es posible que algo similar este sucediendo en los tejidos albinos (A y AV), debido a la acumulación de fitoeno (**Tabla 2.1**), los cuales no sólo presentaron bajos niveles de expresión de los genes que codifican para la *PSY*, *ZDS* y *LCY*, sino que también de la *PDS* (**Figura 3.1**).

La actividad de las enzimas *LCY ϵ* y *LCY β* representa un punto central en la modulación de los niveles de luteína y de todos los β -carotenoides (Yu *et al.*, 2008; Cuttriss *et al.*, 2007). En ausencia de la *LCY β* y la *LCY ϵ* se puede alterar el perfil de los carotenoides y la expresión de los genes que codifican a las enzimas implicadas en su biosíntesis (Bai *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2008). Los niveles de expresión del gen que codifica para la *LCY β* presentan un aumento en los tejidos albinos (A y AV) cuando se les compara con el nivel de expresión en los tejidos G (**Figura 3.1**). De manera contraria, las mutantes albinas de *Arabidopsis* presentaron una reducción en los niveles de transcritos del gen que codifica para la *LCY β* (Qin *et al.*, 2007). Adicionalmente, en arroz, la mutación del gen que codifica para la *LCY β* se asoció con la generación del albinismo (Fang *et al.*, 2008). Sin embargo, en plantas albinas de *Camellia sinensis*, sensibles a la luz, se observó que los niveles de expresión de los genes que codifican para la *LCY β* , la *VDE* y otros genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de los carotenoides presentaron un incremento (Li *et al.*, 2015). Se sugirió que el aumento de la expresión de estos genes tiene una función importante en la fotoprotección al aumentar los niveles de carotenoides como la luteína y la violaxantina (Li *et al.*, 2015).

A diferencia de lo observado en las plantas albinas de *Camellia sinensis*, los tejidos albinos (A y AV) de *A. angustifolia* presentaron una disminución en los niveles de luteína y de los precursores de violaxantina, el β -caroteno y la zeaxantina, sugiriendo que los tejidos albinos (A y AV) podrían encontrarse bajo un estrés foto-oxidativo. Además, se determinó una correlación negativa entre los niveles de expresión de *LCY β* y *VDE* y, la acumulación de carotenoides en los tejidos albinos (A y AV) de *A. angustifolia* (**Figura 3.1** y **Tabla 2.1**), por lo que es posible que la regulación de la actividad de *LCY β* y *VDE* se esté dando a nivel post-transcripcional (Fraser y Bramley, 2004; Rossel *et al.*, 2002; Gilmore, 2001). Ambas enzimas juegan un papel importante contra el daño foto-oxidativo causado por el exceso de luz (Telfer, 2005; Yamamoto *et al.*, 1962).

Por otro lado, la expresión de los genes *LCY ϵ* , *LCY β* y *VDE* en los tejidos V y GV presentó un incremento (**Figura 3.1**), sugiriendo nuevamente un posible mecanismo compensatorio y de fotoprotección de la región verde (GV) a la región albina (AV) (Foudree *et al.*, 2012; Rodermeil, 2002; Carol *et al.*, 1999). Esta idea es reforzada por el aumento de β -caroteno y luteína en la región GV (**Tabla 2.1**)

En los tejidos albinos (A, AV y V) los niveles de expresión del gen que codifica para la *SDG8* presentaron una reducción (**Figura 3.1**) y una correlación negativa con el contenido de luteína (**Tabla 2.1**), contrario a lo observado por Cazzonelli *et al.* (2009). Se sabe que la actividad de *SDG8* no sólo regula los niveles de luteína sino que también está involucrada en diversos procesos biológicos (Cazzonelli *et al.*, 2010; Cazzonelli *et al.*, 2009). Por el momento se desconoce cuál sería el papel biológico de la *SDG8* en los tejidos A y AV.

Además de la reducción en el contenido de carotenoides, los tejidos albinos presentaron una disminución en el contenido de clorofilas (**Tabla 2.1**), por lo que se determinaron los niveles de expresión de la *MAGNESIO QUELATASA* (*Mgche*), una enzima clave en la biosíntesis de las clorofilas (Rüdiger y Grimm, 2006). El tejido A presentó una reducción en los niveles de transcritos de la *Mgche* (**Figura 3.2**), lo que correlaciona con la ausencia de clorofilas observada en este tejido (**Tabla 2.1**). De manera similar, en cultivos albinos de maíz se ha observado una reducción en los niveles de transcritos del gen que codifica para la *Mgche*, correlacionando con una disminución en el contenido de clorofilas (Liu *et al.*, 2012a).

Por otro lado, el incremento en los niveles de transcritos del gen que codifica para la *Mgche* en el tejido V, podría sugerir un aumento en la síntesis de clorofila, sin embargo, también se observó un patrón similar en los niveles de transcritos del gen que codifica para la *CLH2* (**Figura 3.2**), una clorofilasa involucrada en los pasos iniciales de la degradación de la clorofila (Holden, 1961), lo que produce como resultado que no se vea un aumento en la cantidad de clorofila. En las plantas se ha relacionado el incremento en la actividad de la clorofilasa con la senescencia y la maduración de las frutas, debido a que en ambos procesos se produce la pérdida de clorofila (Matile *et al.*, 1996; Hendry *et al.*, 1987; Shimokawa *et al.*, 1978). Los resultados obtenidos y las evidencias podrían sugerir que procesos de síntesis y degradación de clorofila están ocurriendo al mismo tiempo en el tejido V.

Las proteínas LHCP son de las más abundantes en plantas y forman los complejos de absorción de luz (Jansson, 1994). Como éstos son fundamentales para el proceso fotosintético, se procedió a medir sus niveles de transcritos. Los niveles de expresión mostraron una drástica reducción en los tejidos albinos (A y AV) (**Figura 3.2**). Resultados similares se han observado en tejidos albinos de maíz y *Arabidopsis*, sugiriendo una afectación del aparato fotosintético en las plantas albinas (Qin *et al.*, 2007; Mayfield y Taylor, 1984).

El contenido de clorofilas y carotenoides se ha asociado con la expresión del gen que codifica para el complejo *LHCP* y se ha sugerido que en las plantas albinas los complejos LHCP se encuentran ausentes debido a la falta de pigmentos fotosintéticos necesarios para la captación de luz, cuando estas proteínas no son sintetizadas, la fotosíntesis disminuye o no ocurre (Mayfield y Taylor, 1984). Esta idea es reforzada por la disminución en la expresión de los genes que codifican para *RUBISCO* (**Figura 3.3**), lo que a su vez produce una baja capacidad fotosintética en los tejidos albinos (A y AV). En la región albina de la mutante *zebra* se ha determinado un patrón similar al observado en los niveles de expresión de la *RUBISCO* de *A. angustifolia* (Kusumi *et al.*, 2000).

Como se mencionó anteriormente, la enzima PEPCasa cataliza la reacción de fijación de CO₂ en las plantas con fotosíntesis C₄ y CAM (Chollet *et al.*, 1996; Lepiniec *et al.*, 1994; O'Leary, 1982). La mayoría, si es que no todas las especies de *Agave* presenta fotosíntesis tipo CAM (Nobel, 2003). En plantas con fotosíntesis C₄ y CAM los niveles de

transcritos del gen que codifica para la enzima *PEPCasa* son elevados mientras que en plantas C_3 los niveles de los mismos transcritos presentan una reducción o no se expresan (Hermans y Westhoff, 1990; Cushman *et al.*, 1989).

En el caso de *A. angustifolia*, se determinó que la mayoría de los tejidos, a excepción del tejido G, presentaban una reducción en los niveles de los transcritos que codifican para la *PEPCasa* (**Figura 3.3**). En *M. crystallinum*, una planta CAM facultativa ya que puede cambiar su fotosíntesis CAM a C_3 ante ciertos tipos de estrés, los niveles de expresión del gen que codifica para la *PEPCasa* disminuyen cuando utiliza la fotosíntesis C_3 , y aumentan nuevamente cuando regresa a la fotosíntesis CAM (Huang *et al.*, 2010; Cushman *et al.*, 1989; Bohnert *et al.*, 1988).

Los resultados mostrados en este capítulo sugieren que las plantas A y V de *A. angustifolia* presentan una fotosíntesis C_3 debido al estrés al que están sujetas en el cultivo *in vitro*. Algunas especies de *Agave*, como *A. deserti*, pueden presentar fotosíntesis C_3 debido a un aumento en su irrigación (Hartsock y Nobel, 1976). Sin embargo, Duarte-Aké *et al.* (2016), trabajando con la misma especie, determinaron que sólo las plantas albinas de *A. angustifolia* presentan fotosíntesis C_3 . Las plantas albinas no son capaces de acumular malato por la noche, una característica de las plantas CAM, pero las plantas verdes y variegadas sí. Además, las plantas variegadas acumularon más malato que las plantas verdes, sugiriendo un mecanismo CAM intacto de la región verde (GV) y un mecanismo fotosintético compensatorio de GV debido a la región albina (AV) (Duarte-Aké *et al.*, 2016). Esta idea es reforzada por el incremento de la expresión de los genes que codifican para las enzimas *Mgche* y *RUBISCO* en el tejido GV (**Figuras 3.2 y 3.3**).

CAPÍTULO IV**ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD GENÉTICA ENTRE LOS CULTIVOS CON FENOTIPO VERDE, VARIEGADO Y ALBINO DE *A. angustifolia* Haw.****4.1. INTRODUCCIÓN**

La variabilidad genética en las plantas tiene sus ventajas y desventajas. Por un lado, puede ser una problemática en el sistema productivo, ya que su presencia durante el cultivo *in vitro* puede introducir caracteres no deseados, o eliminar las características por las que se está propagando dicho cultivar (Robert *et al.*, 2006). Dentro de las ventajas de la variación somaclonal es la aparición en el cultivo *in vitro* de individuos con mejores capacidades para su adaptación a factores, tanto bióticos como abióticos (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009; Barraza-Morales *et al.*, 2006).

El largo ciclo de vida de los Agaves y su ineficiente mecanismo de reproducción sexual, ha llevado al uso de las técnicas de propagación *in vitro* para la propagación de individuos elite. Dado el carácter vegetativo de la micropropagación, el producto final es una clona. Sin embargo, también se puede utilizar la gran diversidad fenotípica y genética presente en las poblaciones naturales. Esta variabilidad es útil para la conservación y el uso del germoplasma y en algunos casos para su mejoramiento genético (Rodríguez-Garay *et al.*, 2009). Por ejemplo, los productores de la industria tequilera han tratado de mantener los cultivos de *Agave tequilana* Weber uniformes, mediante la propagación asexual de vástagos y bulbillos, sin embargo, se han detectado ciertos niveles de variabilidad genética no deseados, principalmente en el tamaño y el vigor de la descendencia (Robert *et al.*, 2006).

Estudios realizados en el campo usando características morfológicas y marcadores moleculares como AFLP (Polimorfismo en la Longitud de Fragmentos Amplificados, por sus siglas en inglés) han demostrado que existe una diversidad genética intra e inter especie en *A. tequilana*, *A. fourcroides* y *A. angustifolia* (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009; Gil-Vega *et al.*, 2006; Infante *et al.*, 2003; Colunga-Garciamarin y May-Pat, 1997). Un análisis de variabilidad genética, mediante AFLP, en poblaciones geográficamente cercanas de *A. angustifolia* mostró una clara agrupación entre los individuos de cada región. Sin embargo, el resultado también reveló que existe cierto grado de variabilidad genética intra poblacional abióticos (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009; Barraza-Morales *et al.*, 2006). La

variabilidad genética que se produce al interior de las poblaciones de las plantas, es una estrategia adaptativa importante de las especies de *Agave* a condiciones ambientales abióticas (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009; Barraza-Morales *et al.*, 2006). Se ha sugerido que la variabilidad genética observada en *A. Angustifolia* es consecuencia de la adaptación a los factores bióticos y abióticos de medio ambiente (Barraza-Morales *et al.*, 2006).

La variabilidad genética y fenotípica también se ha observado durante el cultivo *in vitro* de especies de *Agave*. Mediante un análisis de AFLP se ha observado cierta variabilidad genética entre la planta madre y sus descendientes en los cultivos *in vitro* de *A. fourcroydes* (Infante *et al.*, 2005; González *et al.*, 2003). A pesar de que la planta madre y sus descendientes se agruparon en el mismo conjunto, presentan un 19.9% de bandas polimórficas. (Infante *et al.*, 2005; González *et al.*, 2003). Por otro lado, en cultivos *in vitro* de *A. tequilana* se ha observado cierta variación fenotípica muy marcada en la progenie, como por ejemplo individuos que carecen de espinas, un crecimiento rápido de los bulbillos o una variegación en las hojas (Díaz-Martínez *et al.*, 2012). Sin embargo, el análisis de variabilidad genética por AFLP entre la planta madre y la progenie (hasta la cuarta generación), con características fenotípicas similares, mostró bajos niveles de variación genética y se ha sugerido que las variaciones fenotípicas observadas se deben a cambios epigenéticos (Díaz-Martínez *et al.*, 2012).

Las evidencias sugieren que la técnica de AFLP es una herramienta confiable para determinar la variabilidad genética inter e intra especies de *Agave*. Por ello, y con el fin de determinar si el origen del albinismo tiene una causa genética, se realizó el análisis mediante AFLP de los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*. Los resultados obtenidos se describen a continuación.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Material vegetal

Los cultivos de *Agave angustifolia* se mantuvieron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad de su fuerza iónica (MSB-5) suplementado con 2,4-D (0.11 μ M), 6-BAP (22.2 μ M) y gelificado con agar (0.2%) y gelrite (0.2%) (Robert *et al.*, 2006). Se partió de brotes de 0.5 cm de altura, los cuales fueron sub-cultivados cada 4 semanas hasta alcanzar una altura de 4-5 cm, utilizando el mismo medio de cultivo. Los cultivos se

mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 12 h luz y 12 h de oscuridad a 25 ± 2 °C. Los análisis de variabilidad genética fueron realizados utilizando las hojas de las plántulas con fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). Las hojas de las plántulas V fueron separadas manualmente con la ayuda de un bisturí en las secciones verde (GV) y albina (AV) para los análisis correspondientes. Como testigo de variabilidad entre especies se utilizaron cultivos de *A. tequilana* con las mismas características de cultivo y altura que las plantas de *A. angustifolia*. Las muestras fueron colectadas y almacenadas a -80 °C hasta realizar los análisis correspondientes.

4.2.2. Análisis de AFLP

El ADN genómico fue extraído de las hojas de las muestras G, V, A, GV y AV así como de las hojas de las plántulas de *A. tequilana* siguiendo el método de CTAB (bromuro de hexadeciltrimetilamonio, por sus siglas en inglés) (Murray y Thompson, 1980) con ligeras modificaciones. El análisis de los AFLP se realizó utilizando el protocolo descrito por Vos et al. (1995) con algunas modificaciones (Youssef et al., 2011). Doscientos cincuenta ng de ADN fueron digeridos con 0.2 µl de la enzima *Mse1* (Biolabs) y 2 µl de amortiguador de ligación/digestión de AFLP10X (Tris-base 100 mM, MgAc 100 mM, KAc 500 mM, DTT 50 mM, pH 7.5 con ácido acético y 100 ng/µl of BSA) hasta un volumen final de 20 µl. La reacción se dejó incubando por 3 h a 37 °C y la enzima se inactivó a 70 °C por 20 min. Posteriormente, a la misma reacción se le adicionaron 0.2 µl de la enzima *EcoR1* (Invitrogene) y 0.4 µl de NaCl 5 M y se incubó nuevamente por 3 h a 37 °C. Terminado el tiempo de incubación, la enzima se inactivó a 70 °C por 20 min. El producto de la digestión se ligó a adaptadores específicos de *Mse1* y *EcoR1*. La reacción de ligación consistió en 6 µl de amortiguador T4 5x ligase, 1 µl de cada mezcla de adaptadores (50 pmol/µl) y 1 µl de la enzima T4 ADN ligasa (1 U/µl) (Invitrogene). La reacción se dejó incubando a 20 °C por 12 h. La reacción de ligación fue diluida 1:10 con agua bidestilada estéril. Para realizar la reacción de pre-amplificación se tomaron 5 µl de la dilución 1:10 y se le adicionaron 2.5 µl del amortiguador de PCR (10x) Dream Taq, 2.5 µl de dNTPs (2 mM), 0.75 del oligo *EcoR1* (30 pmol/µl), 0.75 µl del oligo *Mse1* (30 pmol/µl) y 0.2 µl de Dream taq polimerasa (Thermo scientific) hasta un volumen final de reacción de 25 µl. El programa de PCR utilizado fue: desnaturalización inicial a 94 °C por 1 min, seguido de una temperatura de alineación a 60 °C por 30 s y una extensión final a 72 °C por 1 min, el programa se repitió por 20 ciclos. El producto de la pre-amplificación se diluyó 1:30 con

agua bidestilada estéril, se tomaron 5 µl y se mezclaron con 2 µl de amortiguador de PCR (10x) Dream taq, 2 µl de dNTPs (2 mM), 0.2 µl de oligo selectivo *EcoR1* (20 mM), 0.3 µl del oligo selectivo *Mse1* (20 mM) y 0.25 µl de Dream Taq polimerasa hasta un volumen final de reacción de 20 µl. Para la amplificación selectiva se utilizaron los oligos previamente reportados (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009). Se utilizaron seis combinaciones de oligos los cuales se describen en la **tabla 4.1**. El programa de amplificación selectiva se realizó bajo las siguientes condiciones: 11 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación a 65 °C por 30 s (reduciendo 0.7 °C por ciclo) y extensión a 72 °C por 1 min, y 25 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 30 s, alineación a 65 °C por 30 s y una extensión final a 72 °C por 1 min. Los fragmentos amplificados se separaron por electroforesis en geles desnaturalizante de poliacrilamida al 6% a 2000 V, 50 mA y 60 W por 2 h, seguido de una tinción por plata.

Tabla 4.1 Secuencia de los oligos específicos y las combinaciones utilizadas para el análisis de AFLP.

Combinación de oligos		EcoR1 (5´-3´)	Mse1 (5´-3´)
I	EcoRI/Mse1	GACTGCGTACC AATTC -AAC	GATGAGTCCTGAG TAA-CAC
II	EcoRI/Mse1	GACTGCGTACC AATTC-ACG	GATGAGTCCTGAG TAA-CTT
III	EcoRI/Mse1	GACTGCGTACC AATTC -ACA	GATGAGTCCTGAG TAA-CAT
IV	EcoRI/Mse1	GACTGCGTACC AATTC -ACA	GATGAGTCCTGAG TAA-CAC
V	EcoRI/Mse1	GACTGCGTACC AATTC -AAC	GATGAGTCCTGAG TAA-CAT
VI	EcoRI/Mse1	GACTGCGTACC AATTC-ACG	GATGAGTCCTGAG TAA-CAC

4.2.3. Análisis de los datos

Las bandas generadas de los AFLP fueron analizadas utilizando una matriz de presencia (1) y ausencia (0). El análisis filogenético se realizó utilizando el algoritmo UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic mean) y NTSYS (numerical taxonomy and multivariate analysis system) de la versión de software 2.20. El dendograma se generó con el programa FreeTree, utilizando 1000 repeticiones.

4.3. RESULTADOS

4.3.1. Análisis de la variabilidad genética

Previamente ya se mostraron algunas de las diferencias moleculares y bioquímicas observadas entre los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*. Ahora se muestran los resultados del análisis de los AFLP con la finalidad de evaluar la posible variabilidad genética entre los fenotipos G, V y A. Como referencia de variación interespecífica se utilizó *A. tequilana*.

En total, se obtuvieron entre 26 y 78 bandas por combinación de oligos y 54 bandas en promedio por combinación (**Tabla 4.2**). Entre todas las muestras analizadas, y con los seis juegos de oligos se obtuvieron un total de 327 bandas, de los cuales 285 fueron monomórficas (87.16%) y 42 fueron polimórficas (12.84%). La comparación entre *A. tequilana* y *A. angustifolia* mostró 42 bandas polimórficas (12.48%), lo que indica una variabilidad genética considerable entre ambas especies. Por otro lado, los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* mostraron menos variación, con sólo 12 bandas polimórficas (4.59%) y 312 bandas monomórficas (95.41%), lo que sugiere una elevada similitud genética entre los diferentes fenotipos. La amplificación selectiva, utilizando las seis combinaciones (**Tabla 4.1**) de oligos, generaron diferentes niveles de polimorfismo entre las plantas de *A. angustifolia*. La combinación que generó más bandas polimórficas fue la IV, con 5 de las 45 bandas generadas, por otro lado las combinaciones II y V no mostraron polimorfismo (**Tabla 4.2**).

Tabla 4.2 Niveles de polimorfismo observados por combinación de oligos entre los fenotipos de *A. angustifolia* Haw.

Combinación de oligos	# Total de bandas	% De polimorfismo
I	78	7.6
II	56	0
III	64	4.68
IV	45	11.11
V	57	0
VI	26	3.85

El análisis filogenético mediante un UPGMA mostró la formación de dos grupos principales. Basados en el coeficiente de similitud, el cual fue de 0.89, se observó una clara separación entre *A. tequilana* y de los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*. Todos los fenotipos de *A. angustifolia* formaron el grupo I, con las plantas albinas (A) separadas de los demás tejidos G, V, GV y AV, y los tejidos V, GV y AV formando un sólo subgrupo (**Figura 4.1**). La similitud genética encontrada entre los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* fue mayor a 0.97, indicando una alta similitud genética entre ellas (**Tabla 4.3**). La alta similitud genética determinada entre los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* sugiere que los fenotipos A y V de *A. angustifolia* se encuentran bajo una regulación epigenética más que genética.

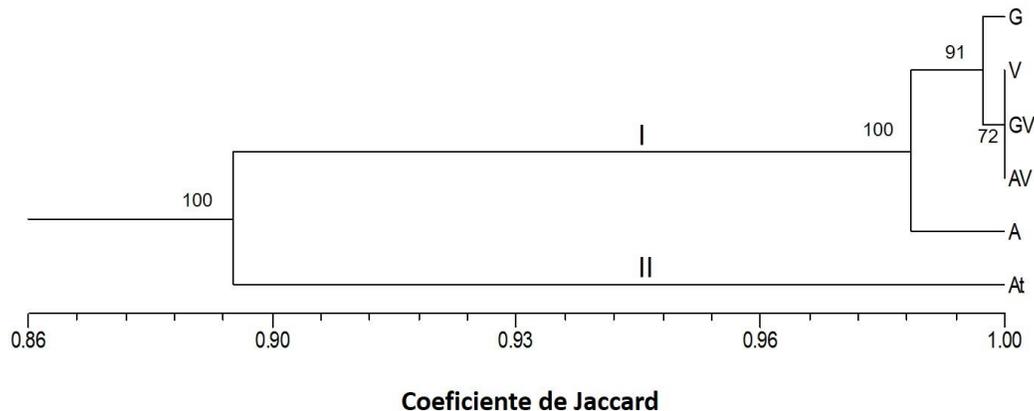


Figura 4.1 Dendrograma UPGMA que muestra la similitud genética entre los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* Haw. y *A. tequilana* Weber var. “Azul” mediante AFLP. G: tejido verde de *A. angustifolia*, V: tejido variegado de *A. angustifolia*, A: tejido albino de *A. angustifolia*, GV: tejido verde-variegado de *A. angustifolia*, AV: tejido albino-variegado de *A. angustifolia* y At: tejido de *A. tequilana* Weber var. “Azul”. Los números arábigos encontrados en cada clado indican el número de bootstrapping. La similitud genética se indica por el coeficiente de Jaccard.

Tabla 4.3 Similitud genética dentro de los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* Haw. y entre *A. tequilana* Weber var. "Azul".

<i>A. angustifolia</i> Haw.						<i>A. tequilana</i> Weber var. "Azul"
	G	V	A	GV	AV	
G	1					
V	0.997	1				
A	0.978	0.981	1			
GV	0.986	0.989	0.986	1		
AV	0.984	0.981	0.978	0.992	1	
<i>A. tequilana</i> Weber var. "Azul"	0.88	0.877	0.874	0.882	0.89	1

4.4. DISCUSIÓN

Varios trabajos sugieren que las poblaciones naturales de especies de *Agave* spp. presentan algún tipo de variabilidad genética durante la reproducción asexual (Torres-Morán *et al.*, 2010; Abraham-Juárez *et al.*, 2009; Gil-Vega *et al.*, 2006; Infante *et al.*, 2003; Martínez-Palacios *et al.*, 1999), lo cual se ha asociado con una respuesta adaptativa a las condiciones bióticas y abióticas del medio ambiente de cada especie (Sánchez-Teyer *et al.*, 2009).

El análisis de AFLP se ha utilizado de manera exitosa para determinar si existe o no variabilidad entre clonas de *Agave* (Díaz-Martínez *et al.*, 2012; González *et al.*, 2003). Por ejemplo, González *et al.*, (2003) determinaron que las plantas madres y sus hijuelos micropropagados se agrupan en un mismo conjunto, sugiriendo la conservación de la información genética. Los niveles de similitud genética determinados entre cada grupo fueron de 0.962-0.998, con cerca de un 20% de bandas polimórficas, los autores concluyen que existe una alta estabilidad genética durante el proceso de micropropagación (González *et al.*, 2003).

Los resultados del análisis de variabilidad genética mediante AFLP entre los tejidos G, V, A y las regiones verde (GV) y albina (AV) del tejido variegado de *A. angustifolia*, mostraron que los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* formaban un sólo grupo (**Figura 4.1**), con un valor de similitud genética por encima de 0.97 (**Tabla 4.3**), lo cual sugiere que

son muy similares a nivel genético. Valores similares a los determinados se han encontrado en *A. fourcroydes*, así como patrones de AFLP muy parecidos, los cuales fueron interpretado como una falta de variabilidad genética (González *et al.*, 2003). Los resultados muestran que se obtuvo como máximo un 11% de bandas polimórficas por combinación de oligos utilizados para el análisis de AFLP (**Tabla 4.2**), algunos autores consideran estos valores como normales durante la reproducción asexual de *Agave* (Díaz-Martínez *et al.*, 2012; González *et al.*, 2003). Por lo tanto, con los resultados encontrados del análisis de AFLP es posible concluir que los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* presentan una baja variabilidad genética y que son muy similares a nivel genético. Estos resultados sugieren que, en la aparición de los diferentes fenotipos en *Agave*, puede estar involucrado un mecanismo diferente al genético (González *et al.*, 2003). En el estudio realizado por Díaz-Martínez *et al.* (2012) se determinó que el cultivo *in vitro* de *A. tequilana* no genera variabilidad genética entre las plantas madre e hija, y de hecho, la variación fenotípica encontrada entre los somaclones (como la pérdida de las espinas laterales, el crecimiento rápido y el fenotipo variegado) está relacionado a cambios en la metilación del ADN (Díaz-Martínez *et al.*, 2012). Por ello, es posible que en la variación somaclonal observada en *A. angustifolia* estén involucrados mecanismos epigenéticos similares.

CAPÍTULO V

ANÁLISIS DE LA METILACIÓN GLOBAL EN EL ADN Y DE LA ACUMULACIÓN DE DIFERENTES MARCAS EN HISTONAS EN LOS CULTIVOS CON FENOTIPO VERDE, VARIEGADO Y ALBINO DE *A. angustifolia* Haw.

5.1. INTRODUCCIÓN

La elevada similitud genética encontrada entre los diferentes fenotipos de *A. angustifolia*, sugiere que el albinismo podría deberse a una regulación epigenética. Es por ello que en el presente capítulo se describen los resultados, en los tres fenotipos, de la metilación en el ADN y las modificaciones post-traduccionales en las histonas.

Existen algunos reportes que sugieren que hay una relación entre la metilación del ADN y las modificaciones en las histonas y la generación del albinismo en plantas. Por ejemplo, durante el cultivo *in vitro* de *Tricale* las variaciones, que incluyen un fenotipo albino, de las plantas regeneradas están relacionadas con una disminución en los niveles de metilación global en el ADN (Machczyńska *et al.*, 2014). De igual manera, la generación de brotes albinos y variegados de *A. angustifolia* coinciden con una disminución en los niveles de metilación global del ADN de la planta madre (Duarte-Aké *et al.*, 2016). En tanto que en cultivos de arroz, el albinismo está relacionado con un aumento en el movimiento de transposones de la familia *nDart* hacia genes del desarrollo de los cloroplastos (Hayashi-Tsugane *et al.*, 2014; Eun *et al.*, 2012). Posteriormente se determinó que el movimiento de los transposones de la familia *nDart* depende de los estados de metilación del ADN de la planta (Eun *et al.*, 2012).

Dependiendo del grado y de la posición de la metilación en las lisinas de las histonas, estas pueden activar o reprimir la expresión de genes (Liu *et al.*, 2010). En *Arabidopsis*, la tri-metilación de la H3K4 se le ha asociado con la activación transcripcional mientras que la di o tri-metilación de la H3K36 se le ha relacionado con la elongación transcripcional (Yang *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2008). Por el contrario, la marca H3K27me3 se le relaciona con la represión transcripcional (Liu *et al.*, 2010; Jacob *et al.*, 2009) al igual que la marca H3K9me2. La H3K9me2 se concentra en regiones de la heterocromatina y se ha asociado con la represión del movimiento de los elementos móviles (Jackson *et al.*, 2004). Por otro lado, la hiperacetilación de las histonas se ha asociado a la activación transcripcional de

genes, mientras que la hipocetilación se le asociado a la represión transcripcional de genes (Berger, 2007; Roth *et al.*, 2001).

En relación con *CRTISO*, una enzima de la ruta de la biosíntesis de los carotenoides, se sabe que es regulada por las marcas H3K4me2 y H3K4me3. La mutante *sdg8*, la cual codifica para una metiltransferasa de histona encargada de la metilación de H3K4, muestra una disminución en los niveles del ARNm de *CRTISO* que correlaciona con una disminución en el contenido de luteína (Cazzonelli *et al.*, 2009).

Con el fin de entender los cambios epigenéticos generados en los cultivos albinos de *A. angustifolia*, en el presente capítulo se describen los resultados obtenidos de la evaluación de dos de los principales mecanismos epigenéticos que existen, la metilación global en el ADN y los niveles de diferentes marcas en histonas relacionadas con la activación (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3) transcripcional de genes.

5.2. MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1. Material vegetal

Los cultivos de *Agave angustifolia* clona 26S se mantuvieron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad de su fuerza iónica (MSB-5) suplementado con 2,4-D (0.11 μ M), 6-BAP (22.2 μ M) y gelificado con agar (0.2%) y gelrite (0.2%) (Robert *et al.*, 2006). Se partieron de brotes de 0.5 cm de longitud, los cuales fueron sub-cultivados cada 4 semanas hasta alcanzar una altura de 4-5 cm utilizando el mismo medio de cultivo. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad a 25 ± 2 °C. La cuantificación de la metilación de ADN genómico y de las diferentes marcas en histonas se realizaron utilizando las hojas de las plántulas de 4-5 cm de altura con fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). Las hojas de las plántulas variegadas fueron también separadas manualmente con la ayuda de un bisturí en las secciones verde (GV) y albina (AV) para los análisis correspondientes. Las muestras fueron colectadas y almacenadas a -80 °C hasta realizar los análisis correspondientes.

5.2.2. Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó por el método de sílica (Echevarria-Machado *et al.*,

2005). Se partió de 0.5 g de tejido G, V, A, GV y AV (antes de macerar se le adicionaron de 0.3 a 0.5 g de PVPP), se maceró hasta pulverizar la muestra con ayuda de nitrógeno líquido y después se le adicionó 1 ml de amortiguador de extracción (Tris-HCl 100 mM pH 8, EDTA 50 mM y NaCl 500 mM) precalentado a 65 °C, posteriormente se le adicionaron 100 µl de β-mercaptoetanol y 100 µl de SDS al 20% mezclando vigorosamente. La muestra se incubó a baño María a 65 °C de 10-15 min mezclando cada 2 min. Terminado el tiempo de incubación se le adicionó 500 µl de acetato de potasio 5 M frío (almacenado a -20 °C) y después se incubó a -20 °C por 20 min. La muestra se centrifugó a 13,500 rpm por 20 min a 4 °C, el sobrenadante se colocó en un tubo nuevo, se le adicionaron 300 µl de sílica y se mezcló manualmente de 3-5 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se centrifugó a 8,000 rpm por 2 min a 4 °C, descartando el sobrenadante. La pastilla formada se lavó dos veces con 500 µl de etanol frío al 70% y se centrifugó a 8,000 rpm por 2 min a 4 °C. La pastilla se dejó secando y luego se resuspendió en 50 µl de agua a pH 7.3-7.5, posteriormente se incubó a 55 °C de 3-5 min y nuevamente se centrifugó a 12,000 rpm por 2 min a 4 °C. El sobrenadante se colectó en un tubo nuevo y el ADN se cuantificó por espectrofotometría a 260 nm.

5.2.3. Metilación global del ADN por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC)

Para determinar los niveles de metilación global se utilizó 1 µg de ADN genómico extraído de los tejidos G, V, A, GV y AV. El ADN se incubó a 100 °C por 3 min, después se colocó en hielo y se le adicionaron 6 µl de amortiguador de digestión (ácido acético 200 mM, glicina 200 mM, MgCl₂ 50 mM, ZnSO₄ 5 mM, CaCl₂ 2 mM, el pH se ajustó a 5.3 con NaOH), 1 µl de ADNasa (20 U/µl) y 1 µl de P1 nucleasa (20 U/µl) hasta un volumen final de 50 µl con agua grado HPLC. Se incubó a 37 °C toda la noche (12-14 h). Terminado el tiempo de digestión, se incubó a -80 °C por 15 min y después a 100 °C por 5 min, luego se le adicionaron 5 µl de NaOH 100 mM y 2 µl de CIAP, se mezcló suavemente y se incubó a 37 °C por 3.5 h. La muestra se preparó para la inyección en el equipo de HPLC adicionándole 50 µl de H₂O y 100 µl de amortiguador fosfato/acetato (50 mM fosfato de amonio dibásico, 15mM acetato de amonio, ajustado con ácido fosfórico a pH 4.1). La materia insoluble se removió centrifugando a 13,000 rpm por 10 min y el sobrenadante se colectó en un tubo nuevo, se filtró y almacenó a -20 °C hasta su uso. Para los análisis de HPLC se inyectaron 40 µl de muestra a una temperatura de 40 °C. La separación se realizó utilizando cuatro fases móviles: A: agua, B: acetonitrilo, C: metanol y D:

amortiguador de fosfato/acetato. El programa utilizado fue el siguiente: 0 a 4 min 72% A, 3% C y 25% D; 4 a 11 min 68% A, 7% C y 25% D; 11 a 15 min 30% A, 20% B, 25% C y 25% D; 15 a 15.8 min 30% A, 20% B, 25% C y 25% D; 15.8 a 16 min 75% A y 25% D, a una velocidad de flujo constante de 1 ml/min. La absorbancia fue medida utilizando un detector con arreglo de diodos a 286 nm.

Los porcentajes de metilación del ADN fueron obtenidos utilizando la siguiente formula: $\%5\text{mdC} = ([5\text{mdC}] / ([5\text{mdC}] + [\text{dC}])) * 100$, en donde [5mdC] es la concentración de la 5-metil-2'-desoxicitidina y [dC] es la concentración de la 2'-desoxicitidina. La concentración de la 5mdC y de la dC se determinó mediante el área de los picos, partiendo de una curva estándar de cada dexosinucleósido. Todos los reactivos utilizados fueron grado HPLC. Se utilizaron tres replicas biológicas para el análisis.

5.2.4. Aislamiento de histonas y western blot

La extracción de las proteínas nucleares se realizó usando el método descrito por Jackson et al., (2004) utilizando ácido sulfúrico para la extracción, seguido de una precipitación con acetona. Se maceraron tres gramos de tejido con un mortero utilizando nitrógeno líquido, se colectaron en tubos Falcon y posteriormente se adicionaron 10 ml de amortiguador NIB (PIPES 15 mM pH 6.8, MgCl_2 5 mM, KCl 60 mM, sacarosa 0.25 M, NaCl 15 mM, CaCl_2 1 mM, Triton-X100 0.8% (v/v) y PMPF 1 mM). Los tubos se agitaron y se dejaron en hielo por 30 min, agitando cada 5 min. La suspensión homogénea se filtró utilizando gasa estéril y se centrifugó a 10,000 x g por 20 min a 4 °C. El sobrenadante se desechó y las proteínas nucleares en la pastilla fueron extraídas dos veces utilizando 2 ml de H_2SO_4 0.4 M. Por último, las proteínas nucleares se dejaron precipitando toda la noche con 35 ml de acetona fría a -20 °C. El precipitado se recuperó por centrifugación a 12,000 x g por 20 min y la pastilla formada se resuspendió en 200 μl de urea 4 M. Las proteínas nucleares se cuantificaron por el método de Peterson (Peterson, 1977). Se elaboró una curva estándar obtenida con diferentes concentraciones de BSA (albúmina de suero bovino, por sus siglas en inglés) como proteína pura. Se mezclaron veinte μg de cada muestra con 10 μl de amortiguador Laemmli 5x (62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, glicerol 25% (p/v), SDS 2% (p/v), β -mercaptoetanol 5% y azul de bromofenol 0.01% (p/v)) y se cargaron en un gel de poliacrilamida al 15%. Las proteínas fueron separadas utilizando 100 V por 2 h.

Para la realización del Western blot la transferencia de las proteínas se realizó a una membrana de nitrocelulosa (0.45 μm) por electroforesis a 250 mA por 3.5 h a 4 °C. Posteriormente, la membrana se bloqueó por 1 h en una solución de PBST 1x con 5% de leche sin grasa y 0.5% de Tween. Después, la membrana se lavó dos veces por 10 min con el amortiguador PBST 1x y se dejó incubando a 4 °C con el anticuerpo primario en agitación constante (ver **tabla 5.1** para los tiempos de incubación de cada uno de los anticuerpos). La membrana se lavó tres veces con PBST 1x y una vez con amortiguador PBS 1x para después incubar por 1 h con el anticuerpo secundario a temperatura ambiente y en agitación constante. Posteriormente la membrana se lavó tres veces con PBST 1x y una vez con amortiguador PBS 1x. La detección de la señal se realizó utilizando el kit de quimioluminiscencia Immobilon Western Chemiluminescent HRP substrate (Millipore) siguiendo las especificaciones del proveedor. La señal de las bandas se normalizó con la intensidad de la banda obtenida con anti-H3. Los tiempos de incubación y la dilución utilizada para cada anticuerpo se especifican en la **tabla 5.1**.

Tabla 5.1 Especificaciones de los anticuerpos utilizados para los análisis de Western blot.

Anticuerpo primario	# Catálogo	Dilución	Tiempo de incubación	Tiempo de detección
Anti-histona H3	07-690, Millipore	1:20,000	12-15 h	15-30 s
Anti-dimetil histona H3 (K4)	07-030, Millipore	1:10,000	12-15 h	1-5 min
Anti-dimetil histona H3 (K36)	07-274, Millipore	1:10,000	12-15 h	1-5 min
Anti-dimetil histona H3 (K9)	07-441, Millipore	1:1,000	24 h	15-30 min
Anti-trimetil histona H3 (K27)	07-449, Millipore	1:1,000	24 h	15-30 min
Anti-acetil histona H3 (K4)	07-352, Millipore	1:1,000	12-15 h	1-5 min
Anticuerpo secundario				
Goat Anti-Rabbit IgG, HRP conjugate	12-348, Millipore	1:20,000	1 h	

5.2.5. Análisis de los datos

Los análisis densitométricos de la acumulación de las marcas en las histonas en las membranas se realizaron con el programa ImageJ, utilizando la señal de la histona H3 como normalizador y testigo de carga. Los valores obtenidos de la acumulación de las

marcas en las histonas, así como de la cuantificación de la metilación global del ADN de todos los tejidos se sometieron a la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes valores de significancia ($*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$). Se emplearon tres replicas biológicas.

5.3. RESULTADOS

5.3.1. Metilación global del ADN

Los niveles de la 5-metil-2'-desoxicitidina del ADN genómico de los tejidos G, V, A, GV y AV presentaron un valor promedio del 33%, sin embargo, no se observaron diferencias significativas entre ellas (**Figura 5.1**).

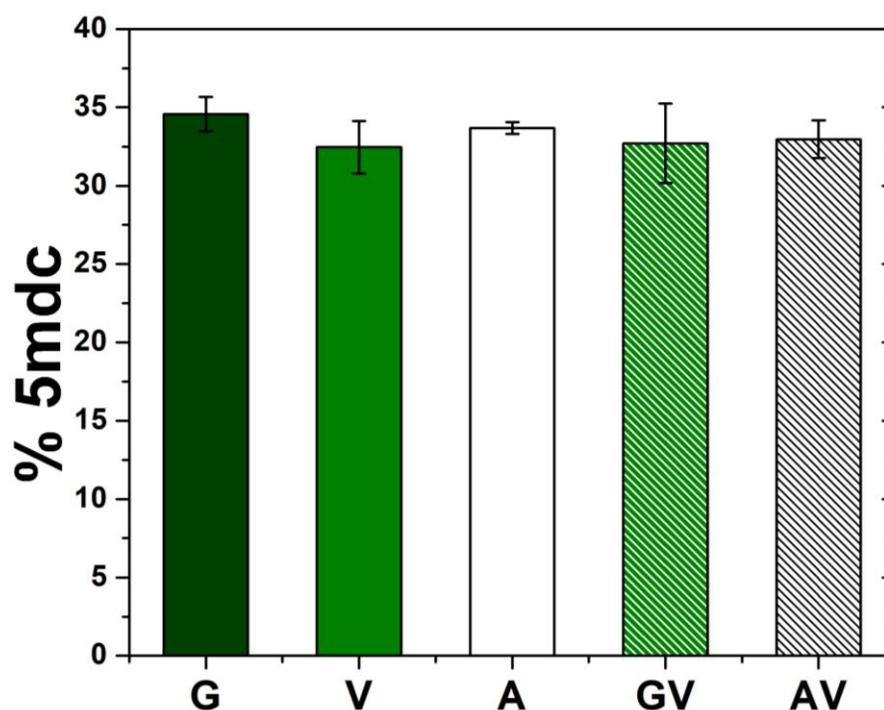


Figura 5.1 Porcentaje de la 5-metil-2'-desoxicitidina del ADN genómico de tejidos con diferente fenotipo de *A. angustifolia* Haw. G: tejido verde, V: variegado, A: albino, GV: verde-variegado y AV: albino-variegado. Las diferencias significativas entre el tejido G contra los demás tejidos fue obtenida mediante la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes niveles de significancia ($*P \leq 0.05$, $**P \leq 0.01$, $***P \leq 0.001$, respectivamente).

5.3.2 Acumulación de diferentes marcas en histonas involucradas en la activación y represión transcripcional de genes

Los tejidos de *A. angustifolia* presentaron cambios en la acumulación de las diferentes marcas en las histonas involucradas en la activación (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3) transcripcional de genes (**Figure 5.2**). El análisis densitométrico de los Western blots indicó que la cantidad de la marca H3K4me2 en el tejido A presentó un aumento de casi el doble mientras que el tejido AV presentó un nivel ligeramente superior con respecto al tejido G. Los tejidos V y GV no presentaron diferencia significativa respecto a la misma marca en el tejido G. Por otro lado, la acumulación de la marca H3K36me2 presentó un ligero incremento en el tejido A, y una disminución en el tejido V, en comparación con la misma marca en el tejido G. No se encontraron diferencias significativas entre los tejidos G, GV y AV. La mayor diferencia se observó en la marca H3K9ac. La cantidad de H3K9ac en los tejidos A y AV fue de 4.5 a 1.5 veces mayor respectivamente a los niveles determinados en los tejidos G, V y GV. Los tejidos G y GV presentaron una acumulación similar de esta marca (**Figure 5.3**).

El análisis de las marcas en las histonas implicadas en la represión transcripcional mostró que la marca H3K9me2 presentó un ligero incremento en el tejido A al compararse con con la misma marca en el tejido G, mientras que los demás tejidos no presentaron diferencias significativas al compararse con la misma marca en el tejido G. Por otro lado, la acumulación de la marca H3K27me3 presentó un aumento en los tejidos A y GV respecto a la misma marca en el tejido G. Los tejidos G, V y AV no presentaron diferencia significativa entre ellas para la marca H3K27me3 (**Figure 5.3**).

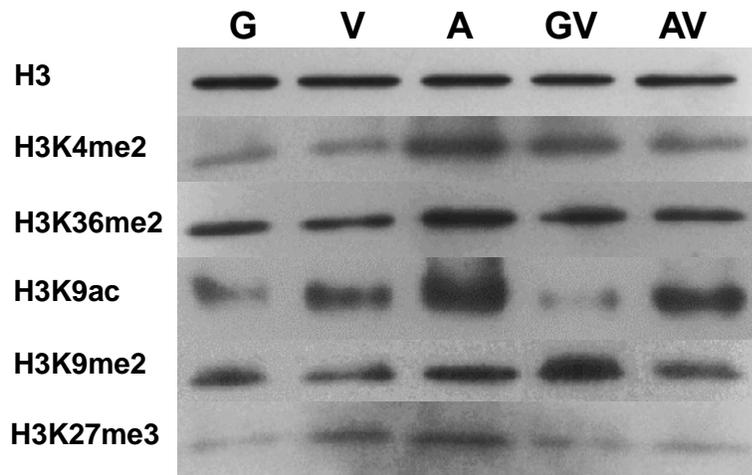


Figura 5.2 Inmunodetección de diferentes marcas en las histonas involucradas en la activación (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3) transcripcional de genes en tejidos de *A. angustifolia* Haw. La histona H3 fue utilizada como testigo de carga. G: tejido verde, V: variegado, A: albino, GV: verde-variegado y AV: albino-variegado.

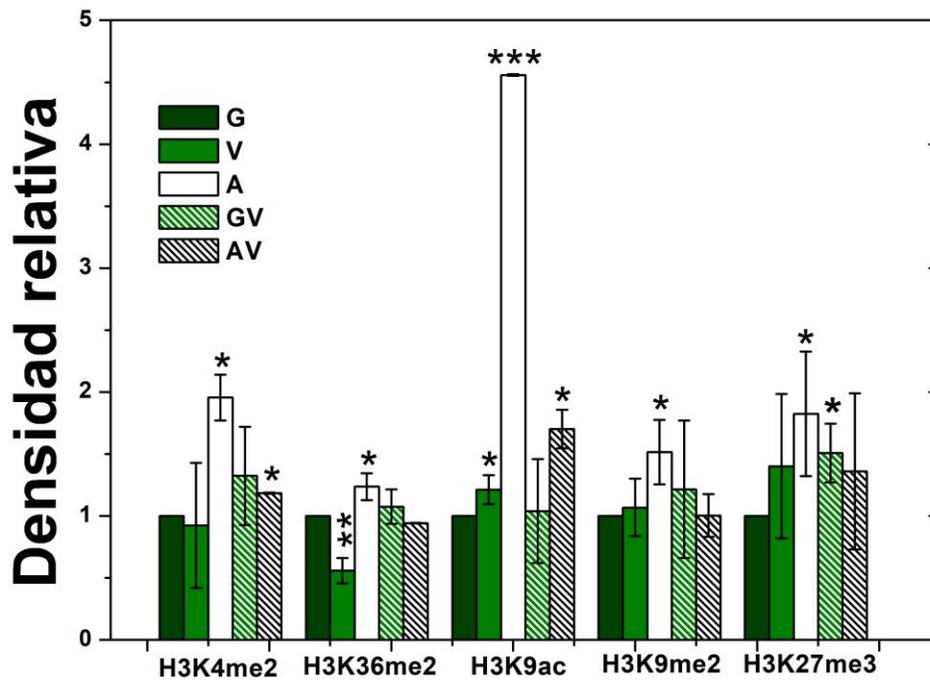


Figura 5.3 Análisis densitométrico de las marcas en las histonas involucradas en la activación (H3K4me2, H3K36me2 y H3K9ac) y represión (H3K9me2 y H3K27me3) transcripcional de genes en tejidos de *A. angustifolia* Haw. La señal de la histona H3 en tejido G fue utilizada como normalizador. G: tejido verde, V:

variegado, A: albino, GV: verde-variegado y AV: albino-variegado. Las diferencias significativas entre el tejido G y los demás tejidos fue obtenida mediante la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes niveles de significancia (*P ≤ 0.05, **P ≤ 0.01, ***P ≤ 0.001, respectivamente).

5.4. DISCUSIÓN

La falta de variabilidad genética encontrada entre los diferentes fenotipos de *A. angustifolia* sugiere que serían los mecanismos epigenéticos los involucrados en la aparición del albinismo. Durante el cultivo *in vitro* de especies como *Elaeis guineensis* y *Zea mays* se han observado cambios en los niveles de metilación en el ADN, usualmente una baja en la metilación se relaciona con algún grado de variación somaclonal (Jaligot *et al.*, 2000; Kaepler y Phillips, 1993). En los cultivos de *Triticale*, la disminución de los niveles de metilación global del ADN generó variaciones fenotípicas que incluían un fenotipo albino en las plantas regeneradas (Machczyńska *et al.*, 2014). Sin embargo, los niveles de la 5-metil-2'-desoxicitidina en los diferentes tejidos de *A. angustifolia* presentaron un valor promedio de 33%, sin mostrar diferencias significativas entre ellas (**Figura 5.1**). Valores similares de metilación global en el ADN se han reportado en cultivos verdes de *A. angustifolia* utilizando el mismo sistema de cultivo *in vitro* (De-La-Peña *et al.*, 2012). Aparentemente, la metilación global en el ADN no se encuentra involucrada en el albinismo de *A. angustifolia*, si bien no se puede descartar que este mecanismo participe de manera específica en la regulación de algunos genes y sea por esa razón que a nivel global no se perciba. Por ejemplo, en *A. tequila* el fenotipo variegado generado durante la propagación asexual de bulbillos y durante el cultivo *in vitro* se ha relacionado con cambios en los patrones de metilación en el ADN (Díaz-Martínez *et al.*, 2012). Los cambios en los perfiles de metilación fueron determinados mediante un análisis de MSAP (Methylation-Sensitive Amplification Polymorphism) y basándose en los cambios en los patrones de metilación del ADN asociado a la secuencia CCGG (Díaz-Martínez *et al.*, 2012). Adicionalmente, se ha reportado que la metilación específica en el ADN de genes involucrados en la biogénesis de los plástidos puede generar la aparición de los fenotipos variegado y albino (Wang *et al.*, 2016; Cocciolone y Cone, 1993).

Aunque no se observaron diferencias en los niveles de metilación global del ADN, las

diferencias epigenéticas se observaron en las marcas de histonas relacionadas a la activación y represión transcripcional de genes (**Figura 5.2 y 5.3**). En el caso de la metilación de las histonas se sabe que dependiendo del grado, y la posición del residuo metilado, éstas pueden dar lugar a la activación o represión transcripcional de genes (Liu *et al.*, 2010). Por otro lado, la hiperacetilación de las histonas se ha asociado a la activación transcripcional de genes, mientras que la hipoacetilación a la represión transcripcional de genes (Berger, 2007; Roth *et al.*, 2001).

La acumulación de las marcas de activación transcripcional H3K4me2, H3K36me2, H3K9ac y represión transcripcional H3K27me3 y H3K9me2 se determinaron de manera predominante en los tejidos A y AV, mientras que en el tejido V se determinó una reducción de la acumulación de la marca H3K36me2 y un incremento de la marca de expresión H3K9ac (**Figura 5.2**). Estos datos sugieren que cambios en los estados de activación y represión transcripcional de la cromatina ocurren de manera dinámica y simultáneamente en los tejidos albinos (A, AV y V). La diferencia más significativa se observó en los niveles de la marca H3K9ac, la cual fue de 1.5 y 4.5 veces mayor en los tejidos AV y A, respectivamente (**Figura 5.3**). Algunas evidencias sugieren que los cambios en la acetilación de la H3K9 juegan un papel importante en la regulación de la biosíntesis de clorofila y la fotosíntesis (Heimann *et al.*, 2013; Charron *et al.*, 2009; Offermann *et al.*, 2008; Offermann *et al.*, 2006). En plántulas de-etioladas (plantas enverdecidas a partir de plantas etioladas) de *Arabidopsis*, los genes transcripcionalmente activos que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis son regulados por la H3K9ac (Charron *et al.*, 2009). También se ha reportado que la marca H3K9ac regula la expresión de los genes que codifican para la enzima PEPCasa y para la subunidad pequeña de la RUBISCO de manera dependiente de luz (Heimann *et al.*, 2013; Offermann *et al.*, 2008; Offermann *et al.*, 2006). Adicionalmente, la abundancia de la H3K9ac encontrada en los tejidos albinos (A y AV) podría sugerir una disminución en la actividad de las deacetilasas de histonas (HDACs) (Berger, 2007; Roth *et al.*, 2001). Existen algunas evidencias que sugieren un papel regulatorio de las HDACs en la biosíntesis de clorofilas y fotosíntesis. Por ejemplo, en arroz, la HDA6 y la HDA10 se localizaron en el cloroplasto, sugiriendo su participación en la fotosíntesis (Chung *et al.*, 2009). Un estudio reciente realizado en *Arabidopsis* sugiere que la HDA14 se localiza en los cloroplastos y tiene un papel regulatorio en la fotosíntesis (Hartl *et al.*, 2017). La mayoría de las

proteínas blanco de la HDA14 se localizan en cloroplastos y tienen una función en la fotosíntesis. La mutante *hda14* presentó un incremento del 90% en la actividad enzimática de la RUBISCO, sugiriendo que la actividad de la RUBISCO es controlada por los estados de acetilación (Hartl *et al.*, 2017). Por otra parte, en plantas etioladas de *Arabidopsis*, la mayoría de los genes que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis y la biosíntesis de clorofila están reprimidos debido a la interacción física de HDA15 con el factor de transcripción PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 (PIF3) en respuesta a la luz (Liu *et al.*, 2013).

De igual manera, es probable que la hiperacetilación determinada en las plantas albinas (A y AV) esté causando cambios conformacionales en la cromatina que alteran la dinámica normal de la eucromatina para un desarrollo correcto de los cloroplastos. En arroz, la mutación del gen *OsCHR4*, el cual codifica a la proteína Mi-2, un componente central del complejo de histonas deacetilasas y remodelamiento del nucleosoma (NuRD), genera defectos en el desarrollo temprano de los cloroplastos y albinismo en células del mesófilo (Zhao *et al.*, 2012). La parte adaxial del mesófilo de dicha mutante no sólo presenta una disminución en los niveles de transcritos de genes relacionados con el desarrollo de los cloroplastos, sino que también en los transcritos de genes que codifican para proteínas involucradas en la fotosíntesis (Zhao *et al.*, 2012).

Se ha sugerido que la acetilación es dinámica durante la mitosis (Li *et al.*, 2005). La hiperacetilación disminuye la estabilidad de las fuerzas intranucleosomales (Oliva *et al.*, 1990) e interfiere con la condensación de la cromatina (Cimini *et al.*, 2003). En protoplastos de tabaco, la acetilación de la histona H4 y H3K9/14 se reduce de forma importante y específica durante la mitosis (Li *et al.*, 2005). Durante la mitosis la hiperacetilación puede interferir con la correcta transmisión genética y la separación de las cromátidas hermanas (Cimini *et al.*, 2003). Por ello, es posible que el albinismo observado en *A. angustifolia* haya sido causado por la transición incorrecta de la información genética entre la planta madre e hija debido a la hiperacetilación de las histonas. En diferentes especies de trigo (*Triticum aestivum*, *T. dicoccum* y *T. durum*) y *Cyrtanthus* (*C. parviflorus* y *C. Mackenii* var. *Cooperi*) se ha reportado que el fenotipo albino puede generarse debido a la aparición de aneuploidía (Tsunewaki, 2004; Buyser *et al.*, 1992; Agache *et al.*, 1989; Ising, 1967).

Un dinamismo apropiado entre la acetilación y la deacetilación en las histonas es necesaria para la regulación de una gran cantidad de procesos biológicos (Chen y Tian, 2007). Si bien todavía se desconoce el papel de la hiperacetilación en el albinismo de *A. angustifolia*, parece ser que la formación de la eucromatina podría estar promoviendo la expresión de algunos genes que podrían perturbar el desarrollo normal de los cloroplastos y la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de pigmentos fotosintéticos.

CAPÍTULO VI

NIVELES DE EXPRESIÓN DE GENES QUE CODIFICAN A DEACETILASAS DE HISTONAS (HDACS) Y METILTRANSFERASAS DE ADN EN LOS CULTIVOS CON FENOTIPO VERDE, VARIEGADO Y ALBINO DE *A. angustifolia* Haw.

6.1. INTRODUCCIÓN

La acetilación en las histonas es un proceso reversible controlado por dos grandes familias de enzimas, las acetiltransferasas de histonas (HATs) y las deacetilasas de histonas (HDACs) (Fuchs *et al.*, 2006). La acetilación está relacionada con la activación transcripcional de genes, neutraliza los grupos ϵ amino de las lisinas de las colas de las histonas permitiendo una cromatina relajada, mientras que la deacetilación se relaciona con la represión transcripcional de genes al remover los grupos acetilo y generar una cromatina compacta (Shahbazian y Grunstein, 2007; Yang y Seto, 2007). En las plantas, se requiere de un balance adecuado entre las actividades de estas enzimas para que se puedan llevar a cabo los diversos procesos biológicos (Chen y Tian, 2007). Es posible que la hiperacetilación encontrada en los tejidos A de *A. angustifolia* se deba a una disminución en la actividad de las HDACs más que a un aumento en la actividad de las HATs. Estudios realizados utilizando diferentes inhibidores de las HDACs (TSA, butirato de sodio, nicotinamida, dialil disulfuro y la toxina HC) en especies vegetales como *A. thaliana*, *P. sativum* y *O. sativa* produjeron un aumento sustancial en los niveles de acetilación de las histonas H3 y H4, lo que ocasionó que en dichas especies la transcripción de ciertos genes se incrementara (Li *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; Bond *et al.*, 2009; Earley *et al.*, 2007; Tsuji *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005; Chua *et al.*, 2004; Murphy *et al.*, 2000). De igual manera, se ha observado un incremento de la acetilación de la H3K9 en plantas de *Arabidopsis* (Venturelli *et al.*, 2015) y tabaco (Kurita *et al.*, 2017) cuando son tratadas con TSA. Un efecto similar se produce cuando se silencian o mutan los genes que codifican para las HDACs, ya que se produce un aumento en los niveles de acetilación y por consiguiente un incremento en la expresión de genes que normalmente se encuentran reprimidos (Zhang *et al.*, 2013; Earley *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2005; Lawrence *et al.*, 2004).

Por otro lado, algunas HDACs se han localizado en cloroplasto (Hartl *et al.*, 2017; Alinsug *et al.*, 2012; Chung *et al.*, 2009) y su función se ha relacionado de manera directa con la regulación de genes que codifican enzimas para la biosíntesis de clorofilas y la

fotosíntesis, como es el caso de la *HDA14* y *HDA15* (Hartl *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2013).

Un estudio reciente sugiere que la *HDA14* se localiza en los cloroplastos y tiene un papel regulatorio en la fotosíntesis (Hartl *et al.*, 2017). Los estados de acetilación de varias proteínas localizadas en el plástidos, incluyendo las subunidades alfa y beta de la ATPasa, así como de proteínas que forman parte de los fotosistemas I (PSI) y II (PSII) son afectados en la mutante *hda14*. También se ha observado un incremento del 90% en la actividad enzimática de la RUBISCO en la mutante *hda14* (Hartl *et al.*, 2017). Por otro lado, en plantas etioladas de *Arabidopsis*, la mayoría de los genes que producen proteínas involucradas en la fotosíntesis y en la biosíntesis de clorofila están reprimidos debido a la interacción física de la *HDA15* con el factor de transcripción en respuesta a luz, PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 (PIF3) (Liu *et al.*, 2013).

En arroz, la mutación de *OsCHR4*, un gen que codifica a la proteína Mi-2, un componente central del complejo de deacetilasas de histonas y remodelamiento del nucleosoma (NuRD), genera defectos en el desarrollo temprano de los cloroplastos y albinismo en células del mesófilo (Zhao *et al.*, 2012). La parte adaxial del mesófilo de la mutante *Oschr4* no sólo presenta una disminución en los niveles de transcritos de genes relacionados con el desarrollo de los cloroplastos, sino también en aquellos genes que codifican para proteínas relacionadas con la fotosíntesis (Zhao *et al.*, 2012). Todas estas evidencias sugieren que es posible que la hiperacetilación encontrada en los tejidos A de *A. angustifolia* se deba a una disminución en la actividad de las HDACs más que a un aumento en la actividad de las HATs.

Basándose en el grado de similitud de secuencias y su dependencia a cofactores, en todos los eucariotas las HDACs se han agrupado en tres familias: RPD3/HDA1 (REDUCED POTASSIUM DEPENDENCE 3/HISTONE DEACETILASE 1), SIR2 (SILENT INFORMATION REGULATION 2) y HD2 (HISTONE DEACETYLASE 2) (Pandey *et al.*, 2002). En las plantas se han identificado aproximadamente 18 HDACs (Alinsug *et al.*, 2009; Hollender y Liu, 2008), de las cuales 12 pertenecen a la familia RPD3/HDA1, una de las familias de HDACs más estudiadas. Basándose en la similitud de secuencias la superfamilia RPD3/HDA1 se ha dividido en tres clases: la clase I está conformada por la *HDA19*, *HDA6*, *HDA7* y *HDA9*; la clase II está conformada por la *HDA5*, *HDA15* y *HDA18*, mientras que la clase III está conformada por la *HDA2* y sus dos isoformas. Las

deacetilasas HDA8, HDA14, HDA10 y HDA17 son miembros no clasificados de la superfamilia RDP3-like. En tanto que las deacetilasas HDA10 y HDA17 presentan similitud con la deacetilasa HDA9 (Liu *et al.*, 2014; Alinsug *et al.*, 2009; Hollender y Liu, 2008; Pandey *et al.*, 2002).

Algunas investigaciones sugieren que existe una relación entre la deacetilación de las histonas y la metilación en el ADN. En *Neurospora crassa* y en células animales, la deacetilación de las histonas y la metilación en el ADN actúan de manera sinérgica en la represión transcripcional de genes (Belinsky *et al.*, 2003; Shaker *et al.*, 2003; Selker, 1998). En las plantas, se ha sugerido que la deacetilación de las histonas y la metilación en el ADN interactúan de manera compleja para establecer los estados de represión genética (Chang y Pikaard, 2005). En *Arabidopsis*, la HDA6 es un componente central de la metilación dirigida por ARN (RdDM) (Aufsatz *et al.*, 2007; Aufsatz *et al.*, 2002) y se le requiere para el silenciamiento del ARNr (ARN ribosomal) (Earley *et al.*, 2006) y de los transposones (Lippman *et al.*, 2003). Liu *et al.*, (2012b) determinaron que para modular el silenciamiento de los transposones, la HDA6 interactúa directamente con MET1 (Liu *et al.*, 2012b).

La metilación del ADN en las plantas ocurre en tres islas o contextos: CG, CHG y CHH (donde H puede ser A, C o T) (Chan *et al.*, 2005; Cao y Jacobsen, 2002a; Gruenbaum *et al.*, 1981). En *Arabidopsis*, cerca de una tercera parte de los genes son metilados en las islas CG (24%), mientras que la metilación en las islas CHG (6.7%) y CHH (1.7%) se encuentran en menor cantidad (Cokus *et al.*, 2008). Si bien todos los sitios de metilación se encuentran en las regiones pericentroméricas, el cuerpo de los genes se encuentra exclusivamente enriquecido en las islas CG (Cokus *et al.*, 2008).

La metilación del ADN es catalizada por enzimas conocidas como metiltransferasas de ADN, las cuales transfieren el grupo metilo de la S-adenosil-L-metionina al carbono 5' de la citosina (Finnegan y Kovac, 2000). Basándose en el arreglo de dominio, en las plantas las metiltransferasas de ADN se han clasificado en cuatro principales familias: las METs (METILTRANSFERASAS DE ADN), las CMTs (CROMOMETILASAS), las DRMs (METILTRANSFERASAS CON DOMINIO REAREGLADO) y la Dnmt2 (METILTRANSFERASA DE ADN HOMÓLOGA 2) (cuya función no ha sido aún elucidada) (Pavlopoulou y Kossida, 2007). La metilación catalizada por estas enzimas puede ser *de*

novo o de mantenimiento (Law y Jacobsen, 2010; Chen y Li, 2004; Finnegan y Kovac, 2000). En las plantas, la metilación *de novo* es catalizada por la DRM1/DRM2 (Cao y Jacobsen, 2002b), mientras que MET1 y CMT3 catalizan las metilaciones de mantenimiento de las islas CG y CHG, respectivamente (Law y Jacobsen, 2010; Pavlopoulou y Kossida, 2007; Lindroth *et al.*, 2001). Por otro lado, la metilación de la isla CHH puede ser catalizada por la DRM2 o la CMT3 (Law y Jacobsen, 2010; Chan *et al.*, 2005).

A pesar de no encontrar diferencias significativas en los niveles de metilación global del ADN (**Figura 5.1**), aún no se puede descartar el papel de la metilación del ADN en la regulación puntual de la expresión de ciertos genes y su relación con el albinismo en las plantas (Wang *et al.*, 2016; Cocciolone y Cone, 1993).

En el presente capítulo se describen los resultados obtenidos de los análisis de expresión de las diferentes HDACs (*HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) y metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *DRM3* y *CMT3*). Con esta parte del estudio se persiguieron dos objetivos. El primero, determinar si la hiperacetilación descubierta en los tejidos albinos de *A. angustifolia* está relacionada con la disminución en los niveles de expresión de las HDACs, y el segundo es recopilar información sobre los posibles cambios en la expresión de los genes involucrados en la metilación del ADN. A pesar de que no se observaron cambios en la metilación global del ADN, entre las plantas G y A, es posible que los cambios si se observen a nivel molecular en la expresión de los genes que codifican a las enzimas encargadas de su regulación y con esto proponer una hipótesis más completa de lo que está sucediendo en el albinismo de *A. angustifolia*.

6.2. MATERIALES Y MÉTODOS

6.2.1. Material vegetal

Los cultivos de *A. angustifolia* clona 26S se mantuvieron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962) a la mitad de su fuerza iónica (MSB-5) suplementado con 2,4-D (0.11 μ M), 6-BAP (22.2 μ M) y gelificado con agar (0.2%) y gelrite (0.2%) (Robert *et al.*, 2006). Se partieron de brotes de 0.5 cm de longitud, los cuales fueron sub-cultivados cada 4 semanas utilizando el mismo medio de cultivo hasta alcanzar una altura de 4-5 cm. Los cultivos se mantuvieron en condiciones de fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad a 25 \pm

2 °C. Los análisis de expresión se realizaron utilizando las hojas de las plántulas de 4-5 cm de altura con fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). Las hojas de las plántulas variegadas fueron separadas manualmente con la ayuda de un bisturí en las secciones verde (GV) y albina (AV) para los análisis correspondientes. Las muestras fueron colectadas y almacenadas a -80 °C hasta realizar los análisis correspondientes.

6.2.2. Diseño de oligos

Se diseñaron oligos específicos para los genes que codifican a deacetilasas de histonas y metiltransferasas de ADN. Los oligos fueron diseñados con base en las secuencias reportadas en el transcriptoma de *Agave* (Gross *et al.*, 2013) y anotadas en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) (Tabla 6.1). Los alineamientos se realizaron utilizando el programa ClustalW2-Multiple Sequence (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>). Los oligos fueron diseñados utilizando los programas Oligo explore 1.1.2 y Oligo Analyzer 1.0.3. Las secuencias de los oligos generados para los análisis de expresión se describen en la tabla 6.2.

Tabla 6.1 Secuencias utilizadas para el diseño de los oligos de genes que codifican a deacetilasas de histonas (*HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) y metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *CMT3* y *DRM3*).

Gen	Número de accesoión	Especie	Base de datos
<i>HDA5</i>	GAHU01056447.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
<i>HDA6</i>	GAHU01014926.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
<i>HDA8</i>	GAHU01094164.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
<i>HDA9</i>	GAHU01065890.1	<i>A. Americana</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
<i>HDA14</i>	GAHU01063148.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank /Genebank
<i>HDA15</i>	GAHU01044027.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
<i>HDA18</i>	SRA:SRR1371238.222407.2	<i>A. americana</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
<i>HDA19</i> o <i>HD1</i>	GAHU01054368.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank

<i>MET1</i>	GAHU01055147.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
<i>MET1B</i>	GAHU01068656.1	<i>A. tequilana</i> y 4. <i>deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
<i>CMT3</i>	GAHU01032011.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank
<i>DRM3</i>	GAHU01033319.1	<i>A. tequilana</i> y <i>A. deserti</i>	Transcriptoma de <i>Agave</i> /Genebank

T
a
b
l
a

6.2 Secuencia de los oligos diseñados para los análisis de expresión de genes que codifican a deacetilasas de histonas (*HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) y metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *CMT3* y *DRM3*).

Gen	Secuencia (5' 3') →	Tamaño teórico	Tm (° C)
<i>HDA5</i>	HDA5F: TGGAAAGGTGGAAGGTATG HDA5R: GGGGATGTAGAAAAGCAAC	155	59
<i>HDA6</i>	HDA6F: GCTGTTGGTGTCTATGAG HDA6R: GGAGGTTCTGTATTTGGTG	244	58
<i>HDA8</i>	HDA8F: TGGCACACTGGAAGAAAGG HDA8R: GAAGCAAGAAGGCAAGCATC	158	62
<i>HDA9</i>	HDA9F: CACTCCCAACACACAACATC HDA9R: GCTCCAGAATTCCTAAGACC	250	60
<i>HDA14</i>	HDA14F: GGGGTTTTGTGTTTTTGGC HDA14R: GCAGGTTTCAGTGTTGTTCC	239	62
<i>HDA15</i>	HDA15F: AAGGGGGGAGGTTCTATC HDA15R: CAGCAGGGGTTACATCAC	243	59
<i>HDA18</i>	HDA18F: GCTGAGGCTTACAATCCA HDA18R: TCCAAAGCCATCACAATC	158	59
<i>HDA19 o HD1</i>	HDA1F: CGAGGTGGGCAACTACTAC HDA1R: AGTGGAAAGCGGCAGAGAT	155	59
<i>MET1</i>	MET1F: GCGTGACCTTCCTTATGA MET1R: CCAACCTTCCAACAATCCC	124	62
<i>MET1B</i>	MET1BF: TGCCTTCTTCACTATCCC MET1BR: CCATCCTCCTTTCCTTCAC	195	57
<i>CMT3</i>	CMT3F: GAGCGAGCTTTTACTTCTTG CMT3R: TCTGTTTCTGGGTGATTGTG	162	59
<i>DRM3</i>	DRM3F: TCCCAAGCCACCTATGAC DRM3R: GCCAACCCAGACCAGATTC	230	62

6.2.3. Medición de los niveles de expresión por PCR en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN total se extrajo de los tejidos G, V, A, GV y AV usando el método de TRI Reagent y siguiendo las especificaciones del proveedor (Sigma). La integridad del ARN se verificó en un gel de agarosa al 1.5%. Para la síntesis del ADNc se utilizó el kit ReverseAid First Strand cDNA Synthesis (Thermo Scientific) partiendo de 1 µg de ARN total hasta un volumen final de reacción de 20 µl. Para las reacciones de PCR punto final se utilizaron 1000 ng/µl del ADNc, 2.5 µl de amortiguador Dream taq 10x, 0.5 µl de cada oligo (10 µM), 0.25 de dNTP (10 mM) y 0.2 µl de la polimerasa Dream taq, hasta un volumen final de reacción de 25 µl. Para las reacciones de RT-qPCR se utilizaron 0.125 µl de cada oligo (5 µM), 6.25 µl de PCR SYBR Master Mix (Applied biosystems) y una concentración de 30 ng/µl de ADNc en un volumen final de reacción de 12.5 µl. El programa de amplificación utilizado fue: desnaturalización inicial de 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 40 s, una T_m específica de cada juego de oligos (**Tabla 6.2**) por 40 s y 72 °C por 1 min. Como gen normalizador se utilizó *UBIQUITINA (UBI11)* (Delgado-Sandoval *et al.*, 2012) siguiendo el programa de amplificación: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, seguido de 40 ciclos a 95 °C por 40 s, 62 °C por 40 s y 72 °C por 2 min. Las reacciones de RT-qPCR se realizaron utilizando el equipo StepOne Software v2.2.2 -Real Time PCR system (Applied Biosystems).

6.2.4. Purificación de fragmentos de ADN

Se cortaron y pesaron los fragmentos deseados del gel de agarosa y se colocaron en tubos Eppendorf de 2 ml. Por cada 100 mg de peso se adicionaron 300 µl del amortiguador ADB del kit Zymoclean Gel Recovery Kit. Posteriormente se incubó a 55 °C por 10 min o hasta fundir completamente la agarosa. Se adicionó la solución de agarosa en la columna Zymo-Spin y la columna se colocó dentro de los tubos de colecta de 2 ml. Se centrifugó a 13,000 x g por 30 s y se vació el tubo de colecta. Después, a la columna se le adicionaron 200 µl del amortiguador de lavado y se centrifugó a 10,000 x g por 30 s, a continuación se vació el tubo de colecta. Este paso se repitió dos veces. Por último, la columna Zymo-Spin se colocó en un tubo nuevo de 1.5 ml y el ADN se eluyó adicionando de 6 a 10 µl de amortiguador de elución o agua bidestilada estéril a la columna y centrifugando a 10,000 x g por 45 s. El ADN purificado fue enviado a secuenciar (Clemson University Genomic Institute). Los resultados de los fragmentos secuenciados fueron

analizados mediante alineamientos (Blastn y Blastx) con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) para confirmar su identidad.

6.2.5. Análisis de los datos

Los resultados obtenidos se analizaron usando el método de $2^{-\Delta\Delta C_t}$ (Livak y Schmittgen, 2001). Se emplearon dos replicas biológicas para la cuantificación de la expresión relativa. Los valores obtenidos del tejido G y los demás tejidos se sometieron a la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes valores de significancia (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$).

6.3. RESULTADOS

6.3.1. Secuenciación de los fragmentos amplificados

Para el diseño de los oligos de los genes que codifican a las deacetilasas de histonas y metiltransferasas de ADN se tomó como criterio que las secuencias estuvieran reportadas en el transcriptoma de *Agave* (Gross *et al.*, 2013). En el transcriptoma de *Agave* hay por lo menos ocho HDACs: *HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19* (también conocida como *HD1*), y también se determinó al menos un miembro para las tres de las principales familias de metiltransferasas de ADN: *MET1*, *MET1B*, *CMT3* y *DRM3*.

Una vez establecidas las condiciones de amplificación de los oligos diseñados, los fragmentos amplificados se enviaron a secuenciar con la finalidad de confirmar su identidad. Los resultados de la secuenciación se analizaron mediante alineamientos con la base de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Los resultados y los porcentajes de similitud obtenidos para cada fragmento (**Tabla 6.3**) confirmaron la identidad de las HDACs: *HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) y metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *CMT3* y *DRM3*).

Tabla 6.3 Resultados del análisis bioinformático de los fragmentos enviados a secuenciar correspondientes a las deacetilasas de histonas (*HDA5*, *HDA6*, *HDA8*, *HDA9*, *HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*) y metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *DRM3* y *CMT3*). En la tabla se indica la proteína ortóloga, el porcentaje de similitud con dicha proteína, el valor de E y el número de accesoión en la base datos de dicha la proteína.

Gen	Proteína ortóloga	Valor de E	Similitud (%)	# De accesoión
HDA5	HDA5- <i>Beta vulgaris</i> subsp. <i>Vulgaris</i>	1e-10	74	XP_010695207.1
HDA6	HDA6 isoforma X1- <i>Nelumbo nucifera</i>	4e-33	78	XP_010248619.1
HDA8	HDA8- <i>Vigna angularis</i>	9e-50	81	XP_017425298.1
HDA9	HDA9- <i>Theobroma cacao</i>	6e-40	97	EOY33531.1
HDA14	HDA14- <i>Phoenix dactylifera</i>	0.39	59	XP_008808492.1
HDA15	HDA15-like isoforma X1- <i>Asparagus officinalis</i>	0.0	81	XP_020255975.1
HDA18	HDA18- <i>Arabidopsis thaliana</i>	4e-14	81	NM_125500.3
HDA19 o HD1	HDA19- <i>Musa acuminata</i> subsp. <i>Malaccensis</i>	6e-11	79	XP_009399782.1
MET1	<i>METILTRANSFERASA DE ADN-Arabis alpina</i>	3.4	87	KFK31662.1
MET1B	MET1B-like isoforma X1- <i>Asparagus officinalis</i>	7e-13	63	XP_020272920.1
CMT3	CMT3-like- <i>Asparagus officinalis</i>	0.0	65	XP_020246348.1
DRM3	DRM3 isoforma X2- <i>Asparagus officinalis</i>	3e-32	65	XP_020273571.1

6.3.2. Análisis de expresión de genes que codifican a deacetilasas de histonas (HDACs)

Los elevados niveles de acetilación encontrados en los tejidos A, sugieren una posible disminución en la actividad de las HDACs, por ello se analizaron los niveles de expresión de las diferentes HDACs identificadas en los tejidos de *A. angustifolia* (**Figuras 6.1 y 6.2**). Con la finalidad de que los resultados puedan interpretarse adecuadamente, los resultados del análisis de expresión de las HDACs se dividieron en dos gráficas (**Figuras 6.1 y 6.2**). El análisis estadístico mostró que los niveles de expresión de la *HDA5* sólo presentaron una disminución en el tejido GV, los demás tejidos no presentaron diferencias

significativas respecto al tejido G. Tampoco se observaron diferencias significativas en los niveles de expresión de la *HDA6* y *HDA8* en todos los tejidos analizados. Por otro lado, los niveles de expresión de la *HDA9* fueron superiores en GV y AV respecto al tejido G, el cuál no presentó una diferencia significativa con A y V (**Figura 6.1**). Un patrón similar se observó en los niveles de expresión de la *HDA14*, los tejidos GV y AV presentaron un incremento respecto al tejido G (**Figura 6.2**). La disminución más significativa en los niveles de expresión fue para el gen que codifica a la *HDA15* en todos los tejidos (V, A, GV y AV), en comparación con el tejido G. También se observó una disminución en los niveles de expresión para el gen que codifica para la *HDA18*, sin embargo, esta disminución sólo se observó en los tejidos V y GV respecto al tejido G, mientras que para la *HDA19* esta disminución sólo se encontró en el tejido GV respecto al tejido G (**Figura 6.2**).

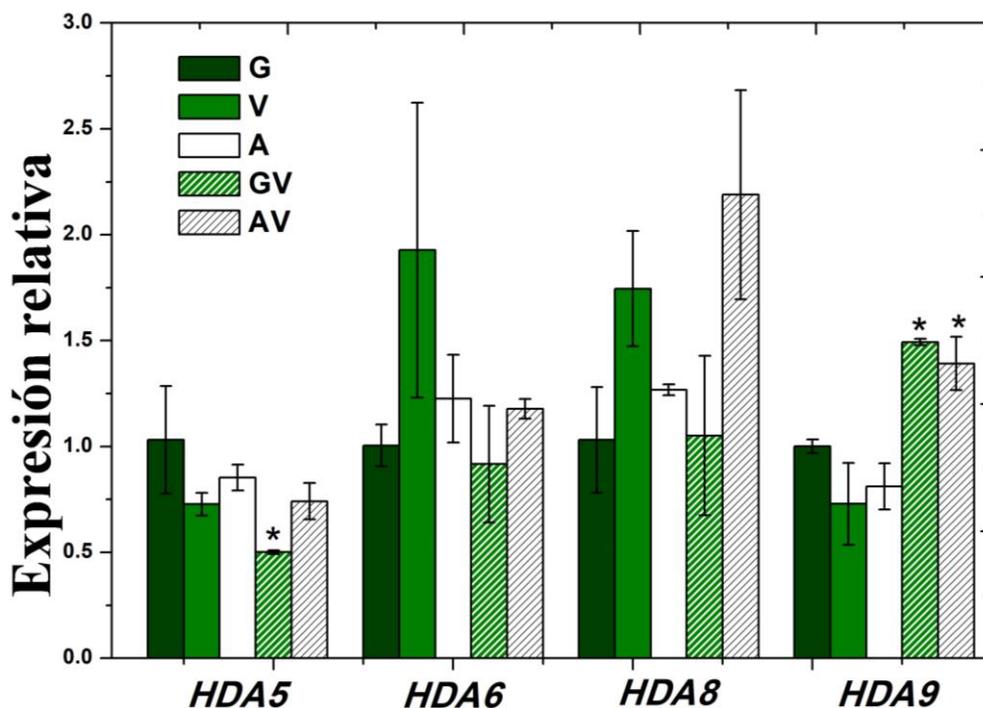


Figura 6.1 Expresión relativa de los genes que codifican a las deacetilasas de histonas (*HDA5*, *HDA6*, *HDA8* y *HDA9*). *HDA5*: DEACETILASA DE HISTONA 5, *HDA6*: DEACETILASA DE HISTONA 6, *HDA8*: DEACETILASA DE HISTONA 8 y *HDA9*: DEACETILASA DE HISTONA 9. G: tejido verde, V: variegado, A: albino, GV: verde-variegado y AV: albino-variegado. Las diferencias significativas entre el tejido G y los demás tejidos fue obtenida mediante la

prueba estadística de Tukey utilizando diferentes valores de significancia (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, respectivamente).

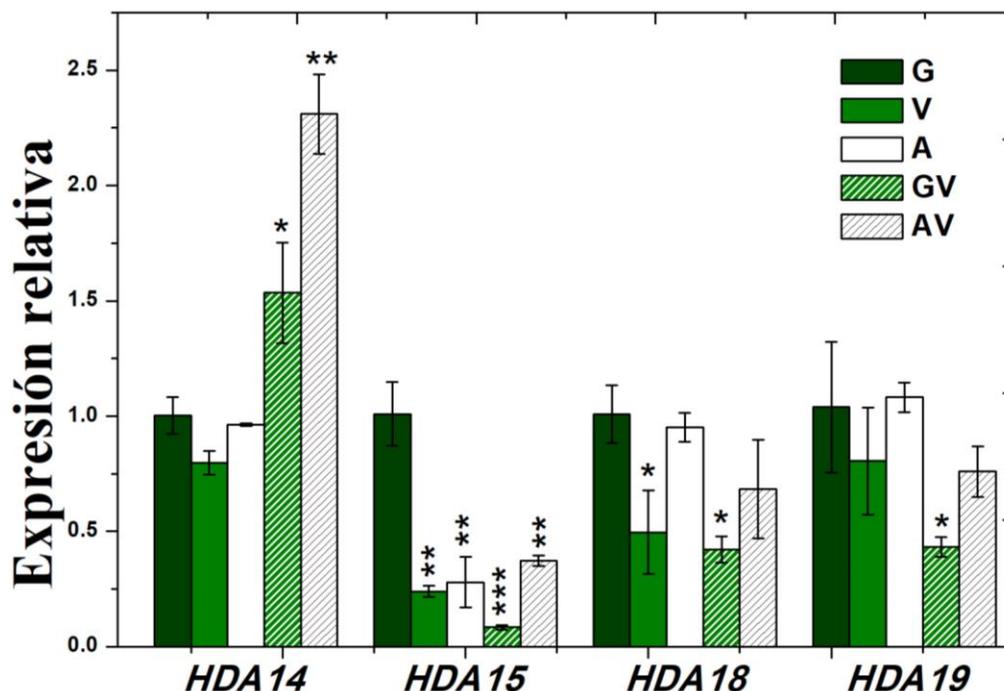


Figura 6.2 Expresión relativa de los genes que codifican a las deacetilasas de histonas (*HDA14*, *HDA15*, *HDA18* y *HDA19*). *HDA14*: DEACETILASA DE HISTONA 14, *HDA15*: DEACETILASA DE HISTONA 15, *HDA18*: DEACETILASA DE HISTONA 18 y *HDA19*: DEACETILASA DE HISTONA 19. G: tejido verde, V: variegado, A: albino, GV: verde-variegado y AV: albino-variegado. Las diferencias significativas entre el tejido G y los demás tejidos fue obtenida mediante la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes valores de significancia (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, respectivamente).

6.3.3. Análisis de expresión de genes que codifican a metiltransferasas de ADN

A pesar de no encontrar diferencias significativas en los niveles de metilación global del ADN (**Figura 5.1**) aún no se puede descartar completamente el papel de la metilación del ADN en la regulación de la expresión de ciertos genes y su relación con el albinismo (Wang *et al.*, 2016; Cocciolone y Cone, 1993). Por otro lado, dado que la cuantificación de la metilación fue a nivel global se desconoce si existen diferencias en las diferentes islas CpG (CG, CHG, CHH). En *Arabidopsis*, a pesar de la disminución de manera global de la

metilación del ADN, Hsieh et al., (2009) determinaron un aumento en la metilación de las islas CHH en el endospermo y en los tejidos embrionarios, respecto a los brotes adultos (Hsieh *et al.*, 2009). En un estudio realizado en arroz, los niveles de metilación global del ADN, en diferentes tejidos durante desarrollo, no se relacionan con la actividad de las metiltransferasas de ADN (homóloga a *OsMET1*) (Teerawanichpan *et al.*, 2009). Estos trabajos sugieren que los estados de metilación global del ADN no siempre se encuentran intrínsecamente relacionados con la acumulación de las diferentes islas de metilación y la actividad de las metiltransferasas de ADN.

Un acercamiento a esta idea consistió en analizar los niveles de expresión de las metiltransferasas de ADN implicadas en las metilaciones *de novo* y de mantenimiento. Se realizó el análisis de expresión de las tres metiltransferasas de mantenimiento del ADN, *MET1* y *MET1B*, encargadas de la metilación de las islas GC así como de *CMT3* encargada de la metilación de las islas CHG (Law y Jacobsen, 2010). En el análisis también se incluyó a la *DRM3*, una metiltransferasa *de novo* encargada de la metilación de las islas CHH (Law y Jacobsen, 2010). (**Figura 6.3**). Los resultados muestran que *MET1* solamente presentó un incremento significativo en su expresión en el tejido A respecto al tejido G, mientras que la expresión del gen que codifica para la *MET1B* presentó un aumento de más del doble en los tejidos AV y una disminución en los tejidos GV, al compararse con el tejido G. El cambio más importante se observó en la expresión del gen que codifica para la enzima *CMT3*, ya que se determinó un incremento de entre 15 y 25 veces más en AV y A, respectivamente, comparado con el tejido G. También se observaron diferencias en la expresión del gen que codifica para la enzima *DRM3*, los tejidos V, A, GV y AV presentaron una disminución significativa respecto al tejido G (**Figura 6.3**).

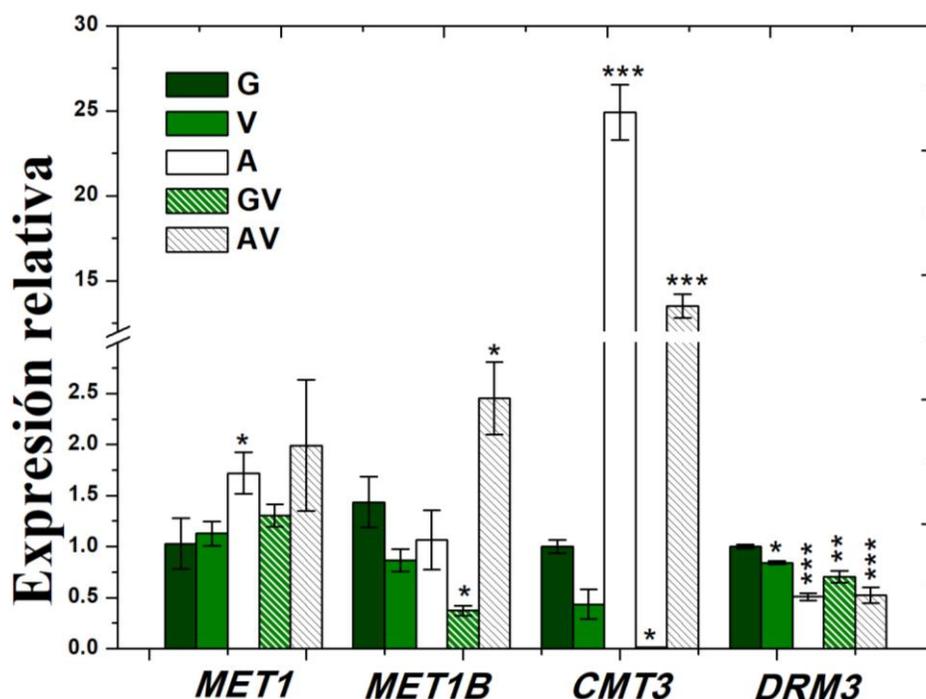


Figura 6.3 Expresión relativa de los genes que codifican a metiltransferasas de ADN (*MET1*, *MET1B*, *CMT3* y *DRM3*). *MET1*: METILTRANSFERASA DEL ADN 1, *MET1B*: METILTRANSFERASA DEL ADN 1B, *CMT3*: CROMOMETILASA 3 y *DRM3*: METILTRANSFERASA DEL ADN CON DOMINIO REARREGLADO 3. G: tejido verde, V: variegado, A: albino, GV: verde-variegado y AV: albino-variegado. Las diferencias significativas entre el tejido G y los demás tejidos se obtuvo mediante la prueba estadística de Tukey utilizando diferentes niveles de significancia (* $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, respectivamente).

6.4. DISCUSIÓN

Los análisis de expresión de los genes que codifican para las diferentes *HDACs* en los tejidos de *Arabidopsis* dan muestra de su importancia en la regulación del crecimiento y el desarrollo de las plantas (Alinsug *et al.*, 2009; Hollender y Liu, 2008). En *Arabidopsis*, la expresión del gen que codifica para la enzima *HDA5* presentó una disminución en cotiledones y en hojas caulinares (Alinsug *et al.*, 2009). Los análisis bioinformáticos sugieren que la *HDA5* se localiza tanto en el núcleo como el citoplasma, debido a que contiene una señal de localización nuclear, sugiriendo una posible función en el transporte nucleocitoplasmático (Alinsug *et al.*, 2009). Recientemente se ha sugerido un papel de la

HDA5 en la regulación de procesos biológicos como la remodelación de la cromatina, el metabolismo, la degradación de proteínas, el transporte y transducción de señales, entre otros (Luo *et al.*, 2015). En *A. angustifolia* sólo se logró cuantificar una disminución significativa en el tejido GV (**Figura 6.1**), sugiriendo una desregulación de la *HDA5* en éste tejido. Sin embargo, aún se desconoce el proceso biológico que la *HDA5* pueda estar regulando en el tejido GV.

En este estudio no se detectaron diferencias significativas en la expresión del gen que codifica para la *HDA6* y la *HDA8* en todos los tejidos de *A. angustifolia* (**Figura 6.1**). En arroz la *HDA6* se localiza en el cloroplasto; además, los genes que codifican para la *HDA6* se expresan de manera diferencial en las hojas, sugiriendo que es de gran importancia en la fotosíntesis (Chung *et al.*, 2009). Por otro lado, en *Arabidopsis*, la *HDA8* se localiza en el citoplasma y en áreas periféricas del núcleo y se ha sugerido que participa en el transporte nuclear y en la deacetilación de proteínas citoplasmáticas (Alinsug *et al.*, 2012). De igual manera, en *Arabidopsis*, se ha reportado un pico de expresión del gen que codifica para la *HDA8* en las hojas caulinares (Alinsug *et al.*, 2009). Sin embargo, los resultados determinados en *A. angustifolia* (**Figura 6.1**), sugieren que la *HDA6* y la *HDA8* parecen no jugar un papel importante en el albinismo de *A. angustifolia*.

En *A. angustifolia* solamente los tejidos GV y AV presentaron un aumento significativo en la expresión del gen que codifica para la *HDA9* (**Figura 6.1**). Un patrón de expresión similar se observó para la expresión del gen que codifica para la *HDA14* (**Figura 6.2**). Estudios realizados en *Arabidopsis* sugieren que la *HDA9* se localiza en el núcleo y su función está relacionada con el control de la floración temprana (Kang *et al.*, 2015). Además, la expresión de la *HDA9* se ha determinado de manera mayoritaria en los cotiledones (Alinsug *et al.*, 2009). Por otro lado, un estudio reciente sugiere que la *HDA14* se localiza en los cloroplastos y tiene un papel regulatorio en la fotosíntesis (Hartl *et al.*, 2017). La *HDA14* también se ha localizado en las mitocondrias, sugiriendo una posible función de la *HDA14* en la homeóstasis energética celular (Hartl *et al.*, 2017; Alinsug *et al.*, 2012). En *Arabidopsis*, el gen que codifica para la *HDA14* muestra un incremento en su expresión en las hojas (Hollender y Liu, 2008). Sin embargo, debido a que la expresión de los genes que codifican para la *HDA9* y la *HDA14* no presentaron una diferencia significativa en el tejido V respecto al tejido G, pero sí los tejidos GV y AV (**Figura 6.1 y**

6.2), es posible que la expresión de los genes que codifican para la *HDA9* y la *HDA14*, en los tejidos de *A. angustifolia*, hayan sido inducidas por el daño mecánico ocasionado durante la separación de dichas regiones.

La *HDA15* es la única deacetilasa de histona que se ha relacionado directamente con la regulación de la fotosíntesis y la biosíntesis de las clorofilas (Liu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2013; Hollender y Liu, 2008). Un análisis bioinformático y funcional sugiere que la *HDA15* se localiza en el núcleo (Liu *et al.*, 2013; Alinsug *et al.*, 2012; Alinsug *et al.*, 2009) y que está involucrada en el transporte nucleocitoplasmático de manera dependiente de luz (Alinsug *et al.*, 2012). En plantas etioladas de *Arabidopsis* la *HDA15* regula de manera negativa genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de las clorofilas y proteínas que participan en la fotosíntesis mediante la interacción específica con PIF3 (PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR 3) (Liu *et al.*, 2013). La mutante *hda15-1* muestra una acumulación de protoclorofilida, sugiriendo que la *HDA15* regula negativamente la biosíntesis de clorofila en las plantas etioladas (Liu *et al.*, 2013). De igual manera, los niveles de expresión de varios genes que codifican a las subunidades D y H de la *Mgche*, subunidades del fotosistema I y subunidades de los complejos de adsorción de luz de los fotosistemas I y II muestran un aumento en la mutante *hda15-1*. Todos estos resultados sugieren que *HDA15* funciona como un represor de genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de las clorofilas y proteínas que participan en la fotosíntesis (Liu *et al.*, 2013). Los tejidos V, A, GV y AV de *A. angustifolia* presentan una disminución en la expresión de la *HDA15* (**Figura 6.2**), sugiriendo una posible desregulación en la expresión de genes que codifican para enzimas de la biosíntesis de clorofila y proteínas que participan en la fotosíntesis en los tejidos albinos de *A. angustifolia*.

En *Arabidopsis*, la expresión de la *HDA18* es necesaria para que se formen los patrones celulares de la epidermis de la raíz (Xu *et al.*, 2005). De manera general el gen que codifica para la *HDA18* se expresa mínimamente durante los diferentes estadios de desarrollo y en los diferentes órganos de la planta, incluyendo los cotiledones y las hojas caulinares (Alinsug *et al.*, 2009). En *A. angustifolia* la disminución de la expresión de *HDA18* sólo se observa en los tejidos V y GV (**Figura 6.2**). Aunque se desconoce el papel biológico de la *HDA18* en *A. angustifolia*, los resultados sugieren una desregulación de la

expresión de la *HDA18* en la región verde de la planta variegada.

La *HDA19* (también conocida como HD1 y RPD3A) (Hollender y Liu, 2008) es una de las deacetilasas de histonas más estudiadas, se localiza en el núcleo, en particular en regiones de la eucromatina (Fong *et al.*, 2006) y se ha visto que está involucrada en la regulación de los niveles de acetilación de las histonas H3K9, H3K27, H4K5, H4K8 y H4K12 (Benhamed *et al.*, 2006; Tian *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2000).

Un análisis de microarreglos realizado en mutantes de la *hda19*, muestra que más del 7% de los genes del transcriptoma son regulados a la baja/alta, sugiriendo que la *HDA19* tiene una gran importancia como regulador transcripcional (Tian *et al.*, 2005). Además, la dramática reducción de los niveles de expresión del gen que codifica para la *HDA19* ocasiona efectos pleiotrópicos en el crecimiento y el desarrollo de la planta (Tian *et al.*, 2003; Tian y Chen, 2001; Wu *et al.*, 2000). A la *HDA19* también se le requiere para la regulación de la expresión de genes dependientes de luz (Benhamed *et al.*, 2006). Bajo condiciones de luz la mutante *hda19* presenta un incremento en la expresión de *CAB2* (CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN 2), sugiriendo que la *HDA19* funciona como un represor transcripcional de genes en respuesta a la luz (Benhamed *et al.*, 2006). En *Arabidopsis*, la *HDA19* se expresa fuertemente en diferentes tejidos, incluyendo las hojas (Wu *et al.*, 2000). En los resultados obtenidos en el presente trabajo, se encontró que la expresión del gen que codifica para la *HDA19* solamente presentó una disminución significativa en el tejido GV respecto al tejido G (**Figura 6.2**), esto sugiere un posible aumento en la expresión de genes dependientes de luz en el tejido GV, como un mecanismo compensatorio hacia la parte albina de la planta variegada como se ha reportado en otros trabajos (Foudree *et al.*, 2012; Rodermel, 2002; Carol *et al.*, 1999).

Otros genes que se analizaron en esta parte del trabajo son los que codifican para las metiltransferasas de ADN implicadas en la metilación de mantenimiento (*MET1*, *MET1B* y *CMT3*) y de novo (*DRM3*) (**Figura 6.3**).

MET1 es una de las metiltransferasas de ADN más estudiadas en plantas (Zhang *et al.*, 2010; Pavlopoulou y Kossida, 2007) y se ha observado que la deficiencia en su expresión produce una reducción global en la metilación del ADN, particularmente en las islas CG (Saze *et al.*, 2003; Kankel *et al.*, 2003; Finnegan y Kovac, 2000), además de ocasionar

anormalidades en el desarrollo de la planta, como una reducción de la dominancia apical, menor altura de la planta, alteraciones en el tamaño y forma de las hojas, disminución de la fertilidad y alteraciones en el tiempo de floración (Kankel *et al.*, 2003; Finnegan *et al.*, 1996).

Al igual que *MET1*, *MET1B* codifica a una metiltransferasa de ADN, la cual es necesaria para el desarrollo normal del arroz (Yamauchi *et al.*, 2014). En arroz, los niveles de transcritos de *MET1B* se acumulan de manera abundante en todos los tejidos analizados, sugiriendo su importancia en el mantenimiento de la metilación de las islas CG del ADN (Yamauchi *et al.*, 2008). Se ha reportado que cambios en los niveles de metilación de las islas CG pueden generar algún tipo de albinismo (Wang *et al.*, 2016; Díaz-Martínez *et al.*, 2012). Por ejemplo, en *A. tequila* la aparición de un fenotipo variegado, generado durante el cultivo *in vitro*, se le ha relacionado con cambios en los patrones de metilación del ADN asociados a la secuencia CCGG (Díaz-Martínez *et al.*, 2012). Por otro lado, la variegación observada en *Clivia miniata* var. *variegata* ha sido asociada con una hipermetilación de las islas CG en el cuerpo de los genes *CPSAR1* y *ycf2*, genes cuyos productos participan en la biogénesis de los cloroplastos, causando su represión transcripcional (Wang *et al.*, 2016). En *A. angustifolia* determinamos que los niveles de expresión de la *MET1* y *MET1B* son mayores en A y AV, respectivamente (**Figura 6.3**), sugiriendo un aumento en la actividad de estas enzimas en los tejidos albinos, ocasionando posiblemente una hipermetilación y por lo tanto una represión transcripcional de genes cuyos productos están implicados en la biosíntesis de pigmentos y/o el desarrollo de los cloroplastos. Estos datos son lo opuesto a lo observado en el tejido GV, en el que se observó una disminución en la expresión del gen que codifica para la *MET1B*, sugiriendo que el incremento en la actividad transcripcional de estos mismos genes funciona como un mecanismo compensatorio (Foudree *et al.*, 2012; Rodermeil, 2002; Carol *et al.*, 1999).

Además de la metilación de las islas CG, la función de *MET1* está relacionada con la metilación de las islas no-CG (islas CHG y CHH) (Lister *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006). La mutante *met1* presenta un incremento en el movimiento de elementos móviles y pseudogenes, resultando en un aumento importante de la actividad transcripcional en regiones de la heterocromatina (Lister *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2006). Estos datos sugieren que el incremento en la expresión de los genes que codifican para *MET1* y

MET1B, en los tejidos albinos, también podría estar relacionado con la represión del movimiento de los elementos móviles en estos tejidos. Sin embargo, en diferentes especies vegetales la regulación del movimiento de los elementos móviles en regiones de heterocromatina está directamente relacionada con la actividad de la *CMT3* (Zhang *et al.*, 2010; Pavlopoulou y Kossida, 2007; Jackson *et al.*, 2002). Los resultados del análisis de expresión de *CMT3* muestran un incremento de casi 15 y 25 veces más en los tejidos AV y A, respectivamente (**Figura 6.3**).

El género *Agave* cuenta con una gran familia de elementos móviles y esta abundancia se ha relacionado con la variación encontrada en estos tejidos (Gross *et al.*, 2013; Torres-Morán *et al.*, 2010; Bousios *et al.*, 2007; Infante *et al.*, 2006). En cultivos de *A. tequilana* la variación fenotípica, incluyendo la variegación, también se le ha relacionado con un aumento en el movimiento de los elementos móviles (Díaz-Martínez *et al.*, 2012). De igual manera la aparición del albinismo en arroz se ha asociado con un incremento en el movimiento de los elementos móviles (Hayashi-Tsugane *et al.*, 2014; Eun *et al.*, 2012; Li y Murai, 1995). Estas evidencias, junto con los niveles de expresión del gen que codifica para la *CMT3*, determinados en los tejidos albinos (A y AV), sugieren un aumento de la metilación de los elementos móviles en estos tejidos, consistente con el papel de la metilación del ADN en la defensa del genoma a través del silenciamiento de los elementos móviles (Lister *et al.*, 2008). Por otro parte, la importante reducción de la expresión del gen que codifica para la *CMT3* en los tejidos GV (**Figura 6.3**) sugiere un incremento en la activación de los elementos móviles en este tejido.

La actividad de *DRM3* se requiere para facilitar la metilación *de novo* realizada por *DRM2* (Saze *et al.*, 2012; Henderson *et al.*, 2010). Un estudio reciente sugiere que *DRM3* es una mutante catalítica paróloga a *DRM2*, y se le requiere para el mantenimiento normal de las islas no-CG (islas CHG y CHH) y el establecimiento de la metilación *de novo* en todos los contextos, mediante el proceso de metilación del ADN dirigido por ARN (RdDM) al promover la actividad de *DRM2* (Henderson *et al.*, 2010). En *Arabidopsis* la expresión de *DRM3* y *DRM2* son independientes la una de la otra y se ha sugerido que *DRM3* actúa junto con *DRM2* en el paso de catálisis (Henderson *et al.*, 2010).

Durante el cultivo *in vitro* se han observado cambios en los niveles de metilación en el ADN, usualmente una baja en la metilación se relaciona con algún grado de variación

somaclonal (Jaligot *et al.*, 2000; Kaeppeler y Phillips, 1993). Durante el cultivo *in vitro* de *Tricale* las variaciones, que incluyen un fenotipo albino en las plantas regeneradas, están relacionadas con una disminución en los niveles de metilación global en el ADN. Un análisis más profundo sugiere que la demetilación prevaleció sobre la metilación *de novo* (Machczyńska *et al.*, 2014). En maíz se determinó que los eventos de hipometilación encontradas en las plantas regeneradas no son blancos activos de la metilación *de novo* (Stelpflug *et al.*, 2014). Por otro lado, un análisis previo realizado en *A. angustifolia* muestra que la aparición de los brotes albinos y variegados coinciden con una disminución en los niveles de metilación global del ADN de la planta madre, manteniendo este comportamiento en la mayoría de los subcultivos analizados (Duarte-Aké *et al.*, 2016).

Es posible que la disminución en los niveles de metilación global del ADN relacionada con la aparición del albinismo en los cultivos de *A. angustifolia* se deba a eventos de demetilación del ADN, lo que sugiere que las metiltransferasas de ADN, relacionadas con la metilación *de novo* en estos tejidos, no están funcionales, o que su actividad se encuentra muy disminuida. La disminución en la expresión del gen que codifica para la *DRM3* en V, A, GV y AV (**Figura 6.3**) soporta esta idea y sugiere que su actividad enzimática en los tejidos variegados y albinos está muy disminuida. Se ha sugerido que los cambios de la metilación del ADN, en las plantas regeneradas, funciona como un mecanismo de respuesta a las condiciones del cultivo *in vitro* en oposición a una pérdida general de la fidelidad del estado epigenético (Stelpflug *et al.*, 2014).

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

CONCLUSIONES

- ✓ La acumulación de fitoeno y la ausencia o disminución de la mayoría de los carotenoides analizados (licopeno, β -caroteno, zeaxantina, luteína y ABA) en los tejidos albinos (A y AV) está afectando la ruta de biosíntesis de los carotenoides. Además, la reducción en el contenido de las Chl *a* y *b* podría estar generando una baja actividad fotosintética en los tejidos albinos (A y AV).
- ✓ El incremento en la cantidad de β -caroteno y luteína en la región verde del tejido variegado (GV), sugiere un mecanismo de protección al daño foto-oxidativo debido la región albina (AV). De igual manera, la región verde del tejido variegado (GV) presenta un aumento en la relación de clorofila *a/b* sugiriendo un mecanismo fotosintético compensatorio provisto por el tejido AV.
- ✓ La disminución en los niveles de expresión de algunos genes, cuyos productos están relacionados con la biosíntesis de carotenoides (*PSY*, *PDS*, *ZDS*, *LCY ξ* y *LCY β*) y la biosíntesis de clorofila (*Mgche*) en los tejidos albinos (A y AV) podrían explicar una disminución, pero no la ausencia completa de los pigmentos fotosintéticos en estos tejidos. Estos datos sugieren que la biosíntesis de los pigmentos fotosintéticos en los tejidos albinos podría estar regulada a un nivel diferente del transcripcional. De igual manera los tejidos albinos (A y AV) presentan una reducción en los niveles de expresión de la *rubS*, *rubL*, *LCHP* y *PEPCasa* sugiriendo una afectación del mecanismo fotosintético debido al albinismo.
- ✓ El incremento en los niveles de expresión de los genes que codifican para *Mgche*, *rubS* y *rubL*, *LCY ξ* y *LCY β* en el tejido GV refuerza la idea de un mecanismo fotosintético compensatorio y de fotoprotección proveniente de los tejidos AV.
- ✓ La alta similitud genética encontrada entre los diferentes fenotipos sugiere fuertemente que podrían estar involucrados mecanismos epigenéticos en el albinismo de *A. angustifolia*.
- ✓ La metilación global del ADN parece no estar involucrada en el albinismo de *A. angustifolia*. Sin embargo, aún no se puede descartar el papel de la metilación del ADN en sitios específicos (CG, CHG y CHH) y su relación con el albinismo en plantas,

debido al papel de la metilación del ADN en la regulación específica de genes cuyos productos están involucrados en la biosíntesis de los carotenoides, las clorofilas, la fotosíntesis y el desarrollo de los cloroplastos

- ✓ Los resultados también sugieren que una de las modificaciones epigenéticas responsables de la falta de clorofilas, carotenoides y de la actividad fotosintética en los cultivos albinos de *A. angustifolia* podría ser la hiperacetilación de la H3K9. Es posible que la hipermetilación permita la formación de eucromatina y promueva la expresión de represores transcripcionales responsables de la regulación de la biosíntesis de las clorofilas, carotenoides y el funcionamiento de la fotosíntesis, y que pueda perturbar el desarrollo normal de los cloroplastos.
- ✓ Los resultados de la expresión de las diferentes *HDACs* no presentaron una relación directa con la hiperacetilación de la H3K9 determinada en los tejidos albinos de *A. angustifolia*. Sin embargo, la disminución de la expresión de la *HDA15* en los tejidos V, A, GV y AV, sugiere una posible desregulación en la expresión de genes, cuyos productos están relacionados con la biosíntesis de clorofila y el desarrollo de la fotosíntesis en los tejidos A y V, mientras que la disminución en la expresión de la *HDA19* en el tejido GV sugiere un incremento en la expresión de genes dependientes de luz en este tejido como un mecanismo compensatorio hacia la parte albina desde la parte variegada.
- ✓ El aumento en los niveles de expresión de los genes que codifican para *MET1* y *MET1B* en los tejidos albinos (A y AV) sugiere una hipermetilación de las islas CG y por lo tanto, una posible represión transcripcional de genes cuyos productos estén implicados en la biosíntesis de los pigmentos y/o el desarrollo de los cloroplastos en estos tejidos. Por otro lado, la elevada expresión del gen que codifica para *CMT3* en los tejidos albinos (A y AV) sugiere el silenciamiento de los genes implicados en el movimiento de los elementos móviles en estos tejidos. La disminución en la expresión de la *DRM3* en los tejidos A y V sugiere una baja actividad de la metilación *de novo* en los tejidos albinos de *A. angustifolia*.

PERSPECTIVAS

- ✓ Realizar los análisis por bisulfito de las regiones promotoras y del cuerpo del gen de los genes que presentaron una expresión diferencial en los tejidos albinos, con la finalidad de determinar cuáles son regulados de manera específica por la metilación del ADN.
- ✓ Analizar los niveles de expresión de las diferentes acetilasas de histonas (*HATs*) y determinar cuáles de ellas podrían estar relacionadas con la hiperacetilación de los tejidos albinos.
- ✓ Determinar la actividad de las *HATs* y *HDACs* en los fenotipos albinos y verdes.
- ✓ Determinar la actividad de las metiltransferasas de ADN y desmetilasas de ADN en los fenotipos albinos y verdes.
- ✓ Analizar por ChiP-seq para H3K9ac qué genes son regulados de manera específica por esta marca.
- ✓ Evaluar el efecto de la tricosantina (*TSA*), un inhibidor de la actividad de las *HDACs*, en la aparición de brotes albinos de *A. angustifolia*.
- ✓ Evaluar el efecto de la azacitidina, un inhibidor de la metilación del ADN, en la incidencia de la aparición de brotes albinos de *A. angustifolia*.

ARTÍCULOS PUBLICADOS

Us-Camas R, Rivera-Solís G, Duarte-Aké F y De-la-Peña C (2014). *In vitro* culture: an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118, 187-201

Campos-Rivero G, Osorio-Montalvo P, Sanchez-Borges R, Us-Camas R, Duarte-Ake F y De-la-Peña C (2017). Plant hormone signaling in flowering: an epigenetic point of view. *Journal of Plant Physiology*, 214, 16-27

Us-Camas R, Castillo-Castro E, Aguilar-Espinosa M, Limones-Briones V, Rivera-Madrid R, Robert-Díaz ML y De-la-Peña C (2017). Assessment of molecular and epigenetic changes in the albinism of *Agave angustifolia* Haw. *Plant Science*, 263, 156-167

BIBLIOGRAFÍA

- Abadie J-C, Püttsepp Ü, Gebauer G, Faccio A, Bonfante P y Selosse M-A (2006). *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Botany*, 84, 1462-1477
- Abraham-Juárez MJ, Ramírez-Malagón R, Gil-Vega KdC y Simpson J (2009). AFLP analysis of genetic variability in three reproductive forms of *Agave tequilana*. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32, 171-175
- Agache S, Bachelier B, de Buyser J, Henry Y y Snape J (1989). Genetic analysis of anther culture response in wheat using aneuploid, chromosome substitution and translocation lines. *Theoretical and Applied Genetics*, 77, 7-11
- Albrecht M, Klein A, Hugueney P, Sandmann G y Kuntz M (1995). Molecular cloning and functional expression in *E. coli* of a novel plant enzyme mediating zeta-carotene desaturation. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*, 372, 199-202
- Alinsug MV, Chen FF, Luo M, Tai R, Jiang L y Wu K (2012). Subcellular localization of class II HDAs in *Arabidopsis thaliana*: nucleocytoplasmic shuttling of HDA15 is driven by light. *Public Library of Science (PLoS) ONE*, 7, e30846
- Alinsug MV, Yu CW y Wu K (2009). Phylogenetic analysis, subcellular localization, and expression patterns of RPD3/HDA1 family histone deacetylases in plants. *BioMed Central (BMC) Plant Biology*, 9, 37
- Aluru MR, Bae H, Wu D y Rodermeel SR (2001). The *Arabidopsis immutans* mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants. *Plant Physiology*, 127, 67-77
- Aluru MR, Yu F, Fu A y Rodermeel S (2006). *Arabidopsis* variegation mutants: new insights into chloroplast biogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 57, 1871-1881
- Aluru MR, Zola J, Foudree A y Rodermeel SR (2009). Chloroplast photooxidation-induced transcriptome reprogramming in *Arabidopsis immutans* white leaf sectors. *Plant Physiology*, 150, 904-923
- Alvarez-Venegas R, Abdallat AA, Guo M, Alfano JR y Avramova Z (2007). Epigenetic control of a transcription factor at the cross section of two antagonistic pathways. *Epigenetics*, 2, 106-113
- Alvarez-Venegas R y Avramova Z (2005). Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive *Arabidopsis* genes and in *atx1* mutants. *Nucleic Acids Research*, 33, 5199-5207
- Ankele E, Heberle-Bors E, Pfosser MF y Hofinger BJ (2005). Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals. *Acta Physiologiae Plantarum*, 27, 651-665
- Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE y Moudrianakis EN (1991). The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 88, 10148-10152
- Armstrong GA, Runge S, Frick G, Sperling U y Apel K (1995). Identification of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductases A and B: a branched pathway for light-dependent chlorophyll biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 108, 1505-1517

- Aubry C, De Buyser J, Hartmann C, Henry Y y Rode A (1989). Changes in the molecular organization of the mitochondrial genome in albino tissue cultures derived from wheat pollen embryos and in plants regenerated from these cultures. *Plant Science*, 65, 103-110
- Aufsatz W, Mette MF, van der Winden J, Matzke M y Matzke AJM (2002). HDA6, a putative histone deacetylase needed to enhance DNA methylation induced by double-stranded RNA. *European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*, 21, 6832-6841
- Aufsatz W, Stoiber T, Rakic B y Naumann K (2007). *Arabidopsis* histone deacetylase 6: a green link to RNA silencing. *Oncogene*, 26, 5477-5488
- Babiychuk E, Bouvier-Nave P, Compagnon V, Suzuki M, Muranaka T, Van Montagu M, Kushnir S y Schaller H (2008). Albinism and cell viability in cycloartenol synthase deficient *Arabidopsis*. *Plant Signaling and Behavior*, 3, 978-980
- Badami PS, Mallikarjuna N y Moss JP (1997). Interspecific hybridization between *Cicer arietinum* and *C. pinnatifidum*. *Plant Breeding*, 116, 393-395
- Bai L, Kim EH, DellaPenna D y Brutnell TP (2009). Novel lycopene epsilon cyclase activities in maize revealed through perturbation of carotenoid biosynthesis. *Plant Journal*, 59, 588-599
- Bannister AJ y Kouzarides T (2011). Regulation of chromatin by histone modifications. *Cell Research*, 21, 381-395
- Barraza-Morales A, Robert M, Esqueda M, Gardea A y Sánchez-Teyer FL (2006). Variabilidad genética en *Agave angustifolia* Haw. de la Sierra Sonorense, México, determinada con marcadores AFLP. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 29, 1-8
- Barski A, Cuddapah S, Cui K, Roh TY, Schones DE, Wang Z, Wei G, Chepelev I y Zhao K (2007). High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell*, 129, 823-837
- Bartee L, Malagnac F y Bender J (2001). *Arabidopsis cmt3* chromomethylase mutations block non-CG methylation and silencing of an endogenous gene. *Genes and Development*, 15, 1753-1758
- Bartley GE, Viitanen PV, Pecker I, Chamovitz D, Hirschberg J y Scolnik PA (1991). Molecular cloning and expression in photosynthetic bacteria of a soybean cDNA coding for phytoene desaturase, an enzyme of the carotenoid biosynthesis pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 88, 6532-6536
- Barwale UB y Widholm JM (1987). Somaclonal variation in plants regenerated from cultures of soybean. *Plant Cell Reports*, 6, 365-368
- Bastow R, Mylne JS, Lister C, Lippman Z, Martienssen RA y Dean C (2004). Vernalization requires epigenetic silencing of FLC by histone methylation. *Nature*, 427, 164-167
- Belinsky SA, Klinge DM, Stidley CA, Issa JP, Herman JG, March TH y Baylin SB (2003). Inhibition of DNA methylation and histone deacetylation prevents murine lung cancer. *Cancer Research*, 63, 7089-7093
- Benhamed M, Bertrand C, Servet C y Zhou DX (2006). *Arabidopsis GCN5*, *HD1*, and *TAF1/HAF2* interact to regulate histone acetylation required for light-responsive gene expression. *Plant Cell*, 18, 2893-2903
- Benli M, Schulz R y Apel K (1991). Effect of light on the NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 16, 615-625
- Berger SL (2007). The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature*, 447, 407-412

-
- Bernatavichute YV, Zhang X, Cokus S, Pellegrini M y Jacobsen SE (2008). Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Public Library of Science (PLoS) ONE, 3, e3156
- Berr A y Shen WH (2010). Molecular mechanisms in epigenetic regulation of plant growth and development, en: Plant Developmental Biology - Biotechnological Perspectives: Volume 2, EC Pua, MR Davey, (eds). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 325-344
- Bobadilla Landey R y Berr A (2016). Histone methylation -a cornerstone for plant responses to environmental stresses?, en: Abiotic and biotic stress in plants, S Arun, ed. IntechOpen, pp 31-61
- Bode S, Quentmeier CC, Liao P-N, Hafi N, Barros T, Wilk L, Bittner F y Walla PJ (2009). On the regulation of photosynthesis by excitonic interactions between carotenoids and chlorophylls Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 106, 12311-12316
- Boerma HR y Specht JE (2004). Soybeans: improvement, production and uses. American Society of Agronomy, Madison, pp 1144
- Bohnert H, Ostrem J, Cushman J, Michalowski C, Rickers J, Meyer G, Jay deRocher E, Vernon D, Krueger M, Vazquez-Moreno L, Velten J, Hoefner R y Schmitt J (1988). *Mesembryanthemum crystallinum*, a higher plant model for the study of environmentally induced changes in gene expression. Plant Molecular Biology Reporter, 6, 10-28
- Bond DM, Dennis ES, Pogson BJ y Finnegan EJ (2009). Histone acetylation, VERNALIZATION INSENSITIVE 3, FLOWERING LOCUS C, and the vernalization response. Molecular Plant, 2, 724-737
- Bousios A, Saldana-Oyarzabal I, Valenzuela-Zapata AG, Wood C y Pearce SR (2007). Isolation and characterization of Ty1-copia retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis. Plant Science, 172, 291-298
- Brown PT, Yoneyama K y Lorz H (1989). An investigation into the role of 5-Azacytidine in tissue culture. Theoretical and Applied Genetics, 78, 321-328
- Buckner B, Kelson TL y Robertson DS (1990). Cloning of the *y1* locus of maize, a gene involved in the biosynthesis of carotenoids. Plant Cell, 2, 867-876
- Buyser JD, Hachemi-Rachedi S, Lemee ML, Sejourne S, Marcotte JL y Henry Y (1992). Aneuploid analysis of anther culture response in wheat. Plant Breeding, 109, 339-342
- Cao X y Jacobsen SE (2002a). Locus-specific control of asymmetric and CpNpG methylation by the DRM and CMT3 methyltransferase genes. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 99 S, 16491-16498
- Cao X y Jacobsen SE (2002b). Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in *de novo* DNA methylation and gene silencing. Current Biology, 12, 1138-1144
- Cao X, Springer NM, Muszynski MG, Phillips RL, Kaeppler S y Jacobsen SE (2000). Conserved plant genes with similarity to mammalian *de novo* DNA methyltransferases. Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A., 97, 4979-4984
- Caredda S, Doncoeur C, Devaux P, Sangwan RS y Clément C (2000). Plastid differentiation during androgenesis in albino and non-albino producing cultivars of barley (*Hordeum vulgare* L.). Sexual Plant Reproduction, 13, 95-104
- Carol P, Stevenson D, Bisanz C, Breitenbach J, Sandmann G, Mache R, Coupland G y Kuntz M (1999). Mutations in the *Arabidopsis* gene *IMMUTANS* cause a variegated
-

- phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, 11, 57-68
- Carretero-Paulet L, Ahumada I, Cunillera N, Rodriguez-Concepcion M, Ferrer A, Boronat A y Campos N (2002). Expression and molecular analysis of the *Arabidopsis* DXR gene encoding 1-deoxy-D-xylulose 5-phosphate reductoisomerase, the first committed enzyme of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway. *Plant Physiology*, 129, 1581-1591
- Carretero-Paulet L, Cairo A, Botella-Pavia P, Besumbes O, Campos N, Boronat A y Rodriguez-Concepcion M (2006). Enhanced flux through the methylerythritol 4-phosphate pathway in *Arabidopsis* plants overexpressing deoxyxylulose 5-phosphate reductoisomerase. *Plant Molecular Biology*, 62, 683-695
- Cartagena JA, Matsunaga S, Seki M, Kurihara D, Yokoyama M, Shinozaki K, Fujimoto S, Azumi Y, Uchiyama S y Fukui K (2008). The *Arabidopsis* SDG4 contributes to the regulation of pollen tube growth by methylation of histone H3 lysines 4 and 36 in mature pollen. *Developmental Biology*, 315, 355-368
- Castorena-Sánchez I, Escobedo RM y Quiroz A (1991). New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisalanae*. *Canadian Journal of Botany*, 69, 1257-1264
- Cazzonelli CI, Cuttriss AJ, Cossetto SB, Pye W, Crisp P, Whelan J, Finnegan EJ, Turnbull C y Pogson BJ (2009). Regulation of carotenoid composition and shoot branching in *Arabidopsis* by a chromatin modifying histone methyltransferase, SDG8. *Plant Cell*, 21, 39-53
- Cazzonelli CI, Roberts AC, Carmody ME y Pogson BJ (2010). Transcriptional control of SET DOMAIN GROUP 8 and CAROTENOID ISOMERASE during *Arabidopsis* development. *Molecular Plant*, 3, 174-191
- Ciesielska A, Ruskowski M, Kasperska A, Femiak I, Michalski Z y Sikorski MM (2014). New insights into the signaling and function of cytokinins in higher plants. *BioTechnologia*, 93, 400-413
- Cimini D, Mattiuzzo M, Torosantucci L y Degrassi F (2003). Histone hyperacetylation in mitosis prevents sister chromatid separation and produces chromosome segregation defects. *Molecular Biology of the Cell*, 14, 3821-3833
- Cistue L, Soriano M, Castillo AM, Valles MP, Sanz JM y Echavarri B (2006). Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 25, 257-264
- Cocciolone SM y Cone KC (1993). *Pi-Bh*, an anthocyanin regulatory gene of maize that leads to variegated pigmentation. *Genetics*, 135, 575-588
- Cokus SJ, Feng S, Zhang X, Chen Z, Merriman B, Haudenschild CD, Pradhan S, Nelson SF, Pellegrini M y Jacobsen SE (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452, 215-219
- Colunga-Garciamarin P y May-Pat F (1997). Morphological variation of henequen (*Agave fourcroydes*, Agavaceae) germplasm and its wild ancestor (*A. angustifolia*) under uniform growth conditions: diversity and domestication. *American Journal of Botany*, 84, 1449-1449
- Collins JL (1927). A low temperature type of albinism in barley. *Journal of Heredity*, 18, 331-334
- Connett MB (1986). Mechanisms of maternal inheritance of plastids and mitochondria: developmental and ultrastructural evidence. *Plant Molecular Biology Reporter*, 4, 193-205

-
- Conti A, Pancaldi S, Fambrini M, Michelotti V, Bonora A, Salvini M y Pugliesi C (2004). A deficiency at the gene coding for ζ -carotene desaturase characterizes the sunflower *non dormant-1* mutant. *Plant and Cell Physiology*, 45, 445-455
- Cunningham FX y Gantt E (1998). Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 557-583
- Cunningham FX, Jr., Pogson B, Sun Z, McDonald KA, DellaPenna D y Gantt E (1996). Functional analysis of the beta and epsilon lycopene cyclase enzymes of *Arabidopsis* reveals a mechanism for control of cyclic carotenoid formation. *Plant Cell*, 8, 1613-1626
- Cushman JC, Meyer G, Michalowski CB, Schmitt JM y Bohnert HJ (1989). Salt stress leads to differential expression of two isogenes of phosphoenolpyruvate carboxylase during Crassulacean Acid Metabolism induction in the common ice plant. *Plant Cell*, 1, 715-725
- Cuttriss AJ, Chubb AC, Alawady A, Grimm B y Pogson BJ (2007). Regulation of lutein biosynthesis and prolamellar body formation in *Arabidopsis*. *Functional Plant Biology*, 34, 663-672
- Chan SW, Henderson IR y Jacobsen SE (2005). Gardening the genome: DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Reviews: Genetics*, 6, 351-360
- Chang S y Pikaard CS (2005). Transcript profiling in *Arabidopsis* reveals complex responses to global inhibition of DNA methylation and histone deacetylation. *Journal of Biological Chemistry*, 280, 796-804
- Chanvivatana Y, Bishopp A, Schubert D, Stock C, Moon YH, Sung ZR y Goodrich J (2004). Interaction of Polycomb-group proteins controlling flowering in *Arabidopsis*. *Development*, 131, 5263-5276
- Charron J-BF, He H, Elling AA y Deng XW (2009). Dynamic landscapes of four histone modifications during deetiolation in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 3732-3748
- Chase MW, Reveal JL y Fay MF (2009). A subfamilial classification for the expanded asparagalean families Amaryllidaceae, Asparagaceae and Xanthorrhoeaceae. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 161, 132-136
- Chen M, Choi Y, Voytas DF y Rodermel S (2000). Mutations in the *Arabidopsis* VAR2 locus cause leaf variegation due to the loss of a chloroplast FtsH protease. *Plant Journal*, 22, 303-313
- Chen M, Jensen M y Rodermel S (1999). The yellow variegated mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and delayed in chloroplast biogenesis. *Journal of Heredity*, 90, 207-214
- Chen T y Li E (2004). Structure and function of eukaryotic DNA methyltransferases. *Current Topics in Developmental Biology*, 60, 55-89
- Chen ZJ y Tian L (2007). Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression*, 1769, 295-307
- Chollet R, Vidal J y O'Leary MH (1996). Phosphoenolpyruvate carboxylase: a ubiquitous, highly regulated enzyme in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 47, 273-298
- Chory J, Aguilar N y Peto CA (1991). The phenotype of *Arabidopsis thaliana det1* mutants suggests a role for cytokinins in greening. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 45, 21-29
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T y Brenner M (1994). A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (*det* mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology*, 104, 339-347
-

- Chua YL, Mott E, Brown AP, MacLean D y Gray JC (2004). Microarray analysis of chromatin-immunoprecipitated DNA identifies specific regions of tobacco genes associated with acetylated histones. *Plant Journal*, 37, 789-800
- Chung PJ, Kim YS, Park SH, Nahm BH y Kim JK (2009). Subcellular localization of rice histone deacetylases in organelles. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*, 583, 2249-2254
- Datta SK (2005). Androgenic haploids: factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, 89, 1870
- Davis SC, Dohleman FG y Long SP (2011). The global potential for *Agave* as a biofuel feedstock. *Global Change Biology Bioenergy*, 3, 68-78
- Day A y Ellis T (1984). Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible basis for maternal inheritance of chloroplasts. *Cell*, 39, 359-368
- Day A y Ellis THN (1985). Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Current Genetics*, 9, 671-678
- Day IS, Golovkin M y Reddy AS (1998). Cloning of the cDNA for glutamyl-tRNA synthetase from *Arabidopsis thaliana*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1399, 219-224
- De-La-Peña C, Nic-Can G, Ojeda G, Herrera-Herrera JL, Lopez-Torres A, Wrobel K y Robert-Diaz ML (2012). *KNOX1* is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave* spp. *BioMed Central (BMC) Plant Biology*, 12, 203
- Deimling S y Flehinghaus-Roux T (1997). Haploidy in rye, en: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants: Volume 4 - Cereals*, SM Jain, SK Sopory, RE Veilleux, (eds). Springer Netherlands, Dordrecht, pp 181-204
- Delgado-Sandoval C, Abraham- Juarez MJ y Simpson J (2012). *Agave tequilana* MADS genes show novel expression patterns in meristems, developing bulbils and floral organs. *Sexual Plant Reproduction*, 25, 11-26
- Demmig-Adams B, Gilmore AM y Adams WW, 3rd (1996). Carotenoids 3: in vivo function of carotenoids in higher plants. *Federation of American Societies for Experimental Biology (FASEB) Journal*, 10, 403-412
- Díaz-Martínez M, Nava-Cedillo A, Guzman-Lopez JA, Escobar-Guzman 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, 321-330
- Duarte-Aké F, Castillo-Castro E, Pool FB, Espadas F, Santamaría JM, Robert ML y De-la-Peña C (2016). Physiological differences and changes in global DNA methylation levels in *Agave angustifolia* Haw. albino variant somaclones during the micropropagation process. *Plant Cell Reports*, 35, 2489-2502
- Earley K, Lawrence RJ, Pontes O, Reuther R, Enciso AJ, Silva M, Neves N, Gross M, Viegas W y Pikaard CS (2006). Erasure of histone acetylation by *Arabidopsis* HDA6 mediates large-scale gene silencing in nucleolar dominance. *Genes and Development*, 20, 1283-1293
- Earley KW, Shook MS, Brower-Toland B, Hicks L y Pikaard CS (2007). *In vitro* specificities of *Arabidopsis* co-activator histone acetyltransferases: implications for histone hyperacetylation in gene activation. *Plant Journal*, 52, 615-626
- Eckhardt U, Grimm B y Hörtensteiner S (2004). Recent advances in chlorophyll biosynthesis and breakdown in higher plants. *Plant Molecular Biology*, 56, 1-14

-
- Echevarria-Machado I, Sanchez-Cach LA, Hernandez-Zepeda C, Rivera-Madrid R y Moreno-Valenzuela OA (2005). A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology*, 31, 129-135
- Edwards G y Walker D (1983). C3, C4: mechanisms, and cellular and environmental regulation, of photosynthesis. Vol 6. University of California Press, California, pp 747-748
- Eisenreich W, Rohdich F y Bacher A (2001). Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. *Trends in Plant Science*, 6, 78-84
- Espineda CE, Linford AS, Devine D y Brusslan JA (1999). The *AtCAO* gene, encoding chlorophyll a oxygenase, is required for chlorophyll b synthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 96, 10507-10511
- Estevez JM, Cantero A, Reindl A, Reichler S y Leon P (2001). 1-Deoxy-D-xylulose-5-phosphate synthase, a limiting enzyme for plastidic isoprenoid biosynthesis in plants. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 22901-22909
- Estevez JM, Cantero A, Romero C, Kawaide H, Jimenez LF, Kuzuyama T, Seto H, Kamiya Y y Leon P (2000). Analysis of the expression of *CLA1*, a gene that encodes the 1-deoxyxylulose 5-phosphate synthase of the 2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate pathway in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 124, 95-104
- Eun CH, Takagi K, Park KI, Maekawa M, Iida S y Tsugane K (2012). Activation and epigenetic regulation of DNA transposon *nDart1* in rice. *Plant and Cell Physiology*, 53, 857-868
- Fambrini M, Pugliesi C, Vernieri P, Giuliano G y Baroncelli S (1993). Characterization of a sunflower (*Helianthus annuus* L.) mutant, deficient in carotenoid synthesis and abscisic-acid content, induced by *in-vitro* tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 87, 65-69
- Fang J, Chai C, Qian Q, Li C, Tang J, Sun L, Huang Z, Guo X, Sun C, Liu M, Zhang Y, Lu Q, Wang Y, Lu C, Han B, Chen F, Cheng Z y Chu C (2008). Mutations of genes in synthesis of the carotenoid precursors of ABA lead to pre-harvest sprouting and photo-oxidation in rice. *Plant Journal*, 54, 177-189
- Fieldes MA (1994). Heritable effects of 5-azacytidine treatments on the growth and development of flax (*Linum usitatissimum*) genotrophs and genotypes. *Genome*, 37, 1-11
- Finnegan EJ, Brettell RI y Dennis ES (1993). The role of DNA methylation in the regulation of plant gene expression. *Experientia Supplementum*, 64, 218-261
- Finnegan EJ, Genger RK, Peacock WJ y Dennis ES (1998). DNA methylation in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 49, 223-247
- Finnegan EJ y Kovac KA (2000). Plant DNA methyltransferases. *Plant Molecular Biology*, 43, 189-201
- Finnegan EJ, Peacock WJ y Dennis ES (1996). Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 93, 8449-8454
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R y Pavletich NP (1999). Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, 401, 188-193
- Fong PM, Tian L y Chen ZJ (2006). *Arabidopsis thaliana* histone deacetylase 1 (AtHD1) is localized in euchromatic regions and demonstrates histone deacetylase activity *in vitro*. *Cell Research*, 16, 479-488
-

- Foudree A, Putarjunan A, Kambakam S, Nolan T, Fussell J, Pogorelko G y Rodermel S (2012). The mechanism of variegation in *immutans* provides insight into chloroplast biogenesis. *Frontiers in Plant Science*, 3:260
- Fraser PD y Bramley PM (2004). The biosynthesis and nutritional uses of carotenoids. *Progress in Lipid Research*, 43, 228-265
- Fuchs J, Demidov D, Houben A y Schubert I (2006). Chromosomal histone modification patterns--from conservation to diversity. *Trends in Plant Science*, 11, 199-208
- Fujimoto R, Sasaki T, Ishikawa R, Osabe K, Kawanabe T y Dennis ES (2012). Molecular mechanisms of epigenetic variation in plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 9900-9922
- Gentry HS (1982). *Agaves of Continental North America*, Tucson, AZ. USA. University of Arizona Press, pp 670
- Gil-Vega K, Díaz C, Nava-Cedillo A y Simpson J (2006). AFLP analysis of *Agave tequilana* varieties. *Plant Science*, 170, 904-909
- Gilmore AM (2001). Xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching in photosystem II: mechanistic insights gained from *Arabidopsis thaliana* L. mutants that lack violaxanthin deepoxidase activity and/or lutein. *Photosynthesis Research*, 67, 89-101
- González G, Alemán S y Infante D (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. *Plant Science*, 165, 595-601
- Good-Avila SV, Souza V, Gaut BS y Eguiarte LE (2006). Timing and rate of speciation in *Agave* (Agavaceae). *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 103, 9124-9129
- Griffin PT, Niederhuth CE y Schmitz RJ (2016). A comparative analysis of 5-azacytidine- and zebularine-Induced DNA demethylation. *Genes|Genomes|Genetics*, 6, 2773-2780
- 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*. *BioMed Central (BMC) Genomics*, 14, 563
- Grozinger CM, Chao ED, Blackwell HE, Moazed D y Schreiber SL (2001). Identification of a class of small molecule inhibitors of the Sirtuin family of NAD-dependent deacetylases by phenotypic screening. *Journal of Biological Chemistry*, 276, 38837-38843
- Gruenbaum Y, Naveh-Many T, Cedar H y Razin A (1981). Sequence specificity of methylation in higher plant DNA. *Nature*, 292, 860-862
- Guglielminetti L, Frediani M, Castiglione MR, Gelati MT y Cremonini R (2012). Characterization of normal and "albino" phenotypes in *Erythrina crista-galli*. *Caryologia*, 65, 199-207
- Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM y Marks PA (2004). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21^{WAF1} involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 101, 1241-1246
- Guo Y-D, Sewón P y Pulli S (1999). Improved embryogenesis from anther culture and plant regeneration in timothy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 57, 85-93
- Haliloglu K y Baenziger PS (2003). The effects of age and size of wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture-derived embryos on regeneration of green and albino plantlets. *Israel Journal of Plant Sciences*, 51, 207-212

-
- Happel N y Doenecke D (2009). Histone H1 and its isoforms: contribution to chromatin structure and function. *Gene*, 431, 1-12
- Harada T, Sato T, Asaka D y Matsukawa I (1991). Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 81, 157-161
- Hartl M, Fussl M, Boersema PJ, Jost JO, Kramer K, Bakirbas A y Sindlinger J (2017). Lysine acetylome profiling uncovers novel histone deacetylase substrate proteins in *Arabidopsis*. *Molecular Systems Biology*, 13, 949
- Hartsock T y Nobel P (1976). Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. *Nature*, 262, 574 - 576
- Hartung W y Gimmler H (1994). A stress physiological role for abscisic acid (ABA) in lower plants, en: *Progress in botany*, H-D Behnke, U Lüttge, K Esser, JW Kadereit, M Runge, (eds), Vol 55. Springer, pp 157-173
- Hayashi-Tsugane M, Takahara H, Ahmed N, Himi E, Takagi K, Iida S, Tsugane K y Maekawa M (2014). A mutable albino allele in rice reveals that formation of thylakoid membranes requires the *SNOW-WHITE LEAF1* gene. *Plant and Cell Physiology*, 55, 3-15
- Heimann L, Horst I, Perduns R, Dreesen B, Offermann S y Peterhansel C (2013). A common histone modification code on C4 genes in maize and its conservation in sorghum and *Setaria italica*. *Plant Physiology*, 162, 456-469
- Henderson IR, Deleris A, Wong W, Zhong X, Chin HG, Horwitz GA, Kelly KA, Pradhan S y Jacobsen SE (2010). The *de novo* cytosine methyltransferase DRM2 requires intact UBA domains and a catalytically mutated paralog DRM3 during RNA-Directed DNA Methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Public Library of Science (PLoS) Genetics*, 6, e1001182
- Henderson IR y Jacobsen SE (2007). Epigenetic inheritance in plants. *Nature*, 447, 418-424
- Hendry GA, Houghton JD y Brown SB (1987). Tansley Review No. 11. The degradation of chlorophyll-a biological enigma. *New Phytologist*, 107, 255-302
- Henikoff S y Comai L (1998). A DNA methyltransferase homolog with a chromodomain exists in multiple polymorphic forms in *Arabidopsis*. *Genetics*, 149, 307-318
- Hermans J y Westhoff P (1990). Analysis of expression and evolutionary relationships of phosphoenol-pyruvate carboxylase genes in *Flaveria trinervia* (C4) and *F. pringlei* (C3). *Molecular and General Genetics*, 224, 459-468
- Herppich WB (1997). Crassulacean Acid Metabolism: Biochemistry, Ecophysiology and Evolution en: *New Phytologist*, K Winter, JAC Smith, (eds), Vol 135. Cambridge University Press, pp 567-574
- Holden M (1961). The breakdown of chlorophyll by chlorophyllase. *Biochemical Journal*, 78, 359-364
- Holt NE, Zigmantas D, Valkunas L, Li X-P, Niyogi KK y Fleming GR (2005). Carotenoid cation formation and the regulation of photosynthetic light harvesting. *Science*, 307, 433-436
- Hollender C y Liu Z (2008). Histone deacetylase genes in *Arabidopsis* development. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50, 875-885
- Holliday R (2006). Epigenetics: a historical overview. *Epigenetics*, 1, 76-80
- Horn PJ y Peterson CL (2002). Molecular biology. Chromatin higher order folding--wrapping up transcription. *Science*, 297, 1824-1827
- Houben A, Demidov D, Gernand D, Meister A, Leach CR y Schubert I (2003). Methylation of histone H3 in euchromatin of plant chromosomes depends on basic nuclear DNA content. *Plant Journal*, 33, 967-973
-

- Hsieh T-F, Ibarra CA, Silva P, Zemach A, Eshed-Williams L, Fischer RL y Zilberman D (2009). Genome-wide demethylation of *Arabidopsis* endosperm. *Science*, 324, 1451-1454
- Huang N-C, Li C-H, Lee J-Y y Yen HE (2010). Cytosine methylation changes in the ice plant *Ppc1* promoter during transition from C3 to Crassulacean Acid Metabolism. *Plant Science*, 178, 41-46
- Huettel B, Kanno T, Daxinger L, Bucher E, van der Winden J, Matzke AJ y Matzke M (2007). RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1769, 358-374
- Infante D, González G, Peraza-Echeverría L y Keb-Llanes M (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes*. *Plant Science*, 164, 223-230
- Infante D, Molina S, Demey J y Gámez E (2006). Asexual genetic variability in Agavaceae determined with inverse sequence-tagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis. *Plant Molecular Biology Reporter*, 24, 205-217
- Infante D, Osorio M, Molina S y Gonzalez G (2005) Genetic improvement of asexually propagated plants. *In International Symposium on Biotechnology of Temperate Fruit Crops and Tropical Species 738*, pp 721-727
- Isaacson T, Ohad I, Beyer P y Hirschberg J (2004). Analysis *in vitro* of the enzyme CRTISO establishes a poly-cis-carotenoid biosynthesis pathway in plants. *Plant Physiology*, 136, 4246-4255
- Ising G (1967). Chromosome breakage and aneuploidy in *Cyrtanthus*. *Hereditas*, 57, 312-318
- Jackson JP, Johnson L, Jasencakova Z, Zhang X, PerezBurgos L, Singh PB, Cheng X, Schubert I, Jenuwein T y Jacobsen SE (2004). Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. *Chromosoma*, 112, 308-315
- Jackson JP, Lindroth AM, Cao X y Jacobsen SE (2002). Control of CpNpG DNA methylation by the KRYPTONITE histone H3 methyltransferase. *Nature*, 416, 556-560
- Jacob Y, Feng S, LeBlanc CA, Bernatavichute YV, Stroud H, Cokus S, Johnson LM, Pellegrini M, Jacobsen SE y Michaels SD (2009). ATXR5 and ATXR6 are H3K27 monomethyltransferases required for chromatin structure and gene silencing. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16, 763-768
- Jähne A, Lazzeri PA, Jäger-Gussen M y Lörz H (1991). Plant regeneration from embryogenic cell suspensions derived from anther cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 82, 74-80
- Jahns P y Holzwarth AR (2012). The role of the xanthophyll cycle and of lutein in photoprotection of photosystem II. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1817, 182-193
- Jaligot E, Rival A, Beulé T, Dussert S y Verdeil JL (2000). Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports*, 19, 684-690
- Jansson S (1994). The light-harvesting chlorophyll ab-binding proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1184, 1-19
- Jenuwein T y Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science*, 293, 1074-1080
- Jiang F, Ryabova D, Diedhiou J, Hucl P, Randhawa H, Marillia EF, Foroud NA, Eudes F y Kathiria P (2017). Trichostatin A increases embryo and green plant regeneration in wheat. *Plant Cell Report*, 36, 1701-1706

-
- Jørgensen RB, Jensen CJ, Andersen B y Von Bothmer R (1986). High capacity of plant regeneration from callus of interspecific hybrids with cultivated barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 6, 199-207
- Jullien PE, Katz A, Oliva M, Ohad N y Berger F (2006). Polycomb group complexes self-regulate imprinting of the Polycomb group gene MEDEA in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 16, 486-492
- Juttermann R, Li E y Jaenisch R (1994). Toxicity of 5-aza-2'-deoxycytidine to mammalian cells is mediated primarily by covalent trapping of DNA methyltransferase rather than DNA demethylation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 91, 11797-11801
- Kaeppeler SM y Phillips RL (1993). Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 90, 8773-8776
- Kang MJ, Jin HS, Noh YS y Noh B (2015). Repression of flowering under a noninductive photoperiod by the HDA9-AGL19-FT module in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 206, 281-294
- Kankel MW, Ramsey DE, Stokes TL, Flowers SK, Haag JR, Jeddloh JA, Riddle NC, Verbsky ML y Richards EJ (2003). *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants. *Genetics*, 163, 1109-1122
- Kieber JJ y Schaller GE (2014). Cytokinins. Vol 12. American Society of Plant Biologists, pp e0168
- Kim H-J y Bae S-C (2011). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *American Journal of Translational Research*, 3, 166-179
- Kim SY, He Y, Jacob Y, Noh Y-S, Michaels S y Amasino R (2005). Establishment of the vernalization-responsive, winter-annual habit in *Arabidopsis* requires a putative histone H3 methyl transferase. *Plant Cell*, 17, 3301-3310
- Kinoshita T, Harada JJ, Goldberg RB y Fischer RL (2001). Polycomb repression of flowering during early plant development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 98, 14156-14161
- Kondo H, Miura T, Wada KC y Takeno K (2007). Induction of flowering by 5-azacytidine in some plant species: relationship between the stability of photoperiodically induced flowering and flower-inducing effect of DNA demethylation. *Physiologia Plantarum*, 131, 462-469
- Krol M, Spangfort MD, Huner NP, Oquist G, Gustafsson P y Jansson S (1995). Chlorophyll a/b-binding proteins, pigment conversions, and early light-induced proteins in a chlorophyll b-less barley mutant. *Plant Physiology*, 107, 873-883
- Kumar AM, Csankovszki G y Soll D (1996). A second and differentially expressed glutamyl-tRNA reductase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 30, 419-426
- Kumari M, Clarke HJ, Small I y Siddique KH (2009). Albinism in plants: a major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 28, 393-409
- Kurita K, Sakamoto T, Yagi N, Sakamoto Y, Ito A, Nishino N, Sako K, Yoshida M, Kimura H, Seki M y Matsunaga S (2017). Live imaging of H3K9 acetylation in plant cells. *Scientific Reports*, 7, 45894
- Kuromori T, Wada T, Kamiya A, Yuguchi M, Yokouchi T, Imura Y, Takabe H, Sakurai T, Akiyama K, Hirayama T, Okada K y Shinozaki K (2006). A trial of phenome analysis using 4000 Ds-insertional mutants in gene-coding regions of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 47, 640-651

- Kusumi K, Komori H, Satoh H y Iba K (2000). Characterization of a *zebra* mutant of rice with increased susceptibility to light stress. *Plant and Cell Physiology*, 41, 158-164
- Lafos M, Kroll P, Hohenstatt ML, Thorpe FL, Clarenz O y Schubert D (2011). Dynamic regulation of H3K27 trimethylation during *Arabidopsis* differentiation. *Public Library of Science (PLoS) Genetics*, 7, e1002040
- Lan F y Shi Y (2009). Epigenetic regulation: methylation of histone and non-histone proteins. *Science in China Series C, Life Sciences*, 52, 311-322
- Lange BM y Ghassemian M (2003). Genome organization in *Arabidopsis thaliana*: a survey for genes involved in isoprenoid and chlorophyll metabolism. *Plant Molecular Biology*, 51, 925-948
- Laule O, Fürholz A, Chang H-S, Zhu T, Wang X, Heifetz PB, Grussem W y Lange M (2003). Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 100, 6866-6871
- Law JA y Jacobsen SE (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature Reviews: Genetics*, 11, 204-220
- Lawrence RJ, Earley K, Pontes O, Silva M, Chen ZJ, Neves N, Viegas W y Pikaard CS (2004). A concerted DNA methylation/histone methylation switch regulates rRNA gene dosage control and nucleolar dominance. *Molecular Cell*, 13, 599-609
- Lees AD y Waddington CH (1942). The development of the bristles in normal and some mutant types of *Drosophila melanogaster*. *Proceedings of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences*, 131, 87-110
- Lepiniec L, Vidal J, Chollet R, Gadal P y Crétin C (1994). Phosphoenolpyruvate carboxylase: structure, regulation and evolution. *Plant Science*, 99, 111-124
- Li F, Vallabhaneni R y Wurtzel ET (2008a). PSY3, a new member of the phytoene synthase gene family conserved in the Poaceae and regulator of abiotic stress-induced root carotenogenesis. *Plant physiology*, 146, 1333-1345
- Li G, Hall TC y Holmes-Davis R (2002). Plant chromatin: development and gene control. *Bioessays*, 24, 234-243
- Li H, Soriano M, Cordewener J, Muino JM, Riksen T, Fukuoka H, Angenent GC y Boutilier K (2014). The histone deacetylase inhibitor trichostatin A promotes totipotency in the male gametophyte. *Plant Cell*, 26, 195-209
- Li N, Yang Y, Ye J, Lu J, Zheng X y Liang Y (2015). Effects of sunlight on gene expression and chemical composition of light-sensitive albino tea plant. *Journal of Plant Growth Regulation*, 78, 253-262
- Li X, Wang X, He K, Ma Y, Su N, He H, Stolc V, Tongprasit W, Jin W, Jiang J, Terzaghi W, Li S y Deng XW (2008b). High-resolution mapping of epigenetic modifications of the rice genome uncovers interplay between DNA methylation, histone methylation, and gene expression. *Plant Cell*, 20, 259-276
- Li Y, Butenko Y y Grafi G (2005). Histone deacetylation is required for progression through mitosis in tobacco cells. *Plant Journal*, 41, 346-352
- Li Z, Ahn TK, Avenson TJ, Ballottari M, Cruz JA, Kramer DM, Bassi R, Fleming GR, Keasling JD y Niyogi KK (2009). Lutein accumulation in the absence of zeaxanthin restores nonphotochemical quenching in the *Arabidopsis thaliana npq1* mutant. *Plant Cell*, 21, 1798-1812
- Li Z y Murai N (1995). Agronomic trait evaluation of field-grown transgenic rice plants containing the hygromycin resistance gene and the maize *Activator* element. *Plant Science*, 108, 219-227

-
- Lichtenthaler HK, Schwender J, Disch A y Rohmer M (1997). Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate-independent pathway. Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters, 400, 271-274
- Lim SH, Witty M, Wallace-Cook AD, Ilag LI y Smith AG (1994). Porphobilinogen deaminase is encoded by a single gene in *Arabidopsis thaliana* and is targeted to the chloroplasts. Plant Molecular Biology, 26, 863-872
- Lindahl M, Spetea C, Hundal T, Oppenheim AB, Adam Z y Andersson B (2000). The thylakoid FtsH protease plays a role in the light-induced turnover of the photosystem II D1 protein. Plant Cell, 12, 419-431
- Lindroth AM, Cao X, Jackson JP, Zilberman D, McCallum CM, Henikoff S y Jacobsen SE (2001). Requirement of CHROMOMETHYLASE3 for maintenance of CpXpG methylation. Science, 292, 2077-2080
- Lippman Z, May B, Jordan C, Singer T y Martienssen R (2003). Distinct mechanisms determine transposon inheritance and methylation via small interfering RNA and histone modification. Public Library of Science (PLoS) Biology, 1, e67
- Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH y Ecker JR (2008). Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. Cell, 133, 523-536
- Liu C, Lu F, Cui X y Cao X (2010). Histone methylation in higher plants. Annual Review of Plant Biology, 61, 395-420
- Liu CL, Kaplan T, Kim M, Buratowski S, Schreiber SL, Friedman N y Rando OJ (2005). Single-nucleosome mapping of histone modifications in *S. cerevisiae*. Public Library of Science (PLoS) Biology, 3, e328
- Liu X-G, Xu H, Zhang J-Y, Liang G-W, Liu Y-T y Guo A-G (2012a). Effect of low temperature on chlorophyll biosynthesis in albinism line of wheat (*Triticum aestivum*) FA85. Physiologia Plantarum, 145, 384-394
- Liu X, Chen CY, Wang KC, Luo M, Tai R, Yuan L, Zhao M, Yang S, Tian G, Cui Y, Hsieh HL y Wu K (2013). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 associates with the histone deacetylase HDA15 in repression of chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in etiolated *Arabidopsis* seedlings. Plant Cell, 25, 1258-1273
- Liu X, Yang S, Yu CW, Chen CY y Wu K (2016). Histone acetylation and plant development. Enzymes, 40, 173-199
- Liu X, Yang S, Zhao M, Luo M, Yu CW, Chen CY, Tai R y Wu K (2014). Transcriptional repression by histone deacetylases in plants. Molecular Plant, 7, 764-772
- Liu X, Yu CW, Duan J, Luo M, Wang K, Tian G, Cui Y y Wu K (2012b). HDA6 directly interacts with DNA methyltransferase MET1 and maintains transposable element silencing in *Arabidopsis*. Plant Physiology, 158, 119-129
- Livak KJ y Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. Methods, 25, 402-408
- Luger K y Richmond TJ (1998). The histone tails of the nucleosome. Current Opinion in Genetics and Development, 8, 140-146
- Luo M, Tai R, Yu CW, Yang S, Chen CY, Lin WD, Schmidt W y Wu K (2015). Regulation of flowering time by the histone deacetylase HDA5 in *Arabidopsis*. Plant Journal, 82, 925-936
- Lüthy B, Martinoia E, Matile P y Thomas H (1984). Thylakoid-associated «Chlorophyll Oxidase»: distinction from lipoxygenase. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 113, 423-434

- Machczyńska J, Orłowska R, Mańkowski D, Zimny J y Bednarek P (2014). DNA methylation changes in triticale due to *in vitro* culture plant regeneration and consecutive reproduction. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 119, 289-299
- Mallikarjuna N (1999). Ovule and embryo culture to obtain hybrids from interspecific incompatible pollinations in chickpea. *Euphytica*, 110, 1-6
- Mandel MA, Feldmann KA, Herrera-Estrella L, Rocha-Sosa M y Leon P (1996). *CLA1*, a novel gene required for chloroplast development, is highly conserved in evolution. *Plant Journal*, 9, 649-658
- Margueron R y Reinberg D (2010). Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nature Reviews: Genetics*, 11, 285-296
- Martínez-Palacios A, Eguiarte LE y Furnier GR (1999). Genetic diversity of the endangered endemic *Agave victoriae-reginae* (Agavaceae) in the Chihuahuan Desert. *American Journal of Botany*, 86, 1093-1098
- Massoumi M, Krens FA, Visser RGF y De Klerk G-JM (2017). Azacytidine and *miR156* promote rooting in adult but not in juvenile *Arabidopsis* tissues. *Journal of Plant Physiology*, 208, 52-60
- Mathieu O, Probst AV y Paszkowski J (2005). Distinct regulation of histone H3 methylation at lysines 27 and 9 by CpG methylation in *Arabidopsis*. *European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*, 24, 2783-2791
- Matile P, Hortensteiner S, Thomas H y Krautler B (1996). Chlorophyll breakdown in senescent leaves. *Plant Physiology*, 112, 1403-1409
- Matzke M, Kanno T, Daxinger L, Huettel B y Matzke AJ (2009). RNA-mediated chromatin-based silencing in plants. *Current Opinion in Cell Biology*, 21, 367-376
- Mayfield SP y Taylor WC (1984). Carotenoid-deficient maize seedlings fail to accumulate light-harvesting chlorophyll a/b binding protein (LHCP) mRNA. *European Journal of Biochemistry*, 144, 79-84
- McKain M, Wickett N, Zhang Y, Ayyampalayam S, McCombie W, Chase M, Pires J, Depamphilis C y Leebens-Mack J (2012). Phylogenomic analysis of transcriptome data elucidates co-occurrence of a paleopolyploid event and the origin of bimodal karyotypes in Agavoideae (Asparagaceae). *American Journal of Botany*, 99, 397 - 406
- McKelvie AD (1963). Studies in the induction of mutations in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Radiation Botany*, 3, 105-123
- Miki D y Shimamoto K (2004). Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. *Plant and Cell Physiology*, 45, 490-495
- Mohanty M, Bhola N y Mohanty S (2005). Albino seedlings in *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. *Indian Forester*, 131, 127-128
- Müller J y Verrijzer P (2009). Biochemical mechanisms of gene regulation by polycomb group protein complexes. *Current Opinion in Genetics and Development*, 19, 150-158
- Murashige T y Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497
- Murphy JP, McAleer JP, Ugliarolo A, Papile J, Weniger J, Bethelmie F y Tramontano WA (2000). Histone deacetylase inhibitors and cell proliferation in pea root meristems. *Phytochemistry*, 55, 11-18
- Murray K (1964). The occurrence of ϵ -N-methyl lysine in histones. *Biochemistry*, 3, 10-15
- Murray MG y Thompson WF (1980). Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4326

-
- Narita S, Tanaka R, Ito T, Okada K, Taketani S y Inokuchi H (1996). Molecular cloning and characterization of a cDNA that encodes protoporphyrinogen oxidase of *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 182, 169-175
- Naumann K, Fischer A, Hofmann I, Krauss V, Phalke S, Irmeler K, Hause G, Aurich AC, Dorn R, Jenuwein T y Reuter G (2005). Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in *Arabidopsis*. *European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*, 24, 1418-1429
- Ng SS, Yue WW, Oppermann U y Klose RJ (2009). Dynamic protein methylation in chromatin biology. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 66, 407-422
- Ngernprasirtsiri J, Kobayashi H y Akazawa T (1988). DNA methylation as a mechanism of transcriptional regulation in nonphotosynthetic plastids in plant cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 85, 4750-4754
- Nic-Can GI, Lopez-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, Rojas-Herrera R y De-la-Peña C (2013). New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *Public Library of Science (PLoS) ONE*, 8, e72160
- Nishiyama I y Motoyoshi F (1966). Cytogenetic studies in avena, XVI. Chlorophyll formation in albino sand oats under certain culture conditions. *Japanese Journal of genetics*, 41, 403-411
- Nixon PJ, Barker M, Boehm M, de Vries R y Komenda J (2005). FtsH-mediated repair of the photosystem II complex in response to light stress. *Journal of Experimental Botany*, 56, 357-363
- Nobel P y Smith S (1983). High and low temperature tolerances and their relationships to distribution of agaves. *Plant, Cell and Environment*, 6, 711 - 719
- Nobel PS (2003). *Environmental biology of agaves and cacti*. Cambridge University Press, pp 284
- Norris SR, Barrette TR y DellaPenna D (1995). Genetic dissection of carotenoid synthesis in *Arabidopsis* defines plastocyanin as an essential component of phytyl desaturation. *Plant Cell*, 7, 2139-2149
- O'Leary MH (1982). Phosphoenolpyruvate carboxylase: an enzymologist's view. *Annual Review of Plant Physiology*, 33, 297-315
- Offermann S, Danker T, Drey Müller D, Kalamajka R, Töpsch S, Weyand K y Peterhänsel C (2006). Illumination is necessary and sufficient to induce histone acetylation independent of transcriptional activity at the C4-specific phosphoenolpyruvate carboxylase promoter in maize. *Plant Physiology*, 141, 1078-1088
- Offermann S, Dreesen B, Horst I, Danker T, Jaskiewicz M y Peterhänsel C (2008). Developmental and environmental signals induce distinct histone acetylation profiles on distal and proximal promoter elements of the *C4-Pepc* gene in maize. *Genetics*, 179, 1891-1901
- Okada K, Saito T, Nakagawa T, Kawamukai M y Kamiya Y (2000). Five geranylgeranyl diphosphate synthases expressed in different organs are localized into three subcellular compartments in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 122, 1045-1056
- Oliva R, Bazett-Jones DP, Locklear L y Dixon GH (1990). Histone hyperacetylation can induce unfolding of the nucleosome core particle. *Nucleic Acids Research*, 18, 2739-2747
- Orellana R, Villers L, Franco V y Ojeda L (1985). Algunos aspectos ecológicos de los Agaves de la Península de Yucatán, en: *Biología y aprovechamiento integral del Henequén y otros Agaves*, C Cruz, Ld Castillo, M Robert, RN Ondarza, (eds).
-

- Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. Mérida, Yucatán, México., pp 39-54
- Osugi A y Sakakibara H (2015). Q&A: How do plants respond to cytokinins and what is their importance? *BioMed Central (BMC) Biology*, 13, 102
- Palomino G, Dolezel J, Mèndez I y Rubluo A (2003). Nuclear genome size analysis of *Agave tequilana* Weber. *Caryologia*, 56, 37-46
- Pandey R, Muller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, Bender J, Mount DW y Jorgensen RA (2002). Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Research*, 30, 5036-5055
- Papenbrock J, Mock H-P, Tanaka R, Kruse E y Grimm B (2000). Role of MAGNESIUM CHELATASE activity in the early steps of the tetrapyrrole biosynthetic pathway. *Plant Physiology*, 122, 1161-1170
- Park H, Kreunen SS, Cuttriss AJ, DellaPenna D y Pogson BJ (2002). Identification of the carotenoid isomerase provides insight into carotenoid biosynthesis, prolamellar body formation, and photomorphogenesis. *Plant Cell*, 14, 321-332
- Pavlopoulou A y Kossida S (2007). Plant cytosine-5 DNA methyltransferases: structure, function, and molecular evolution. *Genomics*, 90, 530-541
- Pecker I, Gabbay R, Cunningham FX, Jr. y Hirschberg J (1996). Cloning and characterization of the cDNA for lycopene beta-cyclase from tomato reveals decrease in its expression during fruit ripening. *Plant Molecular Biology*, 30, 807-819
- Peterson GL (1977). A simplification of the protein assay method of Lowry et al. which is more generally applicable. *Analytical Biochemistry*, 83, 346-356
- Pfluger J y Wagner D (2007). Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10, 645-652
- Pien S, Fleury D, Mylne JS, Crevillen P, Inze D, Avramova Z, Dean C y Grossniklaus U (2008). ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates FLOWERING LOCUS C activation via histone 3 lysine 4 trimethylation. *Plant Cell*, 20, 580-588
- Pien S y Grossniklaus U (2007). Polycomb group and trithorax group proteins in *Arabidopsis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1769, 375-382
- Piven NM, Barredo-Pool FA, Borges-Argáez IC, Herrera-Alamillo MA, Mayo-Mosqueda A, Herrera-Herrera JL y Robert ML (2001). Reproductive biology of henequen (*Agave fourcroydes*) and its wild ancestor *Agave angustifolia* (Agavaceae). I. Gametophyte development. *American Journal of Botany*, 88, 1966-1976
- Qin G, Gu H, Ma L, Peng Y, Deng XW, Chen Z y Qu LJ (2007). Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Res*, 17, 471-482
- Rea S, Eisenhaber F, O'Carroll D, Strahl BD, Sun ZW, Schmid M, Opravil S, Mechtler K, Ponting CP, Allis CD y Jenuwein T (2000). Regulation of chromatin structure by site-specific histone H3 methyltransferases. *Nature*, 406, 593-599
- Reinbothe S, Pollmann S y Reinbothe C (2003). *In situ* conversion of protochlorophyllide b to protochlorophyllide a in barley. Evidence for a novel role of 7-formyl reductase in the prolamellar body of etioplasts. *Journal of Biological Chemistry*, 278, 800-806

-
- Reiter RS, Coomber SA, Bourett TM, Bartley GE y Scolnik PA (1994). Control of leaf and chloroplast development by the *Arabidopsis* gene pale cress. *Plant Cell*, 6, 1253-1264
- Rice JC y Allis CD (2001). Histone methylation versus histone acetylation: new insights into epigenetic regulation. *Current Opinion in Cell Biology*, 13, 263-273
- Richards EJ y Elgin SC (2002). Epigenetic codes for heterochromatin formation and silencing: rounding up the usual suspects. *Cell*, 108, 489-500
- Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T, Jursic B, Ngo L, Civoli F, Breslow R, Rifkind RA y Marks PA (1996). Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 93, 5705-5708
- Riggs AD (1975). X inactivation, differentiation, and DNA methylation. *Cytogenetics and Cell Genetics*, 14, 9-25
- Rines HW, Riera-Lizarazu O, Nunez VM, Davis DW y Phillips RL (1997). Oat haploids from anther culture and from wide hybridizations, en: *In Vitro Haploid Production in Higher Plants: Volume 4 - Cereals*, SM Jain, SK Sopory, RE Veilleux, (eds). Springer Netherlands, Dordrecht, pp 205-221
- Robert ML, Herrera-Herrera JL, Castillo E, Ojeda G y Herrera-Alamillo MA (2006). An efficient method for the micropropagation of *Agave* species. *Methods in Molecular Biology*, 318, 165-178
- Rodermel S (2002). *Arabidopsis* variegation mutants, en: *The Arabidopsis Book Vol 1*. American Society of Plant Biologists, p e0079
- Rodermel SR, Abbott MS y Bogorad L (1988). Nuclear-organelle interactions: nuclear antisense gene inhibits ribulose biphosphate carboxylase enzyme levels in transformed tobacco plants. *Cell*, 55, 673-681
- Rodríguez-Ávila NL, Narváez-Zapata JA, Aguilar-Espinosa M y Rivera-Madrid R (2011). Regulation of pigment-related genes during flower and fruit development of *Bixa orellana*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 29, 43-50
- Rodríguez-Garay B, Lomelí-Sención JA, Tapia-Campos E, Gutiérrez-Mora A, García-Galindo J, Rodríguez-Domínguez JM, Urbina-López D y Vicente-Ramírez I (2009). Morphological and molecular diversity of *Agave tequilana* Weber var. Azul and *Agave angustifolia* Haw. var. Lineño. *Industrial Crops and Products*, 29, 220-228
- Rohmer M, Seemann M, Horbach S, Bringer-Meyer S y Sahn H (1996). Glyceraldehyde 3-phosphate and pyruvate as precursors of isoprenic units in an alternative non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis. *Journal of the American Chemical Society*, 118, 2564-2566
- Rossel JB, Wilson IW y Pogson BJ (2002). Global changes in gene expression in response to high light in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 130, 1109-1120
- Roth SY, Denu JM y Allis CD (2001). Histone acetyltransferases. *Annual Review of Biochemistry*, 70, 81-120
- Roudier F, Teixeira FK y Colot V (2009). Chromatin indexing in *Arabidopsis*: an epigenomic tale of tails and more. *Trends in Genetics*, 25, 511-517
- Rüdiger W y Grimm B (2006). Chlorophyll metabolism, an overview, en: *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls*, B Grimm, R Porra, W Rüdiger, H Scheer, (eds), Vol 25. Springer Netherlands, pp 133-146
- Sakakibara H (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57, 431-449
- Sakamoto W, Zaltsman A, Adam Z y Takahashi Y (2003). Coordinated regulation and complex formation of YELLOW VARIEGATED1 and YELLOW VARIEGATED2,
-

- chloroplastic FtsH metalloproteases involved in the repair cycle of photosystem II in *Arabidopsis* thylakoid membranes. *Plant Cell*, 15, 2843-2855
- Saleh A, Alvarez-Venegas R, Yilmaz M, Le O, Hou G, Sadler M, Al-Abdallat A, Xia Y, Lu G, Ladunga I y Avramova Z (2008). The highly similar *Arabidopsis* homologs of trithorax ATX1 and ATX2 encode proteins with divergent biochemical functions. *Plant Cell*, 20, 568-579
- Sánchez-Teyer F, Moreno-Salazar S, Esqueda M, Barraza A y Robert ML (2009). Genetic variability of wild *Agave angustifolia* populations based on AFLP: A basic study for conservation. *Journal of Arid Environments*, 73, 611-616
- Santi DV, Norment A y Garrett CE (1984). Covalent bond formation between a DNA-cytosine methyltransferase and DNA containing 5-azacytosine. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 81, 6993-6997
- Saze H, Scheid OM y Paszkowski J (2003). Maintenance of CpG methylation is essential for epigenetic inheritance during plant gametogenesis. *Nature Genetics*, 34, 65
- Saze H, Tsugane K, Kanno T y Nishimura T (2012). DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant and Cell Physiology*, 53, 766-784
- Schoch S, Rudiger W, Luthy B y Matile P (1984). 13(2)-hydroxychlorophyll a, the first product of the reaction of chlorophyll-oxidase. *Journal of Plant Physiology*, 115, 85-89
- Schubert D, Clarenz O y Goodrich J (2005). Epigenetic control of plant development by Polycomb-group proteins. *Current Opinion in Plant Biology*, 8, 553-561
- Schubert D, Primavesi L, Bishopp A, Roberts G, Doonan J, Jenuwein T y Goodrich J (2006). Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27. *European Molecular Biology Organization (EMBO) Journal*, 25, 4638-4649
- Selker EU (1998). Trichostatin A causes selective loss of DNA methylation in *Neurospora*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 95, 9430-9435
- Sequeira-Mendes J y Gutierrez C (2015). Links between genome replication and chromatin landscapes. *Plant Journal*, 83, 38-51
- Shahbazian MD y Grunstein M (2007). Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annual Review of Biochemistry*, 76, 75-100
- Shaker S, Bernstein M, Mompalmer LF y Mompalmer RL (2003). Preclinical evaluation of antineoplastic activity of inhibitors of DNA methylation (5-aza-2'-deoxycytidine) and histone deacetylation (trichostatin A, depsipeptide) in combination against myeloid leukemic cells. *Leukemia Research*, 27, 437-444
- Sharma RR, Patel VB y Krishna H (2006). Relationship between light, fruit and leaf mineral content with albinism incidence in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 109, 66-70
- Shen Y, Wei W y Zhou DX (2015). Histone acetylation enzymes coordinate metabolism and gene expression. *Trends in Plant Science*, 20, 614-621
- Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M, Colburn S y Ke DY (1999). Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant Journal*, 20, 401-412x
- Shimokawa K, Shimada S y Yaeo K (1978). Ethylene-enhanced chlorophyllase activity during degreening of *Citrus unshiu* Marc. *Scientia Horticulturae*, 8, 129-135
- Solís C, de Jiménez ES, Loyola-Vargas VM, Cárabez A y Lotina-Hennsen B (1989). The biogenesis of chloroplasts in tissue cultures of a C₃ and a C₄ Plant. *Plant and Cell Physiology*, 30, 609-616

-
- Somerville C, Youngs H, Taylor C, Davis SC y Long SP (2010). Feedstocks for lignocellulosic biofuels. *Science(Washington)*, 329, 790-792
- Spreitzer RJ y Salvucci ME (2002). Rubisco: structure, regulatory interactions, and possibilities for a better enzyme. *Annual Review of Plant Biology*, 53, 449-475
- Stelpflug SC, Eichten SR, Hermanson PJ, Springer NM y Kaeppler SM (2014). Consistent and heritable alterations of DNA methylation are induced by tissue culture in maize. *Genetics*, 198, 209-218
- Sterner DE y Berger SL (2000). Acetylation of histones and transcription-related factors. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64, 435-459
- Su Q, Frick G, Armstrong G y Apel K (2001). POR C of *Arabidopsis thaliana*: a third light- and NADPH-dependent protochlorophyllide oxidoreductase that is differentially regulated by light. *Plant Molecular Biology*, 47, 805-813
- Sun Z, Gantt E y Cunningham FX, Jr. (1996). Cloning and functional analysis of the beta-carotene hydroxylase of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 24349-24352
- Taiz L y Zeiger E (2010). *Plant Physiology*. Ed 5th. Sinauer Associates, pp 782
- Takechi K, Sodmergen, Murata M, Motoyoshi F y Sakamoto W (2000). The *YELLOW VARIATED (VAR2)* locus encodes a homologue of FtsH, an ATP-dependent protease in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 41, 1334-1346
- Tanaka M, Kikuchi A y Kamada H (2008). The *Arabidopsis* histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiology*, 146
- Tanaka R y Tanaka A (2007). Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 321-346
- Tanaka R y Tanaka A (2011). Chlorophyll cycle regulates the construction and destruction of the light-harvesting complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1807, 968-976
- Tariq M y Paszkowski J (2004). DNA and histone methylation in plants. *Trends in Genetics*, 20, 244-251
- Teerawanichpan P, Krittanai P, Chauvatcharin N y Narangajavana J (2009). Purification and characterization of rice DNA methyltransferase. *Plant Physiology and Biochemistry*, 47, 671-680
- Telfer A (2005). Too much light? how beta-carotene protects the photosystem II reaction centre. *Photochemical and Photobiological Sciences* 4, 950-956
- Thomas C y Jiménez VM (2006). Mode of action of plant hormones and plant growth regulators during induction of somatic embryogenesis: molecular aspects, en: *Somatic Embryogenesis*, A Mujib, J Šamaj, (eds). Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, pp 157-175
- Tian L y Chen ZJ (2001). Blocking histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 98, 200-205
- Tian L, Fong MP, Wang JJ, Wei NE, Jiang H, Doerge RW y Chen ZJ (2005). Reversible histone acetylation and deacetylation mediate genome-wide, promoter-dependent and locus-specific changes in gene expression during plant development. *Genetics*, 169, 337-345
- Tian L, Wang J, Fong MP, Chen M, Cao H, Gelvin SB y Chen ZJ (2003). Genetic control of developmental changes induced by disruption of *Arabidopsis histone deacetylase 1 (AtHD1)* expression. *Genetics*, 165, 399-409

- Tilney-Bassett R (1975). Genetics of variegated plants, en: Genetics and biogenesis of mitochondria and chloroplasts, J C. W. Birky, PS Perlman, TJ Byers, (eds). Ohio State University Press, Columbus, pp 268-308
- Torres-Morán MI, Escoto-Delgadillo M, Molina-Moret S, Rivera-Rodríguez DM, Velasco-Ramírez AP, 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 and Organ Culture*, 103, 403-409
- Tsuji H, Saika H, Tsutsumi N, Hirai A y Nakazono M (2006). Dynamic and reversible changes in histone H3-Lys4 methylation and H3 acetylation occurring at submergence-inducible genes in rice. *Plant and Cell Physiology*, 47, 995-1003
- Tsunewaki K (2004). Aneuploid analyses of three chlorophyll abnormalities in Emmer wheat. *Genes and Genetic Systems*, 79, 95-104
- Turck F, Roudier F, Farrona S, Martin-Magniette M-L, Guillaume E, Buisine N, Gagnot S, Martienssen RA, Coupland G y Colot V (2007). *Arabidopsis* TFL2/LHP1 specifically associates with genes marked by trimethylation of histone H3 lysine 27. *Public Library of Science (PLoS) Genetics*, 3, e86
- Van Zanten M, Zöll C, Wang Z, Philipp C, Carles A, Li Y, Kornet NG, Liu Y y Soppe WJJ (2014). HISTONE DEACETYLASE 9 represses seedling traits in *Arabidopsis thaliana* dry seeds. *Plant Journal*, 80, 475-488
- Vanlerberghe GC y McIntosh L (1997). ALTERNATIVE OXIDASE: from gene to function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48, 703-734
- Vanyushin BF y Ashapkin VV (2011). DNA methylation in higher plants: past, present and future. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, 1809, 360-368
- Vanyushin BF, Shorning BY, Seredina AV y Aleksandrushkina NI (2002). The effects of phytohormones and 5-Azacytidine on apoptosis in etiolated wheat seedlings. *Russian Journal of Plant Physiology*, 49, 501-506
- Vega KG, Chavira MG, de la Vega OM, Simpson J y Vandemark G (2001). Analysis of genetic diversity in *Agave tequilana* var. Azul using RAPD markers. *Euphytica*, 119, 335-341
- Venturelli S, Belz RG, Kamper A, Berger A, von Horn K, Wegner A, Bocker A, Zabulon G y Langenecker T (2015). Plants release precursors of histone deacetylase inhibitors to suppress growth of competitors. *Plant Cell*, 27, 3175-3189
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Pot J, Peleman J, Kuiper M y et al. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, 23, 4407-4414
- Walter MH y Strack D (2011). Carotenoids and their cleavage products: biosynthesis and functions. *Natural Product Reports*, 28, 663-692
- Wang M, Wang G, Ji J y Wang J (2009). The effect of *pds* gene silencing on chloroplast pigment composition, thylakoid membrane structure and photosynthesis efficiency in tobacco plants. *Plant Science*, 177, 222-226
- Wang QM, Wang L, Zhou Y, Cui J, Wang Y y Zhao C (2016). Leaf patterning of *Clivia miniata* var. variegata is associated with differential DNA methylation. *Plant Cell Reports*, 35, 167-184
- Wang Z, Cao H, Sun Y, Li X, Chen F, Carles A, Li Y, Ding M, Zhang C, Deng X, Soppe WJ y Liu YX (2013). *Arabidopsis* paired amphipathic helix proteins SNL1 and SNL2 redundantly regulate primary seed dormancy via abscisic acid-ethylene antagonism mediated by histone deacetylation. *Plant Cell*, 25, 149-166

-
- Welsch R, Beyer P, Hugueney P, Kleinig H y von Lintig J (2000). Regulation and activation of phytoene synthase, a key enzyme in carotenoid biosynthesis, during photomorphogenesis. *Planta*, 211, 846-854
- Welsch R, Wüst F, Bär C, Al-Babili S y Beyer P (2008). A third phytoene synthase is devoted to abiotic stress-induced abscisic acid formation in rice and defines functional diversification of phytoene synthase genes. *Plant Physiology*, 147, 367-380
- Werner T, Motyka V, Strnad M y Schmölling T (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 98, 10487-10492
- Wetzel CM, Jiang CZ, Meehan LJ, Voytas DF y Rodermel SR (1994). Nuclear-organelle interactions: the *immutans* variegation mutant of *Arabidopsis* is plastid autonomous and impaired in carotenoid biosynthesis. *Plant Journal*, 6, 161-175
- Willows RD (2003). Biosynthesis of chlorophylls from protoporphyrin IX. *Natural Product Reports*, 20, 327-341
- Wisman E, Hartmann U, Sagasser M, Baumann E, Palme K, Hahlbrock K, Saedler H y Weisshaar B (1998). Knock-out mutants from an *En-1* mutagenized *Arabidopsis thaliana* population generate phenylpropanoid biosynthesis phenotypes. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 95, 12432-12437
- Wojnarowicz G, Caredda S, Devaux P, Sangwan R y Clement C (2004). Barley anther culture: assessment of carbohydrate effects on embryo yield, green plant production and differential plastid development in relation with albinism. *Journal of Plant Physiology*, 161, 747-755
- Wolff JB y Price L (1960). The effect of sugars on chlorophyll biosynthesis in higher plants. *Journal of Biological Chemistry*, 235, 1603-1608
- Woo HR, Dittmer TA y Richards EJ (2008). Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis*. *Public Library of Science (PLoS) Genetics*, 4, e1000156
- Woodcock CL y Ghosh RP (2010). Chromatin higher-order structure and dynamics. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2, a000596
- Wu D, Wright DA, Wetzel C, Voytas DF y Rodermel S (1999). The *IMMUTANS* variegation locus of *Arabidopsis* defines a mitochondrial alternative oxidase homolog that functions during early chloroplast biogenesis. *Plant Cell*, 11, 43-55
- Wu K, Malik K, Tian L, Brown D y Miki B (2000). Functional analysis of a RPD3 histone deacetylase homologue in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 44, 167-176
- Xiong L y Zhu J-K (2003). Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*, 133, 29-36
- Xu C-R, Liu C, Wang Y-L, Li L-C, Chen W-Q, Xu Z-H y Bai S-N (2005). Histone acetylation affects expression of cellular patterning genes in the *Arabidopsis* root epidermis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 102, 14469-14474
- Xu L, Zhao Z, Dong A, Soubigou-Taconnat L, Renou JP, Steinmetz A y Shen WH (2008). Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*. *Molecular and Cellular Biology*, 28, 1348-1360
- Xu WS, Parmigiani RB y Marks PA (2007). Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26, 5541

- Yamagishi M, Otani M, Higashi M, Fukuta Y, Fukui K y Shimada T (1998). Chromosomal regions controlling anther culturability in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 103, 227-234
- Yamamoto HY, Nakayama TOM y Chichester CO (1962). Studies on the light and dark interconversions of leaf xanthophylls. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 97, 168-173
- Yamauchi N y Watada AE (1991). Regulated chlorophyll degradation in spinach leaves during storage. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116, 58-62
- Yamauchi T, Johzuka-Hisatomi Y, Terada R, Nakamura I y Iida S (2014). The *MET1b* gene encoding a maintenance DNA methyltransferase is indispensable for normal development in rice. *Plant Molecular Biology*, 85, 219-232
- Yamauchi T, Moritoh S, Johzuka-Hisatomi Y, Ono A, Terada R, Nakamura I y Iida S (2008). Alternative splicing of the rice *OsMET1* genes encoding maintenance DNA methyltransferase. *Journal of Plant Physiology*, 165, 1774-1782
- Yang DH, Paulsen H y Andersson B (2000). The N-terminal domain of the light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding protein complex (LHCII) is essential for its acclimative proteolysis. *Federation of European Biochemical Societies (FEBS) Letters*, 466, 385-388
- Yang W, Jiang D, Jiang J y He Y (2010). A plant-specific histone H3 lysine 4 demethylase represses the floral transition in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 62, 663-673
- Yang XJ y Seto E (2007). HATs and HDACs: from structure, function and regulation to novel strategies for therapy and prevention. *Oncogene*, 26, 5310-5318
- Yao JL y Cohen D (2000). Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of *Zantedeschia*. *Theoretical and Applied Genetics*, 101, 400-406
- Yoshida M, Kijima M, Akita M y Beppu T (1990). Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both *in vivo* and *in vitro* by trichostatin A. *Journal of Biological Chemistry*, 265, 17174-17179
- Youssef M, James A, Rivera-Madrid R, Ortiz R y Escobedo-GraciaMedrano R (2011). *Musa* genetic diversity revealed by SRAP and AFLP. *Molecular Biotechnology*, 47, 189-199
- Yu B, Lydiate DJ, Young LW, Schafer UA y Hannoufa A (2008). Enhancing the carotenoid content of *Brassica napus* seeds by downregulating lycopene epsilon cyclase. *Transgenic Research*, 17, 573-585
- Yu F, Fu A, Aluru M, Park S, Xu Y, Liu H, Liu X, Foudree A, Nambogga M y Rodermeil S (2007). Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant, Cell and Environment*, 30, 350-365
- Yu F, Park S y Rodermeil SR (2004). The *Arabidopsis* FtsH metalloprotease gene family: interchangeability of subunits in chloroplast oligomeric complexes. *Plant Journal*, 37, 864-876
- Yu Y, Bu Z, Shen W-H y Dong A (2009). An update on histone lysine methylation in plants. *Progress in Natural Science*, 19, 407-413
- Zamariola L, Tiang CL, De Storme N, Pawlowski W y Geelen D (2014). Chromosome segregation in plant meiosis. *Frontiers in Plant Science*, 5, 279
- Zapata AGV y Nabhan GP (2003). *Tequila: a natural and cultural history*. University of Arizona press, pp 133
- Zeevaart J y Creelman R (1988). Metabolism and physiology of abscisic acid. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 39, 439-473

- Zhang H, Wang B, Duan C-G y Zhu J-K (2013). Chemical probes in plant epigenetics studies. *Plant Signaling and Behavior*, 8, e25364
- Zhang K, Sridhar VV, Zhu J, Kapoor A y Zhu JK (2007a). Distinctive core histone post-translational modification patterns in *Arabidopsis thaliana*. *Public Library of Science (PLoS) ONE*, 2, e1210
- Zhang M, Kimatu JN, Xu K y Liu B (2010). DNA cytosine methylation in plant development. *Journal of Genetics and Genomics*, 37, 1-12
- Zhang X, Bernatavichute YV, Cokus S, Pellegrini M y Jacobsen SE (2009). Genome-wide analysis of mono-, di-and trimethylation of histone H3 lysine 4 in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Biology*, 10, R62
- Zhang X, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, Goodrich J y Jacobsen SE (2007b). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *Public Library of Science (PLoS) Biology*, 5, e129
- Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SWL, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE y Ecker Joseph R (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell*, 126, 1189-1201
- Zhao C, Xu J, Chen Y, Mao C, Zhang S, Bai Y, Jiang D y Wu P (2012). Molecular cloning and characterization of *OsCHR4*, a rice chromatin-remodeling factor required for early chloroplast development in adaxial mesophyll. *Planta*, 236, 1165-1176
- Zhao Z, Yu Y, Meyer D, Wu C y Shen WH (2005). Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3 K36. *Nature Cell Biology*, 7, 1256-1260
- Zubko MK y Day A (1998). Stable albinism induced without mutagenesis: a model for ribosome-free plastid inheritance. *Plant Journal*, 15, 265-271