



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**DIFERENCIAS FISIOLÓGICAS Y CAMBIOS EN LOS
PATRONES DE METILACIÓN DEL ADN DURANTE
LA MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS ALBINAS
DE *Agave angustifolia* Haw.**

Tesis que presenta

FÁTIMA PATRICIA DUARTE AKÉ

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2018

CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.

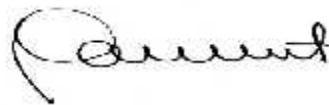
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente hago constar que el trabajo de tesis de FATIMA DUARTE AKE titulado DIFERENCIAS FISIOLÓGICAS Y CAMBIOS EN LOS PATRONES DE METILACIÓN DEL ADN DURANTE LA MICROPROPAGACIÓN DE PLANTAS ALBINAS DE *Agave angustifolia* Haw. fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. Clelia De la Peña Seaman, dentro de la opción Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente,



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 10 de abril de 2018.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en las secciones de Materiales y Métodos Experimentales y de 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 de Yucatán, 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.C. Fátima Patricia Duarte Aké

Este trabajo se llevó a cabo en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Papel de los reguladores del crecimiento en la modulación epigenética de la variación somaclonal de *Agave* spp.” (Proyecto No.178149, Ciencia Básica 2012) y el proyecto titulado “La participación de las auxinas en la metilación de novo en el ADN de *Agave angustifolia* Haw.: Una vía para la formación de somaclonas albinas” (Proyecto No. 285898, Ciencia Básica 2016), en los que participé bajo la dirección de la Dra. Clelia De la Peña Seaman.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca número 255368 que me fue otorgada para la realización del Doctorado en Ciencias Biológicas, por el financiamiento del proyecto número 178149 de la convocatoria de Ciencia Básica de 2012 y el proyecto número 285898 de la convocatoria de Ciencia Básica de 2016; así como la otorgación de la beca de movilidad número 390344.

Al Dr. Ulrich Grossniklaus y el Departamento de Biología de Plantas y Microbiología de la Universidad de Zúrich, Zúrich, Suiza, por su apoyo y guía en la realización de los experimentos durante la estancia de investigación.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), por las instalaciones proporcionadas para la realización de todos los experimentos que forman parte de esta tesis. Así como a la coordinación académica de la Unidad de Biotecnología y al departamento de Docencia por el apoyo recibido durante la estancia académica realizada.

En especial a mi asesora la Dra. Clelia De La Peña, por su apoyo y guía para mi formación académica y la realización de esta tesis.

Al Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas, por sus enseñanzas, guía y discusiones que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Manuel L. Robert Díaz, al Dr. Geovanny Nic Can y al Dr. Jorge Santamaría Fernández por sus aportaciones y discusiones.

Al Ing. Eduardo Castillo Castro, Lic. en Biol. Felipe Barredo e Ing. Francisco Espadas Gil, por su apoyo técnico en los experimentos realizados.

A mi comité de revisión de tesis integrado por el Dr. Raúl Álvarez Venegas, la Dra. Virginia Herrera Valencia, el Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dra. Renata Rivera Madrid, por sus revisiones y observaciones que fueron realizadas a la tesis.

A mis compañeras de laboratorio Sara Hernandez Castellano y Rosa Yazmín Us Camas, por su compañerismo, colaboración académica, apoyo y sugerencias realizadas para mejorar este estudio.

PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

Artículos originales de investigación publicados en extenso en revistas de prestigio internacional con arbitraje estricto:

Fátima Duarte-Aké, Eduardo Castillo-Castro, Felipe Barredo Pool, Francisco Espadas, Jorge M. Santamaría, Manuel L. Robert, Clelia De-la-Peña (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(12):2489-2502. ISSN: 07217714.

Resúmenes de participación en congresos nacionales e internacionales

Fátima Duarte Aké, Miloslawa Jaciubek, Clelia De-la-Peña, Ulrich Grossniklaus. Epigenetic variation in albino plants of *Agave angustifolia* Haw. Plants for health, from research to application, Escuela Politécnica Federal de Zúrich, ETH (Eidgenössische Technische Hochschule Zürich), Zúrich, Suiza, 1 de diciembre de 2016.

Artículos de revisión en libros publicados por una casa editorial reconocida o revistas de circulación internacional

Rosa Us-Camas, Gustavo Rivera-Solís, **Fátima Duarte-Aké**, Clelia De-la-Peña (2014). In vitro culture: an epigenetic challenge for plants, Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 118(2):187-201. ISSN: 01676857.

Gerardo Rivero-Campos, Pedro Osorio-Montalvo, Rosa Us-Camas, **Fátima Duarte-Aké**, Clelia De-La-Peña (2017). Plant hormone signaling in flowering: an epigenetic point of view, Journal of Plant Physiology, 214:16-27. ISSN: 01761617.

Capítulos de investigación original en extenso en libros especializados, publicados por una casa editorial reconocida

Fátima Duarte-Aké y Clelia De-la-Peña (2016). Epigenetic advances on somatic embryogenesis in sequenced genome crops. En: Somatic Embryogenesis: Fundamental Aspects and Applications, (Loyola-Vargas, V. y N. Ochoa-Alejo eds.). Springer, Cham. ISBN:9783319337050.

DEDICATORIAS

Para mi esposo Nicolás, mi hijo Benjamín y mis padres Fausto y Emilia.

ÍNDICE

LISTADO DE FIGURAS	VII
LISTADO DE CUADROS	VIII
ABREVIATURAS	IX
RESUMEN	X
ABSTRACT	XIII
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I	5
1.1 ANTECEDENTES	5
1.1.1 VARIACIÓN SOMACLONAL	5
1.1.2 ALBINISMO Y VARIEGACIÓN	7
1.1.3 PLÁSTIDOS	9
1.1.3.1 CLOROPLASTOS Y ALBINISMO	10
1.1.4 ALBINISMO EN SISTEMAS <i>IN VITRO</i>	11
1.1.5 FACTORES EXTERNOS QUE AFECTAN EL ALBINISMO	12
1.1.5.1 COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO	12
1.1.5.1.1 NUTRIENTES	12
1.1.5.1.2 AZÚCARES	13
1.1.5.1.3 REGULADORES DEL CRECIMIENTO	14
1.1.5.2 LUZ	15

1.1.6 EL GÉNERO AGAVE	16
1.1.6.1 CULTIVO TRADICIONAL E <i>IN VITRO</i> DE AGAVE.....	16
1.1.6.2 VARIACIONES FENOTÍPICAS EN EL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE AGAVE	17
1.2 HIPÓTESIS	19
1.3 OBJETIVO GENERAL.....	19
1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	19
1.5 JUSTIFICACIÓN.	20
1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	21
CAPÍTULO II	23
CARACTERIZACIÓN MORFOFISIOLÓGICA DE LAS VARIANTES SOMACLONALES ALBINAS MICROPROPAGADAS DE AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW.....	23
2.1 INTRODUCCIÓN.....	23
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.2.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	24
2.2.2 CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS	24
2.2.3 CUANTIFICACIÓN DE MALATO.....	25
2.2.4 DENSIDAD ESTOMÁTICA Y MORFOLOGÍA DEL COMPLEJO ESTOMÁTICO.....	25
2.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	26
2.3 RESULTADOS.....	26

2.3.1 DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE LAS VARIANTES G, V Y A.....	26
2.3.2 CONTENIDO DE CLOROFILA Y CAROTENOIDES.....	29
2.4 DISCUSIÓN	31
2.4.1 EL ALBINISMO AFECTA EL CONTENIDO DE PIGMENTOS Y LA FISIOLÓGÍA DE LA PLANTA.....	31
2.4.2 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LOS ESTOMAS DE LAS HOJAS DE LAS PLANTAS VERDES, VARIEGADAS Y ALBINAS	32
2.4.3 EFECTO EN EL METABOLISMO DE LAS PLÁNTULAS ALBINAS.....	34
2.5 CONCLUSIONES.....	34
CAPÍTULO III	36
CAMBIOS EN LOS NIVELES GLOBALES DE LA METILACIÓN EN EL ADN DE LAS VARIANTES SOMACLONALES VERDES, VARIEGADAS Y ALBINAS DE AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW. DURANTE SU MICROPROPAGACIÓN	36
3.1 INTRODUCCIÓN.....	36
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
3.2.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	37
3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	37
3.2.3 TASA DE MULTIPLICACIÓN	38
3.2.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS PATRONES GLOBALES DE METILACIÓN EN EL ADN.....	38
3.2.4.1 EXTRACCIÓN DEL ADN	38

3.2.4.2 DIGESTIÓN DEL ADN	39
3.2.4.3 ANÁLISIS DEL PORCENTAJE DE METILACIÓN POR HPLC.....	39
3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	40
3.3 RESULTADOS.....	40
3.3.1 MICROPROPAGACIÓN DE LOS TRES FENOTIPOS: G, V Y A	40
3.3.2 NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN DURANTE LA MICROPROPAGACIÓN DE LOS FENOTIPOS G, V Y A.....	42
3.4 DISCUSIÓN.	45
3.4.1 DIFERENCIAS FISIOLÓGICAS ENTRE LAS VARIANTES VERDES, VARIEGADAS Y ALBINAS.....	46
3.4.2 CAMBIOS EN LOS NIVELES GLOBALES DE METILACIÓN EN EL ADN Y LA VARIACIÓN FENOTÍPICA	47
3.5 CONCLUSIONES.....	49
CAPÍTULO IV.....	51
PARTICIPACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO Y LA CONCENTRACIÓN DE BENZILADENINA EN EL PORCENTAJE DE VARIACIÓN Y LOS NIVELES DE METILACIÓN EN EL ADN EN LOS FENOTIPOS VERDES, VARIEGADOS Y ALBINOS.	51
4.1 INTRODUCCIÓN.....	51
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	53
4.2.1 MATERIAL VEGETAL, CONDICIONES DE CULTIVO Y TRATAMIENTOS.....	53
4.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL	54

4.2.3 DETERMINACIÓN DE EL PORCENTAJE DE VARIACIÓN.....	54
4.2.4 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN.....	55
4.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO	55
4.3 RESULTADOS.....	56
4.3.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE RCM Y EL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE BA EN LA CAPACIDAD ORGANOGÉNICA DE LAS PLÁNTULAS G, V Y A.....	56
4.3.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS RCM Y EL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE BA EN LA VARIACIÓN DE LOS BROTES DE LAS PLÁNTULAS G, V Y A.....	58
4.3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE RCM Y EL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE BA EN LOS NIVELES GLOBALES DE METILACIÓN EN EL ADN EN LAS PLÁNTULAS G, V Y A.....	63
4.4 DISCUSIÓN	67
4.4.1 LA RCM AFECTA LA CAPACIDAD ORGANOGÉNICA Y LA COLORACIÓN DE LAS PLÁNTULAS.	68
4.4.2 LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE BA AFECTAN LA CAPACIDAD ORGANOGÉNICA DE LAS PLÁNTULAS G Y V, PERO NO DE LAS PLÁNTULAS A.....	70
4.4.3 LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE BA GENERAN REVERSIÓN EN EL FENOTIPO DE LOS BROTES DE LAS PLÁNTULAS V	71
4.4.4. LA MAYOR RCM GENERA CAMBIOS EN LOS NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL EN LAS PLÁNTULAS G Y V.....	73

4.4.5 LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE BA AFECTAN SEVERAMENTE LOS NIVELES DE METILACIÓN EN LAS PLÁNTULAS V Y A.....	74
4.5 CONCLUSIONES.....	74
CAPÍTULO V	77
CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS Y EPIGENÉTICAS EN PLANTAS G, V Y A EXPUESTAS A BAJA INTENSIDAD LUMÍNICA	77
5.1 INTRODUCCIÓN.....	77
5.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	79
5.2.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO	79
5.2.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA	79
5.2.3.1 ALTURA, PESO FRESCO, PESO SECO Y NÚMERO DE BROTES TOTALE.....	79
5.2.3.2 CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS.....	80
5.2.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES GLOBALES DE METILACIÓN EN EL ADN.....	80
5.3 RESULTADOS.....	81
5.3.1 EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE LUZ EN EL FENOTIPO DE G, V Y A.....	81
5.3.2 EFECTO DE LAS CONDICIONES DE INTENSIDAD LUMÍNICA EN LOS NIVELES DE METILACIÓN EN EL ADN DE LOS FENOTIPOS G, V Y A	87
5.4 DISCUSIÓN	88
5.5 CONCLUSIONES.....	91

CAPÍTULO VI	92
CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	92
6.1 CONCLUSIONES GENERALES.	92
6.2 PERSPECTIVAS.....	93
6.3 BIBLIOGRAFÍA.....	94

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1..	8
Figura 1.2.....	9
Figura 2.1.....	26
Figura 2.2.....	27
Figura 2.3..	28
Figura 2.4..	31
Figura 3.1..	42
Figura 3.2..	45
Figura 4.1..	57
Figura 4.2.	59
Figura 4.3..	61
Figura 4.4.	63
Figura 4.5..	66
Figura 5.1.....	82
Figura 5.2	84
Figura 5.3	87

LISTADO DE CUADROS

Cuadro 2.1.....	30
Cuadro 5.1.....	86

ABREVIATURAS

2, 4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
6-BA	6-Benziladenina
A	Fenotipo albino
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
CTV	Cultivo de tejidos vegetales
G	Fenotipo verde
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
ISSR	Repeticiones de inter-secuencia simple
MSAP	Amplificación de polimorfismos sensibles a la metilación
NMG	Niveles globales de metilación en el ADN
RAPD	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico
RC	Regulador del crecimiento
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
SSR	Repeticiones de secuencia simple
TDZ	Tidiazurón
V	Fenotipo variegado
VS	Variación somaclonal

RESUMEN

El albinismo es una variación que puede ocurrir de forma espontánea en las plantas. Esta variación es originada por un defecto en el desarrollo de los cloroplastos y se caracteriza por la falta de clorofila y otros pigmentos, como el fitoeno y el beta caroteno. El albinismo puede observarse en la naturaleza, sin embargo, también puede presentarse en el cultivo de tejidos vegetales (CTV). En el CTV, el albinismo es considerado una variación fenotípica, la cual no ha sido estudiada, por lo tanto se desconoce cómo y por qué ocurre. Hasta ahora se ha observado que esta variación ocurre con mayor frecuencia en el cultivo de anteras y microesporas. Sin embargo, también se ha observado en la micropropagación del bambú y el plátano.

Durante la micropropagación de *Agave angustifolia* Haw. en nuestro laboratorio, se observó la aparición de una variación somaclonal en las plántulas con ausencia de clorofila. Los tres fenotipos que se obtuvieron, de acuerdo a la pigmentación en sus hojas, fueron verde (G), variegado (V) y albino (A). Estudios genéticos en nuestro laboratorio comprobaron que los fenotipos V y A presentan una casi nula variabilidad genética con respecto al fenotipo G, por lo que se planteó la hipótesis de que esta variación podría ser de origen epigenética, y que además dependería en gran parte de las condiciones de cultivo de las plantas.

En diferentes estudios publicados en otras plantas se han asociado diferentes factores exógenos del CTV con la aparición de plantas albinas en sistemas *in vitro*. Por ejemplo, la composición del medio de cultivo, la concentración exógena de reguladores del crecimiento (RC) y las condiciones de luz. Además, existe evidencia de que estos factores pueden modificar la metilación del ADN, provocando variación fenotípica en plantas cultivadas *in vitro*. Por esta razón, en la presente tesis se plantearon dos objetivos principales. El primer objetivo fue caracterizar fenotípica y fisiológicamente las variantes somaclonales y conocer el papel de la metilación en el ADN en la aparición de las plantas albinas durante el proceso de micropropagación. El segundo objetivo fue estudiar el efecto de los factores exógenos del cultivo de tejidos en la metilación del ADN y la variación fenotípica de las plantas de agave micropropagadas *in vitro*. Por esta razón, se llevaron a cabo dos experimentos independientes. En el primero se llevó a cabo una

caracterización de los fenotipos G, V y A, así como un seguimiento de los cambios en los niveles de metilación global en el ADN, durante cinco resiembras. En el segundo experimento, se evaluó el efecto de la reducción de nutrientes en el medio de cultivo, la adición de diferentes concentraciones de citocininas, y la reducción en la intensidad lumínica, en los niveles de metilación global en el ADN y el porcentaje de variación en los tres fenotipos G, V y A durante cinco resiembras.

De acuerdo con los resultados morfofisiológicos obtenidos en el primer experimento, se observó un defecto en la morfología de los estomas en las plantas A, una posible compensación en la cantidad de pigmentos presentes en la zona verde con respecto de la zona albina en las plantas V, así como un incremento en la cantidad de malato producido en el fenotipo V. Por otro lado, el análisis epigenético reveló que el cambio en la metilación global del ADN en el fenotipo G puede ser lo que disparó la señal para la generación de las plantas V. Se determinó que el aumento en la metilación en el ADN en el fenotipo V de entre el 2 y el 4% correlaciona con la generación de los fenotipos G y A, respectivamente. En el fenotipo A no se determinaron cambios significativos en la metilación en el ADN y no generaron brotes con fenotipos G o V.

En relación con el segundo experimento planteado en la tesis, se obtuvieron los siguientes resultados, que un tiempo prolongado en condiciones de reducción de nutrientes genera una hipermetilación en el fenotipo G, que el uso de benziladenina (BA) en concentraciones elevadas provoca un aumento en la frecuencia de brotes de los genotipos A y G durante la propagación del fenotipo V, lo cual está asociado con un aumento en la metilación en el ADN. Por otra parte, en los tratamientos de baja intensidad lumínica, se observaron cambios en la coloración de las plantas A, así como una hipermetilación en las plantas que presentaban reverdecimiento en sus hojas.

Todos estos hallazgos refuerzan la hipótesis de que el albinismo, proveniente de una variación somaclonal, se pudo haber originado por los cambios en la metilación del ADN debido a las condiciones de cultivo.

ABSTRACT

Albinism is a variation which could spontaneously occur in plants. This variation is originated by a defect in chloroplast development, and is characterized for a lack of chlorophyll and other pigments, such as phytoene and beta carotene. Albinism could be observed in nature and during plant cell tissue culture (PCTC) as well. In PCTC, albinism is considered a phenotypic variation, which has not been completely studied, due to unknown how and why it occurs. So far, it has been observed that this variation frequently occurs in anther and microspore cultures. Also, albinism was observed in bamboo and banana micropropagation.

During *Agave angustifolia* Haw. micropropagation in our laboratory, a somaclonal variation in plants with a lack of chlorophyll was observed. According to the extent of pigmentation in their leaves, three phenotypes were observed: green (G), variegated (V) and albinos (A). The genetic studies in the laboratory found that phenotypes V and A had almost no genetic variability with respect to G phenotype, so it was hypothesized that this variation could be of epigenetic origin, and this variation depends largely on the plant culture conditions.

In different studies in other plants, different exogenous PCTC factors have been associated with the appearance of albino plants in *in vitro* systems. For example: the composition of the culture medium, the exogenous concentration of growth regulators and the light conditions. In addition, there is evidence that these factors can modify DNA methylation, causing phenotypic variation in *in vitro* cultured plants. For this reason, two objectives were presented in this thesis. The first was to phenotypically and physiologically characterize somaclonal variants and to know the role of methylation in DNA in the appearance of albino plants during the micropropagation process. The second one was to study the effect of exogenous PCTC factors on DNA methylation and phenotypic variation of micropropagated agave plants. Therefore, two independent experiments were carried out. In the first one, was made a characterization of the phenotypes G, V and A as well as a follow-up of the changes in the levels of global methylation in the DNA, during five subcultures. In the second experiment, the effect of the reduction of nutrients in the culture medium, the addition of different concentrations of cytokinins, and the reduction in light

intensity, in the levels of global methylation in the DNA and variation percentage were evaluated in three phenotypes G, V and A during five subcultures.

According to morphophysiological results obtained in the first experiment, a defect in the morphology of stomata was observed in plants A, a possible compensation in the amount of pigments present in the green zone (GV) with respect to the albino zone (AV) in V plantlets, as well as increase in the amount of malate produced in V phenotype. On the other hand, the epigenetic analysis revealed that a change in the global DNA methylation in the G phenotype may be who triggered the signal for the generation of V plants. Also, a relationship was found between an increase in methylation of phenotype V about 2 and 4% with the regeneration of phenotypes G and A, respectively. In phenotypes A, no significant changes were found in DNA methylation and these plants didn't regenerate G and V shoots.

Regarding to second experiment proposed in the thesis, the following results were observed: a prolonged conditions of nutrient reduction generated a hypermethylation in the G phenotypes, the use of cytokinin analog benzyladenine (BA) in high concentrations caused an increase in the frequency of A and G shoots during phenotype V propagation, which was associated with an increase in the DNA methylation. On the other hand, in treatments with low light intensity, changes were observed in the coloration of plants A, as well as hypermethylation in plants that showed greening in their leaves.

All these findings reinforce the hypothesis that albinism, could have been originated by the culture conditions, which affected the methylation in DNA and in turn the phenotype.

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales (CTV) es un conjunto de herramientas que nos permiten cultivar células, tejidos u órganos en condiciones asépticas y controladas para el mejoramiento de cultivos de interés (Loyola-Vargas *et al.*, 2008). Uno de los sistemas *in vitro* que utilizan el cultivo de tejidos, es la micropropagación. La micropropagación es un método utilizado para la generación de individuos clonales de forma masiva, eficiente y rápida. Sin embargo, también es utilizado como una estrategia para generar nueva variabilidad en la población vegetal ya existente y obtener clones con variaciones fenotípicas de interés agronómico (Jayasankar, 2005; Larkin y Scowcroft, 1981). Las variaciones fenotípicas que se presentan en el CTV, han sido denominadas en su conjunto como variación somaclonal (VS) (Larkin y Scowcroft, 1981). En cultivos perenes que son micropropagados, la VS ofrece una excelente oportunidad para obtener nuevas variantes. En estos casos es importante entender e identificar el mecanismo causal detrás de las variaciones, ya que así se pueden controlar de forma efectiva y selectiva, ya sea para inducirlas o evitarlas, según las características de interés para mejorar los cultivos (Miguel y Marum, 2011; Bairu *et al.*, 2010; Zhang y Ogas, 2009; Jayasankar, 2005).

Con el fin de entender cómo surge esta variación y cuáles son los agentes causales, en varios trabajos se han estudiado diferentes factores externos al cultivo de tejidos que están asociados a la VS. Por ejemplo, se ha observado que la exposición a los reguladores del crecimiento (RC) puede ser una de las causales de la VS (Ruffoni y Savona, 2013; Neelakandan y Wang, 2012; Morcillo *et al.*, 2006; Ahmed *et al.*, 2004; Mazari y Camm, 1993; LoSchiavo *et al.*, 1989), también el tiempo de cultivo (Ruffoni y Savona, 2013; Bairu *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2007; Kaeppler y Philips, 1993), así como el tipo y la calidad de la luz (Sharma *et al.*, 2006), entre otras.

Entre las variaciones fenotípicas que se presentan en plantas cultivadas *in vitro*, el albinismo, ha sido pobremente estudiado y sigue siendo un problema en la regeneración de individuos clonales (Liu *et al.*, 2012; Qin *et al.*, 2007; Zaffari *et al.*, 1998; Scolnik *et al.*, 1987). El albinismo, es un tipo de variación que afecta la síntesis de clorofila y otros pigmentos, así como el desarrollo de los cloroplastos. Hasta ahora se han propuesto diferentes causas probables de la aparición de este particular fenotipo, entre las que

destacan las causas genéticas y ambientales. Entre las causas genéticas se encuentran las mutaciones puntuales (Xing *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2007; Scolnik *et al.*, 1987) o eliminaciones nucleotídicas que pueden favorecer la aparición de este fenómeno. Entre las causas exógenas o ambientales, se han descrito factores tales como los nutrientes en el medio de cultivo (sacarosa, fuente nitrogenada y algunos microelementos) (Kumari *et al.*, 2009; Abadie *et al.*, 2006; von Wiren *et al.*, 1994; Nishiyama y Motoyoshi, 1966; Walles, 1963); los RC, tales como el tidiazurón (TDZ) (Redha y Suleman, 2011; Kumari *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2007; Chory *et al.*, 1991), la intensidad luminosa (Pinas Fernandez y Strand, 2008; Sharma *et al.*, 2006; Hu y Kasha, 1999) y el número de ciclos de cultivo (Liu *et al.*, 2015; Zaffari *et al.*, 1998). A pesar de ello, aún no se conoce cuál es el factor o factores que desencadenan este fenotipo en el cultivo *in vitro*, así como el mecanismo por el cual una planta normal genera clones albinos.

Es preciso mencionar que en general entre los factores que pueden causar variación somaclonal durante el CTV, el genotipo es probablemente el factor más estudiado (Bairu *et al.*, 2010; Skirvin *et al.*, 1994). Sin embargo, ahora se sabe que los cambios producidos a nivel epigenético por el proceso de regeneración *in vitro* pueden causar VS con una mayor frecuencia (Us-Camas *et al.*, 2014; Smulders y Klerk, 2011; Miguel y Marum, 2011; Jaligot *et al.*, 2011; Bairu *et al.*, 2010; 2000; Smulders *et al.*, 1995; Kaeppler y Phillips, 1993). Uno de los mecanismos epigenéticos que está asociado a la variación fenotípica entre las plantas, que son regeneradas en sistemas *in vitro*, es la metilación del ADN (Miguel y Marum 2011; Smulders y Klerk 2011; Xu *et al.* 2004; Joyce y Cassells 2002; Peraza-Echeverria *et al.* 2001; Jaligot *et al.* 2000; Kaeppler *et al.* 2000; Smulders *et al.* 1995; Kaeppler y Phillips 1993).

La metilación del ADN es un mecanismo epigenético, el cual consiste en la adición de un grupo metilo en la posición 5' del carbono perteneciente a las citosinas del ADN. Esta marca epigenética es de gran importancia ya que mantiene la estabilidad del genoma, regula la expresión génica y lleva a cabo el silenciamiento de transposones (Law y Jacobsen 2010). Recientemente, la metilación en el ADN se ha asociado a la variación en los patrones de pigmentación de individuos clonales de *Clivia miniata* propagadas *in vitro*. Además, se determinó que la generación de fenotipos verdes, variegados y amarillos esta asociada a un incremento en los niveles de metilación y que las diferencias epigenéticas,

a su vez, se encuentran relacionadas a la intensidad de la coloración de las hojas de las variantes (Wang *et al.* 2015). Por lo tanto, es muy probable que la metilación en el ADN tenga un papel importante en la aparición de fenotipos albinos en los sistemas *in vitro*.

En la micropropagación de *Agave angustifolia*, una de las especies más importantes de agave, después de *A. tequilana*, se ha obtenido un gran número de individuos vigorosos por más de 25 años (Robert *et al.*, 2006; 1992). Sin embargo, recientemente se han observado variantes fenotípicas a partir de plantas verdes (G), las cuales presentan albinismo de una forma completa y parcial, dando lugar a plantas albinas (A) y variegadas (V), respectivamente. Estas variantes crecen y se desarrollan adecuadamente bajo condiciones *in vitro*, y ocasionalmente, revierten su fenotipo, sugiriendo que los factores epigenéticos podrían estar involucrados en esta variación. Por esta razón, el albinismo observado en *A. angustifolia*, es un buen modelo para estudiar cuál es el papel de la metilación en el ADN durante la propagación de estas variantes, así como conocer cómo influyen los factores exógenos del CTV en la metilación del ADN de estas variantes somaclonales. Con el fin de lograr estos objetivos, en este estudio se caracterizaron los tres fenotipos (G, V y A) encontrados en la micropropagación del agave, se evaluaron los cambios en los patrones de metilación durante su micropropagación y se analizó el efecto de algunos factores exógenos del CTV que podrían estar asociados al albinismo y la metilación global del ADN.

CAPÍTULO I

1.1 ANTECEDENTES

1.1.1 VARIACIÓN SOMACLONAL

La VS es la variación fenotípica de los rasgos cuantitativos y cualitativos que ocurre entre las plantas regeneradas de cualquier tipo de cultivo de tejidos (Larkin y Scowcroft, 1981). Se considera que en algunos cultivos, la variación puede ser preexistente o inducida (Karp, 1995), ya que en diversos reportes se ha observado que la cantidad de variaciones depende del genotipo, el nivel de ploidía, la naturaleza del explante, el número de subcultivos, la edad de las plantas, el pre-acondicionamiento del tejido (Veilleux y Johnson, 1998) el uso de agentes mutagénicos, el estrés durante el cultivo *in vitro* (Skirvin *et al.*, 1994), así como a los componentes del medio de cultivo (Martin *et al.*, 2006; Vidal y De García, 2000; Pierik, 1991).

Por esta razón, se considera que la VS puede ser el resultado de los diferentes cambios genéticos y epigenéticos que se dan entre las plantas generadas por propagación clonal y la planta que les dio origen (Kaeppeler *et al.*, 2000; 1993; Larkin y Scowcroft, 1981). La VS de origen genético, tiene dos causas principales: anomalías citogenéticas (nivel de ploidía y rearrreglos cromosómicos) y cambios en secuencias específicas, los cuales son frecuentemente encontrados en las plantas regeneradas y en su progenie (Kaeppeler *et al.*, 2000). Hasta ahora se propone que la replicación de la heterocromatina que ocurre tardíamente en el cultivo de tejidos permite los eventos de rompimiento cromosómico (Johnson *et al.*, 1987) y también los rearrreglos cromosómicos (incluyendo translocaciones, eliminaciones, inserciones, inversiones y duplicaciones). Los cambios en secuencias específicas se han analizado por diferentes métodos: RFLP (polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico), AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados), ISSR (repeticiones de inter-secuencia simple) y SSR (repeticiones de secuencia simple) (Gao *et al.*, 2010; Puente *et al.*, 2008; Devarumath *et al.*, 2002; Polanco y Ruiz, 2002; Al-Zahim *et al.*, 1999).

Por otro lado, la variación epigenética en el cultivo *in vitro* es más frecuente que la VS genética (Miguel y Marum, 2011) aunque se ha reportado que existe una correlación significativa entre los cambios de metilación en el ADN y las variaciones genéticas (Guo *et*

al., 2007). Es probable que el factor principal de la VS sea la alteración en la metilación en el ADN, ya que puede resultar en diferentes variaciones fenotípicas y en algunos casos genéticas, incluyendo una sola mutación puntual, fragmentación cromosómica, inserciones, eliminaciones y la poliploidía (Gao *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2007; Kaeppler *et al.*, 2000).

La metilación en el ADN es uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados (Piccolo y Fisher, 2013; Smith y Meissner, 2013; Ford 2012), que se ha relacionado con la regulación génica y la VS (Miguel y Marum, 2011), el silenciamiento génico en plantas transgénicas, la regulación transposónica y como un mecanismo de respuesta a infecciones por agentes virales (Fu *et al.* 2013; Pooggin 2013; Giménez *et al.* 2006;). La metilación se puede dar en diferentes secuencias de reconocimiento como son CG, CHG o CHH, donde H puede ser cualquier nucleótido excepto guanina. En el análisis del metiloma de *Arabidopsis thaliana* se encontró que la metilación en el contexto CG representa cerca de 22-24%, el contexto CHG se da en menor medida ya que se presenta solo del 7 al 8% a lo largo del genoma y por último el contexto CHH solo representa el 2% (Cokus *et al.* 2008; Lister *et al.* 2008).

Entre los métodos que se utilizan para evaluar los cambios epigenéticos que se presentan en el ADN, específicamente los eventos de metilación, están la cuantificación a nivel global del ADN mediante HPLC (cromatografía líquida de alta resolución), la identificación de eventos de metilación por medio de MSAP (amplificación de secuencias polimórficas sensibles a la metilación) y la cuantificación de la metilación según el contexto, es decir la metilación en el ADN que se presenta en las secuencias CG, CHG y CHH mediante la secuenciación de bisulfito, entre otros métodos.

Entre los tipos de VS de origen genético y epigenético más estudiados en el cultivo *in vitro* se encuentran las deformaciones en los embriones de las suspensiones celulares de zanahoria (LoSchiavo *et al.*, 1989), el fruto envuelto de la palma aceitera (Jaligot *et al.*, 2011; 2000), y cambios en la pigmentación y en la forma de las flores en las orquídeas (Park *et al.*, 2009). Un ejemplo de VS epigenética provocada por los RC tipo auxina utilizados en el medio de cultivo es la variación presente en la propagación *in vitro* de la palma aceitera *Elaeis guineensis* Jacq. Esta variación, conocida como fruto envuelto, se caracteriza por la presencia de deformidades en el desarrollo del mismo y se presenta en

aproximadamente el 5% de las palmas regeneradas (Jaligot *et al.*, 2011; Gao *et al.*, 2010; Guo *et al.*, 2007; Jaligot *et al.*, 2004; 2002; 2000). Este fenotipo da como resultado malformaciones en las flores, los frutos y una reducción en el rendimiento del aceite. Se propone que el causante de esta variación es el uso de la auxina ácido 2,4-dicloro acético (2,4-D), la cual provoca una hipometilación a nivel global, esto desencadena la liberación de elementos móviles que se insertan en genes importantes que dan la morfología y que intervienen en la formación de los órganos florales y el fruto. Existe otro tipo de VS que se da en las plantas regeneradas *in vitro* que afectan de forma significativa la pigmentación y el desarrollo de los plástidos conocida como albinismo, el cuál será abordado en los párrafos siguientes.

1.1.2 ALBINISMO Y VARIEGACIÓN

El albinismo en las plantas es un tipo de VS que se caracteriza por la pérdida de clorofila en tejidos que normalmente son de color verde (Figura 1.1). La clorofila es requerida para la captura de la energía solar que la planta usará para llevar a cabo la fotólisis del agua, de tal forma que la pérdida de este pigmento puede provocar la muerte prematura de la planta. Sin fotosíntesis, las plantas no pueden crecer autotróficamente y rápidamente pierden sus reservas de alimento necesarias para su crecimiento y reproducción. Es por esta razón que las plantas que presentan mutaciones y son albinas son mantenidas en medios de cultivo para evitar su muerte prematura en campo (Xing *et al.*, 2010; Kumari *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Sakamoto, 2003)

La variegación, a diferencia del albinismo, es una pérdida parcial de la clorofila de las hojas (Figura 1.2). Las plantas variegadas se caracterizan porque poseen secciones verdes y blancas (o amarillas) en la misma hoja. Esta variación es una característica genética recesiva, y a diferencia de las plantas albinas, éstas pueden sobrevivir en el campo. La variegación en las plantas monocotiledóneas, como trigo y arroz, es también conocida como *striping* y se ha estudiado el mecanismo molecular resultante en la variegación en las hojas. Por ejemplo, la clonación de los genes responsables de la variegación en las plantas mutantes: *immutants*, *chloroplast mutator* y *yellow variegated 1*, por medio de inserción de transposones y otros medios en diferentes especies, ha indicado que la variegación ocurre a través de rutas metabólicas tales como la biosíntesis de pigmentos, la transcripción de algunos genes que codifican para enzimas

mitocondriales o que están involucradas en la biogénesis del cloroplasto (Xing *et al.*, 2010; Myouga *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Sakamoto, 2003; 2002).

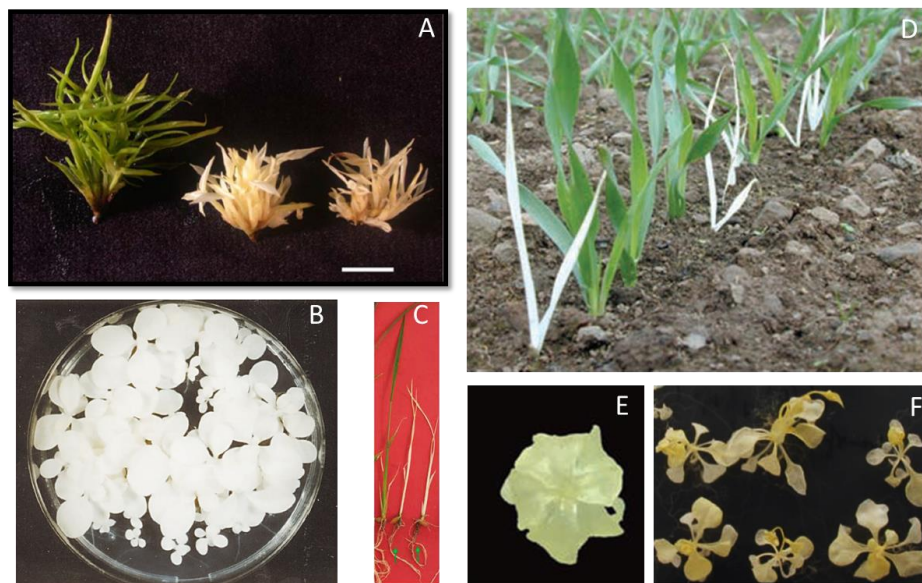


Figura 1.1 Fenotipos con albinismo. (A) Albinismo que se da en bambú durante el cultivo *in vitro* (Liu *et al.*, 2007). (B y C) Se muestran plantas albinas de tabaco (Bae *et al.*, 2001) y de arroz (Jung *et al.*, 2008) con fenotipos albinos y enanos, respectivamente. (D) trigo en el campo con algunos ejemplares albinos. (E y F) fenotipos de las mutantes de *A. thaliana* en genes importantes en la ruta de biosíntesis de los carotenoides (*dxr*) (Xing *et al.*, 2010) y en el desarrollo de los cloroplastos (*gun-4*) (Larkin *et al.*, 2003), respectivamente.

Se conoce que la variegación es causada por un defecto que provoca inestabilidad en el desarrollo del cloroplasto. El tejido verde de una planta variegada contiene cloroplastos normales a diferencia del tejido albino el cual no posee cloroplastos desarrollados y contiene plástidos anormales (Sakamoto, 2003; 2002; Scolnik *et al.*, 1987; Shumway y Weier, 1967).

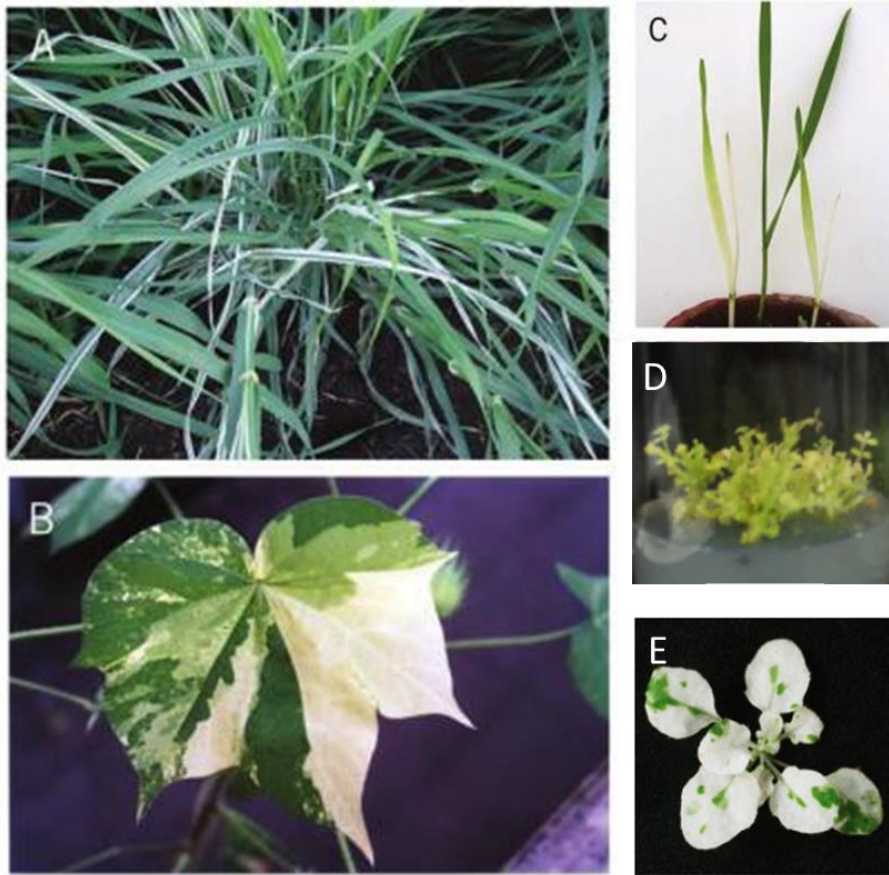


Figura 1.2 Ejemplos de variegación en diferentes especies. (A) Planta de cebada con variegación en las hojas. (B) hoja de algodón que presenta regiones albinas y decoloradas por toda el área foliar. (C) plantas de trigo que presentan un color amarillento en las hojas (Prina *et al.*, 2012). (D) híbrido de garbanzo con carencia de clorofila en toda la planta (Clarke *et al.*, 2011). (E) mutante *imm* de *A. thaliana* con variegación predominante albina (Yu *et al.*, 2007).

1.1.3 PLÁSTIDOS

Los proplástidos son los precursores de todos los plástidos, incluyendo a los amiloplastos, cromoplastos y cloroplastos. Los plástidos son organelos característicos de las algas fotosintéticas y las plantas (Keeling, 2010; Whatley, 1978). En las plantas existen varios tipos de plástidos y se diversifican de acuerdo a su estructura, función y localización. Los amiloplastos, los cuales se encuentran en las semillas, raíces y tubérculos, tienen un papel muy importante en el almacenaje de energía y en el gravitropismo. Por otro lado, en

los cromoplastos se acumulan pigmentos y carotenoides en las flores y los frutos atractivos para los insectos. Los cloroplastos, localizados en todas las plantas y algas verdes, son los plástidos mejor caracterizados y son los responsables de la fotosíntesis, la síntesis de algunos reguladores del crecimiento, aminoácidos, lípidos y otros compuestos (Keeling, 2010; Waters y Langdale, 2009; Eberhard *et al.*, 2008; López-Juez y Pyke, 2005). Los cloroplastos se desarrollan de proplástidos en las células meristemáticas en condiciones de luz o de etioplastos formados en la obscuridad. Durante la senescencia, los cloroplastos son transformados en gerontoplastos los cuales se caracterizan por tener pigmentos amarillos, es la etapa final de los cloroplastos.

1.1.4 CLOROPLASTOS Y ALBINISMO

En plantas que presentan albinismo, los proplástidos no se desarrollan adecuadamente en cloroplastos, esto trae consigo un pobre desarrollo de las membranas tilacoidales, donde yace el sitio que contiene la clorofila de los fotosistemas (Xing *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2007). En la mayoría de los reportes en los que se ha reportado albinismo, se han hecho estudios más profundos acerca de la morfología de los cloroplastos (Kumari *et al.*, 2009; Sakamoto, 2003; Sakamoto *et al.*, 2002) y se ha observado que las plántulas que presentan albinismo se caracterizan por tener cloroplastos que carecen de galactolípidos y presentan membranas fotosintéticas dañadas y rotas, causando una interrupción en la actividad fotosintética y en el crecimiento de las plantas (Kobayashi *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Yu *et al.*, 2007; Rédei y Plurad, 1973). Un estudio en *Arabidopsis* ha revelado que la síntesis de galactolípidos en la envoltura interior del cloroplasto es esencial para la biogénesis de los tilacoides (Kobayashi *et al.*, 2007).

Por lo tanto, los cloroplastos son plástidos primordiales para llevar a cabo la fotosíntesis y biosíntesis de carotenoides y otros precursores importantes para el metabolismo y la fisiología de la planta. Se sabe que estos organelos son sumamente susceptibles a presentar diferentes afecciones debido a ciertos tipos de estrés, tanto por factores bióticos como abióticos (Crosatti *et al.*, 2013; Biswal *et al.*, 2013).

Además de los daños en el desarrollo de los cloroplastos, el contenido de clorofilas y carotenoides es diferente en los tejidos de plantas verdes y albinas, por ejemplo, se ha observado que en la orquídea *Cephalanthera longifolia* el contenido de clorofila es menor

en las plantas albinas en comparación con las de fenotipo verde (Abadie *et al.*, 2006) . Por otro lado, Yao y Cohen (2000) determinaron que el contenido de pigmentos de violaxantina, luteína, clorofilas *a* y *b*, y de β -caroteno, en las progenies con albinismo de *Zantendeschia* eran menores en 1-6% en comparación con los fenotipos verdes. En híbridos de garbanzo se ha observado que el contenido de clorofilas *a* y *b*, y de carotenoides totales es de tres a cuatro veces más bajo en los fenotipos albinos comparados con el fenotipo verde (Mallikarjuna, 1999; Badami *et al.*, 1997).

El cultivo *in vitro* es un ambiente estresante para las plantas, que puede causar diferentes afecciones durante la biogénesis de los plástidos. Se sabe que los plástidos son organelos muy sensibles a los factores ambientales y responden de forma rápida a diferentes tipos de estrés (Crosatti *et al.*, 2013; Biswal *et al.*, 2013; Waters y Langdale, 2009). Entre los factores externos que pueden desencadenar el albinismo están la luz, los nutrientes (sobre todo la fuente nitrogenada y la sacarosa) y los RC. Estos afectan de forma significativa la correcta formación de los plástidos en los brotes de las plantas que estuvieron en contacto con los diferentes factores ambientales y nutricionales durante el cultivo *in vitro*.

1.1.5 ALBINISMO EN SISTEMAS *IN VITRO*

Aunque el albinismo puede ocurrir como resultado de una mutación natural, esta condición es también encontrada cuando se crean nuevos híbridos o mediante el uso del CTV (Kumari *et al.*, 2009; Datta, 2005; Yao y Cohen, 2000; 1995; Dunford y Walden, 1991; Tuveesson *et al.*, 1989). Las plántulas albinas son frecuentemente obtenidas de cruza y son comúnmente derivadas del cultivo de anteras y microesporas (Datta, 2005) obstaculizando la producción de haploides a nivel comercial. El albinismo ha sido reportado en el cultivo de anteras en cebada (Dunford y Walden, 1991), trigo (Tuveesson *et al.*, 1989), garbanzo (Mallikarjuna, 1999; Badami *et al.*, 1997), *Arabidopsis* (Xing *et al.*, 2010; Qin *et al.*, 2007; Larkin *et al.*, 2003; Chory *et al.*, 1991), tabaco (Stetler y Laetsch, 1965) y jitomate (Scolnik *et al.*, 1987). Sin embargo, el albinismo también se ha observado en sistemas *in vitro* sometidos a diferentes factores externos como son los continuos ciclos de resiembra y la adición de análogos de citocininas, como ocurre en bambú (Liu *et al.*, 2007) y plátano (Zaffari *et al.*, 1998), respectivamente.

1.1.6 FACTORES EXTERNOS QUE AFECTAN EL ALBINISMO

Dado que en el cultivo *in vitro* la variación genética es baja, los factores externos a los que están expuestas las plantas son al parecer una posible fuente de variación, dando lugar al albinismo. Entre los factores más comunes se encuentran la luz y los componentes del medio de cultivo. Entre los componentes del medio de cultivo que pueden tener un efecto en el fenotipo de las plantas micropropagadas son los azúcares, los macro y micro nutrientes, así como los RC, siendo estos últimos, los más reportados como fuente de variación (Us-Camas *et al.*, 2014; Miguel y Marum, 2011).

1.1.6.1 COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO

Los componentes del medio de cultivo juegan un papel muy importante en la regeneración de plantas albinas en el cultivo de tejidos vegetales y también afectan la formación de clorofila en las hojas. La proporción de clorofilas *a/b* varía bajo diferentes condiciones de cultivo, tanto en plantas albinas como en plantas verdes (Nishiyama y Motoyoshi, 1966). Aunque es difícil identificar los efectos individuales de los diferentes componentes del medio, frecuentemente estos son aplicados en combinación. Algunos componentes importantes para la generación de plantas albinas se enlistan a continuación.

1.1.6.1.1 NUTRIENTES

En diferentes plantas mutantes se ha observado que el fenotipo albino está asociado con cierta incapacidad para tomar ciertos nutrientes del medio o bien para metabolizarlos como es el caso de algunas vitaminas y minerales. Por ejemplo, en mutantes de maíz, llamadas en inglés *yellow stripe* (*ys1*), se ha observado que éstas tienen una deficiencia en la absorción de hierro. Sin embargo, cuando estas mutantes son cultivadas en medios ricos en hierro, sus hojas presentan pigmentación verde (von Wiren *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1962). Así también, se han hecho experimentos con jitomate, en los que al injertarlos en ejemplares normales, la condición albina puede revertirse, así como con el suplemento con extractos de plantas normales (Wallis, 1963; Böhme y Scholz, 1960). Esto sugiere que existe una movilización de moléculas entre la zona albina y la verde que favorece la maduración de los cloroplastos en la zona albina.

Por otro lado, en una mutante albina de cebada (*albina-7*) se ha observado que al adicionarle al medio de cultivo ácido aspártico o nor-leucina hay un aumento en la

pigmentación verde de las hojas. Esta carencia de nutrientes también se ve reflejada en la biosíntesis del cloroplasto, ya que las plantas que fueron tratadas con ácido aspártico presentan una mejor formación de este organelo, así como un aumento en la formación de pigmentos de clorofila (Walles, 1963).

1.1.6.1.2 AZÚCARES

La sacarosa es una fuente de carbono esencial en cualquier medio de cultivo. La cantidad de azúcares presente en el medio afecta tanto la cantidad de carbono disponible para las células vegetales como la presión osmótica presente en el medio de cultivo (George, 1993; Pierik, 1987). Por lo general, las plantas que son cultivadas *in vitro* no son capaces de ser autótrofas por completo, debido a las condiciones de baja intensidad lumínica propias del cultivo *in vitro*, lo cual incrementa los requerimientos de azúcares para asegurar su supervivencia. Por ello, en comparación con las plantas que tienen un fenotipo normal, las plantas con fenotipos albinos, por ejemplo el maíz (Spoehr, 1942), requieren de altas concentraciones de azúcares.

Hasta ahora el albinismo se ha considerado como un problema en diferentes cultivos generados *in vitro*, por lo tanto se ha tratado de erradicar modificando la fuente de carbono. Saidi *et al.*, (1997) encontraron que en el cultivo de anteras, albinos parciales de *Triticum turgidum* ssp. Durum siempre regresaban a la coloración verde cuando se cambiaba la concentración de azúcares en el medio de cultivo. Otro grupo de investigación determinó que hay una relación positiva entre la concentración de manitol y la regeneración de plantas verdes en el cultivo de anteras de cebada (Cistué *et al.*, 1994). También se ha probado, con éxito, un medio modificado con almidón y melibiosa para la disminución de fenotipos albinos durante el cultivo *in vitro* de cebada (Sovari y Schieder, 1987).

En este sentido, se ha estudiado el efecto de varios carbohidratos en la fisiología de los plástidos derivados del cultivo de anteras en cebada en relación con el fenotipo albino. Al suplementar el medio de cultivo con manitol, se obtuvieron plantas con un fenotipo verde (Wojnarowicz *et al.*, 2004). Otros componentes que se han adicionado para promover la formación de clorofila son glucosa, ácido indolacético, quinetina y caseína hidrolizada, siendo la glucosa el componente que mejor ha funcionado hasta ahora (Nishiyama y

Motoyoshi, 1966).

1.1.6.1.3 REGULADORES DEL CRECIMIENTO

Los RC, particularmente las auxinas y las citocininas, en un determinado balance tienen un efecto crucial en la división celular, el desarrollo y el metabolismo de las plantas (Kaufmann *et al.*, 2012; Su *et al.*, 2011; Zhao, 2010; Vanneste y Friml, 2009; Pernisová *et al.*, 2009; Veit, 2009; Ruzycka *et al.*, 2009; Lindsay *et al.*, 2006; Gaspar *et al.*, 1996).

Los RC juegan un papel crítico durante la formación de nuevos órganos durante la micropropagación de plantas. Así, también se les considera como la fuente de variación fenotípica en el cultivo *in vitro*. En bambú y plátano se ha sugerido que estos compuestos, sobre todo las citocininas, son los responsables de las variaciones encontradas en la pigmentación de las hojas. En bambú, se ha observado albinismo, cuya aparición ha sido atribuida al uso de la citocinina TDZ y a los largos ciclos de cultivo a los que son expuestas las plantas (Liu *et al.*, 2007; Piekik, 1987). Por otro lado, un análisis de las hojas que presentan variegación en plátano ha revelado que el contenido de citocininas es mucho mayor en la región verde que la región amarilla de las hojas (Zaffari *et al.*, 1998). Por lo contrario, en las regiones amarillas hay un contenido de citocininas que equivale a la mitad de lo encontrado en las plantas totalmente verdes.

Se sabe que las citocininas se producen en las raíces y son transportadas a las hojas influenciando la síntesis de clorofilas y el mantenimiento del aparato fotosintético (Longo *et al.*, 1979). Así también, la kinetina, un análogo de citocinina, el cual se adiciona exógenamente durante el cultivo *in vitro*, tiene un papel importante en la formación de los grana en los proplástidos en las suspensiones celulares de tabaco (Stetler y Laetsch, 1965). El mínimo contenido en los niveles endógenos de citocininas en las plantas variegadas podría estar asociado a diferentes alteraciones en el metabolismo de este RC.

Por otro lado, en plantas albinas de *A. thaliana*, se ha encontrado que la adición de citocininas al medio de cultivo pueden promover la conversión de etioplastos a cloroplastos (Larkin *et al.*, 2003; Chory *et al.*, 1991). En híbridos de *C. arietinum* y *C. pinnaatifidum*, obtenidos durante la propagación *in vitro*, se produjeron plantas albinas que dieron lugar a brotes albinos en los subcultivos posteriores (Badami *et al.*, 1997). Sin embargo, el cultivo continuo en altas concentraciones de zeatina permitió que las

plántulas albinas se tornaran verdes, aunque de manera parcial (Mallikarjuna, 1999; Badami *et al.*, 1997). También se ha observado que el cultivo de anteras y ovarios de trigo bajo concentraciones de 1 mg L^{-1} de AIA y 1 mg L^{-1} de BA, propicia la producción de plántulas verdes en mayor proporción que las albinas (Broughton, 2008). En otro estudio, utilizando el análogo de auxina 2,4-D (1.5 mg L^{-1}), una de los análogos de auxina, más utilizados en el cultivo *in vitro* y relacionado con diferentes tipos de VS, en combinación con kinetina (0.5 mg L^{-1}) o con ácido fenilacético (AFA; 10 mg L^{-1}), no tuvieron un efecto significativo en la frecuencia de plantas regeneradas de fenotipo verde, en comparación con las de fenotipo albino (Pauk *et al.*, 2000); es decir, el fenotipo albino siguió apareciendo sin importar las modificaciones en los RC utilizados en el medio de cultivo. Contrariamente, en cebada se determinó que la adición de 1 mg L^{-1} de 2,4-D y de BA a una concentración de 0.4 mg L^{-1} al medio de cultivo aumenta la regeneración de plantas verdes en comparación con plantas albinas (Nuutila *et al.*, 2000). Estos resultados sugieren que los RC juegan un importante papel en el albinismo, ya sea para promoverlo o evitarlo, según la especie y el sistema *in vitro* utilizado; sin embargo, el modo de acción aun no se ha elucidado.

1.1.6.2 LUZ

La luz es uno de los factores que afectan la organización del desarrollo *in vitro* de las plantas. Los requerimientos de luz para la diferenciación celular involucran una combinación de varios componentes, incluyendo la intensidad, el periodo de luz y la calidad de la misma. La energía lumínica requerida es diferente para los tejidos que son cultivados *in vitro* al de las plantas que se desarrollan fotoautotróficamente. La luz es requerida para llevar a cabo ciertos eventos fotomorfogénicos (Murashige, 1974). Hay reportes en los cuales se demuestra que la luz juega un papel muy importante en los sistemas *in vitro*. Por ejemplo, para la regeneración de callos es necesaria la ausencia de la luz, sin embargo, para lograr la respuesta organogénica o embriogénica, se requiere de una baja intensidad lumínica ($90 \text{ nE cm}^{-2} \text{ seg}^{-1}$). En los cultivos de coníferas, generalmente, se requiere la luz para la morfogénesis; además, se ha observado que se requiere la interacción entre la luz y las citoquininas en la formación de yemas en *Pinnus radiata* (Villabos *et al.*, 1984). El tipo de luz también es importante, ya que se ha observado que la luz azul puede tener un efecto a través de uno de los receptores de fitocromo (Hughes, 1981).

Por otro lado, el régimen de luz puede influir en la formación de las hojas y su morfología, también puede afectar la respuesta fotosintética y variar el contenido de clorofila, en este sentido, la ocurrencia de la etiolación es un ejemplo de la plasticidad fenotípica en respuesta a una variación externa, como es la intensidad lumínica (Joyce *et al.*, 2003)

En general, la intensidad de luz es sumamente importante durante la regeneración de plantas *in vitro*. De igual forma, el desarrollo del cloroplasto es un proceso en el cuál la luz es un factor clave y necesario. La luz regula la actividad y la composición de las membranas tilacoidales (Anderson, 1986). Por otro lado, también se ha observado que el cambio de las condiciones lumínicas puede disminuir la aparición de fenotipos albinos, durante el cultivo de tejidos. Por ejemplo, en el cultivo de *Phleum pratense*, una importante especie cultivada para ser utilizada como forraje, se ha observado que durante la embriogénesis somática, la frecuencia de plantas albinas puede disminuir si las condiciones de luz son de baja intensidad ($5.46 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) (Guo *et al.*, 1999).

1.1.7 EL GÉNERO AGAVE

Los agaves son plantas monocotiledóneas con un metabolismo fotosintético del tipo CAM. Los agaves han sido utilizados con diferentes fines ya sea como alimento, bebida, fibras u ornamentos, por lo que han contribuido a la economía y sustentabilidad de las culturas de Mesoamérica. México es considerado el centro de origen y/o biodiversidad de 117 de las 155 especies de la familia *Agavaceae*, es decir el 75% de las especies que pertenecen al género *Agave* (García-Mendoza, 1995). En México, las especies del género *Agave* se distribuyen en todos los estados de la República con excepción de Tabasco. Las regiones de mayor riqueza de especies son el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, la Sierra Madre Occidental, la zona árida entre Tamaulipas y San Luis Potosí, la zona árida Hidalguense, el eje Neovolcánico en los límites de Michoacán y el Estado de México, el centro de Jalisco, las montañas de Oaxaca y Chiapas, y los límites de la Altiplanicie y la Sierra Madre Oriental (García-Mendoza, 1995).

1.1.7.1 CULTIVO TRADICIONAL E *in vitro* DE AGAVE

En el campo, las plantaciones de agaves son propagadas vegetativamente a partir de los brotes producidos en los rizomas, éstos son brotes subterráneos que crecen lateralmente desde el tallo y eventualmente surgen para dar lugar a un individuo nuevo, llamado

hijuelo. Durante la propagación asexual por rizomas, se ha observado que se produce variabilidad genética, por ejemplo en *A. tequilana* (Martínez *et al.*, 2012). Otra forma de propagación utilizada, es a partir de los bulbillos (pequeñas plantas derivadas de los brotes axilares en las ramas de las inflorescencias) y aunque todos los nuevos brotes son producidos vegetativamente de una sola planta madre y son genéticamente iguales a ésta, se observa variabilidad en el fenotipo de la descendencia, como, por ejemplo, el tamaño y la vigorosidad.

Por otro lado, la propagación a partir de los bulbillos también puede ser usado para generar o introducir nueva variabilidad genética en forma de nuevos híbridos o mutantes, que podrían tomar mucho tiempo (10 a 20 años) para estar disponibles con propósitos de formar parte de las plantaciones (Robert *et al.*, 2006; 1992). Durante el cultivo *in vitro*, se ha observado cierta variabilidad genética generada por ejemplo, en *A. tequilana* (embriogénesis somática y yemas axilares); así como en *A. fourcroydes* (Infante *et al.*, 2006; González *et al.*, 2003), *A. cocui*, *A. americana*, *A. angustifolia*, *A. deserti* y *A. sisalana* (Infante *et al.*, 2006). Además, se ha reportado que los cambios en el genoma del género *Agave* pueden ser causados por retrotransposones (Infante *et al.*, 2006; Osorio-Zambrano *et al.*, 2006; Boutet *et al.*, 2003). Las diferencias genéticas encontradas tanto en las plantas de agave en el campo, como en las plantas producidas *in vitro*, podrían ser una excelente fuente de VS, y pueden tener importantes consecuencias para su mejora y su propagación comercial.

1.1.7.2 VARIACIONES FENOTÍPICAS EN EL CULTIVO *in vitro* DE AGAVE

El ambiente estresante del cultivo *in vitro* puede producir algunas alteraciones fisiológicas en *Agave*, como la disminución en la tasa fotosintética, cambios en la coloración de las hojas, enanismo, adquisición de la mixotrofia, etc. Por ejemplo, el uso de contenedores provoca un alto grado de humedad, una baja irradiación, un limitado flujo de CO₂ y otros gases producidos por la planta, como el etileno, el cual se incrementa de forma significativa (Pospíšlová *et al.*, 1997). Otro de los factores que afectan el desarrollo de las plantas que son cultivadas en condiciones *in vitro* son los componentes del medio de cultivo como es la sacarosa, la cual aumenta el potencial osmótico en la solución, y los RC, y es por ello que la apariencia y morfología de los estomas no siempre es normal (Tichá *et al.*, 1999; Pospíšlová *et al.*, 1997). Durante la micropropagación de *A.*

angustifolia, se ha observado que los complejos estomáticos no están desarrollados, las células subsidiarias (células que resguardan las células guarda) no son bulbosas, aunque las plantas analizadas fueron colectadas durante el día. Contrariamente, las plantas *in vitro* que tenían tres meses de aclimatación en campo, si presentaban sus cuatro células subsidiarias bien definidas (Monja-Mio, 2013), esto indica que las plantas tienen la capacidad de adaptarse.

En la micropropagación de los agaves, se ha observado que los factores ambientales y estacionales influyen en la eficiencia de la multiplicación o en la inducción de ciertas clonas. Por ejemplo, en *A. tequilana* hay una variación en cuanto al número de brotes generados, de acuerdo al mes del año en el cuál las plantas madres fueron colectadas, es decir, las plantas de agave que fueron colectadas durante junio y julio, tienen una mejor respuesta organogénica en comparación con los demás meses (Robert *et al.*, 1992). Así también, las clonas de esta especie crecen de forma diferente, dependiendo del tipo de contenedor empleado para su cultivo (Robert *et al.*, 2006).

En el trabajo realizado por De la Peña *et al.*, (2012), se observó que el tipo de recipiente en los que se cultivan las plantas influye en el desarrollo de éstas. En este trabajo se determinó. que después de cinco semanas de cultivo *in vitro* de *A. fourcroydes* en biorreactores, las plántulas se desarrollan mejor que las que fueron cultivadas en cajas Magenta, éstas presentaron una apariencia más pequeña, pero eran más vigorosas y presentaban una coloración verde más intensa. También se observó que las plantas de *A. angustifolia* cultivadas en biorreactores tenían más hojas. Sin embargo, estas características fenotípicas no se conservaron cuando las plantas se pasaron a condiciones *ex vitro* y muy pocas plantas sobrevivieron, éstas eran pequeñas, pálidas y tenían pocas raíces. En contraste, la mayoría de las plantas de la especie *A. fourcroydes* sobrevivieron. En este trabajo también se observó cierta variación de naturaleza epigenética, ya que presentan una tendencia a la habituación de los RC.

Todos los datos discutidos anteriormente dan pauta para confirmar que el cultivo *in vitro* ocasiona la generación de VS en un gran número de especies, incluyendo a las plantas del género *Agave* y que entre los causales de esta variación se encuentran en gran medida los componentes del medio de cultivo, así como las condiciones lumínicas las cuales afectan de manera directa la metilación en el ADN. En la presente tesis se evalúa

el albinismo y la variegación de *A. angustifolia* como un sistema de VS único en el cual se pueden determinar el papel del número de ciclos de cultivo, la intensidad lumínica, la deficiencia nutrimental y la concentración de citocininas en la metilación global del ADN y su incidencia en los fenotipos G, V y A.

1.2 HIPÓTESIS

Para la presente tesis se plantearon dos hipótesis:

1. Si la metilación del ADN está involucrada en la aparición de variantes somaclonales variegadas y albinas de *A. angustifolia*, entonces se espera que haya cambios en los patrones de metilación en el ADN cuando aparezcan dichos fenotipos.
2. Si la metilación del ADN es afectada por los factores exógenos del cultivo de tejidos, a los que se exponen las plantas de *A. angustifolia*, entonces se espera que estos generen cambios en los patrones de metilación en el ADN en los fenotipos verde, variegado y albino.

1.3 OBJETIVO GENERAL

Evaluar los patrones de metilación global del ADN durante la micropropagación de las plantas verdes, variegadas y albinas de *A. angustifolia* así como en diferentes condiciones de cultivo.

1.4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar el contenido de clorofila y la morfología de los estomas de las plantas con los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A) así como la región verde (VG) y la región albina (VA) de las plantas variegadas.
2. Analizar la variación fenotípica de las plantas G, V y A en cinco subcultivos.
3. Evaluar el porcentaje de metilación global del ADN en cada uno de los fenotipos G, V y A durante la micropropagación de cinco subcultivos.
4. Evaluar el efecto de la reducción de los nutrientes del medio de cultivo y en la intensidad lumínica, así como la adición de benziladenina (BA) en el número de brotes

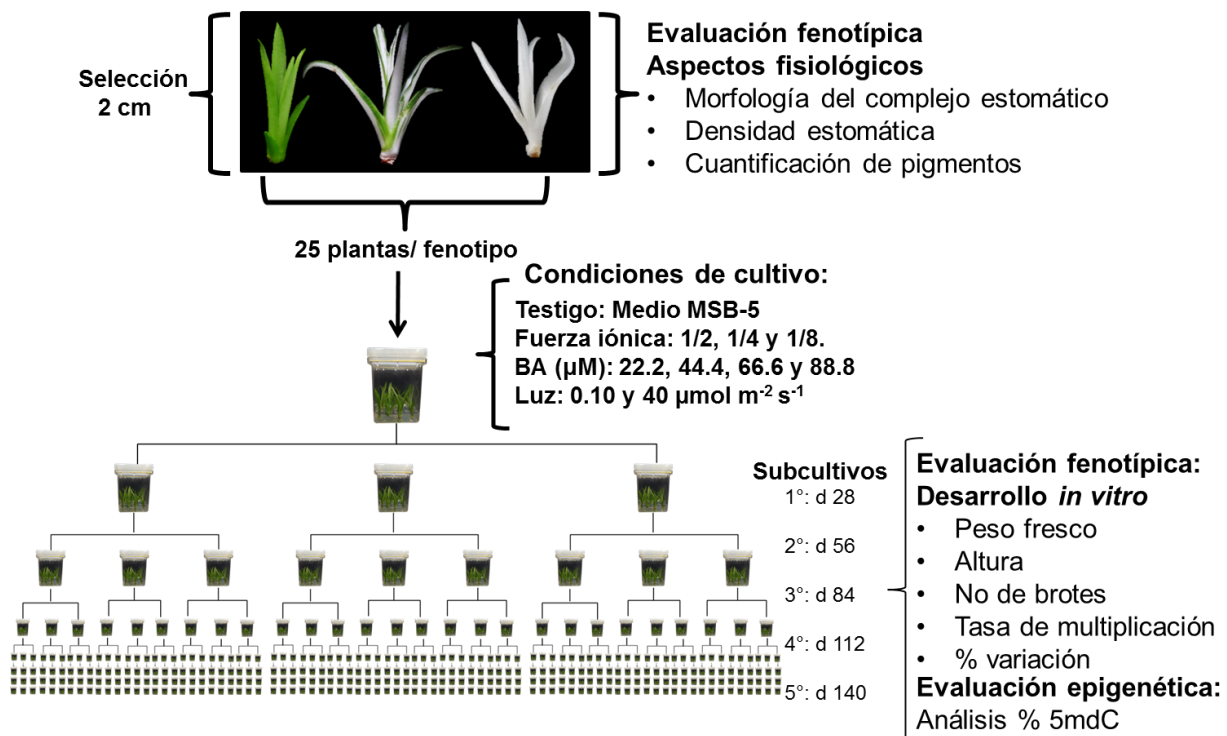
y la variación fenotípica de las plantas G, V y A durante cinco subcultivos.

- 5 Evaluar el efecto en la reducción de los nutrientes del medio de cultivo y en la intensidad lumínica, así como la adición de BA en la metilación global del ADN en los fenotipos G, V y A durante cinco subcultivos.

1.5 JUSTIFICACIÓN

El albinismo en plantas es un fenómeno difícil de estudiar, ya que la mayoría de las plantas con albinismo son mutantes, son difíciles de obtener y tienen una baja supervivencia. La variegación es un albinismo incompleto que se ha estudiado en mutantes y en plantas con variegación, que han aparecido espontáneamente. En la micropropagación de *A. angustifolia*. Se ha observado tanto albinismo como variegación. Ambos fenotipos pueden cultivarse en condiciones *in vitro* y pueden mantenerse vivos durante mucho tiempo. Estas variantes somaclonales representan un excelente sistema, con fenotipos contrastantes, que permiten estudiar las diferencias fenotípicas y fisiológicas en cada uno de las variantes somaclonales. Debido a que estas variantes tienen muy baja variación genética con respecto a las plantas verdes, se ha planteado estudiar su aparición desde un enfoque epigenético. Uno de los mecanismos epigenéticos que está involucrado en la VS de diversas especies vegetales, durante el CTV, es la metilación del ADN. Es por ello que en este trabajo se estudiará cómo los cambios en la metilación en el ADN pueden influir en la aparición de las variantes somaclonales. Durante el CTV, factores como los componentes del medio, los RC y la intensidad lumínica pueden influirla en la aparición de la VS. A su vez, estos factores afectan la metilación del ADN, generando variación epigenética. Por esta razón, en este trabajo se estudió el efecto de los factores exógenos del cultivo de tejidos, como son los nutrientes, los reguladores de crecimiento y la luz en la modulación de los mecanismos epigenéticos durante la micropropagación del agave, para tener entender qué papel juega cada uno de estos factores en la aparición de la VS y la variación epigenética en cada una de las variantes somaclonales.

1.6 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



CAPÍTULO II

CARACTERIZACIÓN MORFOFISIOLÓGICA DE LAS VARIANTES SOMACLONALES ALBINAS MICROPROPAGADAS DE AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW.

2.1 INTRODUCCIÓN

Durante la propagación *in vitro*, frecuentemente se observa VS o variación fenotípica, y la severidad de la variación es usualmente calculada como el porcentaje de las plantas generadas que muestran aberraciones o cambios fenotípicos respecto a la planta parental en una o más características. Estas características incluyen cambios en la morfología de la planta de forma completa, el aumento de la capacidad para la regeneración de brotes, alteraciones en la forma de las hojas y cambios en la pigmentación foliar (Chen y Henny, 2006). Entre las modificaciones en el contenido de pigmentos de las plantas cultivadas en condiciones *in vitro*, es posible encontrar variantes con albinismo. Las plantas que presentan albinismo se caracterizan por la pérdida parcial o total de los pigmentos de clorofila y otros pigmentos como el fitoeno (Kumari *et al.*, 2009; Qin *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; Dunford y Walden, 1991). La aparición de brotes albinos es un fenómeno que es observado frecuentemente en el cultivo de anteras y microesporas (Kumari *et al.*, 2009; Jacquard *et al.*, 2009; Broughton, 2008; Wojnarowiez *et al.*, 2004; Pauk *et al.*, 2000; Nuutila *et al.*, 2000; Mallikarjuna, 1999; Dunford y Walden, 1991). La causa primordial de la aparición de brotes albinos en el cultivo de anteras de arroz, avena y cebada es la eliminación a gran escala de fragmentos de ADN y una consecuente pérdida de los genes relacionados a la fotosíntesis, tales como los genes que codifican para la subunidad mayor de la RuBisCo (Harada *et al.*, 1990).

El albinismo ha sido observado en forma completa en los brotes meristemáticos durante la micropropagación del bambú (Liu *et al.*, 2007), así como albinismo de forma parcial o variegación en la micropropagación de plátano (Zaffari *et al.*, 1998). En bambú, los brotes albinos tienen células que presentan plástidos con una morfología anormal, especialmente los tilacoides son menos numerosos y están pobremente desarrollados debido a la pérdida de la función del cloroplasto. Estas plantas no pueden realizar la fotosíntesis. Los autores sugieren que la aparición de brotes albinos posiblemente es causada por el tiempo prolongado de la propagación y el uso del TDZ durante el cultivo *in*

vitro (Liu *et al.*, 2007; Zaffari *et al.*, 1998). Por otro lado, las plantas variegadas de plátano presentan una desregulación en la síntesis de clorofila y en el metabolismo de las citocininas, sin embargo, la causa de la variación es desconocida (Zaffari *et al.*, 1998).

En nuestro sistema de micropropagación de *A. angustifolia*, hemos encontrado variantes fenotípicas muy distintivas. Durante muchos años, la micropropagación en esta especie ha sido usada para producir un gran número de individuos vigorosos seleccionados con características elite (Robert *et al.*, 2006; 1992). Sin embargo, por un evento espontáneo y desconocido, aparecieron plantas albinas y variegadas durante su micropropagación. Por lo tanto, en este trabajo, hemos identificado y analizado los cambios morfológicos y fisiológicos que ocurren en los tres fenotipos G, V y A.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Plántulas de 2 cm de altura de los tres fenotipos, G, V y A, fueron cultivados en cajas Magentas con 50 ml de medio de multiplicación MS-B reportado por Robert *et al.*, (2006), el cual está conformado por medio MS (Murashige y Skoog, 1962), modificado en la concentración de nitrógeno, 10 mM de KNO₃ y 5 mM de NH₄NO₃. Este medio es suplementado con 2,4-D (0.11 µM) y 6 BA (4.43 µM). El medio se solidificó con agar (0.2%) y gelrite (0.2%). Las plantas se mantuvieron en un cuarto de cultivo con una temperatura de 27 ± 2 °C, bajo condiciones de fotoperiodo de 12 h, con una intensidad luminosa de 40 µmol m⁻² s⁻¹.

2.2.2 CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS

Las clorofilas (*a* y *b*) y los carotenoides totales fueron extraídos con acetona al 80% (previamente almacenada a -10 °C). Doscientos mg de peso fresco de cada fenotipo, G, V y A, fueron colectados y mezclados con 1.5 ml de acetona al 80% y macerado en un mortero. El extracto fue transferido a tubos Eppendorf de 2 ml y centrifugado a 9,360 x g durante 10 min a 4 °C. La pastilla fue lavada con acetona fría al 80% hasta eliminar la coloración verde por completo. El sobrenadante fue colectado en tubos de ensayo. El extracto fue aforado a 5 ml y se leyó su absorbancia en un espectrofotómetro (Beckman Coulter DU650) a 663 nm (clorofila *a*), 646 nm (clorofila *b*) y 470 nm (carotenoides). La concentración de clorofilas y carotenoides fue calculada como se describe en Wellburn

(1994).

2.2.3 CUANTIFICACIÓN DE MALATO

El malato fue cuantificado a partir de hojas de plántulas cultivadas *in vitro* de los tres fenotipos: G, V y A, cada 4 h durante un periodo de 24 h (las muestras se colectaron a las 10 a.m., 2:00 p.m., 6:00 p.m., 10:00 p.m., 2:00 a.m., 6 a.m. y 10 a.m.). Las plantas fueron cultivadas en las condiciones de fotoperiodo, tomando en cuenta que las lámparas son encendidas a las 6:00 a.m. y son apagadas a las 6:00 p.m. Por cada fenotipo se colectaron 200 mg del material foliar el cual fue congelado rápidamente en nitrógeno líquido y macerado con 2 ml de agua. El extracto se centrifugó por 10 min a $9,360 \times g$ y el sobrenadante fue colectado para determinar el contenido de malato. Del sobrenadante se tomaron 25 μ l y se le agregó 2.8 ml de amortiguador (Glicina 1 M; Sulfato de hidracina 0.4 M; EDTA 5 mM; pH 9.5), 30 μ l de NAD 60 mM y 30 μ l de Malato deshidrogenasa (M9004-Sigma, 500 U ml^{-1}). Los extractos se incubaron a temperatura ambiente por una hora. Las concentraciones de malato obtenidas fueron cuantificadas espectrofotométricamente a una longitud de onda de 340 nm de acuerdo a Osmond *et al.*, (1989).

2.2.4 DENSIDAD ESTOMÁTICA Y MORFOLOGÍA DEL COMPLEJO ESTOMÁTICO

Se analizó por microscopia electrónica de barrido (MEB) la morfología del complejo estomático de plantas de 3 meses de edad de los fenotipos G, V y A. El análisis fue realizado como se describió previamente (Monja-Mio *et al.*, 2015). Brevemente, se utilizaron las hojas de la parte media de la roseta para extraer 1 cm^2 de la región abaxial y adaxial de la hoja. Los tejidos fueron fijados al vacío con formaldehído al 10% por 24 h. La solución fue retirada y el tejido se lavó con amortiguador de fosfatos 0.2 M pH 7.1 por 50 min al vacío. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron en una serie de gradiente de etanol (30, 50, 70, 85 y 96% por 60 min en cada una) y finalmente los tejidos se sumergieron en alcohol anhidro al 100% tres veces. Por último las muestras se secaron en un punto crítico a 31.3°C y se metalizaron con una capa de oro de 120 nm (Denton vacuum Desk II) para poder proceder a la observación en el MEB (Joel, JSM-6360LV). La densidad estomática fue analizada usando imágenes del MEB con el programa QuickPHOTO MICRO (PROMICRA). Las mediciones de densidad fueron realizadas por

quintuplicado, basado en un total de 30 imágenes, mientras los valores de ancho y largo del complejo estomático están basados en 10 mediciones al azar.

2.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron analizados utilizando el programa Origin 8. EL análisis de varianza (ANOVA) fue usado para calcular la significancia estadística y la media $\pm$ SE (error estándar). Las diferencias significativas fueron determinadas usando la prueba de Tukey con una $P < 0.05$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 DIFERENCIAS MORFOLÓGICAS Y FISIOLÓGICAS DE LAS VARIANTES G, V Y A

Para definir las diferencias morfológicas y fisiológicas que existen entre los tres fenotipos (G, V y A), las plántulas fueron analizadas a una escala macro y microscópica (Figuras 2.1, 2.2 y 2.3). A nivel macroscópico, las hojas del fenotipo G son completamente verdes y están dispuestas en forma de roseta, como es característico de los agaves. El fenotipo V presenta hojas con regiones verdes y blancas, dispuestas a lo largo del área foliar. Este fenotipo presenta una roseta más abierta respecto a las plantas verdes. Las hojas del fenotipo A, tienen una apariencia globular, el área meristemática no está completamente diferenciada y presenta una base callosa (Figura 2.1).

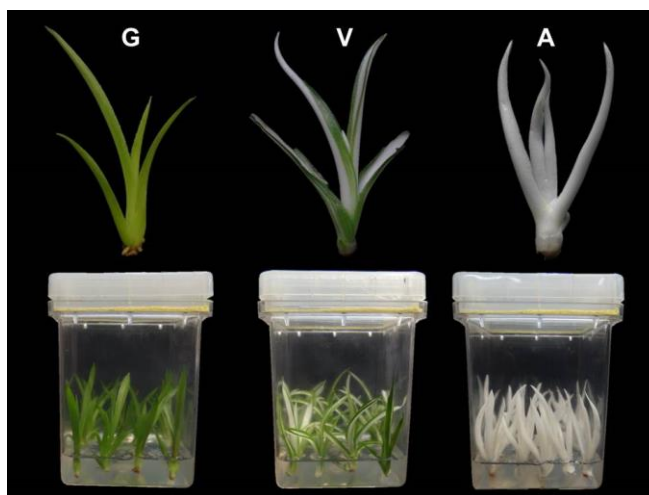


Figura 2.1 Los tres fenotipos encontrados en el cultivo *in vitro* de *A. angustifolia*, verde (G), variegado (V) y albino (A).

A nivel microscópico, se observaron cambios en los complejos estomáticos entre las plántulas con fenotipos G, V (ambas secciones, verde y albina) y A, mediante el análisis de los tejidos foliares con el MEB (Figura 2.2). Las plántulas con fenotipo A tuvieron una morfología diferente en los estomas y las células adyacentes que conforman el complejo estomático respecto a las plántulas con fenotipo G (i.e., las plántulas A tienen dos células adyacentes en vez de cuatro, como es el caso de las plántulas con fenotipo G y V).

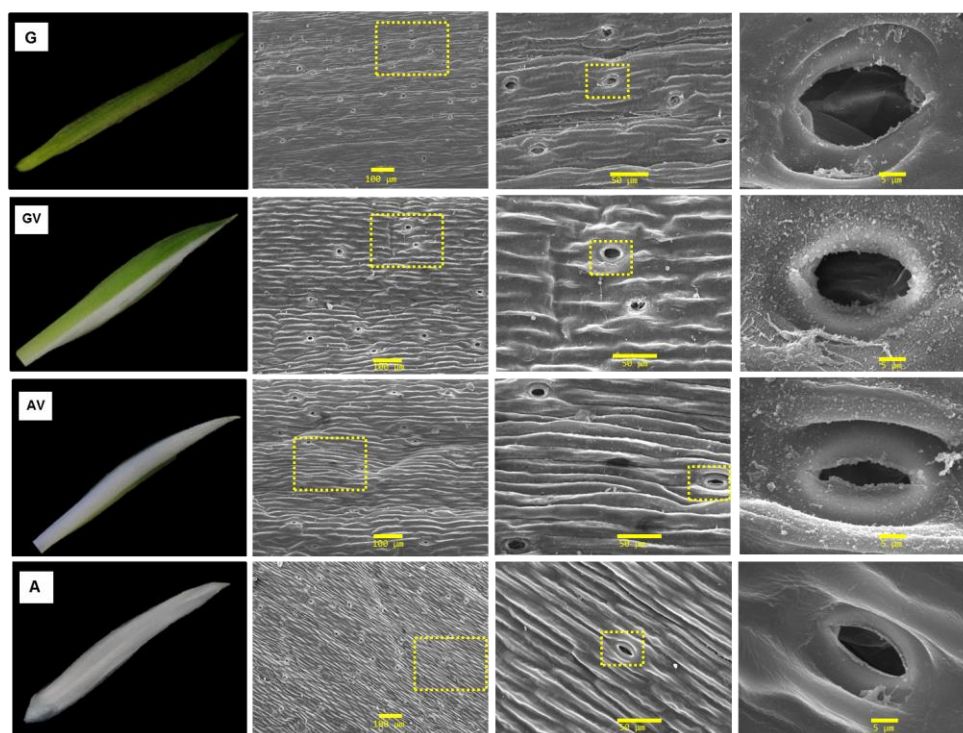


Figura 2.2 Morfología de la superficie foliar y las diferencias en el complejo estomático entre el fenotipo verde (G), la región verde (GV), la región albina (AV) del fenotipo variegado (V) y el fenotipo albino (A) los cuadros punteados representan los acercamientos de 150 $\times$, 500 $\times$, y 3,000 $\times$. Las barras de la derecha, en medio e izquierda representan una medida de 100, 50, y 5 μ m, respectivamente.

Normalmente las plantas con metabolismo CAM tienen cuatro células adyacentes en sus complejos estomáticos (Gentry y Sauck, 1978). Por lo tanto, las diferencias que se encontraron sugieren un contraste metabólico entre las plántulas A y los fenotipos G o V (Figura 2.2). El análisis microscópico global también reveló importantes diferencias entre la densidad estomática (Figura 2.3a), la longitud y la amplitud (Figura 2.3b, c); y la apertura estomática (Figura 2.3d).

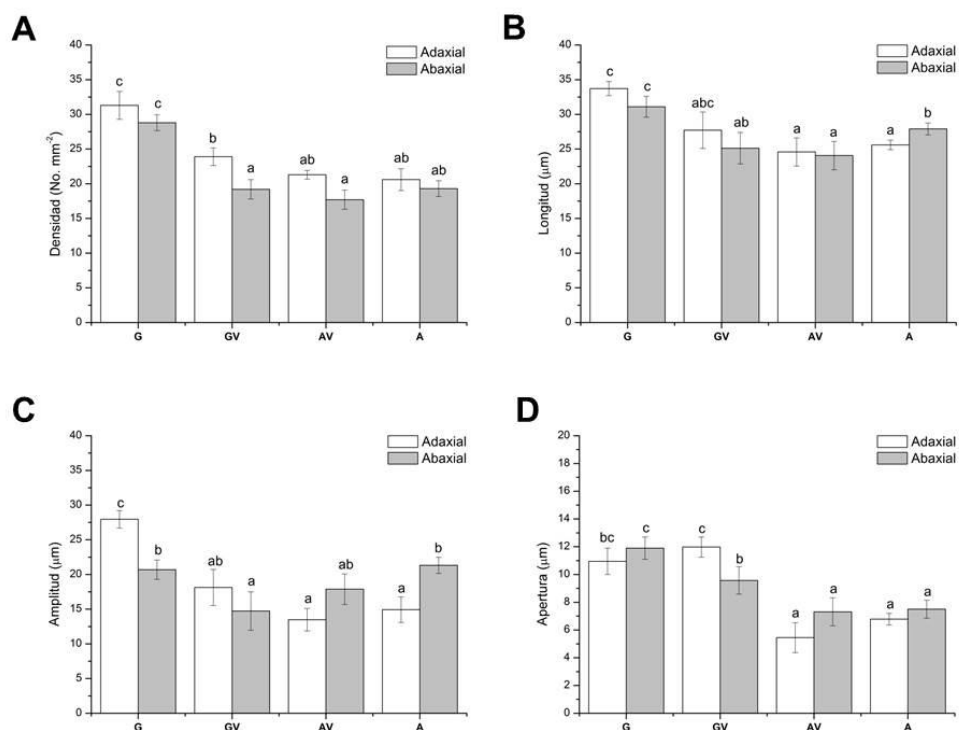


Figura 2.3 Análisis del complejo estomático mediante el MEB en la superficie adaxial y abaxial. (A) Densidad estomática entre los tres fenotipos verde (G), región verde (GV) y región albina (AV) del fenotipo variegado (V) y el fenotipo albino (A). (B) longitud del complejo estomático de G, GV, AV y A. (C) Amplitud del complejo estomático de G, GV, AV y A. (D). Diferencias en la apertura estomática entre G, GV, AV y A. las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey $P < 0.05$ ($n=10$)

La densidad estomática en las plantas G fue 10% más alta en la región adaxial y abaxial que en las regiones GV y AV de las plántulas con fenotipo V. La morfología del complejo estomático entre los fenotipos G, V y A, mostraron diferencias interesantes. Por ejemplo, en el fenotipo G los estomas son redondos y presentan ceras epicuticulares alrededor de las células subsidiarias pobremente desarrolladas, mientras que en las plántulas con fenotipo V, los estomas de la región AV están hundidos y no poseen ceras epicuticulares, además, presentan cierta deformación en el sitio donde deberían yacer las células subsidiarias. Las plántulas con fenotipo A poseen estomas con una morfología elíptica y las células epidermales son más alargadas que los estomas de las plantas G y V.

Comparando el tamaño del complejo estomático, los estomas de la región GV de las plantas V, tienen una longitud similar a los estomas de las plántulas G. De modo interesante, la longitud de los estomas de la región abaxial en la región AV fue similar a los estomas que se encontraban en las plántulas A (Figura 2.3b). Por otro lado, los estomas en la región adaxial en las regiones GV y AV son dos veces más estrechos que los estomas de las plántulas G (Figura 3c). En el caso de la apertura estomática (Figura 3d), se observó que tanto en las plántulas G como en la región GV de las plántulas V, la apertura estomática fue 38% mayor que la de los estomas de la región AV de las plántulas V y las plántulas A.

2.3.2 CONTENIDO DE CLOROFILA Y CAROTENOIDES

Para tener un mejor entendimiento de las principales diferencias en la pigmentación entre los fenotipos, se llevó a cabo la cuantificación y el análisis del contenido de clorofila (Chl *a* y Chl *b*) y carotenoides en cada uno de los tres diferentes fenotipos, así como en la región G y A de las plántulas V (Cuadro 2.1). De acuerdo con las cuantificaciones obtenidas, se encontró que las hojas de las plantas G, así como la región GV tuvieron un mayor contenido de Chl *a* y carotenoides. El contenido de Chl *b* en las plántulas V fue ligeramente mayor que en las plántulas G. Sin embargo, la reducción de Chl *a* fue muy significativa, ya que se redujo a la mitad de lo encontrado en los fenotipos G o GV. En el caso de las plántulas A, éstas mostraron un bajo contenido en Chl *a*, Chl *b* y carotenoides.

Interesantemente, el contenido de Chl *a*, Chl *b* y carotenoides en la región AV fue mayor que en las hojas de las plántulas A. Además, la relación clorofila *a/b* mostró interesantes diferencias; ya que en las plántulas G, la relación fue 2.20 ± 0.18 en comparación con 1.26 ± 0.10 en los tejidos de la región G de las plántulas V.

Cuadro 2.1 Cuantificación de pigmentos ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) en las tres variantes somaclonales: verde (G), variegado (V) y albino (A). Además se cuantificó el contenido de pigmentos en las regiones verde (GV) y albina (AV) de la planta V.¹

Pigmentos	G	V	GV	AV	A
Chl <i>a</i>	460.47 $\pm$ 35.94 ^c	287.74 $\pm$ 18.22 ^b	462.23 $\pm$ 36.22 ^c	133.73 $\pm$ 39.65 ^b	0.87 $\pm$ 0.36 ^a
Chl <i>b</i>	225.04 $\pm$ 28.72 ^b	302.86 $\pm$ 46.60 ^c	390.46 $\pm$ 50.36 ^c	199.31 $\pm$ 67.92 ^b	3.7 $\pm$ 0.77 ^a
Chl total	685.51 $\pm$ 63.76 ^d	590.61 $\pm$ 55.77 ^c	852.69 $\pm$ 82.74 ^e	333.04 $\pm$ 107.31 ^b	4.6 $\pm$ 1.00 ^a
Carotenoides	274.45 $\pm$ 68.16 ^c	198.26 $\pm$ 53.81 ^b	279.78 $\pm$ 72.91 ^c	165.68 $\pm$ 48.67 ^b	9.00 $\pm$ 7.3 ^a
Chl <i>a/b</i>	2.20 $\pm$ 0.18 ^c	1.24 $\pm$ 0.35 ^b	1.26 $\pm$ 0.10 ^b	1.05 $\pm$ 0.30 ^b	0.18 $\pm$.07 ^a

¹ Los valores representan las medias $\pm$ ES basado en tres réplicas biológicas, en tres experimentos independientes. Las diferentes letras en cada columna indican las diferencias significativas entre las medias con un $\alpha = 0.05$ de acuerdo a la prueba de Tukey.

Debido a que las diferencias en la morfología estomática encontradas en la Figura 2.2, sugiere una diferencia en el metabolismo de las plántulas A, se examinó la posible diferencia metabólica, por medio de la cuantificación de la capacidad de producción de malato en los tres fenotipos en un periodo de 24 h (Figura 2.4). Se observaron diferencias significativas en la capacidad para acumular malato durante el periodo de obscuridad entre los tres fenotipos. Mientras las plantas V y G acumularon altas concentraciones de malato (31.23 ± 0.50 and $22.20 \pm 0.12 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF, respectivamente) a las 6:00 a.m., las plántulas A tuvieron una pobre producción de malato con valor de $11.04 \mu\text{mol g}^{-1}$ PF. El pico de acumulación de malato en las plántulas V y G ocurrieron a las 6:00 a.m. (justo antes que las luces se encendieran en el cuarto de cultivo), lo cual sugiere que tanto el fenotipo G como el fenotipo V tienen un metabolismo CAM, sin embargo las plantas con fenotipo A carecen de la capacidad para acumular malato en la noche y por lo tanto pareciera que poseen un metabolismo diferente al CAM.

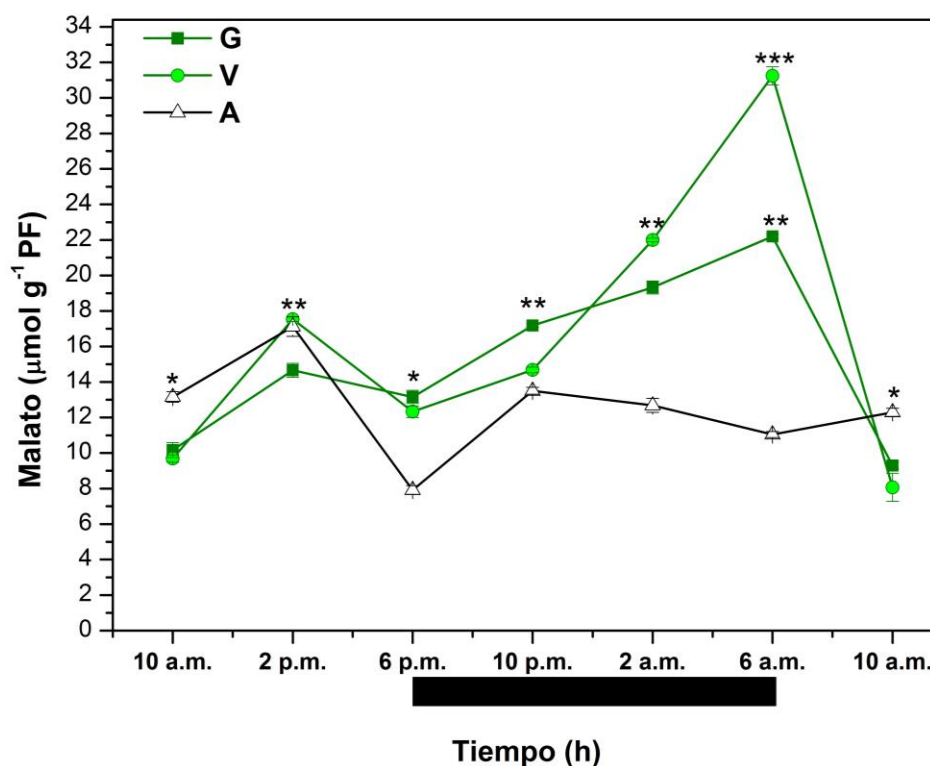


Figura 2.4 Cuantificación de malato durante 24 h de fotoperiodo en las plántulas verde (G), variegada (V) y albina (A). El rectángulo de color negro representa el periodo de oscuridad. Los puntos representan la media $\pm$ el error estándar de cinco réplicas biológicas. La comparación estadística fue llevada a cabo por el análisis de varianza (ANOVA) $P < 0.05$.

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 EL ALBINISMO AFECTA EL CONTENIDO DE PIGMENTOS Y LA FISIOLÓGÍA DE LA PLANTA

La aparición de plantas albinas en *A. angustifolia* (Figura 2.1) representa un sistema natural y un modelo importante para investigar cuestionamientos biológicos acerca de la fotosíntesis y la síntesis de clorofila. Entre los pigmentos fotosintéticos, las clorofilas y carotenoides, son los pigmentos más importantes que le confieren el color característico en las plantas. Además son necesarios para la captura de energía y la fotoprotección de los fotosistemas por la disipación del exceso de energía (Horton *et al.*, 1994). En este estudio se encontró que en GV tuvo un contenido total de clorofilas mayor al fenotipo G

(Cuadro 2.1). También se ha observado una concentración elevada de clorofilas en la parte verde en plantas variegadas en mutantes de *Arabidopsis immutans* (*imm*) (Meehan *et al.*, 1996). En esta mutante, el análisis fluorescente reveló que las células del área verde en las plantas variegadas tienen más clorofila que las células de las plantas verdes normales. Los autores sugieren que los sectores verdes de las hojas podrían compensar la carencia de fotosíntesis en los sectores blancos. Esto también podría ser el caso de GV en agave. Se ha reportado que estas secciones actúan protegiendo la sección albina del daño oxidativo (Kumari *et al.*, 2009; Jacquard *et al.*, 2009; Sakamoto *et al.*, 2002; Rodermel, 2002; Dunford y Walden, 1991).

De modo interesante, se encontró que la relación entre clorofila *a* y clorofila *b*, la cual está asociada tanto al tamaño de la antena de captura del fotosistema II (PSII) y el nivel de compactación de la membrana de los tilacoides en los cloroplastos (Leong y Anderson, 1984) fue diferente entre los cinco tejidos analizados (G, V, A, GV y AV) (Cuadro 2.1). De acuerdo a Leong y Anderson (1984), la relación clorofila *a/b* refleja un incremento en la proporción de clorofila *b* en los complejos de la captura de luz y una disminución en los complejos del PS II. Por lo tanto, la baja relación de Chl *a/b* encontrada en las plántulas V y A de agave podrían sugerir un posible daño en el complejo del PS II o una alteración en la estequiometría de los fotosistemas I y II. Sin embargo, otra explicación para la reducción de la relación Chl *a/b* es una adaptación fotosintética de las plantas V al estrés por condiciones de baja intensidad lumínica (Valladares y Niinemets, 2008), una condición a la cual las plantas *in vitro* están expuestas (Us-Camas *et al.*, 2014). De hecho, esta adaptación también ha sido observada en otras plantas variegadas. Por ejemplo, en la mutante de *Arabidopsis imm* se ha observado que en la región verde de las hojas de plantas variegadas, la relación de Chl *a/b* disminuye cuando éstas son cultivadas en condiciones de baja intensidad luminosa, en contraste con las plantas con un fenotipo silvestre, la relación Chl *a/b* no es afectada por las condiciones de baja intensidad lumínica (Aluru *et al.*, 2001).

2.4.2 CAMBIOS MORFOLÓGICOS EN LOS ESTOMAS DE LAS HOJAS DE LAS PLANTAS VERDES, VARIEGADAS Y ALBINAS

La epidermis de las plantas es el primer tejido que mantiene contacto con el ambiente (Hernández-Valencia *et al.*, 2003). Durante el CTV, el ambiente *in vitro* puede provocar

ciertos cambios morfológicos, los cuales permiten a las plantas adaptarse a estas condiciones. De forma específica, la superficie foliar de las plantas que son cultivadas en diferentes sistemas *in vitro* pueden mostrar diferentes cambios morfológicos en las células estomáticas, por ejemplo, en el tamaño del complejo estomático (Monja-Mio *et al.*, 2015). Las observaciones en el fenotipo G fueron similares a las observadas por Monja-Mío *et al.*, (2015) en *A. angustifolia*, observaron que el alto contenido de humedad por las condiciones *in vitro* causaba un pobre desarrollo del complejo estomático y una poca deposición de ceras epicuticulares. En la presente investigación se observó que las plántulas G y la GV tienen un complejo estomático característico con una disposición de las células adyacentes tetracítica (Figura 2.2). Gentry y Sauck (1978) analizaron el complejo estomático de 80 especies del género *Agave*, en los cuales clasificaron y describieron este complejo de forma morfológica como tetracítico. Este tipo de disposición es caracterizado por la presencia de un grupo constante de cuatro células epidérmicas subsidiarias (dos células polares y dos células laterales) asociadas con las células oclusivas del estoma. Las cuatro células subsidiarias que rodean las células guarda hundidas, forman una cámara supra-estomática encima de las células guarda, las cuales pueden o no estar rellenas con ceras. En el género *Agave*, esta cámara es una adaptación xerofítica para la supervivencia en condiciones desérticas (McClendon, 1908). Sin embargo, debido a las condiciones *in vitro*, las cuáles mantienen altos niveles de humedad, las ceras observadas en las plántulas verdes “normales” (el fenotipo G) fueron pocas (Figura 2.2). El fenotipo albino carece completamente de ceras epicuticulares, y las células adyacentes a las células guarda son más alargadas, con una apertura más pequeña que en las plántulas G (Figura 2.2). La pérdida de la disposición tetracítica en los estomas y la morfología del fenotipo A podría indicar un posible efecto en los procesos del metabolismo CAM. En el metabolismo CAM, la morfología del complejo estomático es importante para el control de la apertura de los estomas. Este metabolismo es caracterizado por una apertura de los estomas durante la noche para mejorar la eficiencia en el uso del agua (Hartsock y Nobel, 1976; Ehrlér, 1969). Por lo tanto, un cambio en la morfología estomática en las plántulas A podría afectar este mecanismo. En contraste con las plántulas A de *A. angustifolia*, en *Arabidopsis* la mutante *dxr* (Xing *et al.*, 2010), la apertura estomática es más ancha que la del fenotipo silvestre y las células guarda están hinchadas.

2.4.3 EFECTO EN EL METABOLISMO DE LAS PLÁNTULAS ALBINAS

Para investigar si las plantas A tiene un metabolismo diferente respecto a las plantas G y V, se llevó a cabo la cuantificación de malato acumulado en las plántulas G, V y A durante 24 h (Figura 2.4). De acuerdo a los resultados obtenidos, las plantas con un fenotipo normal G, muestran un metabolismo CAM típico, es decir, el malato es acumulado durante la noche y alcanza sus máximos niveles justo después que las luces son encendidas y disminuye rápidamente durante las horas de luz. En otra especie del género *Agave* como *A. tequilana*, las plantas micropropagadas también mantienen su metabolismo CAM (Santamaría *et al.*, 1995). Sin embargo, las plántulas del fenotipo A mostraron ser incapaces de acumular malato durante la noche, indicando que este fenotipo no está funcionando con un metabolismo CAM, sino quizás como una planta C₃. Es de importancia mencionar que el fenotipo V fue capaz de acumular altas concentraciones de malato durante la noche, más que el fenotipo G. Esto podría indicar que el fenotipo V tiene su maquinaria metabólica para acumular malato intacta y quizás la región GV de sus hojas es suficiente para mantener su capacidad fotosintética como una regulación compensatoria (Meehan *et al.*, 1996). En otras especies de *Agave*, como *A. americana* con un fenotipo variegado, se ha determinado que los sectores verdes acumulan una cantidad mayor de malato al comienzo del día y tienen una acumulación inferior durante el período de obscuridad. Sin embargo, la región albina se comporta completamente diferente, hay una reducción del 70% en la acumulación de malato durante la noche, sugiriendo un daño en su metabolismo lo cual está de acuerdo con la baja actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de malato (Raveh *et al.*, 1998)

2.5 CONCLUSIONES

- Las plantas V muestran una acumulación de pigmentos en la región GV mayor a las plantas G, sugiriendo un mecanismo compensatorio para llevar a cabo su crecimiento y metabolismo en condiciones *in vitro*. Además, esta acumulación de pigmentos en la región GV podrían actuar protegiendo la sección albina del daño oxidativo.
- La baja relación de Chl *a/b* encontrada en las plántulas V y A de agave podrían sugerir, ya sea un posible daño en el complejo del PS II, una alteración en la estequiometría de los fotosistemas I y II, o una adaptación fotosintética de las plantas V al estrés por condiciones de baja intensidad lumínica.

- A diferencia del fenotipo G que muestra un complejo estomático de tipo tetracítico, la región AV de las plantas V y las plantas A no lo muestran. Esta pérdida de la disposición tetracítica en los estomas y la morfología del fenotipo A podría indicar un posible efecto en la apertura estomática interfiriendo con los procesos del metabolismo CAM.
- La incapacidad de las plantas A para acumular malato durante la noche como es característico de las plantas CAM, así como los cambios morfológicos en el complejo estomático, sugieren un daño en su metabolismo.

CAPÍTULO III

CAMBIOS EN LOS NIVELES GLOBALES DE LA METILACIÓN EN EL ADN DE LAS VARIANTES SOMACLONALES VERDES, VARIEGADAS Y ALBINAS DE *AGAVE ANGUSTIFOLIA* HAW. DURANTE SU MICROPROPAGACIÓN

3.1 INTRODUCCIÓN

Las técnicas del CTV han sido eficientes para el mantenimiento de líneas clonales y la rápida propagación vegetativa de especies de interés comercial. Entre las técnicas del CTV, el cultivo de brotes adventicios, que se forman a partir del meristemo, ha sido ampliamente utilizado debido a que se pueden obtener un gran número de plantas a partir de un explante. Aunque a partir de estas técnicas se espera obtener individuos idénticos a las plantas que les dio origen, hay evidencia que puede ocurrir variación fenotípica en los clones propagados (Vázquez y Linacero, 2010). A la variación fenotípica que se encuentran en las plantas, que fueron regeneradas a partir de un explante en condiciones *in vitro*, también se le llama variación somaclonal (VS) (Larkin y Scowcroft, 1981).

Entre los factores que están asociados a la VS, el factor genético es probablemente el más importante. Este factor determina la frecuencia de la variación, pero también los cambios epigenéticos producidos durante el cultivo *in vitro* pueden causar VS, y pueden llegar a ser más frecuentes e igualmente importantes (Miguel y Marum, 2011; Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2011; Bairu *et al.*, 2010; Kaeppler *et al.*, 2000; Cubas *et al.*, 1999). Uno de los mecanismos epigenéticos que están implicados como causa de la VS es la metilación en el ADN (Jaligot *et al.*, 2011; Valledor *et al.*, 2010; Xu *et al.*, 2004; Kaeppler y Phillips, 1993; Kaeppler y Philips, 1993). Esta modificación es sumamente importante para la estabilidad del genoma, la configuración de la cromatina, regula la expresión de los genes y está implicada en el silenciamiento de los elementos móviles (Law y Jacobsen, 2010). Recientemente, se ha mostrado que plantas con fenotipos verde, variegado y amarillo de *Clivia miniata*, cultivados bajo condiciones *in vitro*, están relacionados con un incremento en los niveles de metilación del ADN y las diferencias en el grado de metilación están positivamente asociados con la intensidad del color de estas plantas (Wang *et al.*, 2016).

En nuestro sistema de micropropagación de *A. angustifolia*, hemos encontrado variantes fenotípicas muy distintivas ocasionadas por un evento espontáneo y desconocido. Estas

somaclonas tienen una variabilidad genética muy baja (menos del 1 por ciento) (Us-Camas *et al.*, 2017) sugiriendo que podrían estar involucrados factores epigenéticos en estas variaciones. El albinismo encontrado en *A. angustifolia* podría ser un modelo muy efectivo para analizar el papel de la metilación en el ADN en esta variación somaclonal. Por lo tanto, en este trabajo, se analizaron los niveles de metilación de los tres fenotipos durante cinco subcultivos. Los resultados encontrados en el presente trabajo sugieren una posible “memoria epigenética al estrés” (Avramova, 2015) de las condiciones *in vitro*, que causan un cambio en la configuración de la cromatina, favoreciendo la generación de brotes V y A en las plantas G y V, respectivamente.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

En cajas Magentas que contenían 50 ml de medio de multiplicación se cultivaron plántulas de 2 cm de altura de los tres fenotipos, G, V y A. El medio de multiplicación que se utilizó, para obtener los brotes, fue el medio MS-B reportado por Robert *et al.*, (2006), el cual está conformado por medio MS (Murashige y Skoog, 1962), modificado en la concentración de nitrógeno, 10 mM de KNO₃ y 5 mM de NH₄NO₃. Este medio es suplementado con 2,4-D (0.11 µM) y 6-BA (4.43 µM). El medio se solidificó con agar (0.2%) y gelrite (0.2%). Las plantas se mantuvieron en cuartos de cultivo con una temperatura de 27 ± 2 °C, bajo condiciones de fotoperiodo de 12 h, con una intensidad luminosa de 40 µmol m⁻² s⁻¹. Las plantas fueron subcultivadas cinco veces. Cada subcultivo se realizó cada 28 días.

3.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

De 25 plantas de cada uno de los fenotipos, G, V y A, se seleccionaron diez brotes de 2 cm de altura (que se considerarán como las plantas madres) para evaluar el crecimiento de la planta madre (MP) mediante peso fresco y la altura alcanzada, así como el número de nuevos brotes en cada uno de los ciclos de subcultivo. Los nuevos brotes formados de la MP fueron clasificadas de acuerdo a su tamaño (pequeños: 0.5-1 cm; medianos: 1-2 cm y grandes: >2 cm) y transferidos a nuevas cajas Magentas. Para los cinco subcultivos se determinó el número total de brotes y la tasa de multiplicación. La variación fenotípica de los nuevos brotes fue analizada para cada uno de los cinco subcultivos y el porcentaje de variación fue calculado del total de brotes regenerados.

3.2.3 TASA DE MULTIPLICACIÓN

Con el fin de analizar la tasa de multiplicación entre los diferentes fenotipos, bajo las condiciones de cultivo, se contabilizó el número total de brotes obtenidos en cada subcultivo. El número de brotes y la tasa de multiplicación fueron determinados para los cinco subcultivos.

Para tener el número de brotes se contabilizaron cinco cajas Magentas con 25 plantas cada una. Además, los brotes obtenidos se clasificaron de acuerdo al fenotipo que presentaron, por ejemplo, en la línea V se contabilizaron los brotes A y G por separado. Para evaluar el porcentaje de variación se tomó en cuenta el número total de brotes obtenidos por subcultivo.

3.2.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS PATRONES GLOBALES DE METILACIÓN EN EL ADN

Para la cuantificación de los patrones de metilación es necesario extraer el ADN de las muestras, digerir ese ADN y analizarlo por HPLC.

3.2.4.1 Extracción del ADN

La extracción del ADN de agave se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Echavarría-Machado *et al.*, (2005). Se colectaron doscientos mg de tejido en cada subcultivo para los tres fenotipos (G, V y A), tanto de las MP como de los brotes obtenidos durante la micropropagación. Estos tejidos se maceraron con nitrógeno líquido, posteriormente se les agregó el amortiguador de extracción [Tris-HCl 100 mM; EDTA 50 mM; NaCl 500 mM], se les adicionaron 100 µl de β-mercaptoetanol y 100 µl de SDS al 20%. La mezcla se incubó a 65 °C durante 15 min y posteriormente se centrifugó a 17,000 x g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se le adicionaron 300 µl de sílica, mezclando por inversión por 5 min. La mezcla se centrifugó a 6,000 x g durante 5 min, el sobrenadante fue decantado y la pastilla se lavó con etanol al 70% dos veces a 6,000 x g por 2 min cada vez. La pastilla se dejó secar por 2 h, a continuación se le adicionaron 50 µl de agua con un pH 7.3-7.5, se incubó a 55 °C por 5 min y se centrifugó a 14,600 x g. El sobrenadante se colocó en un tubo nuevo y se cuantificó en un nanodrop para obtener la cantidad de ADN en nano gramos (ng) así como la relación 260/280 y 240/260 para saber la integridad y la pureza del ADN.

3.2.4.2 Digestión del ADN

Cinco µg de DNA de cada muestra se hidrolizaron y mezclaron con 5 µl de amortiguador de digestión 10X (ácido acético 200 mM, glicina 200 mM, cloruro de magnesio 50 mM, acetato de Zinc 5 mM, cloruro de calcio 2 mM, ajustado con hidróxido de sodio 1N pH 5.3), 2 µl de DNAsa I (D2821-Sigma, 10 U ml⁻¹) y 1 µl de Nucleasa PI (N8630-Sigma, 1.25 U/ml) y se incubó a 37 °C toda la noche. Posteriormente se adicionaron 5 µl de NaOH 100 mM y 2 µl de fosfatasa alcalina (P4879-Sigma, 1 U ml⁻¹). La mezcla se incubó por 3.5 h a 37 °C y se mezcló con la fase móvil D (fosfato de amonio dibásico 50 mM, acetato de amonio-ácido fosfórico 15 mM, pH 4.1). Después las muestras se centrifugaron a 15,200 x g y se transfirieron a un tubo nuevo.

3.2.4.3 Análisis del porcentaje de metilación por HPLC

Las muestras se pasaron por filtros de 0.22 µm y se colocaron en insertos y posteriormente en viales para ser inyectados en el HPLC en una columna de fase reversa Kromasil C₁₈, 250 mm x 4.6 mm, 5 µm (250 x 4.6 mm, 5 µm de Phenomenex). Siguiendo el método usado en Nic-Can *et al.*, (2013). En este método se utilizaron cuatro fases móviles: fase móvil A, agua; fase móvil B, acetonitrilo; fase móvil C, metanol y fase móvil D, amortiguador de fosfo acetato (50 mM fosfato de amonio dibásico, 15 mM acetato de amonio) pH 4.1. El programa utilizado para separar los deoxynucleósidos, fue el gradiente siguiente: al minuto 4:00 3% fase móvil C, 25% fase móvil D; al minuto 11:00 7% fase móvil C, 25% fase móvil D; minuto 15:00 20% fase móvil B, 25% fase móvil C, 25% fase móvil D, minuto 15:80 20% fase móvil B, 25% fase móvil C, 25% fase móvil D, minuto 16:00 25% fase móvil D. En todo el gradiente, el 100% del flujo fue completado con la fase móvil A de forma proporcional en cada tiempo determinado. El flujo utilizado fue de 1 ml min⁻¹, manteniendo la columna a 40 °C. La separación de los nucleósidos fue lograda inyectando 40 µl de cada muestra. La detección en el arreglo de diodos fue realizada a 286 nm a partir de tres replicas por muestra, las mediciones del porcentaje de metilación se hicieron de acuerdo al área de los picos para determinar la concentración de 2'-deoxycitocina (dC) y 5'-metil-2'-deoxycitocina (5 mdC) en cada muestra usando la formula (%5 mdC = $C_{5\text{ mdC}} / [C_{5\text{ mdC}} + C_{\text{ dC}}] \times 100$), donde C es la concentración.

3.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron analizados utilizando el programa Origin 8. El análisis de varianza (ANOVA) fue usado para calcular la significancia estadística y la media $\pm$ SE (error estándar). Las diferencias significativas fueron determinadas usando la prueba de Tukey con una $P < 0.05$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 MICROPROPAGACIÓN DE LOS TRES FENOTIPOS: G, V Y A

Después de evaluar las diferencias fisiológicas entre los tres fenotipos, era necesario saber cómo se comportaban los fenotipos G, V y A durante la micropropagación, es decir, ¿cómo crecen y cuántos clones produce cada uno? Para contestar esta pregunta, se analizó el peso fresco y el tamaño de 10 plántulas G, V y A durante cinco subcultivos (Figura 3.1a, b).

En el primer subcultivo, se pudo observar que la ganancia en peso fresco fue similar entre las plántulas G (0.22 ± 0.014 g), V (0.18 ± 0.012 g) y A (0.17 ± 0.011 g). En el segundo subcultivo, las plántulas A incrementaron 2.5 veces más en peso que en el primer subcultivo (0.54 ± 0.06 g), mientras que las plantas V (0.44 ± 0.057 g) y G (0.45 ± 0.041 g) doblaron su peso respecto al primer subcultivo. Las principales deferencias se observaron en el inicio del tercer subcultivo, cuando las plántulas G (1.06 ± 0.11 g) y V (0.87 ± 0.08 g) crecieron muy rápido en comparación con las plántulas A (0.83 ± 0.04 g). Fue evidente que, del cuarto (1.16 ± 0.119 g) al quinto subcultivo (1.22 ± 0.144 g) las plantas G ganaron más peso que las plántulas V (Figura 3.1a).

En cuanto a la altura, se pudo observar que en el primer subcultivo los tres fenotipos no mostraron diferencias entre sí. Sin embargo, es de importancia señalar que aunque las plántulas A pesaron más que otros fenotipos en el segundo subcultivo (Figura 3.1a), éstas fueron 50% más pequeñas que las plántulas G y V (Figura 3.1b). Las diferencias en el fenotipo G y V con respecto al fenotipo A fueron más evidentes en el tercer subcultivo. Las plántulas G duplicaron su altura pasando de 2.97 ± 0.16 cm a 6.88 ± 0.24 cm. Las plántulas V incrementaron su crecimiento de 4.27 ± 0.25 cm a 5.81 ± 0.16 cm y las plántulas A mantuvieron su altura en 3.55 ± 0.22 cm. En el cuarto y quinto subcultivo, hubo un patrón similar en el crecimiento de las plantas G y V (7.96 ± 0.36 cm y $7.88 \pm$

0.27, respectivamente), mientras que las plántulas A mostraron un mínimo crecimiento, ya que crecieron menos de 2 cm en promedio durante los cinco subcultivos evaluados (Figura 3.1b). Para determinar las diferencias en cuanto a la capacidad regenerativa y la tasa de multiplicación entre los somaclones G, V y A, a través de cinco subcultivos de 28 días cada uno, se contabilizó el número de brotes obtenidos en cada uno de los cinco subcultivos (Figura 3.1c, d). En general, el fenotipo V generó un mayor número de brotes en comparación de los fenotipos G y A. El experimento comenzó con 25 plántulas de cada fenotipo, los cuales produjeron en los primeros dos subcultivos, 229.66 ± 8.95 , 241 ± 45.44 y 200.66 ± 14.8 brotes en los fenotipos G, V y A, respectivamente. Esto quiere decir que cada plántula en promedio generó de 8 a 9 brotes. Sin embargo, en el tercer subcultivo, se observó que habían 825 ± 46.5 , 695 ± 57.57 , 574 ± 44.30 brotes acumulados en los fenotipos G, V y A respectivamente.

Al final del quinto subcultivo, un total de 4959 ± 222.9 , 5827 ± 313.5 , 4226 ± 300.9 brotes fueron generados en los fenotipos G, V y A, respectivamente. La tendencia en el número total de brotes generados durante los primeros tres subcultivos fueron muy similares entre los fenotipos, sugiriendo que la capacidad para generar brotes no fue afectada por las diferencias fenotípicas, por lo menos en los primeros ciclos (Figura 3.1c, d). Sin embargo, este patrón cambia al comienzo del cuarto subcultivo, donde la capacidad de A para generar brotes decrece, mientras que la de V aumenta.

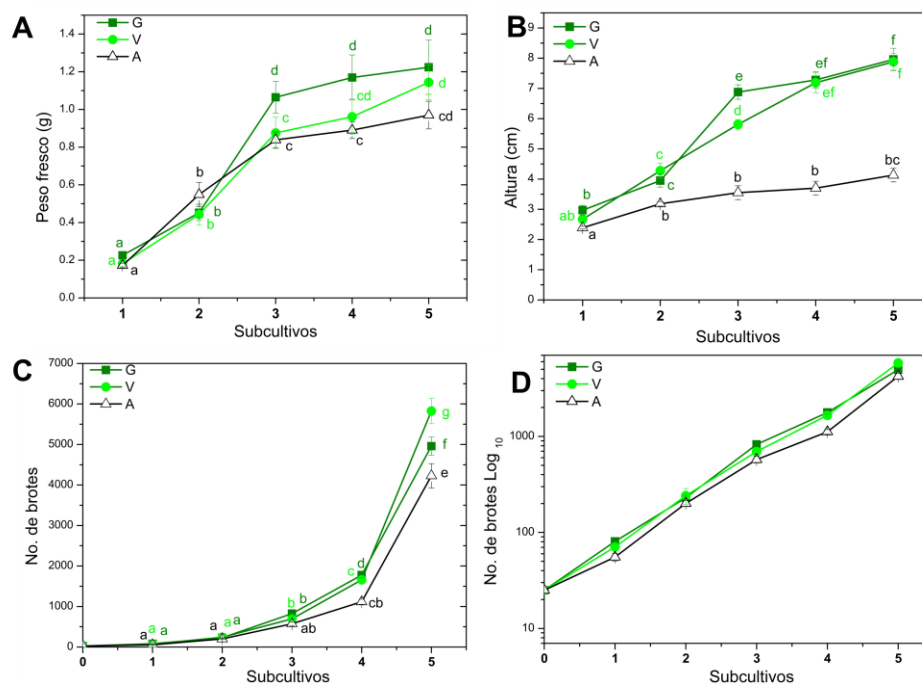


Figura 3.1. Desarrollo *in vitro* de los tres fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A) durante cinco subcultivos. En A se observa la altura acumulada y en B el peso fresco ganado de 10 individuos. El número de brotes obtenido en cada subcultivo (C) y en escala logarítmica (D) a partir de 25 plántulas. Los puntos representan las medias y las barras el error estándar de 10 réplicas biológicas.

3.3.2 NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN DURANTE LA MICROPROPAGACIÓN DE LOS FENOTIPOS G, V Y A

Con el objeto de entender qué cambios en la metilación en el ADN, a nivel global, podrían ocurrir durante la micropropagación de las plantas G, V y A, los cuales pudieran estar relacionados ya sea con la tasa de multiplicación o al fenotipo en cierto grado, se midió el porcentaje de 5mdC por cada fenotipo en las plantas madre (MP) y en los brotes generados en los cinco subcultivos (Figura 3.2). Se llevó a cabo un análisis sistemático de los cambios en la metilación del ADN para tener una mejor comprensión de la “memoria” epigenética en los clones. La metilación en el ADN fue analizada a través del tiempo (cinco resiembras que equivalen a 5 meses aproximadamente) en las MP de cada fenotipo para determinar los cambios en la metilación durante el desarrollo de las plantas. Además, el %5mdC fue evaluado en los brotes generados de las MP para determinar si la metilación de los nuevos brotes era la misma de las MP o diferente dependiendo del

fenotipo generado, así como del ciclo de cultivo (Figura 3.2a, b y c). Los resultados indicaron que en los tres fenotipos, los niveles de metilación de las MP fueron diferentes dependiendo del fenotipo (Figura 3.2). Las MP-G (plantas madre de fenotipo G) tuvieron 34.4% de metilación mientras que MP-V (plantas madre de fenotipo V) tuvieron 33.40%. En las MP-A (planta madre del fenotipo A), el porcentaje de metilación fue de aproximadamente 2% menos (32.88%) que de las MP-G (34.4%) (Figura 3.2). La evaluación de la metilación en los brotes generados en cada subcultivo mostró algunos resultados interesantes. Por ejemplo, los brotes obtenidos en el primer subcultivo tuvieron valores similares a la metilación de las MP en los tres fenotipos. Sin embargo, en los subcultivos siguientes, los patrones de metilación cambiaron así como también la variación fenotípica. Por ejemplo, en el fenotipo G (Figura 3.2), se observó que las MP produjeron no solo brotes verdes (Gs-G) sino también brotes variegados (Vs-G) al comienzo del cuarto subcultivo. También se observó una diferencia significativa en los niveles de metilación, más del 2% en las MP-G en comparación con los Gs-G en el segundo y el tercer subcultivo. Sin embargo, en el cuarto subcultivo una disminución en los niveles de metilación fue acompañado por la aparición de brotes variegados (Vs-G), los cuales presentaron bajos niveles de metilación en comparación con los Gs-G y MP-G. Es importante señalar que los niveles de metilación de MP-G y Gs-G fueron los mismos en el cuarto y quinto subcultivo, y que la hipometilación observada en Gs-G pareciera estar relacionada con la aparición de los brotes variegados.

En el caso del fenotipo V (Figura 3.2b), las MP-V generaron no solamente brotes variegados (Vs-V), sino que también aparecieron brotes verdes (Gs-V) y albinos (As-V) en el segundo subcultivo. Aunque los niveles de metilación de los Gs-V y Vs-V en el segundo subcultivo fueron similares al de las MP-V, los As-V presentaron una hipermetilación, la cual fue mantenida hasta el cuarto subcultivo; cuando la metilación disminuyó en más de un 2%, se observó la aparición de los brotes variegados provenientes de los brotes albinos (Vs-As). Los niveles de metilación de los Gs-V fueron mucho mayores que en los Vs-V en el tercer, cuarto y quinto subcultivo. Interesantemente, los niveles de metilación de los Vs-V en el cuarto y quinto subcultivo fueron los mismos que los de las MP-V. Este mismo resultado fue encontrado en las plántulas G (Figura 3.2a).

En cuanto al fenotipo A (Figura 2.6c), en éste no se generaron ni brotes verdes o

variegados, y los niveles de GDM fueron los mismos entre las MP-A y los brotes (As-A) hasta el cuarto subcultivo. Sin embargo, en el quinto subcultivo se observó un incremento del 2% en los niveles de metilación en las MP-A, mientras que los As-A disminuyeron por lo menos 1%.

Aunque hubieron cambios en la metilación relacionados al crecimiento de las MP, así como en la aparición de los brotes en los diferentes fenotipos (Figura 3.2), fue claro que los brotes G tuvieron una metilación mayor (34%) que la de los brotes V (33%), y que estos tuvieron una metilación mayor que los brotes A (32%) en el cuarto y quinto subcultivo (Figura 3.2b). Esos valores de GDM fueron observados en el cuarto y quinto subcultivo en los brotes de las líneas G, V y A. Por ejemplo, los valores de metilación de los Gs-G (34%) (Figura 3.2a) y Gs-V (35%) (Figura 3.2b) fueron similares, y los de As-V (32%) (Figura 3.2b) fueron similares a los As-A (31%) (Figura 3.2c).

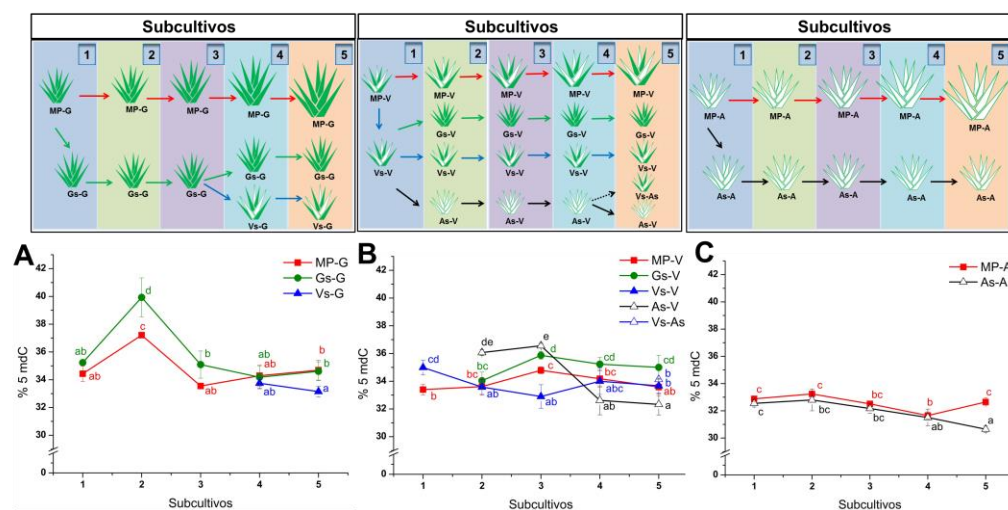


Figura 3.2. Diagrama de segregación por cada fenotipo, seguido por los niveles de metilación global en el ADN en las plantas madre (MP) y los brotes (s) de las plántulas verdes (G), variegadas (V) y albinas (A). En los tres paneles superiores se esquematizan los diferentes subcultivos así como la aparición de la variación en cada uno de los cinco subcultivos evaluados. Las flechas rojas representan las MP en el fenotipo G (MP-G), V (MP-V) y A (MP-A). Las flechas verde, azul y negro representan los brotes G (Gs), V (Vs) o A (As) de los fenotipos G (Gs-G; Vs-G), V (Vs-V; Gs-V; As-V and Vs-As) y A (As-A), respectivamente, durante cinco subcultivos. En las gráficas A, B y C se muestran el porcentaje de 5mC en MP y los brotes de los fenotipos G, V y A. Todas las muestras de las MP y los brotes obtenidos durante la micropropagación de cada fenotipo fue cuantificado en cada subcultivo y se representa el porcentaje de 5mC de cada muestra en la gráfica A (G), B (V) y C (A). Los puntos en el gráfico representan la media de tres réplicas biológicas de tres experimentos independientes. Las diferencias significativas están marcadas por diferentes letras en cada punto de datos, de acuerdo a la comparación estadística llevada a cabo por el análisis de varianza (ANOVA) $P < 0.05$.

3.4 DISCUSIÓN

El albinismo no es evento común en la naturaleza pero puede surgir de manera fortuita (Kumari *et al.*, 2009; Smith, 1999). El albinismo en plantas ha sido observado en la micropropagación de importantes cultivos como cebada (Dunford y Walden, 1991), trigo (Tuveson *et al.*, 1989) y arroz (Harada *et al.*, 1990), y por esa razón es considerada una

variación somaclonal con relevantes implicaciones biológicas (Kumari *et al.*, 2009; Yao *et al.*, 1995; Tuvevsson *et al.*, 1989). Existen causas genéticas (Yao y Cohen, 2000; 1995; Dunford y Walden, 1991) e inclusive epigenéticas que pudieran explicar parcialmente el albinismo (Wang *et al.*, 2016; Zaffari *et al.*, 1998). En el presente estudio se estudiaron las diferencias fenotípicas y morfofisiológicas, así como el papel de la metilación global en el ADN, en los tres diferentes fenotipos somaclonales de *A. angustifolia*. Se observó que el albinismo causado por las condiciones *in vitro* afecta el metabolismo de las plántulas y probablemente esta variación esté asociada a los cambios en los niveles de metilación global en el ADN.

3.4.1 DIFERENCIAS FISIOLÓGICAS ENTRE LAS VARIANTES VERDES, VARIEGADAS Y ALBINAS

Los tres fenotipos mostraron diferencias en el contenido de pigmentos (Cuadro 2.1), la morfología del complejo estomático (Figura 2.2 y 2.3) y el metabolismo (Figura 2.4). Por esa razón se planteó la hipótesis de que esas diferencias podrían afectar el crecimiento y la capacidad organogénica de las plántulas. El análisis del peso fresco y altura de las plantas G, V y A durante cinco subcultivos (Figura 3.1a, b) revelaron interesantes diferencias, especialmente en las plántulas A. En otras especies que son micropropagadas, los brotes albinos tienen un crecimiento lento. Por ejemplo, en la micropropagación de brocado “Pink”, las plántulas verdes tienen una mayor altura y peso fresco que las plántulas albinas (Chin, 1980). Estudios en la regeneración de brotes albinos en la micropropagación de *Soymida febrifuga* revelaron que los brotes albinos crecen muy lento en comparación con el fenotipo verde (Chiruvella *et al.*, 2014). En mis resultados encontré que aunque hay diferencias muy marcadas en el fenotipo y el metabolismo existente entre G, V y A, no hay diferencias significativas en la capacidad para regenerar brotes o el índice de multiplicación entre los fenotipos somaclonales durante los primeros tres subcultivos (Figura 3.1c, d). Sin embargo, en el cuarto y quinto subcultivo, la capacidad de A para generar brotes disminuyó, mientras que la del fenotipo V incrementó, incluso más que el fenotipo G (Figura 2.5c). Las plántulas V podrían tener una mayor capacidad organogénica debido a las diferencias fisiológicas que les permite mejorar su habilidad para responder a las condiciones de estrés durante el cultivo *in vitro* (Duarte-Aké *et al.*, 2016). Como se discutió en el capítulo II de esta tesis, el contenido total de clorofila fue mayor en la sección GV que en la región AV, inclusive en las

plántulas G (Cuadro 2.1) y también se encontró un incremento de malato en las plántulas V (Figura 2.4). Por lo tanto, es posible que esas ventajas fisiológicas pudieran mejorar su habilidad para generar más brotes durante el cultivo *in vitro*. Durante la generación de brotes en callos de tabaco, un dramático incremento en la acumulación de malato en los tejidos cultivados después de la formación de brotes fue observado (Plumb-Dhindsa *et al.*, 1979). Sin embargo, una vez que los brotes han sido formados, el contenido de malato comienza a declinar. En este caso, el malato actúa en parte como un agente osmótico, regulando la expansión celular entre las sucesivas divisiones celulares (Plumb-Dhindsa *et al.*, 1979).

3.4.2 CAMBIOS EN LOS NIVELES GLOBALES DE METILACIÓN EN EL ADN Y LA VARIACIÓN FENOTÍPICA

Entre las marcas epigenéticas asociadas a la VS, la metilación en el ADN es la más estudiada en variantes somaclonales (Baranek *et al.*, 2010; Bairu *et al.*, 2010; Schellenbaum *et al.*, 2008; Jaligot *et al.*, 2002; Kaeppler *et al.*, 2000; Smulders *et al.*, 1995; 1993; Kaeppler y Philips, 1993). Por lo tanto, el análisis epigenético fue necesario para entender el papel de la metilación en el ADN en las condiciones del ambiente *in vitro* y la relación entre los niveles de metilación y la variación fenotípica encontrada en *A. angustifolia* (Figura 3.2). Hasta ahora, se sabe que la metilación en el ADN no sólo cambia de acuerdo al estado de desarrollo de las plantas, sino que también, con los sucesivos subcultivos, los cuáles han estado asociados con la variación fenotípica bajo condiciones *in vitro* (Rival *et al.*, 2013; Smýkal *et al.*, 2007; Díaz-Sala *et al.*, 1995). En la micropropagación de *Malus xiaojinensis*, se observaron variaciones en la morfología foliar después de varios subcultivos, y esta variación empezó a aparecer cuando los niveles de metilación empezaron a disminuir (Huang *et al.*, 2012). En *A. angustifolia*, se determinó que los brotes variantes empezaron a aparecer en el segundo y el cuarto subcultivo en las plántulas variegadas y verdes respectivamente (Figura 3.2). Entonces, se planteó la hipótesis de que los niveles de metilación podrían cambiar cuando la variación ocurre. Encontramos que en efecto hay un cambio en la metilación cuando la variación aparece (Figura 3.2). En el segundo subcultivo del fenotipo G, hubo un incremento substancial en los niveles de metilación. En el tercer subcultivo, los niveles de metilación disminuyeron, y en el cultivo subsecuente, fue observado la aparición de los brotes V de las plantas G. Un patrón similar se encontró en las plántulas V, sugiriendo que el cambio en el porcentaje de

5mdC podría estar relacionado con la variación somaclonal encontrada en *A. angustifolia*. Se sabe que las condiciones *in vitro* causan modificaciones epigenéticas en las células que llevan a cabo constantes divisiones durante la formación de brotes (Feng *et al.*, 2010; Koukalova *et al.*, 2005; Avivi *et al.*, 2004; Joyce *et al.*, 2003; Gaspar *et al.*, 1996).

Durante el CTV, la diferenciación celular es caracterizada por una condensación en la cromatina por la activación de la transcripción y la síntesis y reparación del ADN (Zhao *et al.*, 2001), incluyendo las modificaciones en la metilación del ADN. Además, durante el desarrollo *in vitro*, los eventos de diferenciación y regeneración están caracterizados por grandes cambios en la metilación en el ADN. Por ejemplo, en *Populus trichocarpa*, se observó que los tejidos diferenciados tenían eventos de hipermetilación en su genoma, mientras que las plantas regenerantes presentaban una hipometilación (Vining *et al.*, 2013). Esto sugirió que la variación epigenética podría ser causada por un restablecimiento incompleto de las marcas epigenéticas durante la regeneración adventicia y el estrés causado por las condiciones *in vitro* (Us-Camas *et al.*, 2014). Entonces, es posible que durante la multiplicación del fenotipo G, las células que forman el meristemo llevaron a cabo un restablecimiento incompleto de esas marcas epigenéticas. Estas células meristemáticas y otras que tuvieron un correcto restablecimiento epigenético de las plántulas G, se dividieron, multiplicaron y formaron los brotes con fenotipo V. De hecho, los brotes V tienen un nivel de metilación diferente a los brotes G (Figura 3.2). Stroud *et al.*, (2013) observaron que el cultivo de tejidos puede causar cambios al azar, afectando ciertos individuos. En este caso, el proceso de cultivo de tejidos causa una hipometilación en diferentes sitios del genoma de algunos regenerantes. A pesar de que en la mayoría de los regenerantes se mantenían eventos de hipometilación, otros presentaban cambios de híper e hipometilación. Los autores postularon que esos cambios epigenéticos podrían explicar por qué sólo una proporción de individuos presentan variaciones fenotípicas.

Los hallazgos en las plántulas V refuerzan la idea de que la metilación juega un papel importante en la variación fenotípica. De acuerdo con los que se observó en el subcultivo cuatro, los brotes V generaron brotes con fenotipo A (Figura 3.1). Este cambio fotosintético, de células sin cloroplastos a células con cloroplastos, fue acompañado por una disminución en los niveles de metilación de las plántulas albinas. En *Clivia miniata*, el

análisis específico de los sitios que presentaban una hipometilación en los fenotipos variegados y amarillos revelaron que los genes implicados en la biogénesis del cloroplasto, son regulados por la metilación en el ADN (Wang *et al.*, 2016). Esto sugiere que la pérdida de metilación permite la expresión de un “restablecimiento completo” de las células en los brotes V para generar brotes con fenotipo A. Una posible explicación podría ser que la metilación en el ADN podría funcionar como un apagador, y cuando la conformación de la cromatina sufre drásticos cambios debido a las modificaciones en metilación, reprimiendo genes, permitiendo la generación de brotes variantes.

3.5 CONCLUSIONES

- A pesar de las diferencias contrastantes, los tres fenotipos mantuvieron su capacidad para generar brotes en cada subcultivo.
- El análisis sistemático de los patrones de Metilación del ADN reveló que los cambios a la alta y luego a la baja, es decir, una hipermetilación precedida a una hipometilación, generan variación somaclonal en los fenotipos G y V de *A. angustifolia*.

CAPÍTULO IV

PARTICIPACIÓN DE LA REDUCCIÓN DE LOS COMPONENTES DEL MEDIO DE CULTIVO Y LA CONCENTRACIÓN DE BENZILADENINA EN EL PORCENTAJE DE VARIACIÓN Y LOS NIVELES DE METILACIÓN EN EL ADN EN LOS FENOTIPOS VERDES, VARIEGADOS Y ALBINOS

4.1 INTRODUCCIÓN

Entre los sistemas *in vitro*, la micropropagación es el método más utilizado para la propagación a gran escala de especies cultivadas de importancia agroeconómica. Entre las diferentes técnicas de micropropagación, la propagación vegetativa de brotes adventicios, vía organogénesis, es la más usada para la producción rápida de un gran número de plantas a partir de un explante (Sugiyama, 1999; Seckinger, 1991). Durante la organogénesis, el proceso de división celular, comienza cuando las células que conforman el meristemo de las plantas madre, cambian su programación, se diferencian y dan lugar a brotes que crecerán y darán a lugar individuos clonales, permitiendo el establecimiento de un cultivo genéticamente homogéneo (Zhao *et al.*, 2008; Thorpe, 1990).

Durante el CTV se utilizan diferentes componentes en el medio de cultivo para favorecer o afectar la respuesta organogénica. El medio de cultivo es siempre un factor importante, que provee, tanto los nutrientes, como el ambiente osmótico, óptimo para los eventos morfogénicos. Los nutrientes son uno de los componentes más importantes, ya que la ausencia o reducción de estos, puede afectar fuertemente el crecimiento, el grado y la calidad de la respuesta morfogénica (Niedz y Evens, 2007). Por ejemplo, la concentración de NH_4^+ y NO_3^- puede afectar la regeneración de brotes en pera (Leblay *et al.*, 1991) y agave (Robert *et al.*, 2006). También se ha observado que, variando el nivel de Na_2SO_4 , se puede incrementar la regeneración de brotes (Chandramu *et al.*, 2003). Por otro lado, los reguladores del crecimiento, especialmente los niveles de auxinas y citocininas son sumamente importantes en la formación de órganos y la multiplicación *in vitro* de diferentes especies (Pernisová *et al.*, 2009; Skoog y Miller, 1957).

Sin embargo, eventualmente, durante el proceso de organogénesis se puede observar diferentes fenotipos con una variedad de características que son diferentes a la planta que

les dio origen. La VS aparece de forma inesperada y puede afectar negativamente el fenotipo de los clones obtenidos. En general, los principales factores que están asociados a la VS pueden agruparse en tres principales: a) factores genéticos (ej. variabilidad genética, nivel de ploidía, actividad transposónica, entre otros); b) factores externos, (temperatura, e intensidad lumínica), componentes del medio de cultivo (fuente de carbono, vitaminas y minerales) (Kou *et al.*, 2011), el balance y la concentración de los reguladores de crecimiento (Jaligot *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2004; Joyce y Cassells, 2002; Gaspar *et al.*, 1996; LoSchiavo *et al.*, 1989), y los subcultivos; c) factores epigenéticos.

Algunos de los factores externos asociados con la VS también han sido asociados a la aparición de variegación y en algunos casos al albinismo en las plantas (Liu *et al.*, 2012; Jacquard *et al.*, 2009; Nuutila *et al.*, 2000; Collins, 1927). Por ejemplo, debido a que las mutantes que presentan variegación no pueden metabolizar algunas vitaminas y minerales, se han realizado diferentes experimentos para tratar de revertir este fenómeno. Las mutantes *yellow stripe* (*ys1*) de maíz no pueden producir hierro, sin embargo, cuando son cultivadas en medios enriquecidos con este mineral, sus hojas pueden revertir a un color verde (von Wiren *et al.*, 1994; Bell *et al.*, 1962). También, el albinismo ha sido tratado, modificando la fuente de carbono, resultando en la regeneración de plantas verdes (Wojnarowicz *et al.*, 2004). Saidi *et al.*, (1997) determinaron que en el cultivo de anteras, las plantas albinas de *Triticum turgidm spp. durum*, siempre revertían de albino a verde, cuando la concentración de azúcar era cambiada en el medio de cultivo. Otros investigadores encontraron una relación positiva entre la concentración de manitol y la regeneración de plantas verdes de cebada (Cistué *et al.*, 1994). En cebada se ha reportado, que usando un medio de cultivo adicionado con almidón y melibiosa se pudo disminuir la aparición de plántulas albinas en cebada (Sovari y Schieder, 1987). Por otro lado, en bambú, se ha sugerido que concentraciones elevadas de citocininas, como el TDZ, y los subsecuentes subcultivos, son factores posiblemente involucrados en la aparición de plántulas albinas (Liu *et al.*, 2007). Además, el análisis de las hojas variegadas de plátano ha revelado que el contenido de citocininas es dos veces más alto en la región verde que en la amarilla, sugiriendo una alteración en el metabolismo de las citocininas en las plantas variegadas (Zaffari *et al.*, 1998). Sin embargo, aunque existen diversos estudios en los que se sugiere que los factores externos del cultivo de tejidos,

podrían incrementar o reducir la aparición del albinismo, las causas siguen siendo desconocidas en estas especies.

Por otro lado, muchas de las variaciones encontradas en el cultivo *in vitro* se han relacionado con cambios epigenéticos, entre ellos la metilación en el ADN. Por ejemplo, en palma aceitera (Ong-Abdullah *et al.*, 2015; Jaligot *et al.*, 2011; Jaligot *et al.*, 2002; Jaligot *et al.*, 2000), maíz (Kaepler y Philips, 1993), tomate (Smulders *et al.*, 1995), zanahoria (LoSchiavo *et al.*, 1989), orquídeas (Park *et al.*, 2009) y agave (Duarte-Aké *et al.*, 2016; Díaz-Martínez *et al.*, 2012; De la Peña *et al.*, 2012) entre otras. Recientemente, se ha revelado que el albinismo, una VS muy distintiva y fácil de reconocer, podría estar relacionado con cambios en los niveles de metilación del ADN. Por ejemplo, en clones de *Clivia miniata*, con fenotipos verde, amarillo y variegados, se encontró que las diferencias en los niveles de metilación están correlacionados con la intensidad de color que presentan las plántulas (Wang *et al.*, 2016). Adicionalmente, durante la micropropagación de variantes somaclonales de *A. angustifolia* se ha revelado que los cambios en los patrones de metilación global pueden asociarse con la generación de brotes con diferente fenotipo, ya que durante el seguimiento sistemático de los niveles de metilación global durante la micropropagación de plántulas con fenotipo verde y variegado se determinó que hay un aumento entre el 4 y el 6%, respectivamente (Figura 3.2). Estos hallazgos sugieren que el albinismo en agave es un evento epigenético y probablemente es ocasionado por las condiciones *in vitro*. Por esta razón, en este estudio se evaluó el efecto de diferentes factores asociados a la aparición del albinismo como la reducción en los componentes del medio de cultivo (RCM) y la concentración de BA durante cinco subcultivos en la capacidad organogénica, la variación fenotípica y los niveles de metilación en los fenotipos G, V y A, para entender qué factor induce o incrementa la variación fenotípica y los cambios en la metilación del ADN.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 MATERIAL VEGETAL, CONDICIONES DE CULTIVO Y TRATAMIENTOS

Los experimentos de reducción de los componentes del medio de cultivo se iniciaron con 25 plántulas de cada fenotipo, las cuales fueron subcultivadas cinco veces. En el caso de los experimentos con BA, cinco plantas fueron usadas en el comienzo del experimento y también fueron subcultivadas por cinco ciclos. En ambos experimentos se utilizaron

plantas de dos meses de edad de los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A). Estas plantas fueron cultivadas en cajas Magentas que contenían 50 ml de medio modificado de Murashige y Skoog, suplementado con 0.11 μM de 2,4-D y 22.2 μM de 6 BA y solidificado con agar (0.2%) y gel-rite (0.2%) en los tratamientos testigo. Para las condiciones de reducción de los componentes del medio de cultivo, el medio fue diluido a la mitad, a un cuarto y un octavo de su concentración antes de adicionar el agar y el gel-rite. En los tratamientos con BA, se utilizaron 22.2 (testigo) 44.4, 66.6 y 88.8 μM . Las plántulas fueron incubadas en el cuarto de cultivo a 27 ± 2 °C bajo 12 h de fotoperiodo ($40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) por 28 días en cada subcultivo, por cinco subcultivos en total en cada tratamiento.

4.2.2 DISEÑO EXPERIMENTAL

Se llevaron a cabo dos experimentos independientes para la evaluación del efecto de los factores externos: reducción de los componentes del medio de cultivo (RCM) y el balance en la concentración de BA, en la regeneración de brotes, el porcentaje de variación y en los niveles globales de metilación en el ADN. Todos los tratamientos fueron llevados a cabo en las condiciones descritas anteriormente. En cada subcultivo, los brotes obtenidos fueron cuantificados y clasificados de acuerdo a su tamaño (los brotes pequeños: 0.5-1 cm; brotes medianos: 1-2 cm y los brotes grandes: de más de 2 cm) y el fenotipo: G, V y A. El número total de brotes obtenidos fue cuantificado para analizar la tasa de multiplicación entre los tratamientos en cada fenotipo. Los nuevos brotes obtenidos con diferentes fenotipos fueron cuantificados y cultivados en cajas Magenta de forma individual. El número de brotes y la tasa de multiplicación fueron determinados en cada uno de los cinco subcultivos. La variación fenotípica de los brotes nuevos fue analizada en cada uno de los cinco subcultivos y el porcentaje de variación fue calculada partiendo del número total de brotes generados como el 100%.

4.2.3 DETERMINACIÓN DE EL PORCENTAJE DE VARIACIÓN

Las plantas cultivadas en los diferentes tratamientos fueron subcultivadas cinco veces. En cada subcultivo, las plántulas fueron monitoreadas para identificar la presencia de variantes fenotípicas. Para calcular el porcentaje de variación, el número de brotes obtenidos en cada línea de cultivo (G, V y A), fue tomando en cuenta como el cien por ciento, y el número de brotes con fenotipo diferente en cada línea de cultivo, fue usado

para sacar el porcentaje de variación en cada línea clonal. Es decir, se multiplicó el número de individuos con fenotipo diferente por 100, entre el número total de brotes obtenidos en cada línea clonal.

4.2.4 ANÁLISIS DE LOS NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL DEL ADN

El ADN genómico de cada uno de los fenotipos y tratamientos fue extraído de acuerdo al protocolo descrito por Echavarría-Machado *et al.*, (2005). Brevemente, 200 mg de brotes obtenidos en cada subcultivo, durante la micropropagación, fueron colectados, macerados con nitrógeno líquido y mezclados con el amortiguador de extracción usando 100 mM Tris-HCL (pH 8.0), 50 mM EDTA y 500 mM de NaCl, suplementado con 20% de SDS y 100 mM β -mercaptoetanol. La precipitación del ADN fue llevada a cabo con la adición de 4 M de acetato de sodio. Para el análisis de la metilación en el ADN se siguió el método descrito por Nic-Can, *et al.*, (2013). Brevemente, cinco μ g de ADN de cada muestra fue hidrolizada y mezclada con 5 μ l del amortiguador de digestión 10X (200 mM de ácido acético, 200 mM de glicina, 50 mM de cloruro de magnesio, 5 mM de acetato de zinc, 2 mM de cloruro de calcio, ajustado con hidróxido de sodio a pH 5.3), 2 μ l de DNAsa I (D2821-Sigma, 10 U μ l⁻¹) y 1 μ l de nucleasa P1 (N8630-Sigma, 1.25 U/ μ l) e incubado toda la noche a 37 °C. Las muestras fueron mezcladas con 5 μ l de 100 mM de NaOH y 2 μ l de fosfatasa alcalina (P4879-Sigma, 1 U μ l⁻¹) e incubada por 3.5 h a 37 °C. Las muestras fueron analizadas por HPLC y el porcentaje de metilación en el ADN fue obtenido de los cromatogramas usando el área de los picos para determinar la concentración de 2'-deoxycytosine (dC) y 5-methyl-2'-deoxycytosine (5mdC) en la muestra (%5mdC= $C_{5mdC} / [C_{5mdC} + C_{dC}] \times 100$), donde C es la concentración. Todo el análisis fue realizado con tres réplicas de diferentes extracciones de ADN.

4.2.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron analizados usando el programa Origin 8. El análisis de varianza (ANOVA) fue usado para calcular el significado estadístico de la media $\pm$ ES. Las diferencias significativas fueron determinadas usando la prueba de Tukey con un valor de $P < 0.05$

4.3 RESULTADOS

4.3.1 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE RCM Y EL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE BA EN LA CAPACIDAD ORGANOGÉNICA DE LAS PLÁNTULAS G, V Y A

Para evaluar si el periodo prolongado en un medio con deficiencias nutrimentales o el uso prolongado de altas concentraciones de BA podrían haber influido en la aparición de las variantes somaclonales, se evaluó el efecto de la reducción de la fuerza iónica del medio de cultivo a la mitad (1/2), una cuarta parte (1/4) y un octavo (1/8), en el cultivo de cada uno de los fenotipos G, V y A así como la adición de diferentes concentraciones de BA: 44.4, 66.6 y 88.8 μ M en las plantas G, V y A, durante cinco subcultivos.

Primeramente se evaluó el efecto de la reducción de la fuerza iónica del medio de cultivo. Como se muestra en la Figura 4.1, la capacidad organogénica varía dependiendo del tratamiento y del fenotipo. En el caso de las plantas G, la capacidad para generar brotes fue afectada severamente en los tratamientos de 1/4 y 1/8 (Figura 4.1a, d) durante todos los subcultivos, respecto al testigo (medio de cultivo completo). Por otro lado, del tercer al quinto subcultivo, el tratamiento de 1/2 presentó una reducción ligeramente a más del 50% en el número total de brotes generados, respecto al tratamiento testigo (Figura 4.1d). En comparación con el fenotipo G, las plántulas con fenotipo V que estuvieron bajo los tratamientos de 1/2, 1/4 y 1/8 no presentaron una disminución considerable de la capacidad organogénica (Figura 4.1b, e). Los tratamientos de 1/2, 1/4 y 1/8 mostraron una producción total de brotes de 879 ± 126 , 701 ± 219 y 463 ± 89 en el quinto y último subcultivo comparado con el medio normal en el que las plantas generaron un total de $5,235 \pm 345$ brotes. Estos datos sugieren que las plántulas V, a diferencia de las plántulas G, tienen la capacidad de adaptarse a las condiciones de “estrés” a la RCM. En el caso del fenotipo A, los tratamientos de reducción de la fuerza iónica generaron la muerte de las plántulas desde el segundo subcultivo en el tratamiento de 1/2 y desde el primer subcultivo en los tratamientos a 1/4 y 1/8 (Figura 4.1c). Esto no ocurrió en el medio de cultivo completo (testigo). Por lo tanto, se puede concluir que los RCM afectó severamente la sobrevivencia de las plántulas con fenotipo A.

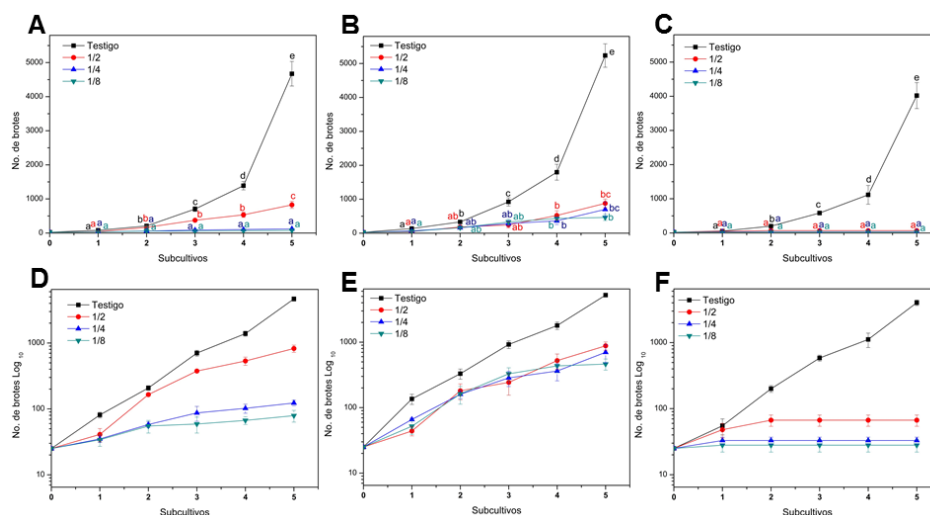


Figura 4.1. Variación en la capacidad organogénica de las variantes somaclonales: verde (G), variegado (V) y albino (A) bajo el tratamiento de reducción de los componentes del medio de cultivo (RCM) durante cinco subcultivos. Número total de brotes obtenidos de los fenotipos G (A) V (B) y A (C), durante cinco subcultivos. El número total de brotes obtenidos de los fenotipos G (D), V (E) y A (F) durante cinco subcultivos en log 10. Los puntos representan la media $\pm$ error estándar por tres replicas biológicas. Las diferencias significativas de acuerdo con el análisis de variancia (ANOVA) $P < 0.05$ están representadas con las diferentes letras por cada punto en el gráfico.

Para saber si la adición de diferentes concentraciones de BA podría afectar en número de brotes en cada uno de los fenotipos G, V y A, se adicionó al medio de multiplicación diferentes concentraciones de BA: 44.4, 66.6 y 88.8 μM y se evaluó su efecto en el número total de brotes generados, durante cinco subcultivos. El fenotipo G presentó un ligero aumento en la generación de brotes en todos los tratamientos respecto al testigo (22.2 μM) hasta el tercer subcultivo (Figura 4.2a, d). La propagación comenzó con 5 plántulas en cada tratamiento y al tercer subcultivo se generaron 157 ± 10 , 309 ± 32 , 201 ± 48 , 299 ± 77 , en 22.2, 44.4, 66.6 y 88.8 μM de BA, respectivamente. Del tercer al quinto subcultivo se puede apreciar que en los tratamientos de 66.6 y 88.8 μM generaron un total de brotes ligeramente mayor que el testigo. Sin embargo, la concentración de 44.4 μM fue la que produjo mayor número de brotes en las plantas G. Lo mismo se obtuvo en el caso de las plantas V. Caso contrario fue para las plantas A, en las que las concentraciones más altas de BA (66.6 y 88.8 μM) fueron las que generaron mayor número de brotes.

Incluso en el cuarto y quinto subcultivo se contabilizaron el triple número de brotes en estas concentraciones que en el testigo o en la concentración de 44.4 μ M.

4.3.2. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LOS RCM Y EL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE BA EN LA VARIACIÓN DE LOS BROTES DE LAS PLÁNTULAS G, V Y A

Después de observar que los tratamientos de RCM y de diferentes concentraciones de BA, afectan y modifican la capacidad organogénica de los tres fenotipos, quisimos entender si estos tratamientos podrían afectar la variación entre los fenotipos. Por esta razón, con el fin de evaluar de qué forma afectaba los RCM y el uso de altas concentraciones de BA la variación fenotípica de G, V y A, se monitorearon sistemáticamente los cambios fenotípicos que presentaron los brotes de las plántulas en los diferentes tratamientos y se calculó el porcentaje de variación en cada uno de los cinco subcultivos (Figuras 4.3 y 4.4).

Los tratamientos de reducción de fuerza iónica provocaron cambios en la coloración de las plántulas G (Figura 4.3a, d), necrozamiento y muerte en las plántulas A (Figura 4.3c, f). Sin embargo, en las plántulas V no se observaron cambios aparentes en la coloración (Figura 4.3b). También se pudieron observar cambios de coloración de las plántulas G que fueron cultivadas en los tratamientos de 1/2, 1/4 y 1/8 (Figura 4.3a). El 10% de los brotes obtenidos en el tratamiento de 1/4, en el cuarto y quinto subcultivo tenían hojas con una coloración purpura (Figura 4.3a, d), lo cual es un indicativo de estrés en las plantas de agave. Por otro lado, las plántulas que fueron cultivadas en 1/8, tenían una coloración muy pálida desde el tercer subcultivo, y la tonalidad verde fue disminuyendo hasta el quinto subcultivo. En cuanto a los porcentajes de variación (Figura 4.3d), las plántulas G que fueron propagadas dieron lugar a brotes V en el cuarto y quinto subcultivo en un 2% y 6% respectivamente.

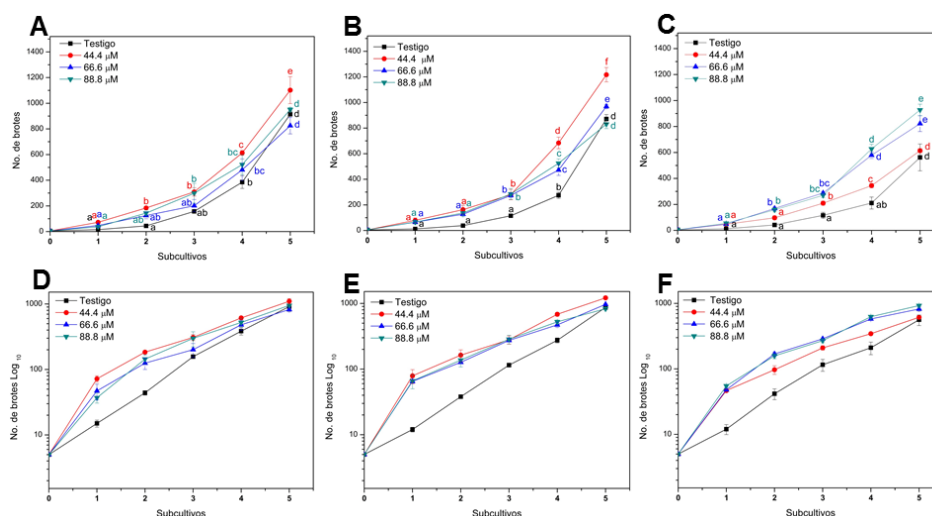


Figura 4.2 Variación en la capacidad organogénica de las variantes somaclonales: verde (G), variegado (V) y albino (A), bajo diferentes concentraciones de BA en el medio de cultivo durante cinco subcultivos. Las gráficas representan el número total de brotes obtenidos de los fenotipos G (A), V (B) y A (C), durante cinco subcultivos y el número total de brotes obtenidos en escala logarítmica de los fenotipos G (D), V (E) y A (F) durante cinco subcultivos. Los puntos representan la media $\pm$ error estándar por tres replicas biológicas. Las diferencias significativas de acuerdo con el análisis de variancia (ANOVA) $P < 0.05$ están representadas con las diferentes letras por cada punto en el gráfico.

En el caso de las plántulas V, éstas no presentaron cambios aparentes en la coloración (Figura 4.3b), sin embargo, si presentaron diferentes porcentajes de variación (Figura 4.3e). Por ejemplo, las plántulas cultivadas en el medio testigo (completo) generaron el 2 (19 de 990 brotes), 5 (138 de 2769 brotes), 16 (862 de 5388 brotes) y 10% (1569 de 15705 brotes) de brotes con un fenotipo G, en el segundo, tercer, cuarto y quinto subcultivo respectivamente. Así también, se observó la generación de brotes albinos en un 2% tanto en el cuarto como en el quinto subcultivo, en el medio de cultivo testigo (Figura 4.3d). Sin embargo, en el tratamiento de 1/2 se observó una reducción en la generación de brotes G de un 11% en el segundo subcultivo a un 4% en el quinto subcultivo. Caso contrario en el tratamiento de 1/4, en donde se observó un incremento en el porcentaje de brotes G generados de un 6% en el segundo subcultivo a un 16% en el último subcultivo. Las plantas V que fueron cultivadas en 1/8 mantuvieron un porcentaje

de 2% de brotes G generados a partir del segundo subcultivo, sin embargo, súbitamente en el quinto subcultivo, los brotes G generados aumentó a un 9%.

Por otro lado, para el caso de las plántulas A, éstas fueron afectadas severamente en todos los tratamientos de reducción de la fuerza iónica (Figura 4.3c, f). En el tratamiento de 1/2 desde el tercer subcultivo se observaron tejidos necrosados en los brotes. Además de presentar una reducción en el número total de brotes obtenidos en los tratamientos 1/4 y 1/8 (Figura 4.1b), las plántulas A comenzaron a morir desde el segundo subcultivo (Figura 4.3c). Estos resultados sugieren que los RCM afectan el fenotipo de las plántulas G y A, cambiando la coloración y provocando la muerte, respectivamente. En el caso de los porcentajes de variación en los nuevos brotes surgidos de las plantas A en los diferentes tratamientos, no se encontraron cambios de fenotipo y todos los brotes generados de las plantas A eran fenotipo A (Figura 4.3f).

En cuanto a los resultados de la evaluación de diferentes concentraciones de BA en la generación de brotes con variación, se determinó que la adición de diferentes concentraciones de BA en el medio de cultivo, aumentó el porcentaje de variación en las plántulas G y V, sin embargo, en las plantas A no se generaron brotes de ningún fenotipo que no sea el A (Figura 4.4). Como se muestra (Figura 4.4d) las plántulas G, que fueron sometidas a los tratamientos testigo, 44.4 y 66.6 μM de BA, generaron brotes con fenotipo diferente, es decir las plántulas G, generaron brotes V. En el tratamiento testigo, las plántulas G generaron el 2% de brotes V en el cuarto (23 de 1155 brotes) y quinto subcultivo (55 de 2742 brotes); solamente en el quinto subcultivo se pudo observar que en el tratamiento a 44.4 μM de BA, las plántulas G, generaron en un 4% de brotes V (132 de 33016 brotes). El tratamiento 66.6 μM de BA, generó un total de 8% de brotes V en el cuarto (115 de 1443 brotes) y quinto subcultivo (198 de 2475 brotes). Sorprendentemente, en el tratamiento más elevado de BA a 88.8 μM , no se observó la aparición de brotes V.

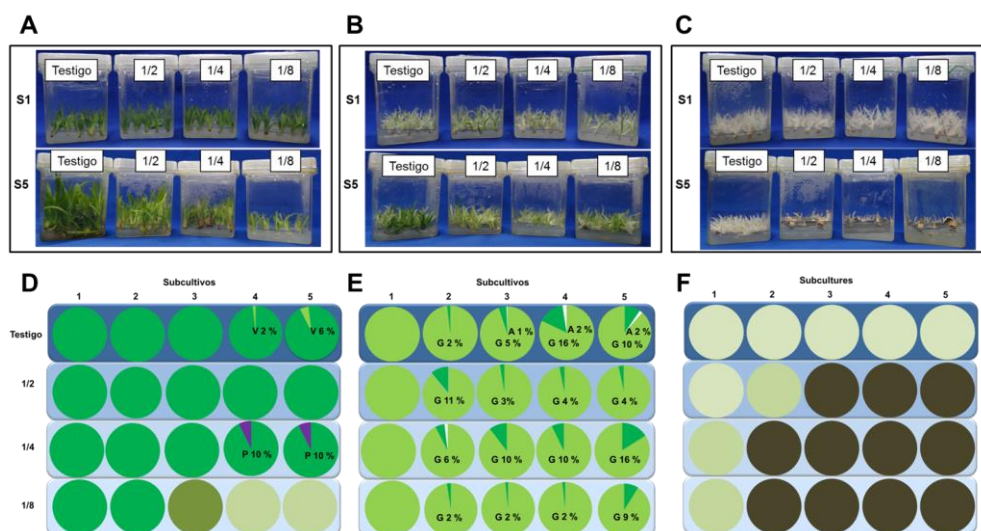


Figura. 4.3 Cambios en los porcentajes de variación fenotípica en las plántulas con fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A) bajo el cultivo con medio Testigo (medio completo) y los tratamientos en la reducción de los componentes del medio de cultivo (RCM) a 1/2, 1/4 y 1/8, durante cinco subcultivos. En los paneles en la parte superior (A), (B) y (C) se muestra la comparación del fenotipo de los brotes obtenidos en el primer (S1) y el quinto (S5) subcultivo los fenotipos G, V y A, respectivamente. En los paneles de la parte inferior, se muestran los porcentajes de variación obtenidos de los fenotipos G (D), V (E) y A (F) en cada uno de los cinco subcultivo. En los diagramas de pastel, los brotes originados de los fenotipos están representados en diferentes colores: verde oscuro para el fenotipo G, verde claro para el fenotipo V y blanco para el fenotipo A. Los cambios en la coloración están representados en morado (plantas que presentaron una coloración purpura (P)), café (tejidos necróticos) y beige (tejidos con una coloración pálida).

Por otro lado, las plántulas V (Figura 4.4e), generaron brotes con los tres fenotipos G, V y A, en todos los tratamientos, incluyendo el testigo. En todos los tratamientos se observó la aparición de brotes con fenotipo G desde el segundo ciclo de cultivo. El tratamiento con 88.8 μ M de BA generó el mayor porcentaje de brotes con fenotipo G del número total de brotes, siendo el 21% (86 de 411 brotes) en el segundo subcultivo, 21% (178 de 855 brotes) en el tercer subcultivo, 29% (457 de 1575 brotes) en el cuarto subcultivo y 33% (822 de 2493 brotes) en el quinto y último subcultivo. En el testigo sólo generaron 2 brotes que representa el 2% en el segundo subcultivo (114 brotes en total) y en el tercer, cuarto

y quinto subcultivo se generaron el 5% (17 de 345 brotes), 18% (148 de 825 brotes) y 16% (418 de 2613 brotes), respectivamente. En el caso de la aparición de brotes con fenotipo A, en el tratamiento 66.6 μ M de BA, éstos fueron observados desde el segundo subcultivo a diferencia del testigo y el tratamiento de 44.4 μ M de BA, en el que se observaron brotes con fenotipo A, en el cuarto y quinto subcultivo. En el tratamiento 66.6 μ M de BA, en comparación a todos los tratamientos, incluyendo el testigo, se observó el mayor porcentaje de brotes con fenotipo A, siendo un 3% (11 de 381 brotes) en el segundo subcultivo, un 4% (33 de 822 brotes) en el tercer y cuarto subcultivo (56 de 1416 brotes) y por ultimo un 7% (203 de 2907 brotes) en el quinto subcultivo. En el tratamineto con la más alta concentración de BA, 88.8 μ M, se observaron brotes A desde el tercer subcultivo con un 2% (17 de 855 brotes), en el cuarto con un 6% (94 de 1575 brotes) y en el quinto subcultivo con un 4% del total de brotes generados (99 de 2493 brotes).

Las plantas albinas, no generaron brotes con fenotipos G o V, por lo tanto no tuvieron variaciones durante los cinco subcultivos.

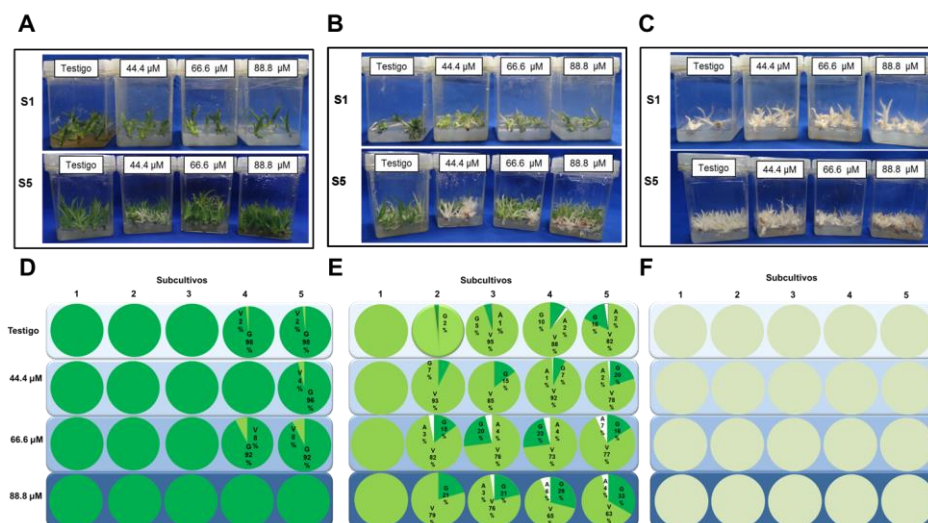


Figura 4.4 Cambios en los porcentajes de variación presentes en las plántulas micropropagadas con fenotipo verde (G), variegado (V) y albino (A). Estos fenotipos fueron cultivados bajo diferentes concentraciones de BA, 44.4, 66.6 y 88.8 μM y el tratamiento testigo (22.2 μM). Las plántulas de cada fenotipo fueron subcultivadas durante cinco ciclos. En los paneles en la parte superior (A), (B) y (C) se muestra la comparación del fenotipo de los brotes obtenidos en el primer (S1) y el quinto (S5) subcultivo los fenotipos G, V y A, respectivamente. En los paneles de la parte inferior, se muestran los porcentajes de variación obtenidos de los fenotipos G (D), V (E) y A (F) en cada uno de los cinco subcultivo. En los diagramas de pastel, los brotes originados de los diferentes fenotipos están representados en diferentes colores: verde oscuro para el fenotipo G, verde claro para el fenotipo V y blanco para el fenotipo A.

4.3.3. EVALUACIÓN DEL EFECTO DE RCM Y EL AUMENTO EN LA CONCENTRACIÓN DE BA EN LOS NIVELES GLOBALES DE METILACIÓN EN EL ADN EN LAS PLÁNTULAS G, V Y A

Los tratamientos de RCM (Figura 4.3) y las altas concentraciones de BA (Figura 4.4) afectaron el fenotipo de los brotes obtenidos, modificaron los porcentajes de variación en cada línea clonal de las plántulas G, V, A. Sin embargo, era necesario saber si estos tratamientos podrían afectar también los niveles de metilación y qué tratamiento afectaba más la metilación de los fenotipos G, V y A. Para ello, se cuantificaron los niveles de metilación en el ADN de forma global en los fenotipos G, V y A que fueron cultivados en tratamientos de reducción de fuerza iónica del medio de cultivo y bajo diferentes

concentraciones de BA. Los porcentajes de metilación en las plántulas con fenotipo G, V y A variaron significativamente de acuerdo al fenotipo, el tipo de tratamiento y los subcultivos (Figura 4.5). En los tratamientos de RCM se observaron diferencias en los tres fenotipos por subcultivo (Figura 4.5a, b, c).

Los niveles de metilación de las plántulas G (Figura 4.5a) que fueron cultivadas en los tratamientos de 1/2 (29%), 1/4 (29%) y 1/8 (28%) fueron inferiores a las plantas cultivadas en el medio de cultivo testigo en los primeros dos subcultivos (32.25% y 37% en el primer y segundo subcultivo, respectivamente). A partir del tercer subcultivo se observaron los cambios más significativos en los niveles de metilación en todos los tratamientos (Figura 4.5a). El tratamiento testigo presentó una reducción de la metilación del 4% en comparación con los primeros subcultivos. En el caso de los tratamientos 1/2, 1/4 y 1/8, éstos presentaron un aumento en la metilación del 12%, 10% y 21%, respectivamente. En el cuarto subcultivo, aunque los niveles de metilación disminuyeron súbitamente, los tratamientos de 1/2 (36.7%), 1/4 (37.6%) y 1/8 (41.6%) presentaron una metilación superior al testigo (31.3%). Por último, en el quinto subcultivo se observó que en el medio de cultivo testigo se presentó el menor porcentaje de metilación (33.45%) y en los tratamientos 1/2, 1/4 y 1/8 se obtuvieron niveles de metilación de 36.74%, 42.52% y 52.25%, respectivamente. Estos resultados sugieren que en los primeros dos subcultivos los tratamientos de RCM disminuyeron los niveles de metilación. Sin embargo, a partir del tercer subcultivo los tratamientos de RCM favorecieron el aumento en la metilación global (Figura 4.5a).

En el fenotipo V (Figura 4.5b), en el primer subcultivo, los brotes cultivados bajo el tratamiento 1/8 obtuvieron el menor porcentaje de metilación global (27%), seguido del tratamiento 1/4 (27.66%) y 1/2 (29.79%) respecto al medio de cultivo testigo (32.16%). En el segundo subcultivo, los brotes del tratamiento 1/4 mostraron la más baja metilación (28%) respecto a los demás tratamientos y el testigo (34%). En el tercer subcultivo, de forma similar a las plántulas G, los brotes con fenotipo V que fueron cultivados bajo los tratamientos 1/2, 1/4 y 1/8 presentaron altos niveles de metilación 46.16%, 46.53% y 43%, respectivamente, en comparación con el testigo (32.3%). En el cuarto y quinto subcultivo, todos los tratamientos disminuyeron los niveles de metilación en las plántulas V. En el cuarto subcultivo, los brotes del tratamiento 1/8 pasaron de 39.25% a 31.31%. El

porcentaje de metilación en tratamiento 1/4 disminuyó a 33.11%, en el cuarto subcultivo. Sin embargo, en el quinto subcultivo, los niveles de metilación aumentaron a 39.47 %. Contrariamente, el tratamiento 1/2 y el testigo se mantuvieron en 36.7% y 34%, respectivamente. Estos resultados muestran que los tratamientos de RCM afectaron la metilación global del ADN, provocando una hipermetilación en los fenotipos G y V, sobre todo en el tercer subcultivo, sugiriendo que quizás el tercer subcultivo es el momento en el que la metilación es severamente afectada, ya que aumenta abruptamente y posteriormente disminuye.

En cuanto a las plántulas A, sólo las plántulas del tratamiento testigo fueron evaluadas durante cinco subcultivos, el tratamiento 1/2 pudo ser evaluado sólo durante los primeros subcultivos, el tratamiento 1/4 y 1/8 no pudieron ser evaluados después de primer subcultivo debido a que estas plantas no resistieron los tratamientos y murieron (Figura 4.3c, f). Como se muestra en la gráfica c, de la Figura 4.5, las plántulas A que fueron cultivadas en el medio de cultivo testigo mantuvieron su metilación entre 28.5 y 31.6% a lo largo de los cinco subcultivos. En el caso del tratamiento 1/2, los niveles de metilación se redujeron de 33.6% en el primer subcultivo a 28.5% en el segundo subcultivo. Los tratamientos 1/4 y 1/8 tuvieron niveles de metilación global de 31.6 y 32.5% en el primer subcultivo, respectivamente (Figura 4.5c).

En los tratamientos con BA a 44.4 μ M, 66.6 μ M y 88.8 μ M, se obtuvieron resultados interesantes en los fenotipos G, V y A (Figura 4.5d, e, f). En el fenotipo G (Figura 4.5d) se mantuvieron constantes los niveles de metilación en el testigo y 44.4 μ M durante los cinco subcultivos.

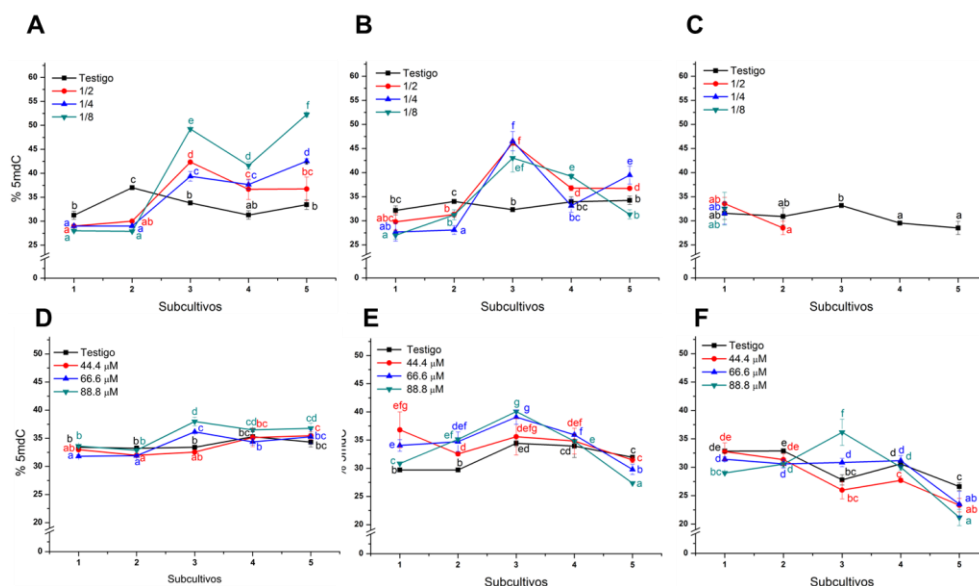


Figura 4.5 Variaciones en los niveles de metilación global del ADN en los fenotipos G, V y A. Las gráficas (A), (B) y (C) muestran los cambios en los porcentajes de metilación global del ADN (%5mdC) en los brotes con fenotipo G, V y A, respectivamente cultivados en medio de cultivo con reducción en los componentes nutrimentales durante cinco subcultivos. Las gráficas (D), (E) y (F) muestran los cambios en porcentaje de 5mdC en los brotes con fenotipo G, V y A, respectivamente cultivados en diferentes concentraciones de BA 22.2 μM (testigo), 44.4 μM, 66.6 μM y 88.8 μM durante cinco subcultivos. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras en cada punto del gráfico, de acuerdo con la comparación estadística realizada por el análisis de varianza (ANOVA) $P < 0.05$.

Para el caso de los tratamientos con 66.6 μM (36.14%) y 88.8 μM de BA (38%), se determinó un aumento en los niveles de metilación en el tercer subcultivo. Sin embargo, en el quinto subcultivo los tratamientos de 44.4 μM (35.5%) y 66.6 (35.3%) μM no mostraron diferencias significativas en los niveles de metilación, pero si hubo una diferencia importante entre el testigo (34.3%) y el tratamiento con 88.8 μM de BA (36.8%).

En las plántulas V (Figura 4.5e), todos los tratamientos tuvieron altos niveles de metilación en comparación con el testigo. Sin embargo, en los últimos dos subcultivos estos niveles disminuyeron significativamente. En el primer subcultivo las plántulas que fueron cultivadas en el tratamiento 44.4 μM de BA, obtuvieron el mayor NMG (36.8%), seguido

del tratamiento 66.6 μ M de BA (34%), 88.8 μ M de BA (31%) y el testigo (30%). En el tercer subcultivo, los tratamientos de 66.6 μ M y 88.8 μ M de BA tuvieron los niveles de metilación más altos de 39% y 40%, respectivamente, y el testigo y 44.4 μ M tuvieron los niveles más bajos (34.4% y 35.6%, respectivamente). Del cuarto al quinto subcultivo los niveles de metilación disminuyeron drásticamente en todos los casos, excepto en el testigo. Las plántulas cultivadas en el tratamiento testigo mantuvieron los niveles de metilación en 32%. Es importante resaltar que a diferencia de las plántulas G (Figura 4.5d) en las que se observó una mayor metilación en 88.8 μ M de BA que en el testigo en el quinto subcultivo, en las plántulas V (Figura 4.5e) sucedió lo opuesto, en el quinto subcultivo fueron las plantas testigo las que tuvieron mayor metilación que las plantas expuestas a 88.8 μ M de BA y lo mismo se observó en las plántulas A (Figura 4.5f). También de manera general se puede observar que en los tres fenotipos se aprecia una hipermetilación en el tercer subcultivo en presencia de 88.8 μ M de BA.

El patrón de metilación en las plántulas A (Figura 4.5f) con 88.8 μ M de BA tuvo una dinámica interesante. En el primer subcultivo, las plántulas cultivadas en este tratamiento tuvieron el nivel de metilación más bajo (26.6%) en comparación a los demás tratamientos: testigo (32.8%), 44.4 μ M (32.8%) y 66.6 μ M de BA (31.4%). Del segundo al tercer subcultivo el tratamiento de 88.8 μ M de BA aumentó sus niveles de metilación 6%, de 30.6% a 36.2%. En el cuarto subcultivo, las plántulas en este tratamiento volvieron a disminuir al 30% y para el último subcultivo, los niveles de metilación disminuyeron hasta 21.2%. Esto sugiere fuertemente que el uso prolongado de altas concentraciones de citocininas afecta de manera importante los niveles de metilación, teniendo posiblemente repercusiones en la expresión de genes.

4.4 DISCUSIÓN

La VS es un evento que puede suceder espontáneamente en las plantas que son cultivadas *in vitro* durante un largo periodo de tiempo. En general, la VS puede ser causada por diferentes factores: genéticos, externos y epigenéticos. Sin embargo, dependiendo de la especie, la aparición de VS tiene diversas causas, siendo las epigenéticas las menos estudiadas (Us-Camas *et al.*, 2014; Miguel y Marum, 2011; Rodríguez-Enriquez *et al.*, 2011; Bairu *et al.*, 2010).

Durante la micropropagación de *A. angustifolia*, se encontraron fenotipos con albinismo y variegación. Los resultados hasta el momento han apuntado a que el ambiente *in vitro* y los cambios epigenéticos están asociados para la generación de estas variantes somaclonales. Por esta razón, en esta parte de la investigación, se estudió el efecto de la RCM y diferentes concentraciones de BA, en el porcentaje de variación y los niveles de metilación global en el ADN en los tres fenotipos de *A. angustifolia*. Se observó que cada especie responde de forma diferente a cada uno de los tratamientos de RCM y BA. Los tratamientos de RCM afectan la capacidad organogénica de las plántulas y modifican la coloración de las hojas en los tres fenotipos; además, generan cambios significativos en los niveles de metilación en los fenotipos G y V en el tercer subcultivo. Respecto a los tratamientos con diferentes concentraciones de BA, las concentraciones más altas generaron un mayor número de brotes en las plántulas A, un mayor porcentaje de brotes con fenotipo G a partir de las plantas V y altos niveles de metilación en el tercer subcultivo en los tres fenotipos.

4.4.1 LA RCM AFECTA LA CAPACIDAD ORGANOGÉNICA Y LA COLORACIÓN DE LAS PLÁNTULAS

Debido a la importancia de los nutrientes del medio de cultivo en la respuesta organogénica, en esta investigación se evaluó el efecto de la RCM en la capacidad organogénica. Determinamos que todos los tratamientos de RCM, afectaron significativamente la capacidad organogénica de los tres fenotipos G, V y A (Figura 4.1). Sin embargo, es interesante mencionar que en el fenotipo V, los tratamientos de 1/4 y 1/8 no afectaron tan severamente su capacidad organogénica (Figura 4.1b, e) en comparación al fenotipo G (Figura 4.1a, d). Al parecer el fenotipo V tiene cierta capacidad para sobrevivir en estas condiciones de “estrés” por la RCM. A pesar de que el fenotipo V no generó un gran número de brotes en los tratamientos de RCM en comparación a las plantas que estuvieron cultivadas en el medio de cultivo testigo, siguieron generando un número considerable de brotes por subcultivo (Figura 4.1b). Quizás esto fue debido a las características fisiológicas que poseen estas plantas en comparación a las plantas G.

Las plántulas V tienen una mayor contenido de clorofila en la región G de sus hojas, así como una mayor producción de malato (Duarte-Aké *et al.*, 2016). Estos datos refuerzan la teoría de que las plantas V, pudieran estar mejor adaptadas a ciertas condiciones de

estrés, ya que a pesar de ser cultivadas en medios con una considerable reducción en los componentes del medio de cultivo, pueden seguir multiplicándose a una baja, pero constante velocidad. Se ha observado que las plantas V a pesar de tener una disminución en el contenido de pigmentos y cloroplastos pequeños en la región blanca, tienen la capacidad de producir metabolitos necesarios para sobrevivir y crecer (Sun *et al.*, 2017). Aunado a esto, en plantas variegadas Marble Queen de *Epipremnum aureum*, se ha encontrado que no poseen deficiencias en el contenido de nutrientes y acumulan metabolitos implicados en respuesta al estrés oxidativo (Sun *et al.*, 2017). Por ello, se ha sugerido que estas plantas utilizan algunas moléculas señal para mantenerse vivas a pesar del estrés oxidativo al cuál están expuestas, reduciendo el nivel de compuestos relacionados al estrés abiótico y oxidativo. Los autores sugirieron que estas plantas utilizan una estrategia específica para mantener un umbral muy delgado entre la vida y la muerte y así responder positivamente al estrés que están expuestas (Sun *et al.*, 2017). Quizás las plantas V de agave, utilizan una estrategia muy parecida a las plantas variegadas de *Epipremnum aureum*.

Por otro lado, se observó que las plantas A de agave no pudieron sobrevivir en los tratamientos de RCM, esto pudo haber sido porque las plántulas albinas no pueden sobrevivir sin una fuente de carbono (Kumari *et al.*, 2009; Abadie *et al.*, 2006; Yao *et al.*, 1995; Spoehr, 1942). En este caso, el medio les proporcionaba todos los nutrientes necesarios para llevar a cabo sus funciones para su metabolismo y crecimiento y al reducirse la fuente que le proporciona energía, estas plántulas murieron (Figura 4.1c, Figura 4.3a).

Los tratamientos de RCM no solo afectaron la capacidad organogénica, sino que también modificaron el fenotipo de los brotes generados en cada subcultivo (Figura 4.3). Varios de los componentes del medio de cultivo son importantes para la generación de los pigmentos como clorofilas y carotenoides, para llevar a cabo funciones metabólicas importantes como es la fotosíntesis, así como el crecimiento y desarrollo de las plántulas (White y Brown, 2010; Skoog y Miller, 1957). La reducción de estos, generó un cambio en la coloración de las hojas en todos los tratamientos de RCM (Figura 4.3a). Estos cambios se pueden observar de forma más severa en los tratamientos 1/4 y 1/8.

Es interesante, que el 10% de las plántulas generadas en el tratamiento 1/4 tenían

pigmentos púrpuras en las hojas. Se ha observado que cuando una planta está atravesando por un estrés por deficiencia de diferentes nutrientes, ésta acumula antocianinas por lo cual posee una coloración rojo-púrpura en las hojas (Stewart *et al.*, 2001). De hecho estudios recientes han revelado que el contenido de flavonoides es un indicador de la alteración del metabolismo de la planta debido a deficiencias nutricionales (Stewart *et al.*, 2001). Por ejemplo, en tomate se compararon extractos de plantas que habían sido cultivadas en condiciones normales y otras en deficiencia de nitrógeno, estas últimas mostraron un incremento significativo en el contenido de antocianinas (Bongue-Bartelsman y Phillips, 1995). La producción de estos pigmentos puede deberse a las limitaciones de nitrógeno, lo cual podría afectar la fotosíntesis, disminuyendo la disponibilidad de clorofila y dañando las membranas fotosintéticas debido a la acumulación de almidón. Esto también podría permitir el incremento de la sensibilidad a la luz.

La producción de pigmentos fotoprotectores como las antocianinas podría reforzar la protección contra el daño oxidativo (Guidi *et al.*, 1998). Así también, las plántulas obtenidas en los tratamientos de 1/8 tuvieron una pérdida muy visual de la coloración verde característica de las plantas de agave que fueron cultivadas en los medios de cultivo testigo (Figura 4.3a). Esto puede ser debido a que la RCM afectó severamente la síntesis de pigmentos de clorofila en las plántulas *in vitro*. Sin embargo, es interesante que las plántulas V, no tuvieran este cambio de coloración, muy probablemente por las adaptaciones al estrés oxidativo discutidas anteriormente.

4.4.2 LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE BA AFECTAN LA CAPACIDAD ORGANOGÉNICA DE LAS PLÁNTULAS G Y V, PERO NO DE LAS PLÁNTULAS A

Los RC tienen un importante papel en el crecimiento y en la diferenciación celular (Skoog y Miller, 1957). Los niveles exógenos y endógenos de los RC están altamente relacionados a la organogénesis de brotes, sobre todo el balance auxinas/citocininas (Vanstraelen y Benková, 2012; Zhao, 2010; Santner *et al.*, 2009; Werner *et al.*, 2001; Sugiyama, 1999). En el cultivo de *A. angustifolia*, el BA, una citocinina utilizada para promover la multiplicación de brotes (Pernisová *et al.*, 2009; Ruzicka *et al.*, 2009) se encuentra en una proporción mayor a las auxinas (200:1). Es interesante que el aumento de la concentración de BA (44.4 μM) generó un mayor número de brotes generados en

todos los subcultivos en las plantas G (Figura 4.2a, b) y V (Figura 4.2d, e). Sin embargo, a mayor concentración de BA, menor era el número de brotes formados. Estos datos sugieren que existe un umbral de concentración exógena de BA para que éste actúe de forma positiva generando mayor número de brotes. Quizás esto es debido a que las células que están en contacto con el medio sobrepasan su capacidad para absorber el contenido total del BA en el medio de cultivo. Otra explicación podría ser la habituación a los RC de tipo citocinina debido a la alta sensibilidad a la BA. En reportes anteriores, se ha observado cierta habituación a los RC en la micropropagación de agave (Robert *et al.*, 2006).

De manera interesante, en el caso de las plantas A, el mayor número de brotes se generaron cuando fueron cultivadas en altas concentraciones de BA (88.8 μM). Estos datos sugieren que el metabolismo de las citocininas pareciera ser diferente en las plantas A en comparación a las plantas G y V. En la región albina de plantas variegadas de plátano, se ha observado que la concentración endógena de citocininas en la región albina es menor que en la región verde, es decir que el contenido de pigmentos está correlacionado a la concentración endógena de citocininas (Zaffari *et al.*, 1998).

Estos datos sugirieron que el fenotipo albino tiene un bloqueo en la ruta de biosíntesis de este regulador, y probablemente es causado por la pérdida de pigmentos, así como el pobre desarrollo de los cloroplastos, ya que la síntesis de citocininas es llevada a cabo en este organelo (Sakakibara, 2006; Mok y Mok, 2001). Debido a la pérdida de clorofila, es probable que el fenotipo A de agave tenga un defecto en la síntesis de citocininas, y quizás la producción de brotes dependa exclusivamente de las grandes cantidades de citocininas añadidas al medio de cultivo.

4.4.3 LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE BA GENERAN REVERSIÓN EN EL FENOTIPO DE LOS BROTES DE LAS PLÁNTULAS V

En diferentes sistemas *in vitro*, la aparición de plantas albinas es un gran problema que conlleva limitaciones en el mejoramiento de las especies. La regeneración de plantas albinas respecto a las de fenotipo verde es influenciada en gran medida por factores genéticos y los factores externos del cultivo *in vitro* (Kumari *et al.*, 2009; Cistué *et al.*, 1995). Además, se ha observado que la tasa de VS incrementa de acuerdo al tiempo que el cultivo ha sido mantenido *in vitro* (Shen *et al.*, 2007; Kuznetsova *et al.*, 2006). Por

ejemplo, en el cultivo de cebada se ha observado que la aparición de plantas albinas está fuertemente correlacionado con el tiempo que pasa el explante en el medio de inducción (Cistué *et al.*, 1995). Estos hallazgos concuerdan con lo que encontramos en el fenotipo G y V. En el fenotipo G hemos observado que los subcultivos son un factor importante para que se dé la variación (Figura 4.3d).

Se ha sugerido que los RC de tipo citocinina podrían influir en la aparición de fenotipos albinos y variegados en el cultivo *in vitro* de diferentes especies (Liu *et al.*, 2012; Jacquard *et al.*, 2009; Nuutila *et al.*, 2000; Collins, 1927), como plátano (Zaffari *et al.*, 1998) y bambú (Liu *et al.*, 2007). Así también se ha utilizado para evitar el albinismo en diferentes especies como trigo (Broughton, 2008; Cistué *et al.*, 2006) y cebada (Cistué *et al.*, 1995). En agave, la adición de concentraciones elevadas de BA puede reducir la variación en el fenotipo G. En el caso del fenotipo V, las concentraciones elevadas de BA, pueden incrementar la aparición de brotes A y G, en el fenotipo V. En el cultivo de microesporas de trigo se ha observado que el remplazar kinetina por BA se reduce significativamente la aparición de plantas albinas y aumenta la regeneración de plantas verdes (Cistué *et al.*, 1995). Además, en trigo (Broughton, 2008; Stetler y Laetsch, 1965) y *A. thaliana* (Larkin *et al.*, 2003; Chory *et al.*, 1991) se ha utilizado la BA para evitar el albinismo, aumentando la regeneración de plantas verdes y promover el desarrollo de los cloroplastos y la síntesis de clorofila. Broughton *et al.*, (2008) observaron que la adición de 1 mg l⁻¹ de IAA y 1 mg l⁻¹ de BA en el medio de cultivo reduce significativamente la regeneración de plantas albinas respecto a las plantas verdes en el cultivo de óvulos de trigo “Australian spring”.

Se sabe que las citocininas son RC esenciales para la formación de clorofila y la grana en los cloroplastos (Mazari y Camm, 1993). Se ha observado que las citocininas pueden inducir cambios en la ultraestructura del cloroplasto en plántulas de *Arabidopsis* en diferentes tiempos después de haber sido transferidas en condiciones de oscuridad a condiciones de luz. De hecho, incluso en la oscuridad, 1 µM de BA causa la formación de las membranas protilacoidales, mientras que esas membranas solo son visibles en las plántulas silvestres después de 6 h del tratamiento de luz (Cortleven y Schmölling, 2015; Chory *et al.*, 1994). La aceleración de la transición de etioplastos a cloroplastos es debido a la formación temprana de las membranas tilacoidales.

Además del efecto de las citocininas en la de-etiolación, también se ha observado que

durante las condiciones de luz las citocininas actúan incrementando la cantidad de tilacoides por grana en *Cucumis sativus* (Farineau y Rousseaux, 1975). También se ha observado que en mutantes que sobreexpresan el gen *CKX1* (gen que codifica para una enzima que degrada las citocininas), que poseen bajos niveles de citocininas, poseen cloroplastos poco desarrollados, sugiriendo que se requieren niveles normales de citocininas para la formación correcta de los cloroplastos (Werner *et al.*, 2008). Por lo tanto, la BA podría funcionar como un regulador esencial para la formación de los cloroplastos durante la diferenciación y división celular en los procesos de organogénesis *in vitro* de agave. Esta idea puede verse reforzada en la reversión del fenotipo que encontramos en el fenotipo V, ya que he observado que las plántulas que fueron cultivadas en el tratamiento 66.6 μM de BA, pueden generar hasta un 7% de brotes con fenotipo A, 5% más que en el testigo (Figura 4.4e). Cuando las plántulas V fueron cultivadas en una concentración más alta de BA (88.8 μM), estas generaron ligeramente menos brotes con fenotipo A pero generaron hasta un 17% más brotes con fenotipo G, que el testigo (22.2 μM), indicando que las altas concentraciones de BA genera una reversión en el fenotipo.

Sin embargo, en las plantas albinas no pudimos ver alguna reversión del fenotipo durante los cinco subcultivos que fueron propagadas (Figura 4.4c, f). Quizás, esto es debido a que además de las citocininas, hay otro factor que está involucrado en la variación. Cómo se puede observar en el fenotipo V, aunque se generan muchos brotes con fenotipo G, los brotes con fenotipo A, siguen generándose (Figura. 4.4e).

4.4.4. LA MAYOR RCM GENERA CAMBIOS EN LOS NIVELES DE METILACIÓN GLOBAL EN LAS PLÁNTULAS G Y V

Hasta ahora se ha observado que la privación de los nutrientes puede modificar los niveles globales de metilación en el ADN de las plantas. Por ejemplo, en el cultivo hidropónico de dandelion (*Taraxacum officinale*) se ha observado que la metilación del ADN es modificada por diferentes tipos de estrés, entre ellos la deficiencia nutricional (Verhoeven *et al.*, 2010). En otro estudio, plántulas de arroz que fueron cultivadas en privación de N, tenían alterados niveles de metilación en el ADN. El 50% de los patrones de metilación alterados fueron reencontrados en la progenie, lo cual eventualmente permitió una alta tolerancia a la privación de N. En los experimentos realizados con agave

se encontró que a pesar de los altos niveles de metilación que tenían los brotes, estos no perdieron su capacidad para seguir multiplicándose (Figura 4.1b). Sorprendentemente, las plántulas V sufrieron grandes cambios en los niveles de metilación en el tercer subcultivo (Figura 4.5b). Sobre todo en el tratamiento 1/4, las plantas presentaron cambios en los niveles de metilación en los últimos ciclos de cultivo. Estos cambios en los niveles de metilación podrían deberse a que estas plantas presentaron una resistencia a la multiplicación a pesar de que el medio en el cual crecían, carecía de todos los nutrientes necesarios para sobrevivir, estas plántulas siguieron multiplicándose, incluso dando brotes con diferentes fenotipos.

4.4.5 LAS ALTAS CONCENTRACIONES DE BA AFECTAN SEVERAMENTE LOS NIVELES DE METILACIÓN EN LAS PLÁNTULAS V Y A

Se han visto en varios reportes que los RC modulan la metilación en el ADN (Jaligot *et al.*, 2011; Kou *et al.*, 2011; Ahmed *et al.*, 2004; Joyce y Cassells, 2002; Gaspar *et al.*, 1996; LoSchiavo *et al.*, 1989). Por ejemplo, en el cultivo de *Malus xiaojinensis* se ha observado que la metilación en el ADN puede disminuir al aumentar la concentración de BA usada en el medio de cultivo. Sin embargo, la metilación en el ADN también disminuye de acuerdo al número de subcultivos (Huang *et al.*, 2012). En *A. angustifolia* se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de BA en la modulación de la metilación en el ADN durante cinco ciclos de cultivo y se determinó que en el tercer subcultivo, los brotes que estuvieron cultivados en concentraciones elevadas de BA (88.8 μ M) mostraron un aumento significativo en la metilación del ADN en los tres fenotipos. También se observó que en el último subcultivo, tanto los brotes con fenotipo V (Figura 4.5e) y A (Figura 4.5f) tuvieron una disminución en la metilación, caso contrario en los brotes G (Figura 4.5d). Estos datos sugieren que cada fenotipo responde de forma diferente a los tratamientos con BA, quizás esto podría estar involucrado con la capacidad de metabolizar las citocininas.

4.5 CONCLUSIONES

- Los tratamientos de reducción de nutrientes en el medio de cultivo afectaron el fenotipo de las plántulas G y A y redujeron su capacidad organogénica
- Los tratamientos de la reducción de nutrientes en el medio de cultivo afectaron

severamente los patrones de metilación del ADN de forma global en los fenotipos G, provocando una hipermetilación en todos los tratamientos.

- Las altas concentraciones de BA aumentaron la capacidad organogénica sólo en las plántulas A, sugiriendo que el metabolismo de las citocininas es diferente en las plántulas A respecto a las plántulas G y V
- Las concentraciones elevadas de BA redujeron el porcentaje de variación en el fenotipo G y aumentaron el número de brotes con fenotipo G en las plántulas V, sugiriendo que las citocininas podrían ayudar a reducir la variación.
- En las plántulas V y A se encontraron cambios significativos en la metilación del ADN en los tratamientos con altas concentraciones de BA en comparación con el testigo.

CAPÍTULO V

CONSECUENCIAS FISIOLÓGICAS Y EPIGENÉTICAS EN PLANTAS G, V Y A EXPUESTAS A BAJA INTENSIDAD LUMÍNICA

5.1 INTRODUCCIÓN

La luz desencadena diferentes cambios en el desarrollo y la morfología de las plantas. Estos cambios incluyen la diferenciación de las hojas y cotiledones, inhibición del crecimiento y elongación del tallo, la producción de clorofila (Karlin-Neumann *et al.*, 1988), y el desarrollo de cloroplastos con la capacidad fotosintética (Gruissem, 1989).

Durante el cultivo *in vitro*, la luz es uno de los factores ambientales que tiene un gran efecto en el desarrollo de los tejidos vegetales. Los requerimientos de luz incluyen la intensidad, el fotoperiodo y la calidad de luz. La intensidad de luz podemos medirla de acuerdo a la cantidad de fotones emitidos a una velocidad determinada. Por otro lado la calidad de luz, depende de la longitud de onda a la cuál ésta es transmitida. La luz es necesaria para regular ciertos procesos morfogénicos en el cultivo *in vitro* (Murashige, 1974). Por ejemplo, la luz es necesaria para la formación de brotes (Nebel y Naylor, 1968), la iniciación de raíces, la iniciación de la fotosíntesis como resultado de la diferenciación de los cloroplastos. De hecho, la luz actúa en conjunto con las citocininas para inducir el desarrollo de cloroplastos y la síntesis de clorofila en las suspensiones celulares de zanahoria (Kumar *et al.*, 1983; Neumann y Raafat, 1973) y durante el reverdecimiento de plántulas etioladas de *Arabidopsis* (Ma *et al.*, 2001; Frankhauser y Chory, 1997). En cuanto a la intensidad de luz, se ha observado que bajas intensidades favorecen procesos complejos de diferenciación celular como embriogénesis y la organogénesis, mientras que la obscuridad favorece el crecimiento de callos (Bagga *et al.*, 1985; Seibert *et al.*, 1975; Ammirato y Stewars, 1971; Weis y Jaffe, 1969; Skoog, 1944).

Por otro lado, se ha observado que la luz podría tener un papel importante en el albinismo. La formación de plantas albinas es característica de ciertos genotipos y el desarrollo de plantas albinas puede verse reducida modificando el protocolo de cultivo. Durante la regeneración de plantas verdes, la intensidad de luz utilizada es muy importante, debido a que la formación del cloroplasto es dependiente de luz (Mullet, 1988). La intensidad lumínica es un factor importante que regula la actividad y la

composición de las membranas tilacoidales. Sin embargo, es interesante mencionar que se ha observado que modificando las condiciones de luz se ha podido reducir la aparición de plantas albinas en timoti. Guo *et al.*, (1999) observaron que intensidades de $4.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, pueden disminuir el porcentaje de plantas albinas generadas respecto a fenotipos verdes de 4.96% a 1.42%, durante la embriogénesis de *Phleum pratense*.

Es evidente que la luz tiene un efecto visual en el fenotipo de las plantas, pero también, es un factor clave en la regulación de la expresión génica y actualmente se ha propuesto que la luz podría actuar como regulador de proteínas implicadas en la fotosíntesis y proteínas sensibles a la luz por la vía epigenética. Hasta ahora, se ha observado que en presencia de luz se expresan los genes que codifican para las enzimas involucradas en la metilación del ADN, DRM1 (DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE1), MET1 (METHYLTRANSFERASE1) y CMT3 (CHROMOMETHYLASE3) (Bourbousse *et al.*, 2015). De acuerdo al análisis, usando endonucleasas sensibles a la metilación, en maíz se ha encontrado que enzimas involucradas en la fotosíntesis como la enzima fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), la subunidad mayor y menor de la RuBisCO son reguladas por luz y éstas a su vez pueden ser reguladas epigenéticamente por la metilación en el ADN (Ngernprasirtsiri *et al.*, 1989). En otros estudios, se han observado cambios en la metilación del ADN en la región promotora de los genes que codifican estas enzimas, regulando su expresión. Otros estudios han revelado que la expresión del gen *PEPC* es inducida por la luz y está correlacionado con una disminución de la metilación en la region promotora (Langdale *et al.*, 1991).

En el Capítulo I de este trabajo reportamos que los cambios en los niveles globales de metilación en el ADN están asociados con la generación de las variantes somaclonales y probablemente éstos son causados por las condiciones medioambientales *in vitro*. Así también, en el Capítulo II, se reportaron los resultados de la reducción de los componentes del medio de cultivo y de la exposición a diferentes concentraciones de BA. Los resultados del Capítulo II muestran que ambos tratamientos modificaron los patrones de metilación de forma diferencial en cada uno de los fenotipos y que esta metilación está asociada a la generación de brotes con diferente fenotipo, reforzando la idea de que el ambiente *in vitro* es un factor clave en la generación de la variación somaclonal en *A. angustifolia*. De manera particular, en los tratamientos con altas concentraciones de BA,

determinamos que las plántulas G generaban solo brotes con fenotipo G. Sin embargo, en las plántulas V generaban un gran número de brotes con fenotipo G, pero también con el fenotipo A, sugiriendo que además de la BA, hay por lo menos otro factor que podría estar involucrado en la generación de VS en *A. angustifolia*. Uno de esos factores podría ser la luz, debido a todo lo discutido anteriormente, podría jugar un papel importante durante la generación de plantas albinas. Por esta razón en esta parte de la investigación se evaluarán diferentes condiciones de luz en los fenotipos G, V y A, lo cuál nos ayudará a entender los cambios fisiológicos y epigenéticos que podrían ser regulados por la luz.

5.2 MATERIALES Y MÉTODOS

5.2.1 MATERIAL VEGETAL Y CONDICIONES DE CULTIVO

Setenta y cinco plantas de tres meses de edad de cada uno de los fenotipos G, V y A fueron cultivados en cajas Magentas que contenían 50 ml de medio modificado de Murashige y Skoog, suplementado con 0.11 μM de 2,4-D y 22.2 μM de 6 BA y solidificado con agar (0.2%) y gel-rite (0.2%). Las plántulas fueron incubadas en el cuarto de cultivo a 27 ± 2 °C bajo tres diferentes condiciones de luz: el grupo testigo (L), el cual fue incubado bajo un fotoperiodo de 12 h con una intensidad lumínica de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$; el grupo a baja intensidad de luz (B), el cual fue incubado bajo un fotoperiodo de 12 h con una intensidad lumínica de $0.10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y el grupo en oscuridad total (O), el cual fue incubado en un cuarto oscuro las 24 h. Las plántulas fueron puestas en estas tres condiciones de luz durante 28 días.

5.2.3 CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

5.2.3.1 ALTURA, PESO FRESCO, PESO SECO Y NÚMERO DE BROTES TOTALES

Al inicio (tiempo cero, T0) y al final (después de 28 días, T1M) del experimento se midió la altura, el peso fresco (PF) y el peso seco (PS) de cinco plántulas por fenotipo (G, V y A), las cuales fueron incubadas bajo cada una de las tres condiciones de luz, L, B y O, mencionadas anteriormente. Para obtener el PS de las plántulas, éstas se pesaron antes y después de ser incubadas en un horno a 80 °C durante 7 días. El número total de brotes obtenidos en cada uno de los tres fenotipos, G, V y A fueron contabilizados al final del experimento (T1M).

5.2.3.2 CUANTIFICACIÓN DE PIGMENTOS

La cuantificación de clorofilas (*a* y *b*) y carotenoides totales fue realizada de acuerdo al protocolo descrito por Duarte-Aké *et al.*, (2016). Brevemente, 200 mg de peso fresco de cada fenotipo, G, V y A, previamente cultivadas en las tres condiciones de luz (L, B y O) en T0 y T1M fueron colectados y mezclados con 1.5 ml de acetona al 80% y macerado en un mortero. El extracto fue transferido a tubos Eppendorf de 2 ml y centrifugado a 9,360 x g por 10 min a 4 °C. La pastilla fue lavada con acetona fría al 80% hasta eliminar la coloración verde por completo. El sobrenadante fue colectado en tubos de ensayo. El extracto fue aforado a 5 ml y se colocaron en celdas para espectrofotómetro (Beckman Coulter DU650) y se midieron a 663 nm (clorofila *a*), 646 (clorofila *b*) y 470 nm (carotenoides). La concentración de clorofilas y carotenoides fue calculada como se describe en Wellburn (1994).

5.2.4 CUANTIFICACIÓN DE LOS NIVELES GLOBALES DE METILACIÓN EN EL ADN

El ADN genómico se extrajo de plántulas de los fenotipos G, V y A, cultivadas bajo las tres condiciones de luz (L, B y O) de acuerdo al protocolo descrito por Echavarría-Machado *et al.*, (2005). Brevemente, 200 mg de las plántulas T0 y T1M fueron colectados y mezclados con el amortiguador de extracción usando 100 mM Tris-HCl (pH 8.0); 50 mM EDTA y 500 mM de NaCl, suplementado con 20% de SDS y 100 mM β-mercaptoetanol. Posteriormente, el ADN se precipitó con la adición de 4 M de acetato de sodio. El sobrenadante fue homogenizado con 12 mg de dióxido de sílica (S5631- Sigma). El ADN fue lavado con etanol al 70% y se resuspendió en agua ultra pura (pH 7.5). La digestión del ADN y la separación de los nucleósidos se realizó de acuerdo a De la Peña *et al.*, (2012). El porcentaje de metilación en el ADN fue obtenido de los cromatogramas de fase reversa usando el área de los picos para determinar la concentración de 2'-deoxycytosine (dC) y 5-methyl-2'-deoxycytosine (5mdC) en la muestra ($\%5mdC = \frac{C\ 5mdC}{[C\ 5mdC + C\ dC]} \times 100$), en la que C es la concentración. Todo el análisis fue realizado con tres réplicas de diferentes extracciones de ADN.

5.3 RESULTADOS

5.3.1 EFECTOS DE LAS CONDICIONES DE LUZ EN EL FENOTIPO DE G, V Y A

Para entender qué papel tiene la luz en las plantas G, V y A de agave se analizaron primeramente los cambios en el fenotipo (Figura 5.1 y 5.2) como son la altura (Figura 5.2a), el número de hojas (Figura 5.2b), el peso fresco (Figura 5.2c) y el peso seco (Figura 5.2d) en los tres fenotipos G, V y A bajo las tres condiciones lumínicas (L, B y O).

Se observó que las plantas G, que fueron incubadas en condiciones L, mostraron una morfología y una coloración característica de las plantas de agave que son cultivadas *in vitro* (Figura 5.1). Sin embargo, las plantas que estuvieron en las condiciones B y O mostraron características fenotípicas propias del fenómeno de etiolación. En particular, las plántulas que fueron cultivadas en la condición B mostraron un adelgazamiento en las hojas y una pérdida de la coloración, esta pérdida de la coloración se puede observar incluso en los brotes (Figura 5.1, flechas amarillas). De igual forma, las condiciones de O afectaron el fenotipo de las plántulas G, ya que éstas mostraron una pérdida en la coloración.

Las plantas V que fueron cultivadas en las condiciones B y O mostraron un adelgazamiento en las hojas, así como una elongación mayor a las condiciones L. En cuanto a las plántulas A, se observaron cambios muy significativos. Las plántulas que fueron cultivadas en las condiciones B mostraron cambios en la coloración de sus hojas y se podía apreciar incluso una coloración verde pálida, sobre todo en la región apical de las hojas. Al igual que las plántulas G y V, las hojas de las plántulas A mostraron un adelgazamiento y una elongación muy pronunciada en las hojas tanto en el tratamiento B como el tratamiento O. Es interesante notar que el reverdecimiento encontrado en las plántulas A, solo se observó en las condiciones de baja intensidad de luz (B) pero no en el caso de oscuridad total (O).

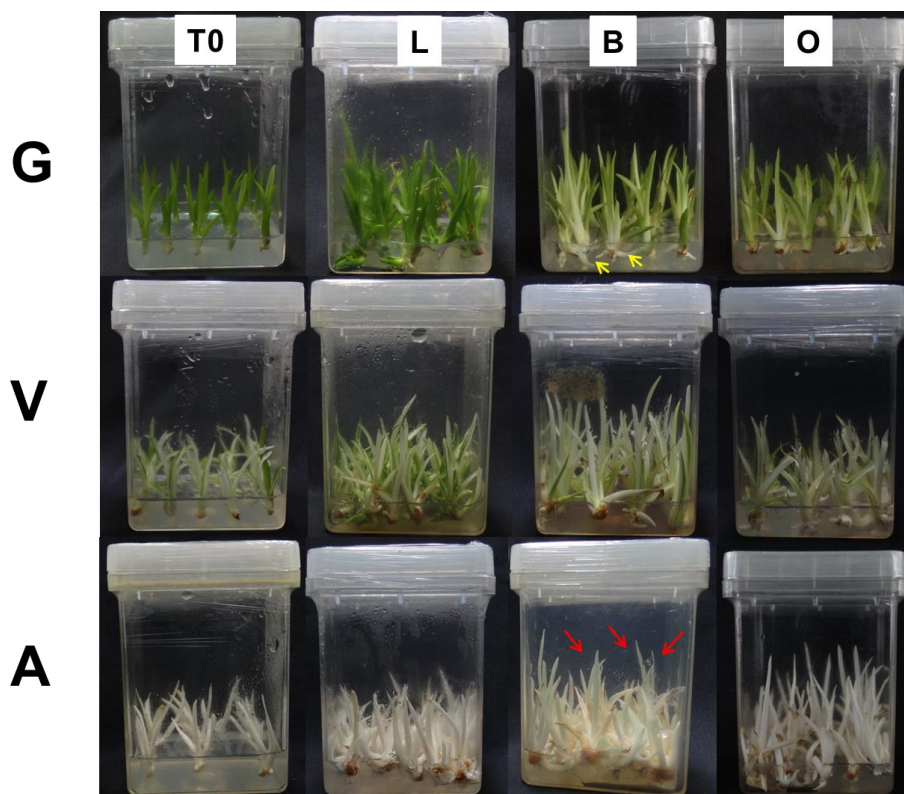


Figura 5.1 Efecto de diferentes condiciones de luz en los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A). El experimento se realizó con 15 plántulas (T0) que fueron cultivadas en las condiciones de intensidad lumínica de $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con fotoperiodo 12/12 h (L); en condiciones de baja intensidad lumínica ($0.10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con fotoperiodo 12/12 h (B) y en condiciones de total oscuridad (O). Las flechas rojas indican el reverdecimiento observado en las plántulas A que fueron incubadas en condiciones de baja intensidad lumínica.

Por otro lado, estos cambios fenotípicos fueron analizados de forma cuantitativa (Figura 5.2). En cuanto al cambio más visual que fue la altura de las plántulas, cuantitativamente se pudo observar que las plántulas con fenotipo V y A mostraron un incremento significativo en la altura en las condiciones O en comparación con L. Las plántulas V y A en las condiciones O tuvieron una altura de 4.29 ± 0.10 cm y 4.5 ± 0.16 cm respectivamente, en comparación de las plántulas V y A del tratamiento L, las cuales tuvieron una altura de 3.9 ± 0.12 cm y 3.84 ± 0.11 cm, respectivamente. Sin embargo, se pudo observar que en las condiciones B las plántulas con fenotipo V tuvieron un ligero incremento en la altura (4.23 ± 0.20 cm) en comparación con las plántulas cultivadas en las condiciones L (3.9 ± 0.12 cm). Es interesante notar que las plántulas A en la condición

B mostraron una altura mucho menor (3.47 ± 0.08 cm) que las plántulas A cultivadas en la condición L (3.84 ± 0.11 cm).

Aunque las plántulas crecieron significativamente en las condiciones de O, el PF (Figura 5.2b) y el PS (Figura 5.2c) también se afectó bajo las diferentes condiciones lumínicas. En cuanto al peso fresco, se pudo observar que en general las plántulas de los fenotipos G, V y A que fueron cultivadas bajo las condiciones L presentaron una mayor ganancia de peso fresco. Por otro lado, las plántulas con fenotipos G, V y A que fueron cultivadas en las condiciones de B y O no tuvieron una ganancia significativa en el PF en comparación al T0.

Debido a que a pesar que las plántulas V y A tuvieron un incremento en la altura (Figura 5.2a) debido a la elongación de las plántulas (Figura 5.1), no presentaron una ganancia significativa en el PF (Figura 5.2b). Para saber si esta diferencia era debida a la pérdida de agua, se analizó el PS de las plántulas. Se encontró que las plántulas G, V y A tienen un PS similar a las plántulas que fueron cultivadas en las condiciones de L (Figura 5.2c), las cuales obtuvieron una mayor ganancia en PF (Figura 5.2b). Es decir, que la diferencia entre los tratamientos es la acumulación de agua. Por otro lado, se pudo observar que las plántulas que fueron cultivadas en la condición B no mostraron diferencias significativas en el PS, extrañamente el fenotipo G mostró una disminución en el PS.

Otro parámetro que se evaluó fue el número de hojas que tenían las plantas, ya que mientras más hojas tengan, mayor será su PF. Al analizar las diferencias en cuanto al número de hojas, se encontró que las plántulas G y V, en la condición L, tenían un mayor número de hojas en comparación con las condiciones O y B. Al parecer, además de la gran acumulación de agua, las plántulas G y V poseían un mayor número de hojas y por esa razón tenían grandes cantidades de PF en comparación con las condiciones O y B.

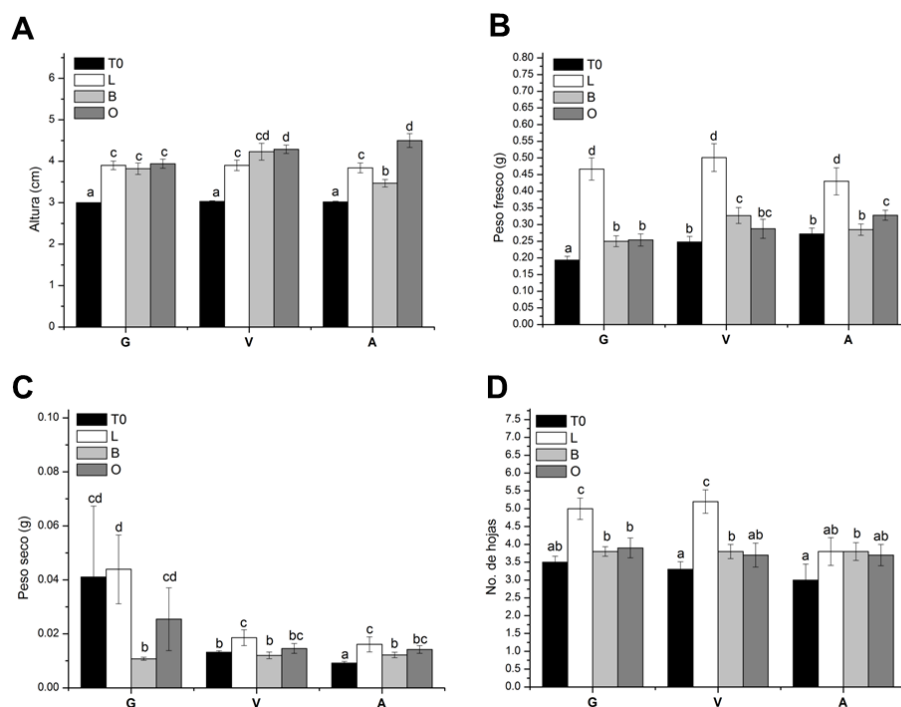


Figura 5.2 Análisis de los cambios morfológicos observados entre los tres fenotipos, verde (G), variegado (V) y albino (A) en el tiempo T0 y después de 28 días bajo diferentes intensidades lumínicas: $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, con fotoperiodo 12/12 h (L); en condiciones de baja intensidad lumínica ($0.10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), con fotoperiodo 12/12 h (B) y en condiciones de total oscuridad (O). (A) Altura de G, V y A. (B) Peso fresco de G, V y A. (C) Peso seco entre G, V y A. (D) Número de hojas de G, V y A. Las barras con la misma letra no presentan diferencias significativas de acuerdo a la prueba Tukey $P < 0.05$ ($n=10$)

Además de los cambios morfológicos, también se observaron cambios significativos en las clorofilas *a* y *b*, así como en los carotenoides totales (Cuadro 5.1). En el fenotipo G se encontró que, bajo las condiciones de B, hubo una reducción de clorofila *a* de un 80%, de clorofila *b* de un 64%, y en el contenido de carotenoides de un 76% en comparación con el testigo. En cuanto a las condiciones de O, se pudo observar una reducción en el contenido de clorofila *a* de 85%, clorofila *b* de 73% y carotenoides del 83% en comparación con las condiciones L. En cuanto a la relación chl *a/b*, se observó una relación de 2.14 ± 0.30 en las plántulas que se encontraban en las condiciones L, 1.42 ± 0.05 en B y 1.08 ± 0.04 en O.

En el fenotipo V, al igual que en el fenotipo G, se pudo observar una reducción en el

contenido de pigmentos, inclusive más severos. Las plántulas en la condición B presentaron una reducción en el contenido de clorofila *a* del 86%, clorofila *b* del 90%, carotenoides de 88% respecto a las plántulas en la condición L. En O, la reducción del contenido de pigmentos respecto a la condición L, fue aún más severa ya que se observó una reducción del 92% de clorofila *a*, 93% de clorofila *b* y 92% de carotenoides en comparación con el testigo. En cuanto a la relación Chl *a/b*, se pudo observar que las plántulas en la condición L tenían una relación de 0.83 ± 0.08 , mientras que en B fue de 1.75 ± 0.49 y en O de 0.73 ± 0.46 .

En las plántulas A, se encontraron resultados muy interesantes (Cuadro 5.1). Se observó un aumento en el contenido de Chl *a* y Chl *b* en las condiciones de B y O, respecto al testigo. En la condición B se pudo observar un incremento de 40 veces más en cantidad de Chl *a* y siete veces más de Chl *b* en comparación con L. Por otro lado, en la condición O se pudo observar un aumento de 33 veces más de Chl *a* y 5.9 veces más de Chl *b* en comparación con la condición L. Respecto a la relación de Chl *a/b* se observó un incremento significativo entre condiciones, pasando de 0.166 ± 0.32 en las plántulas expuestas a L, a 1.04 ± 0.32 y 1.26 ± 0.52 en las plántulas en las condiciones B y O, respectivamente (Cuadro 5.1).

Cuadro 5.1 Cuantificación de pigmentos ($\mu\text{g g}^{-1}$ PF) en las tres variantes somaclonales: verde (G), variegado (V) y albino (A), al inicio del experimento (T0) y después de cuatro semanas expuestas a condiciones de luz (L), baja intensidad lumínica (B) y oscuridad total (O)¹.

Fenotipo	Pigmentos	T0	L	B	O
G	Chl <i>a</i>	397.27 $\pm$ 86.35 ^c	501.54 $\pm$ 51.49 ^d	109.36 $\pm$ 12.57 ^b	75.38 $\pm$ 4.80 ^a
	Chl <i>b</i>	209.78 $\pm$ 36.45 ^c	256.81 $\pm$ 43.55 ^c	76.10 $\pm$ 6.82 ^b	69.90 $\pm$ 4.33 ^a
	Chl total	703.26 $\pm$ 89.63 ^c	758.362 $\pm$ 89.94 ^c	185.46 $\pm$ 19.21 ^b	145.29 $\pm$ 8.71 ^a
	Carotenoides	309.36 $\pm$ 52.18 ^c	408.78 $\pm$ 92.89 ^d	89.44 $\pm$ 8.09 ^b	70.65 $\pm$ 4.19 ^a
	Chl <i>a/b</i>	2.09 $\pm$ 0.31 ^c	2.14 $\pm$ 0.30 ^c	1.42 $\pm$ 0.05 ^b	1.08 $\pm$ 0.04 ^a
V	Chl <i>a</i>	266.15 $\pm$ 21.67 ^c	300.04 $\pm$ 22.22 ^d	43.98 $\pm$ 7.05 ^b	24.55 $\pm$ 7.37 ^a
	Chl <i>b</i>	301.62 $\pm$ 38.56 ^c	382.14 $\pm$ 58.38 ^d	38.42 $\pm$ 12.16 ^b	27.01 $\pm$ 8.20 ^a
	Chl total	549.76 $\pm$ 77.25 ^c	682.18 $\pm$ 79.90 ^d	82.41 $\pm$ 19.10 ^b	51.57 $\pm$ 14.10 ^a
	Carotenoides	201 $\pm$ 97.25 ^c	310.27 $\pm$ 37.08 ^d	36.98 $\pm$ 8.57 ^b	23.51 $\pm$ 7.01 ^a
	Chl <i>a/b</i>	0.76 $\pm$ 0.54 ^a	0.83 $\pm$ 0.08 ^a	1.75 $\pm$ 0.49 ^b	0.73 $\pm$ 0.46 ^a
A	Chl <i>a</i>	0.69 $\pm$ 0.46 ^a	0.78 $\pm$ 0.50 ^a	31.76 $\pm$ 9.71 ^c	25.85 $\pm$ 7.56 ^b
	Chl <i>b</i>	2.9 $\pm$ 0.65 ^a	3.85 $\pm$ 1.07 ^a	29.61 $\pm$ 12.33 ^c	22.90 $\pm$ 8.98 ^b
	Chl total	5 $\pm$ 0.35 ^a	4.64 $\pm$ 1.36 ^a	61.37 $\pm$ 21.78 ^c	48.75 $\pm$ 16.31 ^b
	Carotenoides	11.2 $\pm$ 5.3 ^a	16.80 $\pm$ 12.02 ^b	24.54 $\pm$ 9.32 ^d	17.39 $\pm$ 6.78 ^c
	Chl <i>a/b</i>	0.12 $\pm$ 0.09 ^a	0.166 $\pm$ 0.10 ^b	1.04 $\pm$ 0.32 ^c	1.26 $\pm$ 0.52 ^d

¹ Los valores representan las medias $\pm$ ES basado en tres réplicas biológicas de tres experimentos independientes. Las diferentes letras en cada columna indican las diferencias significativas entre las medias con un $\alpha = 0.05$ de acuerdo a la prueba Tukey.

5.3.2 EFECTO DE LAS CONDICIONES DE INTENSIDAD LUMÍNICA EN LOS NIVELES DE METILACIÓN EN EL ADN DE LOS FENOTIPOS G, V y A

Debido a que se observaron diferencias en la coloración de las hojas, acompañado por un incremento en la acumulación de Chl *a* en las plántulas A que fueron cultivadas en condiciones de baja intensidad lumínica (B), se planteó la hipótesis de que los niveles de metilación en el ADN pudieron haberse modificado en tales condiciones. Primeramente, se encontró que en el fenotipo G, las condiciones de B y O afectaron la metilación global en el ADN (Figura 5.3).

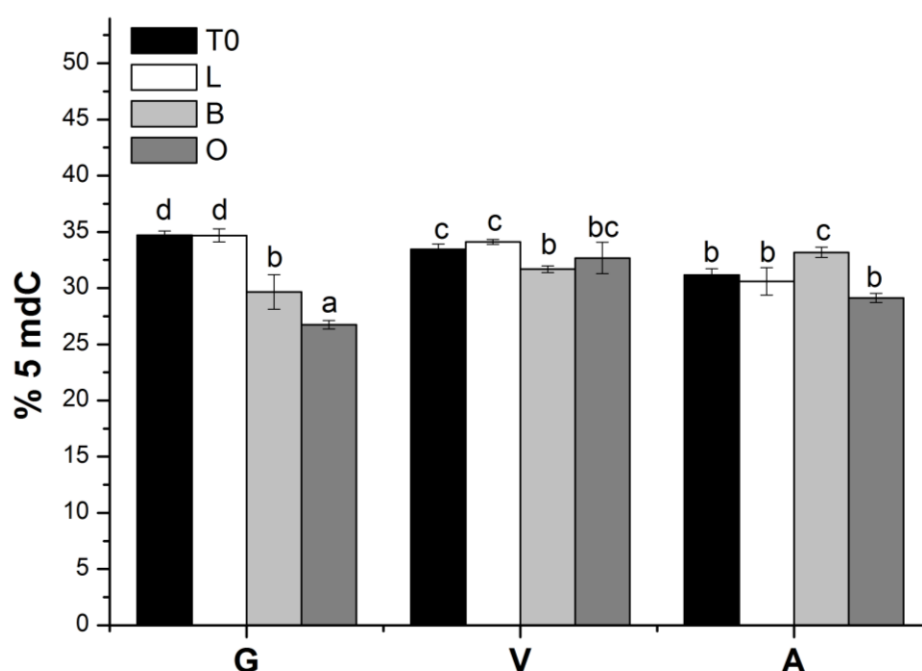


Figura 5.3 Porcentaje de metilación global en el ADN (%5mdC) en los fenotipos verde (G), variegado (V) y albino (A) en el T0 y bajo los diferentes condiciones de luz (L, B y O) durante 28 días. Las diferencias significativas están representadas con diferentes letras en cada punto del gráfico, de acuerdo con la comparación estadística realizada por el análisis de varianza (ANOVA) $P < 0.05$.

En el T0 y en las condiciones de L, la metilación de las plántulas G era 34.7%. Sin embargo, en las condiciones de B y O la metilación se redujo a 29.7% y 26.7%, respectivamente. Por otro lado, en el fenotipo V hubo una ligera reducción de la metilación

en la condición B (31.6%), respecto a el T0 (33.4%) y L (34.10%) Contrariamente, en las plántulas con fenotipo A, se encontró que bajo las condiciones de B (33.1%) el nivel de metilación global era alrededor de un 3% más alto, respecto a T0 (31.1%), L (30.5%) y O (29.1%) (Figura 5.3). Las plántulas A que fueron cultivadas en la condición de B presentaron un aumento significativo en la acumulación de Chl a (Cuadro 5.1), esto pudiera explicar en cierto modo el reverdecimiento observado en las plantas expuestas a esta condición lumínica (Figura 5.1).

5.4 DISCUSIÓN

La luz es un factor ambiental que desencadena procesos vitales para la supervivencia de las plantas como la fotosíntesis, estimula la acumulación de pigmentos fotosintéticos y de fotoprotección como son clorofilas y carotenoides (Juao *et al.*, 2007; Aluru *et al.*, 2001; Frankhauser y Chory, 1997) y contribuye al desarrollo, crecimiento y el metabolismo de las plantas (Frankhauser y Chory, 1997). Por otro lado, la ausencia de luz desencadena el fenómeno de etiolación, el cual se caracteriza por una disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos y de fotoprotección (Chory *et al.*, 1989; Mullet, 1988). Sin embargo, la etiolación también promueve el incremento de auxinas endógenas en la planta ocasionando el crecimiento apical de las plantas (Esmon *et al.*, 2006; Fuchs *et al.*, 2003). Las plantas que son cultivadas *in vitro*, dependiendo del protocolo de cultivo empleado, pueden depender o no de una cierta intensidad lumínica, ya que está implicada en muchos procesos morfogénicos (Murashige, 1974). Se ha observado que bajas intensidades lumínicas pueden favorecer al reverdecimiento de mutantes variegadas de *Arabidopsis* (Aluru *et al.*, 2001) y estas condiciones podrían prevenir la aparición de plantas albinas en el cultivo *in vitro* de *Phleum pratense* (Guo *et al.*, 1999). Las mutantes *immutants* normalmente presentan un fenotipo variegado en condiciones de luz a $100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, sin embargo, cuando estas mutantes son incubadas a $15 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$, la variegación se pierde y las plantas se tornan completamente verdes. Este cambio está acompañado por un incremento en el contenido de clorofila (Aluru *et al.*, 2001). En estas mutantes se sugiere que la falta de una enzima clave con actividad oxidasa terminal trae consigo un bloqueo en la diferenciación de los cloroplastos de forma parcial. En otros estudios, se ha observado que la región albina de las mutantes *imm*, a pesar de tener una disminución significativa en la producción total de metabolitos, produce las moléculas involucradas en la adaptación al estrés oxidativo, que son necesarias para su

supervivencia (Sun *et al.*, 2017). Esto sugiere que en estas mutantes, los cloroplastos no están diferenciados por completo, sin embargo, aún pueden sintetizar moléculas para contrarrestar el estrés oxidativo debido a la carencia de los pigmentos fotosintéticos. En *Agave*, las plántulas A en condiciones de baja intensidad lumínica (B) presentaron un reverdecimiento de las hojas que estuvo acompañado por una acumulación de pigmentos tales como Chl *a* y Chl *b* (Cuadro 5.1). Hasta ahora, no se sabe por qué una baja intensidad de luz podría favorecer el reverdecimiento en plantas albinas. Una posibilidad es que al igual que en *Arabidopsis*, exista un bloqueo en la diferenciación de los cloroplastos, y la baja intensidad de luz, podría estimular y reactivar la biogénesis de los cloroplastos. Debido a que existe un estrés oxidativo debido a la carencia de los pigmentos fotosintéticos, la baja intensidad lumínica podría activar este mecanismo sin dañar los plástidos en formación. Los únicos estudios en donde abordan el reverdecimiento, es durante la etiolación. Durante la etiolación, se ha determinado que cuando las plantas son cultivadas bajo sombra puede encenderse un mecanismo de adaptación (Brouwer *et al.*, 2014). Éste consiste en la activación del fitocromo A, una proteína receptora de luz que activa la vía de síntesis de clorofila en condiciones de sombra. Se ha observado que en mutantes de *PhyA* que son cultivadas en condiciones de sombra, la síntesis de clorofila se ve disminuida y los genes que codifican para las enzimas que degradan la clorofila se activan, cambiando la coloración de las plantas de verde a amarillo (Brouwer *et al.*, 2014). En condiciones normales *PhyA* mantiene en equilibrio la síntesis de clorofila, conservando la coloración verde, en condiciones de sombra. Quizás en *Agave*, este fitocromo A podría captar las bajas intensidades de luz y favorecer la biosíntesis de pigmentos ayudando en el reverdecimiento de las plantas albinas.

Uno de los efectos que trae consigo el fenómeno de etiolación en plantas con fenotipo verdes es la disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos (Chory *et al.*, 1989; Karlin-Neumann *et al.*, 1988). En la presente investigación se encontró que una disminución en la intensidad lumínica en el fenotipo G y V favorecía la reducción del 80% en todos los pigmentos (Cuadro 5.1). Sin embargo, en el caso de las plantas A, éstas presentaron un aumento significativo en la acumulación de hasta cuarenta veces más Chl *a* y siete veces más de Chl *b* bajo las mismas condiciones. Como es característico del fenómeno de etiolación, los tres fenotipos presentaron un alargamiento y un

adelgazamiento en sus hojas (Figura 5.2a).

Este cambio en el fenotipo sugiere un cambio en la expresión génica y uno de los mecanismos involucrados en regular la expresión de los genes es la metilación del ADN (Us-Camas *et al.*, 2014; Miguel y Marum, 2011; Kaeppler *et al.*, 2000; Kaeppler y Philips, 1993). El efecto de la luz en la metilación del ADN ha sido un tema poco estudiado. Sin embargo, hasta ahora se sabe que en plantas de maíz que han pasado por el proceso de etiolación presentan una disminución en los niveles metilación en el ADN (Ngernprasirtsiri *et al.*, 1989). En Agave, también se observó una disminución de los niveles de metilación en las plántulas que estuvieron en las condiciones O y B. Por ejemplo, las plántulas que estuvieron en ausencia de luz (O) y en las condiciones de baja intensidad lumínica (B) presentaron una disminución del 7% y 5% en la metilación del ADN, respectivamente, en el fenotipo G. Por otro lado, en las condiciones O y B se observó una disminución del 1% en la metilación del ADN en el fenotipo V. Estos resultados sugieren que la ausencia parcial y total de luz provocan una disminución en la metilación en el ADN, es decir, la luz tiene un papel importante en la regulación de la expresión génica, a través de los mecanismos epigenéticos. Quizás esta disminución en la metilación promueve un aumento en la expresión de diferentes genes que codifican para las enzimas encargadas de la degradación de clorofila y en la síntesis de auxinas, promoviendo el crecimiento apical. Estos genes son expresados durante el fenómeno de etiolación. Durante el fenómeno de etiolación hay una disminución de los pigmentos fotosintéticos y esto es debido a que durante el periodo en usencia de luz, se inicia el proceso de degradación de clorofila. Así también, los genes que codifican para las enzimas que están involucradas en la síntesis y la conjugación de auxinas podrían verse activados. La metilación del ADN podría activar estos genes. Se sabe que los genes que responden a auxinas, los ARF pueden ser regulados por la metilación del ADN (Li *et al.*, 2011). Estos, a su vez, desencadenan la vía de señalización de las auxinas. Así que es muy probable que la metilación en el ADN esté regulando este proceso. Por otro lado, en el fenotipo albino se encontró un reverdecimiento en condiciones de B (Figura 5.1), el cual estuvo acompañado con un incremento en la metilación en el ADN (Figura 5.3). En maíz se ha observado que un reverdecimiento de plantas etioladas está relacionada con un aumento en la metilación del ADN (Ngernprasirtsiri *et al.*, 1989).

5.5 CONCLUSIONES

- Tanto en las condiciones de O como de B se pudo observar una disminución significativa de los pigmentos fotosintéticos, así como un aumento en el crecimiento apical de las plántulas respecto a las plántulas que fueron cultivadas en condiciones L.
- Las condiciones de baja intensidad lumínica favorecen el reverdecimiento de las plantas albinas.
- Las condiciones de ausencia total (O) y parcial de luz (B) provocaron una disminución en los niveles de metilación en el ADN en las plantas con fenotipos G y V.
- Sólo la condición B generó un aumento en la metilación global del ADN de las plantas con fenotipo A.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS

6.1 CONCLUSIONES GENERALES

- Los cambios fisiológicos y fenotípicos que presentaron los fenotipos G, V y A no afectaron su multiplicación.
- La metilación en el ADN es un mecanismo que juega un papel importante en la variación fenotípica de *A. angustifolia*. Los cambios en la metilación a la alta y a la baja están asociados a la generación de brotes variegados en las plantas verdes. La metilación a la alta en las plantas variegadas está asociada a la generación de brotes verdes y albinos. En las plantas albinas no se muestran cambios significativos en la metilación.
- Los tratamientos de la reducción de nutrientes en el medio de cultivo a 1/4 modificó la coloración de las plántulas con fenotipo G. Todos los tratamientos provocaron la muerte de las plántulas albinas. Los tratamientos de reducción de nutrientes afectaron severamente los patrones de metilación en el ADN de forma global en los fenotipos G, provocando una hipermetilación.
- La variación presente en el número de brotes del fenotipo V, en los tratamientos con BA a 88.8 μM y el incremento en la metilación sugiere que las citocininas podrían aumentar la metilación y favorecer la regeneración de brotes verdes.
- Los tratamientos de obscuridad (O) y baja intensidad lumínica (B) provocaron una disminución en el contenido de pigmentos fotosintéticos, un aumento en el tamaño de las plantas y una disminución de la metilación en los fenotipos G y V, debido al proceso de etiolación.
- La presencia de luz a bajas intensidades provocó un reverdecimiento en las plantas A, sugiriendo que una mínima intensidad de luz es necesaria para permitir el desarrollo de los pocos cloroplastos inmaduros que están presentes en las plantas A.

6.2 PERSPECTIVAS

- Este estudio sienta una base teórica y experimental de lo complejo que es el albinismo que se presenta en el cultivo *in vitro*, sin embargo, un estudio más puntual sobre los genes que son regulados por la metilación en el ADN en estas plantas podría revelar las posibles causas del albinismo en agave.
- Sería interesante entender qué papel juegan las citocininas en la reversión parcial del albinismo durante la micropropagación.
- El albinismo en agave es un modelo interesante para la búsqueda de genes clave que regulan la fotosíntesis y la biogénesis del cloroplasto para aplicaciones biotecnológicas y aumentar la productividad de las plantas.

6.3 BIBLIOGRAFÍA

- Abadie, J. C., U. Puttsepp, G. Gebauer, A. Faccio, P. Bonfante y M. A. Selosse (2006). *Cephalanthera longifolia* (Neottieae, Orchidaceae) is mixotrophic: a comparative study between green and nonphotosynthetic individuals. *Canadian Journal of Botany*, 84: 1462-1477.
- Ahmed, E. U., T. Hayashi y S. Yazawa (2004). Auxins increase the occurrence of leaf-color variants in *Caladium* regenerated from leaf explants. *Science Horticulture*, 100: 159.
- Al-Zahim, M. A., B. V. Ford-Lloyd y H. J. Newbury (1999). Detection of somaclonal variation in garlic (*Allium sativum* L.) using RAPD and cytological analysis. *Plant Cell Reports*, 18: 473-477.
- Aluru, M. R., H. Bae, D. Wu y S. R. Rodermel (2001). The *Arabidopsis immutans* mutation affects plastid differentiation and the morphogenesis of white and green sectors in variegated plants. *Plant Physiology*, 127: 67-77.
- Ammirato, P. V. y F. C. Stewars (1971). Some effects of environment on the development of embryos from cultured free cells. *Botanical Gazette*, 132: 149-158.
- Anderson, J. M., (1986). Photoregulation of the composition, function, and structure of thylakoid membranes. *Annual Review of Plant Physiology*, 37: 93-136.
- Avivi, Y., V. Morad, H. Ben-Meir, J. Zhao, K. Kashkush, T. Tzfira, V. Citovsky y G. Grafi (2004). Reorganization of specific chromosomal domains and activation of silent genes in plant cells acquiring pluripotentially. *Developmental Dynamics*, 230: 12-22.
- Avramova, Z., (2015). Transcriptional "memory" of a stress; transient chromatin and memory (epigenetic) marks at stress response genes. *Plant Journal*, 83: 156.
- Badami, P. S., N. Mallikarjuna y J. P. Moss (1997). Interspecific hybridization between *Cicer arietinum* and *C. pinnatifidum*. *Plant Breeding*, 116: 393-395.
- Bae, C. H., T. Abe, T. Matsuyama, N. Fukunishi, N. Nagata, T. Nakano, Y. Kaneko, K. Miyoshi, H. Matsushima y S. Yoshida (2001). Regulation of chloroplast gene expression is affected in *ali*, a novel tobacco albino mutant. *Annals of Botany*, 88: 545-553.
- Bagga, S., V. K. Rajasekhar, S. Guha-Mukherjee y S. K. Sopory (1985). Enhancement in the formation of shoot initials by phytochrome in stem callus cultures of *Brassica oleracea* var. *botrytis*. *Plant Science*, 38: 61-64.
- Bairu, M. W., A. O. Aremu y J. V. Staden (2010). Somaclonal variation in plants: causes and detection methods. *Plant Growth Regulators*, 63: 147-173.
- Baranek, M., B. Krizan, E. Ondrusýkova y M. Pidra (2010). DNA-methylation changes in

- grapevine somaclones following in vitro culture and thermotherapy. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101: 11-22.
- Bell, W. D., L. Bogorad y W. J. McIlrath (1962). Yellow-stripe phenotype in maize I. Effects of *ys1* locus on uptake and utilization of iron. *Botanical Gazette*, 124: 1-8.
- Biswal, B., K. Krupinska y U.C. Biswal (2013) *Plastid development in leaves during growth and senescence*, Springer Dordrecht Heidelberg, New York, London, pp 3-685.
- Böhme, v. H. y G. Scholz (1960). Versuche zur normalisierung des phänotyps der mutante chloronerva von *Lycopersicon esculentum* Mill. *Die Kulturpflanze*, 8: 93-109.
- Bongue-Bartelsman, M. y D. A. Phillips (1995). Nitrogen stress regulates gene expression of enzymes in the flavonoid biosynthetic pathway of tomato. *Plant Physiology & Biochemistry*, 33: 539-546.
- Bourbousse, C., I. Mestiri, G. Zabulon, M. Bourge, F. Formiggini, M. A. Koini, S. C. Brown, P. Fransch, C. Bowler y F. Barneche (2015). Light signaling controls nuclear architecture reorganization during seedling establishment. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 112: E2836-E2844.
- Boutet, S., F. Vazquez, J. Liu, C. Beclin, M. Fagard, A. Gratias, J. B. Morel, P. Crete, X. Chen y H. Vaucheret (2003). *Arabidopsis* HEN1: a genetic link between endogenous miRNA controlling development and siRNA controlling transgene silencing and virus resistance. *Current Biology*, 13: 843-848.
- Broughton, S. (2008). Ovary co-culture improves embryo and green plant production in anther culture of Australian spring wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95: 185-195.
- Brouwer, B., P. Gardestrom y O. Keech (2014). In response to partial plant shading, the lack of phytochrome A does directly induce leaf senescence but alters the fine-tuning of chlorophyll biosynthesis. *Journal of Experimental Botany*, 65: 4037-4049.
- Chandramu, C., D. M. Rao y V. D. Reddy (2003). High frequency induction of multiple shoots from nodal explants of *Vitex negundo* L. using sodium sulphate. *Journal of Plant Biotechnology*, 5: 107-113.
- Chen, J. y R. J. Henny (2006). Somaclonal variation: an important source for cultivar development of floriculture crops, en: *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*, (Teixeira da Silva R. J., ed.). Global Science Books, London, UK, pp 244-253.
- Chin, C. K. (1980). Growth behavior of green and albino plants of *Episcia cupreata* "Pink brocade" *in vitro*. *In Vitro*, 16: 847-850.
- Chiruvella, K. K., A. Mohammed y R. G. Ghanta (2014). Phenotypic aberrations during micropropagation of *Soymida febrifuga* (Roxb.) A.D. Juss. *Notulae Scientia Biologicae*, 6: 99-104.

- Chory, J., N. Aguilar y C. A. Peto (1991). The phenotype of *Arabidopsis thaliana* DET1 mutants suggests a role for cytokinins in greening. *Molecular Biology of Plant Development*, 1991: 21-29.
- Chory, J., C. A. Peto, M. Ashbaugh, R. Saganich, L. Pratt y F. Ausubel (1989). Different roles for phytochrome in etiolated and green plants deduced from characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants. *Plant Cell*, 1: 867-880.
- Chory, J., D. Reinecke, S. Sim, T. Washburn y M. Brenner (1994). A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (*det* mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology*, 104: 339-347.
- Cistué, L., A. Ramos, A. M. Castillo y I. Romagosa (1994). Production of large numbers of doubled haploid plants from barley anthers pre-treated with high concentrations of mannitol. *Plant Cell Reports*, 13: 709-712.
- Cistué, L., M. Soriano, A. M. Castillo, M. P. Vallés, J. M. Sanz y B. Echávarri (2006). Production of doubled haploids in durum wheat (*Triticum turgidum* L.) through isolated microspore culture. *Plant Cell Reports*, 25: 257-264.
- Cistué, L., A. Ziauddin, E. Simion y K. J. Kasha (1995). Effects of culture conditions on isolated microspore response of barley cultivar Igri. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 42: 163-169.
- Clarke, H. J., M. Kumari, T. N. Khan y H. M. Siddique (2011). Poorly formed chloroplasts are barriers to successful interspecific hybridization in chickpea following *in vitro* embryo rescue. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 106: 465-473.
- Collins, J. L. (1927). A low temperature type of albinism in barley. *Journal of Heredity*, 18: 331-334.
- Cortleven, A. y T. Schmölling (2015). Regulation of chloroplast development and function by cytokinin. *Journal of Experimental Botany*, 1-15.
- Crosatti, C., F. Rizza, F. W. Badeck, E. Mazzucotelli y L. Cattivelli (2013). Harden the chloroplast to protect the plant. *Physiologia Plantarum*, 147: 55-63.
- Cubas, P., C. Vincent y E. Coen (1999). An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*, 401: 161.
- Datta, S. K. (2005). Androgenic haploids: Factors controlling development and its application in crop improvement. *Current Science*, 89: 1870-1878.
- De la Peña, C., G. Nic-Can, G. Ojeda, J. L. Herrera-Herrera, A. López-Torres, K. Wrobel y M. L. Robert (2012). *KNOX1* is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave* spp. *BMC Plant Biology*, 12: 1-11.
- Devarumath, R., S. Nandy, V. Rani, S. Marimuthu, N. Muraleedharan y S. Raina (2002). RAPD, ISSR and RFLP fingerprints as useful markers to evaluate genetic integrity

- of micropropagated plants of three diploid elite tea clones representing *Camellia sinensis* (China type) and *C. assamica* ssp. *assamica* (Assam-India type). *Plant Cell Reports*, 21: 166-173.
- Díaz-Martínez, M., A. Nava-Cedillo, J. A. Guzmán-López, R. Escobar-Guzmán y J. Simpson (2012). Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. Azul plants propagated asexually by three different methods. *Plant Science*, 185: 321-330.
- Díaz-Sala, C., M. Rey, A. Boronat, R. Besford y R. Rodríguez (1995). Variation in the DNA methylation and polypeptide patterns of adult hazel (*Corylus avellana* L.) associated with sequential *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 15: 218-221.
- Duarte-Aké, F., E. Castillo-Castro, F. Barredo-Pool, F. Espadas, J. M. Santamaría, M. L. Robert y C. De-la-Peña (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.
- Dunford, R. y R. M. Walden (1991). Plastid genome structure and plastid-related transcript levels in albino barley plants derived from anther culture. *Current Genetics*, 20: 339-347.
- Eberhard, S., G. Finazzi y F. A. Wollman (2008). The dynamics of photosynthesis. *Annual Review of Genetics*, 42: 463-515.
- Echavarría-Machado, I., L. Sánchez-Cach, C. Hernández-Zepeda, R. Rivera-Madrid y O. Moreno-Valenzuela (2005). A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues. *Molecular Biotechnology*, 31: 129-135.
- Ehrler, W. L. (1969). Daytime stomatal closure in *Agave americana* as related to enhanced water-use efficiency, en: *Physiological systems in semiarid environments*, (Hoff C. C. y M. L. Riedesel, eds.). University of New Mexico Press, Albuquerque, pp 239-247.
- Esmon, C. A., A. G. Tinsley, K. Ljung, G. Sandberg, L. B. Hearne y E. Liscum (2006). A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 103: 236-241.
- Farineau, N. y J. Rousseaux (1975). Influence de la 6-benzylaminopurine sur la différenciation plastidale dans les cotyledons de cocobre. *Physiologia Plantarum*, 64: 153-160.
- Feng, S., S. E. Jacobsen y W. Reik (2010). Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science*, 330: 622-627.
- Frankhauser, C. y J. Chory (1997). Light control of plant development. *Annual Review of Cell Developmental Biology*, 13: 203-229.
- Fuchs, I., K. Philippar, K. Ljung, G. Sandberg y R. Hedrich (2003). Blue light regulates an

- auxin-induced K⁺ -channel gene in the maize coleoptile. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 100: 11795-11800.
- Gao, X., D. Yang, D. Cao, M. Ao, X. Sui, Q. Wang, J. N. Kimatu y L. Wang (2010). *In vitro* micropropagation of *Freesia hybrida* and the assessment of genetic and epigenetic stability in regenerated plantlets. Journal of Plant Growth Regulators, 257-267.
- García-Mendoza, A., (1995). Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México, en: Conservacion de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques, (Linares E., P. Dávila, F. Chiang, R. Bye y T. Elías, eds.). UNAM, México, pp 51-75.
- Gaspar, T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid y T. A. Thorpe (1996). Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell Development Biology- Plant, 272-289.
- Gentry, H. S. y J. R. Sauck (1978). The stomatal complex in *Agave*: groups Deserticolae, Campaniflorae, Umbelliflorae. Proceedings of California Academy of Sciences, 41: 371-387.
- George, E.F. (1993) Plant propagation by tissue culture, part 1: the technology, Exegetics, London. pp. 501.
- González, G., S. Alemán y D. Infante (2003). Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population. Plant Science, 595-601.
- Gruissem, W. (1989). Chloroplast gene expression: How plants turn their plastids on. Cell, 56: 161-170.
- Guidi, L., G. Lorefice, A. Pardossi, F. Malorgio, F. Tognoni y G. F. Soldatini (1998). Growth and photosynthesis of *Lycopersicon esculentum* (L.) plants as affected by nitrogen deficiency. Biologia Plantarum, 40: 235-244.
- Guo, W. L., R. Wu, Y. F. Zhang, X. M. Liu, H. Y. Wang, L. Gong, Z. H. Zhang y B. Liu (2007). Tissue culture-induced locus-specific alteration in DNA methylation and its correlation with genetic variation in *Codonopsis lanceolata* Benth. et Hook. f. Plant Cell Reports, 26: 1297-1307.
- Guo, Y. D., P. Sewón y S. Pulli (1999). Improved embryogenesis from anther culture and plant regeneration in timothy. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 57: 85-93.
- Harada, T., T. Sato, D. Asaka y I. Matsukawa (1990). Large-scale deletions of rice plastid DNA in anther culture. Theoretical and Applied Genetics, 81: 157-161.
- Hartsock, T. L. y P. S. Nobel (1976). Watering converts a CAM plant to daytime CO₂ uptake. Nature, 262: 574-576.
- Hernández-Valencia, R., R. López-Franco y A. Benavides-Mendoza (2003). Micromorphology of the foliar epidermis of *Agave tequiliana* Weber. Agrofaz, 3:

387-396.

- Horton, P., A. V. Ruban y R. G. Walters (1994). Regulation of light harvesting in green plants. *Plant Physiology*, 106: 415-420.
- Hu, T. y K. Kasha (1999). A cytological study of pretreatments used to improve isolated microspore cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.) cv. Chris. *Genome*, 42: 432-441.
- Huang, H., S. S. Han, Y. Wang, X. Z. Zhang y Z. H. Han (2012). Variations in leaf morphology and DNA methylation following *in vitro* of *Malus xiajinensis*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 111: 153-161.
- Hughes, K. W. (1981). *In vitro* ecology: exogenous factors affecting growth and morphogenesis in plant culture systems. *Environmental and Experimental Botany*, 21: 281-288.
- Infante, D., S. Molina, J. R. Demey y E. Gámez (2006). Asexual genetic variability in *Agavaceae* determined with inverse sequencetagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis. *Plant Molecular Biology Reports*, 24: 205-217.
- Jacquard, C., F. Nolin, C. Hécart, D. Grauda, I. Rashal, S. Dhondt-Cordelier, R. Sangwan, P. Devaux, F. Mazeyrat-Goubeyré y C. Clément (2009). Microspore embryogenesis and programmed cell death in barley: effects of copper on albinism in recalcitrant cultivars. *Plant Cell Reports*, 28: 1329-1339.
- Jaligot, E., S. Adler, E. Debladis, T. Beulé, F. Richaud, P. Ilbert, E. J. Finnegan y A. Rival (2011). Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the *in vitro*-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany*, 108: 1453-1462.
- Jaligot, E., T. Beulé, F. C. Baurens, N. Billotte y A. Rival (2004). Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the "mantled" variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.). *Genome*, 47: 224-228.
- Jaligot, E., T. Beulé y A. Rival (2002). Methylation-sensitive RFLPs: characterization of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism. *Theoretical and Applied Genetics*, 104: 1263-1269.
- Jaligot, E., A. Rival, T. Beulé, S. Dussert y J. L. Verdeil (2000). Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis. *Plant Cell Reports*, 19: 684-690.
- Jayasankar, S., (2005). Variation in tissue culture, en: *Plant development and biotechnology*, (Trigiano R. N. y D. J. Gray, eds.). CRC press, 301-310.
- Johnson, S. S., R. L. Phillips y H. W. Rines (1987). Possible role of heterochromatin in chromosome breakage induced by tissue culture in oats (*Avena sativa* L.). *Genome*, 29: 439-446.

-
- Joyce, S. M. y A. C. Cassells (2002). Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 125-137.
- Joyce, S. M., A. C. Cassells y S. M. Jain (2003). Stress and aberrant phenotypes in *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 103-121.
- Juao, Y., O. S. Lau y X. W. Deng (2007). Light-regulated transcriptional networks in higher plants. *Nature Reviews in Genetics*, 8: 217-230.
- Jung, K. H., J. Lee, C. Dardick, Y. S. Seo, P. Cao, P. Canlas, J. Phetsom, X. Xu, S. Ouyang, K. An, Y. J. Cho, G. C. Lee, Y. Lee, G. An y P. C. Ronald (2008). Identification and functional analysis of light-responsive unique genes and gene family members in rice. *PLoS Genetics*, 4: e1000164.
- Kaeppeler, S. M., H. F. Kaeppeler y Y. Rhee (2000). Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant Molecular Biology*, 179-188.
- Kaeppeler, S. M. y S. L. Philips (1993). Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 90: 8773-8776.
- Kaeppeler, S. M. y R. L. Phillips (1993). DNA methylation and tissue culture-induced variation in plants. *In Vitro Cell Development Biology*, 29: 125-130.
- Karlin-Neumann, G. A., L. Sun y E. M. Tobin (1988). Expression of light harvesting chlorophyll *a/b* protein genes is phytochrome-regulated in etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology*, 88: 1323-1331.
- Karp A. (1995). Somaclonal variation as a tool for crop improvement. *Euphytica*, 85: 295-302.
- Kaufmann, K., A. Pajoro y G. C. Angenet (2012). Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches. *Natural Reviews Genetic*, 830-824.
- Keeling, P. J., (2010). The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids. *Philosophical Transactions of the Royal Society, B* 365: 729-748.
- Kobayashi, K., M. Kondo, H. Fukuda, M. Nishimura y H. Ohta (2007). Galactolipid synthesis in chloroplast inner envelope is essential for proper thylakoid biogenesis, photosynthesis, and embryogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 104: 17216-17221.
- Kou, H. P., Y. Li, X. X. Song, X. F. Ou, S. C. Xing, J. Ma, D. Von Wettstein y B. Liu (2011). Heritable alteration in DNA methylation induced by nitrogen-deficiency stress accompanies enhanced tolerance by progenies to the stress in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Plant Physiology*, 168: 1685-1693.
- Koukalova, B., M. Fojtova, K. Y. Lim, J. Fulnecek, A. R. Leitch y A. Kovarik (2005). Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene
-

- hypomethylation, increased transcription and chromatin alterations. *Plant Physiology*, 139: 275-286.
- Kumar, A., L. Bender, B. Pauler, K. H. Neumann, H. Senger y C. Jeske (1983). Ultrastructural and biochemical development of the photosynthetic apparatus during callus induction in carrot root explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2: 161-177.
- Kumari, M., H. J. Clarke, I. Small y K. H. M. Siddique (2009). Albinism in plants: a major bottleneck in wide hybridization, androgenesis and doubled haploid culture. *Critical Reviews in Plant Science*, 28: 393-409.
- Kuznetsova, O. I., O. A. Ash y S. A. Gostimsky (2006). The effect of the duration of callus culture on the accumulation of genetic alteration in pea *Pisum sativum* L. *Russian Journal of Genetics*, 42: 555-562.
- Langdale, J. A., W. C. Taylor y T. Nelson (1991). Cell-specific accumulation of maize phosphoenolpyruvate carboxylase is correlated with demethylation at a specific site greater than 3 kb upstream of the gene. *Molecular Genetics and Genomics*, 225: 49-55.
- Larkin, P. J. y W. R. Scowcroft (1981). Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement. *Theoretical Applied Genetics*, 60: 197-214.
- Larkin, R. M., J. M. Alonso, J. R. Ecker y J. Chory (2003). GUN 4, a regulator of chlorophyll synthesis and intracellular signaling. *Science*, 299: 902-906.
- Law, J. A. y S. E. Jacobsen (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nature*, 11: 204-220.
- Leblay, C., E. Chevreau y L. M. Raboin (1991). Adventitious shoot regeneration from leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25: 99-105.
- Leong, T. Y. y J. M. Anderson (1984). Adaptation of the thylakoid membranes of pea chloroplasts to light intensities. I. Study on the distribution of chlorophyll-protein complexes. *Photosynthesis Research*, 5: 105-115.
- Li, W., Z. J. Cheng, Y. H. Su, H. N. Han, Y. Zhang y X. S. Zhang (2011). DNA methylation and histone modifications regulate de novo shoot regeneration in *Arabidopsis* by modulating *WUSCHEL* expression and auxin signaling. *PLoS Genetics*, 7: e1002243.
- Lindsay, D. L., V. K. Sawhney y P. C. Bonham-Smith (2006). Cytokinin-induced changes in *CLAVATA1* and *WUSCHEL* expression temporally coincide with altered floral development in *Arabidopsis*. *Plant Science*, 170: 1111-1117.
- Liu, N. T., W. N. Jane, H. S. Tsay, H. Wu y W. C. Chang (2007). Chloroplast genome

- aberration in micropropagation derived albino *Bambusa edulis* mutants, *ab1* and *ab2*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 88: 147-156.
- Liu, X., C. Y. Chen, K. C. Wang, M. Luo, R. Tai, L. Yuan, M. Zhao, S. Yang, G. Tian, Y. Cui, H. L. Hsieh y K. Wu (2015). PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR3 associates with the Histone Deacetylase HDA 15 in repression of chlorophyll biosynthesis and photosynthesis in etiolated *Arabidopsis* seedlings. Plant Cell, 25: 1258-1273.
- Liu, X. G., H. Xu, J. Y. Zhang, G. W. Liang, Y. T. Liu y A. G. Guo (2012). Effect of low temperature on chlorophyll biosynthesis in albinism line of wheat (*Triticum aestivum*) FA85. Physiologia Plantarum, 145: 383-394.
- Longo, G. P., M. Pedretti, G. Rossi y C. P. Longo (1979). Effect of benzyladenine on the development of plastids and microbodies in excised watermelon cotyledons. Planta, 145: 209-217.
- López-Juez, E. y K. A. Pyke (2005). Plastids unleashed: Their development and their integration in plant development. International Journal of Developmental Biology, 49: 557.
- LoSchiavo, F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli y M. Terzi (1989). DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs. Theoretical and Applied Genetics, 177: 325-331.
- Loyola-Vargas, V. M., C. De-la-Peña, R. M. Galaz-Avalos y F. R. Quiroz-Figueroa (2008). Plant tissue culture, en: An intemporal set of tools, (Walker J. M. y R. Rapley, eds.). Humana Press, Totowa, NJ, pp 875-904.
- Ma, L., J. Li, L. Qu, J. Hager, Z. Chen, H. Zhao y X. W. Deng (2001). Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. Plant Cell, 13: 2589-2607.
- Mallikarjuna, N., (1999). Ovule and embryo culture to obtain hybrids from interspecific incompatible pollinations in chickpea. Euphytica, 110: 1-6.
- Martin, K., S. Pachathundikandi, C. Zhang, A. Slater y J. Madassery (2006). RAPD analysis of a variant of banana (*Musa* sp.) cv. grande naine and its propagation via shoot tip culture. In Vitro Cell Development Biology- Plant, 37: 599-604.
- Martínez, M. D., A. Cedillo-Nava, J. A. Guzmán-López, R. Escobar-Guzmán y J. Simpson (2012). Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. "Azul" plants propagated asexually by three different methods. Plant Science, 185: 321-330.
- Mazari, A. y E. L. Camm (1993). Effect of cytokinins on plastid development and photosynthetic polypeptides during organogenesis of *Pinus ponderosa* Dougl cotyledons cultured *in vitro*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 33: 81-89.

- McClendon, J. F., (1908). On xerophytic adaptations of leaf structure in Yuccas, Agaves and Nolinas. American Society of Naturalists, 42: 308-316.
- Meehan, L., K. Harkins, J. Chory y S. Rodemel (1996). *Lhcb* transcription is coordinated with cell size and chlorophyll accumulation. Plant Physiology, 112: 953-963.
- Miguel, C. y L. Marum (2011). An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. Journal of Experimental Botany, 1-13.
- Mok, D. W. S. y M. C. Mok (2001). Cytokinin metabolism and action. Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology, 52: 89-118.
- Monja-Mio, K. M., F. A. Barredo Pool, G. Herrera Herrera, M. Esqueda Valle y M. L. Robert (2015). Development of the stomatal complex and leaf surface of *Agave angustifolia* Haw. 'Bacanora' plantlets during the *in vitro* to *ex vitro* transition process. Scientia Horticulturae, 189: 32-40.
- Morcillo, F., C. Gagneur, H. Adam, F. Richaud, R. Singh, S. C. Cheah, A. Rival, Y. Duval y J. W. Tregear (2006). Somaclonal variation in micropropagated oil palm. Characterization of two novel genes with enhanced expression in epigenetically abnormal cell lines and in response to auxin. Tree Physiology, 26: 585-594.
- Mullet, J. E. (1988). Chloroplast development and gene expression. Annual Review of Plant Physiology, 39: 475-502.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. Annual Review of Plant Physiology, 25: 135-166.
- Murashige, T. y F. Skoog (1962). A revised medium for rapid and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum, 15: 473-497.
- Myouga, F., K. Akiyama, R. Motohashi, T. Kumori, T. Ito, H. Iizumi, R. Ryusui, T. Sakurai y K. Shinozaki (2010). The chloroplast function database: a large-scale collection of *Arabidopsis* Ds/Spm or T-DNA-tagged homozygous lines for nuclear-encoded chloroplast proteins, and their systematic phenotype analysis. The Plant Journal, 61: 529-542.
- Nebel, B. J. y A. W. Naylor (1968). Light, temperature and carbohydrate requirements for shoot-bud initiation from protonemata in the moss *Physcomitrium turbinatum*. American Journal of Botany, 55: 38-44.
- Neelakandan, A. K. y K. Wang (2012). Recent progress in understanding of tissue culture-induced genome level changes in plants and potential applications. Plant Cell Reports, 31: 597-620.
- Neumann, K. H. y A. Raafat (1973). Further studies on the photosynthesis of carrot tissue cultures. Plant Physiology, 51: 685-690.
- Ngernprasirtsiri, J., R. Chollet, H. Kobayashi, T. Sugiyama y T. Akazawa (1989). DNA

- methylation and the differential expression of C4 photosynthesis genes in mesophyll and bundle sheath cells of greening maize leaves. *Journal of Biological Chemistry*, 264: 8241-8248.
- Nic-Can, G., A. López-Torres, F. Barredo-Pool, K. Wrobel, V. M. Loyola-Vargas, R. Rojas-Herrera y C. De-la-Peña (2013). New insights into somatic embryogenesis: *LEAFY COTYLEDON1*, *BABY BOOM1* and *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4* are epigenetically regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE*, 8: e72160.
- Niedz, R. P. y T. J. Evens (2007). Regulating plant tissue growth by mineral nutrition. In *In Vitro Cell Development Biology- Plant*, 43: 370-381.
- Nishiyama, I. y F. Motoyoshi (1966). Cytogenetic studies in avena, XVI. Chlorophyll formation in albino sand oats under certain culture conditions. *Japan Journal Genetics*, 41: 403-411.
- Nuutila, A. M., J. Hämäläinen y L. Mannonen (2000). Optimization of media nitrogen and copper concentrations for regeneration of green plants from polyembryogenic cultures of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science*, 151: 85-92.
- Ong-Abdullah, M., J. M. Ordway, N. Jiang, S. E. Ooi, S. Y. Kok, N. Sarpan, N. Azimi, A. T. Hashim, Z. Ishak, S. K. Rosli, F. A. Malike, N. A. A. Bakar, M. Marjuni, N. Abdullah, Z. Yaakub, M. D. Amiruddin, R. Nookiah, R. Singh, E. T. L. Low, K. L. Chan, N. Azizi, S. W. Smith, B. Bacher, M. A. Budiman, A. Van Brunt, C. Wischmeyer, M. Beil, M. Hogan, N. Lakey, C. C. Lim, X. Arulandoo, C. K. Wong, C. N. Choo, W. C. Wong, Y. Y. Kwan, S. S. R. S. Alwee, R. Sambanthamurthi y R. A. Martienssen (2015). Loss of Karma transposon methylation underlies the mantled somaclonal variant of oil palm. *Nature*, 525: 533-537.
- Osmond, C. B., I. W. W. Adams y S. D. Smith (1989). Crassulacean acid metabolism, en: *Plant Physiological Ecology. Field methods and instrumentation*, (Pearcy R. W., J. Ehleringer, H. A. Mooney y P. W. Rundel, eds.). Chapman and Hall, London, pp 255-280.
- Osorio-Zambrano, M. A., D. Infante y S. Molina (2006). Study of asexual genetic variability in *Agave cocui* Trelease by molecular markers. *Bol Nakari*, 17: 1-7.
- Park, S., H. Murthy, D. Chakrabarthy y K. Paek (2009). Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of *Doritaenopsis* by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45: 104-108.
- Pauk, J., M. Puolimatka, K. L. Tóth y T. Monostori (2000). *In vitro* androgenesis of triticale in isolated microspore culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61: 221-229.
- Pernisová, M., P. Klíma, J. Horák, M. Válková, J. Malbeck, P. Soucek, P. Reichman, K. Hoyerová, J. Dubová, J. Friml, E. Zazimalová y J. Hejácíko (2009). Cytokinins modulate auxin-induced organogenesis in plants via regulation of the auxin efflux. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 106: 3609-3614.

- Pierik, R.L.M. (1987) *In vitro* culture of higher plants, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. pp. 344.
- Pierik, R. L. M. (1991). Commercial Aspects of Micropropagation, en: Horticulture-New Technologies and Applications, (Prakash J. y R. L. M. Pierik, eds.). Springer Netherlands, 141-153.
- Pinas, Fernandez A. y A. Strand (2008). Retrograde signaling and plant stress: plastid signals initiate cellular stress responses. *Current Opinion in Plant Biology*, 11: 509-513.
- Plumb-Dhindsa, P. L., R. S. Dhindsa y T. Thorpe (1979). Non-autotrophic CO₂ fixation during shoot formation in Tobacco callus. *Journal of Experimental Botany*, 30: 759-767.
- Polanco, C. y M. L. Ruiz (2002). AFLP analysis of somaclonal variation in *Arabidopsis thaliana* regenerated plants. *Plant Science*, 162: 817-824.
- Prina, A. R., A. M. Landau y M. G. Pacheco (2012). Chimeras and mutant gene transmission, en: Plant mutation breeding and biotechnology, (Shu Q. S., B. P. Foster y H. Nakagawa, eds.). FAO-IAEA, Rome, pp 179-187.
- Puente, R., A. I. González, M. L. Ruiz y C. Polanco (2008). Somaclonal variation in rye (*Secale cereale* L.) analyzed using polymorphic and sequenced AFLP markers. *In Vitro Cell Development Biology*, 44: 419-426.
- Qin, G., H. Gu, L. Ma, Y. Peng, X. W. Deng, Z. Chen y L. J. Qu (2007). Disruption of phytoene desaturase gene results in albino and dwarf phenotypes in *Arabidopsis* by impairing chlorophyll, carotenoid, and gibberellin biosynthesis. *Cell Research*, 17: 471-482.
- Raveh, E., N. Wang y P. S. Nobel (1998). Gas exchange and metabolite fluctuations in green and yellow band of variegated leaves of the monocotyledonous CAM species *Agave americana*. *Physiologia Plantarum*, 103: 99-106.
- Rédei, G. P. y S. B. Plurad (1973). Hereditary structural alteration of plastids induced by a nuclear mutator gene in *Arabidopsis*. *Protoplasma*, 77: 361-380.
- Redha, A. y P. Suleman (2011). Effects of exogenous application of polyamines on wheat anther cultures. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105: 345-353.
- Rival, A., P. Ilbert, A. Labeyrie, E. Torres, S. Doulbeau, A. Personne, S. Dussert, T. Beulé, T. Durand-Gasselín, J. W. Tregear y E. Jaligot (2013). Variations in genomic DNA methylation during the long-term *in vitro* proliferation of oil palm embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports*, 32: 359-368.
- Robert, M. L., J. L. Herrera y F. Contreras (1992). Micropropagation of *Agave* spp., en: Biotechnology in agriculture and forestry, (Bajaj Y. P. S., ed.). Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp 307-329.

- Robert, M. L., J. L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda y M. A. Herrera-Alamillo (2006). An efficient method for the Micropropagation of *Agave* species, en: Plant Cell Culture Protocols, (Loyola-Vargas V. M. y F. Vázquez-Flota, eds.). 165-178.
- Rodermel, S. (2002). *Arabidopsis* variegation mutants, en: The *Arabidopsis* Book, American Society of Plant Biologists, (Somerville C. y E. M. Meyerowitz, eds.). Rockville, MD, pp 1-28.
- Rodriguez-Enriquez, J., H. G. Dickinson y R. T. Grant-Downton (2011). MicroRNA misregulation: an overlooked factor generating somaclonal variation? Trends in Plant Science, 16: 1360-1385.
- Ruffoni, B. y M. Savona (2013). Physiological and biochemical analysis of growth abnormalities associated with plant tissue culture. Horticulture Environmental Biotechnology, 54: 191-205.
- Ruzycka, K., M. Simaskova, J. Duclercq, J. Petrasek, E. Zazímalová, S. Simon, J. Friml y M. C. E. Van Montagu (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 106: 4284-4289.
- Saidi, N., S. Cherkaoui, A. Chlyah y H. Chlyah (1997). Embryo formation and regeneration in *Triticum turgidum* ssp. *durum* anther culture. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 51: 27-33.
- Sakakibara, H. (2006). Cytokinins: activity, biosynthesis, and translocation. Annual Review of Plant Biology, 57: 431-449.
- Sakamoto, W. (2003). Leaf-variegated mutations and their responsible genes in *Arabidopsis thaliana*. Genes and Genetics Systems, 78: 1-9.
- Sakamoto, W., T. Tamura, Y. Hanba-Tomita, M. Sodmergen y M. Murata (2002). The *VAR1* locus of *Arabidopsis* encodes a chloroplastic FtsH and is responsible for leaf variegation in the mutant alleles. Genes to Cells, 7: 769-780.
- Santamaría, J. M., J. L. Herrera y M. L. Robert (1995). Stomatal physiology of micropropagated CAM plant, *Agave tequilana* (Weber). Journal Plant Growth Regulation, 16: 211-214.
- Santner, A., L. I. Calderon-Villalobos y M. Estelle (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. Plant Molecular Biology, 43: 179-188.
- Schellenbaum, P., V. Mohler, G. Wenzel y B. Walter (2008). Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.). BMC Plant Biology, 8: 78.
- Scolnik, P. A., P. Hinton, I. M. Greenblatt, G. Giuliano, M. R. Delanoy, D. L. Spector y D. Pollock (1987). Somatic instability of carotenoid biosynthesis in the tomato *ghost* mutant and its effect on plastid development. Planta, 171: 11-18.

- Seckinger, G. R., (1991). Micropropagation of vegetable crop species, en: Micropropagation, (Debergh P. C. y R. H. Zimmerman, eds.). Springer, Dordrecht, pp 265-284.
- Seibert, M., P. Wetherbee y D. Job (1975). The effects of light intensity and spectral quality on growth and shoot initiation in tobacco callus. *Plant Physiology*, 56: 130-139.
- Sharma, R. R., V. B. Patel y H. Krishna (2006). Relationship between light, fruit and leaf mineral content with albinism incidence in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Scientia Horticulturae*, 109: 66-70.
- Shen, X., J. Chen y M. E. Kane (2007). Assessment of somaclonal variation in *Dieffenbachia* plants regenerated through indirect shoot organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 91: 21-27.
- Shumway, L. K. y T. E. Weier (1967). The chloroplast structure of iojap maize. *American Journal of Botany*, 54: 773-780.
- Skirvin, R. M., K. D. McPheeters y M. Norton (1994). Sources and frequency of somaclonal variation. *Horticulture Science*, 29: 1232-1237.
- Skoog, F. (1944). Growth and organ formation in tobacco tissue cultures. *American Journal of Botany*, 31: 19-24.
- Skoog, F. y C. O. Miller (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultures *in vitro*. *Symposium of Society of Experimental Biology*, 11: 118-131.
- Smith, H. B. (1999). Photosynthetic pigmentation-variegations on a theme. *The Plant Cell*, 11: 1-3.
- Smulders, M. J. M. y G. J. Klerk (2011). Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulators*, 63: 137-146.
- Smulders, M. J. M., W. Rus-Kortekaas y B. Vosman (1995). Tissue culture-induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants. *Theoretical and Applied Genetics*, 91: 1257-1264.
- Smýkal, L., L. Valledor, R. Rodriguez y M. Griga (2007). Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (*Pisum sativum* L.). *Plant Cell Reports*, 26: 1985-1998.
- Sovari, S. y O. Schieder (1987). Influence of sucrose and melibiose on barley anther cultures in starch media. *Plant Breed*, 99: 164-171.
- Spoehr, H. A., (1942). The culture of albino maize. *Plant Physiology*, 17: 397-410.
- Stetler, D. A. y W. M. Laetsch (1965). Kinetin-induced chloroplast maturation in cultures of

- tobacco tissue. *Science*, 149: 1387-1388.
- Stewart, A. J., W. Chapman, G. I. Jenkins, I. Graham, T. Martin y A. Crozier (2001). The effect of nitrogen and phosphorus deficiency on flavonol accumulation in plant tissues. *Plant, Cell and Environment*, 24: 1189-1197.
- Stroud, H., B. Ding, S. A. Simon, S. Feng, M. Bellizzi, M. Pellegrini, G.-L. Wang, B. C. Meyers y S. E. Jacobsen (2013). Plants regenerated from tissue culture contain stable epigenome changes in rice. *Elife*, 2: e00354.
- Su, Y.-H., Y.-B. Liu y X. Zhang (2011). Auxin-cytokinin interaction regulates meristem development. *Molecular Plant*, 4: 616-625.
- Sugiyama, M., (1999). Organogenesis *in vitro*. *Current Opinion of Plant Biology*, 2: 61-64.
- Sun, Y. H., C. Y. Hung, J. Qiu, J. Chen, F. S. Kittur, C. E. Oldham, R. J. Henny, K. O. Burkey, L. Fan y J. Xie (2017). Accumulation of high OPDA level correlates with reduced ROS and elevated GSH benefiting with the cell survival in variegated leaves. *Scientific Reports*, 7: 1-15.
- Thorpe, T. A. (1990). Organogenesis *in vitro*: structural, physiological, and biochemical aspects, en: *Plant Aging*, (Rodríguez R., R. S. Tamés y D. J. Durzan, eds.). Springer, Boston, MA, pp 191-197.
- Turesson, I. K. D., S. Pedersen y S. B. Andersen (1989). Nuclear genes affecting albinism in wheat (*Triticum aestivum* L.) anther culture. *Theoretical and Applied Genetics*, 78: 879-883.
- Us-Camas, R., E. Castillo-Castro, M. Aguilar-Espinosa, V. Limones-Briones, R. Rivera-Madrid, M. L. Robert y C. De-la-Peña (2017). Assessment of molecular and epigenetic changes in the albinism of *Agave angustifolia* Haw. *Plant Science*, 263: 156-167.
- Us-Camas, R., G. Rivera-Solís, F. Duarte-Aké y C. De-la-Peña (2014). *In vitro* culture an epigenetic challenge for plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 118: 187-201.
- Valladares, F. y Ü. Niinemets (2008). Shade tolerance, a key plant feature of complex nature and consequences. *Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 39: 237-257.
- Valledor, L., M. Meijón, R. Hasbún, M. J. Cañal y R. Rodríguez (2010). Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of *in vitro* organogenic capability. *Journal of Plant Physiology*, 167: 351-357.
- Vanneste, S. y J. Friml (2009). Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136: 1016.

- Vanstraelen, M. y E. Benková (2012). Hormonal Interactions in the Regulation of plant Development. *Annuals Review Cell Developmental Biology*, 463-487.
- Vázquez, A. M. y R. Linacero (2010). Stress and somaclonal variation, en: *Plant Developmental Biology-Biotechnological Perspectives*, (Pua E. C. y M. Davey, eds.). Springer, New York, pp 45-64.
- Veilleux, R. E. y A. A. T. Johnson (1998). Somaclonal variation: molecular analysis, transformation, interaction, and utilization. *Plant Breeding Reviews*, 16: 229-268.
- Veit, B., (2009). Hormone mediated regulation of the shoot apical meristem. *Plant Molecular Biology*, 69: 397-408.
- Verhoeven, K. J. F., J. Jansen, P. J. van Dijk y A. Biere (2010). Stress-induced DNA methylation changes and their heritability in asexual dandelions. *New Phytologist*, 185: 1108-1118.
- Vidal, M. D. C. y E. De García (2000). Analysis of a *Musa* spp. somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka. *Plant Molecular Biology*, 18: 23-31.
- Villabos, V. M., M. J. Oliver, E. C. Yeung y T. A. Thorpe (1984). Cytokinin induced switch development in excised cotyledons of radiata pine cultured *in vitro*. *Physiologia plantarum*, 61: 483-489.
- Vining, K., K. R. Pomraning, L. J. Wilhelm, C. Ma, M. Pellegrini, Y. Di, T. C. Mockler, M. Freitag y S. T. Strauss (2013). Methylome reorganization during *in vitro* dedifferentiation and regeneration of *Populus trichocarpa*. *BMC Plant Biology*, 13: 92.
- von Wiren, N., S. Mori, H. Marschner y V. Römheld (1994). Iron inefficiency in maize mutant *ys1* (*Zea mays* L. cv yellow-stripe) is caused by a defect in uptake of iron phytosiderophores. *Plant Physiology*, 106: 71-77.
- Walles, B., (1963). Macromolecular physiology of plastids. IV. On amino acid requirements of lethal chloroplast mutants in barley. *Hereditas*, 50: 317-344.
- Wang, Q. M., L. Wang, Y. Zhou, J. Cui, Y. Wang y C. Zhao (2016). Leaf patterning of *Clivia miniata* var. *variegata* is associated with differential DNA methylation. *Plant Cell Reports*, 35: 167-184.
- Waters, M. T. y J. A. Langdale (2009). The making of a chloroplast. *EMBO Journal*, 28: 2861-2873.
- Weis, J. S. y M. J. Jaffe (1969). Photoenhancement by blue light of organogenesis in tobacco pith cultures. *Physiology Plant*, 22: 171-176.
- Wellburn, A. R. (1994). The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 144: 307-313.

- Werner, T., K. Holst, Y. Poers, A. Guivarc'h, A. Mustroph, D. Chriqui, B. Grimm y T. Schmölling (2008). Cytokinin deficiency causes distinct changes of sink and source parameters in tobacco shoots and roots. *Journal of Experimental Botany*, 59: 2659-2672.
- Werner, T., V. Motyka, M. Strnad y T. Schmölling (2001). Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 98: 10487-10492.
- Whatley, J. M., (1978). A suggested cycle of plastid developmental interrelationships. *New Phytology*, 80: 489-502.
- White, P. J. y P. H. Brown (2010). Plant nutrition for sustainable development and global health. *Annals of Botany*, 105: 1073-1080.
- Wojnarowicz, G., S. Caredda, P. Devaux, R. Sangwan y C. Clément (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.
- Xing, S., J. Miao, S. Li, G. Qin, S. Tang, H. Li, H. Gu y L. J. Qu (2010). Disruption of the 1-deoxy-D-Xylulose-5-phosphate reductoisomerase (DXR) gene results in albino, dwarf and defects in trichome initiation and stomata closure in *Arabidopsis*. *Cell Research*, 20: 688-700.
- Xu, M., X. Li y S. S. Korban (2004). DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 109: 899-910.
- Yao, J. L. y D. Cohen (2000). Multiple gene control of plastome-genome incompatibility and plastid DNA inheritance in interspecific hybrids of *Zantedeschia*. *Theoretical and Applied Genetics*, 101: 400-406.
- Yao, J. L., D. Cohen y R. E. Rowland (1995). Interspecific albino and variegated hybrids in the genus *Zantedeschia*. *Plant Science*, 109: 199-206.
- Yu, F., A. Fu, M. Aluru, S. Park, Y. Xu, H. Liu, X. Liu, A. Foudree, M. Nambogga y S. Rodermel (2007). Variegation mutants and mechanisms of chloroplast biogenesis. *Plant Cell Environment*, 30: 350-365.
- Zaffari, G. R., L. E. P. Peres y G. B. Kerbaury (1998). Endogenous levels of cytokinins, indoleacetic acid, abscisic acid, and pigments in variegated somaclones of micropropagated banana leaves. *Journal of Plant Growth Regulation*, 17: 59-61.
- Zhang, H. y J. Ogas (2009). An epigenetic perspective on developmental regulation of seed genes. *Molecular Plant*, 1-18.
- Zhao, J., N. Morozova, L. Williams, L. Libs, Y. Avivi y G. Grafi (2001). Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells. *The Journal of*

Biological Chemistry, 276: 22772-22778.

Zhao, X. Y., Y. H. Su, Z. J. Cheng y X. S. Zhang (2008). Cell fate Switch during *in vitro* plant organogenesis. Journal of Integrative Plant Biology, 50: 816-824.

Zhao, Y. D., (2010). Auxin biosynthesis and its role in plant development. Annual Review Plant Biology, 61: 49-64.