



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**ESTUDIO SOBRE EL REJUVENECIMIENTO *IN*
VITRO: *Agave* UN MODELO**

Tesis que presenta

ANTONIO RESCALVO MORALES

En opción al título de

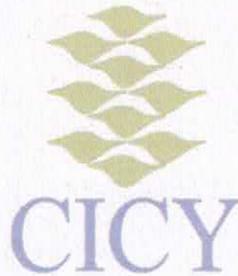
DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2016

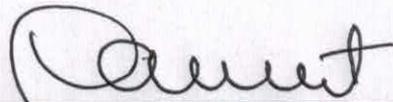
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de **Antonio Rescalvo Morales** titulado “**Estudio Sobre el Rejuvenecimiento *in vitro*: Agave un modelo**” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente.



Dr. Manuel Martínez Estévez
Director de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 25 de mayo de 2016

Mérida, Yucatán, México; a 25 de mayo de 2016.

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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


Antonio Rescalvo Morales

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Marcadores Moleculares y Genómica Funcional de la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto titulado “Rejuvenecimiento mediante cultivo *in vitro*: *Agave* un modelo” no. CB-2021-180757-Z en el que participe bajo la dirección del Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer por patrocinar y dirigir este trabajo de investigación.

A los doctores que formaron parte del Comité Tutorial, Predoctoral y Revisor de tesis: Dra. Rosa María Escobedo Gracia-Medrano, Dra. Nina Valadez González, Dra. Ileana Echevarría Machado, Dr. Felipe Vázquez Flota, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dra. Clelia de la Peña Seaman y el Dr. José Alberto Narváez Zapata quienes con sus comentarios y observaciones ayudaron a mejorar el presente trabajo.

Al Dr. Manuel L. Robert por facilitar el material vegetal para el desarrollo de los experimentos de cultivo *in vitro* y aclimatación.

A la Dra. Kelly Maribel Monja Mío por su asesoría, intelecto y diseño de experimentos que permitió el desarrollo del presente proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada No. 240190 durante el periodo Febrero 2012 - Enero 2016 para los estudios de doctorado y por financiar el proyecto Rejuvenecimiento mediante cultivo *in vitro*: *Agave* un modelo no. CB-2021-180757-Z.

Al Centro de Investigación Científica de Yucatán por permitirme utilizar sus instalaciones para llevar a cabo este trabajo de tesis.

A los técnicos M.C. Adriana Quiroz Moreno, Ing. Gastón Herrera Herrera, M.C. Miriam Monforte González y Q.F.B. Matilde Margarita Ortiz García por la ayuda y asistencia en las metodologías realizadas en este trabajo.

A mis compañeros de laboratorio Javier, Zamaria, Laura, Eduardo, Yahaira, María, Gerardo, María José, Erick y Daniela por hacer un ambiente alegre, ameno y de respeto en el trabajo.

PRODUCTOS GENERADOS

Congresos:

Del 26 de Abril al 01 Mayo del 2016. EMBO Conferences: Telomeres, Telomerase and Disease. Rejuvenation by tissue culture: *Agave* as a model. Liege, Belgium.

Del 15 al 17 de Octubre del 2014. II International Symposium on *Agave*. Study on Rejuvenation *in vitro*: *Agave* as a Model. Guadalajara, Jalisco, México.

Del 11 al 17 de Noviembre del 2012. XXIX Congreso Nacional de Bioquímica. Estudio sobre el Rejuvenecimiento *in vitro*: *Agave* un modelo. Oaxaca, Oaxaca, México.

Del 24 al 26 de Octubre del 2012. VI Congreso de Biotecnología y Bioingeniería del Sureste. Estudio sobre el Rejuvenecimiento *in vitro*: *Agave* un modelo. Mérida, Yucatán, México.

Artículos:

Rescalvo-Morales, A., Monja-Mio, K.M., Herrera- Herrera, G., Robert, M.L and Sanchez-Teyer, L. F. Analysis of telomere length during the organogenic induction of *Agave fourcroydes* Lem and *Agave tequilana* Weber. (Aceptado)

Rescalvo-Morales, A., Monja-Mio, K.M., Quiroz-Moreno, A., Robert, M.L and Sanchez-Teyer, L. F. Telomere length in *Agave tequilana* Weber plants during the *in vitro* to *ex vitro* transition. (sometido)

DEDICATORIA

A mis padres, que me brindaron su apoyo, comprensión, consejos y gran cariño a lo largo de este camino académico.

A mi esposa Kelly, que siempre me ha apoyado de manera incondicional en los momentos más críticos, estoy seguro que sin ti, este trabajo no hubiese llegado a culminarse; además, me diste el regalo más grande de este mundo, un hijo.

A mi hijo Erick, que llegaste a darle alegría a mi vida, y con tus sonrisas me hiciste pensar que lo que realizaba tenía sentido, espero que algún día te sientas orgulloso de mi, así como yo me siento orgulloso de llamarte hijo.

A mis hermanos Claudia y Arturo, por todo el apoyo incondicional que me han brindado, pero sobre todo por creer siempre en mí y en mis capacidades, ustedes han sido y será un modelo a seguir, espero algún día poder regresarles un poco de lo mucho que me han dado, no existen palabras para poder decir lo agradecido que estoy con ustedes.

A la Dra. Leticia Ponce de León García y la Dra. Claudia Barbosa Martínez, que me permitieron ser parte de un proyecto de investigación por primera vez y de esta manera encaminarme en este mundo científico que me trajo el CICY.

A mis amigos y compañeros, que me brindaron un poco de su tiempo para poder mejorar este trabajo de tesis.

ÍNDICE

RESUMEN.....	xi
ABSTRAT	xiii
INTRODUCCIÓN.....	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1. Telómeros.....	3
1.1 Estructura y composición telomérica.....	3
1.2 Funciones de los telómeros	7
1.3 Telomerasa.....	9
1.3.1 Estructura y composición	9
1.3.2 Actividad y función	12
1.4 Metodologías empleadas para el estudio de telómeros y telomerasa.....	13
1.4.1 Técnicas empleadas para el estudio del telómero.....	13
1.4.2 Determinación de la actividad de la telomerasa	14
1.5 Estudios sobre la longitud de telómeros y la actividad de telomerasa en plantas.....	15
1.5.1 Telómeros.....	15
1.5.2 Telomerasa.....	17
1.6 Estudios sobre los telómeros en <i>Agave</i>	18
1.7 Cultivo <i>in vitro</i>	20

1.8 Importancia del género <i>Agave</i>	21
1.9 JUSTIFICACIÓN.....	23
1.10 HIPOTESIS.....	24
1.11 OBJETIVOS.....	24
1.11.1 General	24
1.11.2 Particulares	24
1.12 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	25
CAPÍTULO II.....	27
DINÁMICA DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN PLANTAS DE <i>Agave tequilana</i> Weber DURANTE LA TRANSICIÓN DE <i>IN VITRO</i> A <i>EX VITRO</i>	27
2. 1 INTRODUCCIÓN.....	27
2.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	29
2.2.1 Material vegetal.....	29
2.2.2 Determinación de la longitud de los fragmentos de restricción terminal (TRFL).....	30
2.2.2.2 Longitud telomérica determinada mediante southern blot	31
2.2.2.3 Medición de la longitud de los TRF y análisis estadísticos	31
2.3 RESULTADOS	32
2.3.1 Dinámica de la longitud telomérica durante la transición <i>in vitro</i> a <i>ex vitro</i>	32
2.3.2 Longitud telomérica en diferentes tejidos y edades en plantas de invernadero	33
2.3.3 Comportamiento de la longitud telomérica en planta de campo de seis edades.....	37
2.4 DISCUSIÓN.....	41

2.4.1 Acortamiento de la longitud telomérica ocurrido durante la transición de <i>in vitro</i> a <i>ex vitro</i>	41
2.4.2 Longitud telomérica por tipo de tejido y edad en plantas aclimatadas	42
2.4.3 Dinámica de la longitud telomérica durante la edad en plantas de campo.....	44
2.5 CONCLUSIONES	46
CAPÍTULO III.....	47
DINÁMICA DE LA LONGITUD TELOMÉRICA DURANTE LA INDUCCIÓN ORGANOGÉNICA DE <i>Agave fourcroydes</i> Lem Y <i>Agave tequilana</i> Weber	47
3.1 INTRODUCCIÓN.....	47
3.2 MATERIALES Y MÉTODOS	49
3.2.1 Material vegetal.....	49
3.2.2 Inducción de la organogénesis.....	49
3.2.3 Extracción del ADN genómico.....	50
3.2.4 Evaluación de la longitud de los fragmentos de restricción terminal (TRFL).....	51
3.2.5 Medición de la longitud de los TRF y análisis estadísticos.....	51
3.3 RESULTADOS	52
3.3.1 Caracterización de la longitud telomérica del material donador.....	52
3.3.2 Inducción organogénica de <i>A. fourcroydes</i> y <i>A. tequilana</i>	54
3.3.3 Dinámica de la longitud telomérica durante la inducción organogénica en <i>A. fourcroydes</i>	55
3.3.4 Dinámica de la longitud telomérica durante la inducción organogénica en <i>A. tequilana</i>	55

3.4 DISCUSIÓN.....	59
3.4.1 Diferencias de la longitud telomérica en el material parental de acuerdo a especies	59
3.4.2 Dinámica de la longitud telomérica durante la inducción organogénica de <i>A. fourcroydes</i> y <i>A. tequilana</i>	61
3.5 CONCLUSIONES	63
CAPÍTULO IV	65
ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVA PARA DETERMINAR EL NÚMERO DE COPIAS DEL ADN TELOMÉRICO EN <i>Agave tequilana</i>	65
4.1 INTRODUCCIÓN.....	65
4.2 MATERIALES Y MÉTODOS.....	67
4.2.1 Material biológico	67
4.2.2 Determinación del número de copias del ADN telomérico.....	68
4.2.2.1 Extracción de ADN genómico.....	68
4.2.2.2 Obtención de fragmentos teloméricos a partir de concatenados	68
4.2.2.3. Purificación de amplificadas a partir de gel de agarosa.....	69
4.2.2.4 Clonación de fragmentos teloméricos	69
4.2.2.5 Secuenciación.....	69
4.2.2.6 Curva estándar para PCR cuantitativa	69
4.2.2.7 Amplificación de las secuencias de ADN telomérico mediante PCR cuantitativa..	70
4.3 RESULTADOS	70

4.3.1 Obtención de fragmento teloméricos.....	70
4.3.3 Número de copias en diferentes tejidos de <i>Agave tequilana</i>	76
4.4 DISCUSIÓN.....	79
4.5 CONCLUSIONES	81
CAPÍTULO V	83
DISCUSIÓN GENERAL.....	83
4.1 Dinámica de la longitud telomérica durante la transición de <i>in vitro</i> a <i>ex vitro</i>	83
4.2 Comportamiento de la longitud telomérica en diferentes tejido (hojas tallo y raíces) y la edad durante el proceso de aclimatación.....	84
4.3 Dinámica de la longitud telomérica durante la edad en plantas de campo de <i>Agave tequilana</i>	85
4.4 Longitud telomérica en plantas de <i>Agave tequilana</i> y <i>Agave fourcroydes</i> en condiciones de invernadero	87
4.5 Análisis de la longitud telomérica durante la inducción organogénica de <i>A. fourcroydes</i> y <i>A. tequilana</i>	88
CAPÍTULO VI	91
CONCLUSIONES GENERALES	91
5. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS.....	91
5.1 Conclusiones	91
5.2 Perspectivas	92
BIBLIOGRAFIA.....	95

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1.1 Representación esquemática de las estructuras secundarias formadas por el ADN telomérico y proteínas accesorias en animales..	6
Figura 1.2 Proceso de replicación del ADN.....	8
Figura 1.3 Modelo sobre la relación entre el envejecimiento, la longitud del ADN telomérico y la actividad de la telomerasa.....	10
Figura 1.4 Representación esquemática de la síntesis de los telómeros..	11
Figura 2.1 Plantas de <i>A. tequilana</i> utilizadas para determinar la longitud del ADN telomérico.....	33
Figura 2.2 Análisis de la longitud telomérica durante el proceso de <i>in vitro</i> a <i>ex vitro</i>	34
Figura 2.3 Análisis de la longitud telomérica por tipo de tejidos en diferentes edades durante el proceso de aclimatación.....	35
Figura 2.4 Análisis de la longitud telomérica durante la edad en plantas de campo.....	38
Figura 2.5 Comparación de la longitud telomérica por tipo de hojas (basal, media, central) en plantas de campo de diferente edades (1-6 años)..	39
Figura 2.6 Comparación de la longitud telomérica entre las plantas aclimatas y las plantas de campo de tres edades (1-3 años) en los tres tipos de hojas (basal, media y central)..	40
Figura 3.1 Representación esquemática del diseño experimental basado en la determinación de la longitud telomérica a partir de los tejidos de la planta madre y durante el proceso de inducción organogénica para ambas especies de agaves.	50
Figura 3.2 Análisis de la longitud telomérica en diferentes tejidos de las plantas madre o donadoras (<i>A. fourcroydes</i> y <i>A. tequilana</i>)..	53
Figura 3.3 Proceso de inducción organogénica en agaves.	54

Figura 3.4 Imagen representativa de un southern blot utilizado para la cuantificación de la longitud telomérica durante el proceso organogénico.	56
Figura 3.5 Análisis de la longitud telomérica durante el proceso organogénico.....	57
Figura 3.6 Comparación de la longitud telomérica entre <i>A.</i> y <i>A. tequilana</i> al inicio de la inducción (semana 0) y al final de la inducción organogénica (semana 8).	58
Figura 4.1 Amplificación de los fragmentos teloméricos a partir de la concatenación de los cebadores.....	71
Figura 4.2 Análisis de transformantes en un gel de agarosa al 1.2%.	72
Figura 4.3 Gráficas de las amplificaciones obtenidas a partir de la concatenación de los cebadores teloméricos.....	74
Figura 4.4 Amplificación de fragmentos teloméricos en <i>A. tequilana</i> utilizando diferentes concentraciones de cebadores..	75
Figura 4.5 Amplificación de fragmentos específicos de ADN telomérico obtenidos mediante PCR cuantitativa utilizados para la cuantificación del número de copias.	77
Figura 4.6 Estimación del número de copias de ADN telomérico en hojas de plantas mantenidas en invernadero de <i>Agave tequilana</i>	79

LISTADO DE TABLAS

Tabla 1.1 Variacion de los motivos minisatelite de ADN telomérico y la longitud telomérica en diferentes organismos eucariotas..	4
Tabla 2.1 Material vegetal utilizado para la estimacion de la longitud telomerica.....	30
Tabla 4.1 Material vegetal seleccionado a partir de plantas de <i>A. tequilana</i> para la estimacion del número de copias del ADN telomérico.	67
Tabla 4.2 Número de copias de ADN telomérico en diferentes tejidos de plantas aclimatadas de <i>A. tequilana</i>	78

RESUMEN

Los agaves son de importancia ornamental y sirven como materia prima en procesos agroindustrial en México para la obtención de bebidas alcohólicas, inulina y productos esteroideos, pero hasta ahora existe poca información acerca de las regiones teloméricas en estas plantas. Los cambios en la longitud de los telómeros (acortamiento y alargamiento) han sido asociados con la edad, el desarrollo de los tejidos, la pérdida de la replicación celular y la capacidad de regeneración en diferentes especies. En la presente tesis, se estudió: i) la dinámica de la longitud de los fragmentos de restricción terminal (TRFL, por sus siglas en inglés) en plantas de *Agave tequilana* y *Agave fourcroydes* durante la etapa de aclimatación, comparando hojas, tallos y raíces; ii) los cambios en la TRFL en las hojas de plantas de *A. tequilana* de diferentes edades (1-6 años) bajo condiciones de campo, y iii) la dinámica de la longitud telomérica durante el proceso organogénico *in vitro* en *A. fourcroydes* y *A. tequilana*.

Durante la transición de *in vitro* a *ex vitro* se observó un acortamiento de los telómeros durante los seis primeros meses de aclimatación *ex vitro*, en comparación con las plántulas *in vitro* (12 kb), y un incremento de la longitud (restablecimiento) durante el primer año de aclimatación (31 kb), el cual se mantuvo posteriormente en plantas de dos y tres años. Los análisis de la TRFL en los tejidos mostró que varía de acuerdo a la edad y al tejido analizado, en donde los tejidos jóvenes (hoja central) o meristemáticos (tallo) fueron los que presentaron mayor longitud, con un rango de 11.9-25.9 kb en la hoja basal, 15.2-26.2 kb en la hoja media, 17-28.8 kb en la hoja central, 22-31 kb en el tallo y 12.3-27.6 kb en la raíz. En cuanto al sistema *in vitro*, los resultados mostraron que la dinámica de la longitud telomérica varía con la especie. En *A. fourcroydes*, los cambios durante el proceso de inducción fueron más drásticos (22.8- 50.8 kb), mientras que en *A. tequilana* la variación fue menor (27.8- 37.9 kb). Al comparar la longitud telomérica entre plantas de tres años de aclimatación de *A. fourcroydes* y *A. tequilana* ésta mostró un comportamiento muy similar entre tejidos para ambas especies. Por otra parte, se observó una estabilidad en la longitud telomérica durante la edad (1-6 años) en las plantas de campo, sugiriendo que los agaves tienen un mecanismo que mantiene la longitud telomérica durante el desarrollo. Este trabajo es el primer reporte sobre la dinámica de la longitud de los telómeros durante el proceso de *in vitro* a *ex vitro* en plantas y el primer reporte sobre el estudio de la longitud telomérica en especies de *Agave*.

ABSTRACT

Agaves are involved both as ornamental and raw materials in a wide variety of agro-industrial processes in Mexico, and are considered particularly important in the production of alcoholic beverages, inulin and steroid products. However, so far there is little information about the telomere regions in these plants. Changes in the telomere length (shortening and lengthening) have been associated with age, the development tissue, loss of cell replication and the ability of regeneration in different species.

In this thesis we studied: i) the dynamics of the terminal restriction fragments length (TRFL) in plants of *Agave tequilana* and *Agave fourcroydes* during the acclimatization stage, with the comparison of leaves, stems and roots; ii) changes in the TRFL in the leaves of plants of *A. tequilana* of different ages (1-6 years) under field conditions, and iii) the dynamics of telomere length during *in vitro* organogenic process in *A. fourcroydes* and *A. tequilana*.

During the transition from in-vitro to ex vitro we observed a shortening of telomeres during the first six months of acclimatization *ex vitro*, in comparison with in-vitro plantlets (12 kb), and an increase in the length (recovery) during the first year of acclimatization (31 kb), which subsequently remained at two and three year plants during the process of acclimatization.

The analysis of the TRFL in the tissues showed that telomere length varies according to the age of the plant and type of tissue: young tissues (central leaf) or meristematic (stem) were those who showed greater length, ranging from 11.9-25.9 kb for basal leaf, 15.2-26.2 kb for the middle leaf, 17-28.8 kb for the central leaf, 22-31 KB for the stem and 12.3-27.6 kb for the root. The comparison of telomere length between plants three years of acclimatization of *A. fourcroydes* and *A. tequilana* showed a very similar behavior between tissues for both species. On the other hand, stability in length was observed during field plants age (1-6 years), suggesting that agaves has a mechanism that keeps the length in a noncritical state during development.

This work is the first report on the dynamics of telomere length during *in vitro* to *ex vitro* process in plants, and the first report on the study of telomere length in species of *Agave*.

INTRODUCCIÓN

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas, constituidas por secuencias de ADN repetidas en tándem y localizadas en las regiones terminales de los cromosomas eucariotes. Su función es mantener la integridad estructural de los cromosomas, evitando su fusión y degradación, además de permitir el apareamiento y recombinación durante la división celular (Xin *et al.*, 2008). La replicación del ADN telomérico involucra una enzima (transcriptasa reversa) denominada telomerasa. La telomerasa provee una solución a un problema de la replicación de los extremos terminales, producto de la incapacidad de la ADN polimerasa para completar la síntesis del extremo 5' del ADN (Blackburn *et al.*, 2006).

La longitud de los telómeros ha sido relacionada con la capacidad de división y el tiempo de vida de las estirpes celulares (Greider, 1998; 1990). Lo anterior ha sido atribuido en parte, al acortamiento de los telómeros con cada ciclo de división celular, hasta un estado crítico en donde la célula pierde la capacidad de dividirse y entra en senescencia y apoptosis (Shawi y Autexier, 2008; Greider, 1998). En algunas especies de plantas, se ha observado que los tejidos diferenciados como hojas, tallos y raíces o en tejidos con mayor edad, se presenta una reducción en la longitud de sus telómeros, mientras que en otras especies esta longitud puede ser mantenida (Flanary y Kletetschka, 2005; Kilian *et al.*, 1995). En cambio, en plantas provenientes de cultivo *in vitro* se ha observado un incremento en la longitud de sus telómeros, lo cual se atribuye al proceso de desdiferenciación y a los cambios a nivel de la cromatina (reprogramación) que permiten que la longitud de los telómeros incremente, debido a un aumento en la actividad de la telomerasa (Fajkus *et al.*, 1998; Kilian *et al.*, 1995).

La actividad de la telomerasa es tejido específica; en el caso de los animales esta enzima solo se encuentra en células germinales o embrionarias y no así en células somáticas o diferenciadas (Greider, 1998). En plantas esta enzima puede estar presente en células somáticas, germinales y meristemáticas. Este comportamiento posiblemente se debe a que las plantas pueden producir nuevos órganos a lo largo de su vida y algunas de sus células son totipotenciales, por lo que la plasticidad durante su etapa de desarrollo puede requerir una amplia expresión y actividad de la telomerasa para poder mantener estas

regiones. Estudios sobre la telomerasa en plantas de cultivo *in vitro* han mostrado que existe una alta actividad de esta enzima en tejidos de embriogénico y en las plantas regeneradas, esto en comparación con el tejido madre estudiado (Kilian *et al.*, 1998; Riha *et al.*, 1998; Fitzgerald *et al.*, 1996).

La regeneración de plantas en el cultivo de tejidos, se basa en la capacidad de las células para redirigir el desarrollo, recuperando la totipotencialidad o la pluripotencia, perdiendo la célula al menos una parte del programa genético y marcas epigenéticas (De Klerk, 2009). La capacidad de los tejidos para poder responder se debe, entre otras cosas, a la edad del explantes y a las condiciones del medio, lo cual se relaciona con la capacidad de proliferación celular, es decir, de división celular, que a su vez está intrínsecamente relacionado con la longitud telomérica y la actividad de la telomerasa (Riha *et al.*, 1998).

En este trabajo, se tuvo como objetivo principal estudiar la longitud de los telómeros asociado a la edad y el tipo de tejido (hojas, tallos y raíces) en plantas de invernadero, en campo y plántulas provenientes de cultivo *in vitro*, así como la dinámica durante la inducción organogénica en dos especies de *Agave* (*A. fourcroydes* y *A. tequilana*).

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Telómeros

1.1 Estructura y composición telomérica

Los telómeros (del griego *telos*, “final” y *meros*, “parte”) son regiones cromatínicas de ADN no codificante. Estas regiones cromosómicas fueron descubiertas por Hermann J. Muller en la década de los años 30' y años más tarde Barba McClintock quien describió la importancia biológica de dicha región (Fajkus *et al.*, 2005). Posteriormente Blackburn y colaboradores en los 80' describieron los mecanismos moleculares implicados en el mantenimiento de dicha región (Greider y Blackburn, 1985; Blackburn *et al.*, 1984).

Los telómeros se describen como una estructura nucleoproteicas (ADN y proteínas), constituidos por secuencias de ADN conservado, con un motivo específico repetido en tándem y localizados en la región terminal de los cromosomas eucarióticos (Watson y Riha, 2010). El motivo repetido varía entre los diferentes grupos taxonómicos (Tabla 1.1) (Dunshea *et al.*, 2012; Lange, 2005; Chan y Blackburn, 2004; Petracek *et al.*, 1990).

En las plantas existe un motivo repetido heptanucleótidos (TTTAGGG)_n que es altamente conservado y fue previamente caracterizado en *Arabidopsis* (Richards and Ausubel, 1988). Sin embargo, existen algunas excepciones en especies de la familia Amaryllidaceae (Fajkus *et al.*, 2015), Solanaceae (Peska *et al.*, 2015) y el orden Asparagales en donde se encuentran clasificadas las especies del género *Agave* (Tabla 1) (Robert *et al.*, 2008; Sýkorová *et al.*, 2003). En Asparagales este motivo repetido es parecido al de humanos (TTAGGG)_n y se sugiere que este se originó a partir de una mutación puntual en el cebador de ARN de la telomerasa (Sýkorová *et al.*, 2006; 2003; Cesare *et al.*, 2003).

Una de las cadenas que compone el ADN telomérico es rica en guanina, denominada hebra G u “overhang”, la cual se encuentra orientada de 5' a 3' y dirigida hacia el extremo terminal del telómero; mientras que su cadena complementaria es rica en citosinas, por lo cual se denomina hebra C (Baumann y Price, 2010; Watson y Riha, 2010).

Tabla 1.1 Variación de los motivos minisatélite de ADN telomérico y la longitud telomérica en diferentes organismos eucariotas. pb: pares de bases; kb: kilobases. N/D: no determinado. Modificado de Greider (1990).

Organismos	Motivo telomérico	Longitud promedio
Ciliados		
<i>Tetrahymena</i>	TTGGGG	250 pb
<i>Paramecium</i>	TTGGGG/TTTGGG	100-500 pb
<i>Oxytricha</i>	TTTTGGGG	38 pb
Flagelados		
<i>Trypanosoma</i>	TTAGGG	2-7.5 kb
Esporozoos		
<i>Plasmodium</i>	TTTAGGG/TTCAGGGG	1.2-6.7 kb
Levaduras		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	TG ₁₋₃	350 pb
<i>Saccharomyces pombe</i>	T ₁₋₃ ACAG ₁₋₆	200-300 pb
Algas		
<i>Clamydomonas</i>	TTTTAGGG	300-350 pb
Plantas		
<i>Arabidopsis</i>	TTTAGGG	2-4 kb
Asparagaceae	TTAGGG	N/D
<i>Cestrum elegans</i>	TTTTTTAGGG	N/D
Mamíferos		
<i>Homo sapiens</i>	TTAGGG	10 kb

La hebra G puede extenderse y sobresalir desde 14 nucleótidos para el caso de protozoarios ciliados (Wei y Price, 2003), 60-100 nucleótidos en mamíferos (Chai *et al.*, 2006), o hasta más de 150 kb y la variación en el tamaño de dicha secuencia es especie-específica, por lo cual existen varios estudios sobre su variación (Watson y Riha, 2010; Baumann y Price, 2010). En algunos grupos, esta hebra sobresaliente forma una estructura secundaria denominada Bucle-T, la cual ha sido identificada hasta ahora en

humanos, protozoarios y en plantas; dicha estructura permite distinguir y proteger esta región cromosómica (Zellinger y Riha, 2007; Wei, 2003).

Estas secuencias repetidas teloméricas presentan un alto grado de conservación, probablemente resultado de la interacción entre el ADN telomérico y las proteínas de unión específica a dicho ADN (Watson y Riha, 2010; Yu, 2011; Wei, 2003). Estas proteínas, denominadas proteínas de unión al telómero (TBP: telomeric binding protein, por sus siglas en inglés) son un componente importante de la estructuración de los telómeros y pueden unirse tanto a secuencias monofibrilares, así como a secuencias de doble cadena (Baumann y Price, 2010; Zellinger y Riha, 2007).

Dentro de estas proteínas se encuentran TRF1 y TRF2, las cuales se unen directamente al ADN telomérico, cumpliendo funciones de regulación, así como en la formación de una estructura secundaria denominada Bucle-T (Fig. 1.1) (Watson y Riha, 2010). Específicamente la proteína TRF1 se une al ADN de doble cadena, mientras que TRF2 está implicada en el reconocimiento de la cadena sencilla u overhang, permitiendo que esta cadena se encuentre disponible para la elongación (Lamb *et al.*, 2012; Watson y Riha, 2010). Además de estas proteínas también se encuentran TIN1 y RAP1, las cuales reconocen a las proteínas TRF1 y TRF2, y de esta manera reclutan proteínas accesorias como TPP1 y POT1 involucradas en los procesos de regulación de la actividad de la telomerasa (Fig. 1.1) (Lamb *et al.*, 2012; Watson y Riha, 2010; Watson y Shippen, 2007). POT1 a su vez es una proteína esencial que brinda protección y permite la síntesis del ADN telomérico (Lamb *et al.*, 2012).

Se ha observado que POT1 regula directamente la longitud de esta región, lo cual se debe al secuestro del ADN telomérico evitando la accesibilidad de la telomerasa, por lo tanto la región telomérica no puede ser amplificada (Lamb *et al.*, 2012; Baumann y Price, 2010). Todas estas proteínas, ya sea de manera directa o mediante unión a otras proteínas están involucradas en la formación de estructuras secundarias como el Bucle-T, el telosoma, complejo Shelterin, Bucle-D, entre otras, que a su vez está involucrada en la síntesis, regulación, protección y mantenimiento de los extremos cromosómicos (Fig. 1.1) (Watson y Riha, 2010; Watson y Shippen, 2007).

1.2 Funciones de los telómeros

Los telómeros presentan una conservación filogenética estructural y funcional, lo cual, se ha puesto de manifiesto el carácter esencial de estas estructuras para la funcionalidad de la célula (Watson y Riha, 2010; Yu *et al.*, 2007). La hebra sobresaliente u overhang se repliega e invade el dúplex de ADN telomérico, formando una estructura que brinda protección al telómero, manteniendo la integridad estructural de los cromosomas, evitando la fusión de sus extremos y la degradación por nucleasas, además de estar involucrados en la regulación genética, y el anclaje de los cromosomas a la matriz nuclear durante el apareamiento y recombinación de los cromosomas durante el proceso de división celular (Zellinger y Riha, 2007; Heacock, 2007).

Existe una variación en la longitud de las regiones teloméricas entre los diferentes grupos taxonómicos, y cada especie mantiene sus telómeros en una longitud óptima, a la cual le permita mantener su función, la estructura genética y cromosómica de la célula (Yu, 2007; Heacock *et al.*, 2004).

La longitud del telómero ha sido relacionada con la capacidad de la célula para poder dividirse y a su vez se correlaciona con el tiempo de vida de las estirpes celulares (Taddei *et al.*, 2004). Es por esto que recientemente las investigaciones se han centrado en la relación entre el tamaño o longitud del ADN telomérico y su posible función como un marcador de la senescencia y la apoptosis celular (Zvereva *et al.*, 2010; Heacock, 2007).

La pérdida de la capacidad de división se debe, entre otros factores, a que los telómeros se acortan con cada ciclo de división celular, hasta un estado crítico en su longitud, en donde la célula se vuelve inestable; es por esto que el número de divisiones que puede experimentar la célula, dependerá directamente de la longitud de estas regiones terminales (Fig. 1.2) (Zvereva *et al.*, 2010; Taddei *et al.*, 2004; Perrod, 2003; Counter *et al.*, 1996). Por ejemplo, se ha estimado que la longitud mínima funcional en humanos está en un rango aproximado de 100 pb, debido a que este es el tamaño mínimo necesario para que se puedan unir proteínas como TRF1 y TRF2 encargadas de la protección y regulación del ADN telomérico (Capper *et al.*, 2007). Sin embargo, en *Arabidopsis* esta longitud se encuentra en un rango entre 260 y 450 pb (Heacock *et al.*, 2004). Además se ha observado que las primeras fusiones de los cromosomas pueden ser detectadas

cuando el tamaño de los telómeros se encuentra en un rango promedio de 1 kb y se ha propuesto que este es el largo mínimo requerido para que se pueda formar la estructura T-loop (Heacock *et al.*, 2007). Por otra parte, también se ha sugerido que este acortamiento puede ocasionar la pérdida de genes indispensables o silenciar genes cercanos al telómero, que en conjunto induce que la célula entre en senescencia (Tham *et al.*, 2002; Chiu *et al.*, 1997; Counter *et al.*, 1996).

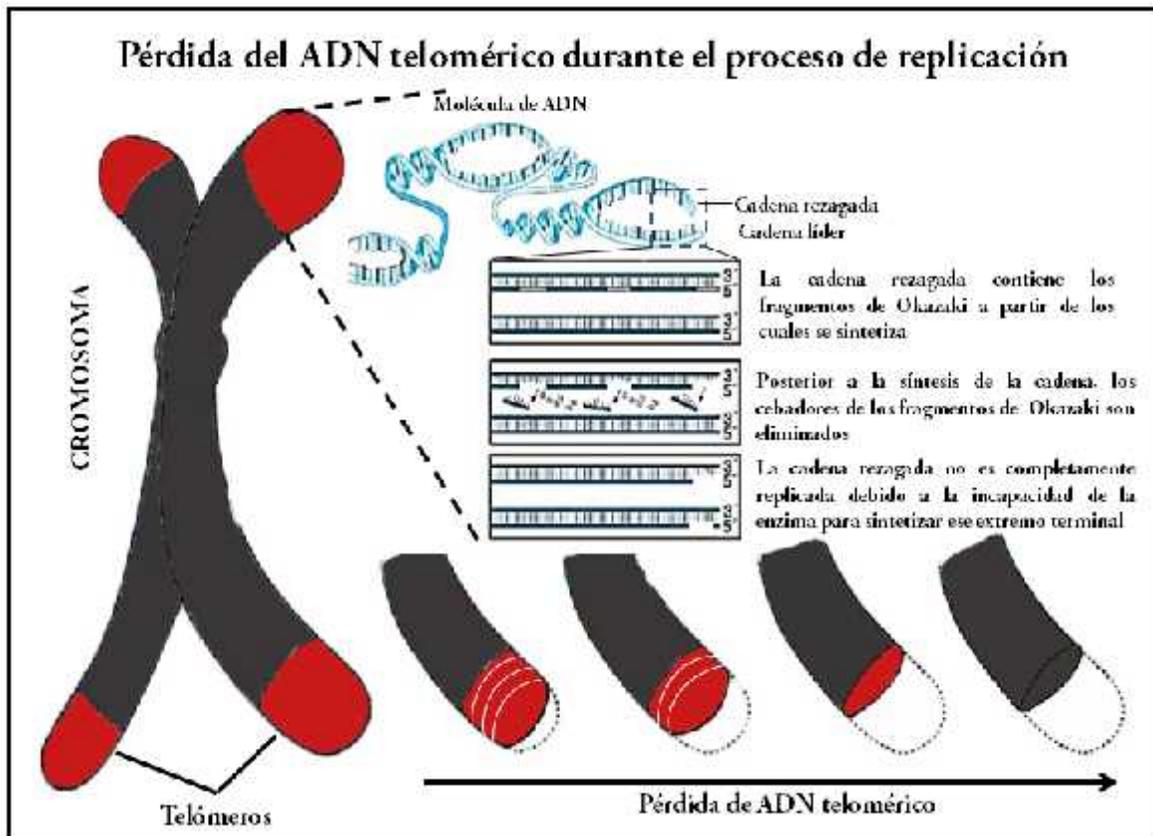


Figura 1.2 Proceso de replicación del ADN. Durante el proceso de síntesis la ADN polimerasa no replica completamente al ADN telomérico, ocasionado su pérdida gradual durante cada ciclo de replicación.

La senescencia celular se caracteriza por una disminución de la división celular; se ha propuesto que un mecanismo regulatorio muy importante de este procesos es el acortamiento de los telómeros (Fig. 1.3) (Liu *et al.*, 2007). La senescencia se caracteriza por presentar una condición en donde las células, aunque viables y metabólicamente activas ya no pueden proliferar, es decir, dividirse activamente (Shakirov y Shippen, 2004; Yang *et al.*, 2004; Cottliar y Slavutsky, 2000). La transición que ocurre en este proceso es

en cierta forma semejante a la diferenciación celular, ya que es irreversible y está acompañada de cambios morfológicos y de expresión génica, los cuales contribuyen a la inducción de la senescencia, mientras que en otros casos son la consecuencia (Baumann y Prince, 2010; Cottliar y Slavutsky, 2000). La senescencia es un proceso biológico normal, que afecta a casi todas las células de un organismo, lo cual contribuye al envejecimiento, resultado de una disminución de la replicación de las células, impidiendo hasta cierto grado el mantenimiento y reparación de los tejidos (Fig. 1.3) (Shakirov y Shippen, 2004; Hou *et al.*, 2001).

El estado dinámico de los telómeros depende de varios factores, entre ellos, la procesividad de la telomerasa, la frecuencia de la acción sobre cada telómero en particular y la velocidad de degradación de ADN telomérico. Por estas razones el tamaño de las secuencias teloméricas varía a lo largo del tiempo y entre las especies (Shakirov y Shippen, 2004; Cottliar y Slavutsky, 2000; Kilian *et al.*, 1995).

1.3 Telomerasa

1.3.1 Estructura y composición

Los telómeros presentan un único modo de replicación, el cual involucra una alta especialización de una enzima (telomerasa) que provee una solución a un problema de la replicación de los extremos terminales, producto de la incapacidad de la polimerasa para completar la síntesis del extremo 5' del ADN (Blackburn y Szostak, 2006). La telomerasa es una enzima (ribonucleoproteína) que sintetiza el ADN telomérico, es el principal factor para el mantenimiento de los telómeros (Cai *et al.*, 2011). Está formada por un ARN de la telomerasa (TER o TR por sus siglas en inglés) que se encuentra totalmente integrado en la enzima, el cual presenta una longitud variable dependiendo de la especie (Zvereva *et al.*, 2010; Hernández, 1999). Este ARN sirve como molde o templado para poder sintetizar la región 3' del telómero, ya que contiene un dominio que es complementario a la secuencia de ADN telomérico, permitiendo el alineamiento de la enzima con el sustrato y provee de un templado para la adición de *nov*o de deoxinucleótidos a las secuencias teloméricas (Fig. 1.4) (Cai *et al.*, 2011; Riha, 2010; Zvereva *et al.*, 2010; Kilian *et al.*, 1995).

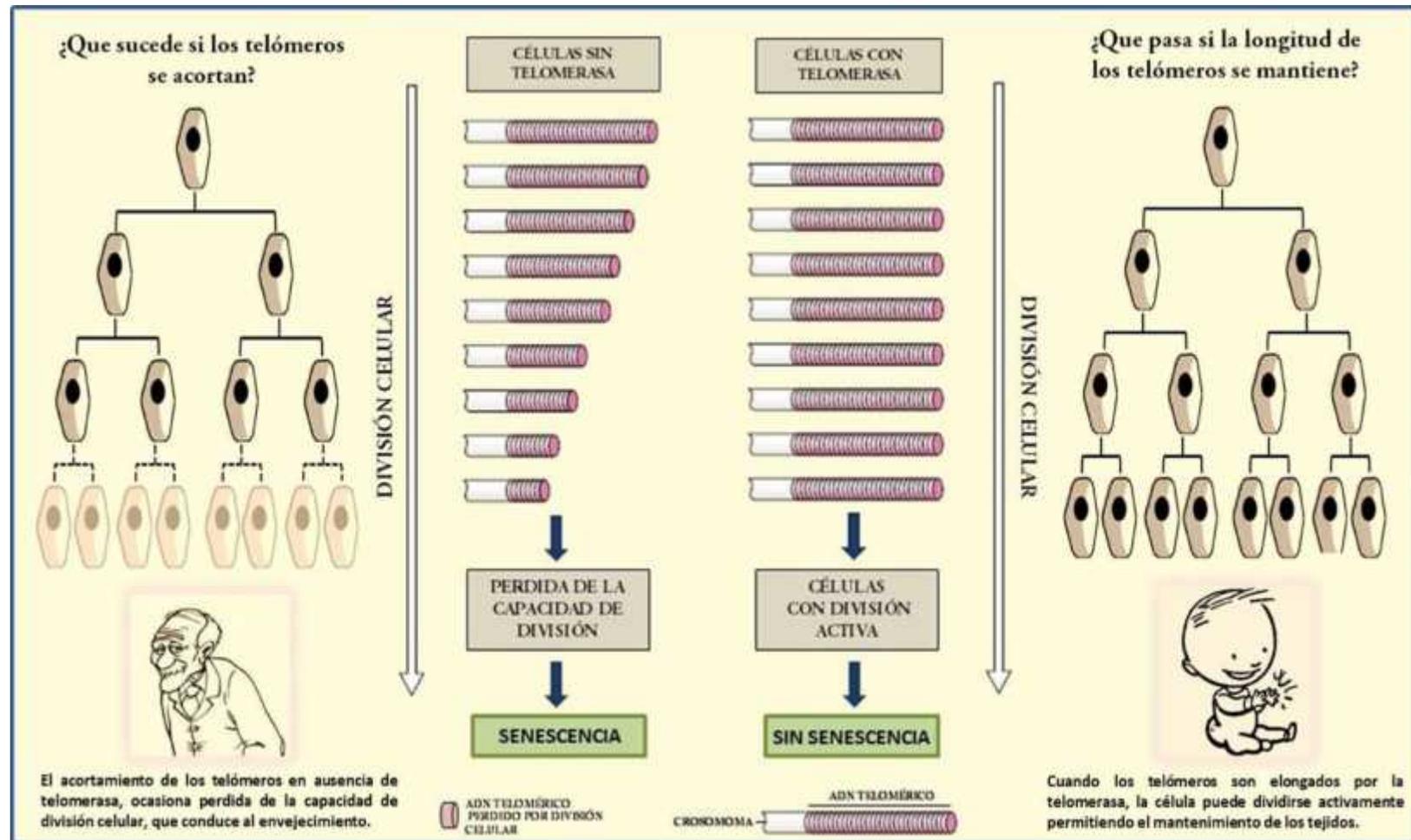


Figura 1.3 Modelo sobre la relación entre el envejecimiento, la longitud del ADN telomérico y la actividad de la telomerasa. Este modelo explica la relación entre la pérdida gradual del ADN telomérico con cada ciclo de división celular en ausencia de la telomerasa, la cual es la encargada de mantener la homeostasis de los telómeros. Modificado de Greider (1998).

Adicionalmente se encuentran un componente proteico que es parte fundamental de la enzima, ya que presenta una actividad de transcriptasa reversa (TERT por sus siglas en inglés) que se encarga de sintetizar una copia de ADN telomérico a partir de un molde de ARN (Cai *et al.*, 2011; Riha, 2010; Zvereva *et al.*, 2010). TERT fue descrita por primera vez en un protozoo ciliado *Euplotes aediculatus* (Lingner *et al.*, 1997) y por homología de secuencias fue subsecuentemente identificada en otros grupos de eucariotes, incluidos vertebrados (Greenberg *et al.*, 1998), plantas (Oguchi *et al.*, 1999), entre otros. Todas las TERT consisten de un motivo N-terminal específico de la telomerasa, un dominio central, un motivo específico RT y un dominio C-terminal poco conservado. La conservación N-terminal es esencial para la actividad de la telomerasa, unión del RNA y multimerización (Autexier y Lue, 2006).

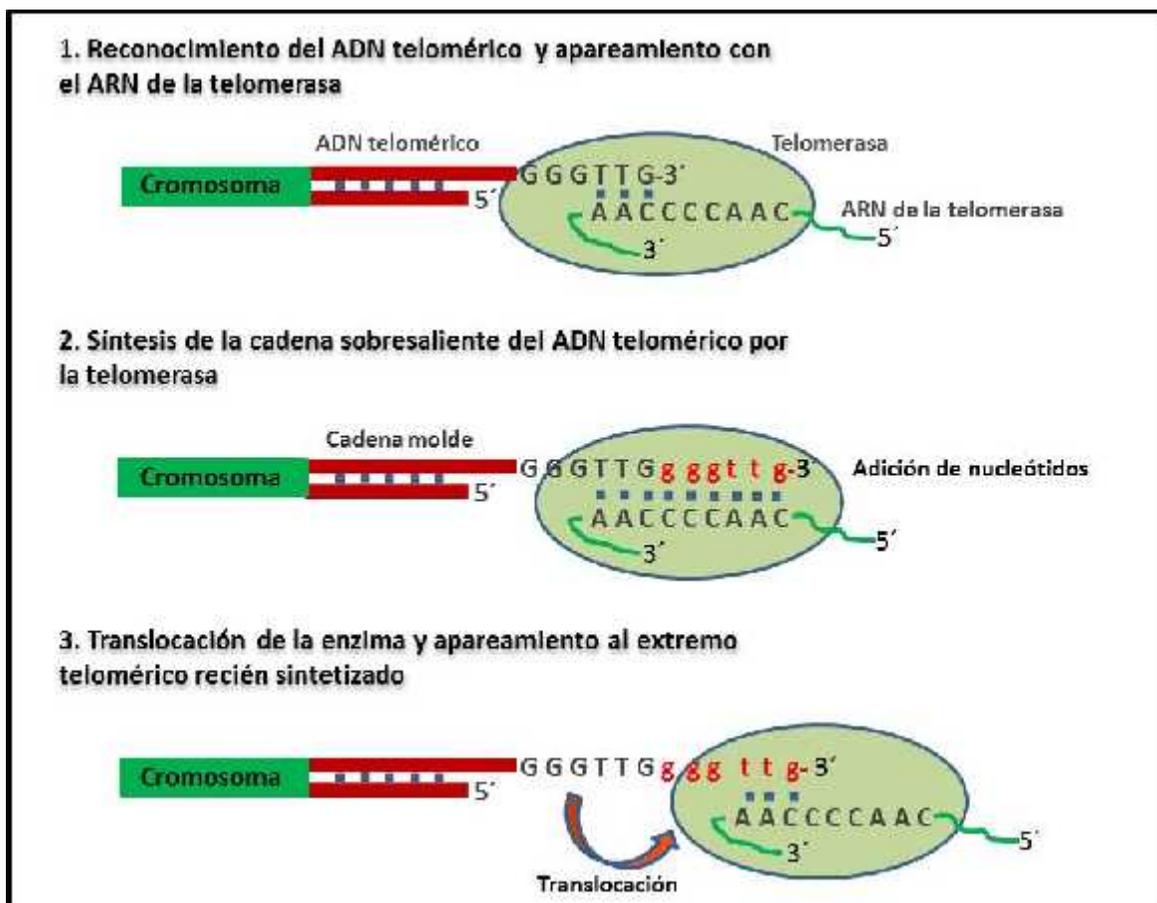


Figura 1.4 Representación esquemática de la síntesis de los telómeros. La adición de nucleótidos es catalizada por la telomerasa a partir de un cebador de ARN, utilizando como molde la hebra sobresaliente del ADN telomérico.

1.3.2 Actividad y función

La actividad de la telomerasa fue detectada en *Tetrahymena* y posteriormente en otros eucariotas (Greider y Blackburn, 1985; Kilian *et al.*, 1995). Aunque la telomerasa es necesaria para mantener la longitud de los telómeros, ésta solo puede alargar la hebra G, mientras que la replicación de la hebra C debe hacerse por el sistema convencional de la polimerasa (Zvereva *et al.*, 2010; Blasco *et al.*, 1999). La replicación de los telómeros es necesaria para compensar la pérdida de ADN, que resulta de la replicación incompleta (Zvereva *et al.*, 2010; Blackburn y Szostak, 2006). La función de la telomerasa es mantener la integridad telomérica, por lo cual actúa elongando los extremos cromosómicos, y de esta forma permite estabilizar su longitud, evitando el acortamiento del telómero (Blasco *et al.*, 2007; Marti *et al.*, 2006). La inactivación de esta enzima está estrechamente relacionada con el acortamiento de los telómeros, que a su vez es una causa potencial de la senescencia y apoptosis celular (Fig. 1.3) (Riha, 2010; Zvereva *et al.*, 2010; Kilian *et al.*, 1995).

La actividad de esta enzima es tejido específica y puede estar en cantidades muy bajas o ausentes en células somáticas (Nicholls *et al.*, 2011; Blasco *et al.*, 1999). Por ejemplo, en el caso de los seres humanos, ésta solo se ha encontrado en células germinales y células cancerígenas (Nicholls *et al.*, 2011; Kong *et al.*, 2007); mientras que en las plantas se ha encontrado en diferentes órganos como hojas (Song *et al.*, 2011; Kilian *et al.*, 1998), raíces (Flanary y Kletetschka *et al.*, 2005) y flores (Aronen, 2011), así como en zonas meristemáticas en especies de *Arabidopsis*, cebada, zanahoria, coliflor, arroz (Fajkus *et al.*, 1998), entre otras. Este comportamiento contrastante de la actividad se debe a las diferencias en el desarrollo de los tejidos vegetales y a la producción constante de nuevos órganos, debido a la presencia de regiones con células totipotentes que permiten la formación de nuevos tejidos y órganos a lo largo de su ciclo de vida (MacKnight, 2002).

En plantas obtenidas por cultivo *in vitro* la actividad de dicha enzima presenta un aumento en comparación con las plantas madres (Fajkus *et al.*, 1996; Fitzgerald *et al.*, 1996; Heller *et al.*, 1996). En este sentido los análisis de la expresión de la telomerasa ha demostrado que es alta en órganos reproductivos y en callos (Yang *et al.*, 2001), pero con una expresión baja o indetectable en hojas, raíces y tallos (Kilian *et al.*, 1998; Fitzgerald *et al.*, 1996; Riha *et al.*, 1998; Heller *et al.*, 1996).

La telomerasa es el principal mecanismo que permite mantener la longitud del telómero, pero en algunos casos, los telómeros pueden ser mantenidos por recombinación, como por ejemplo algunas especies de levaduras (Lundblad, 2002); mientras que en moscas, esta región puede ser mantenida por retrotransposones no-LTR denominados HeT-A y TART (familias de retrotransposones asociados a los telómeros) (Biessmann *et al.*, 2002; Kahn, 2000; Biessmann *et al.*, 1990).

1.4 Metodologías empleadas para el estudio de telómeros y telomerasa

1.4.1 Técnicas empleadas para el estudio del telómero

Existen diversas técnicas que permiten el análisis de los telómeros y sus componentes, las cuales pueden ser utilizadas como una fuente muy importante para la investigación en detalle en las plantas y que a su vez puedan permitir encontrar diferencias y similitudes entre los organismos, así como la diversidad de mecanismos involucrados en su regulación (Cuadrado *et al.*, 2009; Fajkus *et al.*, 2005; Riha y Shippen, 2003; Adams *et al.*, 2001; Fajkus *et al.*, 1995; Cox *et al.*, 1993; Schwarzacher y Heslop-Harrison, 1991). El estudio de los telómeros y la telomerasa se ha llevado a cabo mediante diversas estrategias, las cuales involucran una combinación de técnicas experimentales, que permiten analizar la estructura, función y actividad tanto del telómero como de la enzima (Fajkus *et al.*, 2005).

Una de estas técnicas es la hibridación slot-blot de ADN genómico, esta técnica es útil para propósitos de búsqueda de secuencias teloméricas putativas (Sýkorová *et al.*, 2003). En este caso se utilizan secuencias que son investigadas por primera vez en una especie, permitiendo realizar un escrutinio entre varias secuencias con motivo telomérico y si alguna de éstas es específica para una especie (Sýkorová *et al.*, 2003). Una vez identificada una posible secuencia candidata a ADN telomérico, es necesario demostrar que se localiza en la región telomérica y no en otra región del genoma (Fajkus *et al.*, 2005). Para ello existen varias estrategias, que incluyen digestiones con enzimas como BAL-31, que degradan progresivamente al ADN telomérico. Posterior a la digestión los fragmentos generados son separados mediante una electroforesis y transferidos a una membrana en donde el ADN es hibridado con la sonda putativa para ADN telomérico.

La hibridación *in situ* fluorescente (FISH) es una técnica utilizada para confirmar la localización precisa de una secuencia telomérica, cuyo fundamento se basa en reacciones moleculares específicas entre el ADN cromosómico y otras secuencias (sonda) (Schwarzacher, 2003), lo que permite un mapeo físico (número y posición) de dichas secuencias en los cromosomas. Esta técnica ha sido utilizada en especies pertenecientes al orden Asparagales permitiendo determinar la variabilidad, distribución y localización específica de diferentes sondas teloméricas (Sýkorová *et al.*, 2003), así como en cebada (Roder *et al.*, 1993), arroz (Wu y Tanksley, 1993) y *Arabidopsis* (Cuadrado *et al.*, 2009), entre otros. A partir de los resultados, se podría estimar un acortamiento progresivo de las regiones terminales, como se ha realizado en *Arabidopsis* (Richards y Ausubel, 1991) y *Hordeum* (Kilian *et al.*, 1995) entre otras especies.

Una de las técnicas más ampliamente utilizadas para determinar la longitud telomérica se denominada fragmentos de restricción terminal (TRF, por sus siglas en inglés). Esta técnica de southern blot, se basa en la digestión y transferencia del ADN_g a una membrana y posterior hibridación con una sonda específica de lo que se desea analizar. Esta técnica ha sido utilizada en especies de tabaco (Fajkus *et al.*, 1995) cebada (Kilian *et al.*, 1995), ginkgo (Liu *et al.*, 2007) y pino (Aronen, 2011), entre otras. Recientemente se ha utilizado la medición de la longitud telomérica empleando técnicas de PCR en tiempo real, aunque estas estrategias solo han sido aplicadas a células o tejidos de humanos (Gil y Coetzer, 2004; Cawthon *et al.*, 2002; Dasi *et al.*, 2001).

1.4.2 Determinación de la actividad de la telomerasa

Una parte fundamental que determina la estabilidad de la longitud telomérica es la actividad de la telomerasa, es por esto que se han empleados diversas técnicas para poder evaluar su actividad (Fajkus *et al.*, 2005). En este sentido una de estas técnicas es la amplificación de secuencias repetidas teloméricas (TRAP, por sus siglas en inglés), la cual se basa en la extracción de la enzima de los tejidos vegetales y su análisis *in vitro* mediante PCR (Fajkus *et al.*, 2005). Los métodos originales para la detección de la enzima utilizaban un dNTP marcado radiactivamente, el cual era adicionado a la reacción de amplificación del repetido telomérico (Aldous *et al.*, 2002).

El ensayo TRAP es básicamente un proceso de dos pasos. En el primero se realiza una extensión de polimerización dentro del extremo 3' terminal utilizando un cebador en sentido, conocido como cebador TS; este oligonucleótido facilita la extensión de los productos teloméricos por la telomerasa. Posteriormente, se realiza un segundo paso de amplificación por PCR con la adición de un cebador en antisentido, el cual permite amplificar los fragmentos generados que posteriormente son cuantificados para determinar la actividad (Fajkus *et al.*, 2005; Aldous *et al.*, 2002). Esta es la metodología mejor establecida y que permite estimar la actividad de la telomerasa *in vitro*. Es una técnica muy sensible y reproducible para la detección de la actividad de la enzima utilizando concentraciones muy pequeñas de ésta (Song *et al.*, 2011; Fajkus *et al.*, 1996).

El estudio de la telomerasa ha sido muy difícil, debido a que suele encontrarse en concentraciones muy pequeñas y puede ser una limitante en este tipo de ensayo al momento de la purificación (Fajkus *et al.*, 2005; 1996). Este ensayo ha sido utilizado para identificar y cuantificar la actividad de telomerasa en extractos de tabaco (Fajkus *et al.*, 1995), extractos de tejidos meristemáticas de *Arabidopsis*, zanahoria, arroz, coliflor y soya (Fitzgerald *et al.*, 1996; Heller *et al.*, 1996), así como en diferentes órganos de ginkgo (Song *et al.*, 2011).

1.5 Estudios sobre la longitud de los telómeros y la actividad de telomerasa en plantas

1.5.1 Telómeros

Los estudios *in vivo* e *in vitro* han permitido demostrar en diferentes organismos, incluyendo las plantas, que existe una reducción progresiva del número de repeticiones teloméricas y una inactivación de la telomerasa tejido específico (Riha *et al.*, 2010; Fitzgerald *et al.*, 1996). En humanos, durante el envejecimiento ocurre un acortamiento gradual de la longitud de los telómeros (Chang y Harley, 1995), y este acortamiento es generalmente del orden de 10 a 200 pb por año; mientras que en plantas (*Arabidopsis*) es alrededor de 120 a 460 pb (Decary *et al.*, 1997; Vaziri *et al.*, 1997; Hastie *et al.*, 1990).

En este sentido Kilian *et al.*, (1995) realizaron un estudio del acortamiento de los telómeros durante la diferenciación en el cultivo de callos de cebada (*Hordeum vulgare*). Ellos encontraron que los tejidos más diferenciados y de mayor edad resultaban en una

reducción de la longitud de los telómeros. Además, estos autores encontraron que la desdiferenciación ocasionada por el cultivo de tejidos permitía un incremento en la longitud de los telómeros, y que los tejidos que tenían más tiempo en cultivo presentaban una longitud telomérica más grande. Este comportamiento fue independiente del genotipo y este patrón de comportamiento en la longitud telomérica estaba siempre presente en tejidos diferenciados y desdiferenciados. Ellos sugirieron que el acortamiento o alargamiento de los telómeros en cebada era muy similar al proceso observado en humanos y que esto posiblemente ocurría debido a la falta de actividad de la telomerasa. Este grupo de trabajo propone que los telómeros pueden ser utilizados como un marcador de la división celular en las plantas.

Flanary y Kletetschka (2005), estudiaron la longitud telomérica en árboles con diferentes edades, que iban de 2000-5000 años como *Sequoia sempervirens* y *Pinus aristata* (árboles de vida larga), de 400-500 años como *Pinus monticola* y *Pinus resinosa* (árboles de vida media) y de 100-200 años como *Pinus taeda* y *Pinus palustris* (árboles de vida corta). Ellos encontraron que los cormos de árboles de vida más larga se presentaban una longitud telomérica de 25.1 Kb, mientras que los árboles de vida media tenían telómeros más cortos de 24.5 Kb, pero los árboles de vida corta tenían telómeros más largos de aproximadamente 28.6 kb. En cambio en las raíces de los árboles de vida larga presentaban telómeros más largos (52.5 Kb) que los de vida media (38.7 kb) y a su vez estos tenían los telómeros más largos en comparaciones a las raíces de los árboles de vida corta (28.4 Kb). Esta diferencia en el comportamiento de los telómeros puede deberse, a que este tipo de plantas pueden vivir por varios cientos de años, por lo que no sucumben a la senescencia celular debido a una división celular activa dentro de su meristemas (poblaciones celulares que se renuevan, generando células que se pueden dividir indefinidamente y proveen un crecimiento futuro), lo que puede contribuir al hecho de su gran longevidad, y esto se relaciona con la longitud de los telómeros que no declina a lo largo de su vida, sino que es mantenida en una longitud estable.

Aronen y Ryyänen (2012), estudiaron el comportamiento del telómero en *Pinus sylvestris* L., encontrando que éstos se acortaban con el incremento en la diferenciación de los tejidos, ya que las muestras de embriones tenían telómeros más largos de 21.1 Kb en comparación a las hojas que tenían telómeros más cortos de 18.1 Kb, lo que concuerda con los resultados de Kilian *et al.*, (1995). Además, ellos analizaron el comportamiento del

telómero en el cambium de árboles de diferentes edades, y a pesar que en árboles jóvenes no se presentaban mucha variación, en árboles de 50- 200 años los telómeros mostraban un acortamiento de la base hacia la punta del árbol.

El comportamiento en la longitud del telómero puede variar dependiendo de la especie de estudio y de la capacidad de la planta para poder mantener un estado dinámico a lo largo de su ciclo de vida.

1.5.2 Telomerasa

En plantas la expresión de la telomerasa y el tamaño del telómero se encuentran intrínsecamente correlacionados con la proliferación celular (Kilian *et al.*, 1998). La actividad de esta enzima es regulada por el estado celular, la diferenciación y desdiferenciación del tejido, así como la conformación compacta que pueden adoptar los telómeros, impidiendo el acceso de la enzima (Fitzgerald y Shippen, 2003; Kilian *et al.*, 1998; Riha *et al.*, 1998).

En un estudio utilizando células en suspensión celular de tabaco, se encontraron altos niveles de actividad de telomerasa, la cual se restringe específicamente a la fase S del ciclo celular en etapas tempranas del cultivo, indicando que la regulación de la enzima es expresada en ciertas etapas del ciclo celular. Adicionalmente reportaron que la actividad de la enzima es inducida por la adición exógena de reguladores del crecimiento como las auxinas (Tamura *et al.*, 1999).

Fajkus *et al.*, (1995), estudiaron la actividad de la telomerasa en diferentes extractos de *Nicotiana tabacum*, ellos encontraron que al inhibir o activar la telomerasa se presentaban diferencias en la longitud de los telómeros. Cuando se inactiva la enzima la longitud de los telómeros se reducía, en comparación con los extractos en donde la enzima estaba presente, los cuales presentaban telómeros normales. Estos autores concluyeron que la telomerasa es una enzima indispensable para poder mantener estas regiones en las plantas.

Katarzyna *et al.*, (1996) estudiando la actividad de la telomerasa en extractos de diferentes plantas, observaron actividad de la enzima en extractos de embriones, carpelos

y anteras de cebada, pero ausencia de ésta en extractos de hojas. De igual manera encontraron actividad de la enzima en semillas inmaduras de *Arabidopsis* y cultivo de células en suspensión, por lo cual ellos sugieren que la actividad de la telomerasa puede ser reprimida durante la diferenciación celular.

Song *et al.*, (2011) midieron la actividad de la telomerasa en diferentes tejidos (callo embriogénico, microsporas y hojas), sexo, estación y edad en árboles de *Ginkgo biloba* L., encontrando una alta actividad de ésta en callo embriogénico, en comparación de microsporas y hojas las cuales presentaban baja o casi nula actividad, por lo cual sugieren que dicha actividad es tejido específica, y su presencia depende de la fase en la que se encuentre. Además identificaron que altas tasas de actividad coincidían con los tejidos que contenían altos niveles de división celular. En cuanto al sexo de los árboles no se encontraron diferencias significativas en la actividad de la enzima. Aunado a esto encontraron que la actividad de la enzima dependía de la estación del año debido a que encontraron altos niveles de telomerasa en abril, mientras que ésta disminuía conforme pasaba el tiempo. Debido a estos resultados, ellos sugieren que la actividad de la telomerasa no solo es tejido específico, sino que además es estacional-específica. Adicionalmente midieron la actividad de la telomerasa en árboles de diferentes edades de 10, 20, 70 y 700 años; en estos hubo una declinación de la actividad en los árboles de 700 años. Por todo esto, concluyen que el mantenimiento del largo de los telómeros por la telomerasa depende de una asociación entre la estación, la edad y el tejido de la planta.

1.6 Estudios sobre los telómeros en *Agave*

El motivo repetido de los telómeros, es altamente conservada entre los organismos eucariotas. A pesar de esto existen notables excepciones como el caso de *Drosophila* y otros insectos. En el primer caso se utiliza una estrategia que involucra una retrotransposición de las secuencias HeT-A y TART a los extremos cromosómicos (Casacuberta y Pardue, 2003; Biessmann *et al.*, 1990), mientras que en especies de *Chironomus* y *Anopheles gambiae* el ADN telomérico está formado por bloques de secuencias repetidas satélites (Biessmann *et al.*, 2002). En las plantas, la secuencia telomérica típica consenso es (TTTAGGG)_n, la cual fue primeramente clonada y caracterizada en *Arabidopsis* (Richards y Ausubel, 1988). Dicha secuencia se encuentra ampliamente distribuida en la mayoría de las especies vegetales e incluso en varias

especies de algas verdes como *Chorella vulgaris* (Higashiyama *et al.*, 1995). A pesar de esto, existen notables excepciones, lo cual fue observado primeramente en especies del género *Alliaceae* (Pich *et al.*, 1998).

En otro grupo de plantas pertenecientes al orden Asparagales, en donde se encuentran clasificadas las especies del género *Agave*, la secuencia tipo *Arabidopsis* (TTTAGGG)_n ha sido parcial o completamente remplaza por una secuencia con un motivo repetido parecido al de humanos y a la mayoría de los vertebrados (TTAGGG)_n (Sýkorová *et al.*, 2003). Éste cambio ocurrió en un solo nucleótido, ocasionando que dicha secuencia en Asparagales sea similar a el ADN telomérico de los vertebrados (Sýkorová *et al.*, 2006; 2003). Se ha sugerido que dicho cambio probablemente fue causado por una mutación puntual que alteró el templado de ARN que se encuentra integrado a la telomerasa, evento causado hace aproximadamente 80 millones de años (Sýkorová *et al.*, 2006; 2003; Rotková *et al.*, 2004).

Robert *et al.*, (2008) realizaron una caracterización citogenética en especies del género *Agave* mediante la técnica de hibridación *in situ* fluorescente, usando a las regiones teloméricas como un marcador cromosómico. En este trabajo utilizaron cebadores que amplifican secuencias teloméricas tipo-*Arabidopsis* y tipo-vertebrado, con el objetivo de determinar si dichas secuencias estaban presentes en las especies utilizadas en este estudio (*A. tequilana*, *A. fourcroydes*, *A. sisalana*, *A. angustifolia* y el híbrido 11648). Ellos encontraron señales muy débiles del motivo repetido tipo-*Arabidopsis* en algunos cromosoma, sugiriendo que la telomerasa presenta errores durante la síntesis del ADN telomérico, ocasionando que se generen este tipo de secuencias o que dichas señales son reminiscencias de la secuencia ancestral tipo *Arabidopsis* que existió antes del cambio al nuevo motivo (TTAGGG)_n, durante la divergencia de las Asparagales. En cambio, cuando se utilizó el motivo repetido tipo vertebrados la señal encontrada fue intensa en todos los cromosomas, típicamente como dos puntos en la región terminal de las cromátidas, sin señales visibles en las regiones intersticiales. Estos autores mencionan que en la mayoría de las especies de la familia de las Asparagales, han remplazado la secuencia telomérica tipo *Arabidopsis* por el tipo vertebrados, y que sus hallazgos daban mayor soporte a lo reportado previamente en otras especies del mismo orden (Sýkorová *et al.*, 2006; 2003).

1.7 Cultivo *in vitro*

El cultivo *in vitro* puede ser definido como un conjunto de técnicas que permite la regeneración de una planta a partir de un explante cultivado asépticamente en un medio artificial, e incubado en condiciones ambientales controladas (Engelmann, 1991). El cultivo *in vitro* representa un momento de estrés para las células y tejidos vegetales, el cual puede desencadenar cambios genéticos y epigenéticos ocasionados por los componentes del cultivo incluyendo el medio de cultivo, los reguladores de crecimiento, la edad del explante entre otros; los cuales pueden ejercer efectos sobre el control de la división celular y dediferenciación alterando la estructura de la cromatina (Smulders y Klerk, 2010; Xu *et al.*, 2004). Además se ha reportado que existe una reprogramación de los tejidos somáticos que lleva a una diferenciación acompañada por una reprogramación de la expresión de los genes requerida para el desarrollo (Xu *et al.*, 2004; Hecht *et al.*, 2001).

La regeneración para obtener nuevas plantas en el cultivo de tejidos se basa en la capacidad de las células para redirigir el desarrollo, pero para esto se debe recuperar la totipotencialidad (la capacidad para regenerar una nueva planta completa) o la pluripotencia (la capacidad para regenerar un órgano tal como una raíz o un tallo), perdiendo la célula al menos una parte del programa genético y marcas epigenéticas (De Klerk, 2009). Diferencias en la capacidad de regeneración entre los genotipos pueden ser provocadas por las diferencias en la rapidez y la facilidad para eliminar marcas epigenéticas que pueden estar reprimiendo genes importante del desarrollo, así como la reprogramación celular (Zaho *et al.*, 2008; Ezhova, 2003). En este sentido se hipotetizó que el tipo de célula, la edad de desarrollo y la edad física pueden afectar la velocidad de reprogramación celular y la exactitud de los procesos (Grafi, 2004).

La utilización de tejidos maduros puede ser problemático dentro de la micropropagación. Lo anterior se debe al hecho de que durante el tiempo de vida las plantas pasan por varios procesos referidos como fases de cambio, los cuales van desde la germinación (fase juvenil) hasta llegar a ser adultas (Smulders y Klerk, 2010). Durante todas estas etapas la planta presenta alteraciones morfológicas. Estos cambios que llevan los tejidos adultos pueden ser revertidos (rejuvenecimiento) por el cultivo *in vitro* dentro de algunos ciclos de subcultivos (Webster y Jones, 1989). El rejuvenecimiento puede ser definido

como la recuperación de al menos una de las propiedades características de un material juvenil, del material adulto introducido al cultivo; el cual es un requisito importante al introducir el material vegetal (Pierik, 1990). Ésta importancia se debe al hecho de que la edad fisiológica afecta la morfogénesis, entendiendo la morfogénesis, como un desarrollo y diferenciación de los órganos y tejidos de un organismo multicelular y que entre más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro* (Zhuravlev y Omelko, 2007; Han y Keathley, 1997). Ésta es una de las razones por la cual las regiones meristemáticas tanto apicales como axilares son las más ampliamente utilizadas en el cultivo de tejidos (Arnaud *et al.*, 1993; Hackett, 1985).

Se han reportado diferentes estudios sobre el rejuvenecimiento en varias especies de plantas como *Sequoiadendron giganteum* (Monteuuis y Bon, 1989), *Hevea brasiliensis* (Carron *et al.*, 1995), *Matteuccia sthiopteris* (Meteri *et al.*, 1994), *Kalopanax septemlobus* (Kyu *et al.*, 2008) entre otras. En árboles de *Kalopanax septemlobus* se encontró que al utilizar tejidos rejuvenecidos obtenidos mediante injertación daban mejores resultados al inducir la embriogénesis somática, así como mayor capacidad de producción de plantas (Moon *et al.*, 2008). El rejuvenecimiento ocasionado por el cultivo *in vitro* en estas plantas trajo consigo un aumento en la capacidad de germinación de los embriones somáticos, una readquisición de la capacidad de micropropagación, es decir un aumento en el efecto de la regeneración y el establecimiento de las plantas propagadas.

1.8 Importancia del género *Agave*

El género es considerado de importancia ecológica (como especie clave) y económica ya que ha dado a las personas ropa, sogas, alimentos, etc. Actualmente en México varias especies de este género son aprovechadas como materia prima en procesos tradicionales y agroindustriales.

El subgénero *Agave*, en particular la sección *Rigidae* y *Sisalanae* fueron seleccionadas para cultivarlas, ya que a partir de ellas se producía casi todo el suministro de fibra, la cual se extraía del henequén (*Agave fourcroydes*) y sisal (*Agave sisalana*). Algunas especies de este género también son utilizadas para la elaboración de bebidas alcohólicas, por ejemplo, a partir de *Agave tequilana* se produce el tequila, un producto de exportación con denominación de origen con gran importancia económica para México. Otras especies

son utilizadas para producir fermentos y destilados como el pulque y el mezcal; actividades con relativa importancia económica para distintas regiones del país. A partir de estas plantas también se biosintetizan productos naturales bioactivos de alto valor agregado como sapogeninas esteroidales con propiedades antiinflamatorias, antiparasitarias o hemolíticas aplicables en medicina tradicional (Narváez-Zapata y Sánchez-Teyer, 2009; Guerra *et al.*, 2008; Pereira *et al.*, 2006; Dalton, 2005; Peana *et al.*, 1997; Castorena-Sánchez *et al.*, 1991).

1.9 JUSTIFICACIÓN

El cultivo *in vitro* favorece que se lleve a cabo la desdiferenciación celular, la reprogramación genética y morfogénesis, que permite recuperar la capacidad de totipotencia y proliferación celular. Ésta capacidad se ve afectada por los componentes del medio de cultivo, el genotipo, el estado fisiológico y la edad del explante. Esta última puede impedir que se lleve a cabo la regeneración de las plantas y el mantenimiento de éstas en los ciclos de cultivos.

El estudio acerca de la biología de los telómeros y la telomerasa en diferentes especies vegetales, han permitido evidenciar una relación entre la longitud del telómero y la actividad de la telomerasa con el desarrollo y la edad en las plantas. En este sentido se sabe que los telómeros se puede acortar o incrementar con la diferenciación de los tejidos y con la edad en plantas de campo, mientras que en plantas provenientes de cultivo *in vitro* se ha observado un aumento en la longitud de los telómeros y una mayor actividad de la telomerasa en algunas especies, lo cual se debe posiblemente a la reprogramación celular ocasionada por la desdiferenciación. Sin embargo, hasta ahora se carece de información sobre la dinámica de la longitud del telómero en plantas de *Agave*.

1.10 HIPOTESIS:

El cultivo *in vitro* ocasiona una reprogramación del tejido madre que conlleva cambios a nivel celular. Es posible que dichos cambios afecten la longitud de los telómeros de las plantas regeneradas en comparación con la de los explantes iniciales de las plantas madres.

1.11 OBJETIVOS:

1.11.1 General:

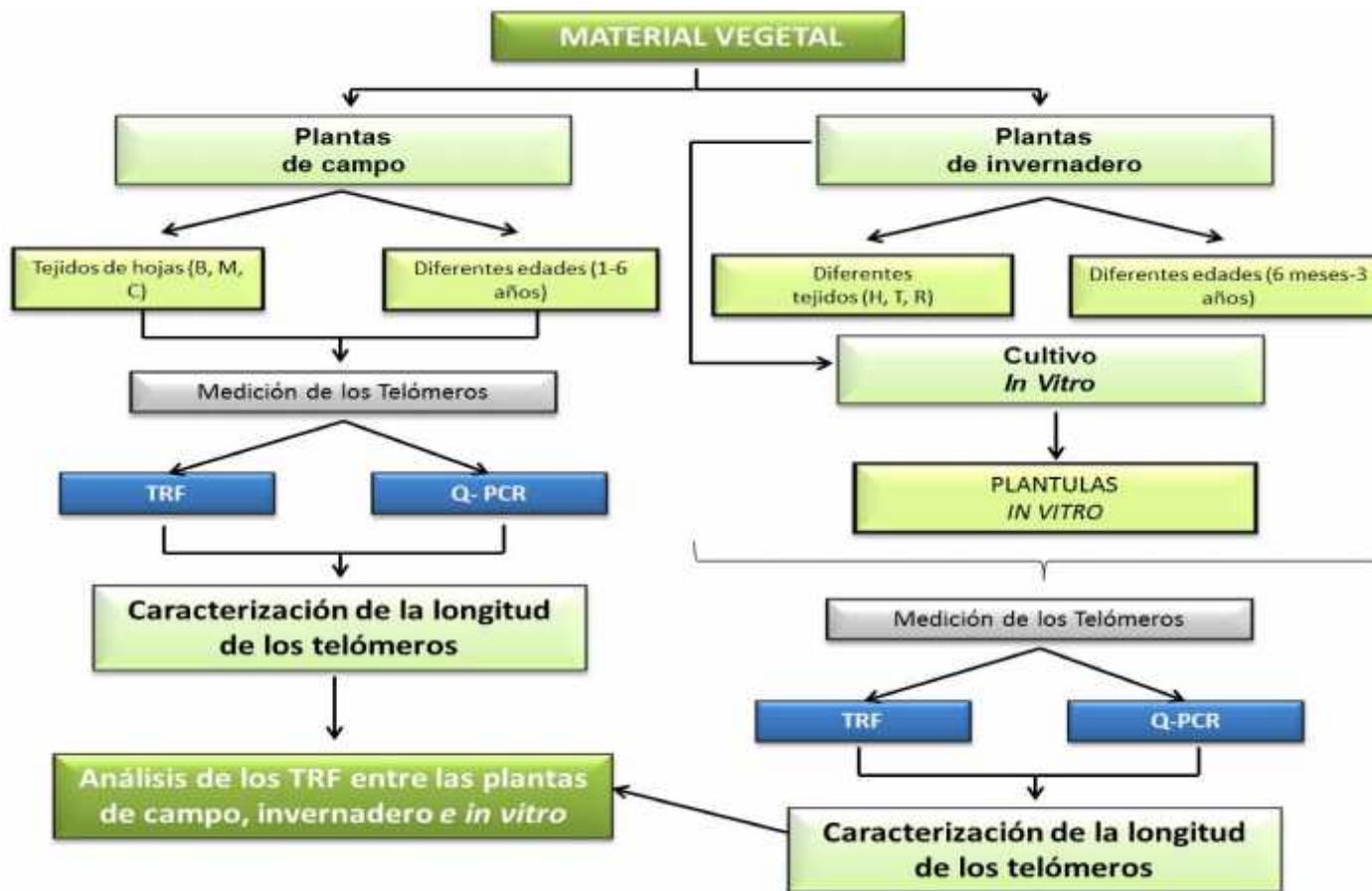
- Estudiar la dinámica de la longitud de los telómeros en dos especies en *Agave tequilana* y *Agave fourcroydes* crecidas bajo condiciones de campo, invernadero y cultivo *in vitro*.

1.11.2 Particulares:

1. Analizar la longitud de los telómeros en diferentes tejidos (hojas, tallos y raíces) en plantas de *Agave tequilana* bajo condiciones de invernadero.
2. Analizar la longitud de los telómeros en diferentes tejidos (hojas, tallos y raíces) en plantas de *Agave fourcroydes* bajo condiciones de invernadero.
3. Analizar la longitud de los telómeros en plantas de diferentes edades (1 a 6 años) en *Agave tequilana* bajo condiciones de campo.
4. Analizar y comparar la longitud telomérica durante el proceso organogénico *in vitro* en *Agave tequilana* y *Agave fourcroydes*.

1.12 ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

En el diagrama general se ilustran las etapas que conforman el presente trabajo, las cuales se realizaron para evaluar la dinámica de la longitud del ADN telomérico en plantas crecidas en condiciones de campo, invernadero e *in vitro* en dos especies de agaves: *A. tequilana* Weber y *A. fourcroydes* Lem.



CAPÍTULO II

DINÁMICA DE LA LONGITUD TELOMÉRICA EN PLANTAS DE *Agave tequilana* Weber DURANTE LA TRANSICIÓN DE *IN VITRO* A *EX VITRO***2.1 INTRODUCCIÓN**

Los telómeros consisten de secuencias de ADN y un grupo de proteínas de unión específica, que se localizan en los extremos de los cromosomas eucariotes (Aronen y Ryyänen, 2012; 2011; Watson y Riha, 2010; McKnight y Shippen, 2004). En plantas, se han caracterizado diferentes motivos repetidos: el tipo *Arabidopsis* (TTTAGGG)_n (Richard y Ausubel, 1988), que es altamente conservado en planta, con algunas excepciones encontradas en la familia Amaryllidaceae (Fajkus *et al.*, 2016), Solanaceae (Peska *et al.*, 2015) y el orden Asparagales (Sýkorová *et al.*, 2003). En Asparagales, este motivo repetido es parecido al de humano (TTAGGG)_n y se sugiere que se originó por una mutación puntual en el cebador de ARN de la telomerasa (Sýkorová *et al.*, 2006; 2003). Posteriormente Robert *et al.*, (2008) identificaron este motivo repetido en diferentes especies del género *Agave*.

Los telómeros forman estructuras secundarias que ofrece protección a los cromosomas, evitando la fusión de sus extremos y la degradación por nucleasas (McKnight *et al.*, 2002). Además están involucrados en la regulación genética, el anclaje y la organización de los cromosomas a la matriz nuclear durante la división celular (Zellinger y Riha, 2007; Heacock, 2007; 2004). Los telómeros son mantenidos por la telomerasa y sin su actividad éstos se acortan, hasta un estado crítico en el cual la célula entra en senescencia y posteriormente en apoptosis, debido a que la maquinaria convencional de replicación es incapaz de mantener esta región (Aronen y Ryyänen, 2014; 2012; Watson y Riha, 2010; Flanary y Kletetschka, 2005).

La correlación entre la longitud telomérica y la edad ha sido observada en animales, por lo cual se consideran como un marcador de la senescencia (Harley *et al.*, 1990; Flanary y Streit, 2003). Las plantas pueden exhibir un amplio rango de vida que va de semanas a más de 4 mil años, ya que han adoptado diferentes estrategias a lo largo de su desarrollo

que les confieren mayor plasticidad (Mu *et al.*, 2015; Aronen y Ryyänen, 2012; Watson y Riha, 2010). Los estudios sobre la dinámica de la longitud de los telómeros en plantas indican una correlación biológica con la edad, como la observada en animales (Kilian *et al.*, 1995).

Los trabajos sobre la longitud de los fragmentos de restricción terminal (TRFL) en las plantas han sido relacionados con el desarrollo y la diferenciación de los tejidos (Kilian *et al.*, 1995; Liu *et al.*, 2007), la edad (Liang *et al.*, 2015; Flanary y Kletetschka *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2010), el genotipo (Aronen y Ryyänen, 2012; Kilian *et al.*, 1995; Broun *et al.*, 1992) y el sexo (Mu *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2007). La información generada hasta el momento aún es limitada, ya que los estudios se han enfocado en especies de herbáceas como: *Arabidopsis thaliana* (Richards and Ausubel, 1988); *Hordeum vulgare* (Kilian *et al.*, 1995); *Lycopersicon esculento* (Broun *et al.*, 1992); *Panax ginseng* (Liang *et al.*, 2015) o en especies arbóreas como: *Pinus longaeva* (Flanary y Kletetschka *et al.*, 2005); *Ginkgo biloba* (Song *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2007); *Pinus sylvestris* (Aronen y Ryyänen, 2012); *Betula pendula* (Aronen y Ryyänen, 2014). Por lo tanto, es necesario el desarrollo de nueva información sobre la longitud de los telómeros asociados a la edad y al desarrollo de los tejidos en otras especies vegetales no arbóreas, perennes y con un ciclo de vida larga que nos permitan entender con mayor detalle la dinámica de la longitud telomérica.

Agave tequilana Weber es una de las especies más ampliamente cultivada como fuente de carbohidratos para la producción de tequila, una bebida alcohólica con una gran demanda internacional (Valenzuela-Sánchez *et al.*, 2006). Es una planta monocotiledónea, xerofítica, semélpara, perennes y de ciclo de vida largo (9-12 años) (Gentry, 1982). El cultivo *in vitro* es una de las herramientas biotecnológicas más eficientes para la micropropagación de individuos seleccionados de diferentes especies de agaves (Robert *et al.*, 2006). La fase de transición a condiciones *ex vitro* es una etapa importante del proceso de micropropagación de los agaves, en la cual se encuentran involucrados diferentes procesos morfológicos como el desarrollo de hojas, la funcionalidad de estomas y raíces, la formación de ceras epicuticulares y estructuras papilares (Monja-Mio *et al.*, 2015). Existen pocos trabajos que relacionen el efecto del cultivo de tejidos con la longitud de los telómeros y no existen reportes sobre la relación

existente entre la dinámica de los TRFL durante la fase *ex vitro* de las plántulas provenientes de cultivo *in vitro*.

En el presente capítulo abordamos los objetivos específicos uno y tres de la presente tesis, con un énfasis en estudiar la dinámica de la longitud telomérica durante la transición de *in vitro* a *ex vitro* (aclimatación), el comportamiento en diferentes tejidos (tallos, raíces y hojas), así como su relación con la edad en plantas de *Agave tequilana* aclimatas *ex vitro* y crecidas en campo.

2.2 MATERIALES Y MÉTODOS

2.2.1 Material vegetal

Plántulas micropropagadas de *A. tequilana*, obtenidas mediante el protocolo de Robert et al (2004), fueron usadas en todos los experimentos (Fig. 2.1A). Las plántulas fueron propagadas en medio MSB: sales de Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) con nitrógeno (10 mM KNO₃ and 5 mM NH₄ NO₃), suplementado con 0.1 μM 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), 44.4 μM bencilaminopurina (BA), solidificado con 0.2 % (w/v) agar (G1910, Sigma-Aldrich) y 0.2% (p/v) Phytigel™ (P8169, Sigma-Aldrich) y mantenidas por seis meses en el sistema *in vitro*.

Posteriormente las plántulas fueron colocadas en medio MS a 50 % de fuerza iónica sin reguladores de crecimiento para su enraizamiento por dos meses y posteriormente fueron transferidas a charolas de poli-estireno con una mezcla de tierra, bagazo y agrolita en una proporción de 2:2:1 (Fig. 2.1B). Las charolas fueron colocadas bajo condiciones de invernadero (30 ± 2 °C, 200–400 mol m⁻² s⁻¹) por tres meses, posteriormente fueron transferidas a bolsas de plástico, que contenían la misma mezcla de sustrato y mantenidas durante tres años (Fig. 2.1C).

Plantas de *Agave tequilana* obtenidas en condiciones *in vitro* (provenientes de una línea clonal) y mantenidas en condiciones de invernadero durante tres años, fueron utilizadas en este estudio (Fig. 2.5B, C). Las edades analizadas fueron seis meses, un año, dos

años y tres años (Tabla 2.1). Los tejidos utilizados fueron: raíz, tallo y hojas (basal, media y central) (Fig. 2.1D). En este último tejido, se realizó tomando en cuenta que el desarrollo de las hojas se lleva a cabo alrededor del tallo; por lo que la hoja basal que es la más externa de la roseta fue considerada como senescente, hoja media localizada entre la basal y la central como una hoja madura y la hoja central fue considerada como una hoja joven (Fig. 2.1D). Adicionalmente, se realizó una colecta de plantas de campo de diferentes edades (1-6 años) en las plantaciones de Casa Herradura, Guadalajara, Jalisco México; de las cuales solo se tomaron los tejidos de los tres tipos de hojas (basal, media y central) (Tabla 2.1).

Tabla 2.1 Material vegetal utilizado para la estimación de la longitud telomérica

Origen del material vegetal	Edad	Tejidos				
		Raíz	Tallo	Hoja		
				Basal	Media	Central
<i>In vitro</i>	6 meses	✓	✓	✓	✓	✓
	1 año	✓	✓	✓	✓	✓
	2 años	✓	✓	✓	✓	✓
	3 años	✓	✓	✓	✓	✓
Convencional	1 año			✓	✓	✓
	2 años			✓	✓	✓
	3 años			✓	✓	✓
	4 años			✓	✓	✓
	5 años			✓	✓	✓
	6 años			✓	✓	✓

2.2.2 Determinación de la longitud de los fragmentos de restricción terminal (TRFL)

2.2.2.1 Extracción de ADN genómico

Posterior a la colecta, las muestras vegetales fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 °C hasta su extracción. Las muestras de cada tejido fueron colocadas en un mortero y maceradas hasta obtener un polvo fino, utilizando un pistilo y nitrógeno líquido. El ADN genómico fue aislado utilizando el método de CTAB (bromuro de

cetiltrimetilamonio) (Doyle y Doyle, 1990) y subsecuentemente tratado con RNAsa (New England Biolabs). La concentración del ADN fue determinada por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (Thermo), en un radio de absorbancia de 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}). La integridad del ADN fue confirmada en un gel de agarosa al 0.8% teñido con bromuro de etidio.

2.2.2.2 Longitud telomérica determinada mediante Southern blot

Los fragmentos de restricción terminal (TRFL) que son un indicador de la longitud telomérica, fueron determinados por medio de un análisis de hibridación southern blot reportado por Kimura *et al.*, (2010), con algunas modificaciones descritas por Liu *et al.*, (2007). Se realizaron alícuotas de ADN (aproximadamente de 10 μ g), las cuales fueron digeridas con la enzima Taq I a 65 °C durante toda la noche. Los productos de las digestiones y 0.1 ng de control positivo fueron cargados en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) y separados por electroforesis utilizando amortiguador TAE 1X, a 100 V durante 3 h a temperatura ambiente. Para la síntesis del control positivo y la sonda para la hibridación, una secuencia sintética telomérica fue generada por PCR por el método propuesto por Ijdo *et al.*, (1991), utilizando los cebadores T1 (TTAGGG)₅ y T2 (CCTAAA)₅. La hibridación Southern fue desarrollada utilizando el kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter II (Roche). Las membranas fueron expuestas a un film de rayos X (GE Healthcare) a temperatura ambiente. La autoradiografía fue desarrollada utilizando la solución reveladora por 1 min (P7167 Sigma-Aldrich) y posteriormente la solución fijadora (P6557 Sigma-Aldrich) por 2 min.

2.2.2.3 Medición de la longitud de los TRF y análisis estadísticos

Las autoradiografías fueron escaneadas e importadas como una imagen en formato "tiff". La localización de la intensidad del pico puede no ser definido exactamente a ojo. Para ello se empleó el programa Telotool (Göhrong *et al.*, 2014), un sistema que es capaz de determinar la distribución de la región telomérica fácilmente, que provee al usuario una imagen realista de la distribución de la longitud TRF.

Para medir la longitud telomérica cada muestra fue repetida tres veces por hibridación Southern y calculada con el programa. La longitud TRF fue reportada como la media \pm error estándar (ES). Todos los datos fueron analizados usando el programa GraphPad Prism 5. El análisis de varianza (ANOVA) fue usado para calcular la significancia estadística, y las medias + ES que diferían significativamente fue determinada mediante la prueba de Tukey con una $p < 0.05$.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Dinámica de la longitud telomérica durante la transición de *in vitro* a *ex vitro*

Para determinar la longitud telomérica durante el proceso de aclimatación *ex vitro*, se utilizaron plantas *in vitro* (antes de ser aclimatadas) (Fig. 2.1A) y después de ser aclimatadas en el invernadero (Fig. 2.1B, C) por seis meses, un año, dos años y tres años (Tabla 2.1). Una imagen representativa de la hibridación southern utilizada para la medición de la longitud de los telómeros se muestra en la Figura 2.2A, en donde la señal de hibridación representa la región telomérica.

Los fragmentos encontrados en las plántulas *in vitro* van desde 9.3 kb a más de 23.1 kb, mientras que, en las plantas aclimatadas se observaron fragmentos que van desde 6.5 a 23.1 kb (Fig. 2.2A). La longitud telomérica aproximada fue de 34 kb (\pm ES 0.3) en las plántulas *in vitro*, de 12-22 kb en las plantas de seis meses, de 25-31 kb en las plantas de un año, de 24-29 kb en las plantas de dos años y de 23-25 kb en las plantas de tres años de edad (Fig. 2.2B).

El análisis de la TRFL indicó que hubo un acortamiento de 12 kb aproximadamente en las plantas de seis meses en comparación con las plántulas mantenidas en cultivo *in vitro* ($p < 0.05$). En cambio en las plantas de un año de aclimatación *ex vitro* observamos un incremento de la longitud de aproximadamente 9 kb en comparación de las plantas de seis meses ($p < 0.05$) y esta longitud telomérica posteriormente se mantuvo en las plantas de dos y tres años de aclimatación *ex vitro* (Fig. 2.2B).

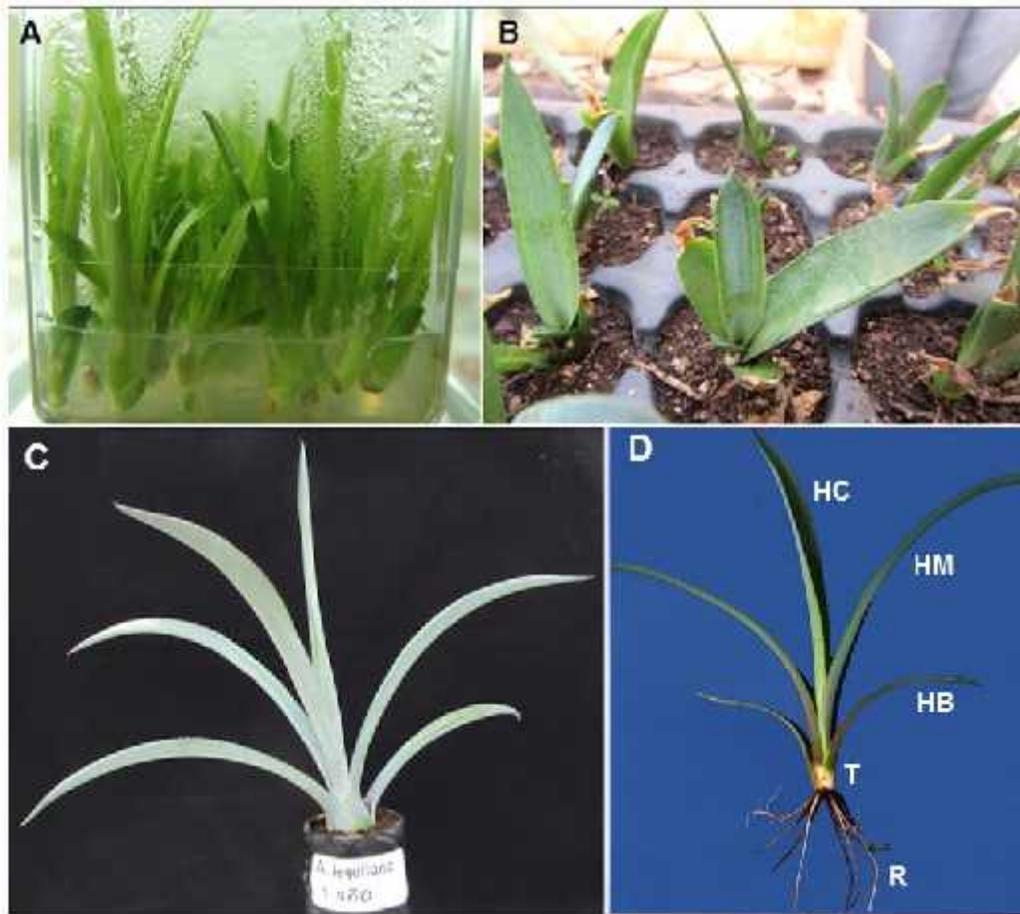


Figura 2.1 Plantas de *A. tequilana* utilizadas para determinar la longitud del ADN telomérico.

A) Plántulas mantenidas en cultivo *in vitro*. B) Plantas transferidas a charolas para la aclimatación *ex vitro*. C) Planta de un año de aclimatación *ex vitro*. D) Tejidos seleccionados para los análisis de los TRFL. HC: Hoja central. HM: Hoja media. HB: Hoja basal. T: Tallo. R: Raíz.

2.3.2 Longitud telomérica en diferentes tejidos y edades en plantas de crecidas en el invernadero

Para determinar la longitud telomérica en diferentes tejidos (hojas, tallos y raíces) (Tabla 2.1) y en plantas de diferentes edades los análisis de la TRFL fueron llevados a cabo en las plantas aclimatadas en el invernadero hasta por tres años (Fig. 2.2B). Una imagen representativa del southern blot utilizado para la medición de la longitud de los telómeros se muestra en la Figura 2.2A, en donde la señal de hibridación representa la región telomérica.

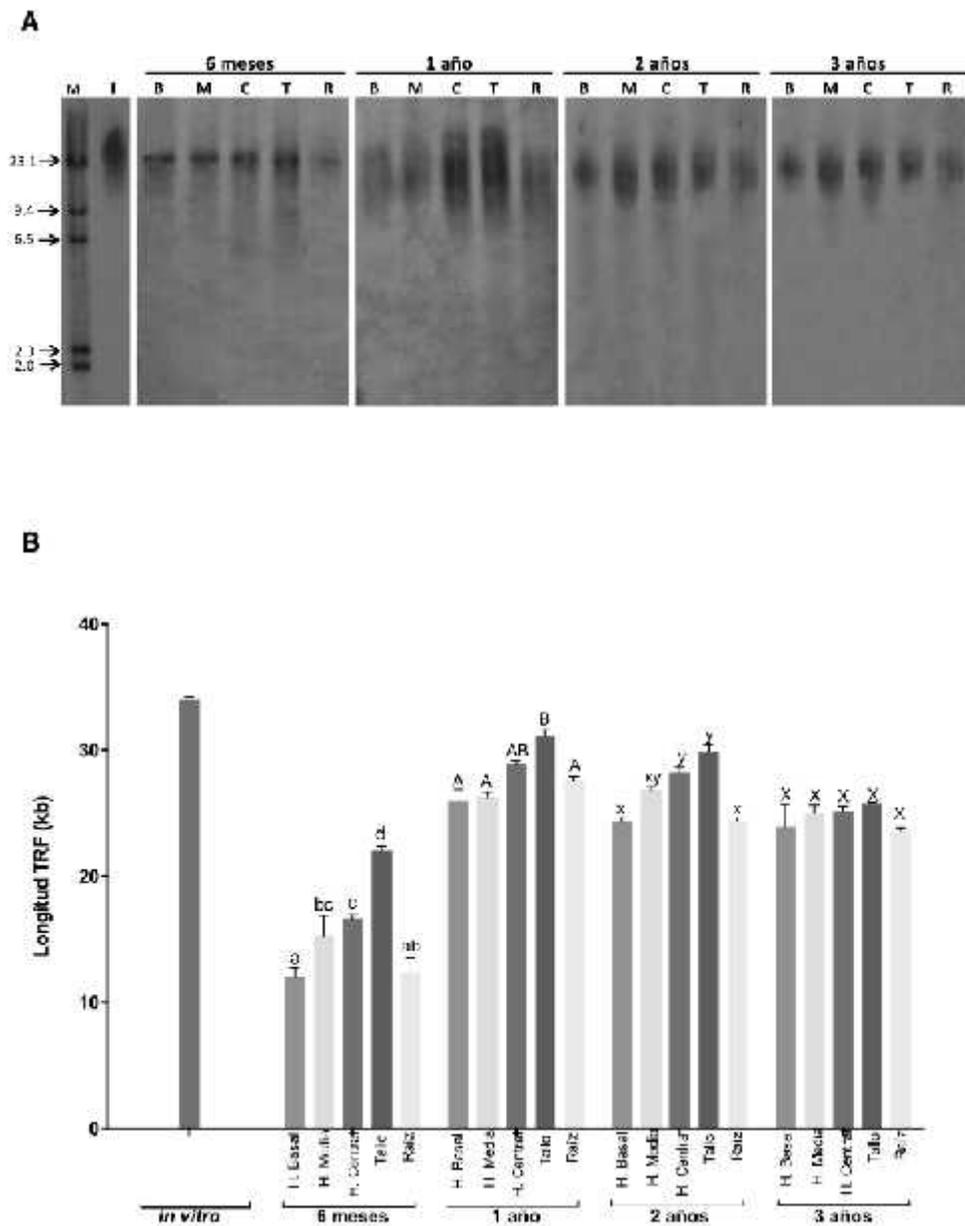


Figura 2.2 Análisis de la longitud telomérica durante el proceso de *in vitro* a *ex vitro*. A) Imagen representativa de un southern blot utilizado para cuantificación de la longitud de TRF en los tejidos de plantas aclimatadas de diferentes edades (6 meses a 3 años) en donde se observa la variación en la intensidad y barrido de los fragmentos teloméricos. M: Marcador de peso molecular Lambda/Hind III en kb. I: Plantas de cultivo *in vitro*. B: Hoja basal. M: Hoja media. C: Hoja central. S: Tallo. R: Raíz. B) Cuantificación del promedio de la longitud de los TRF en kb para cada grupo de tejidos analizados en las diferentes edades durante el proceso de aclimatación. Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias significativas al nivel de 0.05 por grupo de tejidos (hojas, tallo y raíz) para cada edad analizada.

Los resultados mostraron que la longitud de los telómeros en las plantas de seis meses fue de 12 kb (± 0.34) en la hoja basal, 15.3 kb (± 0.5) en la hoja media, 16.6 kb (± 0.19) en la hoja central, 22 kb (± 0.6) en el tallo y de 12.4 kb (± 0.07) en la raíz (Fig. 2.2B).

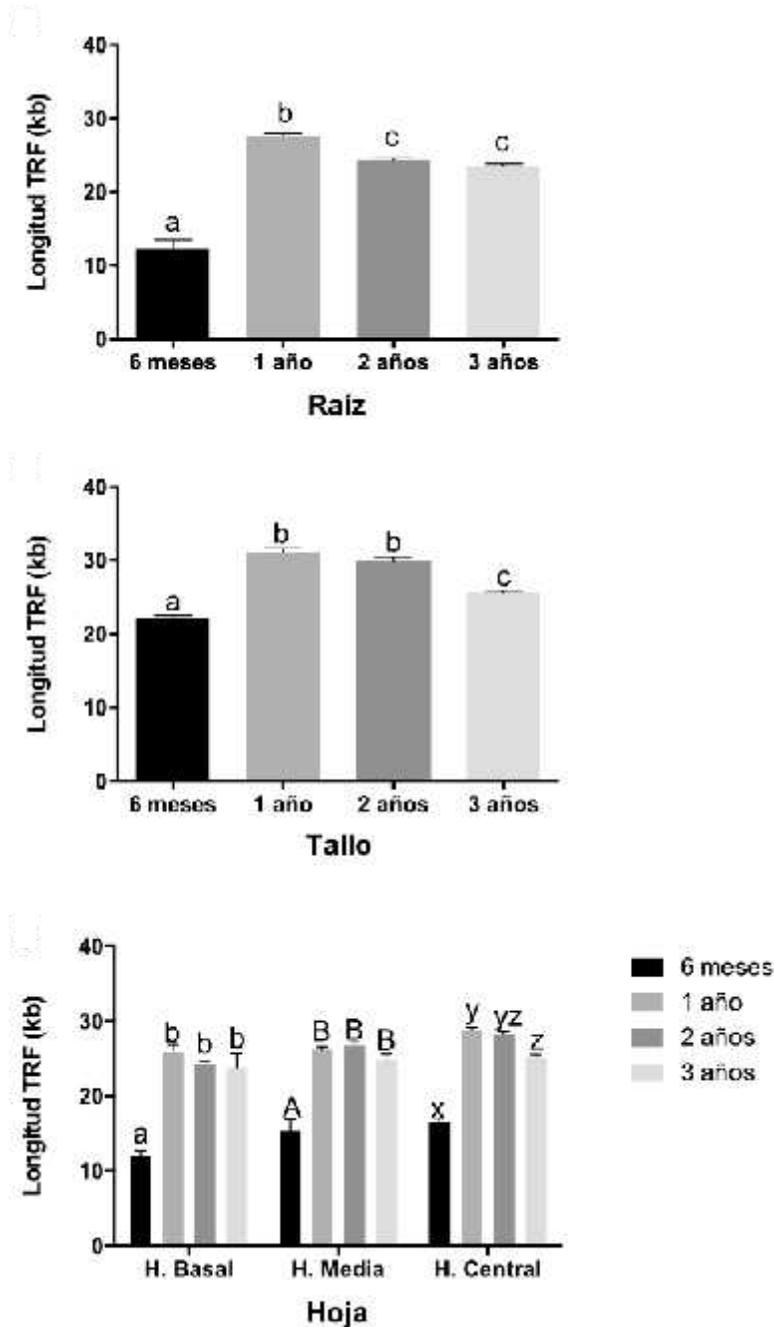


Figura 2.3 Análisis de la longitud telomérica por tipo de tejido en plantas de diferentes edades durante el proceso de aclimatación *ex vitro*. Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias significativas al nivel de 0.05 para cada tejido en diferentes edades evaluadas.

En las plantas de un año la longitud telomérica fue de 25.9 kb (± 0.6) en la hoja basal, 26.2 kb (± 0.5) en la hoja media, 28.8 kb (± 0.53) en la hoja central, 31 kb (± 0.26) en el tallo y 27.6 kb (± 0.56) en la raíz, lo que significó un alargamiento de 13.9 kb, 10.9 kb, 12.2 kb, 9 kb y 15.5 kb respectivamente en comparación con las plantas de seis meses (Fig. 2.2B).

La TRFL en las plantas de dos años fue de 24.2 kb (± 0.24) en la hoja basal, 26.7 kb (± 0.45) en la hoja media, 28.2 kb (± 0.34) en la hoja central, 29.8 kb (± 0.19) en el tallo y 24.3 kb (± 0.5) en la raíz (Fig. 2.2B). En este caso se observó un acortamiento de 3.3 kb de los telómeros en la raíz ($p < 0.05$) (Fig. 2.3), mientras que la longitud telomérica del tallo y las hojas se mantuvieron con respecto a la planta de un año de aclimatación *ex vitro* ($p > 0.05$) (Fig. 2.3).

En las plantas de tres años de aclimatación *ex vitro*, la longitud en los tejidos fue de 23.8 kb (± 0.17) en la hoja basal, 23.9 kb (± 0.47) en la hoja media, 24.4 kb (± 0.35) en la hoja central, 25.3 kb (± 0.61) en el tallo y 22.9 kb (± 0.47) en la raíz (Fig. 2.2B). Los análisis estadísticos en esta edad indicaron un acortamiento de 4.5 kb en el tallo ($p < 0.05$) (Fig. 2.3B), mientras que la longitud de las hojas y de la raíz fue mantenida en comparación con las plantas de dos años de aclimatación ($p > 0.05$) (Fig. 2.3).

La longitud telomérica en los diferentes tejidos de *A. tequilana* reveló una tendencia hacia la variación dependiendo del tejido y de la edad. En la hoja basal, la longitud telomérica fue de 12 kb, 25.9 kb, 24.2 kb y 23.8 kb en la planta de seis meses, uno, dos y tres años respectivamente (Fig. 2.3). En la hoja media la longitud fue de 15.3 kb (seis meses), 26.2 kb (un año), 26.7 kb (dos años) y 23.9 kb (tres años). La longitud telomérica en la hoja central fue de 16.6 kb, 28.8 kb, 28.2 kb y 24.4 kb para seis meses, uno, dos y tres años respectivamente (Fig. 2.3). En el tallo, la longitud de los TRF fue de 22 kb (seis meses), 31 kb (1 año), 29.8 kb (dos años) y 25.3 kb (tres años) y en la raíz de 12.3 kb (seis meses), 27.6 kb (un año), 24.3 kb (dos años) y 22.9 kb (tres años) (Fig. 2.3).

Los resultados mostraron que la longitud varió de corto a largo en este sentido: raíz > hoja basal > hoja media < hoja central < tallo ($p < 0.05$); y una homogeneidad en la longitud entre los tejidos en la planta de tres años (Fig. 2.2B), en los cuales no se encontraron diferencias significativas entre tejidos ($p > 0.05$).

2.3.3 Comportamiento de la longitud telomérica en planta de campo de seis edades

Para examinar los cambios en la longitud telomérica asociados a la edad de las plantas en campo, los tejidos de los tres tipos de hojas (basal, media y central) fueron colectados para cada edad evaluada (1 a 6 años). Una imagen representativa de una hibridación southern blot utilizada para calcular la longitud de los telómeros se muestra en la Figura 2.4A, en donde se observa la señal de hibridación que representa la región de interés. Los fragmentos observados variaban en intensidad y barrido, con despliegues que van desde 6.5 kb a 23.1 kb (Fig. 2.4B).

El análisis de la TRFL mostró que la longitud para la hoja basal fue de 25.3 kb (± 0.35), 23.4 kb (± 0.14), 22.3 kb (± 0.07), 23.6 kb (± 0.52), 23.6 kb (± 0.11) y 23.5 kb (± 0.53) para las plantas de uno, dos, tres, cuatro, cinco y seis años respectivamente (Fig. 2.4B). La hoja media presentó una longitud de 27.1 kb (± 0.24), 25.3 kb (± 0.46), 22.5 kb (± 0.26), 25.2 kb (± 0.3), 26.5 kb (± 0.47) y 24.8 kb (± 0.26) para las plantas de unos, dos, tres, cuatro, cinco y seis años respectivamente (Fig. 2.4B). En la hoja central la longitud fue de 30.4 kb (uno año), 26.9 kb (± 0.44) (dos años), 25.5 kb (± 0.29) (tres años), 26.4 kb (± 0.38) (cuatro años), 26.9 kb (± 0.6) (cinco años) y 25.5 kb (± 0.26) (seis años) (Fig. 2.4B).

Se realizó un comparación entre los tres tipos de hojas (basal, media y central) de cada planta y para cada edad. Específicamente encontramos que la longitud telomérica promedio en las hojas centrales estuvo entre 25.4 kb a 30.4 kb, las hojas medias entre 22.5 kb a 27.1 kb y las hojas basales entre 22.3 kb a 25.3 kb aproximadamente. Los telómeros con mayor longitud los encontramos en las hojas centrales, en todas las edades estudiadas ($p < 0.05$) (Fig. 2.4B), mientras que en las hojas medias y basales no se observaron cambios en la TRFL ($p > 0.05$) (Fig. 2.4B). La única edad en donde no se observaron diferencias significativas en la longitud telomérica en ninguno de los tres tipos de hojas, fue en la planta de seis años ($p > 0.05$) (Fig. 2.4B).

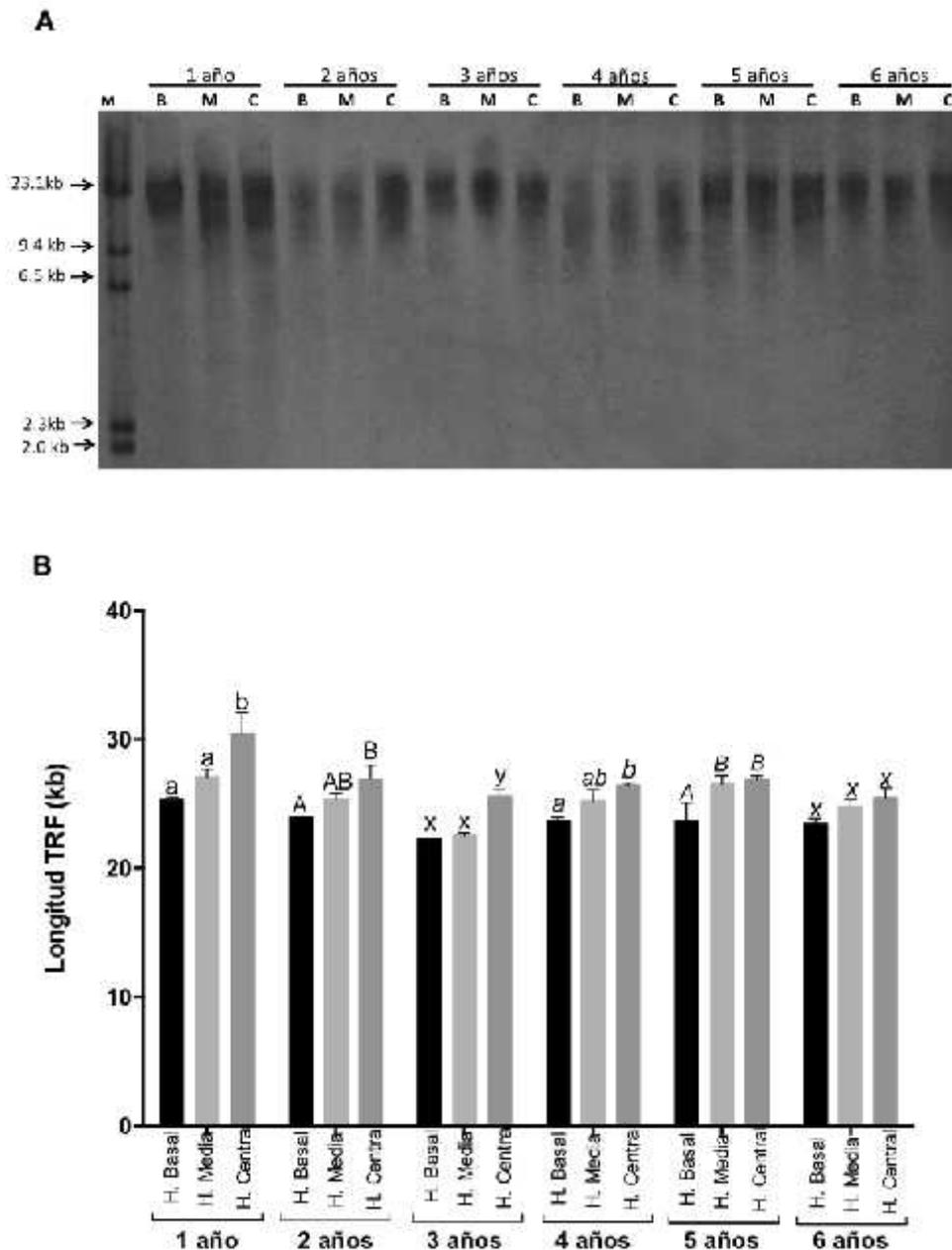


Figura 2.4 Análisis de la longitud telomérica durante la edad en plantas de campo. A) Imagen representativa de un southern blot utilizado para la medición de la longitud de los fragmentos de restricción telomérico en los tejidos de tres tipos de hojas en plantas de campo de diferentes edades (1-6 años) en donde se observa la variación en la intensidad y barrido de los fragmentos teloméricos. M: Marcador de peso molecular Lambda/Hind III en kb. B) Cuantificación de la longitud telomérica para cada tipo de hoja (basal, media y central) en las plantas de campo de diferentes edades en kb. Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias significativas al nivel de 0.05 por grupo de hojas (basal, media y central) para cada edad analizada.

Para determinar si existían cambios en la TRFL respecto de la edad, se realizó un análisis por tipo de hoja para cada una de las edades analizada (1-6 años). En este sentido encontramos que la mayor longitud de los telómeros se presentó en las plantas de un año de edad (30.4 kb), muy similar a la longitud observada en las hojas de un año de aclimatación *ex vitro* (31 kb). Por otra parte, los resultados de la longitud telomérica al realizar una comparación en las hojas basales para todas las edades, solo mostró un acortamiento (3 kb) en la planta de tres años con respecto a la planta de un año ($p < 0.05$) (Fig. 2.5).

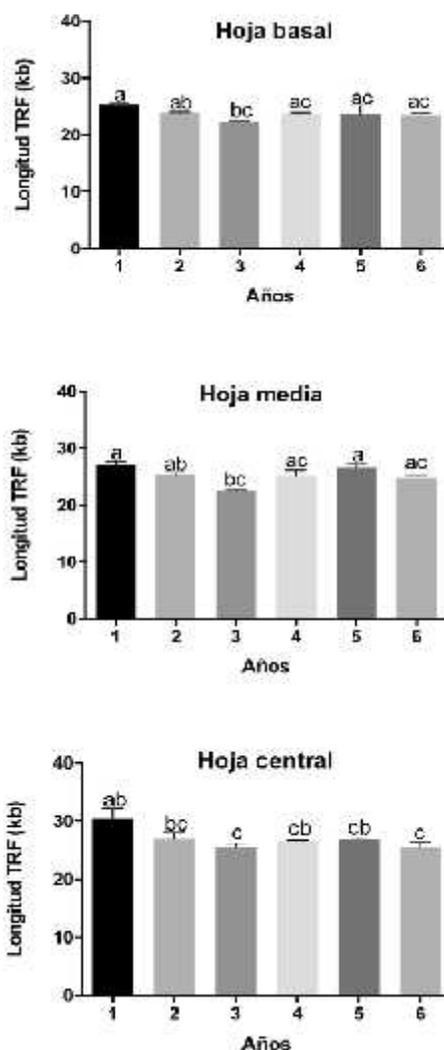


Figura 2.5 Comparación de la longitud telomérica por tipo de hoja (basal, media, central) en plantas de campo de diferente edades (1-6 años). Un acortamiento solo fue observado en las hojas de tres años. Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias significativas al nivel de 0.05 por tipo de hoja de diferentes edades.

En el caso de las hojas medias se observó un acortamiento de 4.6 kb en la planta de tres años ($p > 0.05$), y posteriormente un alargamiento de 4 kb en la planta de 5 años con respecto de la planta de un año ($p < 0.05$) (Fig. 2.5). Un comportamiento similar de la longitud de los telómeros al observado en las hojas basales se presentó en las hojas centrales, en donde se observó un acortamiento de 3.9 kb en la planta de tres años con respecto a la planta de un año ($p < 0.05$) (Fig. 2.5).

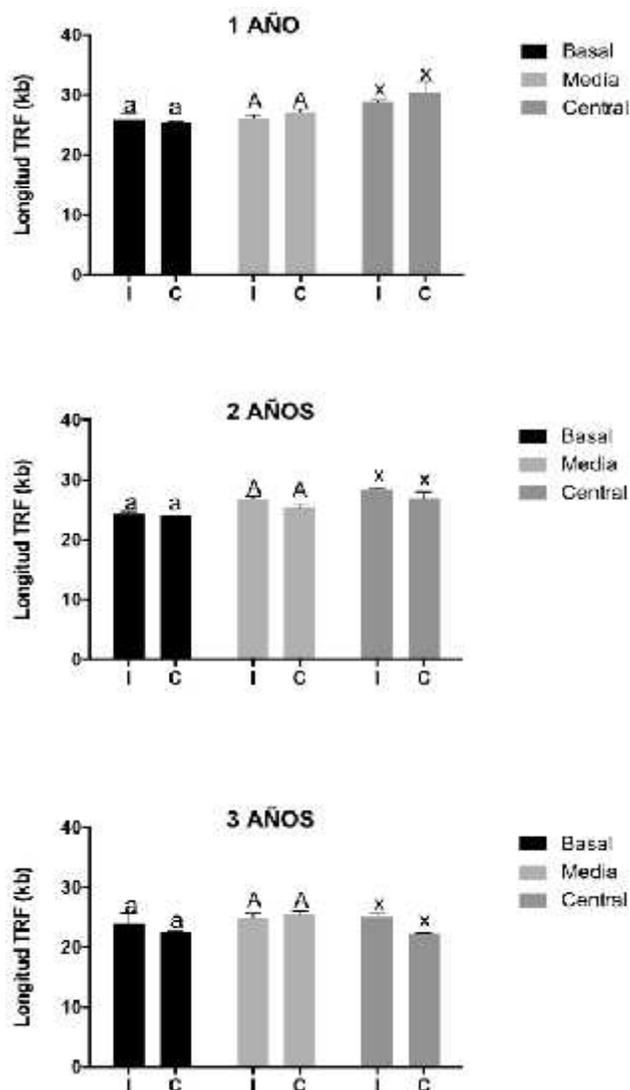


Figura 2.6 Comparación de la longitud telomérica entre las plantas aclimatadas y las plantas de campo de tres edades (1-3 años) en los tres tipos de hojas (basal, media y central). Diferentes letras arriba de las barras indican diferencias significativas al nivel de 0.05 por tipo de hoja para cada edad evaluada.

En general, los análisis de TRFL mostraron que solo ocurrió un acortamiento significativo en las hojas de tres años con respecto a las demás edades ($p < 0.05$) (Fig. 2.5), el cual posteriormente fue restablecido y mantenido en todas las hojas analizadas de las diferentes edades, lo que sugiere una estabilidad en la TRFL durante la edad (1-6 años) en las plantas crecidas en campo (Fig. 2.5).

Adicionalmente, se llevó a cabo el análisis de la longitud de los telómeros en los tres tipos de hojas (basal, media y central) en las plantas aclimatadas *ex vitro* de 1-3 años en comparación con los tres tipos de hojas de las plantas crecidas en campo de 1-3 años (Fig. 2.6). En este sentido no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los tejidos de las 3 edades ($p > 0.05$), indicando que una vez que se restablece la longitud en las plantas aclimatadas *ex vitro*, ésta se comporta de forma muy parecida a las plantas de campo (Fig. 2.6).

2.4 DISCUSIÓN

2.4.1 Acortamiento de la longitud telomérica ocurrido durante la transición de *in vitro* a *ex vitro*

En este estudio se mostró que la longitud telomérica sufre un acortamiento drástico durante la transición de *in vitro* a *ex vitro*. Se observó que durante los primeros seis meses de aclimatación *ex vitro* se acorta la longitud telomérica 1.5 veces con respecto a las plantas crecidas en cultivo *in vitro*, y posteriormente ocurre un incremento (restablecimiento) de la longitud de los telómeros (31 kb) a partir del primer año de edad, esto con respecto a las plantas de seis meses de edad. Posteriormente, esta longitud fue mantenida en las plantas de dos y tres años de aclimatación *ex vitro*. Los trabajos reportados previamente se han centrado en los cambios en la longitud de los telómeros por el efecto del cultivo de tejidos (Kilian *et al.*, 1995, Riha *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1998, Aronen y Ryyänen, 2014), pero hasta ahora no existe información sobre el efecto de la aclimatación *ex vitro* en la longitud telomérica de las plantas crecidas bajo esta condición.

Este es un paso importante en la micropropagación, debido a que se lleva a cabo el desarrollo de unidades funcionales, como el desarrollo de nuevas hojas, la funcionalidad

de estomas y raíces, la formación de ceras epicuticular y estructuras papilares, los cuales favorecen la sobrevivencia de las plantas (Monja-Mio *et al.*, 2015; Pospíšilová *et al.*, 1999). Durante esta fase, cambios ambientales, tales como una disminución en la humedad relativa, incremento en el CO₂ atmosférico o incremento en la radiación natural, generan un período de estrés para la planta, el cual puede determinar su sobrevivencia (Pospíšilová *et al.*, 1999; Tichá *et al.*, 1999).

Existen reportes que relacionan el acortamiento de los telómeros por diferentes tipos de estrés ocasionado por una inactivación o baja actividad de la telomerasa (Epel *et al.*, 2004, Kawanishi y Oikawa, 2004; Rubion *et al.*, 2004). Serra *et al.*, (2000) observaron el acortamiento gradual de los telómeros con el incremento en el estrés oxidativo, por lo que la longitud telomérica podría ser utilizada como un marcador de este tipo de estrés. Kawanishi y Oikawa, (2004) determinaron que el estrés por radiación UV acelera el acortamiento telomérico debido al daño ocasionado a estas regiones. Se ha demostrado que la resistencia al estrés depende de la capacidad de la telomerasa para elongar los telómeros cortos, mediante un aumento en la actividad que permita mantener la homeostasis de esta región (Rubio *et al.*, 2004).

2.4.2 Longitud telomérica por tipo de tejido y edad en plantas aclimatadas

La longitud de los telómeros fue estudiada en las plantas de 6 meses a 3 años de aclimatación *ex vitro*. De acuerdo a nuestros resultados, nosotros observamos que el tamaño de los telómeros va desde 11.9 kb hasta 31 kb aproximadamente. Esta longitud es mayor en comparación con otras angiospermas como *Prunus yedoensis* y *Malus domestica*, cuya longitud aproximada es de 2-6 kb o 2-7 kb, respectivamente (Moriguchi *et al.*, 2007); pero más corta que la reportada en *Carica papaya* que fue de 25-50 kb (Shakirov *et al.*, 2008). En general, se ha observado que existe una variación en la longitud telomérica en las plantas tanto intra como interespecífico, la cual puede ir de 2 kb a más de 150 kb, y cada especie mantiene un tamaño óptimo que le permite mantener la función de la célula (Heacock *et al.*, 2004; MacKnight *et al.*, 2002).

En este trabajo se mostró que en *Agave tequilana* la longitud de los telómeros es tejido específica. En este sentido encontramos que dicha longitud estaba en un rango para la

hoja basal de entre 11.9-25.9 kb, en la hoja media de 15.2-26.2 kb, en la hoja central de 17-28.8 kb, el tallo de 22-31 kb y para la raíz entre 12.3-27.6 kb. La longitud de los TRF tejido específica ha sido observado en *Hordeum vulgare* en donde encontraron que la longitud de las hojas en plantas maduras fue de 23 kb, en las inflorescencias madura de 20 kb y los embriones maduros de 30 kb (Kilian *et al.*, 1995). Diferencias en la longitud de repetidos teloméricos entre tipos de tejidos también ha sido observado en árboles de *Gynkgo biloba*, en donde determinaron que en micrósporas la longitud era de 4.3 Kb, para callo embriogénico de 4.7 kb, en las ramas de 4.9 kb y en las hojas de 5 kb aproximadamente (Liu *et al.*, 2007).

Por otra parte, se observó que esta longitud telomérica se acortaba con la edad y la diferenciación de los tejidos dentro de la planta en el sentido: raíz > hoja basal > hoja media < hoja central < tallo. En donde los tejidos más jóvenes como las hojas centrales (hasta 28.8 kb) o el tallo (hasta 31 kb) caracterizado por la presencia de regiones meristemáticas fueron los que presentaron mayor longitud de los telómeros en todas las edades analizadas, en comparación de las hojas medias (hojas desarrolladas) (hasta 26.2), hojas basales (hojas viejas o senescente) (hasta 25.9 kb) y raíces (27.6 kb) en las plantas aclimatadas *ex vitro*. Se ha reportado que la longitud de los telómeros puede estar asociada y variar con el proceso de diferenciación celular. Una disminución en la longitud de los repetidos teloméricos, a lo largo de la diferenciación durante el desarrollo, ha sido reportada en cebada, en donde se observó que los embriones inmaduros e inflorescencias jóvenes tenían una mayor longitud que los embriones e inflorescencias maduras (Kilian *et al.*, 1995). En *Pinus sylvestris* se encontró un comportamiento muy similar a cebada, ya que los tejidos menos diferenciados como embrionarios, fueron los que exhibían mayor longitud, seguidos del cambium y yemas, mientras que las acículas que son tejidos más diferenciados son los que presentaron menor longitud (Aronen y Ryyänen, 2012). En *Ginkgo biloba* se ha sido reportado un proceso opuesto, ya que los tejidos más diferenciados como hojas y ramas presentaron una mayor longitud en comparación con los tejidos de macrosporas y embriones (Liu *et al.*, 2007).

Nuestros resultados indican que la TRFL varían con el desarrollo y la edad en las planta aclimatadas *ex vitro*, el cual posiblemente es el reflejo de un balance entre la dinámica de

la longitud de los telómeros (acortamiento y elongación) y la actividad de la telomerasa o algún mecanismo alternativo de mantenimiento de esta longitud (ALT, por sus siglas en inglés), como la recombinación o la retrotransposición, como se ha reportado en otros organismos (Watson *et al.*, 2005; Reddel *et al.*, 2001; Robert *et al.*, 1993). En el caso de la telomerasa, se sabe que esta es el mecanismo principal de mantenimiento de la longitud de los telómeros, por lo que su presencia y actividad ha sido reportada en diversas especies, incluidas las plantas, lo que ha permitido observar la relación entre la longitud telomérica y su actividad (Fajkus *et al.*, 1996; Kilian *et al.*, 1998; Liang *et al.*, 2004; Mu *et al.*, 2014). Específicamente en maíz y cebada la actividad de la telomerasa se ve disminuida progresivamente durante la diferenciación de los tejidos (Kilian *et al.*, 1998), ocasionando que la longitud de los telómeros se acortase con cada ciclo de división celular, debido al llamado problema de replicación de los extremos (Kilian *et al.*, 1998; 1995). Es posible que esta dinámica de la longitud de los telómeros en *Agave*, sea un reflejo de la actividad de la telomerasa como lo observado en maíz o cebada.

2.4.3 Dinámica de la longitud telomérica durante la edad en plantas de campo

En este trabajo se observó que la longitud de los telómeros fue diferente en los tres tipos de hojas estudiados (basal, media y central). Los análisis estadísticos indican que las hojas centrales presentan una mayor TRFL en comparación a las hojas medias y basales ($P < 0.05$). Un acortamiento de los telómeros durante la maduración de los tejidos ha sido observado en *Hordeum vulgare* en donde se encontró que las inflorescencias jóvenes presentaban mayor longitud que las inflorescencias maduras (Kilian *et al.*, 1995). En tejidos más diferenciados de *Pinus sylvestris* como las acículas, se observó un acortamiento de la longitud telomérica (Aronen y Rynänen, 2012). Liu *et al.*, (2007) en *Ginkgo biloba*, no observaron diferencias significativas en la longitud de los telómeros en hojas de diferentes ramas, aun en el mismo árbol. Contrario a nuestros resultados Mu *et al.*, (2015) determinaron que en *Pinus tabulaeformis* la longitud telomérica fue más corta en las hojas nuevas en comparación a las hojas viejas. Esto puede deberse a que *Ginkgo biloba* es una especie decidua, que cada año tira sus hojas en otoño, por lo que continuamente desarrollan hojas nuevas; mientras que los árboles de *Pinus tabulaeformis* son perennifolios que siempre mantiene su follaje aun en estaciones frías. En cambio las especies de agaves son herbáceas, perennes, con hojas dispuestas en espiral y

arregladas en rosetas en el ápice de un tallo y no en ramas como en el caso de árboles, por lo que el desarrollo de sus hojas está bien delimitada de la parte central de la roseta hacia afuera, en donde las hojas maduras o senescentes se localizan en la base de la roseta.

La longitud de los telómeros fue estudiada durante el proceso de la edad en plantas de uno hasta seis años. La comparación de los TRFL en las hojas mostró una variación con el desarrollo, pero una estabilidad con respecto a la edad. En este sentido solo un ligero decremento en la longitud fue observado en las hojas de tres años con respecto a la planta de un año para los tres tipos de hojas analizados ($P < 0.05$).

La estabilidad de la longitud telomérica ha sido reportada en *Lycopersicon esculentum*, en donde los TRFL se mantenían en hojas de tomate de cuatro semanas a seis meses de edad (Bround *et al.*, 1992). En *Melandrium* la longitud de los telómeros se permanece estable en diferentes etapas del desarrollo de la planta (Riha *et al.*, 1998). Flanary y Kletetschka, (2005) observaron que en *Pinus longaeva* la longitud de los TRF presentaba patrones cíclicos de alargamiento y acortamiento con la edad de los árboles. Ellos sugieren que la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa puede ser directa o indirectamente un regulador de la expectativa de vida en esta especie. En *Ginkgo biloba*, analizando los TRFL en plántulas de un año de edad y árboles de hasta 700 años, observaron que en hojas y ramas la longitud de sus telómeros se extendía con la edad, siendo más evidente a partir de los 200 años de edad (Liu *et al.*, 2007), con una elongación constante hasta los árboles de 1,400 años, y que este alargamiento fue un resultado inducido por la telomerasa (Song *et al.*, 2010). En cambio en *Prunus yedoensis*, *Malus domestica* (Moriguchi *et al.*, 2007); *Pinus sylvestris* (Aronen y Ryyänen, 2012) y *Betula pendula* (Aronen y Ryyänen, 2014), no se reportaron diferencias significativas en la longitud telomérica con relación a la edad.

En *Agave tequilana* la magnitud del acortamiento de los telómeros relacionado con la edad sugiere que este puede ser el óptimo para mantener su ciclo de vida y que esta homeostasis es mantenida durante el desarrollo y la edad. Esta idea puede ser soportada por los resultados obtenidos al comparar las plantas de 1-3 años de aclimatación con

respecto a las plantas de 1-3 años de campo, en donde no se observaron diferencias significativas en los tres tipos de hojas analizados.

En general, en este trabajo observamos un acortamiento durante el proceso de *in vitro* a *ex vitro*, en los tejidos de las plantas de seis meses con respecto a las plántulas mantenidas *in vitro*. Además, una variación de la longitud de los TRF dependiendo del tejido analizado (hojas tallos y raíces), en donde los tejidos más jóvenes (hojas centrales) o con regiones meristemáticas (tallos) presentaron una mayor longitud, con respecto de los tejidos más viejos o desarrollados (hojas medias, hojas basales y raíces), aun dentro de la misma planta crecida en condiciones de invernadero *ex vitro*. En cuanto a las plantas de campo encontramos que en los tejidos de los tres tipos de hojas, la longitud telomérica es mayor en las hojas centrales (tejido joven), seguida de las hojas medias (tejido maduro) y está a su vez más corta que las hojas basales (desarrollada), pero una estabilidad con respecto de la edad. La longitud (acortamiento o alargamiento) del telómero puede contribuir directa o indirectamente con el incremento del ciclo de vida y la longevidad en arboles (Flanary y Kletetschka, 2005). Es posible que en plantas perenes herbáceas como *Agave* el balance entre la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa o algún mecanismo ALT (alargamiento alternativo del telómero) u otro factor involucrado en la división celular permita mantener la estabilidad de la planta sobre el desarrollo y la edad.

2.5 CONCLUSIONES

En conclusión, se observó en las plantas aclimatas *ex vitro*: i) un acortamiento de los telómeros a los seis meses con respecto a las plántulas mantenidas en cultivo *in vitro*; ii) un incremento de la longitud telomérica (restablecimiento) en las plantas de un año; iii) La longitud telomérica fue tejido-específico (hojas, tallos y raíces) y que esta varía dependiendo de la edad de la planta. En las plantas de campo observamos que los tejidos más jóvenes (hojas centrales) presenta una longitud telomérica mayor en comparación con las hojas medias y basales; y una estabilidad de la longitud de los telómeros con la edad (1-6 años).

CAPÍTULO III

DINÁMICA DE LA LONGITUD TELOMÉRICA DURANTE LA INDUCCIÓN ORGANOGÉNICA DE *Agave fourcroydes* Lem Y *Agave tequilana* Weber

3.1 INTRODUCCIÓN

Los telómeros son estructuras nucleoproteicas, constituidas por secuencias de ADN conservadas, con un motivo específico repetido en tándem y localizadas en la región terminal de los cromosomas eucarióticos (Watson y Riha, 2010). Este motivo repetido varía en los diferentes grupos taxonómicos, pero en la mayoría de las plantas se presenta TTTAGGG que fue previamente caracterizado en *Arabidopsis*. Sin embargo, en algunas especies pertenecientes al orden Asparagales este motivo es parecido al de humanos, debido a una mutación puntual en el ARN de la enzima telomerasa (Sýkorová *et al.*, 2006; Cesare *et al.*, 2003; Greider, 1990). Este ADN telomérico y las proteínas accesorias (TBP, por sus siglas en inglés) forman estructuras secundarias que protegen esta región, manteniendo la integridad estructural de los cromosomas, evitando la fusión de sus extremos y la degradación por nucleasas (Ye *et al.*, 2014; Riha y Shippen, 2003). Además está involucrado en la regulación genética, el anclaje de los cromosomas a la matriz nuclear durante el apareamiento y recombinación cromosómica durante la división celular (Zellinger y Riha, 2007; Heacock, 2007; 2004). El ADN telomérico cuando no está unido a las TBP, este puede ser reconocido como un daño por la maquinaria de reparación, lo que puede desencadenar un arresto irreversible de la proliferación de las células (Aronen y Ryyänänen, 2012; Watson y Riha, 2011).

Existe variación en la longitud de las regiones teloméricas entre los diferentes grupos taxonómicos, y cada especie mantiene sus telómeros en un rango de tamaño óptimo, que le permita mantener su función y la estructura genética y cromosómica de la célula (Yu, 2007; Heacock *et al.*, 2004). Los estudios *in vivo* e *in vitro* han permitido demostrar en diferentes organismos, incluyendo las plantas, que existe una reducción progresiva del número de repeticiones teloméricas y una inactivación de la telomerasa tejido específico, lo

cual a su vez se ha relacionado con la diferenciación de los tejidos y a la edad de la planta (Riha *et al.*, 2010; Fitzgerald *et al.*, 1996).

Los estudios sobre el acortamiento de los telómeros durante la diferenciación y la edad en diferentes especies vegetales han encontrado que en tejidos más diferenciados y con mayor edad ocurre en una reducción de la longitud de los telómeros como en el caso de *Hordeum vulgare* (Kilian *et al.*, 1995), *Pinus silvestris*, *Sequoia sempervirens*, *Pinus monticola*, *Pinus resinosa*, *Pinus taeda* y *Pinus palustris* (Aronen y Ryyänen, 2011; Flanary y Kletetschka, 2005). También se ha reportado que la desdiferenciación ocasionada por el cultivo de tejidos permitía un incremento en la longitud de los telómeros. El comportamiento en la longitud del telómero puede variar dependiendo de la especie de estudio y de la capacidad de la planta para poder mantener un estado dinámico a lo largo de su ciclo de vida.

Existen pocos trabajos sobre la longitud telomérica en plantas en condiciones de cultivo *in vitro* (Kilian *et al.*, 1995; Riha *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1998; Aronen y Ryyänen, 2013). Se ha reportado que durante la diferenciación en el cultivo de callos de *Hordum vulgare*, resulta en un aumento en la longitud de los telómeros hasta más de 250 kb (Kilian *et al.*, 1995). También se observó un incremento en la longitud telomérica en callos de *Malandrium*, tres meses después de su inducción (Riha *et al.*, 1998). En tabaco después de dos ciclos de propagación no se observaron cambios significativos en la longitud de los telómeros (Fajkus *et al.*, 1998). Recientemente, en *Betula pendula* se observó un acortamiento de los telómeros en los brotes generados *in vitro* con respecto a los tejidos de los árboles donadores (Aronen y Ryyänen, 2013).

El género *Agave* representa un modelo de planta de ciclo de vida largo, siendo la organogénesis un proceso con activa replicación celular, se analizó la dinámica de la longitud telomérica durante la inducción organogénica. *Agave fourcroydes* y *Agave tequilana* son dos especies de agaves de importancia económica debido a su gran demanda a nivel industrial para la producción de fibra y tequila respectivamente. Por ser especies de ciclo de vida largo (9- 12 años), las técnicas de cultivo *in vitro* ofrecen una herramienta muy útil para la propagación masiva de individuos élite.

El objetivo del presente capítulo se abordan los objetivos específicos dos y cuatro, con un énfasis en el estudio de la dinámica de la longitud telomérica durante el proceso de organogénesis en dos especies de agaves: *A. tequilana* y *A. fourcroydes*.

3.2 MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1 Material vegetal

Para la inducción organogénica fueron utilizadas plantas de *A. fourcroydes* Lem y *A. tequilana* Weber provenientes de cultivo *in vitro*, cultivadas y mantenidas en condiciones de invernadero durante tres años. Además, a partir de estas plantas se colectaron muestras de raíz, tallo, hoja basal, media y central en ambas especies para la caracterización de la longitud telomérica del material donador (Fig. 3.1).

3.2.2 Inducción de la organogénesis

La inducción organogénica se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Robert *et al.*, (2006), que básicamente consiste en la inducción de brotes a partir de tejido meristemático extraído del tallo de las plantas donadoras para su subsecuente multiplicación (Fig. 3.1).

El protocolo brevemente consiste en quitar todas las hojas de la planta donadora, el tejido restante es lavado, desinfectado y en una campana de flujo laminar es cortado en cubos de 0.8 cm³. Los cortes de cubos fueron inoculados en frascos conteniendo 25 mL de medio MSB: sales de Murashige and Skoog (1962) (MS) con nitrógeno (10 mM KNO₃ and 5 mM NH₄NO₃), suplementado con 0.1 μM ácido 2,4-diclorofenoxiacético, 44.4 μM 6-bencilaminopurina (BA), solidificado con 0.5 % (w/v) agar (Sigma-Aldrich G1910) y 0.5 % (w/v) PhytageI™ (Sigma- Aldrich P8169). El medio de cultivo fue ajustado a un pH de 5.75 con una solución de 0.1 N HCl o KOH y esterilizado a 121 °C por 15 min. Los frascos fueron incubados en un cuarto de cultivo a 25 ± 2 °C bajo 16- h fotoperiodo (45 μmol m⁻²s⁻¹).

Las muestras fueron colectadas antes y durante la inducción organogénica (1, 2, 4, 6 y 8

semanas) (Fig. 3.1). Tres réplicas de southern blot fueron realizadas por cada punto de muestreo. Cada muestra pertenece a un tallo de individuos diferentes.

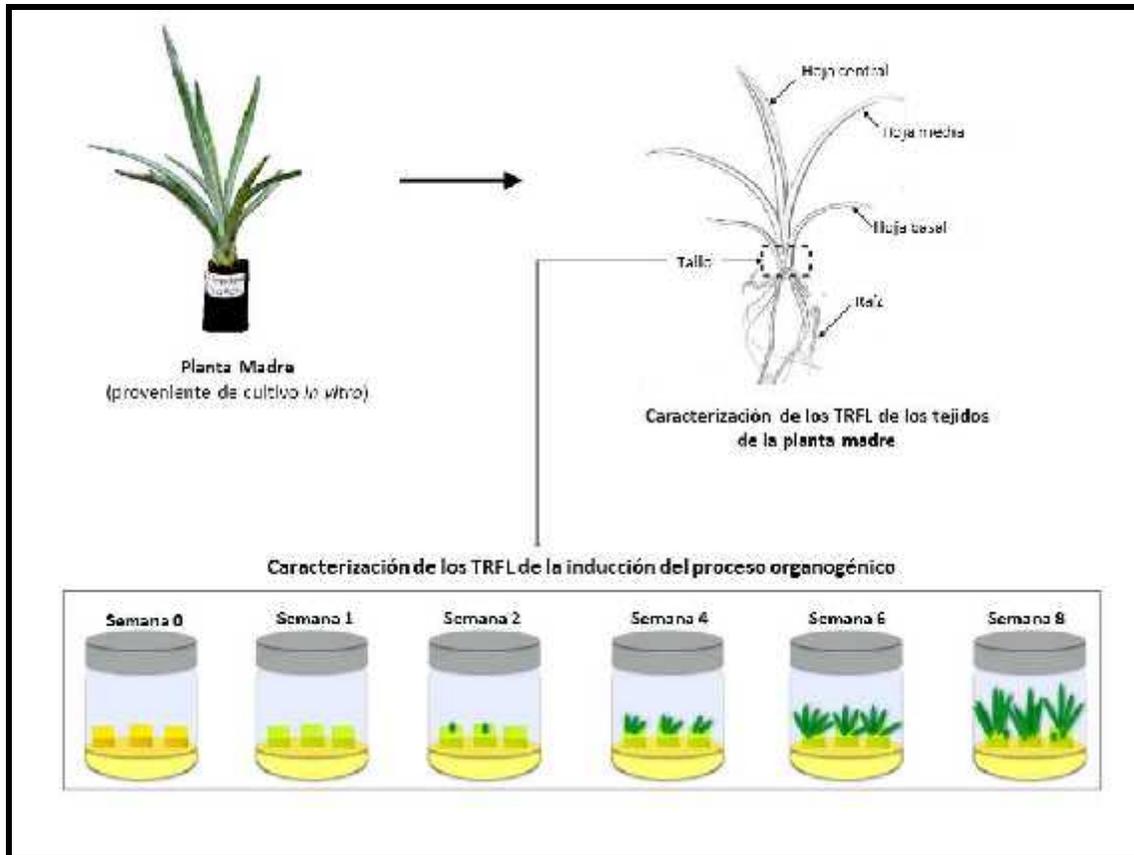


Figura 3.1 Representación esquemática del diseño experimental basado en la determinación de la longitud de los telómeros a partir de los tejidos de la planta madre y durante el proceso de inducción organogénica para ambas especies de agaves.

3.2.3 Extracción del ADN genómico

Posterior a la colecta las muestras vegetales fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 C hasta su extracción. Las muestras de cada tejido fueron colocadas en un mortero y se maceradas hasta obtener un polvo fino utilizando un pistilo y nitrógeno líquido. El ADN genómico fue aislado de cada muestra utilizando el método de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Doyle y Doyle, 1990) y subsecuentemente tratado con RNAsa (New England Biolabs). La concentración del ADN fue determinada por

espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (Thermo) en un radio de absorbancia de 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}). La integridad de las muestras de ADN fueron confirmadas en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) y teñido con bromuro de etidio.

3.2.4 Evaluación de la longitud de los fragmentos de restricción terminal (TRFL)

La TRFL es un indicador de la longitud telomérica. Este indicador fue determinado por medio del análisis de hibridación southern blot reportado por Kimura *et al.*, (2010), con algunas modificaciones descritas por Liu *et al.*, (2007). Alícuotas de ADN (aproximadamente de 10 μ g) fueron digeridas con la enzima Taq I a 65 °C durante toda la noche. Los productos de las digestiones y 0.1 ng de control positivo fueron separados en un gel horizontal de agarosa al 0.8% (p/v) y sometidos a electroforesis en amortiguador TAE 1X a 100 V durante 3 h a temperatura ambiente. Para la síntesis del control positivo y la sonda para la hibridación, se generó por PCR una secuencia sintética telomérica con el método propuesto por Ijdo *et al.*, (1991), utilizando los cebadores T1 (TTAGGG)₅ y T2 (CCTAAA)₅. La hibridación se llevó a cabo a una temperatura de 60 °C durante toda la noche, posteriormente los lavados de astringencia y detección fueron desarrollados como lo indica el kit DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter II (Roche). Las membranas fueron expuestas a un film de rayos X (GE Healthcare) a temperatura ambiente. La autoradiografía fue desarrollada utilizando la solución reveladora por 1 min (Sigma-Aldrich) y posteriormente la solución fijadora (Sigma-Aldrich) por 2 min.

3.2.5 Medición de la longitud de los TRF y análisis estadísticos

Las imágenes en formato “tiff” de las autoradiografías escaneadas se utilizaron para la cuantificación de las longitudes teloméricas. Se utilizó el programa Telotool (Göhrong *et al.*, 2014), sistema que es capaz de determinar la distribución de la región telomérica fácilmente, y que provee al usuario una imagen realista de la distribución de la TRFL. Para medir la longitud telomérica cada muestra fue repetida tres veces por hibridación southern y calculada con el programa. La TRFL fue reportada como la media \pm error estándar (ES). Todos los datos fueron analizados usando el programa GraphPad Prism 5. El análisis de varianza (ANOVA) se utilizó para calcular la significancia estadística. La significancia de la

diferencia que cubre las medias + ES se determinó mediante la prueba de Tukey con una $p < 0.05$.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Caracterización de la longitud telomérica del material donador

Con el propósito de determinar la longitud telomérica en las plantas donadoras del explante, se realizó la caracterización de la longitud de los fragmentos de restricción terminal (TRFL) para cada tejido: hojas (basal, media y central), tallo y raíces de *Agave tequilana* y *A. fourcroydes* de las plantas aclimatadas en el invernadero por tres años. La imagen representativa de una hibridación southern blot utilizada para la medición de la longitud de los telómeros se muestra en la Figura 3.2A, en donde la señal de hibridación representa la región telomérica. Los fragmentos encontrados van desde 9.4 kb a 23.1 kb (Fig. 3.2A).

Los resultados de los TRFL para *A. fourcroydes* indicaron que las longitudes promedio fueron de 23.1 kb ($ES \pm 0.51$) en el tejido de la hoja basal, 24.7 kb (± 0.25) en la hoja media, 25.5 kb (± 0.17) en la hoja central, 30.1 kb (± 0.48) en el tallo y 23.1 kb (± 0.52) en la raíz (Fig. 3.2B). En este caso se observó que existe una longitud telomérica tejido específico muy clara, en donde los tallos, que se caracterizan por la presencia de regiones meristemáticas y la hoja central que es más joven o de reciente formación, fueron los tejidos que presentaron la mayor longitud ($p < 0.05$) (Fig. 3.2B), en comparación con los tejidos de hoja media, basal y la raíz los cuales son tejidos que están más diferenciados y en algunos casos senescentes (hoja basal).

Los resultados en *A. tequilana* mostraron que la longitud telomérica promedio fue de 25.4 kb (± 0.17) en la hoja basal, 26 kb (± 0.47) en la hoja media, 26.4 kb (± 0.35) en la hoja central, 26.1 kb (± 0.63) en el tallo y 23.1 kb (± 0.47) en los tejidos de raíz (Fig. 3.2B). En este sentido se observó que la longitud de los telómeros fue más homogénea en los tejidos analizados (hojas, tallo y raíz) ($p > 0.05$).

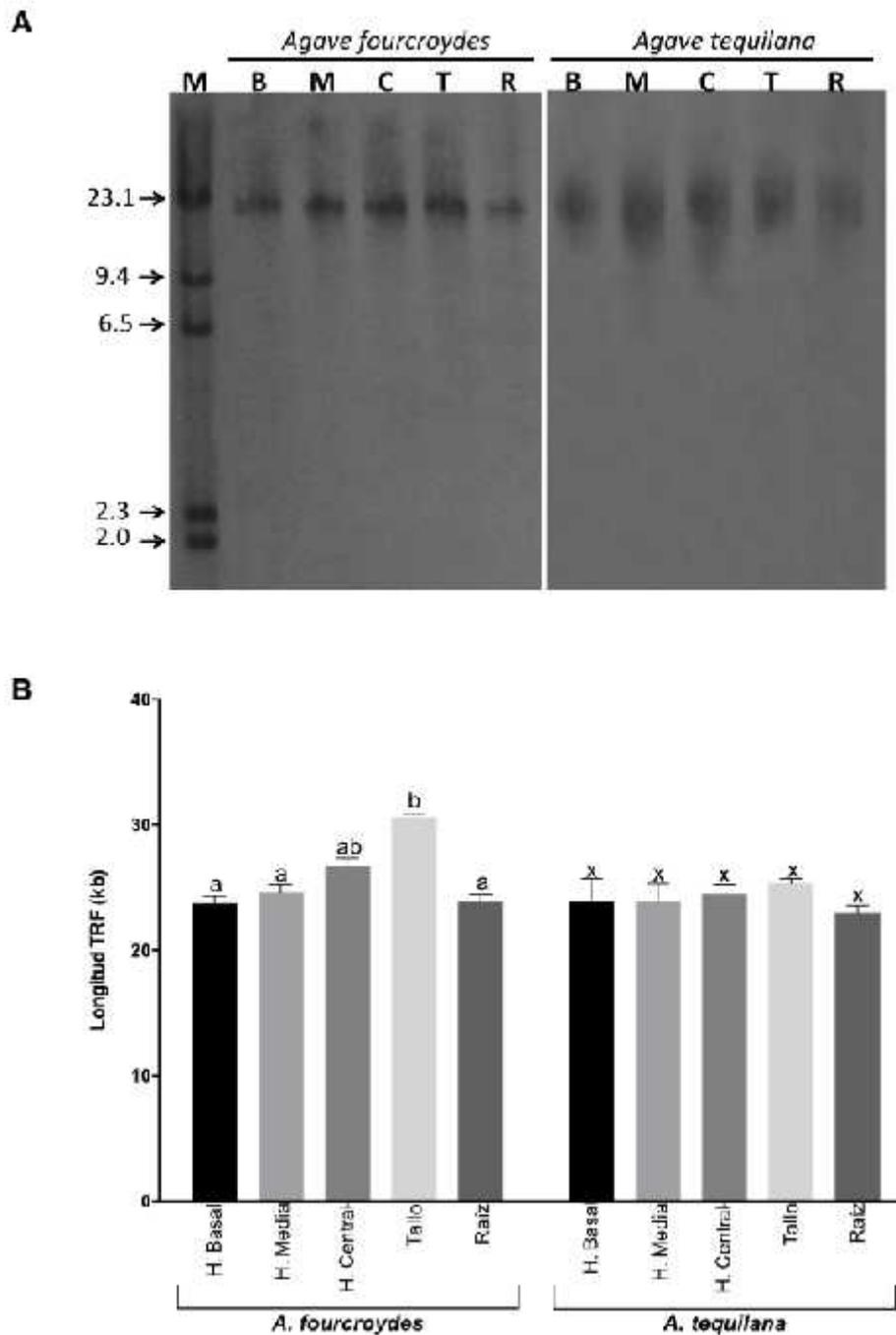


Figura 3.2 Análisis de la longitud telomérica en diferentes tejidos de las plantas madre o donadoras (*A. fourcroydes* y *A. tequilana*). A) Imagen representativa de un southern blot utilizado para la medición de la longitud de los TRF. M: Marcador de peso molecular Lambda/Hind III en kb. B: Hoja basal. M: Hoja media. C: Hoja central. T: Tallo. R: Raíz. B) Longitud de los TRF de los diferentes tejidos para ambas especies de agave. Diferentes letras arriba de las barras son indicativas de diferencias significativas al nivel de 0.05 para cada grupo analizado.

Sin embargo, a pesar de que los análisis estadísticos no revelaron diferencias significativas, se observó que el tejido de la hoja central y el tallo presentaron una longitud telomérica ligeramente mayor (1-3 kb) en comparación de los demás tejidos analizados, un comportamiento parecido al presentado en *A. fourcroydes*.

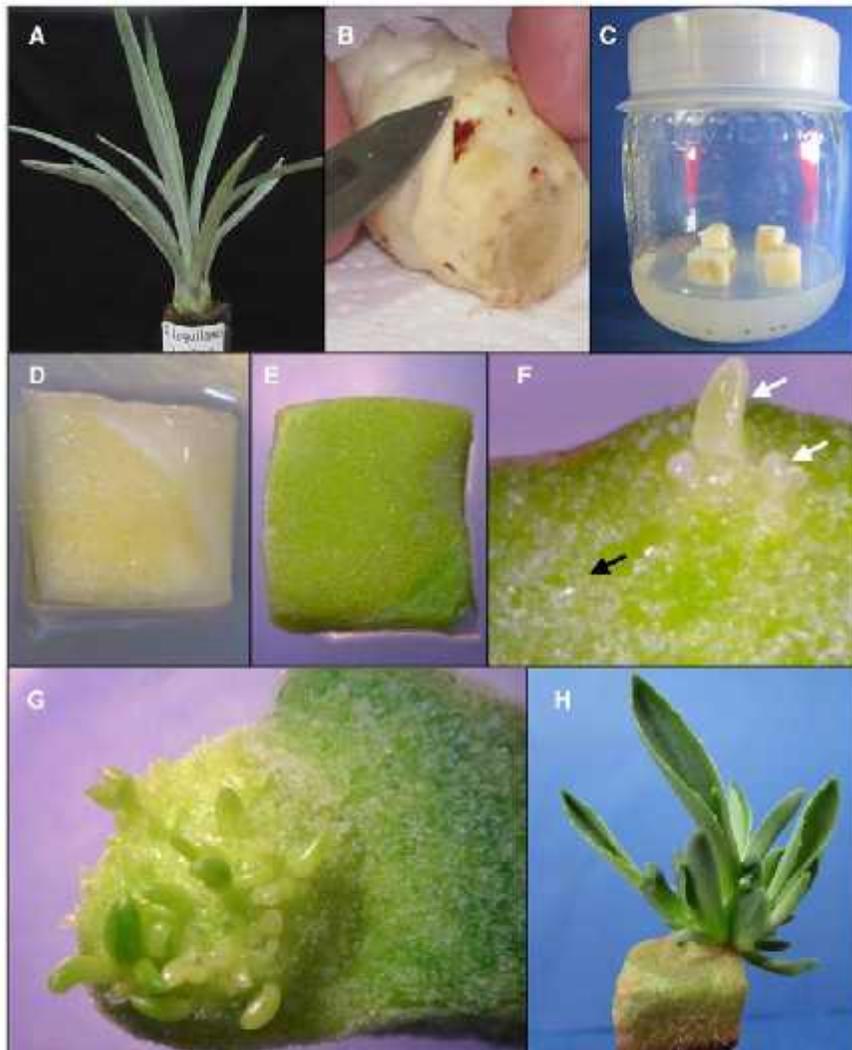


Figura 3.3 Proceso de inducción organogénica en agaves. A) Planta madre. B) Obtención del tallo utilizado como explante. C) Tallo cortado en pequeños cubos de 0.8 cm e inoculados en el medio de inducción. D) Vista frontal del explante al inicio de la inducción. E) Explante después de una semana de cultivo. F) Explante después de dos semanas de cultivo mostrando una superficie escarchada (flecha negra) y la formación de los primeros brotes (flechas blancas). G) Explante después de cuatro semanas mostrando los múltiples brotes formados. H) Crecimiento de brotes sobre el explante en la semana ocho.

3.3.2 Inducción organogénica de *A. fourcroydes* y *A. tequilana*

El proceso de inducción organogénica fue monitoreado durante ocho semanas en ambas especies. Las plantas madres utilizadas presentaron una altura de aproximadamente 40-50 cm (Fig. 3.3A). Los explantes utilizados fueron provenientes del tallo (Fig. 3.3B), cortados en cubos pequeños de 0.8 cm³ (Fig. 3.3C), los cuales contenían el tejido meristemático (Fig. 3.3D). Al cabo de una semana de cultivo, los explantes se volvieron de un color verde intenso (Fig. 3.3E). En la segunda semana, los explantes presentaban una superficie escarchada sobre la cual fueron observadas pequeñas estructuras correspondientes a los primeros brotes (Fig. 3.3F). En la cuarta semana del cultivo se encontraron múltiples brotes sobre el explante (Fig. 3.3G). Estos brotes fueron creciendo durante la sexta y octava semana (Fig. 3.3H). Posteriormente de haber transcurrido este tiempo (8 semanas) los brotes fueron colocados en un medio diferente para la siguiente etapa de multiplicación.

3.3.3 Dinámica de la longitud telomérica durante la inducción organogénica en *A. fourcroydes*

Con el objetivo de medir la longitud telomérica durante el proceso organogénico en *A. fourcroydes* se realizó la determinación de los TRF durante ocho semanas. Una imagen representativa de una hibridación southern blot utilizada para la medición de la longitud de los telómeros se muestra en la Figura 3.4, en la cual se puede observar la señal de hibridación que representa la región telomérica.

Los resultados obtenidos mostraron que la longitud promedio al inicio de la inducción (T0) fue de 22.8 kb (± 0.32), 24.8 kb (± 0.54) en la primer semana (T1), 27.7 kb (± 0.42) en la segunda semana (T2), 35.9 kb (± 0.40) en la cuarta semana (T4), 45.2 kb (± 0.24) en la semana seis (T6) y de 50.8 kb (± 0.07) aproximadamente en la octava semana de la inducción (T8) (Fig. 3.5A). En este sentido observamos un incremento gradual con el tiempo de la inducción, que fue de 2 kb en el T1, 2.9 kb en el T2, 8.2 en el T4, 9.3 kb en el T6 y 5.6 kb en el T8 respectivamente. El análisis estadístico reveló cambios significativos en la longitud de los telómeros a partir de la semana cuatro de inducción, que coincide con la presencia de múltiples brotes en el explante ($p < 0.05$) (Fig. 3.3F y G). En general,

un incremento de 28 kb fue observado en las plántulas generadas en el T8 con respecto del explante inicial ($p < 0.05$) (Fig. 3.5A).

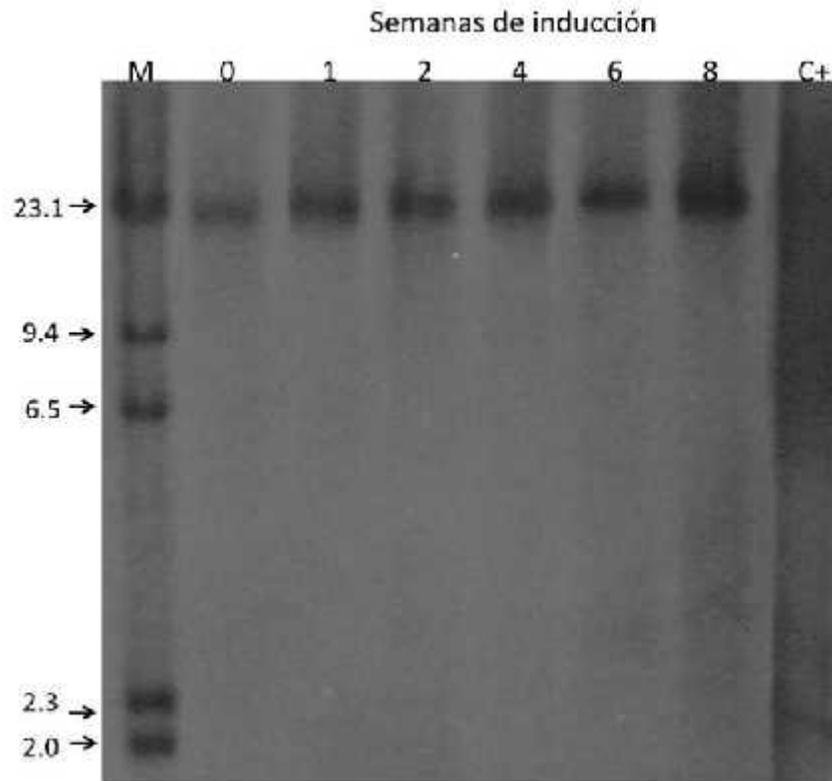


Figura 3.4 Imagen representativa de un southern blot utilizado para la cuantificación de la longitud telomérica durante el proceso organogénico. M: Marcador de peso molecular Lambda/Hind III en kb. 0, 1, 2, 4, 6, 8 indican las semanas del proceso de inducción organogénica. C+: Control positivo.

3.3.4 Dinámica de la longitud telomérica durante la inducción organogénica en *A. tequilana*

De la misma manera que en *A. fourcroydes*, la longitud telomérica durante el proceso de inducción organogénica en *A. tequilana* también fue determinada. Una imagen representativa de un southern blot utilizada para la medición de la longitud de los telómeros se muestra en la Figura 3.4, en donde la señal de hibridación representa la región de interés.

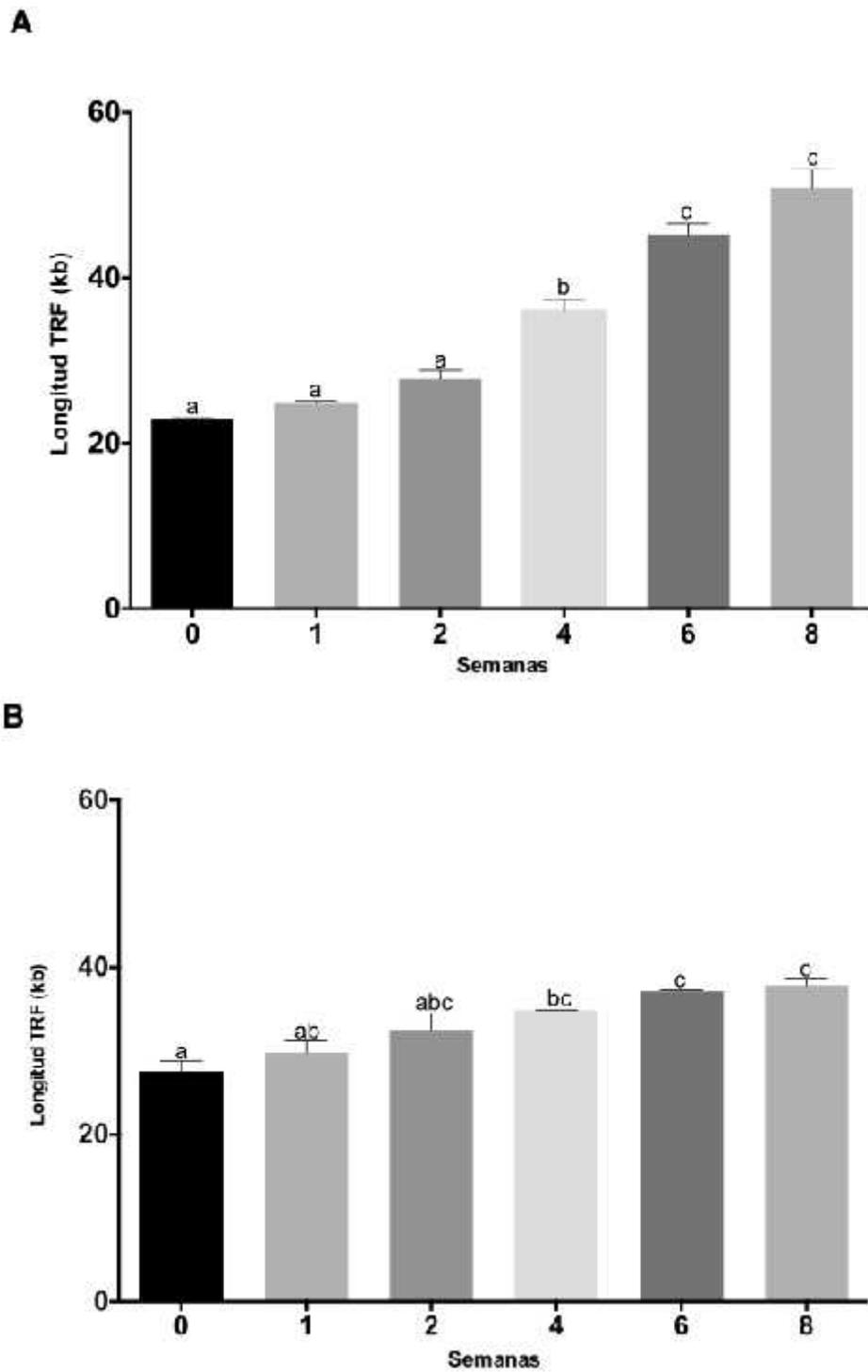


Figura 3.5 Análisis de la longitud telomérica durante el proceso organogénico. A) *A. fourcroydes* y B) *A. tequilana*. Diferentes letras arriba de las barras son indicativas de diferencias significativas al nivel de 0.05.

Los resultados obtenidos, mostraron que la longitud promedio de los telómeros fue de 27.5 kb al inicio de la inducción, 29.8 kb (± 0.42) en el T1, 32.5 kb (± 0.46) en el T2, 34.8 kb (± 0.41) en el T4, 37.1 kb (± 0.07) en el T6 y de 37.8 kb (± 0.4) en la última semana de la inducción (T8) (Fig. 3.5B). Un incremento gradual de la TRFL, muy parecido al de *A. fourcroydes* pero en menor magnitud fue observado en *A. tequilana*. En esta especie observamos un incremento de 2.3 kb durante el T1, 2.7 kb en el T2, 2.3 kb en el T4, 2.3 en el T6 y de 0.7 kb en la última semana de la evaluación (T8). En este caso solo encontraron diferencias significativas a partir de la semana cuatro de la inducción, al igual que en *A. fourcroydes*. En general, la longitud telomérica presentó un alargamiento de 10.3 kb en los brotes generados en la última semana de la evaluación con respecto del explante inicial ($p < 0.05$) (Fig. 3.5B).

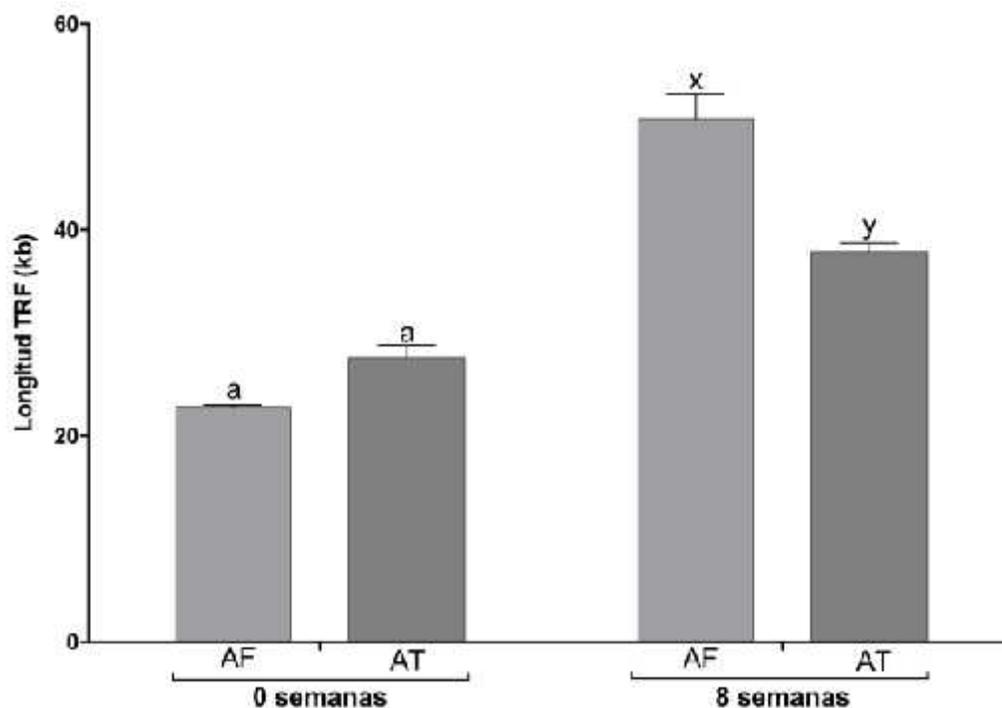


Figura 3.6 Comparación de la longitud telomérica entre *A. fourcroydes* y *A. tequilana* al inicio de la inducción (semana 0) y al final de la inducción organogénica (semana 8). Diferentes letras arriba de las barras son indicativas de diferencias significativas al nivel de 0.05.

Se realizó una comparación de la longitud telomérica al inicio y al final de la inducción organogénica entre las dos especies (*A. fourcroydes* y *A. tequilana*), encontrando que la

longitud telomérica del explante inicial en *A. fourcroydes* (22.8 kb) fue menor al de *A. tequilana* (27.5 kb), lo que representó una diferencia de 4.7 kb ($p < 0.05$) (Fig. 3.6). En *A. fourcroydes*, se observó en la segunda semana de la inducción una longitud de 27.7 kb similar a la longitud encontrada en el explante inicial de *A. tequilana*. La longitud telomérica en *A. fourcroydes* aumentó considerablemente de 22.8 kb a 50.8 kb aproximadamente mientras que, en *A. tequilana* el incremento fue menor (de 27.5 kb a 37.8 kb). Los resultados mostraron un aumento de 13 kb en *A. fourcroydes* con respecto a *A. tequilana* al final de la inducción, aun cuando esta última presentó una longitud mayor al inicio de la inducción (Fig. 3.6).

3.4 DISCUSIÓN

3.4.1 Diferencias de la longitud telomérica en el material parental de acuerdo a especies

La longitud telomérica fue estudiada en el material donador, mantenido durante 3 años en condiciones *ex vitro*, la cual varía de 23.1-30.1 kb en *A. fourcroydes* y de 23.1-26.4 kb en *A. tequilana*.

En las plantas, se ha observado una variación en la longitud telomérica tanto intra como interespecífica, la cual puede ir de 2 kb a más de 150 kb (McKnight *et al.*, 2002; Heacock *et al.*, 2004). La longitud de *A. fourcroydes* y *A. tequilana* es mayor a la reportada en otras especies de angiospermas como *Prunus yedoensis* (2-6 kb) y *Malus domestica* (2-7 kb) (Moriguchi *et al.*, 2007), pero más corta que en *Carica papaya* (25-50 kb) (Shakirov *et al.*, 2008).

En este trabajo, se observó que la longitud de los telómeros varía dependiendo del tejido analizado. En *A. fourcroydes* al analizar los tres tipos de hojas se puede notar que la longitud telomérica en la hoja basal (hoja senescente) fue 2.4 kb más corta, con respecto a la hoja central (hoja joven), y 1.6 kb en comparación con la hoja media (hoja desarrollada). Mientras que la longitud telomérica de la hoja media solo disminuyó 0.8 kb con respecto a la hoja central. En el caso del tallo, este mostró una longitud telomérica mayor en relación a todos los tejidos analizados (raíces y tipos de hojas). A diferencia del tejido de raíz, en

donde se presentó la menor longitud, esto en relación a los demás tejidos analizados (tallo y tipos de hojas). En *A. tequilana*, a pesar de que los análisis estadísticos no mostraron diferencias significativas entre los tipos de tejidos, una ligera diferencia entre ellos fue observada, con un comportamiento similar al presentado en *A. fourcroydes*. La longitud de los TRF tejido específica ha sido observada en *Hordeum vulgare* (Kilian *et al.*, 1995) y en *Gynkgo biloba* (Liu *et al.*, 2007). En *Hordeum vulgare* se reportó una longitud de 23 kb en hojas, 20 kb en inflorescencias maduras y 30 kb en embriones maduros (Kilian *et al.*, 1995). En *Gynkgo biloba*, se reportó una longitud de 4.3 kb en micrósporas, 4.9 kb en ramas y 5 kb en hojas (Liu *et al.*, 2007).

En ambas especies de *Agave* se puede observar que los tejidos del tallo (que contienen regiones meristemáticas) y la hoja central (tejido jóvenes o de reciente formación), fueron los que presentaron la mayor longitud telomérica. Esto concuerda con lo reportado en especies como *Hordeum vulgare* (Kilian *et al.*, 1995) y *Pinus sylvestris* (Aronen y Ryyänänen, 2012), se ha observado que la longitud telomérica es mayor en tejidos jóvenes o menos diferenciados (embriones inmaduros, inflorescencias jóvenes, yemas, cambium vascular) que en tejidos más diferenciados (embriones maduros, inflorescencias viejas, las hojas de plantas adultas, acículas). Mientras que en *Ginkgo biloba* (Liu *et al.*, 2007) y *Pinus tabulaeformis* (Mu *et al.*, 2015), se ha reportado un proceso opuesto a nuestros resultados, ya que los tejidos más diferenciados presentaron mayor longitud en comparación con los tejidos jóvenes (Liu *et al.*, 2007).

Específicamente, en los tres tipos de hojas, en donde la hoja joven presentó una mayor longitud telomérica en comparación con la hoja madura y senescente, siendo esta última la presentó menor longitud telomérica. Contrario a nuestros resultados Mu *et al.*, (2015) observaron que en *Pinus tabulaeformis* la longitud telomérica fue más corta en las hojas nuevas o de reciente formación que en las hojas viejas o maduras. Es posible que el incremento en la longitud de los telómeros pueda permitir mantener los tejidos por más tiempo, evitando procesos como senescencia y apoptosis celular. Los estudios sugieren que en células somáticas, la longitud de los telómeros declina en el tiempo, y este acortamiento sirve como un mecanismo que limita la capacidad de proliferación, que a su vez disparan mecanismos de senescencia y posteriormente apoptosis celular (Watson y

Riha, 2010; Jeyapalan y Sedivy, 2008; Aubert y Lansdorp, 2008). La sobreexpresión ectópica de la telomerasa en células en cultivo de fibroblastos permitió una elongación de los telómeros, lo que a su vez ocasionó que estas células se dividieran más veces y evitaran la senescencia celular (Bobnar *et al.*, 1998). *Pinus tabulaeformis* es especie arbórea, gimnosperma, perennifolia, que siempre mantiene su follaje aún en estaciones frías, con hojas modificadas en forma de acículas que crecen alrededor de las ramas (Mu *et al.*, 2015; Kwei y Lee, 1963). En cambio, las especies del género *Agave* a pesar de ser especies perennes, xerófitas, no arbórea, semélpara o monocárpico (se reproducen una vez y mueren), con hojas dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo (García-Mendoza, 2007). El desarrollo de sus hojas está bien delimitado de la parte central de la roseta hacia afuera, en donde las hojas maduras o senescentes se localizan en la base de la roseta, lo que puede explicar esa diferencia en longitud telomérica en este tejido.

La dinámica de los TRFL observado en ambas especies (*A. tequilana* y *A. fourcroydes*) puede ser un reflejo entre el balance de la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa o algún mecanismo alternativo de mantenimiento de estas regiones. La enzima telomerasa ha sido encontrada en diversas especies, lo que ha permitido observar una relación directa entre la longitud telomérica y la actividad de la enzima (Mu *et al.*, 2015; Kilian *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1996). Específicamente en maíz y cebada la actividad de la telomerasa es suprimida progresivamente durante la diferenciación de los tejidos (Kilian *et al.*, 1998), lo que puede ocasionar una reducción progresiva de los telómeros con cada ciclo de división de la célula, debido al problema de replicación de los extremos terminales (Kilian *et al.*, 1998; Kilian *et al.*, 1995).

3.4.2 Dinámica de la longitud telomérica durante la inducción organogénica de *A. fourcroydes* y *A. tequilana*

En este estudio se observó que la longitud telomérica se incrementó de manera gradual a lo largo del tiempo durante el proceso organogénico. En el caso de *A. fourcroydes* un alargamiento a partir de 22.8 kb al inicio de la inducción hasta 50.8 kb fue observado, lo que representó un incremento de 28.1 kb durante todo el proceso. Un incremento de la

longitud durante el proceso también fue observado en *A. tequilana*, cuya longitud fue desde 27.5 kb a 37.8 kb, pero a diferencia de *A. foucroydes* el incremento fue menor de 10.3 kb, a pesar que al inicio de la inducción esta longitud fue mayor.

El efecto del cultivo de tejidos en la longitud de los telómeros ha sido poco estudiado (Aronen y Ryyananen, 2014; Liu *et al.*, 2007; Riha *et al.*, 1998; Kilian *et al.*, 1995; Broun *et al.*, 1992). El comportamiento de la longitud telomérica (acortamiento, alargamiento y mantenimiento) varía entre especies y procesos de cultivo *in vitro* utilizados. En *Nicotiana tabacum* la formación de callos alrededor de dos ciclos de cultivo no afectó la longitud telomérica (Broun *et al.*, 1992).

En *Hordeum vulgare*, los callos generados durante las primeras cuatro semanas de inducción mostraron un acortamiento en la TRFL, que posteriormente se revirtió y aumentó hasta más de 250 kb en los callos mantenidos durante un año de cultivo (Kilian *et al.*, 1995). En *Melandrium album*, la TRFL en dos líneas de callos se incrementó la longitud telomérica en 1 y 2 kb durante el crecimiento *in vitro* y la diferenciación, en comparación con los explantes iniciales de hojas (Riha *et al.*, 1998). En *Ginkgo biloba*, la TRFL de los callos embriogénicos fue ligeramente mayor (4.7 kb) en comparación con los embriones utilizados como explantes iniciales (4.3 kb) (Liu *et al.*, 2007). En *Betula pendula*, los tejidos mantenidos *in vitro* presentaron un acortamiento de los telómeros en comparación del material donador (Aronen y Ryyänen, 2014).

El aumento de la longitud telomérica fue gradual durante todo el proceso organogénico en ambas especies coincidiendo con los diferentes cambios morfológicos observados: escarchamiento, formación de primeros brotes, desarrollo de múltiples brotes. Interesantemente el incremento estadísticamente significativo de la longitud telomérica ocurrido en la semana 4 de la inducción, coincide con la presencia de múltiples brotes generados en el explante.

El cultivo *in vitro* representa un periodo de estrés celular, en donde la regeneración de nuevas plantas, se basa en la capacidad de las células para redirigir el desarrollo (Zhao *et al.*, 2008; Ezhova, 2003). El estrés ocasionado por el cultivo *in vitro*, puede desencadenar cambios genéticos y epigenéticos, los cuales pueden ejercer efectos sobre el control de la

división celular y la desdiferenciación, alterando la estructura de la cromatina y ocasionado una reprogramación de los tejidos somáticos, lo cual posiblemente puede afectar directa o indirectamente la longitud del ADN telomérico (Smulders y Klerk, 2010; Xu *et al.*, 2004; Hecht *et al.*, 2001).

Los estudios *in vivo* e *in vitro* han permitido demostrar en diferentes organismos, incluyendo las plantas, que el alargamiento o acortamiento del ADN telomérico está directamente relacionado con una activación o inactivación de la telomerasa (Watson and Riha, 2011; Fitzgerald *et al.*, 1996). Se sabe que la telomerasa es altamente activa en el cultivo de células de plantas (Fajkus *et al.*, 1996; Heller *et al.*, 1996), lo cual puede contribuir a que la longitud de los telómeros pueda mantenerse y hasta expandirse a lo largo del tiempo. Lo anterior puede explicar el aumento de la longitud de los telómeros durante el proceso organogénico en las especies de *A. fourcroydes* y *A. tequilana*.

3.5 CONCLUSIONES

En conclusión se mostró que existe un incremento gradual de la longitud de los telómeros durante el proceso de organogénesis *in vitro* en *A. fourcroydes* y *A. tequilana*. Un incremento significativo fue observado hasta la semana cuatro de la inducción, que coincide con la presencia de los nuevos brotes. En ambas especies se observó que la longitud telomérica es tejido específica, en donde los tejidos más jóvenes o meristemáticas (tallos) presentan una mayor longitud telomérica.

CAPÍTULO IV

ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE PCR CUANTITATIVA PARA DETERMINAR EL NÚMERO DE COPIAS DEL ADN TELOMÉRICO EN *Agave tequilana*

4.1 INTRODUCCIÓN

Debido a la importancia de los telómeros en el mantenimiento de la integridad de los cromosomas, recientemente las investigaciones se han centrado en el estudio de las características teloméricas como: la composición de las secuencias de ADN (caracterización del motivo repetido), estructura, longitud y la actividad de la telomerasa, que son utilizados frecuentemente en investigación básica y aplicada (Fajkus *et al.*, 2005). Existen diversas técnicas que permiten el análisis de los telómeros y sus componentes, las cuales son utilizadas como una fuente muy importante en la investigación para encontrar diferencias y similitudes entre los organismos, así como la diversidad de mecanismos involucrados en su regulación (Cuadrado *et al.*, 2009; Fajkus *et al.*, 2005). El estudio de los telómeros se ha llevado a cabo mediante diversas estrategias, las cuales involucran una combinación de técnicas experimentales (Fajkus *et al.*, 2005).

Estas técnicas son utilizadas para el escrutinio y la caracterización de secuencias teloméricas específicas. Una de éstas es la hibridación slot-blot, la cual es útil para propósitos de búsqueda de secuencias putativas teloméricas (Sýkorová *et al.*, 2003). Posteriormente, es necesario demostrar que ésta se localiza hacia la región telomérica y no en otra región del genoma (Fajkus *et al.*, 2005). Para realizar dicho propósito existen varias estrategias, en las que se incluyen digestiones con la enzima BAL-31 (exonucleasa que digiere tanto el extremo 3' y 5' de la doble cadena de ADN sin generar escisiones internas) o la técnica de hibridación *in situ* fluorescente (Cuadrado *et al.*, 2009; Schwarzacher, 2003; Kilian *et al.*, 1995; Richards y Ausubel *et al.*, 1991). Esta última ha sido utilizada en especies pertenecientes al orden Asparagales, lo que permitió determinar la variabilidad, distribución y localización específica de diferentes sondas teloméricas (Sykorokova, *et al.*, 2003), así como en cebada (Robert *et al.*, 1993), arroz (Wu y Tanksley, 1993) y *Arabidopsis* (Cuadrado *et al.*, 2009).

Una técnica que permiten estudiar la dinámica de la longitud telomérica y sus implicaciones de en diferentes procesos (regulación, división celular, edad, cáncer, entre otros) es la longitud de los fragmentos de restricción terminal (TRFL, por sus siglas en ingles). Esta técnica se basa en un southern blot, en donde se lleva a cabo una digestión y transferencia a una membrana del ADN_g, que posteriormente se hibrida con una sonda específica. Esta técnica ha sido utilizada en diferentes especies vegetales como tabaco (Fajkus *et al.*, 1995), cebada (Kilian *et al.*, 1995), ginkgo (Liu *et al.*, 2007) y pino (Aronen y Ryyänen, 2012), entre otras. Esta es una de las técnicas más ampliamente utilizadas en las plantas para estudiar la dinámica de estas regiones en plantas y sus implicaciones en la diferenciación y desarrollo de los tejidos (Liu *et al.*, 2007; Kilian *et al.*, 1995), la edad (Liang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2007; Flanary y Kletetschka *et al.*, 2005) y el genotipo (Aronen y Ryyänen, 2012). Recientemente se ha utilizado la medición de la longitud telomérica empleando técnicas de PCR en tiempo real, aunque estas estrategias solo han sido aplicadas a células o tejidos de humanos (Gil y Coetzer, 2004; Cawthon *et al.*, 2002; Dasi *et al.*, 2001).

Existe una variación en la longitud telomérica entre los diferentes grupos taxonómicos, y cada especie mantiene dicha longitud en un rango de tamaño óptimo, al cual le permita mantener su función, la estructura genética y cromosómica de la célula (Yu, 2007; Heacock *et al.*, 2004). Los estudio *in vivo* e *in vitro* han permitido demostrar en diferentes organismos, incluyendo las plantas, que existe una reducción progresiva del número de repeticiones teloméricas y una inactivación de la telomerasa tejido específico lo cual a su vez ha sido relacionado con la diferenciación y la edad de la planta (Riha *et al.*, 2010; Fitzgerald *et al.*, 1996).

Por lo anterior el objetivo del presente capítulo fue estandarizar y evaluar el número de copias por Q-PCR en plantas de diferentes edades, así como diferentes tejidos en *Agave tequila* y la relación con la edad de la planta.

4.2 MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1 Material biológico

Para la obtención del material vegetal se utilizaron plantas de *Agave tequilana* mantenidas en el invernadero. Para la caracterización del número de copias se tomaron plantas de *Agave tequilana* de diferentes edades (Tabla 4.3). A partir de estas se muestrearon tejidos pertenecientes a hojas basales, hojas de la parte media y hojas de la parte central y se realizó la extracción de ADNg que se utilizó para la determinación del largo del telómero.

Considerando que las plantas especies pertenecientes al género *Agave* desarrollan las hojas en forma de roseta de la parte central hacia afuera, entonces consideramos que las hojas centrales (HC) son las más jóvenes y las definimos como aquellas provenientes de la parte central de la roseta, las cuales eran de color verde-azulado tenue, casi color blanco y generalmente cubierta por otras hojas y éstas se desarrollan a partir del meristemo central. Las hojas medias (HM) son aquellas que se localizaban en la parte intermedia, localizadas entre las hojas basales y centrales de la roseta, con espinas bien desarrolladas hacia la parte terminal, así como laterales. Mientras que las hojas basales (HB) fueron consideradas como las hojas más desarrolladas, las cuales se localizan en la parte más externa de las rosetas y casi cercanas al suelo de color verde-azulado más intenso y con sus espinas laterales desarrolladas de color café oscuro. Además de estos tejidos, se tomaron los hijuelos (H) de cada una de las plantas seleccionadas.

Tabla 4.1 Material vegetal seleccionado a partir de plantas de *A. tequilana* para la estimación del número de copias del ADN telomérico.

Edad de las plantas (años)	Número de plantas	Tejido seleccionado		
		Basal	Hojas Media	Central
0.5	3			
1	3	✓	✓	✓
2	3	✓	✓	✓
3	3	✓	✓	✓

4.2.2 Determinación del número de copias del ADN telomérico

4.2.2.1 Extracción de ADN genómico

Posterior a la colecta las muestras vegetales fueron congeladas en nitrógeno líquido y almacenadas a -80 C hasta su extracción. Las muestras de cada tejido fueron colocadas en un mortero y maceradas hasta obtener un polvo fino utilizando un pistilo y nitrógeno líquido. El ADN genómico fue aislado de cada muestra utilizando el método de CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Doyle y Doyle, 1990) y subsecuentemente purificado con un tratamiento de RNase (New England Biolabs). La concentración del ADN aislado fue medido por espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (Thermo Scientific) en un radio de absorbancia de 260 nm a 280 nm (A_{260}/A_{280}). La integridad de las muestras de ADN fueron confirmadas por electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (p/v).

4.2.2.2 Obtención de fragmentos teloméricos a partir de concatenados

Para la determinación del número de copias del ADN telomérico se procedió a la clonación de fragmentos a partir del concatenado de los cebadores. La amplificación de los fragmentos teloméricos se llevó a cabo por el método propuesto por Ijdo *et al.*, (1991), el cual se describe brevemente a continuación, los fragmentos fueron amplificados por PCR a partir de los iniciadores TEL1F (5'TTAGGG3')₅ y TEL2R (5'CCCTAA3')₅ en una mezcla de reacción que contenía 3.5 mM de MgCl₂, 0.2 mM de dNTPs, 2U de Taq ADN polimerasa, 1x amortiguador de PCR y 1 pmol de los respectivos juegos de cebadores, en un volumen final 50 µl.

Para favorecer la concatenación se realizó una primera amplificación de 10 ciclos que inicia con una desnaturalización a 94°C por 1 min, un alineamiento a 55°C por 30 s y una extensión a 72°C por 1 min, seguida de una segunda amplificación, la cual inicia con una desnaturalización a 94°C durante 4 min, seguida de 30 ciclos de una desnaturalización a 94°C por 1 min, un alineamiento a 60 °C durante 30 s, una extensión a 72°C durante 120 s y una extensión final a 72°C durante 5 min. Los fragmentos generados fueron desplegados a través de una electroforesis en un gel de agarosa al 0.8% (p/v) en amortiguador TAE 1X a 90V durante 45 min.

4.2.2.3. Purificación de amplificadas a partir de gel de agarosa

A partir de la amplificación de los concatenados se procedió a la purificación de los fragmentos. La purificación se realizó con el kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-up System (Promega) de fragmentos de 100, 100-200, 200-400 y 400-600 pb, a partir de gel de agarosa de 1.2% (p/v).

4.2.2.4 Clonación de fragmentos teloméricos

Los fragmentos de interés (100-600 pb) fueron clonados en el vector pGEM T-easy. Los productos purificados fueron ligados en una reacción que contenía 2X buffer de DNA ligasa T4 5 µl, pGEM T-easy 1 µl, producto de PCR 1 µl, DNA ligasa T4 1 µl y se afora a 10 µl con agua destilada o desionizada.

Las mezclas de ligación se transformaron en células de *E. coli* quimiocompetentes. El método de preparación de células competentes y la transformación por choque térmico se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook *et al.*, (2001). Las transformantes se seleccionaron por resistencia a ampicilina (100µg/µl) y por la presencia de colonias blancas. La confirmación de la inserción para cada fragmento en el vector pGEM T-easy se realizó por análisis de transformante con los cebadores Reverso M13-Rev 5'-AACAGCTATGACCARG y derecho M13 -Fwd 5'-GTTTTCCCAGTCACGAC.

4.2.2.5 Secuenciación

Los fragmentos clonados se enviaron a secuenciar a MACROGEN, en Seúl, Corea. Los alineamientos para editar la secuencia del plásmido pGEM-T easy Vector systems se realizaron con el programa Bioedit (Hall, 1999) para la caracterización de la secuencia interna de cada fragmento clonado.

4.2.2.6 Curva estándar para PCR cuantitativa

Como primer paso se realizó una serie de diluciones de los cebadores (10, 1, 0.1, 0.01 picomoles). Posteriormente se realizó una curva estándar a partir ADN plasmídico considerando que cada molécula de pGEM-T contiene un inserto telomérico (3104 y 3115 pb) a partir del cual se calculó el número de copias el cual se relacionó con respecto a la

intensidad de fluorescencia (área bajo la curva). Los valores de intensidad de fluorescencia de cada muestra se interpolaron sobre la curva estándar y el número de copias se calculó de acuerdo al tamaño del genoma de cada variedad analizada considerando que la cantidad de ADN en el genoma nuclear gamético no replicado de *Agave*, 1Cx es de 7.5 pg aproximadamente (Robert *et al.*, 2008). Los valores de Ct (número de ciclo en el cual la fluorescencia alcanza el umbral fijado) fueron graficados contra el logaritmo de la concentración correspondiente. Utilizando ésta curva de calibración se interpoló el valor de Ct de las muestras problemas. Los datos obtenidos se sometieron a regresión lineal y se obtuvo la ecuación lineal: $y=mx+b$ donde: m =pendiente, b = intercepto en el eje y.

4.2.2.7 Amplificación de las secuencias de ADN telomérico mediante PCR cuantitativa.

Para la amplificación mediante PCR en tiempo real de los telómeros se utiliza como molde diferentes concentraciones de ADNg en un volumen de 20 μ L. La mezcla de reacción contenía: 1 μ L Iniciador derecho (10 mM), 1 μ L iniciador reverso (10 mM), 5 μ L Master Mix (2X). Las condiciones para cada ciclo de reacción programada fueron: una desnaturalización inicial a 94°C durante 3 min y 35 ciclos en las siguientes condiciones: 94°C durante 60 seg (desnaturalización), 60°C durante 30 seg (alineamiento), 72°C durante 90 seg (extensión). Al finalizar se efectuó una última extensión a 72°C durante 7 min.

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Obtención de fragmentos teloméricos

Para cuantificar el número de copias del ADN telomérico se realizó un constructo genético que contenía la región telomérica obtenida a partir del concatenado de los cebadores; esto con el objetivo de utilizarlo para realizar una curva estándar para la estimación del número de copias de estas regiones.

Los productos de PCR fueron separados por una electroforesis en un gel de agarosa al 1.2% (p/v) y desarrollada a 85 V para corroborar los tamaños esperados. El tamaño de los

fragmentos obtenidos estuvo en un rango de 200 pb a 10 kb, como se ha reportado anteriormente por Ijdo *et al.*, (1991) (Fig. 4.1).

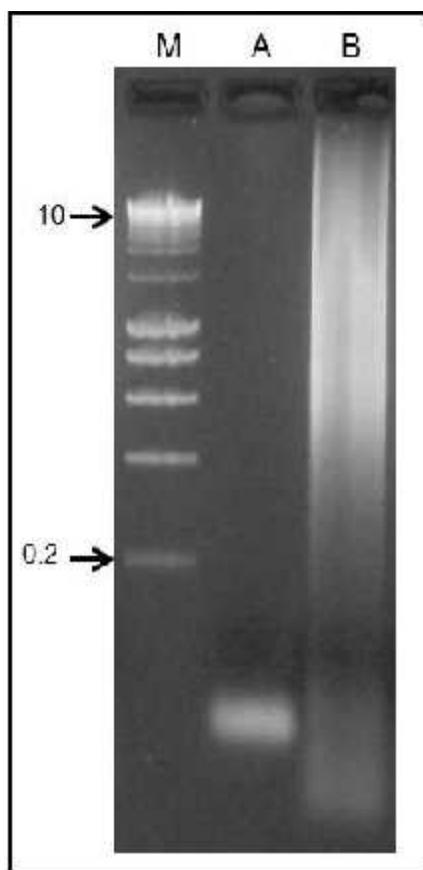


Figura 4.1 Amplificación de los fragmentos teloméricos a partir de la concatenación de los cebadores. Los fragmentos seleccionados fueron aquellos que van desde 200-600 pb. M) Marcador de peso molecular en kb. A) Control negativo. B) Fragmentos generados a partir de la concatenación de los cebadores. M: Marcador de peso molecular en kb.

A partir de este barrido se seleccionaron fragmentos que migraban de 100-600pb (Fig. 4.1B). Las transformantes fueron verificadas por perfil de restricción como se observa en la Figura 18, tomando como referencia los marcadores para estimar los tamaños esperados del vector y el fragmento clonado. Se obtuvieron un total de 30 a 35 transformantes que variaron con respecto al tamaño de inserto y de estas se seleccionaron las clonas que contenía fragmentos estimado entre 100-200 pb, para utilizarlas para la curva estándar (Fig. 4.1B). El análisis de las clonas secuenciadas permitió obtener plásmidos con insertos clonados de 104 y 115 pb, los cuales

posteriormente fueron utilizados para establecer la curva de calibración para la estimación del número de copias (Fig. 4.2).

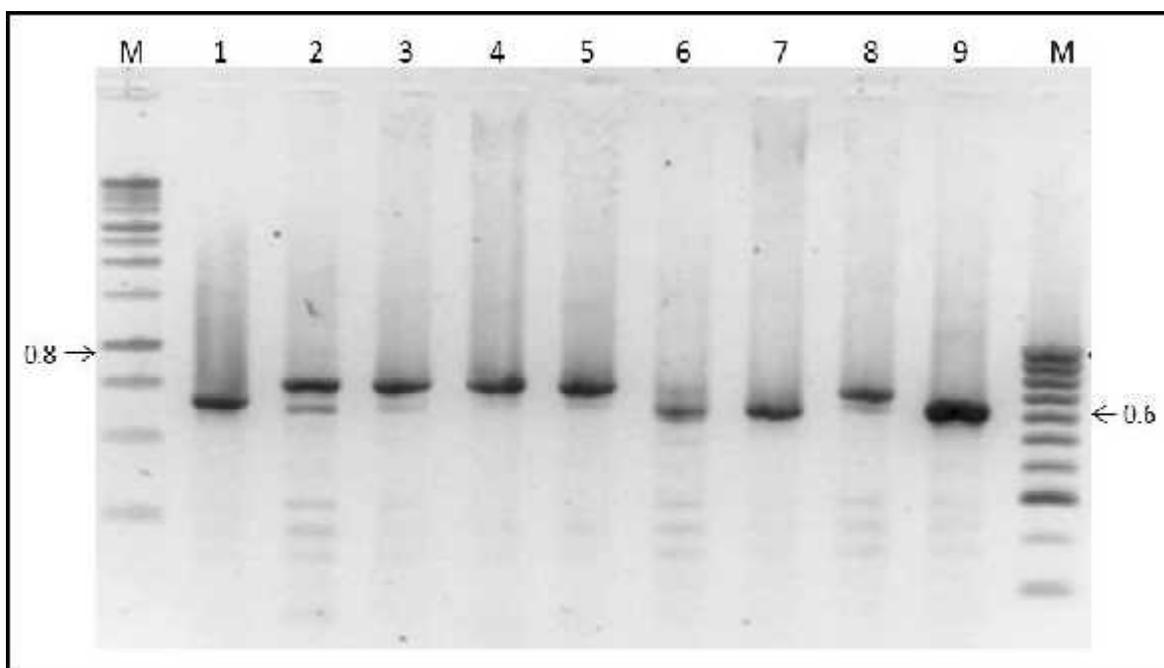


Figura 4.2 Análisis de transformantes en un gel de agarosa al 1.2%. En la figura se muestra el tamaño de fragmento clonado. 1 y 2) Clonas con un inserto de aproximadamente 100 pb. 3-6) Clonas con un tamaño de inserto de aproximadamente 200-400 pb. 7-9) Clonas con insertos de aproximado de 400-600 pb. Marcador de peso molecular en kb.

4.3.2 Estandarización de la técnica de Q-PCR para el cálculo de número de copias en plantas de *Agave tequilana*

Una de las principales limitantes en el cálculo de número de copias para las regiones de ADN telomérico es la concatenación o dimerización de los cebadores, esto debido a que estas regiones son altamente repetidas. En este sentido, para establecer la técnica de Q-PCR para determinar el cálculo del número de copias del ADN telomérico, se procedió a realizar una serie de diluciones de los cebadores para determinar a qué concentración estos no mostraban concatenación. En este sentido se evaluaron cuatro diferentes concentraciones de cebadores (10, 1, 0.1, 0.01 picomoles) en ausencia de templado y cuatro diluciones con 100 ng de ADNg.

Los resultados mostraron una curva de amplificación en las concentraciones de 10, 1 y 0.1 picomoles en ausencia de ADN_g como templado. En este caso las curvas generadas correspondían a los amplicones que se formaron debido a la concatenación de los cebadores (Fig. 4.3A). Al analizar las curvas de fusión, estas mostraron la existencia de múltiples picos en diferentes temperaturas, y en algunos casos hasta más de dos picos dentro de una misma muestra (Fig. 4.3B). La presencia de más de un pico indica la existencia de dimerización o concatenación de los cebadores, que ocasionan la sobrestimación de la cuantificación del número de copias. Por otra parte, al utilizar la concentración más baja de cebadores (0.01 picomoles) no se observaron productos amplificados (Fig. 4.3A).

Para confirmar que los productos con la menor concentración no presentaran un producto de amplificación, las muestras obtenidas fueron analizadas en un gel de agarosa (Fig. 4.4). En este caso se corroboró que las concentraciones de 10, 1 y 0.1 picomoles generan productos amplificados que van desde 200 pb hasta más de 10 kb en ausencia de ADN_g utilizado como templado (Fig. 4.4). En la concentración más baja de cebador (0.01 picomoles) no se observó la amplificación de fragmentos (Fig. 4.4).

Esto pone de manifiesto que las concentraciones de cebadores de 10, 1 y 0.1 picomoles presentaron dimerización o concatenación, por lo que estas concentraciones no son factibles para la cuantificación del número de copias. Mientras que la concentración más baja (0.01 picomoles), en donde no se observó amplificación de fragmento puede ser utilizada para determinar el número de copias mediante Q-PCR específicos de ADN telomérico.

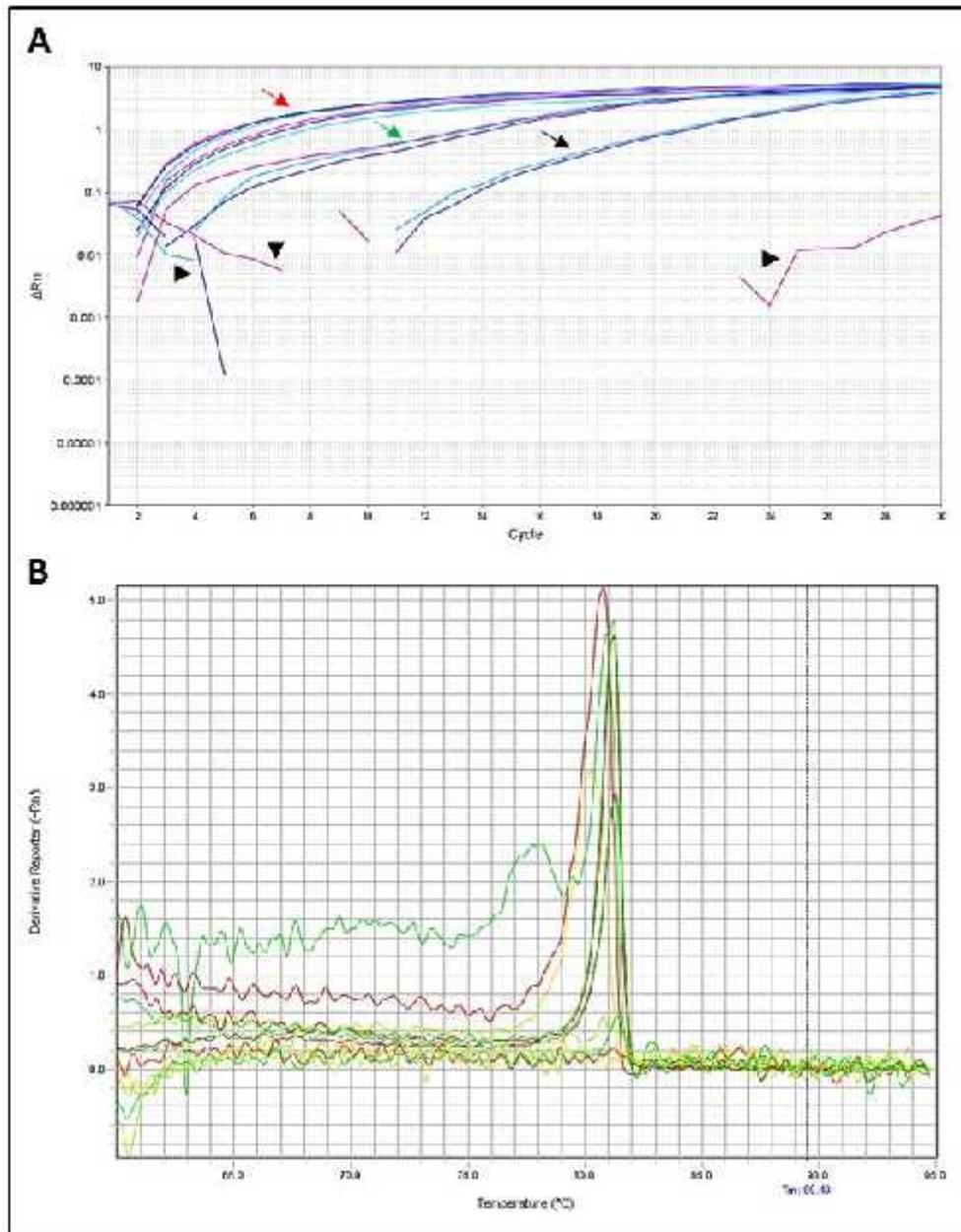


Figura 4.3 Gráficas de las amplificaciones obtenidas a partir de la concatenación de los cebadores teloméricos. A) Curvas de amplificación generadas por la concatenación de los cebadores teloméricos utilizando diferentes concentraciones: 10 pmol (flecha roja), 1 pmol (flecha verde), 0.1 pmol (flecha negra) y 0.01 pmol (cabezas de flecha). B) Curvas de fusión obtenidas por la concatenación de los cebadores utilizados para la amplificación del ADN telomérico. Cada pico generado representa un amplicón, y en algunos casos se pueden observar más de un pico que representa dos amplicones por muestra detectado por el equipo debido a la concatenación de los cebadores.

Posteriormente se realizó nuevamente la amplificación de fragmentos de ADN telomérico utilizando las mismas concentraciones de cebadores (10, 1, 0.1 y 0.01 picomoles), pero en este caso se utilizaron 100 ng de ADNg como templado (Fig. 4.4). Los resultados mostraron que en las concentraciones de cebadores de 10, 1 y 0.1 picomoles se observó un comportamiento muy similar a lo encontrado en las amplificaciones obtenidas en ausencia de ADNg como templado (concatenación o dimerización de cebadores) (Fig. 4.4).

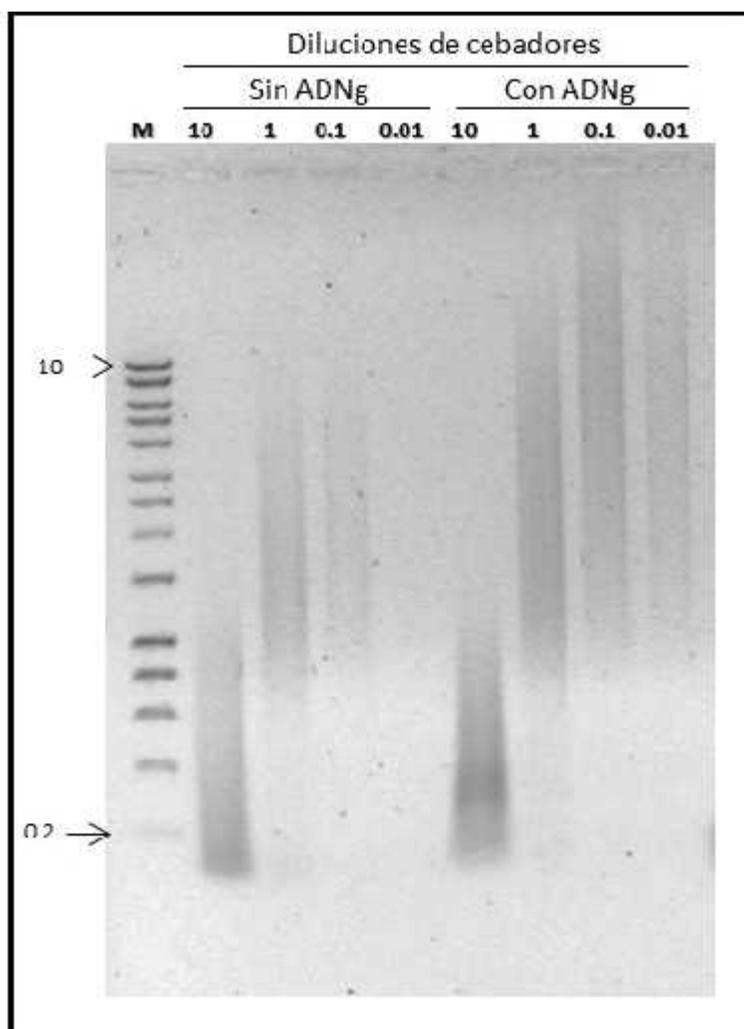


Figura 4.4 Amplificación de fragmentos teloméricos en *A. tequilana* utilizando diferentes concentraciones de cebadores. Los fragmentos obtenidos corresponden a amplificados generados por concatenaciones de los cebadores, así como fragmentos específicos de ADN telomérico. M: Marcador de peso molecular en kb.

En este sentido, dichas concentraciones de cebadores no pueden ser utilizadas debido a que no se puede determinar si los fragmentos generados pertenecen a la concatenación de los cebadores, o los fragmentos específicos de ADN telomérico. Mientras que en la concentración más baja de cebadores (0.01 picomoles) con 100ng de ADNg como templado, se observaron amplificadas que corresponden a fragmentos específicos de ADN telomérico (Fig. 4.4).

En general se observó que a mayor concentración de cebadores éstos presentan concatenación o dimerización. En la concentración de 0.01 picomoles no se observó concatenación en ausencia de ADNg (Fig. 4.5A y B). Cuando se utiliza esta misma concentración pero con templado de ADNg éstos si permitieron la amplificación específica de fragmentos teloméricos (Fig. 4.5A y B). Una vez establecidas las condiciones óptimas para el cálculo del número de copias se procedió a realizar los experimentos correspondientes.

4.3.3 Número de copias en diferentes tejidos de *Agave tequilana*

Para determinar el número de copias de ADN telomérico por PCR-Q se analizaron muestras de hoja basal, media y central de plantas de diferentes edades (6 meses a 3 años) mantenidas en condiciones de invernadero. Para lo cual se utilizó una concentración de 100ng de ADNg con 0.01 picomoles de cebadores como se determinó en experimentos anteriores. Cada muestra fue evaluada por triplicado para verificar los datos. Los resultados obtenidos mostraron la presencia de un solo pico en las curvas de fusión y en las gráficas de amplificación para cada una de las muestras analizadas, indicando la presencia de fragmento específicos de ADN telomérico (Fig. 4.6). A partir de estos valores se procedió a realizar la estimación del número de copias del ADN telomérico.

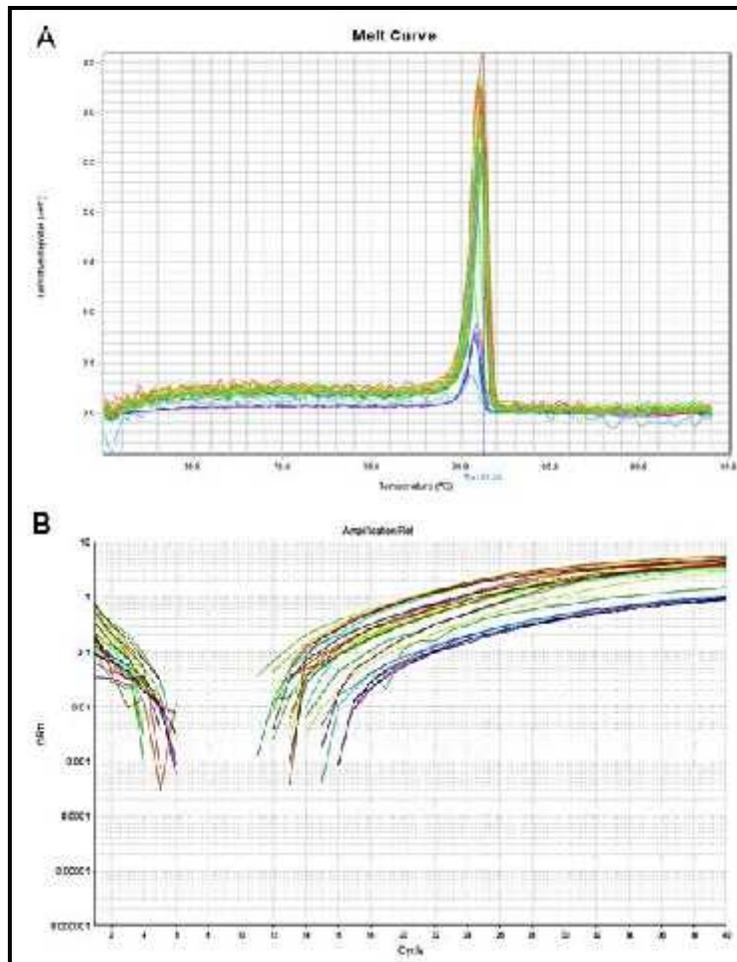


Figura 4.5 Amplificación de fragmentos específicos de ADN telomérico mediante PCR cuantitativa utilizados para la cuantificación del número de copias. A) Curva de fusión mostrando un solo pico de amplificación para cada muestra analizada. B) Curvas de amplificación generadas por los fragmentos de ADN telomérico.

Los resultados obtenidos mostraron que existe una variación en el número de copias durante el desarrollo, tipo de tejido y la edad de las plantas (Tabla 4.2) (Fig. 4.6). En este sentido el menor número de copias se presentó en aquellas plantas de seis meses mantenidas en el invernadero, en comparación de las plantas de uno, dos y tres años (Tabla 4.2) (Fig. 4.6). Las plantas de un año de aclimatación fueron las que presentaron mayor número de copias en comparación con otras edades analizadas (Fig. 4.6). Un comportamiento muy similar fue observado mediante el análisis de TRFL en secciones anteriores, en donde encontramos una variación en la longitud telomérica dependiendo del tejido analizado y la edad de la planta.

Tabla 4.2 Número de copias de ADN telomérico en diferentes tejidos de plantas aclimatadas de *A. tequilana*. P6MHB) Hoja basal (seis meses). P6MHM) Hoja media (seis meses). P6MHC) Hoja central (seis meses). P1HB) Hoja basal (un año). P1HM) Hoja media (un año). P1HC) Hoja central (un año). P2HB) Hoja basal (dos años). P2HM) Hoja basal (dos años). P2HC) Hoja central (dos años). P3HB) Hoja basal (tres años). P3HM) Hoja media (tres años). P3HC) Hoja central (tres años).

Muestra	CT	log copias	Copias	copias/ng	copias/genoma poliploide	copias/genoma haploide
P6MHB	16.6	8.79	6.21E+08	4.68E+07	7.02E+05	3.51E+05
P6MHM	16.2	8.92	8.26E+08	6.23E+07	9.35E+05	4.67E+05
P6MHC	15.8	9.04	1.10E+09	8.29E+07	1.24E+06	6.22E+05
P1HB	14.8	9.35	2.25E+09	1.69E+08	2.54E+06	1.27E+06
P1HM	14.5	9.44	2.78E+09	2.10E+08	3.15E+06	1.57E+06
P1HC	14.3	9.51	3.21E+09	2.42E+08	3.63E+06	1.82E+06
P2HB	14.7	9.38	2.41E+09	1.82E+08	2.73E+06	1.36E+06
P2HM	14.5	9.44	2.78E+09	2.10E+08	3.15E+06	1.57E+06
P3HB	14.4	9.48	2.99E+09	2.25E+08	3.38E+06	1.69E+06
P3HM	15.2	9.23	1.69E+09	1.27E+08	1.91E+06	9.55E+05
P3HC	14.95	9.30	2.02E+09	1.52E+08	2.28E+06	1.14E+06

El número de copias por tipo de tejidos (hoja basal, media y central) reveló que las hojas basales (hojas viejas o más desarrolladas) presentaba menor número de copias de ADN telomérico, en comparación las hojas medias (hoja madura), y ésta a su vez presentaba menor número de copias que las hojas centrales (hoja joven o de reciente formación) (Tabla 4) (Fig. 4.6), lo que indica una variación alrededor del desarrollo, en donde los tejidos más jóvenes fueron los que presentaron mayor número de copias, un comportamiento similar al observado en los resultados obtenidos con la TRFL (Fig. 4.6).

En general una tendencia en cuanto al número de copias fue en este sentido hoja central > hoja media > hoja basal. Este comportamiento es similar al encontrado mediante la técnica de TRF, en donde los análisis mostraron la misma tendencia. Se puede concluir que la técnica de PCR cuantitativa puede ser utilizada para inferir de manera más rápida la variación o dinámica de las regiones telomérica en las especies de *Agave*.

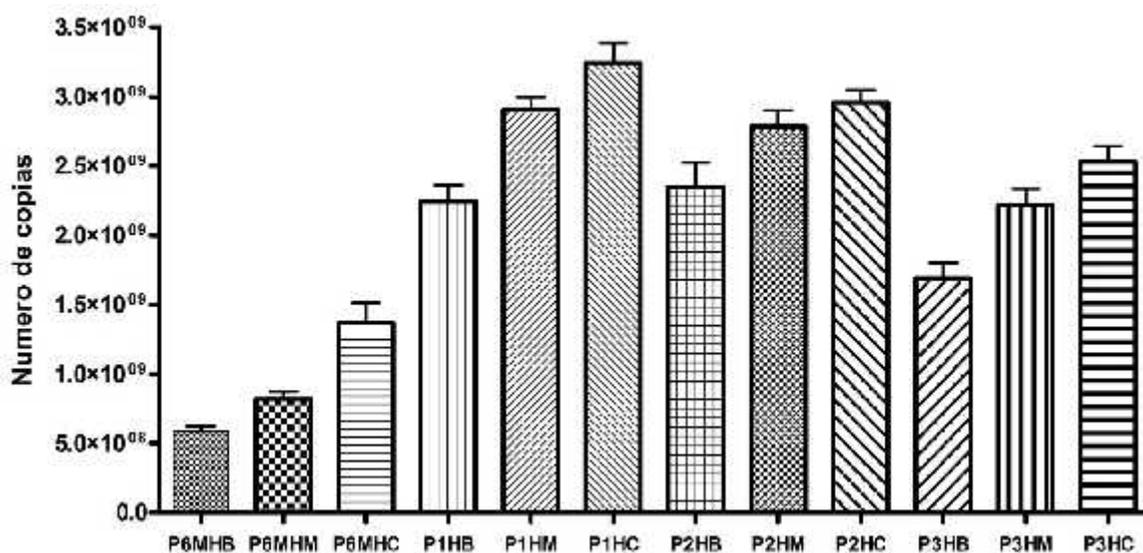


Figura 4.6 Estimación del número de copias de ADN telomérico en diferentes hojas de plantas mantenidas en invernadero de *A. tequilana*. P6MHB) Hoja basal de planta de seis meses. P6MHM) Hoja media de planta de seis meses. P6MHC) Hoja central de planta de seis meses. P1HB) Hoja basal de una planta de un año. P1HM) Hoja media de una planta de un año. P1HC) Hoja central de una planta de un año. P2HB) Hoja basal de una planta de dos años. P2HM) Hoja media de una planta de dos años. P2HC) Hoja central de una planta de dos años. P3HB) Hoja basal de una planta de tres años. P3HM) Hoja media de una planta de tres años. P3HC) Hoja central de una planta de tres años.

4.4 DISCUSIÓN

A pesar de que la técnica de PCR-Q es una herramienta utilizada en la determinación de copias de varios genes (Cheng *et al.*, 2011; Lin y Lai, 2010; Iskander, 2004), ha sido poco utilizada para secuencias altamente repetidas, como es el caso del ADN telomérico, esto debido al diseño de los cebadores que pueden presentar concatenación o dimerización durante el proceso de PCR, impidiendo la obtención de amplificadores específicos del ADN telomérico, de manera que la estimación del número de copias puede verse sobreestimada y por lo tanto no es real (O'Callaghan y Fenech, 2011; O'Callaghan *et al.*, 2008). Ijdo *et al.*, 1991 mencionan que a mayor concentración de cebadores específicos para las regiones teloméricas es posible observar fragmentos de menor tamaño y que a menor concentración estos amplicones pueden ser mayores a 10 Kb. En este trabajo mostramos que realizando una serie de diluciones podemos minimizar este efecto, permitiendo el desarrollo de estas metodologías y su aplicación en las especies de *Agave*.

Los análisis de la PCR cuantitativa permitieron demostrar que el menor número de copias se presentó en los tejidos más desarrollados en comparación con los tejidos jóvenes. Estudios del número copias en cebada determinada por dot blot, encontraron que los tejidos más jóvenes como embriones e inflorescencias inmaduras presentaron mayor número de copias que los tejidos más diferenciados como las inflorescencias maduras y las hojas (Kilian *et al.*, 1995).

La longitud telomérica ha sido asociada con la diferenciación celular (Riha *et al.*, 1998). Una disminución de la longitud de los TRF durante la diferenciación y el desarrollo ha sido observada en *Hordeum vulgare* (Kilian *et al.*, 1995) y en *Pinus sylvestris* (Aronen and Ryyänänen, 2012), en las cuales se observó que los tejidos inmaduros presentaron mayor longitud telomérica que aquellos tejidos más diferenciados o maduros. Por el contrario, en *Ginkgo biloba*, los tejidos diferenciados como hojas y ramas presentaban mayor longitud que los tejidos de macrosporas y embriones (Liu *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos indican que el número de copias varía con el desarrollo y la edad en las plantas, al menos durante el proceso de aclimatación como se mostró mediante los análisis de TRFL, sugiriendo que posiblemente exista un balance entre la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa. En maíz y cebada, la actividad de la telomerasa es suprimida progresivamente durante la diferenciación de los tejidos (Autexier, 2006; Kilian *et al.*, 1998), por lo que, en ausencia de ésta la longitud de los telómeros se acorta con cada ciclo de división celular, debido al problema de la replicación de los telómeros (Kilian *et al.*, 1995; Biessmann, 1990).

El número de copias en los diferentes tipos de hoja (basal, media y central) reveló que las hojas centrales presentaron el mayor número copias en todas las edades estudiadas, comparado con hojas medias y basales (Fig. 4.6). En *Ginkgo biloba*, no se observó diferencias significativas en la longitud de los TRF en hojas de diferentes ramas, aún dentro del mismo árbol (Liu *et al.*, 2007), mientras que en *Pinus tabulaeformis* esta longitud fue más corta en las hojas nuevas que en las hojas viejas (Mu *et al.*, 2015).

Es posible que en plantas perennes herbáceas como *Agave*, el balance entre la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa o algún mecanismo de alargamiento alternativo del telómero (ALT, por sus siglas en inglés) u otro factor involucrado en la

división celular permita mantener la dinámica del ADN telomérico sobre el desarrollo y la edad.

4.5 CONCLUSIONES

La técnica de q-PCR es una herramienta que permite estimar el número de copias en las especies de *Agave*. En este sentido encontramos que el mayor número de copias presentó una tendencia similar a lo encontrado con la técnica de TRFL caracterizado previamente.

CAPÍTULO V

4. DISCUSIÓN GENERAL

4.1 Dinámica de la longitud telomérica durante la transición de *in vitro* a *ex vitro*

Los estudio *in vivo* e *in vitro* han demostrado en diferentes organismos, incluyendo las plantas, que existe una relación entre la reducción progresiva en el número de repeticiones teloméricas y la actividad de telomerasa con la edad, el desarrollo, la diferenciación y el tipo de tejido en varias especies vegetales (Aronen y Ryyänen, 2014; 2012; Riha *et al.*, 2010; Fajkus *et al.*, 1998; Riha *et al.*, 1998; Fitzgerald *et al.*, 1996; Kilian *et al.*, 1995).

En *Agave*, hasta el momento se sabe que el motivo repetido es del tipo reportado en humanos (TTAGGG), y que éste se originó por una mutación puntual en el cebador de ARN utilizado como templado por la enzima telomerasa (Sýkorová *et al.*, 2006; 2003; Rotková *et al.*, 2004; Fay *et al.*, 2000). Hasta el momento no existe información sobre la dinámica de la longitud de los telómeros (acortamiento y elongación) en sistemas *in vitro*, invernadero y campo, así como sus implicaciones en el desarrollo y la edad en las especies de agaves.

En este trabajo mostramos que la longitud telomérica se acorta durante el proceso de transición de *in vitro* a *ex vitro*, durante los seis primeros meses de aclimatación y un restablecimiento en el primer año en el invernadero, el cual se mantiene en las plantas de dos y tres años. Los trabajos reportados se han centrado en estudiar la longitud de los telómeros durante el cultivo de tejidos (Aronen y Ryyänen, 2014; Riha *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1998; Kilian *et al.*, 1995), pero no existe información sobre el efecto en la longitud telomérica ocasionados por la fase de aclimatación.

La aclimatación es un paso importante en la micropropagación, en donde se llevan a cabo el desarrollo de unidades funcionales, como el desarrollo de nuevas hojas, la funcionalidad de estomas y raíces, la formación de ceras epicuticular y estructuras papilares (Monja-Mio *et al.*, 2015; Pospíšilová *et al.*, 1999). Además, durante esta fase, ocurren cambios microambientales, tales como una disminución en la humedad relativa, incremento en el CO₂ atmosférico, incremento en la radiación natural, entre otros, que

pueden generar un periodo de estrés, el cual puede determinar la sobrevivencia de las plantas (Pospíšilová *et al.*, 1999; Tichá *et al.*, 1999).

Existen reportes que relacionan una disminución en la longitud de los telómeros por diferentes tipos de estrés como: el oxidativo (Serra *et al.*, 2000), radiación UV (Kawanishi y Oikawa, 2004), genotóxico (Riha *et al.*, 2002). De manera general se ha observado que el incremento del estrés puede acelerar el acortamiento gradual de los telómeros u ocasionar rupturas dentro de estas regiones, que afectan el funcionamiento celular (Epel *et al.*, 2004; Kawanishi y Oikawa, 2004; Rubion *et al.*, 2004).

La resistencia a estos tipos de estrés depende en parte, de la capacidad de la telomerasa o algún mecanismo alternativo para mantener y elongar los telómeros acortados durante este proceso, mediante una activación o aumento en su actividad, lo cual a su vez permita mantener la homeostasis de esta región (Rubio *et al.*, 2004). Es posible que en *Agave* la sobrevivencia de las plantas durante el proceso de *in vitro* a *ex vitro* pueda estar dada por esta dinámica de alargamiento vía una activación de la telomerasa o un mecanismo alternativo.

4.2 Comportamiento de la longitud telomérica en diferentes tejido (hojas tallo y raíces) y la edad durante el proceso de aclimatación

En las plantas los procesos de desarrollo y la edad presentan diferencias con respecto a los animales, ya que han adoptado diferentes estrategias en sus ciclos de vida. Sin embargo, el concepto y los mecanismos que afectan el envejecimiento en animales, también pueden ser aplicados en plantas (Watson y Riha, 2010; McKnight *et al.*, 2002). En este sentido, sabemos que la biología y función de los telómeros en los organismos vegetales es similar a otros organismos vivos, lo que pone de manifiesto la relevancia de su estudio (Watson y Riha, 2010; McKnight *et al.*, 2002; Riha *et al.*, 1998).

En *Agave* la longitud telomérica es tejido específica (hoja basal de 11.9-25.9 kb, hoja media de 15.2-26.2 kb, hoja central de 17-28.8 kb, el tallo de 22-31 kb y la raíz entre 12.3-27.6 kb) y depende de la edad y el desarrollo de la planta, en este sentido: raíz < hoja basal < hoja media < hoja central < tallo dentro de una sola planta (Shippen y McKnight, 1998), siendo los tejidos más jóvenes los que presentaron la mayor longitud, la cual se

acorta durante el incremento de la edad en las plantas de 1-3 años durante el proceso de aclimatación.

Este comportamiento ha sido observado en diferentes especies como *Hordeum vulgare* (Kilian *et al.*, 1995) y en *Pinus silvestris* (Aronen y Ryyänen, 2012) en donde se encontró que la longitud de los telómeros se acortaba con el incremento en el desarrollo y la edad, ya que los tejidos más jóvenes o en etapas tempranas de desarrollo como macrósporas, cambium vascular, yemas, embriones e inflorescencia presentaban una mayor longitud en comparación de las hojas, tallo, raíces, ramas, acículas, embriones e inflorescencias maduras (Aronen y Ryyänen, 2012; Kilian *et al.*, 1995). En *M. álbum* no se observaron diferencias alrededor del desarrollo en esta especie (Riha *et al.*, 1998). En *Gynkgo biloba* un proceso opuesto fue observado, ya que a pesar de observar diferencias en la longitud de los telómeros durante el desarrollo, éste incrementaba con la diferenciación de los tejidos (Liu *et al.*, 2007).

Los cambios en los TRFL en las plantas aclimatas durante la edad y el desarrollo sugiere que podría ser posiblemente un balance entre la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa o algún mecanismos alternativo. La enzima ha sido encontrada en diversas especies, lo que han permitido demostrar la relación entre la longitud telomérica y su actividad (Mu *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2004; Kilian *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1996).

Específicamente en maíz y cebada se ha reportado que la actividad de la telomerasa es suprimida progresivamente durante la diferenciación de los tejidos (Kilian *et al.*, 1998); similar a lo que se ha reportado en células humanas, en donde la actividad de esta enzima ésta restringida a los tejidos germinales o con capacidad regenerativa (Bacchetti 1996), y en ausencia de la telomerasa, la longitud de los telómeros podría acortarse con cada ciclo de división celular, debido al llamado problema de replicación de los extremos (Kilian *et al.*, 1998; 1995).

4.3 Dinámica de la longitud telomérica durante la edad en plantas de campo de *Agave tequilana*

Algunas preguntas de la investigación biológica, se centran en entender que factores limitan el tiempo de vida y cuáles son las causas del detrimento de los organismos que

conlleven al envejecimiento (Kirkwood, 2002). Este último es un proceso complejo que se caracteriza por un deterioro a lo largo del tiempo, el cual da como resultado un incremento en la susceptibilidad a las enfermedades, cambios fisiológicos, reducción en la fertilidad y un incremento en la mortalidad (Nigam, 2011). Este proceso es inducido por diferentes señales como: la acumulación de daños estocásticos en el ácido desoxirribonucleico (ADN), en las proteínas y en otras macromoléculas (Watson y Riha, 2010; Thomas, 2002). Una señal que recientemente ha tomado relevancia es el acortamiento de secuencias de ADN telomérico, que cuando se acortan durante el desarrollo de la vida afectan las funciones biológicas de la célula y por consiguiente las del organismo (Flanary y Kletetsschaka, 2005; Hayflick, 1961).

En los agaves hasta ahora no existe información sobre el comportamiento de la longitud de los telómeros y la edad. Estas son especies herbáceas, perennes y sus hojas están dispuestas en espiral y arregladas en rosetas en el ápice de un tallo, por lo que el desarrollo de sus hojas está bien delimitado de la parte central de la roseta hacia afuera, en donde las hojas maduras o senescentes se localizan en la base de la roseta, con un recambio continuo de estas a lo largo de su desarrollo (Rocha *et al.*, 2006; Gentry, 1982).

La comparación de los TRFL en las hojas mostró que variaban con el desarrollo, en donde las hojas centrales fueron las que presentaron mayor longitud, en comparación a las hojas medias y basales, muy similar a las plantas de invernadero de seis meses a tres años de aclimatación; y una estabilidad a lo largo de la edad (1-6 años).

Cambios alrededor del desarrollo de los tejidos han sido reportados en varias especies como *Hordeum vulgare* (Kilian *et al.*, 1995) y *Pynus silvestris* (Aronen y Ryyänänen, 2012). En *Ginkgo biloba*, los análisis de TRFL no mostraron cambios en la longitud de los telómeros en hojas de diferentes ramas, aun dentro del mismo árbol (Liu *et al.*, 2007), mientras que en *Pinus tabulaeformis* la longitud telomérica fue más corta en las hojas nuevas en comparación a las hojas viejas (Mu *et al.*, 2015). A diferencia de *Agave*, las especies de *Ginkgo biloba* son deciduas y un acortamiento drástico de los TRFL ocurre en otoño, por lo que el acortamiento de los telómeros puede ser una señal que forma parte de un proceso de apoptosis hacia la parte final de la estación, que permite el recambio de sus hojas (Aronen y Ryyänänen, 2012; Liu *et al.*, 2007).

En este trabajo observamos un ligero patrón de acortamiento y elongación de los telómeros por tipo de hoja analizado. En *Pinus longaeva* (Flanary y Kletetschka, 2005), *Ginkgo biloba* (Liu *et al.*, 2010; 2007) y *Pinus tabulaeformis* (Mu *et al.*, 2015) la longitud de los TRF presentaba patrones cíclicos de alargamiento y acortamiento durante el desarrollo y el ciclo de vida en estas plantas.

Es posible que el incremento o mantenimiento de la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa puede influir de manera directa o indirecta en el incremento o expectativa de vida (Liu *et al.*, 2010; 2007; Flanary y Kletetschka 2005). McKnight *et al.*, (2002) sugieren que es posible que la longitud de los telómeros es más estable en dicotiledóneas que en monocotiledóneas y los resultados encontrados en *Agave* coinciden con esta idea.

En general en *Agave* encontramos una variación de la longitud de los TRFL dependiendo del tejido analizado y el desarrollo, aun dentro de la misma planta y una tendencia hacia la estabilidad alrededor de la edad. En *Agave tequilana* la magnitud del acortamiento de los telómeros sugiere que éste puede ser el óptimo para mantener la homeostasis en estas regiones. Es posible que en plantas perennes y herbáceas como *Agave* el balance entre la longitud de los telómeros y la actividad de la telomerasa o algún mecanismo ALT (alargamiento alternativo del telómero) u otro factor involucrado en la división celular permita mantener la estabilidad de la planta sobre el desarrollo y la edad.

4.4 Longitud telomérica en plantas de *Agave tequilana* y *Agave fourcroydes* en condiciones de invernadero

En este trabajo analizamos la longitud de los repetidos teloméricos en dos especies de *Agave* (*A. fourcroydes* y *A. tequilana*) mantenidos durante tres años en condiciones *ex vitro*. De acuerdo a nuestros resultados observamos que el tamaño de los telómeros va de 23.1-30.1 kb en *A. fourcroydes* y de 23.1-26.4 kb en *A. tequilana*.

La longitud del ADN telomérico varia ampliamente entre los diferentes organismos, en animales puede estar en un rango que va desde menos de 50 nucleótidos en el caso de algunos ciliados, hasta más de 100 kb como en roedores (Shippen y Macknighth, 1998). En las plantas la longitud presenta un amplio rango entre las especies que va desde 2 kb a

más de 150 kb, como se ha observado en tabaco (Heacock *et al.*, 2004; Shippen y Macknigh, 1998; Kilian *et al.*, 1996), variedades e individuos de una misma especie, como el caso de maíz en donde esta longitud puede ir de 1.8 kb en la línea WF9 a 40 kb en la línea CM37 (Burr *et al.*, 1992).

En este sentido, la longitud encontrada para *A. fourcroydes* y *A. tequilana* es mayor a lo reportado en otras especies de angiospermas como *Prunus yedoensis* y *Malus domestica* que tiene una longitud aproximada de 2-6 kb y 2-7 kb respectivamente (Moriguchi *et al.*, 2007); pero más corto que *Carica papaya*, en donde se ha observado una longitud de 25-50 kb (Shakirov *et al.*, 2008).

4.5 Análisis de la longitud telomérica durante la inducción organogénica de *A. fourcroydes* y *A. tequilana*

Existen pocos reportes que relacionen el efecto del cultivo de tejidos con la longitud de los telómeros en las plantas (Aronen y Ryyänen, 2014; Di *et al.*, 2007; Riha *et al.*, 1998; Kilian *et al.*, 1995; Broun *et al.*, 1992). En este estudio mostramos que la TRFL se incrementó de manera gradual a lo largo del tiempo durante el proceso organogénico en ambas especies en un rango que va en el caso de *A. fourcroydes* 22.8 kb hasta 50.8 kb, mientras que en *A. tequilana* fue de 27.5 kb a 37.8 kb.

En *Melandrium album* se observó que la longitud de los telómeros se extendía hasta 6.5 kb 3 meses después de la inducción, (Riha *et al.*, 1998). Un incremento hasta más de 250 también ha sido reportada en *Hordeum vulgare* en los callos mantenidos hasta un año en el cultivo (Kilian *et al.*, 1995). Di *et al.*, (2007) en *Ginkgo biloba* determinaron que la longitud telomérica del callo embriogénico fue ligeramente mayor (4.7 kb) en comparación a la longitud de los telómeros de los embriones utilizados como explantes iniciales (4.3 kb), mientras que en *Betula pendula*, se reportó un acortamiento de los telómeros en los callos generados durante el cultivo *in vitro* (Aronen y Ryyänen, 2014).

El cultivo *in vitro* permite la regeneración de una planta a partir de un explante cultivado en un medio artificial, e incubado en condiciones ambientales controladas (Engelmann, 1991). En donde la regeneración de plantas se basa en la capacidad de las células para redirigir el desarrollo, recuperando la totipotencialidad o la pluripotencia, perdiendo al

menos una parte del programa genético y epigenético (De Klerk, 2009; Xu *et al.*, 2004). Este representa un momento de estrés, que puede desencadenar cambios genéticos (expresión de los genes requerida para el desarrollo) y epigenéticos, los cuales pueden ejercer efectos sobre el control de la división celular y la desdiferenciación, alterando la estructura de la cromatina (Smulders y Klerk, 2010; Xu *et al.*, 2004; Hecht *et al.*, 2001).

Es posible que estos procesos permitan activar de manera directa o indirecta algún mecanismo de elongación de los telómeros. La dinámica de la longitud de los telómeros (acortamiento o elongación) está relacionada con una activación o inactivación de la telomerasa (Riha *et al.*, 2010; Fitzgerald *et al.*, 1996). La presencia de la enzima ha sido encontrada en diversas especies, lo que ha permitido observar la relación directa entre la longitud telomérica y la actividad de la enzima (Mu *et al.*, 2014; Liang *et al.*, 2004; Kilian *et al.*, 1998; Fajkus *et al.*, 1996), lo cual puede contribuir a que la longitud de los telómeros pueda mantenerse y hasta expandirse a lo largo del tiempo (Fajkus *et al.*, 1996; Heller *et al.*, 1996; Kilian *et al.*, 1995). Lo anterior puede explicar el aumento de la longitud de los telómeros durante el proceso organogénico en las especies de *A. fourcroydes* y *A. tequilana*. En general estos resultados dan mayor soporte a la idea de que cada especie mantiene una longitud específica durante el desarrollo, la diferenciación y la edad, aun en los sistemas *in vitro*.

CAPÍTULO VI

CONCLUSIONES GENERALES

5.1 CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1.1 Conclusiones

1. La longitud telomérica durante la transición de *in vitro* a *ex vitro*, se acortó durante los primeros seis meses de aclimatación (12 kb), en comparación con las plantas mantenidas en cultivo *in vitro*.
2. Los análisis de los TRF revelaron que durante el proceso de aclimatación ocurrió un incremento o restablecimiento de la longitud de los telómeros durante el primer año de aclimatación (9 kb).
3. La dinámica de la longitud de los telómeros reveló que ésta varía de 11.9 kb a 28.8 kb dependiendo del tipo de tejidos (hojas, tallo y raíces) y la edad de la planta analizada durante el proceso de aclimatación.
4. Existió una tendencia hacia el acortamiento de los TRFL de acuerdo con la edad de las plantas creciendo en condiciones de invernadero (1-3 años).
5. En las plantas mantenidas en condiciones de campo se observó que los tejidos más jóvenes (hojas centrales) presentaron una mayor longitud en comparación con las hojas medias y basales, similar a lo observado en las plantas creciendo en el invernadero.
6. Existió una estabilidad en la longitud de los telómeros en las plantas de campo, con patrones de acortamiento y elongación que mantuvieron esta longitud.
7. La comparación de los TRFL entre diferentes tejidos (hojas, tallo y raíces) en *Agave fourcroydes* y *Agave tequilana* demostró que cada especie presenta una longitud específica de la longitud telomérica.

8. La longitud de los telómeros aumentó de manera gradual durante el proceso de organogénesis en ambas especies de *Agave*, con un incremento más drástico a las ocho semanas de evaluación en *Agave fourcroydes* en comparación de *Agave tequilana*.
9. Un incremento significativo en la TRFL durante el proceso organogénico fue observado en la semana cuatro de la inducción, lo cual coincide con la presencia de los nuevos brotes.

5.1.2 Perspectivas

1. Los resultados mostraron que la longitud telomérica se acortó durante la transición de *in vitro* a *ex vitro*, pero se debe demostrar que proceso o mecanismo se está llevando a cabo en este acortamiento, por lo que estudios de regulación a nivel genético y epigenético de la enzima telomerasa son necesarios para determinar su influencia durante este proceso.
2. Se observó que durante el primer año de aclimatación se restableció la longitud de los telómeros, pero el mecanismo involucrado en este mantenimiento debe ser estudiado, sobre todo aquellos que involucren la actividad de la enzima telomerasa, mediante análisis de PETRA o TRAP, o de regulación de las proteínas involucradas durante el proceso de elongación del ADN telomérico.
3. Aquí mostramos que la longitud de los telómeros depende del tejido y la edad de la planta, tanto en invernadero como en campo, pero cómo se mantiene esta longitud durante el desarrollo y alrededor de la edad tiene que ser evaluado, por lo que estudios de regulación de las proteínas como POT, TRF o RAP involucradas en la formación del telosoma o el complejo Shelterin que mantiene el ADN telomérico pueden llevarse a cabo.
4. En este estudio determinamos que la longitud del ADN telomérico es especie específica y que cada una de ellas mantiene un óptimo, pero como mantienen esta longitud no ha sido demostrado en las especies de *Agaves*, por lo que estudios

sobre la caracterización *in silico* de la telomerasa, así como la actividad de esta enzima mediante la expresión del gen por PCR-Q o ensayo TRAP podrían ser realizados

5. La evaluación de la TRFL durante el proceso organogénico en dos especies de *Agave* mostró que en ambas especies incrementa la longitud, pero a qué se debe esta elongación aun no es claro, por lo que estudios sobre la actividad de la telomerasa o un mecanismo alternativo de elongación del ADN telomérico (ALT), así como el efecto de los reguladores de crecimiento (auxinas) durante este proceso son necesarios para entender mejor este proceso.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, S. P., Hartman T. P., Lim K. Y., Chase M. W., Bennett M. D., Leitch I. J., and Leitch A. R (2001). Loss and recovery of *Arabidopsis*-type telomere repeat sequences 5-(TTTAGGG)(n)-3 in the evolution of a major radiation of flowering plants. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences.* 268, 1541-1546.
- Arnaud, Y., Franclet A., Tranvan H. and Jacques M (1993). Micropropagation and rejuvenation of *Sequoia sempervirens*: a review. *Annals of Forest Science.* 50, 173-275.
- Aronen, T. and Rynänen L (2014). Silver birch telomeres shorten in tissue culture. *Tree genetics and genomes.* 10, 67-74.
- Aronen, T. and Rynänen L (2012). Variation in telomeric repeats of Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). *Tree genetics & genomes.* 8, 267-275.
- Aronen, T (2011). Variation of telomeric repeats in Scots pine (*Pinus sylvestris*) is there a connection to ageing and loss of regeneration ability? *BioMed Central Proceedings.* 5, 42.
- Aubert, G, and Lansdorp P. M (2008). Telomeres and aging. *Physiological Reviews.* 88, 557-579.
- Arzate-Fernández, A. M. and Mejía-Franco R (2011). Capacidad embriogénica de callos inducidos en ejes embrionarios cigóticos de *Agave angustifolia* Haw. *Revista Fitotecnia Mexicana.* 34, 101-106.
- Autexier, C. and Lue N. F (2006). The structure and function of telomerase reverse transcriptase. *Annuals Review of Biochemistry.* 75, 493-517.

- Biessmann, H., Walter M. F. and Mason J. M (2002). Telomeres in *Drosophila* and other insects. In *Telomerases, telomeres and cancer* (ed. G. Krupp & R. Parwaresch). 395 pp, Georgetown and New York, Landes Bioscience and Kluwer Academic.
- Biessmann, H., Mason J. M., Ferry, K., Dhulst M., Valgeirsdottir K., Traverse K. L. and Pardue M. L (1990). Addition of telomere-associated HET DNA-sequences heals broken chromosome ends in *Drosophila*. *Cell*. 61, 663-673.
- Blackburn, E. H., Greider, C. W. and Szostak, J. W (2006). Telomeres and telomerase: the path from maize, Tetrahymena and yeast to human cancer and aging. *Nature medicine*. 12, 1133-1138.
- Blackburn, E. H (1991). Structure and function of telomeres. *Nature*. 350, 569-73.
- Blackburn, E. H. and Szostak J. W (1984). Molecular structure of centromeres and telomeres. *Annuals Review of Biochemistry*. 53, 163-94.
- Bodnar, A. G, Ouellette M., Frolkis M., Holt S. E., Chiu C. P., Morin G. B., Harley C. B., Shay J. W., Lichtsteiner S., Wright W. E (1998). Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science*. 279, 349-352.
- Broun, P., Ganai M. W., and Tanksley S. D (1992). Telomeric arrays display high levels of heritable polymorphism among closely related plant varieties. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 89, 1354-1357.
- Burr, B., Burr F. A., Matz E. C. and Romero-Severson J (1992). Pinning down loose ends: mapping telomeres and factors affecting their length. *The Plant Cell*. 4, 953-960.
- Carron, M. P., Etienne H., Lardet L., Campagna S., Perrin Y., Leconte A. and Chaine C (1995). Somatic embryogenesis in rubber (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg.). In: Jain S, Gupta., Capper, R., Britt-Compton B., Tankimanova M., Rowson J., Letsolo B., Man S., Haughton M. and Baird D. M (2007). The nature of telomere fusion and a

definition of the critical telomere length in human cells. *Genes Development*. 21, 2495-2508.

Casacuberta, E. and Pardue M. L (2003). Transposon telomeres are widely distributed in the *Drosophila* genus: TART elements in the virilis group. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100, 3363-3368.

Castorena-Sanchez, I., Escóbedo R. M. and Quiroz A (1991). New cytotaxonomical determinants recognized in six taxa of *Agave* in the sections *Rigidae* and *Sisalanae*. *Canadian Journal of Botany*. 69, 1257-1264.

Cesare, A. J., Quinney N., Willcox S., Subramanian D. and Griffith, J. D (2003). Telomere looping in *P. sativum* (common garden pea). *Plant Journal*. 36, 271-279.

Chai, W., Du Q., Shay, J. W. and Wright, W. E (2006). Human telomeres have different overhang sizes at leading versus lagging strands. *Molecular Cell*. 21, 427-435.

Chen, L., Zhong H. Y., Kuang J. F., Li J. G., Lu W. J., and Chen, J. Y (2011). Validation of reference genes for RT-qPCR studies of gene expression in banana fruit under different experimental conditions. *Planta*. 234, 377-390.

Cox, A. V., Bennett S. T., Parokonny A. S., Kenton A., Callimassia M. A., and Bennett M. D (1993). Comparison of plant telomere locations using a PCR-generated synthetic probe. *Annals Botanical*. 72, 239-247.

Counter, C. M., Avilion A. A., Le Feuvre C. L., Stewart N. G., Greider C. W. and Harley C. B (1992). Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *European Molecular Biology Organization*. 11, 1921-1929.

Cuadrado, A., Golczyk H. and Jouve N (2009). A novel, simple and rapid nondenaturing FISH (ND-FISH) technique for the detection of plant telomeres. Potential used and possible target structures detected. *Chromosome Research*. 17, 755-762.

- Dalton, R (2005). Alcohol and science: saving the agave. *Nature*. 438, 1070-1071.
- Decary, S., Mouly V., Hamida C. B., Sautete A., Barbet J. P. and Butler-Brown G. S (1997). Replicative potential and telomere length in human skeletal muscle: implication for satellite cell mediated gene therapy. *Human Gene Therapy*. 8, 1429-1438.
- De Klerk, G. J (2009). Adventitious regeneration. In: Flickinger MC (ed) *Encyclopedia of industrial biotechnology: bioprocess, bioseparation, and cell technology*. Wiley, London, pp. 87.
- Dos Santos, C. F., De Oliveira D. Q. S. R., Rodrigues P. A, et al (2014). Embriogênese somática em *Agave sisalana* Perrine: indução, caracterização anatômica e regeneração. *Pesquisa Agropecuária Tropical*. 294-303.
- Doug, M., Mated L., Dionne A. and Bruce G (1995). Cumming *In vitro* polyploidization of mature ostrich fern sporophytes through Rejuvenation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 42, 27-31.
- Doyle, J. J. and Doyle J. L (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Epel, E. S., Blackburn E. H., Lin J., Dhabhar F. S., Adler N. E., Morrow J. D., and Cawthon R. M (2004). Accelerated telomere shortening in response to life stress. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 101, 17312-17315.
- Ezhova, T. A (2003). Genetic Control of Totipotency of Plant Cells in an in vitro Culture. *Russian Journal of Developmental Biology*. 34, 245-252.
- Fajkus, J., Sýkorová E. and Leich A. R (2005). Techniques in plant telomere biology. *BioTechniques*. 38: 223-243.

- Fajkus, J., Fulneckova J., Hulanova M., Berkova K., Riha K., and Matyasek R (1998). Plant cells express telomerase activity upon transfer to callus culture, without extensively changing telomere length. *Molecular Genetics and Genomics*. 260, 470-474.
- Fajkus, J., Kovarik A., and Kralovics R (1996). Telomerase activity in plant cells. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 391, 307-309.
- Fajkus, J., Kovarik A., Kralovics R. and Bezdak M (1995). Organization of telomeric and subtelomeric chromatin in the higher plant *Nicotiana tabacum*. *Molecular Genetics and Genomics*. 247, 633-638.
- Fay, M. F., Rudall P. J., Sullivan S., Stobart K. L., De Bruijn A. Y., Reeves G., and Conran J. G (2000). Phylogenetic studies of Asparagales based on four plastid DNA regions. In *Monocots: systematics and evolution* (ed. K. L. Wilson & D. A. Morrison). pp. 360–371, Melbourne: CSIRO.
- Fitzgerald, M. S., McKnight T. D., and Shippen D. E (1996). Characterization and developmental patterns of telomerase expression in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93, 14422-14427.
- Flanary, B. E. and Kletetschka G (2005). Analysis of telomere length and telomerase activity in tree species of various life-spans, and with age in the bristlecone pine *Pinus longaeva*. *Biogerontology*. 6, 101-111.
- Flanary, B. E. and Streit W. J (2003). Telomeres shorten with age in rat cerebellum and cortex in vivo. *Journal of anti-aging medicine*. 6, 299-308.
- García-Mendoza, A (2007). *Los agaves de México*. Ciencias. 87.
- Gentry, H. S (1982). *Agaves of Continental North America*. The University of Arizona Press. Tucson, AZ.

- Göhring, J., Fulcher, N., Jacak, J., and Riha, K (2014). TeloTool: A new tool for telomere length measurement from terminal restriction fragment analysis with improved probe intensity correction. *Nucleic Acids Research*. 42, 1-10.
- Grafi, G (2004). How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental Biology*. 268, 1-6.
- Greenberg, R. A., Allsopp R. C., Chin L., Morin G. B. De Pinho R. A (1998). Expression of mouse telomerase reverse transcriptase during development, differentiation and proliferation. *Oncogene*. 16, 1723-1730.
- Greider, C. W. and Blackburn E. H (1985). Identification of a specific telomere terminal transferase activity in *Tetrahymena* extracts. *Cell*. 43, 405-413.
- Griffith, J. D., Comeau L., Rosenfield S., Stansel R. M., Bianchi A., Moss H. and de Lange T (1999). Mammalian telomeres end in a large duplex loop. *Cell*. 97, 503-514.
- Guerra, J. O., Meneses A., Simonet A. M., Macías F. A., Nogueiras C., Gómez A. and Escario J. A (2008). Steroidal saponins from the plant *Agave brittoniana* with activity against the parasite *Trichomona vaginalis*. *Revista de Biología Tropical*. 56, 1645-1652.
- Hall, T. A (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. In *Nucleic acids symposium series*. 41: 95-98.
- Harley, C. B., Futcher B., and Greider C (1990). Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. *Nature*. 345, 458-460.
- Hastie, N. D (1990). Telomere reduction in human colorectal carcinoma and with ageing. *Nature*. 346, 866-868.

- Hazra, S. K., Das S. and Das A. K (2002). Sisal plant regeneration via organogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 3, 235-240.
- Heacock, M., Idol R. A., Friesner J. D., Britt A. B. and Shippen D. E (2007). Telomere dynamics and fusion of critically shortened telomeres in plants lacking DNA ligase IV. *Nucleic Acids Research*. 35, 6490-6500.
- Heacock, M., Spangler E., Riha K., Puizina J. and Shippen D. E (2004). Molecular analysis of telomere fusions in *Arabidopsis*: multiple pathways for chromosome end-joining. *European Molecular Biology Organization Journal*. 23, 2304-2313.
- Hecht, V., Vielle-Calzada J. P., Hartog M. V., Schmidt E. D., Boutilier K., Grossniklaus U., and de Vries S. C (2001). The *Arabidopsis* SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiol*. 127, 803-16.
- Heller, K., Kilian A., Piatyszek M. A. and Kleinhofs A (1996). Telomerase activity in plant extracts. *Molecular Genetics and Genomics*. 252, 342-345.
- Holt, S. E., Wright W. E. and Shay J. W (1996). Regulation of telomerase activity in immortal cells lines. *European Molecular Biology Organization Journal*. 16, 2932-2939.
- Hou, M., Xu D., Bjorkholm M. and Gruber A (2001). Real-Time quantitative telomeric repeat amplification protocol assay for the detection of telomerase activity. *Clinical Chemistry*. 47, 519-524.
- Ijdo, J. W., Well R. A., Baldini A. and Reeders, S. T (1991). Improved telomere detection using a telomere probe (TTAGGG)_n generated by PCR. *Nucleic Acids Research*. 19, 4780.
- Iskandar, H. M., Simpson R. S., Casu R. E., Bonnett G. D., Maclean D. J., and Manners J. M (2004). Comparison of reference genes for quantitative real-time polymerase

- chain reaction analysis of gene expression in sugarcane. *Plant Molecular Biology Reporter*. 22, 325-337.
- Jeyapalan, J. C, Sedivy J. M (2008). Cellular senescence and organismal aging. *Mechanisms of Ageing and Development*. 129, 467-474.
- Kawanishi, S., and Oikawa S (2004). Mechanism of telomere shortening by oxidative stress. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1019, 278-284.
- Kahn, T., Savitsky M. and Georgiev P (2000). Attachment of HeT-A sequences to chromosomal termini in *Drosophila melanogaster* may occur by different mechanisms. *Molecular Cell Biology*. 20, 7634-7642
- Kimura, M., Stone R. C., Hunt S. C., Skurnick J., Lu X., Cao X. and Aviv A (2010). Measurement of telomere length by the Southern blot analysis of terminal restriction fragment lengths. *Nature protocols*. 5, 1596-1607.
- Kilian, A., Stiff C. and Kleinhofs A (1995). Barley telomeres shorten during differentiation but grow in callus culture. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 92, 9555-9559.
- Kilian, A., Heller K. and Kleinhofs A (1998). Development patterns of telomerase activity in barley and maize. *Plant Molecular Biology*. 37, 621-628.
- Kwei, Y. L., and Lee C. L (1963). Anatomical studies of the leaf structure of Chinese pines. *Acta Botanica Sinica*. 11, 44-60.
- Levis, R. W., Ganesan, R., Houtchens, K., Tolar, L. A., & Sheen, F. M. (1993). Transposons in place of telomeric repeats at a *Drosophila* telomere. *Cell*. 75, 1083-1093.

- Liang, J., Jiang C., Peng H., Shi Q., Guo X., Yuan Y. and Huang L (2015). Analysis of the age of *Panax ginseng* based on telomere length and telomerase activity. *Scientific reports*. 5.
- Liu, D., Qiao N., Song H., Hua X., Du J., Lu H. and Li F (2007). Comparative analysis of telomeric restriction fragment lengths in different tissues of *Ginkgo biloba* trees of different age. *Journal Plant Research*. 120, 523-528.
- Liu, D., Zhang X. M., Hua X., Qiao N., Song H., Lu H. and Li F. L (2007). Dynamic changes of telomeric restriction fragment (TRF) lengths in cells during the developmental process from embryos to seedlings and a comparison with the embryonal calli in *Ginkgo biloba* L. *Forestry Studies in China*. 9, 127-131.
- Lingner, J., Hughes T. R., Shevchenko A., Mann M., Lundblad V. and Cech T. R (1997). Reverse transcriptase motifs in the catalytic subunit of telomerase. *Science*. 276, 561-567.
- Lin, Y. L. and Lai Z. X (2010). Reference gene selection for qPCR analysis during somatic embryogenesis in longan tree. *Plant Science*. 178, 359-365.
- López-Diazguerrero, N. E., Martínez G. C. M. y Konigsberg F (2005). La senescencia replicativa como una respuesta celular al estrés. *Revista de Educación Bioquímica*. 24, 47-53.
- Matthew Watson, J., Bulankova P., Riha K., Shippen D. E., and Vyskot B (2005). Telomerase-independent cell survival in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*. 43, 662-674.
- McClintock, B (1941). The stability of broken ends of chromosomes in *Zea mays*. *Genetics*. 26: 234-282.
- Moon, H. K., Park S. Y., Kim Y. W. and Kim S. H (2008). Somatic embryogenesis and plantlet production using rejuvenated tissues from serial grafting of a mature

- Kalopanax septemlobus tree. In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant. 44, 119-127.
- Mu, Y., Ren L., Hu X., Zhao Y., Li H., Lu H. and Liu D (2015). Season-specific changes in telomere length and telomerase activity in Chinese pine (*Pinus tabulaeformis* Carr). Russian Journal of Plant Physiology. 62, 487-493.
- Muller, H.J. (1938). The remaking of chromosomes. Collecting Net. 13, 182-198.
- Muñoz-Jordan, J. L., Cross G. A., de Lange T. and Griffith J. D (2001). T-loops at trypanosome telomeres. European Molecular Biology Organization Journal. 20, 579-588.
- Murashige, T. and F. Skoog (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. Physiologia Plantarum. 15, 473-497.
- Monja-Mio, K. M., Pool F. B., Herrera G. H., Esqueda-Valle M. and Robert M. L (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.
- Moriguchi, R., Kato K., Kanahama K., Kanayama Y. and Kikuchi H (2007). Analysis of telomere lengths in apple and cherry trees. Acta Horticulturae. 738, 389-395.
- Monteuuis, O., and Bon M. C (1989). Rejuvenation of a 100 yr old giant sequoia (*Sequoiadendron giganteum* Buchholz) through in vitro meristem culture. Annals of Forest Science. 46, 183-186.
- McKnight, T. D, Riha K, and Shippen D. E (2002). Telomeres, telomerase, and stability of the plant genome. Plant Molecular Biology. 48, 331-337.

- Narváez-Zapata, J. A. and Sánchez-Teyer F. L (2009). Agaves as a raw material: recent technologies and applications. *Recent Patents on Biotechnology*. 3, 185-191.
- Newton, P. R (eds) (1989). *Somatic embryogenesis in woody plants*. Kluwer, Dordrecht, pp 117-136.
- Nikam, T. D (1997). High frequency shoot regeneration in *Agave sisalana*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 51, 225-228.
- Oguchi, K., Liu H., Tamura K. and Takahashi H (1999). Molecular cloning and characterization of AtTERT, a telomerase reverse transcriptase homolog in *Arabidopsis thaliana*. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 457, 465-469.
- Portillo, L., Santacruz-Ruvalcaba F., Gutiérrez-Mora A. and Rodríguez-Garay B (2007). Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul. In *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. 43, 569-575.
- Pospíšilová, J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D., and Plzáková Š (1999). Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*. 42, 481-497.
- Powers, D. E. and Backhaus R. A (1989). In vitro propagation of *Agave arizonica* Gentry & Weber. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 16, 57-60.
- Peana, A. T., Moretti M. D., Manconi V., Desole G. and Pippia P (1997). Anti-inflammatory activity of aqueous extracts and steroidal sapogenins of *Agave americana*. *Planta Médica*. 63, 199-202.
- Perrod, S. and Gasser, S. M (2003). Long-range silencing and position effects at telomeres and centromeres: parallels and differences. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60, 2303-2318.

- Petracek, M. E., Lefebvre P. A., Silflow C. D. and Berman J (1990). *Chlamydomonas* telomere sequences are A+T-rich but contain three consecutive G-C base pairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 87, 8222-8226.
- Pierik, R. L. M (1990). Rejuvenation and micropropagation. In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. Proc Int Congr Plant Tissue Cell Culture. Amsterdam, The Netherlands.
- Pich, U. and Schbert I (1998). Terminal heterochromatin and alternative telomeric sequences in *Allium cepa*. *Chromosome Research*. 6, 315-321.
- Reddel, R. R., Bryan T. M., Colgin L. M., Perrem K. T. and Yeager T. R. (2001). Alternative lengthening of telomeres in human cells. *Radiation research*.155: 194-200.
- Richards, E. J. and Ausubel F. M (1988). Isolation of a higher eukaryotic telomere from *Arabidopsis thaliana*. *Cell*. 53, 127-136.
- Ríha, K. and Shippen D. E (2003). Ku is required for telomeric C-rich strand maintenance but not for end-to-end chromosome fusions in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 100: 611-615.
- Ríha, K., Fajkus J., Široký J. and Vyskot B (1998). Developmental control of telomere lengths and telomerase activity in plants. *Plant Cell*. 10, 1691-1698.
- Robert, M. L., Yoong L. K., Hanson L., Sanchez-Teyer F., Bennett D. M., Leitch A. R. and Leitch I. L (2008). Wild and agronomically important *Agave* species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy. *Botanical Journal of the Linnean Society*. 158, 215-222.

- Rodríguez-Garay, B., Gutiérrez-Mora A. and Acosta-Dueñas B (1996). Somatic embryogenesis of *Agave victoria-reginae* Moore. *Plant Cell Tissue Organ Culture*. 46, 85-87.
- Robert, M. L., Herrera J. L., Contreras F. and Scorer K (1987). *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem (Henequen). *Plant Cell Tissue Culture*. 8, 37-48.
- Roder, M. S., Lapitan N. L., Sorrells M. E. and Tanksley S. D (1993). Genetic and physical mapping of barley telomeres. *Molecular Genetics and Genomics*. 238, 294-303.
- Rotkova, G., Sklenickova M., Dvorackova M., Sykorova E., Leitch A. R. and Fajkus, J (2004). An evolutionary change in telomere sequence motif within the plant section Asparagales had significance for telomere nucleoprotein complexes. *Cytogenetic Genome Research*. 107, 132-138.
- Rubio, M. A., Davalos A. R. and Campisi J (2004). Telomere length mediates the effects of telomerase on the cellular response to genotoxic stress. *Experimental cell research*. 298, 17-27.
- Sambrook, J., and Russell D. W (2001). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2001.
- Serra, V., Grune T., Sitte N., Saretzki G. and von Zglinicki T (2000). Telomere length as a marker of oxidative stress in primary human fibroblast cultures. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 908, 327-330.
- Schwarzacher, T (2003). DNA, chromosomes, and in situ hybridization. *Genome*. 46, 953-962.
- Schwarzacher, T. and Heslop-Harrison J. S (1991). *In situ* hybridization to plant telomeres using synthetic oligomers. *Genome*. 34:317-323.
- Shakirov, E. V., and Shippen D. E (2004). Length regulation and dynamics of individual telomere tracts in wild-type *Arabidopsis*. *Plant Cell*. 16, 1959-1967.

- Shakirov, E. V., Salzberg S., L, Alam M. and Shippen D. E (2008). Analysis of *Carica papaya* telomeres and telomere-associated proteins: insights into the evolution of telomere maintenance in Brassicales. *Tropical Plant Biology*. 1, 202-21.
- Song, H., Liu D., Fanglang L. and Lu H (2011). Season and age-associated telomerase activity in *Ginkgo biloba* L. *Molecular Biology Report*. 38, 1799-1805.
- Smulders, M. J. M. and De Klerk G. J (2011). Epigenetics in plant tissue culture. *Plant Growth Regulation*. 63, 137-146.
- Sýkorová, E., Lim Z. K. Y., Kunická M. W., Chase M. D., Bennett J., Fajkus J. and Leitch A. R (2003). Telomere variability in the monocotyledonous plant order Asparagales. *Proceedings of the Royal Society of London Biological Sciences*. 270, 1893-1904.
- Sýkorová, E., Rowland A., Leitch A. and Fajkus J (2006). Asparagales telomerases which synthesize the human type of telomeres. *Plant Molecular Biology*. 60, 633-646.
- Taddei, A. and Gasser S. M (2004). Multiple pathways for telomere tethering: functional implications of subnuclear position for heterochromatin formation. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1677, 120-128.
- Tamura, K., Liu H. and Takahashi H (1999). Auxin Induction of Cell Cycle Regulated Activity of Tobacco Telomerase. *Journal of Biological Chemistry*. 274, 20997-21002.
- Tejavathi, D. H., Rajanna M. D., Sowmya R., and Gayathamma K (2007). Induction of somatic embryos from cultures of *Agave veracruz* Mill. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*. 43, 423-428.
- Tichá, I., Radochová B., and Kadle ek P (1999). Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum*. 42, 469-474.

- Tham, W. H. and Zakian V. A (2002). Transcriptional silencing at *Saccharomyces* telomeres: implications for other organisms. *Oncogene*. 21, 512-521.
- Valenzuela-Sánchez, K. K., Juárez-Hernández R. E., Cruz-Hernández A., Olalde-Portugal V., Valverde M. E., and Paredes-López O (2006). Plant regeneration of *Agave tequilana* by indirect organogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant*. 42, 336-340.
- Vaziri, H., West M. D., Allsopp R. C., Davinson T. S., Wu Y. S., Arrowsmith C. H., Poirier G. G. and Benchimol S (1997). ATM-dependent telomere loss in aging human diploid fibroblasts and DNA damage lead to the post-translational activation of p53 protein involving poly (ADP-ribose) polymerase. *European Molecular Biology Organization Journal*. 16, 6018-6033.
- Watson, M. J. and Riha K (2010). Comparative biology of telomere: Where plants stand. *Federation of European Biochemical Societies Letters*. 584, 3752-3759.
- Wei, C. and Price M (2003). Protecting the terminus: t-loops and telomere end binding proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 60, 2283-2294.
- Wu, K. S. and Tanksley S. D (1993). PFGE analysis of the rice genome: estimation of fragment sizes, organization of repetitive sequences and relationships between genetic and physical distances. *Plant Molecular Biology*. 23, 243-254.
- Xu, M., Li X. and Korban S. S (2004). DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.). *Theoretical and Applied Genetics*. 109, 899-910.
- Yu, W., Lamb J. C., Han F. and Birchler J. A (2006). Telomere-mediated chromosomal truncation in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 103, 17331-17336.

- Zakian, V. A (1995). Telomeres beginning to understand the end. *Science*. 270, 1601-1607.
- Zellinger, B. and Riha K. (2007). Composition of plant telomeres. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1769, 399-409.
- Zhang, Y. M., Li X., Chen Z., Li J. F., Lu J. Y. and Zhou W. Z (2013). Shoot organogenesis and plant regeneration in *Agave* hybrid, No. 11648. *Science Horticulture*. 161, 30-34.
- Zhao, X. Y., Su Y. H., Cheng Z. J. and Zhang X. S (2008). Cell fate switch during *In vitro* plant organogenesis. *Journal of Integrative Plant Biology*. 50, 816-824.
- Zvereva, M. I., Shcherbakova D. M. and Dontsova O. A (2010). Telomerase: Structure, Functions, and Activity Regulation. *Biochemistry*. 75, 1563-1583.
- Zhuravlev, Y. N. and Omelko M. A (2007). Plant morphogenesis *in vitro*. *Russian Journal of plant physiology*. 55, 579-596.