



**Centro de Investigación Científica de Yucatán**

**Posgrado en Ciencias Biológicas**

**ESTUDIO EPIGENÉTICO EN DOS ESPECIES DE  
*Agave* EN CONDICIONES *in vitro* Y DE  
INVERNADERO**

**Tesis que presenta  
Fátima Patricia Duarte Aké**

**En opción al título de  
Maestro en Ciencias  
(Ciencias Biológicas: opción Biotecnología)**

**Mérida, Yucatán, México**

**2013**





---

---

**ABSTRACT**

The micropropagation is an efficient biotechnological tool for high-scale production of elite plant. Among the disadvantages of the micropropagation, if it is required a homogenized cultivar, is the called somaclonal variation (SV), which is the phenotypic variation that occurs among the regenerated plants during the *in vitro* culture. It is known that plant growth regulators, in particular the auxins, can alter the metabolism during plant tissue cultures, causing SV. The latest studies on SV suggest that epigenetic mechanisms are related to this phenomenon. However, it is still unknown the role of plants growth regulators in histone methylation linked to SV. Therefore, in this study I wanted to determinate whether auxins, used during the micropropagation of agave, provoke lysine methylation in histone H3 during *in vitro* and *ex vitro* conditions.

## CAPITULO I. ANTECEDENTES

### 1.1. INTRODUCCIÓN

La variación somaclonal (VS) ha sido definida como la variación fenotípica, ya sea de origen genético o epigenético (Hollyday y Pugh, 1975); mostrada entre las somaclonas, es decir, plantas derivadas de cualquier forma de cultivo celular involucrando el uso de células vegetales somáticas (Shaffer, 1990). Se ha observado que pueden producirse diferentes cambios epigenéticos cuando hay variación somaclonal en el cultivo de tejidos de diferentes especies, resultando en un cambio de la expresión de los genes, reversible y heredable (Jain, 2001; Kaeppler et al., 2000; Piekik, 1987; Smulders y Klerk, 2011). Esta variación puede ser utilizada como una herramienta para inducir variabilidad genética, y en el mejor de los casos, obtener características agronómicas deseables (Araújo et al., 2001; Cassells y Curry, 2001). Se ha sugerido que la composición del medio de cultivo es un factor que puede inducir la VS.

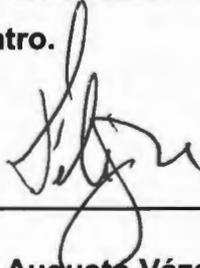
Se ha encontrado que la variación somaclonal puede ser de dos tipos: genética y epigenética (Shaffer, 1990). La variación epigenética, conocida también como la variación del desarrollo, incluye cambios persistentes en el fenotipo el cual involucra la expresión de algunos genes en particular. El mejor ejemplo conocido de la variación epigenética es el fenómeno de habituación en los callos (Jackson y Lyndon, 1995; Skirvin et al., 1994). También se ha encontrado que los reguladores del crecimiento, principalmente de naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del ADN, causando cambios epigenéticos en las plantas (George, 1993; LoSchiavo et al., 1989). Por otro lado, se ha observado que el cultivo *in vitro* del agave provoca acumulaciones en la metilación de la lisina 9 dimetilada en la histona H3 lo que sugiere un represión de genes (De la Peña et al., 2012a).

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán, dentro de su programa de mejoramiento del género Agave, se ha desarrollado exitosamente la técnica de micropropagación, la cual implica el uso de la auxina 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D). Sin embargo, se ha observado que entre las plantas micropropagadas existe una variación

## RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado **ESTUDIO EPIGENÉTICO EN DOS ESPECIES DE *Agave* EN CONDICIONES *in vitro* Y DE INVERNADERO** fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología y los laboratorios de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. bajo la dirección de la Dra. **Clelia De la Peña Seaman**, dentro de la Opción **Biotecnología de Plantas**, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

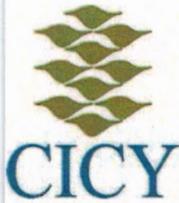
Atentamente,



---

**Dr. Felipe Augusto Vázquez Flota**  
**Coordinador de Docencia**  
**Centro de Investigación Científica de Yucatán, AC.**





Mérida, Yucatán, México; a 13 de marzo de 2013

### **DECLARACIÓN DE PROPIEDAD**

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

Firma: \_\_\_\_\_

Nombre: Fátima Duarte Aké



---

---

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco a mi familia por todo su apoyo incondicional en todo momento, a mis padres Fausto y Emilia, a mis hermanos Maricarmen, Miguel y Oscar. Le agradezco a Nicolás, mi esposo, amigo y compañero de vida, por su paciencia y apoyo emocional. Mi inmensa gratitud a mi hijo Benjamín que me ha ayudado a sobrellevar cada obstáculo que se me ha puesto enfrente, así también me ha ayudado a cumplir las metas que me he propuesto desde mi niñez.

Le doy gracias a mi comité de revisión de tesis conformado por: Dr. Manuel L. Robert Díaz, Dr. Luis Sáenz Carbonell, Dr. Raúl Álvarez Venegas; Dr. Víctor Manuel Loyola Vargas.

Así también al CICY y al Posgrado en Ciencias Biológicas por las instalaciones prestadas para la realización de este trabajo. A CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) por la beca otorgada número 390344.

En especial le agradezco a la Dra. Clelia De la Peña Seaman por aceptarme en el laboratorio de Epigenética y remodelación de la Cromatina en Plantas, por sus consejos, críticas y mejoras que ha sugerido en este trabajo. También agradezco a todos mis compañeros que han hecho amena esta travesía por el inicio de mi formación científica que toda la vida he deseado. Le agradezco a Eduardo Castillo por el apoyo técnico en la micropropagación de Agave, así como sus innumerables consejos; al M.C. Geovany Nic Can por el apoyo técnico en el laboratorio y camaradería en todo momento de fracaso y éxito. A la Q.F.B. Sara Hernández Castellano por su amistad, apoyo emocional, así como su apoyo técnico en el laboratorio. A la Q.F.B. Zamaria de la Torre y al I.B. Víctor Cancino, por su compañerismo y crítica constructiva a este trabajo.

También le agradezco a mis compañeros del laboratorio número 24 de la Unidad de Bioquímica y Biología Molecular de Plantas.



---

---

**Índice:**

Índice de figuras .....	iii
Índice de cuadros .....	v
RESUMEN:.....	1
ABSTRACT .....	2
CAPITULO I. ANTECEDENTES .....	3
1.1. INTRODUCCIÓN.....	3
1.2. JUSTIFICACIÓN.....	5
1.3. ANTECEDENTES GENERALES .....	7
1.3.1. LA VARIACIÓN SOMACLONAL Y LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO. .....	7
1.3.2. LAS VARIACIONES SOMACLONAL Y EPIGENÉTICA .....	8
1.3.3. LA EPIGENÉTICA Y LA REMODELACIÓN DE LA CROMATINA .....	10
1.3.4. LA CROMATINA, EL NUCLEOSOMA Y LAS HISTONAS, UNIDADES DE REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN.....	11
1.3.5. HETEROCROMATINA Y EUCROMATINA.....	15
1.3.6. METILACIÓN DE LAS HISTONAS.....	16
1.3.6.1. H3K4me <sup>3</sup> .....	17
1.3.6.2. H3K9me <sup>2</sup> .....	19
1.3.6.3. H3K27me <sup>2</sup> .....	19
1.3.6.4. H3K36me <sup>2</sup> .....	21
1.3.7. PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA CROMATINA.....	22
1.3.7.1. HISTONA H1 .....	22
1.3.7.2. PROTEÍNAS POLYCOMB .....	22
1.4. AGAVE COMO MODELO DE ESTUDIO.....	23
1.4.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL AGAVE Y SU PROBLEMÁTICA.....	25
1.5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN.....	27
1.6. HIPÓTESIS.....	27
1.7. OBJETIVOS .....	27

---

---

1.7.1. OBJETIVO GENERAL .....	27
1.8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL .....	29
1.9. BIBLIOGRAFÍA .....	30
CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	43
2.1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> Y DE INVERNADERO DE AGAVE. .....	43
2.2. AISLAMIENTO DE LAS HISTONAS .....	45
2.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS .....	45
2.3. WESTERN BLOT DE LAS HISTONAS AISLADAS CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA H3K27me <sup>2</sup> , H3K4me <sup>3</sup> , H3K9me <sup>2</sup> Y H3K36me <sup>2</sup> .....	46
2.3.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE (Laemmli, 1970). .....	46
2.3.2. TRANSFERENCIA .....	47
2.3.3. IMMUNODETECCIÓN .....	47
2.3.4. DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA .....	48
2.4. BIBLIOGRAFÍA .....	49
CAPÍTULO III. RESULTADOS .....	51
3.1. INFLUENCIA DE LAS AUXINAS EN EL PESO FRESCO DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i> . .....	51
3.2. EFECTO DE LAS AUXINAS EN LA ALTURA DE <i>A. ANGUSTIFOLIA</i> . .....	52
3.3. INFLUENCIA DE LAS AUXINAS EN EL PESO FRESCO DE <i>A. FOURCROYDES</i> . .....	55
3.4. INFLUENCIA DE LAS AUXINAS EN LA ALTURA DE <i>A. FOURCROYDES</i> . .....	57
3.5. ACLIMATACIÓN DE LAS PLANTAS EN EL INVERNADERO. ....	58
3.6. ANÁLISIS DE LAS MARCAS EN LAS HISTONAS DE AGAVE EN CONDICIONES <i>IN VITRO</i> Y DE INVERNADERO .....	62
3.6.1. WESTERN BLOT DE LAS HISTONAS AISLADAS CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA H3K27me <sup>2</sup> , H3k4me <sup>3</sup> , H3k9m <sup>2</sup> Y H3k36me <sup>2</sup> .....	62
CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN .....	69
4.1. BIBLIOGRAFÍA .....	75
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....	79
5.1 CONCLUSIONES .....	79
5.2. PERSPECTIVAS .....	80

---



---

**Índice de figuras**

Figura 1. Vista frontal de la partícula repetitiva del nucleosoma. Imagen tomada de Luger (2003). .....	12
Figura 2. Modificaciones en los residuos del extremo N-terminal de las histonas H3, H4, H2A y H2B (Allis et al., 2009). .....	13
Figura 3. Modificaciones en la histona H3 relacionadas con la formación de eucromatina. ....	14
Figura 4. Modificaciones en la histona H3 relacionadas con la conformación de heterocromatina. ....	15
Figura 5. Esquema general de la estrategia llevada a cabo para la adaptación y los tratamientos con auxinas en un curso temporal de 21 días <i>in vitro</i> de las especies <i>A. angustifolia</i> y <i>A. fourcroydes</i> . ....	44
Figura 6. Preparación de charolas de poliestireno con tierra: peat moss (2:1) y transplante de plantas para aclimatarlas en el invernadero. ....	45
Figura 7. Efecto de la concentración de las auxinas en el peso fresco observado en la etapa de cultivo <i>in vitro</i> en el proceso de Micropropagación de <i>A. angustifolia</i> . ....	51
Figura 8. Efecto de la concentración de las auxinas en el peso fresco observado en la etapa <i>ex vitro</i> durante el proceso de micropropagación de <i>A. angustifolia</i> . ....	52
Figura 9. Diferencias en la ganancia de altura observados en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. angustifolia</i> durante el proceso de micropropagación en tratamientos con diferentes concentraciones de auxinas naturales (AIA e IBA) y sintéticas (ANA y 2,4-D). ....	53
Figura 10. Efectos de la concentración de las auxinas en el crecimiento observados en la etapa <i>ex vitro</i> de <i>A. angustifolia</i> durante el proceso de micropropagación. ....	54
Figura 11. Plantas de <i>A. angustifolia</i> a los 3 días (A) y a los 21 días <i>in vitro</i> (B) sin reguladores del crecimiento. ....	54
Figura 12. Efecto de la concentración de auxinas en el peso fresco observado en la etapa de cultivo <i>in vitro</i> en el proceso de micropropagación de <i>A. fourcroydes</i> . ....	55
Figura 13. Efecto de la concentración de las auxinas en el peso fresco observado en la etapa <i>ex vitro</i> durante el proceso de micropropagación de <i>A. fourcroydes</i> . ....	56
Figura 14. Efecto de la concentración de las auxinas en el crecimiento observado en el cultivo <i>in vitro</i> de <i>A. fourcroydes</i> durante el proceso de micropropagación. ....	57
Figura 15. Efectos de la concentración de auxina en el crecimiento observados en la etapa <i>ex vitro</i> de <i>A. fourcroydes</i> . ....	58
Figura 16. A los tres meses posteriores a la etapa de enraizamiento, las plantas de <i>A. angustifolia</i> se colocaron en bandejas de poliestireno durante la fase de aclimatación en el invernadero. ....	59
Figura 17. A los tres meses posteriores a la etapa de enraizamiento, las plantas de <i>A. fourcroydes</i> se colocaron en bandejas de poliestireno durante la fase de aclimatación en el invernadero. ....	59

---

Figura 18. Fenotipos de <i>A. angustifolia</i> observados a los 6 meses <i>ex vitro</i> . .....	60
Figura 19. Fenotipos de <i>A. fourcroydes</i> observados a los seis meses <i>ex vitro</i> . .....	60
Figura 20. Fenotipos observados durante el monitoreo de las plantas a los tres meses <i>ex vitro</i> de <i>A. angustifolia</i> . (A) plantas tratadas con IBA (0.125 $\mu$ M) en la fase <i>in vitro</i> . (B) Plantas tratadas con 2,4-D (0.05 $\mu$ M) en la fase <i>in vitro</i> . (C) Plantas tratadas con 2,4-D (0.125 $\mu$ M). .....	61
Figura 21. Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de <i>A. angustifolia</i> . Al día 0 y tercer día <i>in vitro</i> se extrajeron las histonas de las plantas en el testigo sin auxinas y en cada uno de los tratamientos con auxinas naturales (IBA y AIA) y sintéticas (ANA y 2,4-D); se probaron los anticuerpos específicos $\alpha$ -H3K4me <sup>3</sup> , -H3K9me <sup>2</sup> , -H3K36me <sup>2</sup> y -H3K27me <sup>3</sup> para realizar el Western blot. ....	63
Figura 22. Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de <i>A. angustifolia</i> . A los días cero y 21 de plantas cultivadas <i>in vitro</i> se extrajeron las histonas de los testigos sin auxinas y de cada uno de los tratamientos con auxinas naturales (IBA y AIA) y sintéticas (ANA y 2,4-D). Se probaron los anticuerpos específicos $\alpha$ -H3K4me <sup>3</sup> , -H3K9me <sup>2</sup> , -H3K36me <sup>2</sup> y -H3K27me <sup>3</sup> para realizar el Western blot. ....	64
Figura 23. Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de <i>A. fourcroydes</i> . Al día cero y 21 de las plantas cultivadas <i>in vitro</i> se extrajeron las histonas de los testigos y de cada uno de los tratamientos con auxinas naturales (IBA y AIA) y sintéticas (ANA y 2,4-D); se probaron los anticuerpos específicos $\alpha$ -H3K4me <sup>3</sup> , -H3K9me <sup>2</sup> , -H3K36me <sup>2</sup> y -H3K27me <sup>3</sup> para realizar el Western blot. ....	65
Figura 24. Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de <i>A. fourcroydes</i> . Las muestras se colectaron a los días cero y 21 días de las plantas cultivadas <i>in vitro</i> ; se extrajeron las histonas de las plantas testigo y de cada uno de los tratamientos con auxinas naturales (IBA y AIA) y sintéticas (ANA y 2,4-D); se probaron los anticuerpos específicos $\alpha$ -H3K4me <sup>3</sup> , -H3K9me <sup>2</sup> , -H3K36me <sup>2</sup> y -H3K27me <sup>3</sup> para realizar el Western blot. ....	66
Figura 25. Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de <i>A. angustifolia</i> . Las histonas se extrajeron de plantas de seis meses de cultivo <i>ex vitro</i> y de plantas testigo, así también de las plantas que fueron tratadas en la fase <i>in vitro</i> hasta los 21 días con 0.5 $\mu$ M de 2,4-D; se probaron los anticuerpos específicos $\alpha$ -H3K4me <sup>3</sup> , -H3K9me <sup>2</sup> , -H3K36me <sup>2</sup> y -H3K27me <sup>3</sup> para realizar el Western blot. ....	67
Figura 26. Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de <i>A. fourcroydes</i> . Las histonas se extrajeron de plantas de seis meses de cultivo <i>ex vitro</i> tanto de plantas testigo, como de las plantas que fueron tratadas en la fase <i>in vitro</i> hasta los 21 días con 0.05 $\mu$ M de 2,4-D; se probaron los anticuerpos específicos $\alpha$ -H3K4me <sup>3</sup> , -H3K9me <sup>2</sup> , -H3K36me <sup>2</sup> y -H3K27me <sup>3</sup> para realizar el Western blot. ....	68

---

---

**Índice de cuadros**

**Cuadro 1. Metiltransferasas de histonas.....17**

**Cuadro 2. Anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron en la inmunodetección.34**

**RESUMEN:**

La micropropagación es una herramienta biotecnológica eficaz para la producción de plantas elite a gran escala. Entre las desventajas que presenta este sistema, al requerirse uniformidad fenotípica entre las plantas, está la variación somaclonal (VS) o variación fenotípica en plantas regeneradas por cultivo *in vitro*. Se sabe que los reguladores del crecimiento, en particular las auxinas, pueden alterar el metabolismo en los cultivos vegetales provocando una VS. Estudios recientes sugieren la presencia de mecanismos epigenéticos relacionados con la VS. Sin embargo, aún se desconoce cuál es el papel que juegan los reguladores del crecimiento en la metilación de las histonas que pudieran estar involucradas en la VS. Es por ello que en este estudio se pretende determinar si las auxinas utilizadas en la micropropagación de agaves provocan modificaciones en las lisinas presentes en la histona H3 en condiciones *in vitro* que pudieran mantenerse *ex vitro*.

---

---

somaclonal epigenética (De la Peña et al., 2012a), la cual podría estar involucrada con el uso de esta auxina.

El género *Agave* es endémico de América y en nuestro país se distribuye por todo el territorio nacional. Entre las especies más importantes se encuentra el *Agave fourcroydes* que es el cultivo del que se obtiene la fibra y es la especie más importante en las áreas tropicales y subtropicales de África, y tiene una capacidad de exportación potencial en China (Lingling et al., 2009). Por otro lado, *Agave angustifolia* se utiliza para la elaboración de mezcal (García-Mendoza, 2002). Otra especie, el *Agave tequilana* Weber var. Azul es usado para la producción de tequila (Torres-Morán et al., 2010) cuya denominación de origen pertenece a México (NOM-V-1978).

El agave tiene tres mecanismos de reproducción de forma natural: vástagos que emergen de los rizomas, semillas y pequeñas plántulas llamadas bulbillos que se producen en la inflorescencia (Torres-Morán et al., 2010). El agave también es propagado por métodos de cultivo *in vitro*, usando brotes axilares de hojas, meristemos, rizomas e inflorescencias (Robert et al., 1992).

Al igual que en los agaves, en otras especies que son micropropagadas, como la fresa, también se ha observado la aparición de la variación somaclonal cuando esta técnica se usa por mucho tiempo (Nehra et al., 1992); esto puede causar anomalías anatómicas en las hojas, como es en el caso de la micropropagación de la uva. El cultivo *in vitro* también altera la forma y textura de las hojas haciéndolas más ásperas y pubescentes (Grenan, 1992). También se ha observado que el cultivo *in vitro* puede producir raíces y alteraciones en los procesos fisiológicos en los árboles (Rohr et al., 2003). Se ha demostrado que la VS es un serio problema para los investigadores y propagadores que requieren uniformidad en los cultivos, pero por otro lado la uniformidad es un problema cuando las plantas cultivadas son expuestas a enfermedades (Torres-Morán et al., 2010) por lo que una VS podría servir para seleccionar aquellas plantas resistentes a enfermedades.

La acumulación de los cambios epigenéticos sobre generaciones de divisiones celulares puede aumentar el riesgo de perpetuar alelos epigenéticos peligrosos. Aunque esto también aplica a las especies propagadas clonalmente *ex vitro*, como en los cultivos más

antiguos: la palma aceitera, la uva y el cacao (Miguel y Marum, 2011). Uno de los mecanismos epigenéticos, en el que este estudio se centrará, son las modificaciones en las histonas, ya que estos cambios podrían ser necesarios para borrar los efectos de las marcas causadas por estímulos externos (Feng et al., 2010).

Por todo lo mencionado en los párrafos anteriores, el propósito central de este estudio es entender cómo los reguladores del crecimiento, en particular las auxinas, influyen en la remodelación de la cromatina, modificando los patrones de metilación en la histona H3, así como en la variación fenotípica y epigenética en las etapas de multiplicación y aclimatación del proceso de micropropagación de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia*.

## 1.2. JUSTIFICACIÓN

Las variaciones observadas en las plantas que son regeneradas en sistemas *in vitro* no siempre son causadas por alteraciones genéticas, por ello es importante evaluar la estabilidad de las plantas que se cultivan en estas condiciones, así como en sistemas de micropropagación comercial. Hasta el momento los estudios sobre variación epigenética se han enfocado en la evaluación del papel que desempeña la metilación del ADN con respecto a la variación somaclonal en palma aceitera (Jaligot et al., 2000; Jaligot et al., 2002; Jaligot et al., 2004; Jaligot et al., 2010), orquídeas del género *Doritaenopsis* (Park et al., 2009), *Rosa hybrida* L. (Xu et al., 2004), *Musa spp.* (Peraza-Echeverría et al., 2001), entre otras (Kaepler y Philips, 1993; Li et al., 2002; Santamaría et al., 2009; Smulders et al., 1995; Xu et al., 2004).

Aunque se han estudiado algunos eventos epigenéticos en el ADN provocados por el cultivo *in vitro*, las modificaciones de las histonas no han sido abordadas. Es por ello que en este estudio nos enfocaremos al estudio de las metilaciones que ocurren en los residuos de lisina en la histona H3, debido a que es una marca epigenética muy estable y directamente relacionada con la modificación en la estructura de la cromatina (Byvoet et al., 1972; Honda et al., 1975). Además, si bien existen algunos trabajos acerca de la metilación de las histonas relacionadas con la VS en diferentes tipos de cultivo como son suspensiones celulares y cultivo de protoplastos (Berdasco et al., 2008; Williams et al., 2003) no existe ninguno usando como modelo la micropropagación.

### **1.3. ANTECEDENTES GENERALES**

#### **1.3.1. LA VARIACIÓN SOMACLONAL Y LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO.**

La VS es la variación fenotípica de los rasgos cuantitativos y cualitativos que ocurre entre las plantas regeneradas de cualquier tipo de cultivo de tejidos (Larkin y Scowcroft, 1981). Esto podría deberse a la variación preexistente o inducida (Karp, 1995) en algunos cultivos. Algunos científicos añaden otros aspectos para la definición de variación somaclonal, la cual necesita que ésta sea heredable a través del ciclo sexual (Kaepler et al., 2000). La cantidad de variaciones que pueden ser esperadas varían de acuerdo a la clona, genotipo, nivel de ploidía, naturaleza del explante, el número de subcultivos, edad de las plantas, pre-acondicionamiento del tejido (Veilleux y Johnson, 1998), el uso de agentes mutagénicos, y a la presión de selección aplicada a las clonas por condiciones de estrés, tal como el nivel de sal, herbicidas, microorganismos o subproductos y metabolitos específicos (Skirvin et al., 1994), así como a los componentes del medio de cultivo (Martin et al., 2006; Piekik, 1987; Vidal y De García, 2000). El fenómeno de la VS comprende diferentes situaciones desde las variantes fenotípicamente parecidas a la planta que les dio origen, hasta un rango de alteraciones derivadas del cultivo de tejidos (Kaepler et al., 2000; Kaepler y Philips, 1993; Larkin y Scowcroft, 1981).

La investigación sobre la VS se está llevando a cabo con individuos elites o clonas con un potencial conocido como cultivares o líneas propagadas (Miguel y Marum, 2011; Park et al., 2009; Peraza-Echeverría et al., 2001). La variación observada en tal material puede resultar de varios tratamientos, incluyendo la inducción de la expresión de genes que están presentes en el genoma pero que han sido reprimidos en algunos estadios del desarrollo. Aunque los componentes del medio de cultivo pueden ser controlados y estandarizados para la mayoría de los cultivos, los reguladores del crecimiento provocan una respuesta en el explante en el que no se tiene ningún control. No todos los cultivos, ni todos los explantes responden igual a la relación o tipo de regulador del crecimiento empleado. Dependiendo de su estructura química y su efecto fisiológico, los reguladores del crecimiento vegetal se agrupan en once diferentes categorías: auxinas, citocininas, giberelinas, ácido abscísico, etileno, jasmonatos, salicilatos, brasinoesteroides, estrigolactonas, óxido nítrico y espermidina (Jones et al., 2013).

En el Centro de Investigación Científica de Yucatán, dentro de su programa de mejoramiento del género *Agave*, se ha desarrollado exitosamente la técnica de micropropagación. El *Agave* es una especie originaria de México con un alto valor comercial, ya que especies pertenecientes a este género como *A. tequilana*, *A. angustifolia* y *A. fourcroydes* son usadas en la industria tequilera, mezcalera y de fibras naturales, respectivamente. Este programa se ha desarrollado exitosamente mediante protocolos de micropropagación con el uso de diferentes reguladores de crecimiento; sin embargo, se ha observado que entre las plantas micropropagadas se ha generado una VS entre las clonas obtenidas, y esta variación podría estar relacionada al uso de la auxina 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), ya que, se considera que la composición del medio de cultivo es un factor que puede inducir la VS. Los reguladores de crecimiento, principalmente de naturaleza auxínica, pueden promover la metilación del ADN (George, 1993; Sahijram et al., 2003), y metilación en las histona H3 (De la Peña et al., 2012a) causando cambios epigenéticos.

De esta forma, entendiendo la regulación epigenética durante el cultivo *in vitro* bajo diferentes concentraciones y tipos de auxinas, se podrían manipular de una manera eficiente los efectos que producen las auxinas durante la micropropagación para así eliminar o promover la VS, según sea el caso. Por otro lado, no se sabe si los cambios epigenéticos se conservan al pasar de un ambiente *in vitro* a uno *ex vitro*; por eso uno de los objetivos de este estudio es determinar si los cambios epigenéticos que ocurren en el ambiente *in vitro* se mantiene o cambian al llevar a las plantas a un ambiente *ex vitro*. Esto nos permitirá desarrollar un mejor entendimiento sobre la naturaleza epigenética de las plantas expuestas *in vitro* para un mejor rendimiento y desarrollo en el campo.

Los reguladores del crecimiento vegetal más utilizados en el cultivo *in vitro* son los pertenecientes a los grupos de las auxinas y de las citocininas. Se sabe que estos compuestos regulan en gran medida los procesos de crecimiento y desarrollo en el cultivo de tejidos vegetales (Mazari y Camm, 1993; Zhao, 2010), antagonizándose uno con el otro. En menor grado se utilizan algunos reguladores como las giberelinas y el ácido abscísico (Pérez-Molphe, 1999). Los reguladores del crecimiento y específicamente el 2,4-D y la benciladenina (BA) han sido relacionados con la variabilidad inducida en el cultivo de tejidos (Evans et al., 1984). Los reguladores del crecimiento como las auxinas, son usadas en altas concentraciones para inducir la dediferenciación y la rediferenciación en los tejidos y también son útiles para promover el enraizamiento de las plantas provenientes de la germinación de embriones somáticos (Eeuwens et al., 2002).

Se ha sugerido que la inducción de los callos a concentraciones elevadas de 2,4-D podría ser una de las causas de la VS de la fresa (Nehra et al., 1992), soya (Gesteira et al., 2002) y algodón (Jin et al., 2008). Por lo tanto, los niveles por encima o por debajo de las concentraciones óptimas de reguladores del crecimiento, mayormente artificiales, en los medios de cultivo es una posible causa de la VS (Martin et al., 2006; Vidal y De García, 2000) aunque sin definir si esta es genética o epigenética.

### **1.3.2. LAS VARIACIONES SOMACLONAL Y EPIGENÉTICA**

En general, la VS aparece como resultado de las variaciones genéticas preexistentes dentro de los explantes y la variación inducida durante la fase de cultivo de tejidos (Evans et al., 1984). Se ha determinado que la variación somaclonal puede ser de dos tipos: genética y epigenética (Shaffer, 1990). La variación genética es estable a través del ciclo sexual o la propagación sexual repetitiva; puede involucrar uno o múltiples genes y puede deberse a alteraciones en las bases del ADN, genes, cromosomas o conjuntos enteros de cromosomas (Orton, 1984). En el caso de la variación epigenética, esta incluye cambios persistentes en el fenotipo, por consiguiente da como resultado la expresión o represión de genes que regulan el crecimiento y desarrollo de la planta. El mayor ejemplo conocido de la variación epigenética es la pérdida en los requerimientos de auxinas, citoquininas o vitaminas en los callos (Jackson y Lyndon, 1995; Skirvin et al., 1994). Esos cambios en los requerimientos son colectivamente conocidos como la habituación celular o de tejido. Otro cambio epigenético incluye el vigor extremo *ex vitro* (Swartz et al., 1981) que

probablemente está asociado ya sea con la reversión de la juvenilidad de la planta o la eliminación de un virus (Abo El-Nil y Hildebrandt, 1971). El vigor temporal, es otro ejemplo de influencia epigenética y ésta se da cuando en el cultivo de tejidos las plantas se comportan como plántulas y crecen vigorosamente hasta que la floración ha sido inducida. En este tiempo, la planta siempre revierte al fenotipo de la planta madre. Esta condición ha sido explotada para producir plantas jóvenes y vigorosas que se trasplantan fácilmente, crezcan rápido, y se establezcan más rápidamente que las plantas propagadas convencionalmente (Swartz et al., 1981). Por otro lado también se tiene el enanismo pasajero, probablemente de origen epigenético, ya que podría deberse al reducido acceso de los reguladores del medio de crecimiento del cultivo de tejidos. Muchas plantas con enanismo revierten a un hábito de crecimiento normal después de una temporada o dos de crecimiento en el campo o en condiciones de invernadero (Abo El-Nil y Hildebrandt, 1971; McPheeters y Skirvin, 1983).

Se ha visto que las auxinas utilizadas durante el cultivo de los callos o de suspensiones celulares de zanahoria aumentan la variación epigenética al incrementar la tasa de metilación del ADN (LoSchiavo et al., 1989). Del mismo modo, la síntesis de la auxina 2,4-D, que con frecuencia es utilizada en cultivos de callos y células, se asocia a menudo con anomalías genéticas, como la inducción a la poliploidía y la estimulación de la síntesis de ADN que pueden dar lugar a endorreduplicación (Ahmed et al., 2004; Bouman y De Klerk, 2001; Mohanty et al., 2008). Se denomina endorreduplicación a la ocurrencia de dos o más rondas sucesivas de replicación cromosómica sin pasar por ningún periodo mitótico intermedio. Si al terminar un periodo de síntesis de ADN, los cromosomas no entran en mitosis sino que vuelven a pasar por otro periodo S, cada cromosoma tendrá cuatro cromátidas (duplocromosomas), ocho cromátidas (cuadрупlocromosomas) si vuelve a repetirse la anomalía y así sucesivamente (With, 2011).

Se han identificado diferentes perturbaciones que son asociadas a la VS, específicamente a nivel genético, sin embargo, se ha visto que algunas características fenotípicas en las somaclonas no se deben al cambio de la secuencia de ADN o pérdida o ganancia de cromosomas, como es el caso de la palma aceitera (Adler et al., 2011; Jaligot et al., 2000; Jaligot et al., 2004). La palma aceitera es una especie micropropagada y cultivada con fines comerciales para la producción de aceite en Indonesia y Malasia (Corley, 2009), en

varias líneas clonales se ha identificado una condición llamada fruto "envuelto", lo cual genera pérdidas en la producción de aceite por esta anomalía en los frutos. Esto ocurre debido a que en sus flores, las estructuras carnosas parecidas a los carpelos, reemplazan los estambres y da el típico aspecto de fruto "envuelto". El efecto en la producción de aceite puede ser dramático ya que en el mesocarpio de los frutos resultantes se acumulan niveles muy bajos del aceite y, en los casos más graves, las flores son estériles (Jaligot et al., 2000). Se han realizado estudios para detectar el nivel de polimorfismo en esta especie mediante diferentes marcadores moleculares como RAPD (Random Amplification of Polymorphic DNA) y AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) y han revelado que no hay polimorfismos que pudieran estar relacionados con el fenotipo fruto "envuelto". Lo que sugirió que esta condición está dada por mecanismos epigenéticos (Jaligot et al., 2010).

Se ha observado que las auxinas usadas durante los cultivos de callos o suspensiones celulares aumentan la variación epigenética mediante el aumento en el grado de metilación en el ADN (LoSchiavo et al., 1989). Sin embargo, hasta ahora no se conoce si las modificaciones en las histonas también están involucradas en este proceso. Evidentemente, los mecanismos de respuesta al estrés debido al uso de reguladores del crecimiento podrían ser algunos de los mecanismos candidatos a ser regulados por factores epigenéticos. Extremos tales como los provocados en sistemas de micropropagación también pueden producir modificaciones epigenéticas en las histonas (De la Peña et al., 2012a), principalmente por metilaciones que son las que más se han visto afectan la transcripción. Aunque la propagación masiva de plantas elite, para lo cual es necesario asegurar la integridad genética de las regenerantes, está bien establecida, se desconoce totalmente su integridad epigenética.

### **1.3.3. LA EPIGENÉTICA Y LA REMODELACIÓN DE LA CROMATINA**

La genética tradicional ha establecido por mucho tiempo que los factores de la herencia, llamados genes, consistían en secuencias de nucleótidos de ADN y que las variaciones de las características eran consecuencia de mutaciones y recombinaciones. Sin embargo, en 1940, Waddington definió por primera vez a la epigenética como las interacciones entre genes y el ambiente que definen el fenotipo de cada ser vivo (Waddington, 1940). Más adelante, en 1975 se propuso que la metilación del ADN podría ser responsable del

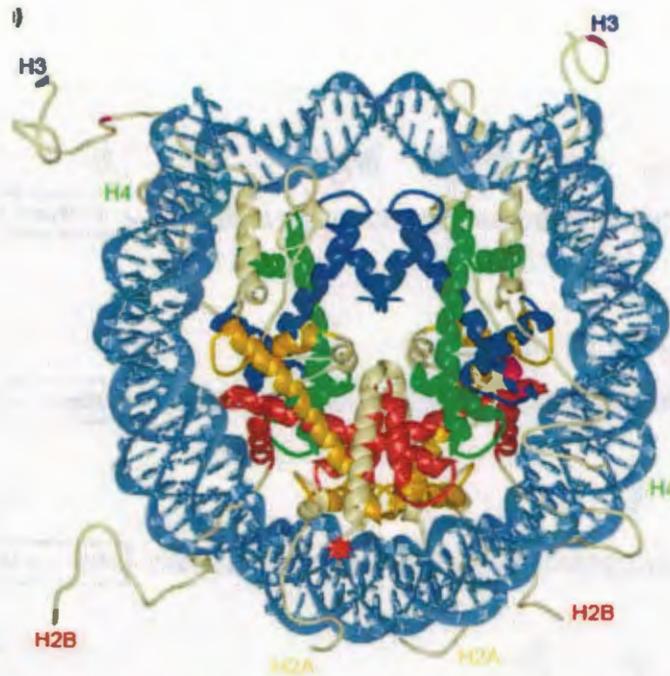
patrón característico de la expresión de ciertos genes durante la mitosis (Holliday, 2006; Riggs, 1975). El control epigenético de la expresión de genes puede ser definido como una alteración heredable somática o meiótica en la expresión de un gen el cual es potencialmente reversible y esto no es debido a la modificación en la secuencia en el ADN (Holliday, 2006). La epigenética es la transmisión de un fenotipo o patrones de expresión génica sin un cambio en la secuencia del ADN. Para el mantenimiento del perfil de expresión específica y la transmisión de ésta a su descendencia, se llevan a cabo los mecanismos epigenéticos (Holliday, 2006; Riggs, 1975).

Los mecanismos epigenéticos actúan en conjunto para favorecer la expresión o represión de uno o varios genes, de forma estable y heredable en los genomas de los eucariotas superiores (Egger et al., 2004). Debido a la interacción de estos mecanismos, la estructura de la cromatina es modificada; estos cambios incluyen la metilación del ADN, modificaciones en las histonas y el ARN de interferencia (ARNi) (Henderson y Jacobsen, 2007; Huettel et al., 2007). Los mecanismos epigenéticos suelen funcionar marcando un gen específico o locus, mediante el marcaje del ADN (metilación de la citosina en la posición 5) o por la modificación postranscripcional de las histonas alrededor de la cual se enrolla el ADN (Goldberg et al., 2007).

#### **1.3.4. LA CROMATINA, EL NUCLEOSOMA Y LAS HISTONAS, UNIDADES DE REGULACIÓN DE LA TRANSCRIPCIÓN**

En eucariotas, el ADN se enrolla alrededor de proteínas conocidas como histonas para formar un complejo ADN-proteína llamado cromatina. Sin embargo, un nivel adicional de información está presente en ellas. Esta información es por lo menos en parte, contenida dentro de la cromatina, pero es independiente de la secuencia de ADN, y se refiere a la información epigenética de un organismo (Van Holde, 1998).

El nucleosoma es la unidad básica repetitiva de la cromatina (Figura 1) y consiste en 147 pares de bases de ADN envuelto alrededor de un grupo de histonas octamérico, que contienen dos copias de cada histona H2A, H2B, H3 y H4 (Kornberg y Lorch, 1999). Este arreglo del nucleosoma se organiza en un núcleo formado por un tetrámero compuesto de dos histonas H3 y dos proteínas histonas H4 y dos dímeros H2A/H2B (Luger, 2003; Luger, 2006).



**Figura 1.** Vista frontal de la partícula repetitiva del nucleosoma. Los dominios de las histonas H2A, H2B, H3 y H4 son de color amarillo, rojo, azul oscuro y verde, respectivamente. Las colas de las histonas y las extensiones se muestran en blanco, el ADN se muestra en azul claro. Imagen tomada de Luger (2003).

El ADN del nucleosoma puede estar compactado por la asociación de la histona conectora H1 y proteínas no histonas adicionales, así como por un alto orden de enrollamiento y plegamiento de la fibra de cromatina. La organización de la cromatina no solamente se restringe al acceso físico de los factores nucleares del ADN, ahora es claro que las modificaciones en las histonas pueden cambiar la conformación de la cromatina y regular la expresión genética (Felsenfeld y Groudine, 2003).

Las histonas son en su mayoría globulares a excepción de su N-terminal o "cola", que no son estructuradas. Una característica notable de las histonas, y en particular de la cola, es el gran número y tipo de modificaciones de los residuos que poseen. Hay por lo menos ocho diferentes tipos de modificaciones que se encuentran en las histonas (Figura 2). Los extremos N-terminal de las histonas pueden ser covalentemente modificados por acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación y ubiquitinación (Kouzarides, 2007).



**Figura 2.** Modificaciones en los residuos del extremo N-terminal de las histonas H3, H4, H2A y H2B (Allis et al., 2009).

Algunas modificaciones, incluyendo la acetilación y la fosforilación, son reversibles y dinámicas y están asociadas con la expresión inducible de genes individuales. Se ha determinado que otras modificaciones, tales como la metilación, son más estables y están involucradas en el mantenimiento, a largo plazo, del estado de la expresión en las regiones del genoma. Esas modificaciones ocurren en múltiples específicos sitios en las histonas, y éstas pueden sugerir que las histonas pueden actuar como plataformas de señalización, integrando rutas de señalización corriente arriba para provocar respuestas nucleares, tales como la activación de la transcripción o su represión (Cheung, 2005). Además, con algunas posibles combinaciones de las modificaciones que además pueden ocurrir en diferentes sitios en las histonas, éstas pueden dar distintos resultados en términos de las funciones reguladas de la cromatina. Esta idea, formalmente propuesta

como la hipótesis del código de la histona, ha estado sujeto a una intensa investigación durante los últimos años (Strahl y Allis, 2000; Turner, 2000).

El repertorio de modificaciones y sus combinaciones (a lo que se le denomina el código de las histonas) juega un papel esencial en la regulación de los cambios dinámicos en la estructura de la cromatina, influenciando últimamente la transcripción de genes (Berger, 2007) en respuesta a diversos estímulos exógenos y endógenos incluyendo el estrés, ataque de patógenos, temperatura, luz y hormonas (Anzola et al., 2010; Chen y Tian, 2007). Se ha observado que la acetilación en la lisina 14 (H3K14 Ac), la fosforilación en la serina 10 (H3PS10) y la metilación en la lisina 4 (H3K4me) están asociadas con la activación de la expresión de genes (Figura 3), mientras que las metilaciones en las lisinas 9 y 27 (H3K9me y H3K27me, respectivamente) y la fosforilación en la serina 28 (H3PS28), se relacionan con la represión de genes (Figura 4) (Hebbes et al., 1988).



**Figura 3.** Modificaciones en la histona H3 relacionadas con la formación de eucromatina.

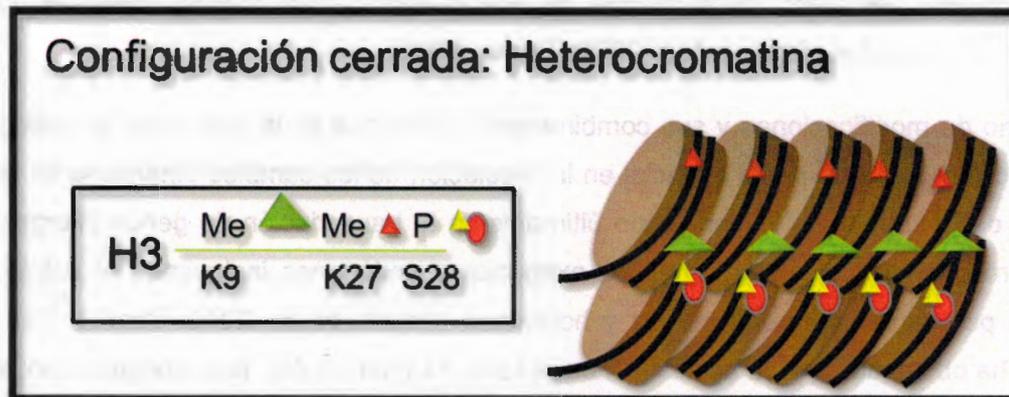


Figura 4. Modificaciones en la histona H3 relacionadas con la conformación de heterocromatina.

### 1.3.5. HETEROCROMATINA Y EUCROMATINA

Utilizando colorantes básicos para la tinción de la cromatina y visualizarla en el microscopio, Heitz, en 1928, señaló que la cromatina de las células eucariotas pueden ser ampliamente distinguida en dos formas: la heterocromatina, como la más colorida, y la eucromatina, como la conformación que estaba menos coloreada. La heterocromatina se definió como las regiones del núcleo que no se decondensan durante la interfase, mientras que se observó que la eucromatina se descondensa fácilmente a la salida de la mitosis (Heitz, 1928).

Se ha postulado que la heterocromatina está formada por las regiones funcionalmente inactivas del genoma, en tanto que la eucromatina es la región del cromosoma en la que se produce la actividad real del gen. A nivel molecular, la heterocromatina está formada por regiones del cromosoma que no permiten el acceso a las proteínas que interaccionan con el ADN (Weintraub y Groudine, 1976), y contienen pocos genes que se activan al final de la fase S. Por el contrario, la eucromatina es más abierta y accesible a las nucleasas, y es rica en genes que se transcriben al inicio de la fase S (Holmquist, 1987). En esta región de la cromatina se puede dar el fenómeno denominado, Efecto de la Posición de Abigarramiento (PEV) descrito por Muller en *Drosophila* en 1930. Este fenómeno sucede cuando los genes que se encuentran en la eucromatina se yuxtaponen a secuencias heterocromáticas por reordenamiento cromosómico o transposición y pueden llegar a ser

silenciadas. El grado de silenciamiento varía de una población clonal a otra y por lo tanto da lugar a fenotipos variados (Muller, 1930). Se han identificado un gran número de genes que modifican la presencia del efecto PEV y se clasifican en E (var)s (potenciadores de la PEV) o Su (var)s (supresores de la PEV) (Grewal y Elgin, 2007). La caracterización de los productos de estos genes ha demostrado que algunos tienen un papel estructural en la formación de la heterocromatina o en funciones en el silenciamiento de los genes.

### 1.3.6. METILACIÓN DE LAS HISTONAS

Es bien sabido que las histonas, particularmente las histonas H3 y la H4, son metiladas en un número elevado de residuos de lisinas (Lys; K) y argininas (Arg; R). La mayoría de los sitios de metilación de K en las histonas identificadas hasta ahora son: Lys4, Lys9, Lys27, Lys36, Lys79 en H3 y Lys20 en la histona H4 (Figura 2). Además, los residuos de lisina pueden ser metilados una, dos o tres veces y esta metilación diferencial provee después una diversidad funcional para cada sitio de metilación en las lisinas (Kouzarides, 2007). Esta modificación es catalizada por la familia de las proteínas histona metiltransferasa (HMT; Cuadro 1). Las lisina metiltransferasas de histonas contienen un dominio catalítico llamado SET (Suppressor of variegation, Enhancer of zeste and Irithorax) (Tschiersch et al., 1994). Muchas de las HMTs han sido identificadas en *Drosophila* en la que están implicadas en la regulación de la expresión génica (silenciamiento de los *loci*, debido a fenómenos epigenéticos). Las lisinas metiladas pueden ser selectivamente reconocidas y se unen a proteínas que contiene un dominio de la "familia ROYAL" (por ejemplo, chromodominio, dominio tudor, dominio MBT) o PHD, un dominio en forma de dedos de zinc (homeodominio en plantas). Los dominios de unión específicos para la lisina reconocen a la metil-lisina y sus niveles de metilación (es decir, mono-, di- o tri-metilación). Recientemente, se han descrito proteínas que pueden eliminar los grupos metilo de las histonas (Kouzarides, 2007). Las amino oxidasas como la LSD1 puede eliminar los grupos metilo (Brosch et al., 2008; Kouzarides, 2007; Shi et al., 2004). Se ha demostrado, en algunos casos, que otras modificaciones de las histonas afectan el nivel de metilación de la lisina (ejemplos: H2BK123ub y H3R2me en H3K4me, H3S10ph en H3K9me) (Kouzarides, 2007).

Cuadro 1. Principales metilaciones en H3 y metiltransferasas de histonas.

Modificación	Metiltransferasa de histona	Referencia
H3K4me2	ATX1(ARABIDOPSIS HOMOLOGS OF TRITHORAX) CLF (CURLY LEAF)	(Alvarez-Venegas y Avramova, 2005)  (Doyle y Amasino, 2009)
H3K4me3	ATX1(Arabidopsis homologs of trithorax) EFS/SDG8 (EARLY FLOWERING IN SHORT DAYS/SET DOMAIN GROUP 8) CLF	(Alvarez-Venegas y Avramova, 2005)  (Kim et al., 2005)  (Saleh et al., 2008)
H3K9me2	KYP (KRYPTONITE)	(Jackson et al., 2004)
H3K27me3	CLF; MEA (MEDEA); SWN (SWINGER)	(Makarevich et al., 2006; Schubert et al., 2006)
H3K36me2	EFS/SDG8	(Zhao et al., 2005)

En otros estudios se ha observado que las marcas de metilación en las histonas son reversibles y se pueden mantener por varias generaciones (Wang et al., 2004). Algunas de las marcas características de cambios epigenéticos en la histona H3 se describen a continuación.

### 1.3.6.1. H3K4me<sup>3</sup>

La metilación de la histona H3 en la lisina 4 (H3K4) es una modificación muy conservada y que se encuentra presente en los promotores de los genes transcritos activamente en el que parecen tener un papel en la iniciación de la transcripción (Kouzarides, 2007; Rival et

al., 2010). Esta modificación es catalizada en la levadura por la HMT Set1 que forma parte de un complejo multiproteico conocido como COMPASS (Bhaumik y Shilatifard, 2007).

En *Arabidopsis thaliana*, la familia TRITHORAX (perteneciente al grupo trithorax, TrxG) comprende 12 genes con dominio SDG (SET DOMAIN GROUP), de los cuales, ATX1 está involucrado en la trimetilación de H3K4 (H3K4me<sup>3</sup>) necesaria para el desarrollo normal de la raíz, las hojas y el crecimiento de los órganos florales (Alvarez-Venegas et al., 2003; Alvarez-Venegas y Avramova, 2005). Esta metilación también está involucrada en la ruta de señalización al estrés abiótico, ya que se ha observado que la expresión de los genes que se inducen en respuesta a la sequía están asociados con un incremento en la trimetilación de la H3K4 y la acetilación de la H3K9 en *Arabidopsis* (Kim et al., 2008).

En *Arabidopsis* se han identificado múltiples metiltransferasas putativas de la marca H3K4, homóloga a SET1 (Alvarez-Venegas y Avramova, 2002; Zhao y Shen, 2004). Varias líneas de evidencia sugieren que en *Arabidopsis* distintas metiltransferasas de la marca H3K4 puede contribuir a la acumulación de H3K4me<sup>1</sup>, H3K4me<sup>2</sup> y H3K4me<sup>3</sup> en un loci específico. Por ejemplo, la pérdida de la metiltransferasa H3K4 ATX1 (homólogo de *Arabidopsis* de Trithorax 1) conduce a una leve reducción en el nivel de metilación y elimina H3K4me<sup>3</sup> en lugares específicos, pero no tiene efecto en H3K4me<sup>2</sup> (Alvarez-Venegas y Avramova, 2005).

Por el contrario, la pérdida de una metiltransferasa de la marca H3K4 ATX2 resulta en defectos en H3K4me<sup>2</sup> en el locus específico pero no parece afectar a H3K4me<sup>3</sup> (Saleh et al., 2008). Interesantemente, ATX1 exhibe varias anomalías del desarrollo en mutantes, mientras que el mutante ATX2 es fenotípicamente normal (Alvarez-Venegas et al., 2003; Pien et al., 2008). Además, los resultados de los estudios de los perfiles de transcripción indican que ATX1 y ATX2 podrían regular en gran medida dos conjuntos de genes no superpuestos (Saleh et al., 2008). Por lo tanto, parece que puede haber diferencias en el mecanismo, localización y función de las marcas H3K4me<sup>1</sup>, H3K4me<sup>2</sup> y H3K4me<sup>3</sup>.

### 1.3.6.2. H3K9me<sup>2</sup>

La metilación de la histona H3 en la lisina 9 (H3K9) es una modificación altamente conservada, generalmente asociada con la heterocromatina y se encuentra en casi todos los eucariotas con la notable excepción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* (Krauss, 2008). La enzima responsable de esta modificación está altamente conservada y se le conoce como Su (var) 3-9 en *Drosophila*, Set39h1, Set39h2, G9A y ESET en los seres humanos. Los miembros de la familia Su (var)3-9 son activos en plantas como *Arabidopsis*. La metilación en la lisina 9 de la histona H3 es una marca crítica para el silenciamiento y la metilación del ADN (Jackson et al., 2004). La marca H3mK9 es dependiente de la metilación ADN, esta marca es conferida por la metiltransferasa CHROMOMETHYLASE3, que se une a H3mK9 indirectamente a través de una proteína HP1-LIKE (Gendrel et al., 2002).

El mayor logro en el entendimiento de la función de la metilación en lisina de H3 fue el descubrimiento que uno de los bien estudiados genes supresores de la variegación Su-(var) que codifican una HMT (Lee et al., 2004; Sims et al., 2003). En *Arabidopsis* el gen que codifica a la proteína KRYPTONITE es un miembro de la familia de las metiltransferasas de histonas Su (var)3-9. En el estudio realizado por Jackson y colaboradores (Jackson et al., 2004) en plantas con la mutación de *kryptonite*, encontraron que la dimetilación de la histona H3 en el residuo de lisina 9 casi se ha perdido, pero el nivel de monometilación de la histona H3 en el residuo de lisina 9 está ligeramente reducido. KRYPTONITE recombinante puede adicionar uno o dos grupos metilo pero no tres. También observaron una proteína relacionada a KRYPTONITE, SUVH6, la cual realiza la metilación en el residuo de la lisina 9 en la histona H3 con un espectro similar a la de KRYPTONITE; esto sugiere que los miembros de la múltiple familia Su (var)3-9 son activos en *Arabidopsis* y que la dimetilación de H3K9 es una marca crítica para el silenciamiento de genes y la metilación del ADN.

### 1.3.6.3. H3K27me<sup>2</sup>

La histona H3 puede ser metilada en la lisina 27 (H3K27) en muchos organismos, incluyendo las plantas; la reacción es catalizada por la EZH2, un componente del complejo Polycomb 2 (PCR2) (García et al., 2007). La H3K27me se asocia con el

silenciamiento de genes que regulan el desarrollo. Hasta ahora solo siete genes en plantas han mostrado estar asociados con H3K27me<sub>3</sub>, incluyendo: CURLY LEAF (CLF), AGAMOUS, MEDEA, SHOOT MERISTEMLESS (STM), PHERES1, FUSCA3 (FUS3), y AGAMOUS-LIKE 19 (AGL19).

Los estudios realizados hasta la fecha son consistentes con la hipótesis de que los defectos observados en el crecimiento por la mutación de MEA, CLF (CURLY LEAF), y / o SWN (Swinger) son el resultado de una pérdida de la H3K27me<sub>3</sub> y de la represión de los reguladores del desarrollo, en particular en los genes asociados con el desarrollo de la semilla. *PHERES1* (*PHE1*) es un gen tipo MADS-box que se expresa de forma transitoria en el embrión temprano y en el desarrollo del endospermo y luego es reprimido posteriormente y está enriquecido en la marca H3K27me<sub>3</sub> (Zhang y Ogas, 2009). Por otro lado, se ha observado que en semillas mutantes de *mea*, se reducen los niveles de H3K27me<sub>3</sub> y los niveles de transcripción de *PHE1* decrecen hasta parecer semillas silvestres. Esta represión probablemente contribuya al fenotipo de aborto de semillas de *mea*, la baja expresión de *PHE1* rescata parcialmente este fenotipo (Köhler et al., 2003). CLF y SWN juegan un papel equivalente al de MEA en el tejido vegetal, en plantas *clf* y *swn*, H3K27me<sub>3</sub> se reduce en el locus de *PHE1* y los niveles de su transcripción son elevados (Makarevich et al., 2006). Del mismo modo, *Fus3* es reprimida por MEA durante el desarrollo embrionario y su represión en el tejido vegetal depende de CLF y SWN (Makarevich et al., 2006). Tal vez lo más sorprendente, es que las plantas *clf* y *swn* desarrollan callos en medios sintéticos y pueden producir embriones somáticos (Chanvivattana et al., 2004; Köhler y Villar, 2008). En *Arabidopsis*, se ha demostrado que CLF y/o SWN promueven la trimetilación de H3K27 y la represión de: AGAMOUS (AG), un gen que promueve la identidad de los órganos en las flores; MERISTEMLESS SHOOT (STM), un gen que ayuda a mantener los brotes y los meristemas florales (Schubert et al., 2006), el represor floral FLOWERING LOCUS C (FLC) (Finnegan y Dennis, 2007) y AGL19 (Schönrock et al., 2006).

Es probable que H3K27me<sub>3</sub> sirva de plataforma para reprimir la asociación de proteínas efectoras específicas para la transcripción en plantas, como es el caso de LHP1, que codifica para una proteína que es similar a la proteína HP1 en las células animales que favorece la heterocromatina (Gaudin et al., 2001). Se requiere LHP1 además de la CLF y

SWN para la inducción de la vernalización y el silenciamiento epigenético de FLC (Mylne et al., 2006; Sung et al., 2006).

#### **1.3.6.4. H3K36me<sup>2</sup>**

Esta marca epigenética es llevada a cabo por la histona metiltransferasa SET2, que se asocia con la actividad de elongación de la ARN polimerasa tipo II en todos los eucariotas examinados (Bhaumik y Shilatifard, 2007). H3K36me se distribuye en toda la región de codificación de los genes activos en los que puede tener un papel en la actividad de elongación de la polimerasa. En *Arabidopsis*, SDG8/ASHH2/EFS/CCR1 está involucrado en la H3K36me<sup>2</sup> y la H3K36me<sup>3</sup>, e implicada en la regulación del tamaño de los órganos, brote de las ramas, fertilidad y la composición de carotenoides (Cazzonelli et al., 2009; Grini et al., 2009; Soppe, 1999; Xu et al., 2008).

La metiltransferasa SET DOMAIN GROUP8 (SDG8) juega un papel crucial en la defensa de las plantas contra patógenos de naturaleza fúngica como *Alternaria brassicicola* y *Botrytis cinerea*, mediante la regulación de los genes que se encuentran en la ruta de señalización del ácido jasmónico (AJ) y/o el etileno. Mediante análisis en la inmunoprecipitación de la cromatina, Berr y colaboradores (Berr et al., 2010) encontraron que en la mutante *sdg8-1* expuesta a estos patógenos, existen cambios en la metilación de la lisina 36 en la histona H3 en genes que codifican para MAPKs kinasas (Mitogen-activated protein kinases), muy bien caracterizados y que son genes marcadores de defensa como *MKK3* y *MKK5*. Esto normalmente ocurre durante la infección con patógenos fúngicos en plantas normales que han sido tratadas con jasmonato de metilo. Por ello se ha propuesto que la metilación llevada a cabo por la metiltransferasa SDG8 sirve como una memoria a la planta para permitir la transcripción de los genes que están implicados en la defensa a patógenos, y de esta manera se permite un rápido establecimiento en la inducción transcripcional.

### 1.3.7. PROTEÍNAS ASOCIADAS A LA CROMATINA.

#### 1.3.7.1. HISTONA H1

Además de las histonas H2A, H2B, H3 y H4, la mayoría de los eucariotas tienen una o más variantes de la histona H1. Las variantes de la histona H1 están presentes en la cromatina y se unen al ADN libre entre nucleosomas. Esto se cree que estabiliza la cromatina y favorece la formación de heterocromatina. Variantes de la histona H1 han demostrado tener un papel en la represión en el desarrollo de genes regulados (Gilbert et al., 2003).

#### 1.3.7.2. PROTEÍNAS POLYCOMB

Las proteínas POLYCOMB comprenden dos tipos de complejos proteínicos, PCR1 (Polycomb Repressive Complex 1) y PCR2 (Polycomb Repressive Complex 2). En los animales, los complejos Polycomb tienen un papel en la regulación epigenética de la memoria celular, la renovación celular, pluripotencia y autorenovación de células madre (Bantignies y Cavalli, 2006).

El complejo central PCR2 consiste en el dominio SET y el factor de remodelación del nucleosoma Nurf55 de 55 kDa. PCR2 cataliza las H3K27me3 represivas. PCR1 consiste en un cromodominio y las proteínas: Polycomb (Pc), dRing, Posterior sex combs (Psc) y Polyhomeotic (Ph). El cromodominio de Pc se une a H3K27me3, mientras dRing cataliza la monoubiquitinación de la histona H2A en la lisina 119 (de Napoles et al., 2004). PCR1 y PCR2 están presentes en la mayoría de los animales, mientras que las plantas sólo tienen al complejo PCR2. La falta de PCR1 y la modificación que cataliza (H2AK119ub) en plantas puede ser, al menos parcialmente, responsable del mayor potencial de desdiferenciación en comparación con el de los animales. Polycomb Repressive Complex2 (PRC2) está involucrado en la represión de la transcripción. El complejo PCR2 de *Arabidopsis* juega un rol crítico en muchos procesos biológicos como el parecido parental en la formación de la semilla, el mantenimiento celular del tallo, la represión estable de *FLC* bajo la vernalización en la promoción de la floración y otros (Huh et al., 2008; Köhler et al., 2003; Köhler y Villar, 2008).

Existen tres complejos Polycomb –PRC1, PRC2 y PhoRC- que trabajan juntos para silenciar los genes. El mejor modelo que se tiene actualmente propone que el complejo

PhoRC se une al ADN y recluta al complejo PRC2 al locus. Entonces se recluta el complejo PRC1 en el sitio H3K27 de la histona 3 el cual ha sido previamente marcado por el complejo PRC2.

Los homólogos en Arabidopsis que tienen un profundo efecto en el programa celular de la impronta genética pertenecen a la proteína MEDEA (MEA) del dominio SET del grupo Polycomb, a la proteína dedo de zinc C2H2 FERTILIZATION INDEPENDENT SEED2 (FIS2) y dos proteínas WD-40, las proteínas FERTILIZATION INDEPENDENT ENDOSPERM (FIE) y la MULTICOPY SUPPRESSOR OF IRA1 (MSI1). Estos componentes del complejo PRC2 de las plantas, como sus contrapartes en los animales, forman un complejo de 600 kDa y es necesario para la metilación de su loci blanco. Se ha propuesto la existencia de tres diferentes complejos PRC en las plantas: las proteínas FERTILIZATION INDEPENDENT SEED (FIS) están involucradas en la supresión del desarrollo de la semilla sin fertilización, el complejo EMBRYONIC FLOWER (EMF) previene la floración precoz y el complejo VERNALIZATION (VRN) está involucrado en la respuesta de vernalización (la adquisición de la competencia para florear después del invierno) (Huh et al., 2008; Schatlowksi et al., 2008).

#### **1.4. AGAVE COMO MODELO DE ESTUDIO**

El género Agave es endémico de América; en México se encuentran 150 de sus 200 especies (75% de las especies del género) (García-Mendoza, 2002); México es su centro de domesticación. En México, las especies de agave se distribuyen de manera natural, desde el nivel del mar hasta los 3,000 m, con una marcada abundancia entre los 1,000 y 2,000 m. Se encuentran en todos los estados de la república con excepción del de Tabasco. Los agaves crecen en dunas costeras, matorrales xerófilos, selvas bajas caducifolias, bosques de pino-encino e incluso en los bosques mesófilos de montaña. Las regiones de mayor riqueza de especies son el Valle de Tehuacán-Cuicatlán, la Sierra Madre Occidental, la zona árida entre Tamaulipas y San Luis Potosí, la zona árida hidalguense, el Eje Neovolcánico en los límites de Michoacán y el Estado de México, el centro de Jalisco, las montañas de Oaxaca y Chiapas, y los límites de la altiplanicie y la Sierra Madre Oriental (García-Mendoza, 1995). Su historia de diversificación bajo cultivo y

selección humana, comenzó hace aproximadamente 9,000 años y aunque su diversidad agromorfológica a nivel intraespecífico ha sido poco estudiada, existen indicios de que durante su utilización se han generado gran cantidad de variantes (Callen, 1965). Las variedades cultivadas de forma tradicional o comercial durante el tiempo que lleva su aprovechamiento en México no han sido descritas académica o legalmente, por lo que las unidades taxonómicas más utilizadas para describir la diversidad de estos recursos fitogenéticos en México han sido, hasta ahora, especie, subespecie y variedad botánica (Colunga-García-Marín y Zizumbo-Villarreal, 2006).

Los datos disponibles indican que las variedades cultivadas tradicionalmente mantienen una diversidad genética similar a la encontrada en poblaciones silvestres (Vargas-Ponce et al., 2009). Los productores tradicionalmente seleccionan hijuelos vigorosos propagados vegetativamente, algunos poliploides y cuando crecen y se convierten en plantas adultas (García-Mendoza, 2002). Por el contrario, en las poblaciones manejadas en plantaciones comerciales su diversidad ha disminuido cada vez más, hasta llegar prácticamente a la homogeneidad genética. Esta tendencia ha sido favorecida por la posibilidad de propagar vegetativamente las variedades seleccionadas y, más recientemente, por la utilización de técnicas de propagación clonal. Tal es el caso del henequén (Galindo-Jaimes et al., 2002; Robert et al., 1987a; Robert et al., 1992) y el agave tequilero (Gil-Vega et al., 2006; Portillo et al., 2007; Rodríguez-Sahagún et al., 2011).

La mayor parte de la diversidad de los recursos genéticos del género es utilizada por los agricultores tradicionales, tanto para autoconsumo como para comercialización. Solo unos cuantos agricultores y compañías la utilizan con fines comerciales sin hacer un consumo directo de ella. Los agricultores tradicionales generalmente emplean una gran cantidad de variedades locales y mantienen una amplia base genética de ellas. Las agroindustrias, en contraste, hacen un uso muy restringido de la diversidad y mantienen una base genética estrecha. En un estudio en el sur de Jalisco, por ejemplo, (Colunga-García-Marín y Zizumbo-Villarreal, 2006) encontraron que un solo productor mantenía 11 variedades mezcaleras dentro de su parcela, mientras que en la misma zona, y en toda su área de distribución, la agroindustria del tequila solo utiliza la variedad azul de *A. tequilana*. Lo mismo ocurre en la agroindustria henequenera, que solo utiliza la variedad tradicional Sac ki de *A. fourcroydes*.

El cultivo del henequén en Yucatán pasó, de principios del siglo XX a los años ochenta, de ocho a tres variantes cultivadas, una de ellas prácticamente extinta y otra con una densidad sumamente baja (Colunga-García-Marín y Zizumbo-Villarreal, 2006). De forma similar, el cultivo del agave tequilero en Amatitlán-Tequila, Jalisco, pasó, en ese mismo periodo, de nueve a cinco variantes cultivadas, con el predominio prácticamente exclusivo de la variedad azul (Valenzuela-Zapata, 1994). Instituciones como el Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY), el Centro de Investigación y Asistencia del Estado de Jalisco (CIATEJ), el Centro de Investigación Avanzados del Politécnico Nacional (Cinvestav), la Universidad Autónoma de Chiapas (UACH), y empresas como Tequila Herradura, están estudiando y financiando programas de mejoramiento del henequén y el tequila seleccionando líneas elite y propagándolas a escala muy pequeña (Eastmond et al., 2000). Dada la estrecha base genética de estos cultivos, debido a su propagación vegetativa, y a su ciclo de vida muy largo, se está buscando aumentar su diversidad por medio de técnicas biotecnológicas. De forma particular, en el CICY se ha desarrollado exitosamente un programa de mejoramiento para agaves, mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

#### **1.4.1. IMPORTANCIA ECONÓMICA DEL AGAVE Y SU PROBLEMÁTICA.**

El género *Agave* representa un importante cultivo en muchos países. *Agave fourcroydes* es el cultivo de fibra más importante en las áreas tropicales y subtropicales de África, y es un cultivo con un alto potencial de exportación en China (Lingling et al., 2009). Entre los usos de los agaves se encuentra la elaboración de mezcal, en México se conocen 22 especies mezcaleras del género *Agave*, de ellas *A. angustifolia* es la más empleada para la elaboración de esta bebida y la más ampliamente distribuida en nuestro país (García-Mendoza, 1995). Para la producción de las bebidas fermentadas las plantas son arrancadas del suelo y el meristemo central es colectado y procesado para hacerlo jugo, el cual es fermentado, destilado y añejado. Otra especie, *A. tequilana* Weber var. Azul es usado para la producción de tequila y, a pesar de los beneficios que esta industria genera, son pocos los recursos que se destinan para la investigación y muchos aspectos sobre la diversidad genética no son conocidos (Torres-Morán et al., 2010).

El género *Agave* tiene tres mecanismos de reproducción de forma natural: vástagos que emergen de los rizomas, semillas y pequeñas plántulas llamadas bulbillos que aparecen en la inflorescencia (Torres-Morán et al., 2010). Los productores tradicionalmente han usado los vástagos para generar nuevas plantaciones. Cuando es necesario, las especies también son propagadas por métodos de cultivo *in vitro*, principalmente usando brotes axilares, para producir plantas uniformes. Sin embargo, el uso por mucho tiempo de este método ha resultado en la aparición de VS, debido a las diferencias genéticas en las células somáticas utilizadas (Pérez-Molphe, 1999) lo cual puede causar anomalías anatómicas en las hojas, raíces y alteraciones en los procesos fisiológicos (Rohr et al., 2003).

La VS se ha detectado en agaves utilizando métodos moleculares para distinguir entre plantas de diferentes tipos y orígenes (Alfaro et al., 2007; Infante et al., 2006; Sánchez-Teyer et al., 2009). Se ha reportado a nivel genético que los cambios en el genoma del género *Agave* pueden ser causados por retrotransposones (Bousios et al., 2007; Infante et al., 2006; Madlung y Comai, 2004; Osorio-Zambrano et al., 2006; SanMiguel y Bennetzen, 1998). También, se ha observado una variabilidad genética en las plantas de *A. tequilana* generado en el campo por el proceso natural de propagación asexual de vástagos a partir de rizomas, así como en los generados en el laboratorio por los métodos de cultivo *in vitro* (embriogénesis somática y yemas axilares); así como en *A. fourcroydes* (González et al., 2003; Infante et al., 2006), *A. cocui* (Osorio-Zambrano et al., 2006), *A. americana*, *A. angustifolia*, *A. deserti* y *A. sisalana* (Infante et al., 2006).

Las diferencias genéticas encontradas en las plantas de agave en el campo, como en las plantas producidas *in vitro*, podrían ser una excelente fuente de VS, que puede tener importantes consecuencias para la mejora de las plantas y su propagación comercial. Esta variación encontrada en cultivos *in vitro* y en plantas de campo es un excelente sistema de estudio para investigar si los reguladores del crecimiento, específicamente las auxinas, que se utilizan de manera cotidiana para micropropagar agave puede tener repercusiones epigenéticas que se conserven en campo influyendo así la susceptibilidad o resistencia de las plantas micropropagadas a condiciones ambientales adversas.

## 1.5. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN

1. ¿Cuál es la variación somaclonal en *Agave* expuesto a diferentes tipos y concentraciones de auxinas?
2. ¿Cómo afectan los diferentes tipos y concentraciones de auxinas las modificaciones de las histonas?
3. ¿Qué auxina es la que induce mayor variación epigenética en *Agave*?
4. ¿Qué modificaciones epigenéticas aparecen en esta variación?
5. ¿Las modificaciones que se observan *in vitro* se mantienen en campo?

## 1.6. HIPÓTESIS

Si las auxinas usadas en la micropropagación de los agaves son las que provocan modificaciones en la histona H3, entonces la aplicación de estos reguladores del crecimiento en condiciones *in vitro* influirá en el patrón de metilación de la histona H3 tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*.

## 1.7. OBJETIVOS

### 1.7.1. OBJETIVO GENERAL

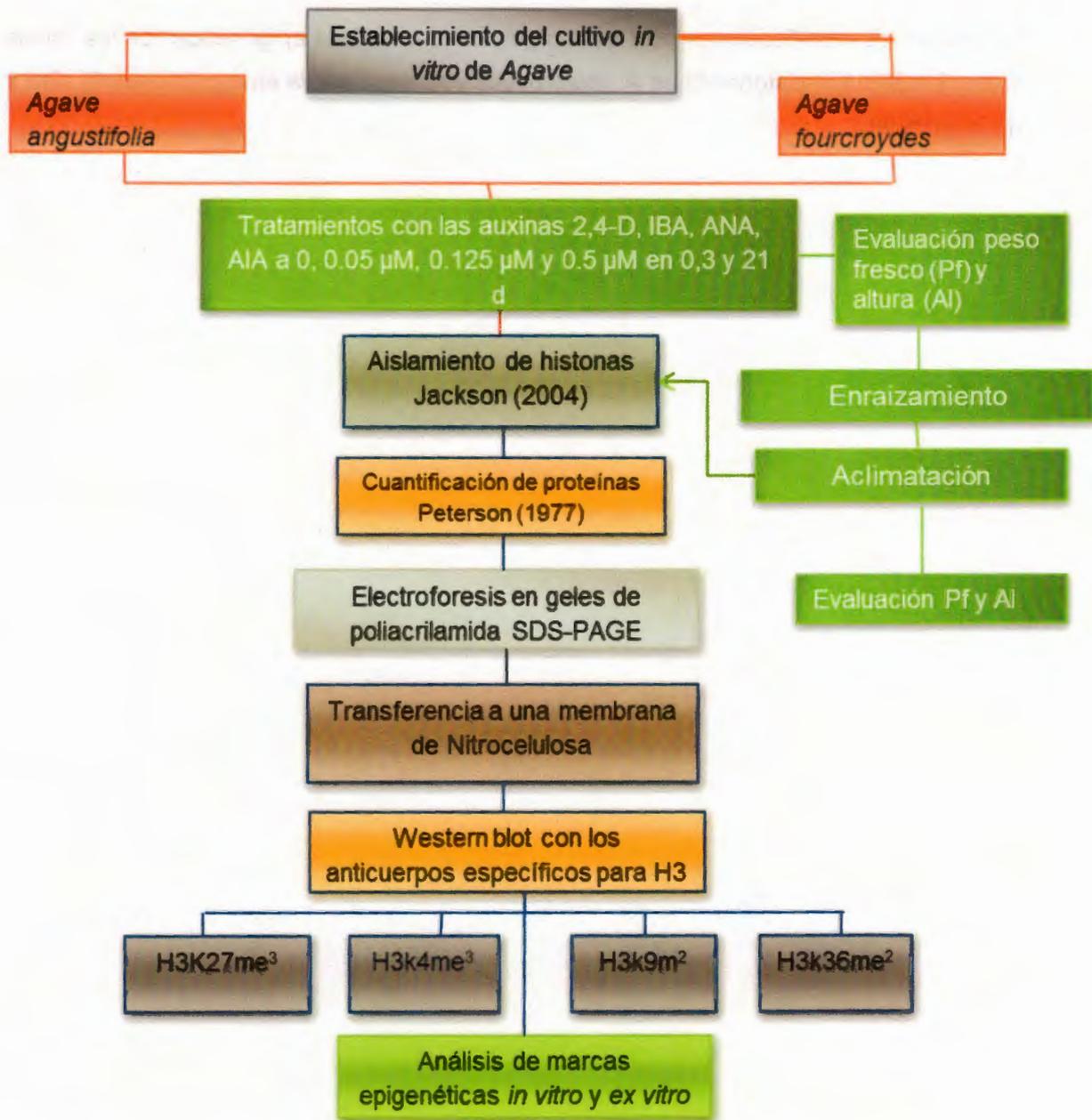
Evaluar el efecto de las auxinas en las modificaciones post-transcripcionales de la histona H3 en plantas de *Agave fourcroydes* y *A. angustifolia* en condiciones *in vitro* y de invernadero.

### 1.7.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Establecer el cultivo *in vitro* de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* en diferentes concentraciones de ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido naftalenacético (ANA), ácido 3-indolacético (AIA) e ácido indolbutírico (IBA).



## 1.8. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.



---

---

## 1.9. BIBLIOGRAFÍA

- Abo El-Nil M. M. y A. C. Hildebrandt, Differentiation of virus symptomless geranium plants from anther callus, *Plant Discussion Reporter*, 55: 1017-1020, (1971).
- Adler S., et al., Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*, *Annals of Botany*, 1-10, (2011). (Abstract)
- Ahmed E. U., T. Hayashi y S. Yazawa, Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants, *Science Horticulture*, 100: 159, (2004).
- Alfaro R. G., J. P. S. Legaria y J. E. Rodríguez, Genetic diversity in *Agaves pulqueros* populations (*Agave* spp.) del nororiente del Estado de México., *Fitotecnia Mexicana*, 30: 1-12, (2007).
- Allis C.D., T. Jenuwein, D. Reinberg y M.-L. Caparros, *Epigenetics*, CSH Press/Cold Spring Harbor Laboratory Press, (2009).
- Alvarez-Venegas R. y Z. Avramova, SET-domain of the *Su8var)3-9*, *E(z)* and trithorax families, *Genetics*, 285: 25-37, (2002).
- Alvarez-Venegas R. y Z. Avramova, Methylation patterns of histone H3 Lys 4, Lys 9 and Lys 27 in transcriptionally active and inactive *Arabidopsis* genes and in *atx1* mutants, *Nucleic Acids Res.*, 33: 5207, (2005).
- Alvarez-Venegas R., S. Pien, M. Sadler, X. Witmer, U. Grossniklaus y Z. Avramova, *ATX-1*, an *Arabidopsis* homolog of trithorax, activates flower homeotic genes., *Current Biology*, 13: 627-637, (2003).
- Anzola J. M., T. Sieberer, M. Ortbauer, H. Butt, B. Korbei, I. Weinhofer, A. E. Mullner y C. Luschnig, Putative *Arabidopsis* transcriptional adaptor protein (*PROPORZ1*) is required to modulate histone acetylation in response to auxin, *Proceedings of the national Academy of Sciences*, 107: 10308-10313, (2010).
- Araújo L. G., A. S. Prabhu, M. C. Filippi y L. Chaves, RAPD analysis of blast resistant somaclones from upland rice cultivar IAC 47 for genetic divergence., *Plan cell, Tissue and Organ Culture*, 67: 165-172, (2001).
- Bantignies F. y G. Cavalli, Cellular memory and dynamic regulation of polycomb group proteins, *Current Opinion in Cell Biology*, 18: 275-283, (2006).
- Berdasco M., R. Alcázar y M. V. García-Ortíz, Promoter DNA methylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* cells, *PLoS ONE*, 3: e3306, (2008).

- 
- Berger S. L., The complex language of chromatin regulation during transcription, *Nature*, 447: 407-412, (2007).
- Berr A., E. J. McCallum, A. Alioua, D. Heintz, T. Heitz y W. H. Shen, Arabidopsis Histone Methyltransferase SET DOMAIN GROUP8 mediates induction of the jasmonate/ethylene pathway genes in plant defense response to necrotrophic fungi, *Plant Physiology*, 154: 1403-1414, (2010).
- Bhaumik S. R. y A. Shilatifard, Covalent modifications of histones during development and disease pathogenesis., *Natural Structural Molecular Biology*, 14: 1008-1016, (2007).
- Bouman H. y G. J. De Klerk, Measurement of the extent of somaclonal variation in begonia plants regenerated under various conditions. Comparison of three assays, *Theor Appl Genet*, 102: 111-117, (2001).
- Bousios A., I. Saldana-Oyarzabal, A. G. Valenzuela-Zapata, C. Wood y S. R. Pearce, Isolation and characterization of Ty1-copia retrotransposon sequences in the blue agave (*Agave tequilana* Weber var. azul) and their development as SSAP markers for phylogenetic analysis., *Plant Science*, 172: 291-298, (2007).
- Brosch G., P. Loidl y S. Graessle, Histone modifications and chromatin dynamics: a focus on filamentous fungi, *FEMS Microbiology Rev.*, 32: 409-439, (2008).
- Byvoet P., G. R. Shepherd, J. M. Hardin y B. J. Noland, The distribution and turnover of labeled methyl groups in histone fractions of cultures mammalian cells, *Arch Biochemical Biophysics*, 148: 558-567, (1972).
- Callen E. O., Food habits of some Pre-Columbian Mexican Indians, *Economic Botany*, 19: 335-343, (1965).
- Cassells C. y R. F. Curry, Oxidative stress and physiological, epigenetic and genetic variability in plant tissue culture: implications for micropropagators and genetic engineers, *Plant Cell, Tissue and organ Culture*, 64: 145-157, (2001).
- Cazzonelli C. I., A. J. Cuttriss, S. B. Cossetto, W. Pye, P. Crisp, J. Whelan, E. J. Finnegan, C. Turnbull y B. J. Pogson, Regulation of Carotenoid Composition and Shoot Branching in Arabidopsis by a Chromatin Modifying Histone Methyltransferase, SDG8, *The Plant Cell*, 21: 39-59, (2009).
- Chanvivattana Y., A. Bishopp, D. Schubert, C. Stock, Y. H. Moon, Z. R. Sung y J. Goodrich, Interaction of Polycomb group proteins controlling flowering in Arabidopsis, *Development*, 131: 5263-5276, (2004).
- Chen Z. J. y L. Tian, Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769: 295-307, (2007).

- Cheung P., Epigenetic Regulation by Histone Methylation and Histone Variants, *Molecular Endocrinology*, 19: 563-573, (2005).
- Colunga-García-Marín P. y 2. Zizumbo-Villarreal, Tequila and other agave spirits from west-central Mexico: Current germplasm diversity, conservation, and origin, *Biodiversity and Conservation*, 16: 1653-1667, (2006).
- Corley R. H. V., How much palm oil do we need?, *Environmental Science & Policy*, 12: 134-139, (2009).
- De la Peña C., G. Nic-Can, G. Ojeda, J. L. Herrera-Herrera, A. López-Torres, K. Wrobel y M. L. Robert, KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave* spp., *Bio Med Central Plant Biology*, 12: 1-11, (2012).
- de Napoles M., J. E. Mermoud, R. Wakao, Y. A. Tang, M. Endoh, R. Appanah, T. B. Nesterova, J. Silva, A. P. Otte y M. D. C. Vidal, Polycomb group proteins Ring1A/B link ubiquitylation of histone H2A to heritable gene silencing and X inactivation., *Development Cell*, 7: 676, (2004).
- Doyle M. R. y R. M. Amasino, A single amino acid change in the enhancer of *zeste* ortholog CURLY LEAF results in vernalization-independent, rapid flowering in *Arabidopsis*, *Plant Physiology*, 151: 1688-1697, (2009).
- Eastmond A.J., J.L.Herrera y M.L.Robert, La biotecnología aplicada al henequén: alternativas para el futuro, CICY, Yucatán, (2000).
- Euwens C. J., S. Lord, C. R. Donough, V. Rao, G. Vallejo y S. Nelson, Effects of tissue culture conditions during embryoid multiplication on the incidence of "mantled" flowering in clonally propagated oil palm, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70: 311-323, (2002).
- Egger G., G. Liang, A. Aparicio y P. A. Jones, Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy, *Nature*, 429: 457-463, (2004).
- Evans D. A., W. R. Sharp y H. P. Medina-Filho, Somaclonal and gametoclonal variation, *American Journal of Botany*, 71: 759-774, (1984).
- Felsenfeld G. y M. Groudine, Controlling the double helix, *Nature*, 421: 448-453, (2003).
- Feng S., S. E. Jacobsen y W. Reik, Epigenetic reprogramming in plant and animal development, *Science*, 330: 622-627, (2010).
- Finnegan E. J. y E. S. Dennis, Vernalization-induced trimethylation of histone H3 lysine 27 at FLC is not maintained in mitotically quiescent cells, *Current Biology*, 17: 1978-1983, (2007).
- Galindo-Jaimes L., M. González-Espinoza, P. Quintana-Ascencio y L. García-Barrios, Tree composition and structure in disturbed stands with varying dominance by

- 
- 
- Pinus spp. in the highlands of Chiapas, Mexico, *Plant Ecology*, 162: 259-272, (2002).
- García B. A., S. Hake, R. L. Díaz, M. Kauer, S. A. Morris, J. Recht, J. Shabanowitz, N. Mishra, B. D. Strahl y C. D. Allis, Organismal Differences in Post-translational Modifications in Histones H3 and H4, *Journal of Biological Chemistry*, 282: 7641-7655, (2007).
- García-Mendoza A., Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México, en: *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*, Anonymous, UNAM, México, 51-75, (1995).
- García-Mendoza A., Distribution of *Agave* (Agavaceae) in Mexico, *Cactus and Succulent Journal*, 4: 177-188, (2002).
- Gaudin V., M. Libaut, S. Pouteau, T. Juul, G. Zhao, D. Lefebvre y O. Grandjean, Mutations in LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1 affect flowering time and plant architecture in *Arabidopsis*, *Development*, 128: 4847-4858, (2001).
- Gendrel A. V., Z. Lippman, C. Yordan, V. Colot y R. A. Martienssen, Dependence of heterochromatic histone H3 methylation patterns on the *Arabidopsis* gene DDM1, *Science*, 297: 1871-1873, (2002).
- George E.F., *Plant propagation by tissue culture, part 1: the technology*, Exegetics, London, (1993).
- Gesteira A. S., W. C. Otoni, E. G. Barros y M. A. Moreira, RAPD-based detection of genomic instability in soybean plants derived from somatic embryogenesis, *Plant Breeding*, 121: 269-271, (2002).
- Gil-Vega K., C. Díaz, A. Nava-Cedrillo y J. Simpson, AFLP Analysis of *Agave tequilana* varieties., *Plant Science*, 170: 904-909, (2006).
- Gilbert N., S. Boyle, H. Sutherland, J. de las Heras, J. Allan, T. Jenuwein y W. A. Bickmore, Formation of facultative heterochromatin in the absence of HP1, *The EMBO Journal*, 22: 5540-5550, (2003).
- Goldberg A., C. Allis y E. Bernstein, Epigenetics: A landscape Takes Shape, *Cell*, 128: 635-638, (2007).
- González G., S. Alemán y D. Infante, Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population, *Plant Science*, 595-601, (2003).
- Grenan S., Micropropagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.), en: *Biotechnology in Agriculture and Forestry: High Tech and Micropropagation*, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, 371-398, (1992).

- Grewal S. I. y S. C. Elgin, heterochromatin: new possibilities for the inheritance of structure, *Current Opin in Genetic Development*, 12: 178-187, (2007).
- Grini P. E., T. Thorstensen, V. Alm, G. Vizcay-Barrena, S. S. Windju, T. S. Jorstad, Z. A. Wilson y R. B. Aalen, The ASH1 HOMOLOG2 (ASHH2) histone H3 methyltransferase is required for ovule and anther development in Arabidopsis, *PLoS ONE*, 4: e7817, (2009).
- Hebbes T. R., A. W. Thorne y C. Cranerobinson, A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin, *EMBO Journal*, 7: 1395-1402, (1988).
- Heitz E., The heterochromatin in moss, *Jahrb Wiss Botanic*, 69: 762-818, (1928).
- Henderson I. R. y S. E. Jacobsen, Epigenetic inheritance in plants, *Nature*, 447: 418-424, (2007).
- Holliday R., Epigenetics. A Historical Overview, *Epigenetics*, 1: 76-80, (2006).
- Hollyday R. y J. E. Pugh, DNA modification mechanisms and gene activity during development, *Science*, 187: 226-232, (1975).
- Holmquist G. P., Role of replication time in the control of tissue specific gene expression, *American Journal of Human Genetic*, 40: 151-173, (1987).
- Honda B. M., P. M. Candido y Dixon G.H., Histone methylation. Its occurrence in different cell types and relation to histone H4 metabolism in developing trout testis, *Journal of Biology and Chemistry*, 250: 8686-8689, (1975).
- Huettel B., T. Kanno, L. Daxinger, E. Bucher, J. van der Winden, A. J. M. Matzke y M. Matzke, RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1769: 358-374, (2007).
- Huh J. H., M. J. Bauer, T. F. Hsieh y R. L. Fischer, Cellular programming of plant gene imprinting, *Cell*, 132: 735-744, (2008).
- Infante D., S. Molina, J. R. Demey y E. Gámez, Asexual genetic variability in Agavaceae determined with inverse sequencetagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis, *Plant Molecular Biology Reports*, 24: 205-217, (2006).
- Jackson J. A. y R. F. Lyndon, Habituation: cultural curiosity or developmental determinant?, *Physiology Plant*, 147: 579-583, (1995).
- Jackson J. P., L. Johnson, Z. Jasencakova, X. Zhang, L. Perez-Burgos, P. B. Singh, X. Cheng, I. Schubert, T. Jenuwein y S. E. Jacobsen, Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in Arabidopsis thaliana, *Chromosoma*, 308-315, (2004).

- Jain S. M., Tissue culture-derived variation in crop improvement, *Euphytica*, 118: 153-166, (2001).
- Jaligot E., S. Adler, E. Debladis, T. Beulé, F. Richaud, P. Ilbert, E. J. Finnegan y A. Rival, Epigenetic imbalance and the floral developmental abnormality of the in vitro-regenerated oil palm *Elaeis guineensis*, *Annals of Botany*, 1-10, (2010).
- Jaligot E., T. Beulé, F. C. Baurens, N. Billotte y A. Rival, Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms associated with the "mantled" variant phenotype in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), *Genome*, 47: 224-228, (2004).
- Jaligot E., T. Beulé y A. Rival, Methylation-sensitive RFLPs: characterisation of two oil palm markers showing somaclonal variation-associated polymorphism, *Theor Appl Genet*, 104: 1263-1269, (2002).
- Jaligot E., A. Rival, T. Beulé, S. Dussert y J. L. Verdeil, Somaclonal variation in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.): the DNA methylation hypothesis, *Plant Cell Reports*, 19: 684-690, (2000).
- Jin S., R. Mushke, H. Zhu, L. Tu, Z. Lin, Y. Zhang y X. Zhang, Detection of somaclonal variation of cotton (*Gossypium hirsutum*) using cytogenetics, flow cytometry and molecular markers, *Plant Cell Reports*, 27: 1303-1316, (2008).
- Kaeppler S. M., H. F. Kaeppler y Y. Rhee, Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants, *Plant Molecular Biology*, 179-188, (2000).
- Kaeppler S. M. y S. L. Philips, Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 8773-8776, (1993).
- Karp A., Somaclonal variation as a tool for crop improvement, *Euphytica*, 85: 295-302, (1995).
- Kim J. M., T. K. To, J. Ishida, T. Morosawa, M. Kawashima, A. Matsuri, H. Kimura, K. Shinozaki y M. Seki, Alterations of lysine modifications on histone H3 N-tail under drought stress conditions in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell Physiology*, 49: 1588, (2008).
- Kim S. Y., Y. He, Y. Jacob, Y. S. Noh, S. Michaels y R. M. Amasino, Establishment of the vernalization- responsive, winter-annual habit in *Arabidopsis* requires a putative histone H3 methyl transferase, *Plant Cell*, 17: 3301-3310, (2005).
- Köhler C., L. Hennig, C. Spillane, S. Pien, W. Grissem y U. Grossniklaus, The Polycomb group protein MEDEA regulates seed development by controlling expression of the Mads-box gene PHERES1, *GENES & DEVELOPMENT*, 17: 1540-1553, (2003).
- Köhler C. y C. B. Villar, Programming of gene expression by Polycomb group proteins, *Trends in Cell Biology*, 18: -236, (2008).

- Kornberg R. D. y Y. Lorch, Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome, *Cell*, 98: 285-294, (1999).
- Kouzarides T., Chromatin Modifications and Their Function, *Cell*, 128: 693-705, (2007).
- Krauss V., Glimpses of evolution: heterochromatic histone H3K9 methyltransferases left its marks behind, *Genetics*, 133: 93-106, (2008).
- Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 681-685, (1970).
- Larkin P. J. y W. R. Scowcroft, Somaclonal variation: a novel source of variability from cell cultures for plant improvement, *Theor Appl Genet*, 60: 197-214, (1981).
- Lee D. Y., Teyssier C., Strahl B.D. y M. R. Stallcup, Role of protein methylation in regulation of transcription, *Endocr Rev*, 10: 2004-0008, (2004).
- Li X., M. Xu y S. S. Korban, DNA methylation profiles differ between field- and in vitro-grown leaves of apple, *Journal of Plant Physiology*, 159: 1229-1234, (2002).
- Lingling L. V., S. Guangming, X. Jianghui, Z. Xiaoping, H. Yulin y D. Jun, Determination of chromosomal ploidy in *Agave* spp., *African Journal Biotechnology*, 8: 52488-5252, (2009).
- LoSchiavo F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli y M. Terzi, DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs, *Theor Appl Genet*, 177: 325-331, (1989).
- Luger K., Structure and dynamic behavior of nucleosomes, *Current Opinion in Genetics & Development*, 13: 127-135, (2003).
- Luger K., Dynamic nucleosomes, *Chromosome Research*, 14: 5-16, (2006).
- Madlung A. y L. Comai, The effect of stress on genome regulation and structure., *Annals of Botany*, 94: 481-495, (2004).
- Makarevich G., O. Leroy, U. Akinci, D. Schubert, O. Clarenz, J. Goodrich, U. Grossniklaus y C. Köhler, Different Polycomb group complexes regulate common target genes in *Arabidopsis*, *EMBO reports*, 7: 947-952, (2006).
- Martin K., S. Pachathundikandi, C. Zhang, A. Slater y J. madassery, RAPD analysis of a variant of banana (*musa* sp.) cv. grande naine and its propagation via shoot tip culture, *In Vitro Cell Development Biology- Plant*, 37: 599-604, (2006).
- Mazari A. y E. L. Camm, Effect of cytokinins on plastid development and photosynthetic polypeptides during organogenesis of *Pinus ponderosa* Dougl cotyledons cultured *in vitro*, *Plant Cell, Tissue and organ Culture*, 33: 81-89, (1993).

- McPheeters K. D. y R. M. Skirvin, Histogenic layer manipulation in chimeral "Thornless Evergreen" trailing blackberry, *Euphytica*, 32: 351-360, (1983).
- Miguel C. y L. Marum, An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond, *Journal of Experimental Botany*, 1-13, (2011).
- Mohanty S., M. Panda, E. Subudhi y S. Nayak, Plant regeneration from callus culture of *Curcuma aromatica* and in vitro detection of somaclonal variation through cytophotometric analysis, *Biology Plant*, 52: 783-786, (2008).
- Muller H. J., Types of visible variations induced by x-rays in *Drosophila*, *Journal of Genetic*, 22: 299-334, (1930).
- Murashige T. y F. Skoog, A revised medium for rapid and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15: 473-497, (1962).
- Mylne J. S., L. Barrett, F. Tessadori, S. Mesnage, L. Johnson, Y. V. Beranataovichute, S. E. Jacobsen, P. Fransz y C. Dean, LHP1, the *Arabidopsis* homologue of HETEROCHROMATIN PROTEIN 1, is required for epigenetic silencing of FLC, *Natural Academy of Science USA*, 103: 5012-5017, (2006).
- Nehra N. S., K. K. Kartha, C. Stushnoff y K. L. Giles, The influence of plant growth regulator concentrations and callus age on somaclonal variation in callus culture regenerants of strawberry, *Plant Cell, Tissue and organ Culture*, 29: 257-268, (1992).
- Orton T. J., Genetic variation in somatic tissues: method or madness?, *Advances of Plant Pathology*, 2: 153-189, (1984).
- Osorio-Zambrano M. A., D. Infante y S. Molina, Study of asexual genetic variability in *Agave cocui* Trelease by molecular markers., *Bol Nakari*, 17: 1-7, (2006).
- Park S., H. Murthy, D. Chakrabarthy y K. Paek, Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of *Doritaenopsis* by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis., *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45: 104-108, (2009).
- Peraza-Echeverria S., V. A. Herrera-Valencia y A. James-Kay, Detection of DNA methylation changes in micropropagated plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP), *Plant Science*, 161: 359-367, (2001).
- Pérez-Molphe E., *Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales*, Universidad Autónoma de Aguas Calientes, Aguas Calientes, México, (1999).
- Peterson G. L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Wich is more generally applicable, *Anal. Biochemistry*, 83: 346-356, (1987).
- Piekik R.L.M., *In vitro culture of higher plants*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, (1987).

- Pien S., D. Fleury, J. S. Mylne, P. Crevillen, D. Inze, Z. Avramova, C. Dean y U. Grossniklaus, ARABIDOPSIS TRITHORAX1 dynamically regulates FLOWERING LOCUS C activation via histone 3 lysine 4 trimethylation, *Plant Cell*, 20: 580-588, (2008).
- Portillo L., F. Santacruz-Ruvalcaba, A. Gutiérrez-Mora y B. Rodríguez-Garay, Somatic embryogenesis in *Agave tequilana* Weber cultivar azul, *In Vitro Cell Development Biology-Plant*, 43: 569-575, (2007).
- Riggs A. D., X inactivation, differentiation and DNA methylation., *Cytogenetic Cell Genetics*, 15: 9-25, (1975).
- Rival A., T. Beulé, F. Aberlenc, J. Tregear y E. Jaligot, Plant Epigenetics: From Genomes to Epigenomes, *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 38: 9-15, (2010).
- Robert M. L., J. L. Herrera y F. Contreras, Micropropagation of *Agave* spp., en: *Biotechnology in agriculture and forestry*, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 307-329, (1992).
- Robert M. L., J. L. Herrera, F. Contreras y K. N. Scorer, *In vitro* propagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequén), *Plant Cell, Tissue and organ Culture*, 8: 37-48, (1987).
- Rodríguez-Sahagún A., G. Acevedo-Hernández, J. Rodríguez-Domínguez, B. Rodríguez-Garay, J. Cervantes-Martínez y O. Castellanos-Hernández, Effect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequiliana* Weber var. Azul, *Plant Cell, Tissue and organ Culture*, 104: 271-275, (2011).
- Rohr R., A. Scaltsoyiannes y P. Tsoulpha, Acclimatization of micropropagated forest trees, *Acta Horticulture*, 616: 59-69, (2003).
- Sahijram L., J. Soneji y K. Bollamma, Analyzing somaclonal variation in micropropagated bananas (*Musa spp.*), *In Vitro Cell Development Biology- Plant*, 39: 551-556, (2003).
- Saleh A., R. Alvarez-Venegas, M. Yilmaz, O. Le, G. Hou, M. Sadler, A. Albdallat, Y. Xia, G. Lu, I. Ladunga y Z. Avramova, The highly similar *Arabidopsis* homologs of trithorax ATX1 y ATX2 encode proteins with divergent biochemical functions, *Plant Cell*, 20: 568-579, (2008).
- Sánchez-Teyer F., S. Moreno-Salazar, M. Esqueda, A. Barraza y M. L. Robert, Genetic variability of wild *Agave angustifolia* populations based on AFLP: A basic study for conservation, *Journal of Arid Environments*, 73: 616, (2009).
- SanMiguel P. y J. L. Bennetzen, Evidence that a recent increase in maize genome size was caused by the massive amplification of intergene retrotransposons., *Annals of Botany*, 82: 37-44, (1998).

- Santamaría M. E., R. Hasbún, M. J. Varela, M. Meijón, L. Valledor, J. L. Rodríguez, P. E. Toorop, M. J. Cañal y R. Rodríguez, Acetylated H4 histone and genomic DNA methylation patterns during bud set and bud burst in *Castanea sativa*, *Journal of Plant Physiology*, 166: 1360-1369, (2009).
- Schatlowski N., K. Creasey, J. Goodrich y D. Schubert, Keeping plants in shape: Polycomb-group genes and histone methylation., *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 19: 547-553, (2008).
- Schönrock N., R. Bouveret, O. Leroy, L. Borghi, C. Köhler, W. GUISSEM y L. Hennig, Polycomb-group proteins repress the floral activator AGL19 in the FLC-independent vernalization pathway, *GENES & DEVELOPMENT*, 20: 1667-1678, (2006).
- Schubert D., L. Primavesi, A. Bishopp, G. Roberts, J. Doonan, T. Jenuwein y J. Goodrich, Silencing by plant Polycomb-group genes requires dispersed trimethylation of histone H3 at lysine 27, *EMBO Journal*, 25: 4638-4649, (2006).
- Shaffer W., Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics, *In Vitro Cell Development Biology- Plant*, 26: 97-101, (1990).
- Shi Y., F. Lan, C. Matson, P. Mulligan, J. R. Whetstone, P. A. Cole y R. A. Casero, Histone demethylation mediated by the nuclear amine oxidase homolog LSD1, *Cell*, 119: 941-953, (2004).
- Sims R. J., K. Nishioka y D. Reinberg, Histone lysine methylation: a signature for chromatin function, *Trends Genetic*, 19: 629-639, (2003).
- Skirvin R. M., K. D. McPheeters y M. Norton, Sources and Frequency of Somaclonal Variation, *Hort Science*, 29: 1232-1237, (1994).
- Smulders M. J. M. y G. J. Klerk, Epigenetics in plant tissue culture, *Plant Growth Regul*, 63: 137-146, (2011).
- Smulders M. J. M., W. Rus-Kortekaas y B. Vosman, Tissue culture-induced DNA methylation polymorphisms in repetitive DNA of tomato calli and regenerated plants, *Theor Appl Genet*, 91: 1257-1264, (1995).
- Soppe W. J., The early-flowering mutant *efs* is involved in the autonomous promotion pathway of *Arabidopsis thaliana*, *Development*, 126: 4763-4770, (1999).
- Strahl B. D. y C. D. Allis, The language of covalent histone modifications, *Nature*, 403: 41-45, (2000).
- Sung S., Y. He, T. W. Eshoo, Y. Tamada, L. Johnson, K. Nakahigashi, K. Goto, S. E. Jacobsen y R. M. Amasino, Epigenetic maintenance of the vernalized state in *Arabidopsis thaliana* requires LIKE HETEROCHROMATIN PROTEIN 1, *Natural Genetic*, 38: 706-710, (2006).

- Swartz H. J., G. J. Galletta y R. H. Zimmermann, Field performance and phenotypic stability of tissue culture propagated strawberries, *Journal of American Society of Horticulture of Science*, 106: 667-673, (1981).
- Torres-Morán M. I., M. Delgadillo-Escoto, S. Molina-Moret, D. M. Rivera-Rodríguez, A. P. Velasco-Ramírez, D. Infante y L. Portillo, Assessment of genetic fidelity among *Agave tequilana* plants propagated asexually via rhizomes versus in vitro culture, *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 103: 403-409, (2010).
- Tschiersch B., A. Hofmann, V. Krauss, R. Dorn, G. Korge y G. Reuter, The protein encoded by the *Drosophila* position-effect variegation suppressor gene *Su(var)3-9* combines domains of antagonistic regulators of homeotic gene complexes, *EMBO Journal*, 13: 3822-3831, (1994).
- Turner B. M., Histone acetylation and epigenetic code, *Bioessays*, 22: 836-845, (2000).
- Valenzuela-Zapata A.G., *El agave tequilero: su cultivo e industrialización*, Trillas, Guadalajara, (1994).
- Van Holde K., *Chromatin*, Springer verlag, New York, (1998).
- Vargas-Ponce O., D. Zizumbo-Villarreal, J. Martínez-Castillo, J. Coello-Coello y P. Colunga-García-Marín, Diversity and structure of landraces of *Agave* grown for spirits under traditional agriculture: A comparison with wild populations of *A. angustifolia* (Agavaceae) and commercial plantations of *A. tequilana*, *American Journal of Botany*, 96: 448-457, (2009).
- Veilleux R. E. y A. A. T. Johnson, Somaclonal variation: molecular analysis, transformation, interaction, and utilization, *Plant Breed Rev*, 16: 229-268, (1998).
- Vidal M. D. C. y E. De García, Analysis of a *Musa* spp. somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka, *Plant Molecular Biology*, 18: 23-31, (2000).
- Waddington C.H., *Organisers and genes*, Cambridge University Press, Cambridge, (1940).
- Wang Y., J. Wysocka, J. Sayegh, Y. H. Lee, J. R. Perlin, L. Leonelli, L. S. Sonbuchner, C. H. McDonald, R. G. Cook, Y. Dou, R. G. Roeder, S. Clarke, M. R. Stallcup, C. D. Allis, C. D. Allis y S. A. Coonrod, Human PAD4 regulates histone arginine methylation levels via demethylimination., *Science*, 306: 279-283, (2004).
- Weintraub H. y M. Groudine, Chromosomal subunits in active genes have an altered conformation, *Science*, 193: 848-856, (1976).
- Williams L., J. Zhao, N. Morozova, Y. Li, Y. Avivi y G. Grafi, Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1 y la activación de E2F-target genes., *Devlopmental Dynamics*, 228: 113-120, (2003).

- With M. J. D., Eine neue form con Tetraploide nach Röntgenbestrahlung, *Naturwiss*, 23: (2011).
- Xu L., Z. Zhao, A. Dong, L. Soubigou-Taconnat, J. P. Renou, A. Steinmetz y W. H. Shen, Di- and tri- but not monomethylation on histone H3 lysine 36 marks active transcription of genes involved in flowering time regulation and other processes in *Arabidopsis thaliana*, *Molecular Cell Biology*, 28: 1348-1360, (2008).
- Xu M., X. Li y S. S. Korban, DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.), *Theor Appl Genet*, 109: 899-910, (2004).
- Zhang H. y J. Ogas, An Epigenetic Perspective on Developmental Regulation of Seed Genes, *Molecular Plant*, 1-18, (2009).
- Zhao Y. D., Auxin biosynthesis and its role in plant development, *Annual Review Plant Biology*, 61: 49-64, (2010).
- Zhao Z. y W. H. Shen, Plants contain a high number of proteins showing sequence similarity to the animal SUV39H family of histone methyltransferases, *Annals of Nature y Academy of Science*, 1030: 661-669, (2004).
- Zhao Z., Y. Yu, D. Meyer, C. Wu y W. H. Shen, Prevention of early flowering by expression of FLOWERING LOCUS C requires methylation of histone H3K36, *Nature Cell Biology*, 7: 1256-1260, (2005).

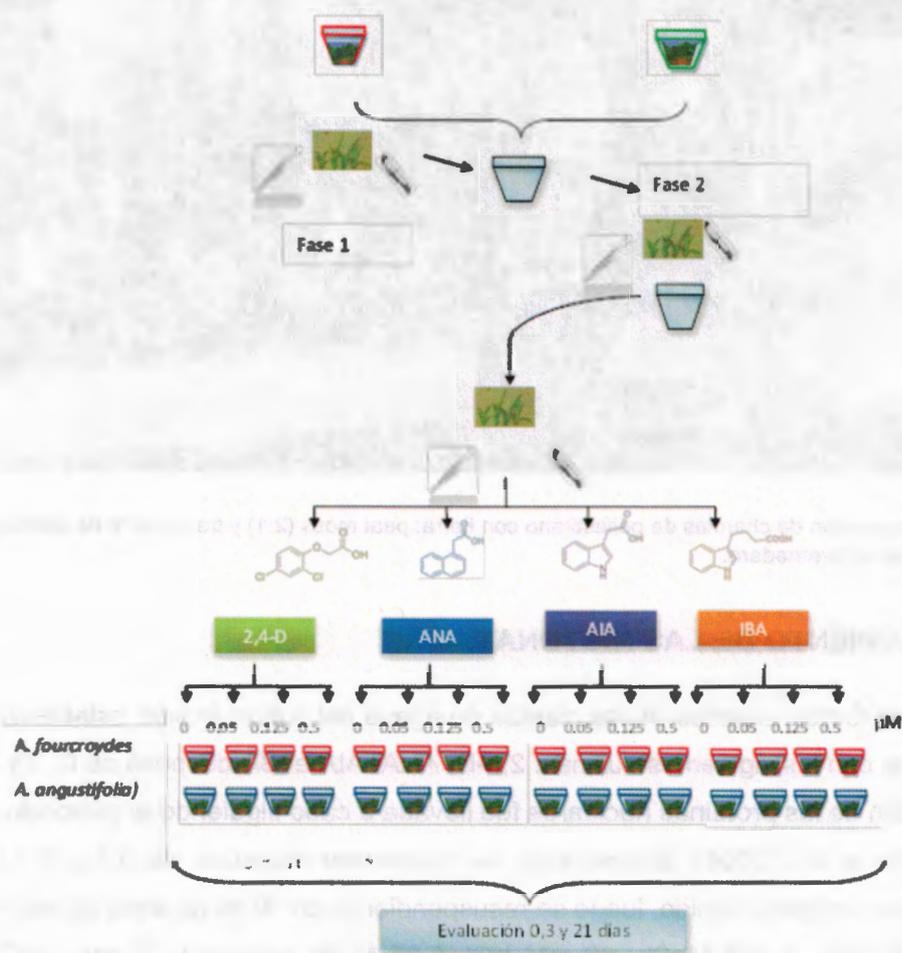


## CAPÍTULO II. MATERIALES Y MÉTODOS

### 2.1. ESTABLECIMIENTO DEL CULTIVO *IN VITRO* Y DE INVERNADERO DE AGAVE.

Las plantas micropropagadas pertenecen a las líneas clonales P66 (*A. fourcroydes*) y 26S (*A. angustifolia*), donadas por el laboratorio de micropropagación clonal del Dr. Manuel Robert. Estas líneas se caracterizan por presentar características fenotípicamente homogéneas. El material biológico pasó por dos fases de adaptación de cuatro semanas cada una, es decir, dos meses sin contacto con reguladores de crecimiento. Para este trabajo se emplearon dos medios de cultivo. Primero, las plantas se propagaron vegetativamente en el medio de cultivo Murashige y Skoog (MS) (Murashige y Skoog, 1962) y a continuación se pasaron al medio BA, este medio consiste en el medio MS original al cual se le disminuye la fuente de nitrógeno a 10 mM KNO<sub>3</sub> y 5 mM NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>.

Pasadas las dos fases de adaptación, las plantas se transfirieron a un medio nuevo suplementado con diferentes tipos de las auxinas, 2,4-D, IBA (ácido indolbutírico), ANA (ácido naftalenacético), AIA (ácido 3-indolacético), en tres concentraciones diferentes, 0.05 µM, 0.125 µM, y 0.5 µM. El testigo que se utilizó fue un medio sin auxina (0). Las plantas fueron evaluadas en un curso temporal de 0, 3 y 21 días *in vitro* y a los 3 y 6 meses *ex vitro*. Los parámetros evaluados fueron peso fresco y altura de la planta (Figura 5). Cada uno de los tratamientos constó de 15 réplicas para la evaluación del peso fresco y la altura.



**Figura 5.** Esquema general de la estrategia llevada a cabo para la adaptación y los tratamientos con auxinas en un curso temporal de 21 días *in vitro* de las especies *A. angustifolia* y *A. fourcroydes*.

Después de la evaluación de las plantas en el día 21, éstas fueron puestas en medio de enraizamiento MS-BA durante dos meses y pasada esta fase, se trasladaron las plantas a charolas de poliestireno con tierra húmeda y peat moss en una relación 2:1. Se regaron cada tercer día durante 6 meses (Figura 6).



**Figura 6.** Preparación de charolas de poliestireno con tierra: peat moss (2:1) y transplante de plantas para aclimatarlas en el invernadero.

## 2.2. AISLAMIENTO DE LAS HISTONAS.

Las histonas fueron aisladas de las plantas de agave del cultivo *in vitro* establecido en los tratamientos con las siguientes auxinas: 2,4-D, ANA, AIA e IBA después de 0, 3 y 21 días. La extracción de las proteínas nucleares fue llevada a cabo siguiendo el protocolo descrito por Jackson et al., (2004). Brevemente, se maceraron muestras de 0.3 a 0.5 g en un mortero, con nitrógeno líquido, luego se resuspendieron en 10 ml de amortiguador NIB [15 mM pH 6.8 TBS, 5 mM  $MgCl_2$ , 60 mM KCl, 0.25 M de sacarosa, 15 mM NaCl, 1 mM  $CaCl_2$ , Triton-X 100 0.8% (v/v), 1 mM de fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF)]. La suspensión homogénea se filtró a través de una gasa estéril y el filtrado se centrifugó a 10,000 x g durante 20 minutos a 4°C. Las proteínas nucleares se extrajeron dos veces con  $H_2SO_4$  0.4 M y se precipitaron con 12 volúmenes de acetona fría a -20°C, toda la noche. El precipitado se recogió por centrifugación a 2,500 x g por 20 minutos y se resuspendió el sedimento en 200  $\mu$ l de urea 4 M.

### 2.2.1. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Las proteínas se cuantificaron siguiendo el método de Peterson (1987), el cual consiste en realizar una curva patrón con albúmina sérica bovina, BSA (1  $mg \cdot ml^{-1}$ ) como proteína

estándar, manejando un rango de concentraciones de 10 a 100 µg de la proteína por mililitro. Con referencia a las muestras a medir, se tomaron 10 µl de dos réplicas por separado y se llevaron a un ml con agua destilada. A la curva patrón y a las muestras se les agregaron 100 µl de DOC (deoxicolato de sodio) al 0.15% (p/v) y se agitaron con la ayuda de un vortex. Las muestras se dejaron reposar 10 minutos a temperatura ambiente. Después de este tiempo se les adicionaron 100 µl de TCA (ácido tridoacético) al 72% (p/v) frío a las muestras y se agitaron en un vortex, a continuación las muestras se dejaron reposar por 15 minutos en hielo. Una vez transcurrido el tiempo, las muestras se centrifugaron en una centrifuga Legend Mach 1.6G a 3,500 x g durante 15 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante cuidando de no perder la pastilla. La pastilla precipitada se resuspendió en un ml de agua destilada y se agitó en un vortex. Seguidamente, a cada muestra se le adicionó un ml del reactivo A que contiene CTC [CuSO<sub>4</sub>.5H<sub>2</sub>O 0.1% (p/v), NaCO<sub>3</sub> 10% (p/v), 0.2% (p/v)], NaOH 0.8N (p/v), SDS 10% (p/v) y H<sub>2</sub>O]; las muestras se agitaron en un vortex, seguido de un reposo de 10 minutos a temperatura ambiente. A continuación, a cada muestra se le adicionaron 500 µl del reactivo B que contiene el reactivo Folin-Ciocalteu 1:5 (v/v) y las muestras se agitaron en vortex. La mezcla se dejó reposar por 30 minutos a temperatura ambiente para permitir el desarrollo del color azul. Por último, para determinar la concentración de la proteína, se midió la absorbancia de las muestras en un espectrofotómetro Genesis 10UV a 750 nm.

### **2.3. WESTERN BLOT DE LAS HISTONAS AISLADAS CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA H3K27me<sup>2</sup>, H3K4me<sup>3</sup>, H3K9me<sup>2</sup> Y H3K36me<sup>2</sup>.**

#### **2.3.1. ANÁLISIS DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE (Laemmli, 1970).**

Para observar el perfil proteico de las muestras, de la extracción proteica obtenida, se mezclaron en un tubo Eppendorf 10 µg de cada muestra con 10 µL de amortiguador de carga Laemmli a 5X [62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 25% (p/v) glicerol, 2% (p/v) SDS, 5% β-mercaptoetanol y 0.01% (p/v) de azul de bromofenol]. La mezcla se calentó por 5 minutos en baño María a 100°C. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida al 15% [gel de separación: 2.5 ml H<sub>2</sub>O; 2.5 ml amortiguador de separación;

5 ml acrilamida al 30%; 50  $\mu$ l de persulfato de amonio, (APS) al 10%; 15  $\mu$ l TEMED. gel de empacamiento: 2.3 ml H<sub>2</sub>O; 1 ml amortiguador de empacamiento; 30  $\mu$ l APS al 10%; 15  $\mu$ l de TEMED] corrido a 100 voltios por 90 minutos.

El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de Coomasie [50% MeOH; 45% H<sub>2</sub>O; 5% ácido acético; 0.05% azul de Coomasie] para visualizar las bandas obtenidas.

### **2.3.2. TRANSFERENCIA.**

El gel de poliacrilamida, sin teñir, se transfirió a una membrana de nitrocelulosa (tamaño de poro: 0.45  $\mu$ m) Millipore, previamente tratada con amortiguador de transferencia [25 mM Tris; 192 mM glicina; metanol al 10% (v/v)] por 10 minutos. Se verificó la transferencia a la membrana tiñéndola con rojo de Ponceaus al 0.2% (v/v) hasta que las bandas sean visibles y se adicionó agua hasta obtener un buen contraste. Para remover por completo la tinción, la membrana se lavó con 0.1 N NaOH seguido de un lavado con PBST 1X [20 mM Tris-HCl, pH a 7.6, 137 mM NaCl, + Tween-20 0.05%] por 10 minutos en agitación constante a temperatura ambiente.

### **2.3.3. IMMUNODETECCIÓN.**

Después de lavar la membrana, y asegurarse que la transferencia fue llevada a cabo, ésta se bloqueó por una hora y media [PBST 1X; leche desgrasada al 5%] en agitación constante a temperatura ambiente. La membrana se lavó con PBST 1X por 10 minutos a temperatura ambiente. Después de los lavados, la membrana se incubó a 4°C toda la noche con el anticuerpo primario (Cuadro 2). Después de la incubación con el anticuerpo, la membrana se lavó cuatro veces con PBST 1X en agitación a temperatura ambiente (10 minutos por vez) y una vez con PBS 1X (20 mM Tris-HCl, pH a 7.6; 137 mM NaCl) por 10 minutos. Seguido de los lavados, la membrana se incubó con el segundo anticuerpo (1:20,000; conjugado-IgG-HRP) por una hora y media a temperatura ambiente en agitación constante. Después de la incubación, la membrana se lavó cinco veces con PBST 1X y una vez con PBS 1X.

Se usaron los anticuerpos primarios específicos para la histona H3: H3K27me<sup>3</sup>, H3K4me<sup>3</sup>, H3K9me<sup>2</sup> y H3K36me<sup>2</sup> como se muestra en el cuadro 2. El testigo que se utilizó es un marcador de la histona H3 (BIO-RAD).

Cuadro 2. Anticuerpos primarios y secundarios que se utilizaron en la inmunodetección.

Anticuerpo primario	Número de catálogo (MILLIPORE)	Dilución en PBST
Anti-histona H3	07-690	1:10,000
Anti-dimetil-histona H3 (Lys4)	07-030	1:10,000
Anti-trimetil-histona H3 (Lys4)	05-745R	1: 1,500
Anti-dimetil-histona H3 (lys9)	07-441	1: 1,000
Anti-trimetil-histona H3 (Lys27)	07-449	1: 1000
Anti-dimetil-histona H3 (Lys 36)	07-274	1: 1000
<b>Anticuerpo secundario</b>		
Cabra anti-conejo IgG, conjugado- HRP	12-348	1: 20,000

#### 2.3.4. DETECCIÓN POR QUIMIOLUMINISCENCIA.

La detección de la quimioluminiscencia se llevó a cabo en un cuarto oscuro. La membrana se sumergió en 2 ml del kit Immovilon Western (Millipore) y se escurrió. Posteriormente se colocó un plástico Reynolds para evitar que la humedad de la membrana manchara el film de revelado. En un estuche de revelado se colocó la membrana envuelta en el plástico y se cubrió con una película fotosensible a los rayos-X por un minuto, haciendo una ligera presión. Seguidamente la película fue incubada en una solución reveladora [Kodak-Sigma-Aldrich revelator 50% (v/v); H<sub>2</sub>O 50%] por un minuto, o hasta visualizar las bandas esperadas, A continuación la película se lavó con agua, seguidamente se puso en una solución fijadora [Kodak-Sigma-Aldrich fijador y aclarador 50% (v/v); H<sub>2</sub>O 50%] hasta obscurecer por completo y ponerse transparente seguidamente se lavó con agua. Por último, la película se dejó secar hasta perder la humedad.

## 2.4. BIBLIOGRAFÍA

Jackson J. P., L. Johnson, Z. Jasencakova, X. Zhang, L. Perez-Burgos, P. B. Singh, X. Cheng, I. Schubert, T. Jenuwein y S. E. Jacobsen, Dimethylation of histone H3 lysine 9 is a critical mark for DNA methylation and gene silencing in *Arabidopsis thaliana*, *Chromosoma*, 308-315, (2004).

Laemmli U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, 227: 681-685, (1970).

Murashige T. y F. Skoog, A revised medium for rapid and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 15: 473-497, (1962).

Peterson G. L., A simplification of the protein assay method of Lowry et al. Wich is more generally applicable, *Anal. Biochemistry*, 83: 346-356, (1987).



## CAPITULO III. RESULTADOS

3.1. INFLUENCIA DE LAS AUXINAS EN EL PESO FRESCO DE *A. ANGUSTIFOLIA*.

En *A. angustifolia* se obtuvo un aumento en el peso fresco de 0.18 g, de 0.14 g (día 0) hasta 0.32 g (día 21) con el tratamiento de 2,4-D en una concentración de 0.5  $\mu\text{M}$ ; es decir 1.2 veces su peso inicial, así también, se observó una menor ganancia en peso cuando las demás auxinas se adicionan en una concentración de 0.05  $\mu\text{M}$  y 0.125  $\mu\text{M}$  como se muestra en la figura 7.

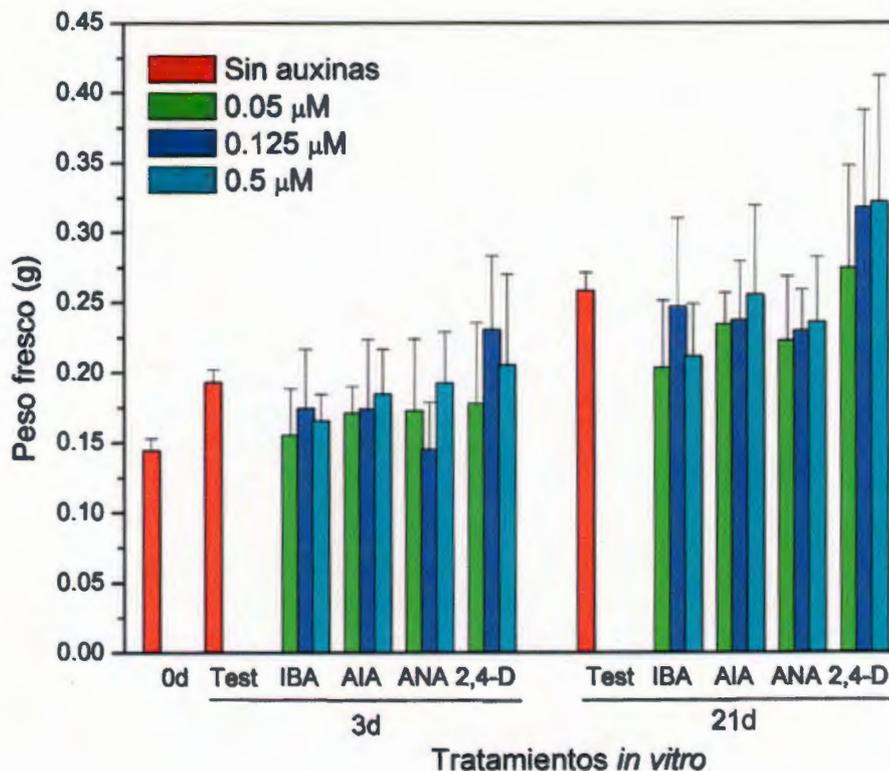
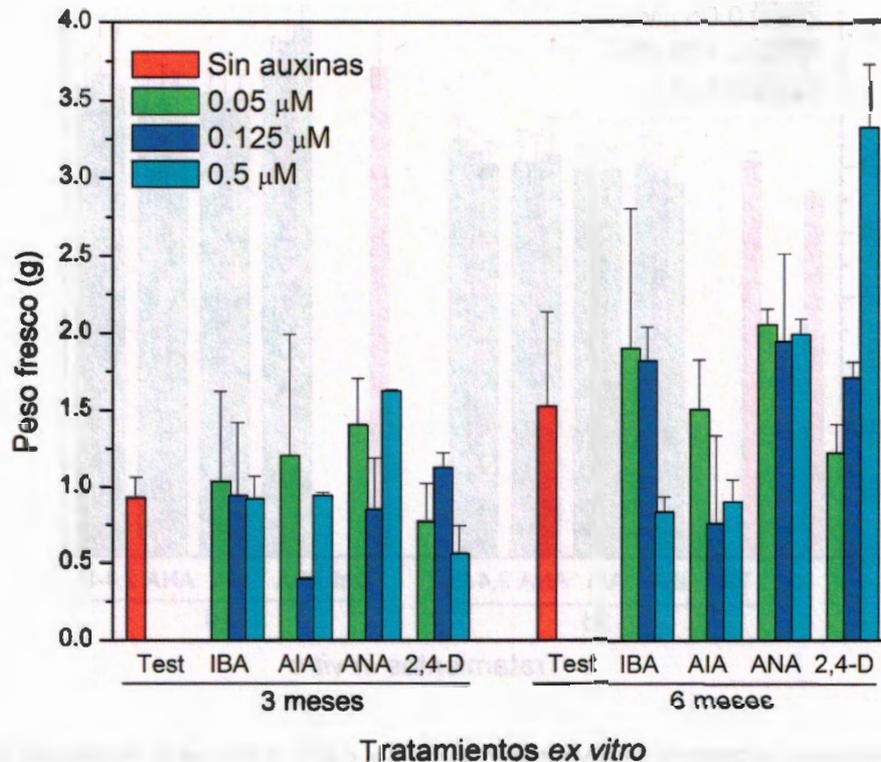


Figura 7. Efecto de la concentración de las auxinas en el peso fresco observado en la etapa de cultivo *in vitro* en el proceso de micropropagación de *A. angustifolia*.

Las plantas que fueron tratadas *in vitro* con 2,4-D y llevadas al invernadero presentaron un peso fresco menor respecto a las plantas testigo que no fueron tratadas con auxinas en la etapa *in vitro*; sin embargo, la mayor ganancia en peso fresco se observó hasta los 6 meses en las plantas *ex vitro*, en promedio llegaron a pesar 3.4 g (Figura 8).

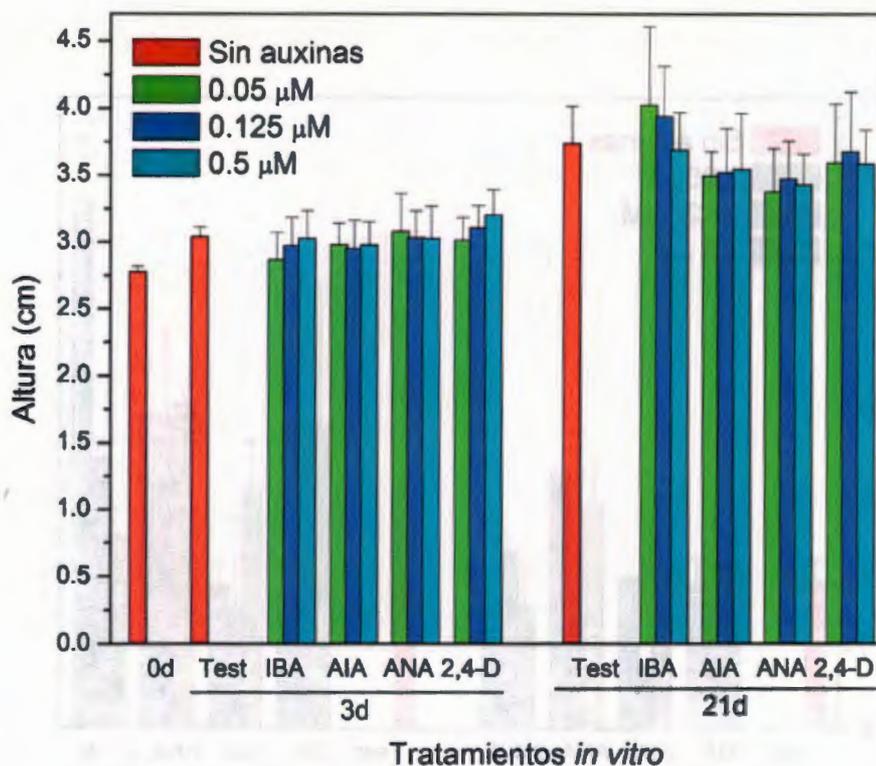


**Figura 8.** Efecto de la concentración de las auxinas en el peso fresco observado en la etapa *ex vitro* durante el proceso de micropropagación de *A. angustifolia*.

### 3.2. EFECTO DE LAS AUXINAS EN LA ALTURA DE *A. ANGUSTIFOLIA*.

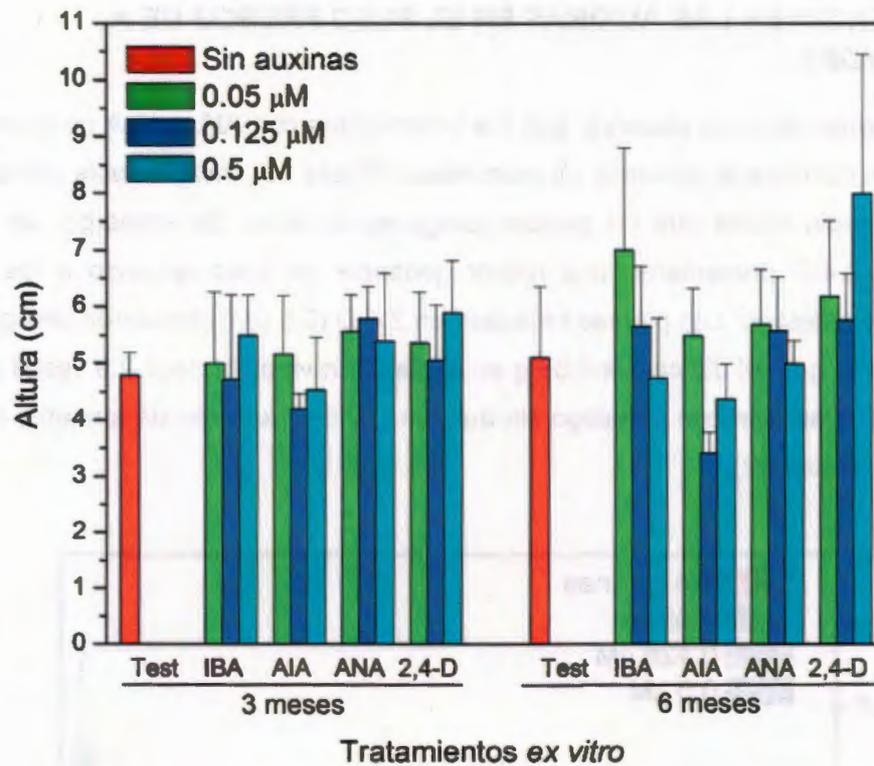
En cuanto al tamaño de la planta, evaluado como la altura de crecimiento, no se observaron diferencias a los tres días de las plantas cultivadas *in vitro*, contrario con los resultados obtenidos a los 21 días. Las plantas que fueron tratadas con la auxina natural IBA a concentraciones de 0.05  $\mu$ M y 0.125  $\mu$ M obtuvieron una ganancia en altura de 4.02 y

3.94 cm, respectivamente (Figuras 9 y 10), mientras que el testigo en el día 0 (en promedio al comenzar el experimento) las plantas tenían una altura de 2.78 cm.

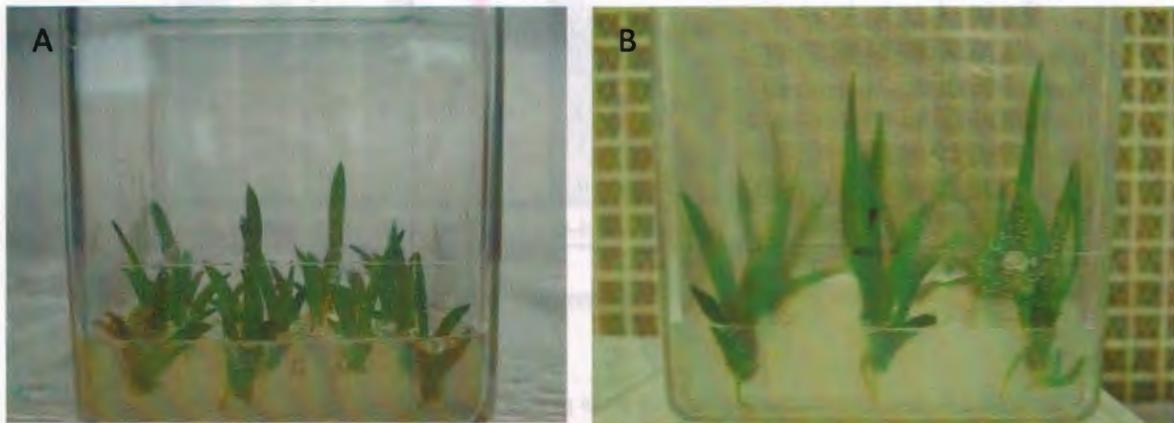


**Figura 9.** Diferencias en la ganancia de altura observados en el cultivo *in vitro* de *A. angustifolia* durante el proceso de micropropagación en tratamientos con diferentes concentraciones de auxinas naturales (AIA e IBA) y sintéticas (ANA y 2,4-D).

En la figura 10 se puede apreciar que las plantas tratadas con 0.5 μM de la auxina sintética 2,4-D y que fueron analizadas en el invernadero, obtuvieron una ganancia en altura, después de 6 meses, que alcanzaron una altura promedio de 8.4 cm. una ganancia mayor en comparación al testigo y los demás tratamientos con auxinas.



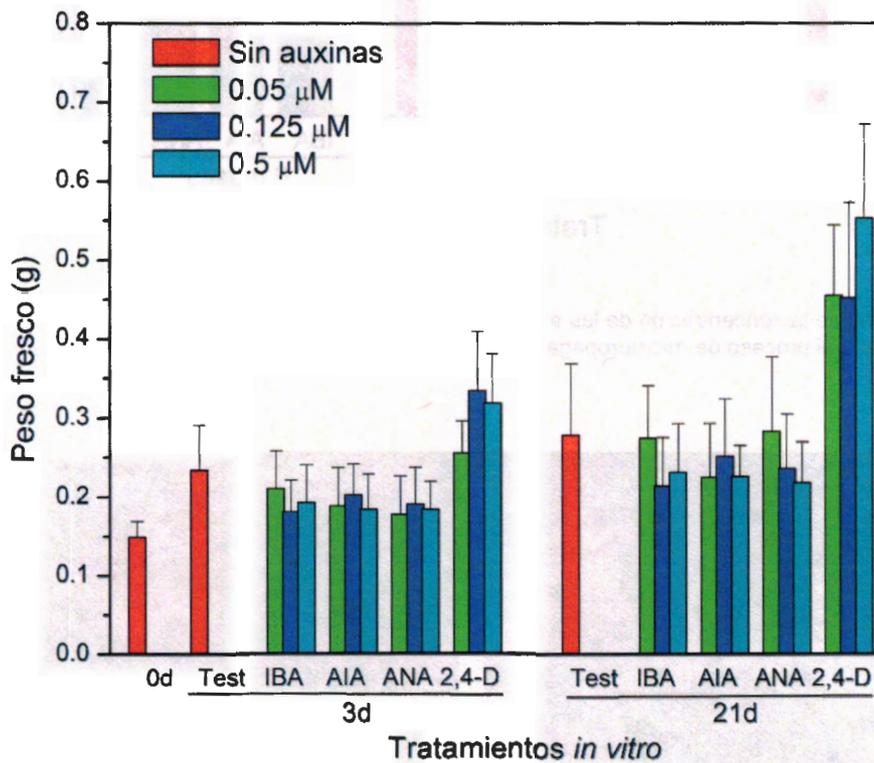
**Figura 10.** Efectos de la concentración de las auxinas en el crecimiento observados en la etapa *ex vitro* de *A. angustifolia* durante el proceso de micropropagación.



**Figura 11.** Plantas de *A. angustifolia* a los 3 días (A) y a los 21 días *in vitro* (B) sin reguladores del crecimiento.

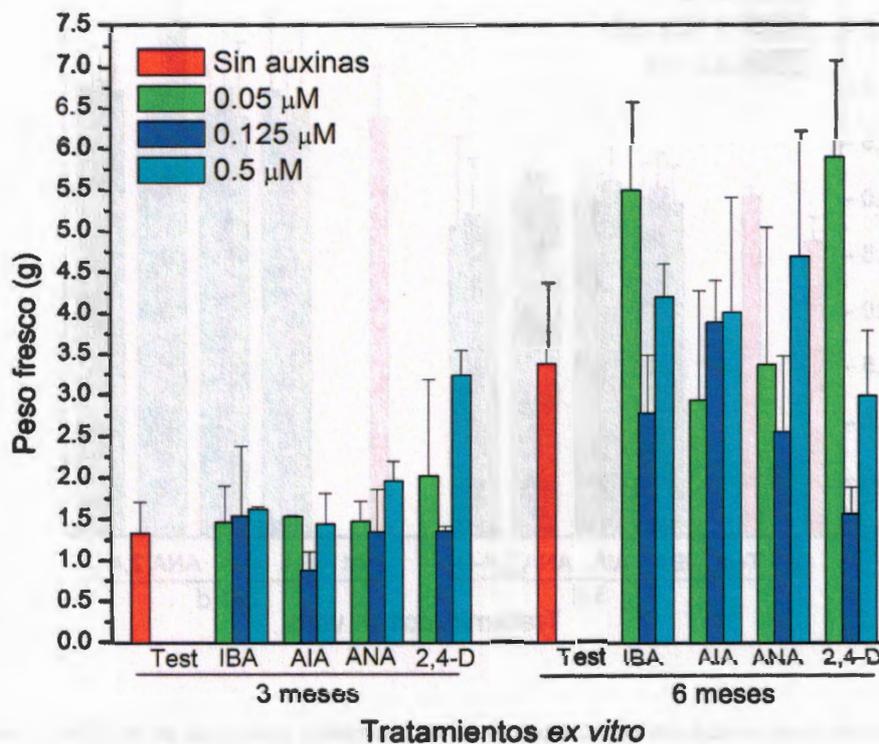
### 3.3. INFLUENCIA DE LAS AUXINAS EN EL PESO FRESCO DE *A. FOURCROYDES*.

En *A. fourcroydes* se pudo observar que los tratamientos con AIA y ANA no presentaron diferencias en cuanto a la ganancia en peso fresco (Figura 12), incluso estas plantas tenían un peso promedio menor que las plantas testigo sin auxinas. Sin embargo, las plantas tratadas con 2,4-D presentaron una mayor ganancia en peso respecto a los demás tratamientos y al testigo. Las plantas tratadas con 2,4-D (0.5  $\mu\text{M}$ ) obtuvieron una ganancia en peso de 0.19 g en el día cero a 0.55 g en el día 21 *in vitro*; es decir 2.9 veces su peso inicial y en comparación con el testigo sin auxinas (0.28 g) tuvieron un aumento en peso de 1.9 veces (Figura 12).



**Figura 12.** Efecto de la concentración de auxinas en el peso fresco observado en la etapa de cultivo *in vitro* en el proceso de micropropagación de *A. fourcroydes*.

Al pasar las plantas al invernadero y cuantificar su ganancia en peso determinamos que las plantas que fueron tratadas con la auxina natural IBA y la auxina sintética 2,4-D con la concentración de  $0.05 \mu\text{M}$  pesaron  $5.75 \text{ g}$  y  $6.2 \text{ g}$ , respectivamente, peso superior respecto a las plantas que no fueron tratadas con auxinas; las plantas testigo alcanzaron un peso de  $3.5 \text{ g}$  después de 6 meses de estar en el invernadero. Las plantas que fueron tratadas con concentraciones elevadas de 2,4-D ( $0.125$  y  $0.5 \mu\text{M}$ ) presentaron un menor peso fresco respecto a las plantas testigo (Figura 13).



**Figura 13.** Efecto de la concentración de las auxinas en el peso fresco observado en la etapa *ex vitro* durante el proceso de micropropagación de *A. fourcroydes*.

### 3.4. INFLUENCIA DE LAS AUXINAS EN LA ALTURA DE *A. FOURCROYDES*.

Las plantas que se cultivaron en el medio MS-BA con ANA (0.05  $\mu\text{M}$ ) tienen una mayor altura a los 21 días *in vitro*, llegando a medir 4.59 cm, es decir 1.7 veces más que las plantas en el día cero cuando median 2.64 cm (Figura 14).

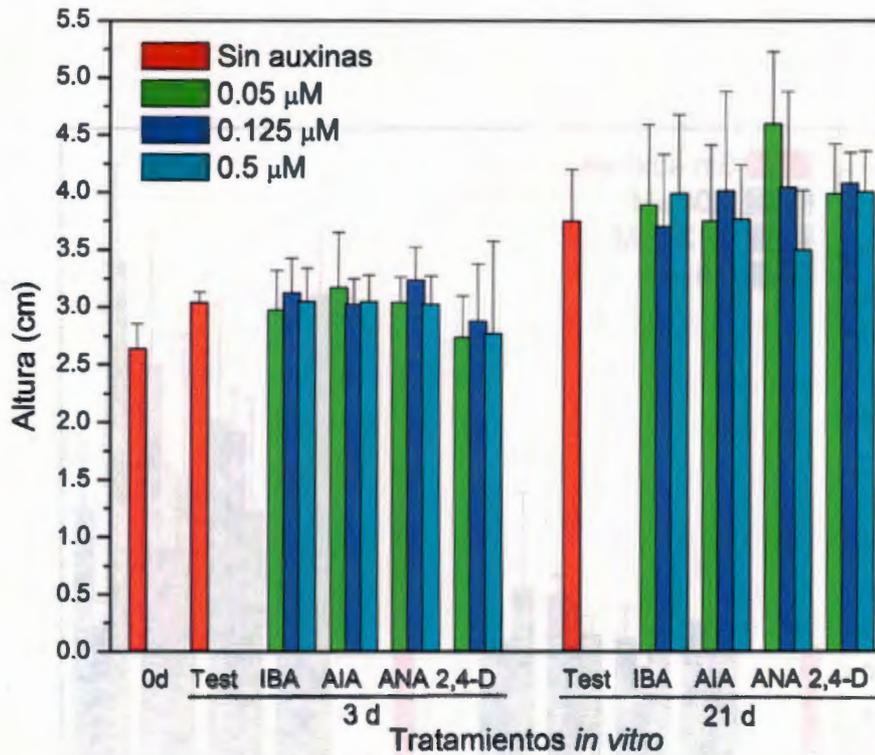
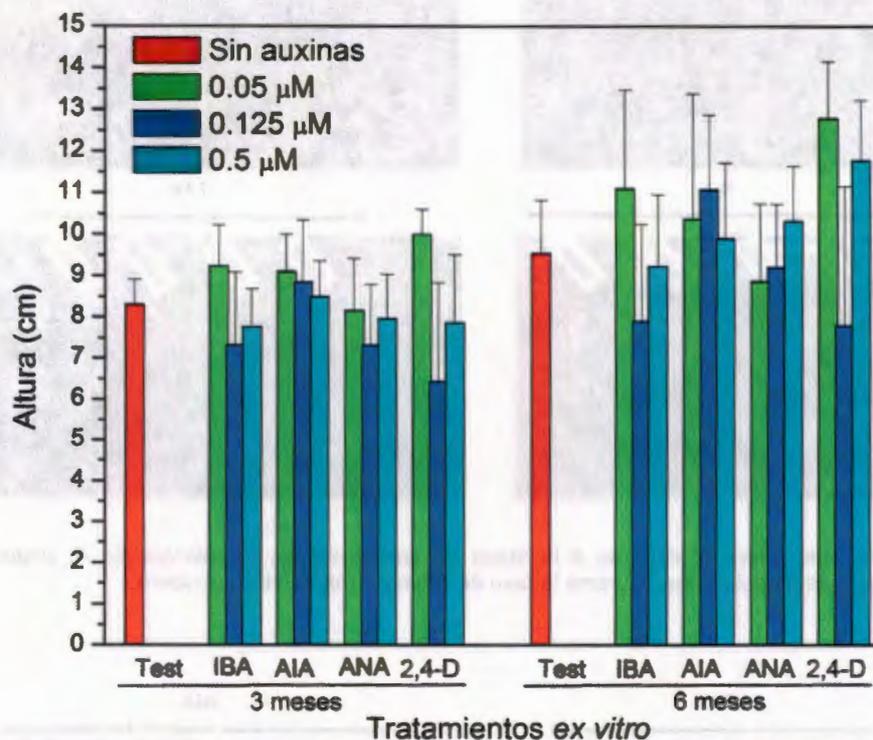


Figura 14. Efecto de la concentración de las auxinas en el crecimiento observado en el cultivo *in vitro* de *A. fourcroydes* durante el proceso de micropropagación.

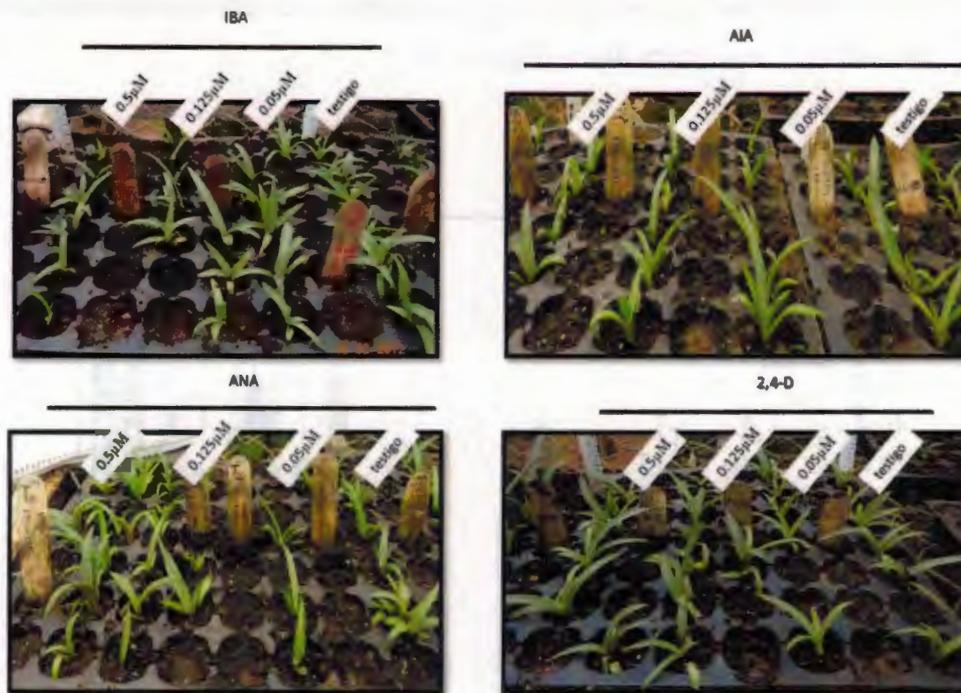
Después de seis meses de aclimatación en el invernadero, las plantas tratadas con 2,4-D (0.05  $\mu\text{M}$ ) presentaron una mayor altura (Figura 15).



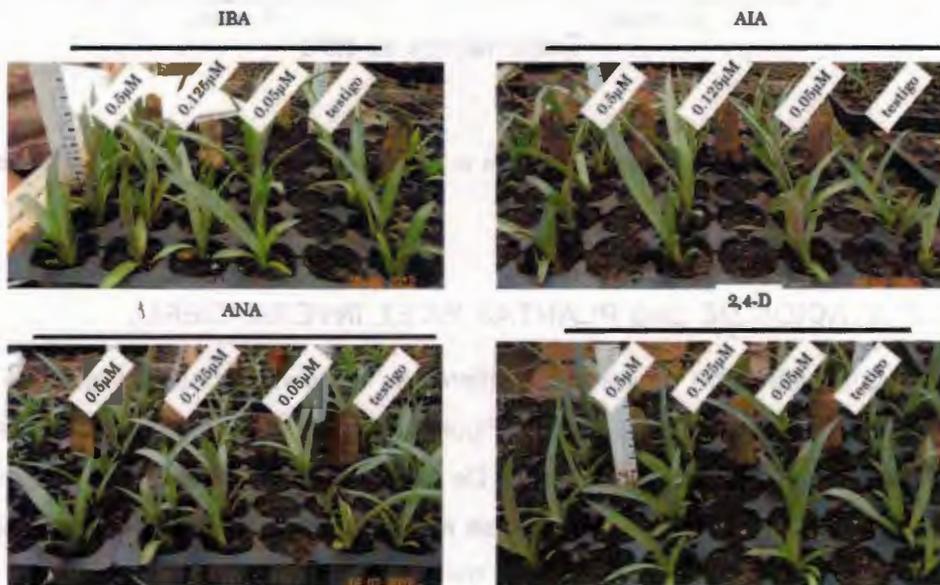
**Figura 15.** Efectos de la concentración de auxina en el crecimiento observados en la etapa *ex vitro* de *A. fourcroydes*.

### 3.5. ACLIMATACIÓN DE LAS PLANTAS EN EL INVERNADERO.

Las plantas que estuvieron expuestas a diferentes concentraciones de auxinas fueron trasplantadas a charolas de poliestireno (Figuras 16 y 17). Se regaron cada tres días, durante 6 meses y se siguió su crecimiento. De cada tratamiento, se tomaron muestras de las plantas a los tres meses, se pesaron y se midieron; cada muestra se guardó a  $-80^{\circ}\text{C}$  para el posterior análisis de sus patrones de metilación (Capítulo III).



**Figura 16.** A los tres meses posteriores a la etapa de enraizamiento, las plantas de *A. angustifolia* se colocaron en bandejas de poliestireno durante la fase de aclimatación en el invernadero.



**Figura 17.** A los tres meses posteriores a la etapa de enraizamiento, las plantas de *A. fourcroydes* se colocaron en bandejas de poliestireno durante la fase de aclimatación en el invernadero.

A los seis meses se hizo la última determinación de las plantas que estaban en el invernadero y se pudo observar que las plantas que fueron tratadas con 2,4-D ( $0.05 \mu\text{M}$ ) presentaron mayor peso y altura como se muestra en las figuras 13 y 15. Al contrario las plantas que mostraron un fenotipo con mayor peso y altura fueron las plantas tratadas con una concentración mayor de 2,4-D ( $0.5 \mu\text{M}$ ).

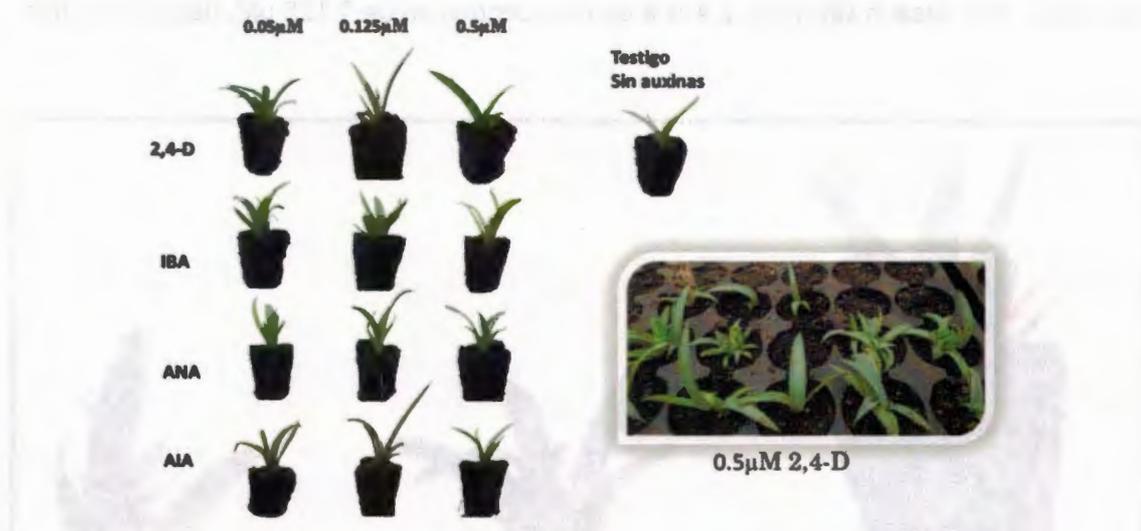
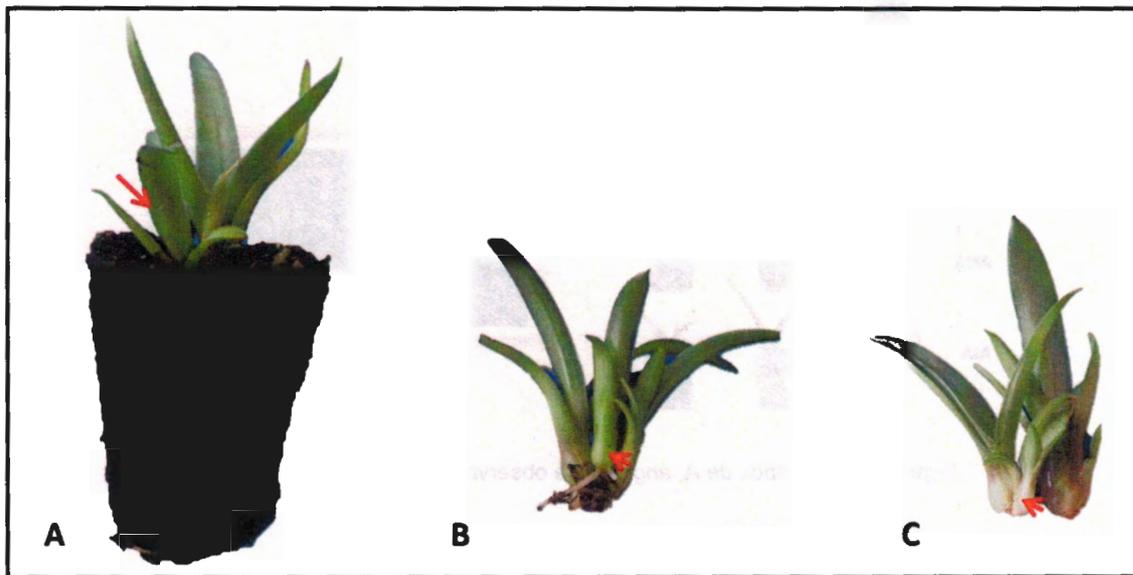


Figura 18. Fenotipos de *A. angustifolia* observados a los 6 meses *ex vitro*.



Figura 19. Fenotipos de *A. fourcroydes* observados a los seis meses *ex vitro*.

Durante el estudio de las plantas en el invernadero se observó que las plantas pertenecientes a la especie *A. angustifolia* tenían un gran número de brotes, a pesar que estas plantas no habían estado en contacto con reguladores del crecimiento de manera exógena después de los 21 días de tratamiento *in vitro* (Figuras 20A, 20B). En la figura 20C se aprecia la aparición de un brote en una de las plantas, esta planta estuvo expuesta, en la fase *in vitro*, con 2,4-D a una concentración de  $0.125 \mu\text{M}$ , durante 21 días.



**Figura 20.** Fenotipos observados durante el monitoreo de las plantas a los tres meses *ex vitro* de *A. angustifolia*. (A) plantas tratadas con IBA ( $0.125 \mu\text{M}$ ) en la fase *in vitro*. (B) Plantas tratadas con 2,4-D ( $0.05 \mu\text{M}$ ) en la fase *in vitro*. (C) Plantas tratadas con 2,4-D ( $0.125 \mu\text{M}$ ).

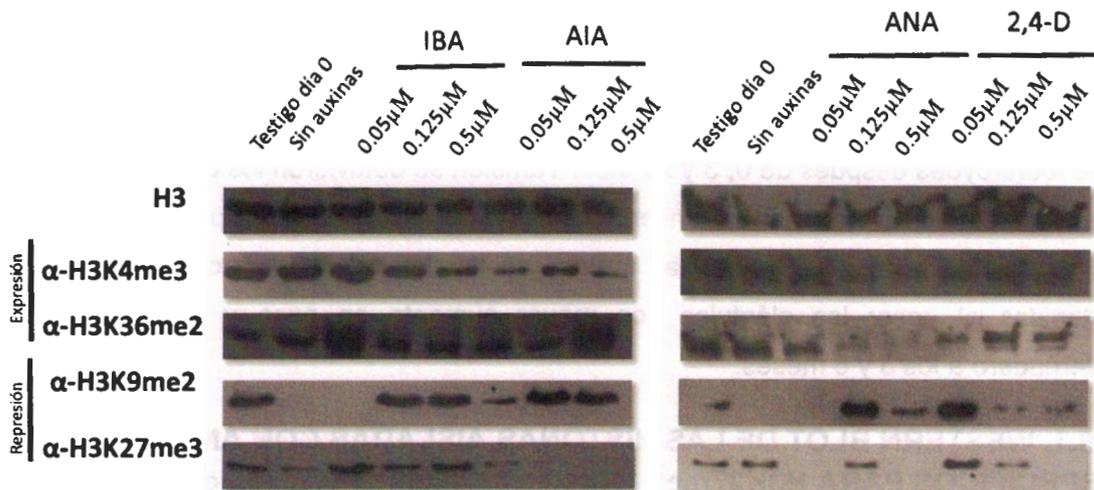
### 3.6. ANÁLISIS DE LAS MARCAS EN LAS HISTONAS DE AGAVE EN CONDICIONES *IN VITRO* Y DE INVERNADERO.

Se obtuvieron las marcas epigenéticas de las plantas cultivadas *in vitro* de *A. angustifolia* y *A. fourcroydes* después de 0, 3 y 21 días: También se obtuvieron los datos morfológicos de las plantas cultivadas en las concentraciones de 0, 0.05  $\mu\text{M}$ , 0.125  $\mu\text{M}$  y 0.5  $\mu\text{M}$  de las auxinas 2,4-D, IBA, ANA y AIA. Las marcas analizadas se compararon con las marcas obtenidas al pasar las plántulas con mayor aumento en peso y altura *in vitro* al invernadero a los 3 y 6 meses.

#### 3.6.1. WESTERN BLOT DE LAS HISTONAS AISLADAS CON ANTICUERPOS ESPECÍFICOS PARA H3K27me<sup>2</sup>, H3k4me<sup>3</sup>, H3k9m<sup>2</sup> Y H3k36me<sup>2</sup>.

Para abordar la pregunta central de este estudio, ¿qué auxina es la que induce la variación epigenética en Agave?, fue necesario inmunolocalizar, con anticuerpos específicos, las diferentes metilaciones que sufre la histona H3. Al mismo tiempo se podrán identificar las modificaciones en las histonas que son representativas en cada uno de los tratamientos analizados.

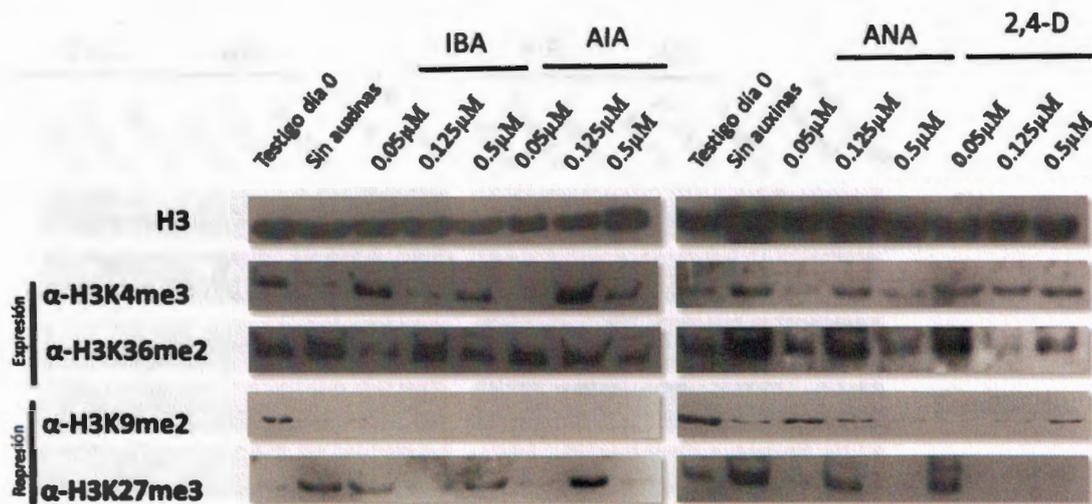
Se utilizó el anticuerpo para la histona H3 como testigo positivo, así como también los anticuerpos para las metilaciones en H3K4me<sup>3</sup>, H3K9me<sup>2</sup>, H3K27me<sup>3</sup> y K36me<sup>2</sup>. Se determinó que las marcas relacionada con la expresión génica, H3K4me<sup>3</sup> y H3K36me<sup>2</sup>, estaban presentes en todos los tratamientos al tercer día en el cultivo *in vitro* de *A. angustifolia* (Figura 21); sin embargo, se encontró en menor abundancia en los tratamientos con ANA. La marca de represión transcripcional H3K27me<sup>3</sup> no se observó en las plantas tratadas con AIA, ANA en las concentraciones 0.05  $\mu\text{M}$  y 0.5  $\mu\text{M}$  y en los tratamientos con 2,4-D a 0.5  $\mu\text{M}$ . La marca que favorece el silenciamiento génico H3K9me<sup>2</sup> estaba presente en el día cero, sin embargo, las plantas que no fueron tratadas con auxinas no presentaban esta marca. Tampoco presentaron esta marca las plantas tratadas con bajas concentraciones (0.05  $\mu\text{M}$ ) de IBA, ANA y altas concentraciones (0.125 y 0.5  $\mu\text{M}$ ) de 2,4-D.



**Figura 21.** Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de *A. angustifolia*. Al día 0 y tercer día *in vitro* se extrajeron las histonas de las plantas en el testigo sin auxinas y en cada uno de los tratamientos con auxinas naturales (IBA y AIA) y sintéticas (ANA y 2,4-D); se probaron los anticuerpos específicos  $\alpha$ -H3K4me<sup>3</sup>, -H3K9me<sup>2</sup>, -H3K36me<sup>2</sup> y -H3K27me<sup>3</sup> para realizar el Western blot.

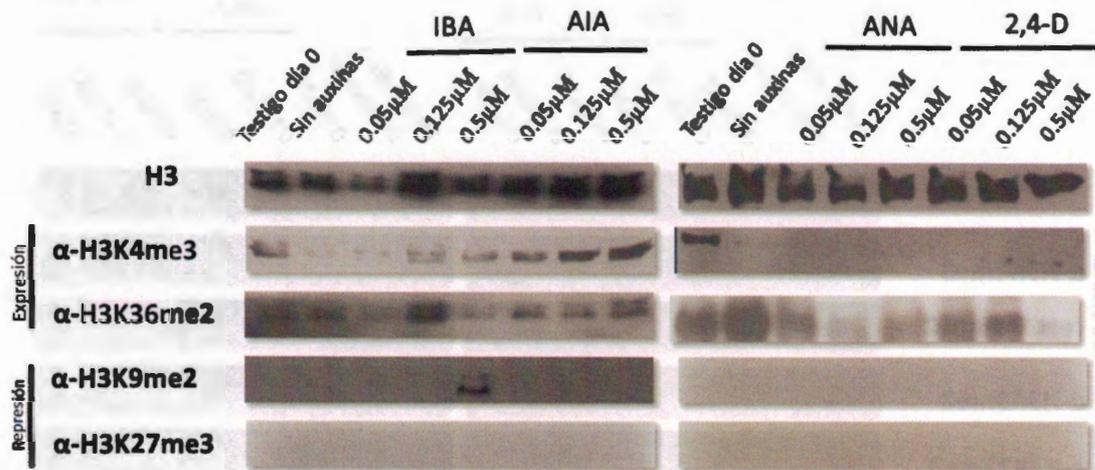
Al analizar las marcas que promueven la formación de eucromatina, es decir la expresión de genes, en el día 21 del cultivo *in vitro*, encontramos que la marca H3K4me<sup>3</sup> es menos abundante que la marca H3K36me<sup>2</sup> en todos los tratamientos, excepto en el tratamiento con 2,4-D (0.125  $\mu$ M; Figura 22). La marca de represión H3K27me<sup>3</sup> no se encontró en las plantas que fueron tratadas con las auxinas naturales IBA (0.125  $\mu$ M) y AIA (0.05 y 0.5  $\mu$ M). Esta marca de represión en los tratamientos con auxinas sintéticas no se encontró en los tratamientos con ANA (0.05 y 0.5  $\mu$ M) y 2,4-D (0.125 y 0.5  $\mu$ M).

La marca H3K9me<sup>2</sup> no está presente en los testigos sin auxinas hasta el día 21 del cultivo *in vitro*, y en los tratamientos con auxinas naturales; sin embargo, esta marca es mucho menos abundante, a diferencia del día 3 del cultivo *in vitro*, y sólo está presente en los tratamientos con 2,4-D (0.05  $\mu$ M), y ANA (0.05 y 0.125  $\mu$ M).



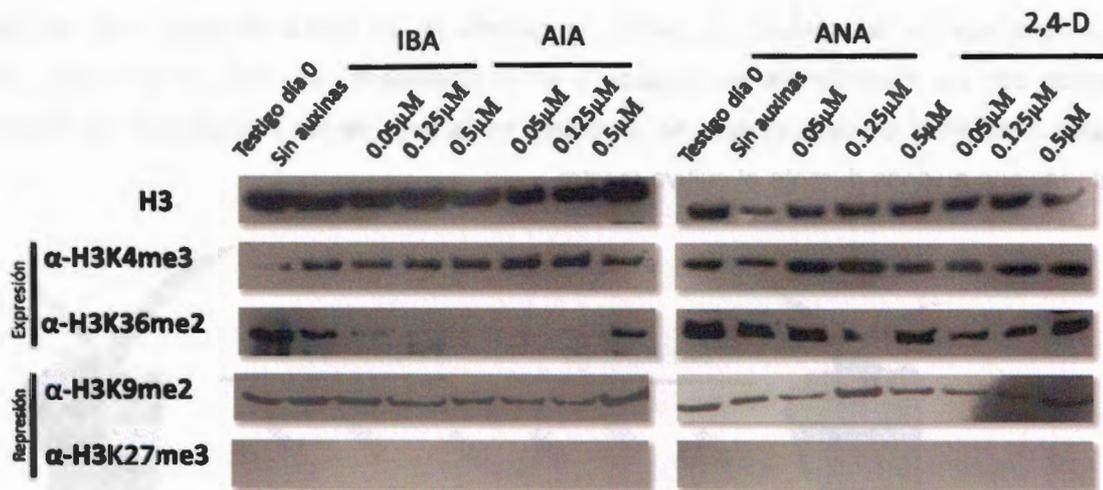
**Figura 22.** Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de *A. angustifolia*. A los días cero y 21 de plantas cultivadas *in vitro* se extrajeron las histonas de los testigos sin auxinas y de cada uno de los tratamientos con auxinas naturales (IBA y AIA) y sintéticas (ANA y 2,4-D). Se probaron los anticuerpos específicos  $\alpha$ -H3K4me<sup>3</sup>,  $\alpha$ -H3K9me<sup>2</sup>,  $\alpha$ -H3K36me<sup>2</sup> y  $\alpha$ -H3K27me<sup>3</sup> para realizar el Western blot.

Al tercer día del cultivo *in vitro* de *A. fourcroydes* hay una pérdida en la marca de expresión H3K4me<sup>3</sup> con los tratamientos con auxinas sintéticas (Figura 23), sin embargo, hay un enriquecimiento de la marca H3K36me<sup>2</sup>; en el caso de las marcas de represión fueron imposibles de detectar, excepto la marca H3K9me<sup>2</sup>, en el tratamiento con 0.5 μM de IBA.



**Figura 23.** Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de *A. fourcroydes*. Al día cero y 21 de las plantas cultivadas *in vitro* se extrajeron las histonas de los testigos y de cada uno de los tratamientos con auxinas naturales (IBA y AIA) y sintéticas (ANA y 2,4-D); se probaron los anticuerpos específicos  $\alpha$ -H3K4me<sup>3</sup>,  $\alpha$ -H3K9me<sup>2</sup>,  $\alpha$ -H3K36me<sup>2</sup> y  $\alpha$ -H3K27me<sup>3</sup> para realizar el Western blot.

A los 21 días del cultivo *in vitro*, *A. fourcroydes* presenta un enriquecimiento en la marca de expresión H3K4me<sup>3</sup> (Figura 24), sin embargo, las muestras tratadas con auxinas naturales tienen una pérdida de la marca H3K36me<sup>2</sup>, a diferencia de los tratamientos con auxinas sintéticas. La marca de represión H3K27me<sup>3</sup> está ausente en todos los tratamientos. La marca de silenciamiento H3K9me<sup>2</sup> está presente en todos los tratamientos, sin embargo, es menos abundante respecto a las demás marcas.

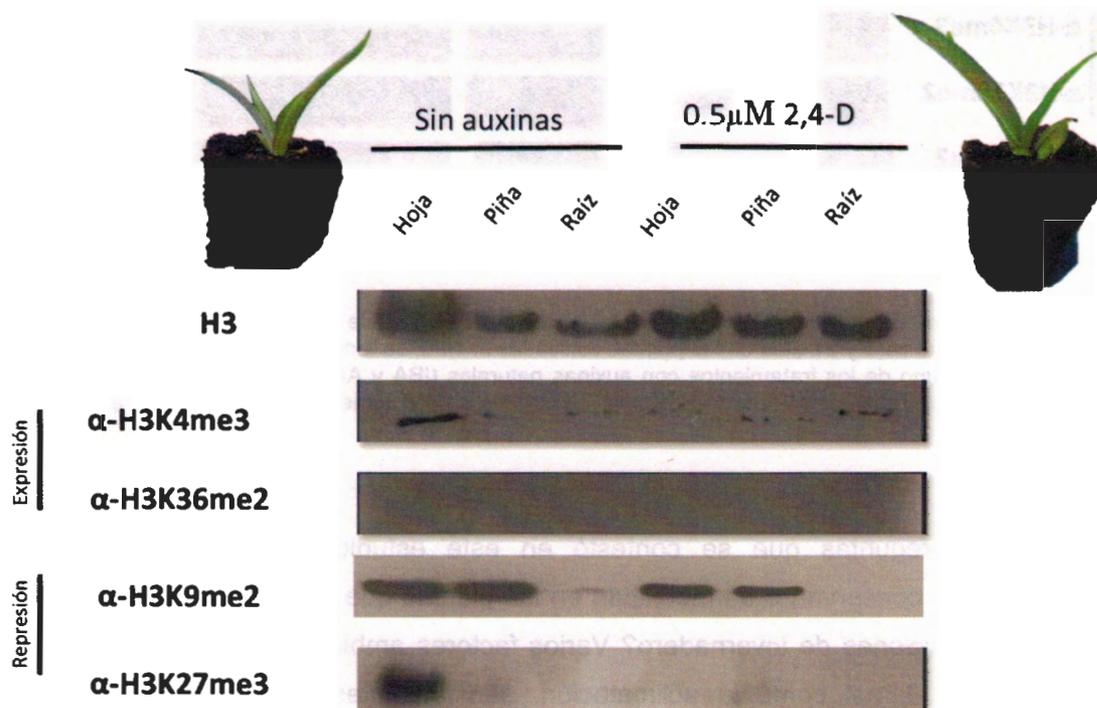


**Figura 24.** Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de *A. fourcroydes*. Las muestras se colectaron a los días cero y 21 días de las plantas cultivadas *in vitro*; se extrajeron las histonas de las plantas testigo y de cada uno de los tratamientos con auxinas naturales (IBA y AIA) y sintéticas (ANA y 2,4-D); se probaron los anticuerpos específicos  $\alpha$ -H3K4me<sup>3</sup>, -H3K9me<sup>2</sup>, -H3K36me<sup>2</sup> y -H3K27me<sup>3</sup> para realizar el Western blot.

Otra de las preguntas que se contestó en este estudio es ¿qué modificaciones epigenéticas se conservan o se modifican en las plantas que pasaron de un ambiente *in vitro* a las condiciones de invernadero? Varios factores ambientales como el estrés y la pérdida de agua, así como la aclimatación, son limitantes que creemos afectan la remodelación de la cromatina en las plantas, por ello, se examinó la metilación global de las histonas en las plantas que presentaron mayor ganancia en peso y altura para cada una de las especies de interés después de seis meses de haberlas colocado en el invernadero.

Después de seis meses de tratamiento *ex vitro*, se evaluaron las marcas de metilación en las histonas en diferentes tejidos de plantas de la especie *A. angustifolia* tratadas, durante el cultivo *in vitro*, con 2,4-D (0.5 μM) y plantas que no fueron tratadas con auxinas como testigo. Los tejidos de los que se extrajeron las histonas fueron: hoja, piña y raíz, además se probó el anticuerpo H3 como testigo positivo en todos los tratamientos como se puede observar en las figuras 25 y 26. Entre las marcas que promueven la expresión de genes, se observó que la marca H3K4me<sup>3</sup> es poco abundante en todos los tratamientos; la marca H3K36me<sup>2</sup> no estaba presente en ninguno de los tratamientos. La marca H3K9me<sup>2</sup>, que

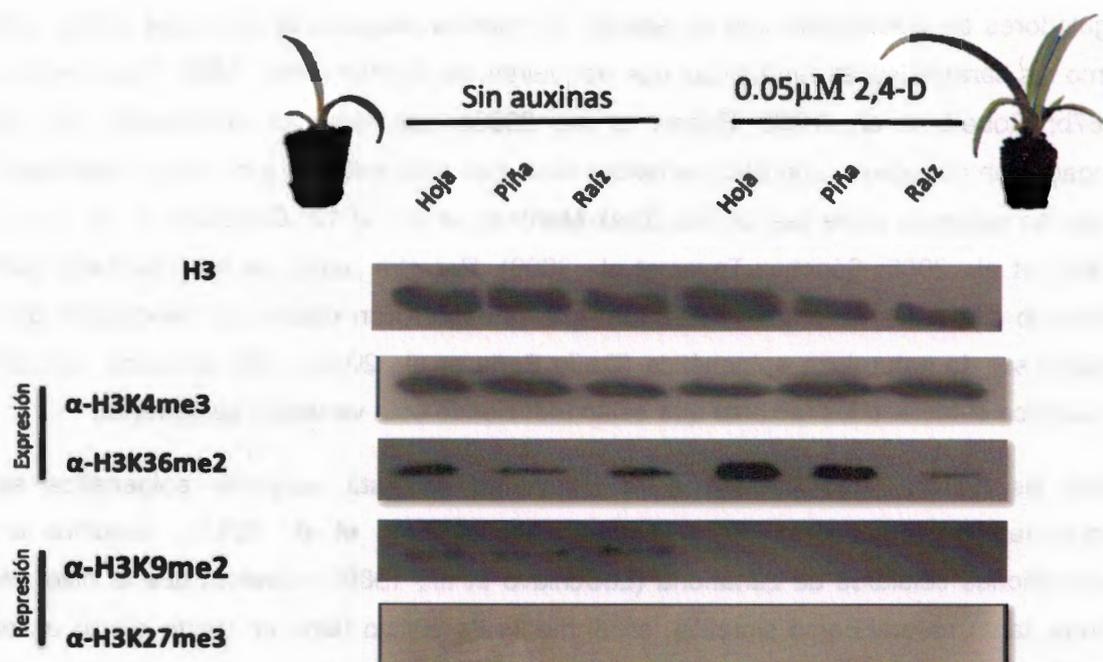
está asociada con la represión de genes, se detectó en los tejidos de hoja y piña en las plantas con los tratamientos sin auxinas y en el tratamiento con  $0.5 \mu\text{M}$  de 2,4-D. La marca  $\text{H3K27me}^3$  se detectó solo en un tejido, en la hoja de las plantas que no fueron tratadas con auxinas durante el cultivo *in vitro*.



**Figura 25.** Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de *A. angustifolia*. Las histonas se extrajeron de plantas de seis meses de cultivo *ex vitro* y de plantas testigo, así también de las plantas que fueron tratadas en la fase *in vitro* hasta los 21 días con  $0.5 \mu\text{M}$  de 2,4-D; se probaron los anticuerpos específicos  $\alpha\text{-H3K4me}^3$ ,  $\alpha\text{-H3K9me}^2$ ,  $\alpha\text{-H3K36me}^2$  y  $\alpha\text{-H3K27me}^3$  para realizar el Western blot.

La especie *A. fourcroydes* también fue evaluada durante los seis meses *ex vitro* (Figura 26). Al igual que las plantas de la especie *A. angustifolia*, *A. fourcroydes* se evaluaron tres tejidos: hoja, piña y raíz. Se extrajeron las histonas de las plantas que fueron tratadas con 2,4-D a  $0.05 \mu\text{M}$  y las plantas que no fueron tratadas con auxinas durante el cultivo *in vitro*. Como se puede observar en la Figura 26, las marcas que se relacionan con la expresión de genes  $\text{H3K4me}^3$  está presente en todos los tratamientos; la marca  $\text{H3K36me}^2$  se encuentra con mayor abundancia en hoja y raíz para los tratamientos sin auxinas, además esta marca es más abundante en los tejidos de hoja y piña en las plantas que fueron

tratadas con  $0.05\mu\text{M}$  de 2,4-D. La marca de represión  $\text{H3K9me}^2$  está presente con muy poca abundancia, respecto a el testigo H3 en las plantas que no fueron tratadas con auxinas, contrariamente en las plantas tratadas con  $0.05\mu\text{M}$  no presentaron esta marca. La marca  $\text{H3K27me}^3$  no se detectó en ninguno de los tratamientos.



**Figura 26.** Patrones de metilación global en la histona H3 en plantas de *A. fourcroydes*. Las histonas se extrajeron de plantas de seis meses de cultivo *ex vitro* tanto de plantas testigo, como de las plantas que fueron tratadas en la fase *in vitro* hasta los 21 días con  $0.05\mu\text{M}$  de 2,4-D; se probaron los anticuerpos específicos  $\alpha\text{-H3K4me}^3$ ,  $\alpha\text{-H3K9me}^2$ ,  $\alpha\text{-H3K36me}^2$  y  $\alpha\text{-H3K27me}^3$  para realizar el Western blot.

## CAPÍTULO IV. DISCUSIÓN

En el laboratorio del Dr. Manuel Robert, se han mantenido plantas de agave por más de 20 años, utilizando la técnica de micropropagación. Este sistema produce un excelente material vegetal para estudiar la influencia del ambiente *in vitro*, como es el estrés y los reguladores de crecimiento que se aplican de manera exógena al medio de cultivo, así como las características fenotípicas que adquieren las plantas (Lock, 1985; Robert et al., 1987b; Robert et al., 1992; Robert et al., 2006). Las técnicas empleadas para la propagación del agave, con características elite, han sido exitosas y no se ha observado variación genética entre las clonas (Díaz-Martínez et al., 2012; González et al., 2003; Infante et al., 2006; Sánchez-Teyer et al., 2009). Por otra parte, se ha observado que utilizando diferentes sistemas *in vitro* los agaves desarrollan diferencias fenotípicas que pueden ser de naturaleza epigenética (De la Peña et al., 2012a). Sin embargo, aún se desconoce el factor o los factores que están induciendo esta variación epigenética.

Entre los factores que pueden estar influyendo en esta variación epigenética se encuentran los reguladores del crecimiento (De la Peña et al., 2012a). Estudios en suspensiones celulares de zanahoria (LoSchiavo et al., 1989) muestran que el nivel de auxina, tanto natural como sintética, en el medio de cultivo tiene un fuerte efecto en el nivel de metilación del ADN, un mecanismo epigenético importante en la regulación de la expresión génica (Bird, 2002; Jaenisch y Bird, 2003; Ruiz-García et al., 2005). Así también, en la micropropagación de orquídeas se determinó que la variación somaclonal observada en la morfología de las flores es causada por los eventos de metilación en el ADN y que probablemente el uso de altas concentraciones de 2,4-D provoca la expresión de genes que desencadenan cada uno de los eventos morfogénicos que dan origen a diferentes variantes en las flores (Park et al., 2009).

La regulación génica depende en gran medida de las condiciones en la que están creciendo las plantas, tales como el estrés, la manipulación del material vegetal bajo condiciones *in vitro* así como otros factores propios de los sistemas *in vitro*, ya que un gran número de genes que están implicados en el crecimiento y desarrollo de las plantas responden a los reguladores de crecimiento, sobre todo a las auxinas y citocininas (Vanstraelen y Benková, 2012). Recientemente se encontró que la regulación génica

depende en gran manera de las modificaciones postranscripcionales de las histonas (Chynnusamy y Zhu, 2009). Es por esta razón que en esta tesis se evaluó el efecto de las auxinas naturales: AIA y AIB; y las auxinas sintéticas: 2,4-D y ANA en la metilación de la histona H3 durante la etapa de multiplicación *in vitro* y de aclimatación *ex vitro* del agave (Figuras 13 a 18). Los resultados obtenidos muestran (Figuras 7 a 15) que cada auxina genera diferencias fenotípicas en cuanto peso y altura de las plantas, dependiendo de la concentración y especie de agave utilizada. Por ejemplo, en *A. angustifolia* se determinó que el 2,4-D (0.05  $\mu\text{M}$ ) desarrolla plantas de menor peso y altura mientras que en *A. fourcroydes* favorece la producción de plantas con un peso y altura mayor respecto a las plantas sin auxinas. Resultados similares fueron determinados en clones de *Caladium* (Ahmed et al., 2004), una planta ornamental conocida como oreja de elefante, que es micropropagada. En dicho estudio se concluyó que el color de las hojas, una característica fenotípica, variaba con el tipo de auxina utilizada más que con la concentración de auxina utilizada. Usando concentraciones iguales de cada una de las diferentes auxinas, se determinó que el número de variantes fue mayor en un medio que contenía 2,4-D en comparación con las plantas que fueron tratadas con ANA o AIB (Ahmed et al., 2004).

En otro estudio realizado en *Zantedeschia albomaculata* (Chang et al., 2003), una planta ornamental monocotiledónea de interés comercial y micropropagada, se observó que al aumentar las concentraciones de auxinas, tanto naturales como sintéticas, la respuesta morfogénica es menor, respecto a bajas concentraciones. Las plantas que son tratadas con altas concentraciones de auxinas presentan un fenotipo de baja altura y sus flores son menos vistosas. El caso más dramático fue con altas concentraciones de ANA, esta tendencia también la observamos en *A. fourcroydes* (Figuras 12 y 19), durante la evaluación a los 21 días de cultivo *in vitro* (Paek et al., 2003). El 2,4-D es una auxina muy utilizada en el cultivo de tejidos vegetales (Gaspar et al., 1996); por otro lado, esta molécula es el principal componente de los herbicidas utilizados frecuentemente para eliminar las malezas, principalmente en los cultivos de trigo, maíz, cebada y alfalfa (Bukowska, 2006). En las plantas, esta molécula funciona manteniendo altos niveles endógenos de auxinas, resultando en la sobre-estimulación del crecimiento en la planta y por último causa la muerte. Esta auxina también induce un aumento en la producción endógena de etileno y por ello actúa como un defoliador. Se sabe que después de la

aplicación del 2,4-D, éste es absorbido rápidamente por las hojas y raíces y luego es traslocado a toda la planta (Aksakal et al., 2013).

En la micropropagación del agave (Robert et al., 2006) se utiliza el 2,4-D en la fase de multiplicación a una concentración de 0.11  $\mu\text{M}$  en el medio de cultivo. En los experimentos realizados en esta tesis se observó que las plantas de *A. angustifolia* que fueron tratadas con 0.5  $\mu\text{M}$  de la auxina presentaron mejores características en el invernadero, incluso, a pesar de no estar en contacto con los reguladores de crecimiento, ya en condiciones *ex vitro* presentaron proliferación de brotes adventicios (Figura 20). Por otro lado, las plantas de *A. fourcroydes* en condiciones tanto de *in vitro* como de *ex vitro* presentaron una mayor ganancia en peso y altura (Figuras 11 a 14) cuando fueron tratadas en la fase de multiplicación con 2,4-D (0.05  $\mu\text{M}$ ), la mitad de la concentración utilizada regularmente en esta especie (Robert et al., 2006). Robert et al. (2006) reportaron haber observado cierta habituación a los reguladores del crecimiento utilizados durante el cultivo *in vitro* de *A. fourcroydes*, lo cual podría ser una de las razones del estímulo del crecimiento a bajas concentraciones de 2,4-D. Cuando el 2,4-D fue utilizado en concentraciones mayores (0.125 y 0.5  $\mu\text{M}$ ) en *A. fourcroydes*, las plantas mostraron una reducción en el crecimiento y una menor ganancia en peso fresco, tanto en la fase de multiplicación como en el invernadero, respecto a las plantas que fueron tratadas con 0.05  $\mu\text{M}$  en la fase de multiplicación, estos datos sugieren que esta molécula tiene un efecto inhibitorio a altas concentraciones, lo cual puede deberse a que el 2,4-D es metabolizado más lentamente que las auxinas naturales, dándole su naturaleza de herbicida (Bukowska, 2006).

Se ha reportado que en células animales tratadas con 2,4-D, se inducen altos niveles de actividad de las enzimas oxidasas y catalasas, lo cual sugiere que se está llevando a cabo la detoxificación en los peroxisomas (Gonzalez et al., 2005; Lundgren et al., 1987). En las células vegetales, este herbicida induce anormalidades genéticas *in vivo* e *in vitro*. Algunos fenotipos que se han encontrado, por el uso de este regulador de crecimiento, y que se le atribuyen a respuestas al medio ambiente y a mecanismos epigenéticos son: variantes en el número y tamaño de las flores en *Begonia x elatior* y *Saintpaulia ionantha* L. (Jain, 1997) se atribuye a niveles elevados de desmetilación en el ADN; diferencias en el peso y morfología de las hojas y tallos en *Bromus inermis* Leyss. (Wattanasiri y Walton, 1993), alta respuesta embriogénica entre las clonas obtenidas en *Freesia hybrida* Klatt

(Gao et al., 2010); variaciones fenotípicas como altura, número de flores y órganos sexuales fusionados en *Torenia fournieri* Linden ex E. Fourn. (Hadi y Bridgen, 1996), diferencias en el tamaño de las espigas y el número de semillas por espiga en trigo (Hashim et al., 1990). Nuestros resultados en agave pueden ser el resultado del mismo mecanismo, aún desconocido, del efecto del 2,4-D en la variación epigenética de las plantas.

En los sistemas de cultivo de tejidos y células vegetales se han realizado estudios sobre las modificaciones en la histona H3 en suspensiones celulares de *Arabidopsis* (Tanurdzic et al., 2008) en los que se observa, que debido al largo periodo de cultivo, las células sufren cambios epigenéticos tales como la metilación del ADN y modificaciones en las histonas. Tanurdzic et al. (2008) encontraron que la hipometilación en el ADN, pérdida de la dimetilación de la lisina nueve en la histona H3 (H3K9me<sup>2</sup>) y una ganancia de la marca H3K4me<sup>2</sup> reactiva elementos transponibles como *Athila* y *Copia-like*. Por otro lado, Berdasco, et al. (Berdasco et al., 2008), realizaron un análisis de inmunoprecipitación de la cromatina tanto en suspensiones celulares de *Arabidopsis* y tejidos diferenciados y encontraron que hay una pérdida en la marca H3K4me<sup>3</sup> en los promotores de los genes *TTG1* (*Transparent Testa Glabra 1*), *GSTF5* (*Glutathione S-transferase F5*), y *SUVH8* (*Suppressor of variegation 3-9 homolog protein 8*) lo cual indica que en la desdiferenciación y en la diferenciación de los tejidos vegetales ocurren cambios a nivel de la cromatina, los cuáles podrían desencadenar la respuesta morfogénica inducida por los reguladores de crecimiento y el estrés del cultivo *in vitro*. TG juega un importante papel en el mantenimiento de la metilación represiva de genes en tejidos desdiferenciados en *Arabidopsis*; *GSTF5*, es un gen que codifica para una enzima involucrada en la detoxificación y en la tolerancia al estrés por salinidad (Dixon et al., 2009) y *SUVH8* es un supuesto gen con función metiltransferasa de histonas (Thorstensen et al., 2006).

Se sabe que la epigenética de un organismo puede cambiar dependiendo del desarrollo (Kaufmann et al., 2012), de las interacciones bióticas (De la Peña et al., 2012b), y abióticas (Gutzart y Mittelstøen, 2012; Kim et al., 2010). Por lo tanto, el mecanismo de respuesta al estrés, debido a la exposición de reguladores de crecimiento durante las condiciones *in vitro*, podrían ser clave en la regulación por factores epigenéticos. Sin embargo, no existen antecedentes en los que se demuestre que la remodelación de la

---

cromatina se encuentre influenciada por los reguladores del crecimiento aplicados al medio donde son cultivados los explantes.

En este estudio se determinó que existe un cambio en la metilación de las histonas que se diferencia en su respuesta a las auxinas sintéticas y las auxinas naturales (Figura 21 a 24). Por ejemplo, en los tratamientos realizados a los tres días en *A. angustifolia* con auxinas naturales se determinó una abundancia de la marca H3K4me<sup>3</sup> así como la marca H3K36me<sup>2</sup> que nos indican la posible formación de estructuras eucromáticas y un favorecimiento en la expresión de genes (Barski et al., 2007). Esto puede deberse a que se requiere una gran actividad transcripcional para generar el mayor número de brotes en la etapa de multiplicación por la cual pasan los agaves. Sin embargo, la abundancia de la marca H3K36me<sup>2</sup>, a los tres días de tratamiento con ANA (0.125 y 0.5 µM), es muy poca. Las plantas que tenían bajos niveles de esta marca, fenotípicamente presentaron un bajo peso en comparación con todos los tratamientos realizados y las plantas testigo (Figura 7). Por el contrario, en *A. fourcroydes* la marca H3K4me<sup>3</sup> sólo se presentó a los tres días en los tratamientos con auxinas naturales, pero no en los tratamientos con las auxinas sintéticas. La marca H3K36me<sup>2</sup> se presentó en todos los tratamientos. A los 21 días *in vitro*, aunque la marca H3K4me<sup>3</sup> estaba presente en todos los tratamientos, la marca H3K36me<sup>2</sup> no lo estaba en los tratamientos con las auxinas naturales AIB y AIA (0.05 µM y 0.125 µM). Esto sugiere que hubo un cambio en la modulación de la cromatina, favoreciendo la eucromatina a los 21 días de cultivo en las plantas que fueron tratadas con auxinas sintéticas y aquellas plantas que no fueron tratadas con auxinas durante la fase de multiplicación *in vitro*. Estos cambios en la modulación en la cromatina también se han observado en *Pinus radiata*, en los que la H3K4me<sup>3</sup> se diferencia en dos fases de crecimiento (Valledor et al., 2010). En vástagos maduros esta marca se pierde en comparación a los vástagos inmaduros durante el cultivo *in vitro*; sin embargo, en este trabajo no se hizo un seguimiento en cada una de las etapas de crecimiento, y este cambio se le atribuye a la alta expresión de los genes necesarios para llevar a cabo los eventos organogénicos en las células indiferenciadas de los vástagos inmaduros (Valledor et al., 2010).

Por otro lado, la marca H3K27me<sup>3</sup>, que es considerada una marca de represión en plantas (Barski et al., 2007; Roh et al., 2006), fue visualizada solamente en *A. angustifolia*

---

a los 21 días de cultivo *in vitro* en los tratamientos sin auxinas, 0.05  $\mu\text{M}$  y 0.125  $\mu\text{M}$  de AIB, 0.125  $\mu\text{M}$  de AIA, 0.125  $\mu\text{M}$  de ANA y 0.05  $\mu\text{M}$  de 2,4-D.

En las plantas sometidas al tratamiento con 2,4-D (0.5  $\mu\text{M}$ ), con un fenotipo vigoroso y de elevado peso, esta marca estaba ausente. Así mismo, esta marca no fue detectada en las plantas de *A. fourcroydes* en la etapa *in vitro* y tampoco en la etapa *ex vitro*. Esto sugiere que la remodelación de la cromatina depende de las auxinas pero también de la respuesta de cada especie al ambiente *in vitro*. Hasta el momento no hay reportes en la literatura sobre la estabilidad epigenética en las plantas micropropagadas una vez que éstas se encuentran en un ambiente *ex vitro*. La estabilidad epigenética es de gran importancia, ya que las variaciones presentes pueden repercutir en el desarrollo, la madurez y la tolerancia al estrés en la etapa de aclimatación e influir en el establecimiento de las plantas. Las plantas tienen que enfrentar, una vez que son retiradas de los contenedores del sistema *in vitro*, condiciones extremas de adaptación como se ha observado en las microplantas de papa (Joyce y Cassells, 2002); pero hasta ahora no se conoce si las modificaciones en las histonas están involucradas. En este estudio, se encontraron cambios en la remodelación de la cromatina de plantas que fueron aclimatadas en el invernadero. Se observó que las plantas que eran fenotípicamente más grandes y con un mayor peso, de la especie *A. angustifolia* sólo presentaron la marca H3K4me<sup>3</sup> en los tres tejidos evaluados, en tanto que en las plantas que no fueron tratadas con auxinas, durante la multiplicación *in vitro*, pudimos detectar la marca H3K27me<sup>3</sup> solo en la hoja. Sin embargo, no se pudo observar la marca H3K36me<sup>2</sup>. Estos resultados sugieren que una vez que las plantas pasan a la etapa de aclimatación, otro mecanismo regula la expresión génica, conjuntamente con la marca H3K4me<sup>3</sup>, para favorecer el crecimiento de las plantas, como podría ser la hipometilación del ADN (De la Peña et al., 2012a).

Los resultados obtenidos en este trabajo nos muestran la plasticidad de los tejidos vegetales, así como que la respuesta al estrés y a los reguladores del crecimiento en el cultivo de tejidos es modulado epigenéticamente en agave como se ha sugerido previamente en nuestro grupo de trabajo (De la Peña et al., 2012a).

---

---

#### 4.1. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed E. U., T. Hayashi y S. Yazawa, Auxins increase the occurrence of leaf-colour variants in *Caladium* regenerated from leaf explants, *Science Horticulture*, 100: 159, (2004).
- Aksakal O., F. A. Erturk, S. Sunar, S. Bozari y G. Agar, Assessment of genotoxic effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on maize by using RAPD analysis, *Industrial Crops and Productis*, 552-557, (2013).
- Barski A., S. Cuddapah, K. Cui, T. Roh, D. Schones, Z. Wang, G. Wei, I. Chepelev y K. Zhao, High-resolution profiling of histone methylations in the human genome, *Cell*, 129: 823-837, (2007).
- Berdasco M., R. Alcázar y M. V. García-Ortiz, Promoter DNA methylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* cells, *PLoS ONE*, 3: e3306, (2008).
- Bird A., DNA methylation patterns and epigenetic memory, *GENES & DEVELOPMENT*, 16: 6-21, (2002).
- Bukowska B., Toxicity of 2,4-Dichlorophenoxyacetuc acid-Molecular Mechanisms, *Polish Journal of Enviromental Studies*, 15: 365-374, (2006).
- Chang H. S., D. Chakrabarthy, E. J. Hahn y K. Paek, Micropropagation of Calla Lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation, *In Vitro Cell Development Biology- Plant*, 39: 129-134, (2003).
- Chynnusamy V. y J.-K. Zhu, Epigenetic regulation of stress responses in plants, *Current Opinion in Plant Biology*, 133-139, (2009).
- De la Peña C., G. Nic-Can, G. Ojeda, J. L. Herrera-Herrera, A. López-Torres, K. Wrobel y M. L. Robert, KNOX1 is expressed and epigenetically regulated during *in vitro* conditions in *Agave* spp., *Bio Med Central Plant Biology*, 12: 1-11, (2012a).
- De la Peña C., A. Rangel-Cano y R. Alvarez-Venegas, Regulation of disease-responsive genes mediated by epigenetic factors: interaction of *Arabidopsis*-*Pseudomonas*, *Molecular Plant Pathology*, 388-398, (2012b).
- Díaz-Martínez M., A. Nava-Cedillo, J. A. Guzmán-López, R. Escobar-Guzmán y J. Simpson, Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. Azul plants propagated asexually by three different methods, *Plant Science*, 185: 321-330, (2012).
- Dixon D. P., T. Hawkins, P. J. Hussey y R. Edwards, Enzyme activities and subcellular localization of members of the *Arabidopsis* glutathione transferase superfamily, *Journal of Experimental Botany*, 60: 1207-1218, (2009).

- Gao X., D. Yang, D. Cao, M. Ao, X. Sui, Q. Wang, J. N. Kimatu y L. Wang, In vitro Micropropagation of *Freesia hybrida* and the Assessment of Genetic and Epigenetic Stability in Regenerated Plantlets, *Journal of Plant Growth regulators*, 257-267, (2010).
- Gaspar T., C. Kevers, C. Penel, H. Greppin, D. M. Reid y T. A. Thorpe, Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture, *In Vitro Cell Development Biology- Plant*, 272-289, (1996).
- González G., S. Alemán y D. Infante, Asexual genetic variability in *Agave fourcroydes* II: selection among individuals in a clonally propagated population, *Plant Science*, 595-601, (2003).
- Gonzalez M., S. Soloneski, M. A. Reigosa y M. L. Larramendy, Genotoxicity of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and commercial formulation, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid dimethylamine salt I. Evaluation of DNA damage and cytogenic endpoints in Chinese Hamster ovary (CHO) cells., *Toxicology In Vitro*, 289-297, (2005).
- Gutzart R. y S. O. Mittelsten, Epigenetic responses to stress: triple defense?, *Current Opinion in Plant Biology*, (2012).
- Hadi M. Z. y M. P. Bridgen, Somaclonal variations as a tool to develop pest resistant plants of *Torenia fournieri* Compacta Blue, *Plant Cell, Tissue and organ Culture*, 43-50, (1996).
- Hashim Z. N., W. F. Campbell y J. G. Carman, Morphological analyses of spring wheat (CIMMYT cv. PCYT-10) somaclones, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 95-99, (1990).
- Infante D., S. Molina, J. R. Demey y E. Gámez, Asexual genetic variability in Agavaceae determined with inverse sequencetagged repeats and amplification fragment length polymorphism analysis, *Plant Molecular Biology Reports*, 24: 205-217, (2006).
- Jaenisch R. y A. Bird, Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals, *Nature genetics Supplement*, 33: 245-254, (2003).
- Jain S. M., Micropropagation of selected somaclones of *Begonia* and *Saintpaulia*, *Journal of Bioscience*, 22: 585-592, (1997).
- Joyce S. M. y A. C. Cassells, Variation in potato microplant morphology *in vitro* and DNA methylation, *Plant Cell, Tissue and organ Culture*, 125-137, (2002).
- Kaufmann K., A. Pajoro y G. C. Angenet, Regulation of transcription in plants: mechanisms controlling developmental switches, *Natural Reviews Genetic*, 830-824, (2012).

- Kim J. M., T. K. To, T. Nishioka y M. Seki, Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses, *Plant Cell Environment*, 604-611, (2010).
- Lock G. W., On the scientific and practical aspects of sisal (*Agave sisalana*) cultivation, en: *Biología y Aprovechamiento Integral del Henequen y Otros Agaves*, (Cruz C., L. Del Castillo, M. L. Robert y R. N. Ordanza, eds.), Centro de Investigación Científica de Yucatán, A. C., 99-119, (1985).
- LoSchiavo F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli y M. Terzi, DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs, *Theor Appl Genet*, 177: 325-331, (1989).
- Lundgren B., J. Mejer y J. W. De Pierre, Induction of cytosolic and microsomal epoxide hydrolases and proliferation of peroxisomes and mitochondria in mouse liver after dietary exposure to p-chlorophenoxyacetic acid, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and 2,4,5-trichlorophenoxyacetic acid, *Biochemistry and Pharmacology*, 815-821, (1987).
- Paek K., H. S. Chang y E. J. Chakrabarty, Micropropagation of Calla Lily (*Zantedeschia albomaculata*) via *in vitro* shoot tip proliferation, *In Vitro Cell Development Biology-Plant*, 39: 129-134, (2003).
- Park S., H. Murthy, D. Chakrabarty y K. Paek, Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of *Doritaenopsis* by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis., *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45: 104-108, (2009).
- Robert M. L., J. L. Herrera y F. Contreras, Micropropagation of *Agave* spp., en: *Biotechnology in agriculture and forestry*, (Bajaj Y. P. S., ed.), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, 307-329, (1992).
- Robert M. L., J. L. Herrera, F. Contreras y K. N. Scorer, Micropropagation of *Agave fourcroydes* Lem. (Henequen), *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 37-48, (1987).
- Robert M. L., J. L. Herrera-Herrera, E. Castillo, G. Ojeda y M. A. Herrera-Alamillo, An efficient method for the Micropropagation of *Agave* Species, en: *Plant Cell Culture Protocols*, (Loyola-Vargas V. M. y F. Vázquez-Flota, eds.), 165-178, (2006).
- Roh T., S. Cuddapah, K. Cui y K. Zhao, The genomic landscape of histone modifications in human T cells, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 15782-15787, (2006).
- Ruiz-García L., M. T. Cervera y J. M. Martínez-Zapater, DNA methylation increases throughout *Arabidopsis* development, *Planta*, 222: 301-306, (2005).
- Sánchez-Teyer F., S. Moreno-Salazar, M. Esqueda, A. Barraza y M. L. Robert, Genetic variability of wild *Agave angustifolia* populations based on AFLP: A basic study for conservation, *Journal of Arid Environments*, 73: 616, (2009).

- Tanurdzic M., M. W. Vaughn, H. Jiang, T. J. Lee, R. K. Slotjin, B. Sosinski, W. F. Thompson, R. W. Doerge y R. A. Martienssen, Epigenomic Consequences of Immortalized Plant Cell Suspension Culture, PLoS BIOLOGY, 6: 2880-2895, (2008).
- Thorstensen T., A. Fisher, S. V. Sandvik, S. S. Johnsen, P. E. Grini, G. Reuter y R. B. Aalen, The *Arabidopsis* SUV4 protein is a nucleolar histone methyltransferase with preference for monomethylated H3K9, Nucleic Acids Res., 34: 5470, (2006).
- Valledor L., M. Meijón, R. Hasbún, M. J. Cañal y R. Rodríguez, Variations in DNAmethylation, acetylatedhistone H4, and methylated histone H3 during *Pinus radiata* needle maturation in relation to the loss of in vitro organogenic capability, Journal of Plant Physiology, 167: 351-357, (2010).
- Vanstraelen M. y E. Benková, Hormonal Interactions in the Regulation of plant Development, Annuals Review Cell Developmental Biology, 463-487, (2012).
- Wattanasiri C. y P. D. Walton, effects of growth regulators on callus cell growth, plant regeneration, and somaclonal variation of smooth brome grass (*Bromus inermis* Leyss.), Euphytica, 77-82, (1993).

## CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

### 5.1 CONCLUSIONES

La micropropagación es una gran herramienta para el escalamiento en la producción de plantas económica y agrónomicamente importantes. Sin embargo, hay muy poca evidencia del papel de los mecanismos epigenéticos, como las modificaciones en las histonas, y de su influencia en la interacción de las plantas en condiciones *in vitro* propias de la micropropagación, con el ambiente.

Las conclusiones de este trabajo son las siguientes:

- ✓ El 2,4-D en *A. fourcroydes* (0.05  $\mu\text{M}$ ) y en *A. angustifolia* (0.5  $\mu\text{M}$ ) tuvo un efecto positivo en el peso y la altura de las plantas.
- ✓ En este estudio se encontró que las auxinas sintéticas ANA y 2,4-D inducen la acumulación de la marca H3K36me<sup>2</sup>, relacionada con la expresión de genes en *A. angustifolia* y *A. fourcroydes in vitro*, mientras que la marca H3K27me<sup>3</sup>, relacionada con la represión, solamente se encontró en *A. angustifolia* en el día 21 del cultivo *in vitro* y a los 6 meses del cultivo *ex vitro*.
- ✓ La marca H3K9me<sup>2</sup> se acumula después de los 21 días de cultivo *in vitro* y en los tratamientos sin auxinas a los 6 meses de cultivo *ex vitro* en *A. fourcroydes*. Por el contrario, esta marca se pierde a los 21 días del cultivo *in vitro* en *A. angustifolia* y aparece a los 6 meses del cultivo *ex vitro*.
- ✓ Estos resultados sugieren que la remodelación de la cromatina en agave, durante la micropropagación, depende del tipo y de la concentración de auxina y de la especie ante el estímulo de estrés, proveniente tanto del ambiente *in vitro* como del ambiente *ex vitro*.

## 5.2. PERSPECTIVAS

Entre las preguntas de investigación que se generaron al concluir con este trabajo y que son muy importantes para futuras investigaciones, se enlistan las siguientes:

1. ¿Qué genes están siendo regulados por las marcas H3K36me<sup>2</sup> y H3K9me<sup>2</sup>? Para responder esta pregunta es necesario analizar mediante la técnica de la Inmunoprecipitación de la Cromatina (ChiP) los genes que están regulados por las marcas epigenéticas que presentaron un comportamiento contrastante entre los tratamientos y las condiciones *in vitro* y *ex vitro*.
2. ¿Qué funciones bioquímicas y moleculares tiene el 2,4-D en la organogénesis del agave para la generación de organismos elite? Para abordar este tema es importante estudiar la influencia del 2,4-D en la homeostasis de las auxinas endógenas en el evento morfogénico de la organogénesis directa durante el proceso de micropropagación de *Agave*, así como también la expresión de los genes relacionados con el transporte de auxinas. En particular si la expresión de estos genes es regulada epigenéticamente.

