



*Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.
Posgrado en Ciencias Biológicas*

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN Y TIPO DE
AUXINA EN EL GRADO DE METILACIÓN DEL ADN
EN AGAVE CULTIVADO IN VITRO.**

Tesis que presenta

ZAMARIA YOSELÍN DE LA TORRE ESPINOSA

En opción al título de

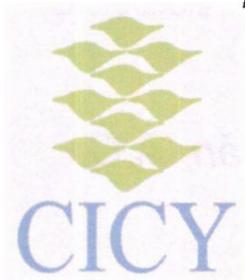
MAESTRO EN CIENCIAS

*(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología de Plantas)
Mérida, Yucatán, México*

2013



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



RECONOCIMIENTO

*Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis titulado “Efecto de la concentración y tipo de auxina en el grado de metilación del ADN en Agave cultivado in vitro” fue realizado en los laboratorios de la Unidad de Biotecnología 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 de 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, Diciembre del 2013

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



DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

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

Zamaria Yoselín De la Torre Espinosa

AGRADECIMIENTOS:

Primero que nada por el apoyo CONACYT que se me fue otorgado para poder realizar mis estudios de posgrado con el número de proyecto: 1234566.

Al proyecto de ciencia básica 2012, Metilación del ADN en Agave spp, con el número de proyecto 178149 otorgado a la Dra. Clelia De La Peña, proyecto ciencia básica 2012, denominado Rejuvenecimiento mediante cultivo in-vitro: Agave un modelo, con el número de proyecto CB0049, otorgado al Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer.

Mamá y Papá: *Ojala pudiera pensar diferente eso me permitiría estar con ustedes cuando ríen cuando lloran cuando se enferman y en los tiempos difíciles, pero mi manera de pensar, mis preguntas, mis inquietudes se me fueron acentuando conforme observaba y experimentaba, la mejor filosofía me la han enseñado ustedes, de las frases que me han marcado y alegrado mi vida fue: La tristeza no se llora; se supera, los errores no se niegan; se asumen, los pecados no se juzgan; se perdonan, el amor no se grita; se demuestra, " sueña lo que deseas soñar, ve a donde quieres ir y sé lo que quieres ser, la mejor manera de predecir tu futuro es creándolo", ahora yo te puedo decir : en el trayecto he llorado y he sufrido pero también lo supere, he asumido mis errores, he perdonado, he demostrado cuando amor y apego tengo a lo que me gusta hacer, deseo y mis expectativas son muy altas porque nunca me han cortado las alas para seguir soñando llegare tan lejos como podre pero todo gracias a ustedes, pues solo estoy haciendo lo que ustedes me inculcaron, el muro y la estructura para que no me caiga en la vida son ustedes, pues es el más grande regalo que me ha dado la vida " el hecho de ser mis padres", Los amo mucho gracias por todo.*

Mi Hermanos Arcelia, José Alfonso, Carolina, *Al siempre brindarme apoyo en cada una de las etapas de mi vida, por educar a mis sobrinos a siempre esperarme, por darme esos nenes tan hermosos que quiero tanto y por al igual que yo siempre ponerse muy contentos por cada meta de vida que voy obteniendo, sé que no somos una familia normal pero aun así los quiero.*

Dra. Clelia De la Peña, *por formar parte de mi formación academia desde mis estudios de licenciatura hasta la actualidad, por la gran paciencia que me ha tenido en los dos años, por permitirme formar parte de su grupo de trabajo, gracias por el gran recibimiento y el apoyo desde el inicio del posgrado, los consejos durante este periodo de formación académica.*

Dr. Rolffy Ruben Ortíz, *Por ser parte de mi comité tutorial durante toda mi trayectoria de maestría por las observaciones realizadas y las correcciones realizadas durante cada tutorial.*

Dr. Lorenzo Felipe Sánchez Teyer, *Por prestarme su laboratorio, reactivos, material, darme un grupo de trabajo, el apoyo en general que ha sido bastante y de gran ayuda, enseñarme a guardar la calma cuando estoy al punto del infarto, por el tiempo que sé que no tiene que me dedicó aun que sea a las 7 de la madrugada, por saber dirigir parte de mi trabajo, y por el aprecio que sé que me tiene porque aunque no sean cosas importantes siempre se toma el tiempo de escucharme aunque últimamente no tanto ׀׀, pero de todas maneras yo sé que siempre está pendiente, muchas gracias por TODO.*

Dr. Luis Sáenz Carbonell, *Al aceptar formar parte de mi comité evaluador, las observaciones realizadas y porque como es coordinador también le tocara recibir mi formato muchas gracias por todo doctor.*

Dr. Manuel Robert Díaz, *Por las línea clonales tanto de Agave fourcroydes y Agave angustifolia donadas para la realización del trabajo, por permitirme trabajar dentro de su laboratorio, y por aceptar formar parte de mi comité de revisión y evaluador.*

M en C. Adriana Quiroz Moreno, *Adri's muchas gracias por todo, por la asesoría que me diste, por todos los consejos impartidos, por todas las regañadas que me diste, por los regalos recibidos, por el cariño que me tienes, el apoyo brindado, por las jaladas de orejas, porque aunque estas chiquita y das ternura tienes tu carácter y no dejabas que me saliera de enfoque, por prohibirme rotundamente llegar desmaquillada, mal vestida, greñuda y sin perfumé al laboratorio y por siempre ser una gran amiga para mí.*

Laboratorio de Marcadores moleculares y Genómica funcional, *aunque ya sé que no soy del grupo siempre me sentí como parte del mismo, aunque Toñito no quisiera y siempre me quería poner mi cortinita, gracias por todo su apoyo todos son unos muy buenos compañeros del laboratorio pues cada uno me apoyo de diferente forma pero todos lo hicieron, todo lo dicho entre cada seminario espero haya reforzado mi formación académica de algo tiene que servir irme a llorar quedito a los baños de mujeres, son un gran grupo de trabajo, Toñito aunque eres seco gracias por prestarme la computadora, cuando llegue fue con el que primero que me puse a dialogar y tu*

fingiste un muy buen interés, pues desde entonces me caes re – bien, aunque saliendo del laboratorio te quejaras porque te dejaba mis cascarras de naranja en tu lugar, Doñita Laurita de igual manera usted me ha brindado una hermosa amistad en donde los que estamos tras bambalinas hemos disfrutado bastante, aunque quedemos más buenos con tanta galleta que comemos en la tarde, Mari gracias por todo, por tomarte el tiempo que tampoco tienes en revisar mi escrito y hacer observaciones en mis presentaciones han sido de mucha ayuda, pica por todas las veces que me ibas a molestar a mi lugar creo que esas son de las molestias más agradables, pues siempre terminaba estudiando, deja tú lo académico, el placer de verte bailar con tu melena (pelo, pelo) son de las experiencias más extrasensoriales que he pasado en la maestría, Hujara por siempre tener el tino de que llegaras al laboratorio y yo siempre como magdalena llore y llore y las palabras de aliento y consuelo, Gerardo, Marijo, Ana, ustedes los chicos de hoy, de igual les agradezco las observaciones generadas de su parte, las convivencias.

Laboratorio de Epigenética y Cromatina de plantas, *muchachones muchas gracias por todo, no tuvimos la oportunidad de convivir diario pero de igual manera en cada uno de los seminarios siempre hubo una buena retroalimentación de conocimientos, por todos esos convivios que me permitieron disfrutar con ustedes, en los festejos no siempre hago acto de presencia pero es grato disfrutar de su presencia, por siempre atenderme muy cordialmente siempre que los iba a visitar, claro como somos un grupo serio nunca soltamos una carcajada en el laboratorio, la maestría no te da tiempo de chismear así que siento mucho no haber compartido esos eventos con ustedes, os quiero mucho y recuerden que al ser epigenéticos en algún sitio del camino nos encontraremos y que creen¿?, les preguntare con mucho gusto muajajaja.....jiji espero y no me extrañen en los seminarios, pues ya se va la que siempre les hacia las preguntas feas ☹-*

Mi familia disfuncional, por todos los integrantes de esa gran familia disfuncional saben que los quiero con todo mi corazón recuerden que teníamos que hacer una maestría en cosas totalmente diferentes para ser multidisciplinarios tal y como lo exige el CICY, porque tenían que pasar unos cuantos años para encontrar gente tan rara, con ustedes me sentí normal estos dos años de maestría los quiero mucho mucho, me dolerá dejarlos pues SOMOS UNA FAMILIA DISFUNCIONAL PERO LA TENEMOS DE QUE SE QUEJAN, Zaira, Lupita, Mintzyrani, Irving, Vincent, Alfredo, Flor, MariChole, Diana, Eduardo, Laura, Ana, Joel, MagdiZ, Paolita, Eduardo, Ulises, por esas veladas tan llenas de conocimiento que pasamos todos juntos los Amo a todos.

Laura a mi amiga y compañera de vida, sabes que te quiero mucho aunque siempre nos paliamos y desde el año 2004 es el final de nuestra amistad ahora si definitivamente y nunca sucede creo que mi padre dios no me dio un marido pero te mando a ti, creo que es suficiente.

Mis amigos que hice y que también quiero con todo mi corazón Abrham aunque no la pasemos discutiendo floñadas, Rosita Gómez, Victoria Nuño, Pepito, Julieta, Kelly, Alejandro, Diego, Shaggys Dulce, Jacobo, si se me olvida alguno lo siento

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS.....	v
ÍNDICE DE CUADROS:.....	vi
RESUMEN.....	1
ABSTRACT	2
CAPÍTULO I.....	3
INTRODUCCIÓN.....	3
ANTECEDENTES.....	5
1.1. LA IMPORTANCIA DE LA METILACIÓN EN EL ADN DE LAS PLANTAS.	6
1.2 CULTIVO IN VITRO.	7
1.2.1. MICROPROPAGACIÓN.....	8
1.3. REGULADORES DEL CRECIMIENTO.	10
1.4. METILACIÓN DEL ADN EN CULTIVO DE TEJIDOS.	11
1.5. CAMBIOS EN LA METILACIÓN DEL ADN POR EFECTO DE LAS AUXINAS.	12
1.6. CAMBIOS EN LA METILACIÓN DEL ADN DURANTE EL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN.....	12
HIPÓTESIS:	15
OBJETIVOS:	16
OBJETIVO GENERAL:	16
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	16
JUSTIFICACIÓN.....	17
REFERENCIAS.....	18
CAPÍTULO II.....	25
SELECCIÓN, PROPAGACIÓN Y TRATAMIENTOS CON AUXINAS	25
2.1. INTRODUCCIÓN.	25
2.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	25
2.2. RESULTADOS.....	27

2.3. DISCUSIÓN.....	34
2.4. CONCLUSIÓN.....	34
2.5. REFERENCIAS.....	35
CAPÍTULO III.....	37
PORCENTAJE DE METILACIÓN GLOBAL EN EL ADN DE AGAVE FOURCROYDES Y A. ANGUSTIFOLIA CON LOS DIFERENTES TIPOS Y CONCENTRACIONES DE AUXINAS.....	37
3.1. INTRODUCCIÓN.....	37
3.2. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
3.2.1. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO.....	37
3.2.2. PORCENTAJE DE METILACION GLOBAL (HPLC).....	38
3.3. RESULTADOS.....	40
3.4. DISCUSIÓN.....	45
3.5. CONCLUSIÓN.....	45
3.6. REFERENCIAS.....	45
CAPÍTULO IV.....	47
PERFILES DE METILACIÓN POR MEDIO DE AMPLIFICACIÓN POLIMÓRFICA SENSIBLE A METILACIÓN (MSAP) EN AGAVE FOURCROYDES Y AGAVE ANGUSTIFOLIA EN DIFERENTES TIPOS Y CONCENTRACIONES DE AUXINAS. .	47
4.1. INTRODUCCIÓN.....	47
4.2. MATERIAL Y METÓDOS.....	47
4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.....	51
4.4. RESULTADOS.....	51
4.5. DISCUSIÓN.....	64
4.6. CONCLUSIÓN.....	64
4.7. REFERENCIAS.....	65
CAPÍTULO V.....	67
DISCUSION GENERAL.....	67
REFERENCIAS.....	71
CAPITULO VI.....	78

<i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>78</i>
<i>PERSPECTIVAS.....</i>	<i>79</i>
<i>CAPITULO VII.....</i>	<i>81</i>
<i>ANEXOS.....</i>	<i>81</i>

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 2.1.- Esquematación del diseño experimental durante el muestreo y análisis de las muestras.</i>	<i>26</i>
<i>Figura 2.2.- Peso fresco en Agave fourcroydes a los 3 y 21 días.</i>	<i>28</i>
<i>Figura 2.3.- Altura de Agave fourcroydes a los 3 y 21 días.</i>	<i>29</i>
<i>Figura 2.4.- Peso fresco en Agave angustifolia a los 3 y 21 días l.</i>	<i>32</i>
<i>Figura 2.5.- Altura de Agave angustifolia los 3 y 21 días.</i>	<i>33</i>
<i>Figura 3.1.- Cromatograma del HPLC de una muestra estándar que muestra la separación de nucleósidos hidrolizados a una de onda de 286 nm.</i>	<i>39</i>
<i>Figura 3.2.- Cuantificación de la concentración de la 2 – desoxicitidina y 5-metil, 2-desoxicitidina mediante el área bajo la curva (mAU).</i>	<i>40</i>
<i>Figura 3 3.- Análisis para mostrar los porcentajes de metilación global de Agave fourcroydes en cada uno de sus concentraciones y auxinas utilizadas.</i>	<i>43</i>
<i>Figura 3.4.- Análisis para mostrar los porcentajes de metilación global de Agave angustifolia en cada uno de sus concentraciones y auxinas</i>	<i>44</i>
<i>Figura 4.1.- Electroferograma completo generado por el secuenciador Beckman CQ800 y analizado en el software GeneMarker®.</i>	<i>50</i>
<i>Figura 4.2.- Eventos de metilación del ADN en Agave fourcroydes a una concentración de 0.05 μM con cada uno de las auxinas utilizadas.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 4.3.- Eventos de metilación del ADN en Agave fourcroydes a una concentración de 0.125 μM con cada uno de las auxinas utilizadas.</i>	<i>56</i>
<i>Figura 4.4.- Eventos de metilación del ADN en Agave fourcroydes a una concentración de 0.5 μM con cada uno de las auxinas utilizadas.</i>	<i>57</i>
<i>Figura 4.5.- Eventos de metilación del ADN en Agave angustifolia una concentración de 0.05 μM con cada uno de las auxinas utilizadas.</i>	<i>62</i>
<i>Figura 4.6.- Eventos de metilación del ADN en Agave angustifolia a una concentración de 0.125 μM con cada uno de las auxinas utilizadas</i>	<i>62</i>
<i>Figura 4.7.- Eventos de metilación del ADN en Agave angustifolia a una concentración de 0.5 μM con cada uno de las auxinas utilizadas).</i>	<i>63</i>

ÍNDICE DE CUADROS:

<i>Cuadro 1.- Clasificación de metiltransferasas de acuerdo a su función</i>	<i>6</i>
<i>Cuadro 2.- Tipos de enzimas que se utilizaron en el MSAP.....</i>	<i>49</i>
<i>Cuadro 3.- Secuencias de adaptadores y cebadores utilizados en este estudio.</i>	<i>50</i>
<i>Cuadro 4.- IBA en Agave fourcroydes muestra con los fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.</i>	<i>52</i>
<i>Cuadro 5.- AIA en Agave fourcroydes con los fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.....</i>	<i>53</i>
<i>Cuadro 6.- ANA en Agave fourcroydes con los en comparación con el control con cada uno de los eventos de metilación y el total de fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos</i>	<i>54</i>
<i>Cuadro 7.- 2,4-D en Agave fourcroydes con los fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.</i>	<i>55</i>
<i>Cuadro 8.- IBA en Agave angustifolia con los fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.....</i>	<i>58</i>
<i>Cuadro 9.-AIA en Agave angustifolia con los fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.....</i>	<i>59</i>
<i>Cuadro 10.- ANA en Agave angustifolia con los fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.</i>	<i>59</i>
<i>Cuadro 11.- 2,4-D en Agave angustifolia con los fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.</i>	<i>61</i>

RESUMEN

La metilación del ADN es un mecanismo molecular que forma parte de la regulación epigenética la cual es necesaria para generar diferentes células con función específica o para el control en la expresión genética. En plantas, debido a la plasticidad que poseen, la metilación del ADN es una pronta respuesta para que se activen o inactiven genes y de esa manera responder a diferentes estreses causados por efectos ambientales. Hoy en día se conoce que en el cultivo in vitro la variación en la metilación global del ADN y en los eventos de metilación se asocia directamente al uso de reguladores del crecimiento, entre estos las auxinas han sido las más estudiadas. El cultivo in vitro es una herramienta que permite la propagación masiva de plantas a partir de individuos vegetales "elite". A. angustifolia y A. fourcroydes son especies que han sido propagadas in vitro debido a la importancia agroindustrial que estas poseen para la elaboración de bebidas alcohólicas o en la fabricación de fibras naturales, respectivamente. En la presente tesis se evaluó el porcentaje de metilación global y los eventos de metilación presentes en el ADN en plantas de Agave spp expuestas a diferentes concentraciones y tipos de auxinas. Se encontró que las diferentes concentraciones y tipos de auxinas inducen cambios en la metilación global y eventos de metilación, lo que posiblemente pueda indicar un control en la regulación de genes en respuesta auxinas.

ABSTRACT

DNA methylation a part of epigenetic related molecular mechanism, which is necessary to generate different cells with specific functions or control gene expression. In plants, due to the plasticity possess, DNA methylation is an important mechanism in order to respond very quickly to activate or inactivate the genes and this way to respond to different stresses caused by environmental effects. Today it is known that, in plant tissue culture the variation occurs in global DNA methylation and the methylation events associated with auxins, which is known as a basic growth regulator. In plant tissue culture it is a tool that allows mass propagate the plants form "elite", Agave fourcroydes and Agave angustifolia are species they have established protocols to micropropagation because of the importance that this has a making household fibers, manufacture of alcoholic beverages respectively. In the present work, the percentage of global DNA methylation and the events from DNA methylation presents in DNA of Agave spp exposed to different concentrations and auxin types were evaluated. In conclusion, different concentrations and types of auxins induce changes in global methylation and methylation events were identified; and this which can possibly indicate the control in auxin related gene regulation.

CAPÍTULO I.

INTRODUCCIÓN

La regulación epigenética no sólo es importante para generar la especificidad celular durante el desarrollo si no también es importante para mantener la estabilidad y la integridad de los perfiles de expresión en diferentes tipos de células (Allis et al., 2009) (Chan et al., 2005). Dentro de los mecanismos moleculares que median la regulación epigenética se encuentran la metilación del ADN, las modificaciones de las histonas y los pequeños ARN no codificantes. Sin embargo, el mecanismo epigenético más estudiado en plantas y animales ha sido la metilación en el ADN (Law y Jacobsen, 2010).

*La metilación en las citosinas del ADN en eucariotas es un mecanismo que permite regular de manera endógena la expresión de los genes (Law y Jacobsen, 2010). En *Arabidopsis thaliana* se ha reportado que la metilación en el ADN tiene dos funciones principales, la primera es de protección al genoma de elementos móviles en el ADN y la segunda es la regulación en la expresión de los genes (Chan et al., 2005). En algunos reportes se ha documentado que la metilación en el promotor o en la secuencia codificante modifica la expresión genética. Sin embargo, estas metilaciones también están relacionadas con la inhibición de la expresión (Finnegan et al., 2000), de manera general la regulación epigenética son mecanismos importantes dentro del cultivo de tejidos para que pueda generar una maquinaria genética adecuada en la planta durante las diferentes etapas que implica este proceso.*

El cultivo de tejidos vegetales es una técnica que permite la propagación de grandes volúmenes de plantas en condiciones totalmente asépticas y controladas. El uso de reguladores del crecimiento es necesario para la multiplicación de plantas y entre ellos las auxinas y citocininas son las más empleadas. Entre los cultivos que se propagan por este tipo de técnicas se encuentran principalmente plantas ornamentales como orquídeas (Vij et al., 1984) y rosa (Li et al., 2002), algunas leñosas como el cedro (Piola y Rhor, 1996), la palma aceitera (Rival et al., 1997) y plantas con interés comercial y alimentario como el plátano (Iseaeli et al., 1998), la zanahoria (Fujimura y Komamine, 1979), caña de azúcar (García et al., 2007), el café y el Agave (Robert et al., 2013) por mencionar algunas.

El Agave es un cultivo agrónomicamente importante ya que se utiliza principalmente para la producción de bebidas alcohólicas, fabricación de fibras, y para la extracción de compuestos esteroideos bioactivos (Robert et al., 2008). El cultivo in vitro de esta planta sido muy exitoso; sin embargo, hasta el momento se desconoce cuál es el efecto epigenético que tienen las auxinas en las diferentes concentraciones agregadas de manera exógena al medio para su propagación.

En otros trabajos se ha referido que el uso de las auxinas que son aplicadas de manera exógena pueden causar cambios en la metilación del ADN, tal como es el caso de palma aceitera en la que se observado un incremento en la metilación del ADN la cual genera la feminización de platas masculinas (Jaligot et al., 2000). Los autores de este trabajo concluyeron que el 2,4-D, una auxina sintética, es el responsable de un incremento en la metilación de la citosina en el ADN durante el proceso de cultivo in vitro de esta planta.

*Por lo tanto en esta tesis se realizó la determinación de la metilación del ADN mediante el uso de dos técnicas complementarias, cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), la cual determina los porcentajes globales de metilación, y la amplificación polimórfica sensible a metilación (MSAP), la determina los eventos de metilación de manera específica que es por medio del uso de enzimas específicas que reconocen islas de metilación, para que se pueda evaluar el efecto que tiene el 2,4-D, AIA, IBA, ANA a diferentes concentraciones en la metilación global y los eventos de metilación en *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* en condiciones in vitro.*

ANTECEDENTES

La epigenética es el estudio de todas las modificaciones que se dan durante el proceso de regulación en la expresión de genes sin que obtenga un cambio en la secuencia del ADN que pueden llegar a ser heredables (Ringgs et al., 1996). La actividad de los genes se relaciona con los cambios en la estructura de la cromatina según sea la interacción con las histonas (Louie et al., 1974) específicamente en la parte amino terminal (N-terminal) de las histonas donde son modificadas de manera covalentemente por acetilación, metilación, fosforilación, carbonilización, glicosilación (Zheng y Hayes, 2003). De la misma forma en últimos años se ha encontrado que un tercer mecanismo de regulación epigenética mediado por pequeños ARNs puede provocar el silenciamiento de genes (Law y Jacobsen, 2010).

De los mecanismos epigenéticos más estudiados esta la metilación del ADN, la cual consiste en la adición de un grupo metilo en el anillo pirimidíco de la citosina. La metilación del ADN es una de las alteraciones epigenéticas más importantes en eucariotas (Hollyday, 1987). El grupo metilo puede aparecer en cualquier residuo de la citosina, pero la transmisión de patrones de metilación sólo es posible para las citosinas localizadas en las islas CpG, CpHpG (Hollyday, 1987). Las islas se definen como regiones no mayores a 200 pb con un alto contenido de GC (Brid y Southern, 1978; Gruenbaum et al., 1981), la presencia de la 5' metilcitosina en el promotor o en la secuencia codificante de un gen altera la unión de proteínas específicas reguladoras modificando así la expresión del mismo (Mette et al., 1999) aunque se ha reportado en la mayoría de la literatura que la metilación del ADN en un gen se asocia a la inhibición de la expresión (Lee et al., 2004).

La metilación en el ADN es un proceso muy complejo que está mediado por al menos tres grupos de enzimas que tienen actividad metiltransferasa diferentes. Por ejemplo, las metiltransferasas "de novo", las demetilinas, y las metiltransferasas de mantenimiento (JitkaZlucova et al., 2001).

La metilación en el ADN en el genoma de las plantas es más complejo que el de los animales ya que el genoma de las plantas contiene un grupo de metiltransferasas más amplio (Finnegan et al., 2000). Dentro de las metiltransferasas de plantas hasta ahora conocidas se describen en el cuadro 1, donde su clasificación es de acuerdo a su función.

Cuadro 1.- Clasificación de metiltransferasas de acuerdo a su función

Función	Nombre del gen con la actividad metiltransferasa	Referencia
Metilación del Novo	Familia de Dnmt/MET1 Dnmt 1 Dnmt3a, Dnmt3b, DDM2	Bestor et al., 1988, Okano et al., 1988, Xie et al., 1999
Mantenimiento	Familia de MET1/CMT MET1a, MET1b, MET1c, PMET, CMET5, CMET21, ZMET1,	Genger et al., 1999, Bernachia et al., 1998, Olhoft et al., 1998
Desmetilasa	DDMB, DDMO	E. Richards

*(Finnegan y Kovac, 2000);

1.1. LA IMPORTANCIA DE LA METILACIÓN EN EL ADN DE LAS PLANTAS.

La metilación en el ADN se relaciona con procesos de regulación genética y con procesos de diferenciación celular (Frank y Magiera, 1994), de manera que la actividad de genes se le atribuye a un proceso de des-metilación en las islas CpG (Tran, 2013). También, se encontró que la metilación del novo se relaciona con los cambios en la estructura de la cromatina (Louie et al., 1974; Sims et al., 1998).

Debido a que el ADN no codificante en plantas contiene intrones, elementos repetitivos, y elementos activos de transposición, estos requieren de un sistema de silenciamiento en el genoma (Hirochika et al., 2000). La mayoría de estos son inactivados o silenciados debido a la metilación (Cheung et al., 2000).

La diferenciación y el desarrollo en las plantas están controlados por la activación temporal y silenciamiento de genes por mecanismos epigenéticos. Los patrones específicos de expresión génica pueden ser mantenidos durante varias generaciones (Keappler y Phillips, 1993a) y durante el desarrollo de las plantas, debido a la plasticidad que las plantas presentan y si son sometidos algún tipo de estreses tanto biótico y abiótico (Wang et al., 2004) pueden llegar a cambiar la organización de la cromatina (Antequera et al., 1990). En las células vegetales debido a su totipotencialidad se ha demostrado que la reactivación de la cromatina que permite a las plantas una rápida adaptación a las nuevas condiciones sin requerir de un cambio en la secuencia en el ADN (Reyes - Rosa y Gruissem, 2002; Valledor et al., 2006).

Durante el proceso de propagación clonal hay cierto nivel de variación en las plantas que puede ser de origen genético y epigenético, que en algunos casos puede casar variaciones que se ven reflejadas en el fenotipo mejor conocida como "variación somaclonal" que se define como una variación en el fenotipo (Cecilia y Marum, 2013) la cual se puede atribuir al uso de las auxinas.

1.2 CULTIVO IN VITRO.

La técnicas de cultivo de tejidos vegetales es una técnica de propagación en condiciones totalmente asépticas, en donde a partir de un tejido es posible regenerar en poco tiempo miles de plantas genéticamente iguales. Generalmente es común dividir las técnicas del cultivo de tejidos en dos grandes grupos; a) cultivos en medios semisólidos y b) en cultivo en medio líquido, los que a su vez pueden ser agitados (mediante el empleo de agitadores de uso continuo) o estacionarios. También es frecuente dividir al cultivo de tejidos atendiendo a los niveles de complejidad como cultivo de órganos, cultivos celulares y cultivo de protoplastos.

El cultivo in vitro tiene varias aplicaciones aunque también se utilizan para estudios básicos, obtención de plantas con salinidad controlada, micropropagación, obtención de híbridos, obtención de plantas de semillas con embriones rudimentarios, inducción de variación somaclonal, obtención de híbridos somáticos, conservación e intercambio de germoplasma, establecimiento de suspensiones celulares (Mroginski et al., 2010); (Anon., 1997).

La ventajas que la técnica de cultivo in vitro son: la propagación de grandes volúmenes de plantas, el manejo de las plantas en lugares reducidos, obtención de plantas libres de patógenos, plantas homocigotas y la producción de plantas en peligro de extinción (Mroginski et al., 2010).

1.2.1. MICROPROPAGACIÓN

El cultivo in vitro forma parte de la multiplicación masiva de plantas, en el cual una de las herramientas más utilizadas es la micropropagación. La micropropagación es una técnica de gran importancia biotecnológica que consiste básicamente en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado empleando un medio de cultivo adecuado y es una técnica ampliamente usada para la propagación de muchas especies de plantas con intereses de cualquier índole como pueden ser agropecuarias, industrial, horticultura por mencionar algunas (Bairu et al., 2011).

Esta técnica es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto (platas elite) y una tasa de multiplicación ilimitada (Mroginski et al., 2010). Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencialidad que tienen las células vegetales; la cual es la capacidad de regenerar una planta completa a partir de cualquier tejido cuando están sujetos a los estímulos adecuados. La micropropagación puede realizarse a través de dos vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas de novo (Mroginski et al., 2010); (Gamborg et al., 1976; Murashige y Skoog, 1962).

Las etapas de micropropagación son cuatro:

1) Establecimiento del cultivo, 2) Desarrollo y multiplicación, 3) Enraizamiento y 4) Aclimatación de las plantas. En casos particulares es de importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantes para el establecimiento del cultivo (Mroginski et al., 2010).

Etapa 1: Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explante a utilizar y los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y esterilización de los explantes. Uno de los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos, embriones o semillas. En esta etapa es donde se puede observar contaminación por bacterias y hongos asociados a los microorganismos que resisten a tratamientos de esterilización y que pueden sobrevivir a los tratamientos de esterilización. También la contaminación puede deberse a patógenos endógenos

latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de los explantes, estos patógenos endógenos podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo (Mroginski et al., 2010).

Etapas 2: Multiplicación.

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos periodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación. La fase de inducción implica el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento (generalmente auxinas o citocininas) para favorecer la dediferenciación y en la fase de multiplicación se requiere de empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular (Mroginski et al., 2010).

El objetivo de la multiplicación es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, aclimatación, etc.). Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse directa o indirecta (implica la formación del callo). La organogénesis puede darse por la inducción de yemas axilares o adventicias, la introducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas usualmente sin formación de callo y la inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago.

Los tipos de auxinas más empleados en esta fase son el ácido indolbutírico (IBA), ácido 2,4-diclorofenoloxiacético (2,4-D), ácido indolacético (AIA), ácido naftalénacético (ANA) y picloram. Los tipos de reguladores, y sus combinaciones y rangos de concentración deben de ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada (Mroginski et al., 2010).

Etapas 3 y 4: Enraizamiento y aclimatación

En la etapa de enraizamiento se produce la formación de raíces adventicias, en las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en varias especies leñosas es más complicada por su limitada capacidad rizogénica. En esta etapa es importante acentuar el uso de las auxinas (que para el enraizamiento una de las más utilizadas es el IBA); a concentraciones elevadas es contraproducente porque induce a la

formación de callo, es por ello que para cada cultivo es necesario optimizar un protocolo de rizogénesis y supervivencia de las plantas (Mroginski et al., 2010).

1.3. REGULADORES DEL CRECIMIENTO.

Los reguladores de crecimiento, endógenos y exógenos controlan el crecimiento y el desarrollo de la planta en bajas concentraciones. Existe evidencia de que estos reguladores tienen todo un mecanismo regulatorio para su biosíntesis y transporte dentro de la célula. Dentro de los reguladores del crecimiento que han sido caracterizado se encuentran el ácido abscísico, los brasinoesteroides, el etileno, las poliaminas, las giberelinas, el ácido jasmónico, el ácido salicílico, las citocininas, y por último a las auxinas (Depuydt y Hardtke, 2011).

Las auxinas se pueden encontrar tanto de origen natural como sintético. Dentro de las auxinas naturales encontramos al ácido indol acético (AIA), y el ácido indol butírico (IBA) y de origen sintético las más conocidas ampliamente usadas esta el 2,4 di-cloro-fenoxi acético (2,4-D), y ácido naftalén acético (ANA). Las funciones de las auxinas dentro de la planta son promover la dominancia apical, promover la división celular, favorecer la elongación e uniformidad de crecimiento; también se han definido los mecanismos de transporte, vías de señalización y biosíntesis de las auxinas dentro de la célula vegetal (Santner et al., 2009; Santner y Estelle, 2010). Las auxinas como ya se ha mencionado anteriormente son utilizados en el cultivo de tejidos, se ha sugerido que el uso de los mismos en este proceso causa variaciones tanto genéticas como epigenéticas, dentro de las variaciones epigenéticas encontramos que las metilaciones en el ADN pueden causar ciertos efectos que pueden verse reflejado tanto en un cambio en el fenotipo de la planta así como también pueden presentar un cambio en su regulación genética por modificaciones en los mecanismos epigenéticos (Gao et al., 2010; Jaligot et al., 2000; Kaeppeler et al., 2000; Miguel y Marum, 2011; Park et al., 2009; Smýkal et al., 2007; Vidal y De García, 2000).

1.4. METILACIÓN DEL ADN EN CULTIVO DE TEJIDOS.

La metilación del ADN se propuesto como un mecanismo interlineado dentro del cultivo de tejidos donde como resultado de éste mecanismo se encuentra una alta frecuencia de variación cuantitativa fenotípica en la cual los patrones de metilación tienen una función entre el proceso de regeneración de las plantas y la generación de las progenies fueron estudiados por (Keappler et al., 2000). La primera investigación sobre la metilación del ADN en cultivo de tejidos fue reportada durante la regeneración de plantas en maíz (Keappler y Phillips, 1993b). Keappler y Phillips (1993) analizan la naturaleza, herencia y frecuencia en los cambios de metilación en la progenie de una misma línea clonal durante el proceso de regeneración de las plantas de maíz. Los autores encuentran que los patrones de metilación entre re generantes derivadas de los explantes tenían únicos perfiles de metilación un cada una de las progenies generadas lo que soporta la idea de que quizás los niveles y patrones de metilación están implicados en el desarrollo de las plantas regeneradas por cultivo in vitro (Keappler et al., 2000).

Otro estudio pero realizado en Rosa híbrida L (Minliang et al., 2004) muestra las alteraciones en los patrones de metilación del ADN durante su el proceso de diferenciación celular, en diferentes etapas, tanto en organogénesis como en embriogénesis somática. También se encontró que las alteraciones en la metilación del ADN durante los eventos de reprogramación se alteran principalmente en las rutas de diferenciación celular, en donde se concluye que existe una correlación entre la metilación del ADN y los cambios morfogénicas observados (Xu et al., 2004). En otro estudio donde relacionan variación en la metilación del ADN y cultivo in vitro fue realizado por un grupo de investigadores de la universidad de Haute Alsace en Francia donde analizan la variación en los patrones de metilación del ADN en clonas de uva (Vitis vinifera L) (Schellenbaum et al., 2008). Los autores compararon plantas en condiciones invernadero con las clonas maternas para determinar los patrones de metilación entre ellas observaron la variación en la metilación del ADN que existía entre las clonas maternas y las clonas en condiciones de invernadero por lo que sugieren que esa variación en la metilación del ADN se debía a los reguladores de crecimiento utilizados durante el cultivo in vitro (Schellenbaum et al., 2008).

1.5. CAMBIOS EN LA METILACIÓN DEL ADN POR EFECTO DE LAS AUXINAS.

Hoy en día ya existen varios estudios en los cuales se relaciona los cambios de metilación del ADN con las auxinas. LoSchiavato y colaboradores (LoSchiavo et al., 1989) analizaron la metilación del ADN en cultivos embriogénicos y celulares de zanahoria, y la variación causada por las hormonas y agentes des-metilantes. El estudio se enfocó en evaluar los niveles de metilación durante el proceso de embriogénesis somática, cómo estaba determinada y cómo diferentes concentraciones de auxinas tanto naturales como sintéticas influían en la metilación del ADN. El primer experimento que realizaron fue adicionarle a células de zanahorias al inicio de la embriogénesis 0.5 mg/l de 2,4-D, después de 5 días ésta concentración se incrementó a 2 mg/l y 5 mg/l. Los resultados que se encontraron en el porcentaje de metilación fueron de 16 % para condiciones normales, 40% para 2mg/l de 2,4-D y 45% para 5mg/l de 2,4-D. Este mismo experimento se realizó con otras auxinas; sin embargo, no se encontraron diferencias significativas. También se usó agentes des-metilantes y el porcentaje de metilación disminuyó en un 70%. Los autores sugieren que la hipermetilación del ADN está relacionada con el tratamiento de altas concentraciones de 2,4-D (LoSchiavo et al., 1989), Xiangqian (Xiangqian et al., 2002) trabajando con manzana sugirió que la variación somaclonal se suscita durante el cultivo de tejidos posiblemente mediante alteraciones en la cromatina, específicamente a causa de los cambios en los niveles de metilación del ADN. Los autores evaluaron los perfiles de metilación del ADN y las alteraciones de estos perfiles de metilación ADN del genoma de la manzana durante su crecimiento *in vitro* y mediante el uso de los marcadores moleculares AFLP. La conclusión a la que llegaron fue que las alteraciones de los niveles de metilación se dan durante el crecimiento de las plantas en cultivo *in vitro* y que los cambios en los niveles de metilación del ADN son atribuidos principalmente por el uso de los reguladores de crecimiento específicamente el 2,4-D (Xiangqian et al., 2002).

1.6. CAMBIOS EN LA METILACIÓN DEL ADN DURANTE EL PROCESO DE MICROPROPAGACIÓN.

El primer trabajo documentado con respecto a la variación somaclonal y el cambio en los eventos de metilación fue reportado por un grupo de investigadores del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CICY) (Peraza-Echeverría et al., 2001) en donde observo que más del 50% de las bananitas cultivadas *in vitro* por micropropagación

presenta un nivel de variación somaclonal. Por medio del método de la amplificación polimórfica sensible a metilación MSAP, al evaluar los eventos de metilación del ADN de la banana reportan que el proceso de micropropagación era el responsable de las alteraciones en los patrones de metilación del ADN, encontrando que las plantas que fueron micropropagadas presentaban hipermetilación en comparación con las plantas convencionales o no micropropagadas de plantas a partir de una sola planta, las ventajas que esto confiere es que sean plantas libres de patógenos, homogeneidad genética, la propagación de plantas con importancia agronómica para uso alimentario, con interés ornamental (Mroginski et al., 2010).

Dentro del cultivo *in vitro* es utilizada ampliamente la micropropagación que de igual manera ayuda a propagar plantas a gran escala en periodos relativamente cortos (Mroginski et al., 2010), *Agave spp* es una de las plantas en donde se estandarizo el protocolo de micropropagación a partir de Rizomas por el Dr. Manuel L. Robert (Manuel Robert et al., 1987), la importancia agronómica que estas especies como ya se saben puede ser en el caso de *Agave tequilana* es una planta que se utiliza para la elaboración de bebidas alcohólicas, los sitios en donde predomina es en Guadalajara, México, *Agave fourcroydes* es utilizada hace aproximadamente 200 años para la elaboración de fibras en el estado de Yucatán misma especie que es endémica de esa región también se utiliza para la elaboración de algunos compuestos bioactivos esteroideos, *Agave angustifolia* es utilizada como planta ornamental en los últimos años se le ha dado el uso para la fabricación de bebidas alcohólicas esta especie se encuentra distribuida mayormente en el estado de Sonora, México, dentro del proceso de micropropagación se realiza la aplicación de auxinas al medio de cultivo con la finalidad de que se puedan facilitar los procesos de diferenciación celular y la multiplicación de las plantas, las auxinas en el medio de cultivo son importantes para que se pueda dar una respuesta positiva o negativa en dichos procesos.

Otro estudio fue el realizado en la orquídea *Doritaenopsis*, en (Park et al., 2009) reportan cambios en los perfiles de metilación del ADN por efecto de la micropropagación, comprobando su estabilidad genética mediante AFLP y los cambios en la metilación del ADN evaluados con MSAP, los cambios en la metilación del ADN sugiere que se debe al uso de los reguladores de crecimiento como ya lo había demostrado Loshiavo y colaboradores en 1993.

El modelo de estudio que en esta tesis se evaluó fue agave, el cual tiene una gran importancia tanto económica como cultural para numerosos pueblos indígenas y mestizos que se han beneficiado como una fuente de alimento, bebida, medicina, combustible, cobijo, ornato, fibras duras extraídas de las hojas, construcción de

viviendas y elaboración de implementos agrícolas (García-Mendoza, 1995). El Agave fue una de las primeras plantas utilizadas por los pobladores de Mesoamérica y el empleo como alimento y fibras proviene de México desde hace por lo menos 7 mil años (García-Mendoza, 2002) aprovechando los magueyes, estos pueblos hicieron de México su centro de domesticación y diversificación mediante la selección humana puesto que escogían al agave por fibras, así como también por sus altas concentraciones de azúcares entre otras, por lo que el agave tiene su máxima expresión en diversidad morfológica, filogenética y evolutiva de México (García-Mendoza, 2002).

El Agave ha sido micropropagado con éxito por muchos años utilizando técnicas de cultivo que conlleva a la utilización de diferentes tipos y concentraciones de auxinas dejando preguntas sobre cómo éstos reguladores del crecimiento pueden afectar la epigenética de la planta. Es por ello que esta tesis está enfocada al estudio del efecto de las auxinas y su concentración en la metilación del ADN.

HIPÓTESIS:

Si las auxinas utilizadas como IBA, ANA, AIA, 2,4-D, bajo diferentes concentraciones se reporta que en otros procesos in vitro generan cambios en la metilación del ADN cuando son aplicados al medio de cultivo de manera exógena, para Agave fourcroydes y Agave angustifolia provocaran cambios en la metilación del ADN.

OBJETIVOS:

OBJETIVO GENERAL:

- *Evaluar el efecto de algunas auxinas (AIA, ANA, IBA y 2,4-D) bajo diferentes concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μ M) en el grado de metilación del ADN en plántulas in vitro de *Agave angustifolia* y *Agave fourcroydes**

OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

- *Determinar el peso en fresco y altura de la planta en las líneas clonales in vitro de *Agave fourcroydes* y *Agave angustifolia* bajo diferentes concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μ M) y tipos de auxinas (AIA, ANA, IBA, 2,4-D).*
- *Determinar el porcentaje de metilación global del ADN por medio de la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) en plantas in vitro de *Agave fourcroydes* y *Agave angustifolia* bajo diferentes concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μ M) y tipos de auxinas.*
- *Determinar el porcentaje de eventos de metilación del ADN por medio de la amplificación polimórfica sensible a la metilación (MSAP) en plantas in vitro de *Agave fourcroydes* y *Agave angustifolia* bajo diferentes concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μ M) y tipos de auxinas (AIA, ANA, IBA, 2,4-D)*

JUSTIFICACIÓN

La metilación del ADN es importante ya que en organismos eucariotes es una manera de proteger el ADN genómico para que no se lleve a cabo la inserción de elementos móviles, así mismo se ha observado que la metilación específica en regiones promotoras de genes puede a inactivar la expresión de dicho gen, y de la misma manera observándose el efecto contrario en donde la des-metilación activa la expresión del gen, en el caso específico de plantas se relaciona la metilación del ADN y alta plasticidad que estas poseen, como una pronta respuesta a cualquier factor a las estas se ven expuestas, por lo que se considera que la metilación del ADN forma parte de los principales mecanismos de regulación genética que puede determinar la expresión o inactivación de un gen, los cambios en la metilación del ADN nos puede estar indicando la aplicación de dichos mecanismos, un desbalance en dicho mecanismo puede llegar a causar una pérdida en el control genético que se va a ver reflejado en la mayoría de los casos en el fenotipo, denominado variación somaclonal.

Para el caso de las especies de Agave fourcroydes y Agave angustifolia se realiza la micropropagación con la finalidad de obtener un mayor número de plantas en un corto periodo de tiempo, sin embargo hasta la fecha se desconoce cuál es el efecto que se adquiere en el grado de metilación del ADN con las auxinas principalmente utilizadas como IBA, ANA, AIA y 2,4-D, bajo diferentes concentraciones que son aplicadas de manera exógena al medio de cultivo utilizado para la multiplicación de in vitro plantas, debido a que se sabe que en otras especies de plantas que son propagadas por técnicas de cultivo in vitro se observan cambios en la metilación del ADN relacionado con uso de auxinas aplicadas al medio utilizado para la multiplicación que pueden llegar a causar "variación somaclonal" que en algunos de los casos este tipo de variaciones se buscan para que se puedan mejorar las propiedades organolépticas, esta variación también es negativa debido a que puede llegar a reducir el tamaño de la planta o generar aberraciones, en el caso de las dos especies de Agave spp es observar cómo se van a encontrar los cambios en la metilación del ADN con cada una de las auxinas agregadas al medio de cultivo en un diferente concentración.

REFERENCIAS

- Allis C.D., T.Jenuwein, D.Reinberg y M.-L.Caparros, *Epigenetics*, (2009). CSH Press/Cold Spring Harbor Laboratory Press,
- Antequera F., J. Boyes y A. P. Brid, (1990), *High levels the novo methylation and altered chromatin structure all CpG is island*, *Cell*, 62: 502-514..
- Bairu M., A. Aremu y J. van Staden, (2011), *Somaclonal variation in plants: causes and detection methods*, *Plant Growth Regul.*, 63: 147-173..
- Brid A. P. y E. M. Southern, (1978), *Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA: I. The methylation pattern in ribosomal DNA from Xenopus laevis*. *J. Mol. Biol.*, 118: 49-60..
- Cecilia M. y L. Marum, (2013), *An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal and beyond*, *Experimental botany*, 62: 3713-3725.
- Chan S. W. L., I. R. Henderson y S. E. Jacobsen, (2005), *Gardening the genome: DNA methylation in Arabidopsis thaliana*, *Nature Reviews Genetics*, 6: 351-360..
- Cheung P., C. D. Allis y C. P. (2000), *Sassone, Signaling to chromatin through histone modification*, *Cell*, 103: 263-271.
- Depuydt S. y C. S. Hardtke, (2011), *Hormone signalling crosstalk in plant growth*, *Current Biology*, 365 - 373. .
- Finnegan E. J., W. J. Peacock y E. S. Dennis, (2000), *DNA methylation a key regulator of plant development and other processes*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10: 217-223..
- Frank J. y R. Magiera, (1994), *DNA methylation during differentiation of lower eukariote, Phsarum polycephalum.*, *Biochem. J.*, 302 (part 1): 101-104.
- Fujimura T. y A. Komamine, (1979) *Synchronization of somatic embryogenesis in the carrot cell suspension culture*, *Plan Physiol.*, 162-164.

- Gamborg O. L., L. H. Murashige, T. A. Thorpe y I. K. Vasil, (1976), *Plant tissue culture media, In vitro, Cell. Dev. Biol. -Plant*, 12: 473-478.
- Gao X., D. Yang, D. Cao, M. Ao, X. Sui, Q. Wang, J. N. Kimatu y L. Wang, (2010), *In vitro Micropropagation of Freesia hybrida and the Assessment of Genetic and Epigenetic Stability in Regenerated Plantlets, Journal of Plant Growth regulators*, 257-267.
- García R., D. Cidade, A. L. Castellar y E. Mansur, (2007), *In vitro morphogenesis patterns from shoot apices of sugar cane determined by length and type of growth regulator., Plan Cell Tiss Organ Cult*, 181-190..
- García-Mendoza A., (1995), *Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México, en: Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques, UNAM, México*, 51-75.
- García-Mendoza A., (2002), *Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico, Cactus and Succulent Journal*, 4: 177-188..
- Gruenbaum Y., T. Naveh - Many, H. Cedar y A. Razin, (1981), *Sequence specificity of methylation in higher plant DNA, Nature*, 292: 860-862..
- Hirochika H., H. Okamoto y T. Kakutani, (2000), *Silencing of retrotransposons in Arabidopsis and re-activation by the ddm1 mutations, Plan cell*, 12: 357-369..
- Hollyday R., (1987), *the inheritance of epigenetic defects science, Science*, 238: 163-170..
- Iseaeli Y., E. Lahav y O. Reuveni, (1998), *In vitro culture of bananas, en: Bananas and Plantains Chapman and hall, Anonymous*, 141-178.
- Jaligot E., A. Rival, T. Beulé, S. Dussert y J. L. Verdeil, (2000), *Somaclonal variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.): the DNA methylation hypothesis, Plant Cell Reports*, 19: 684-690.
- Kaeppler S.M, H. F. Kaeppler y Y. Rhee, (2000), *Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants, Plant Molecular Biology*, 179-188..

- Keappler S. M. y R. L. Phillips, (1993a), *DNA methylation and tissue culture - induced variation in plant*, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 29: 125-130..
- Keappler S. M. y R. L. Phillips, (1993b), *Tissue culture- induced DNA methylation variation in maize*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 8773-8776..
- Law, J. A. y S. E. Jacobsen, (2010), *Establishing, maintaining, and modifying DNA methylation patterns in plants and animals*, *Nature Reviews Genetics*, 10: 204-220..
- Lee D. Y., C. Teyssier, B. D. Strahi y M. R. Stallcup, (2004), *Role of protein methylation in regulation of transcription*, *Endocr. Rev.*, 10: 1210-1216..
- Li X., S. Krasnyanski y S. S. Korban, (2002), *Somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and shoot organogenesis in Rose*, *Plan Physiol.*, 313-319..
- LoSchiavo F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli y M. Terzi, (1989), *DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs*, *Theor Appl Genet*, 177: 325-331..
- Louie A. J., E. P. Candido y G. H. Dixon, (1974), *Ezimatic modifications and their possible role in regulating the binding of basic proteins to DNA and controlling chromosomal structure*, *Cold Spring Harbor*, 23: 631-637..
- Mette M. F., J. Winden, M. A. Matzke y A. J. M. Matzke, (1999), *Production of aberrant promoter transcripts contributes to methylation and silencing of unlinked homologous promoters in trans*, *EMBO J.*, 18: 241-248..
- Miguel C. y L. Marum, (2011), *An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond*, *Journal of Experimental Botany*, 1-13..
- Minliang X., L. Xiangqian y S. Schuyler, (2004), *DNA methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (Rosa hybrida L.)*, *Thor Appl Genet.*, 109: 899-910..
- Mroginski L., P. Sansberro y E. Flashland, (2010), *Establecimiento de cultivos vegetales*, en: *Biotecnología y mejoramiento vegetal II*, (Levitus G., V. Echenique, C. Rubistein, E. Hopp y L. Mroginski, eds.), INTA, 17-24..

- Murashige T. y F. Skoog, (1962), *A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures*, *Physiol. Plant.*, 15: 473-497..
- Park S., H. Murthy, D. Chakrabarthy y K. Paek, (2009), *Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of Doritaenopsis by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis.*, *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45: 104-108.
- Peraza-Echeverria S., V. A. Herrera-Valencia y A. James-Kay, (2001), *Detection of DNA methylation changes in micropropagated plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP)*, *Plant Science*, 161: 359-367..
- Piola F. y R. Rhor, (1996), *A method to overcome seed and axillary bud dormancy improve Cedrus libani micropropagation*, *Plant Tissue Cult. Biotechnol.*, 199-201..
- Reyes - Rosa J. C. y H. W. Gruijssem, (2002), *Chromatin remodeling and memory factor regulators of plant*, *Plant Physiol.*, 3: 1090-1010.
- Ringgs A. D., R. A. Martiessen y V. A. E. Russo, (1996), *Introduction, in epigenetic mechanism of gene regulation*, *Culd Spring Harbor laboratory press*, 1-4.
- Rival A., F. Aberlenc, F. Morcillo, J. Tregear, J. L. Verdeil y Y. Duval, (1997), *Scaling - up in vitro clonal propagation through somatic embryogenesis: The case of oil palm (Elaeis guineensis)*, *Plant Tissue Cult. Biotechnol*, 74-83. . .
- Robert M. L., J. L. Herrera, F. Contreras y K. N. Scorer, (2013), *In vitro propagation of Agave fourcoides Lem (henequen)*, *Plan Cell Tiss Organ Cult*, 37-48.
- Robert M. L., L. K. Yoong, H. Lynda, F. L. Sánchez-Teyer, M. D. Bennett, A. R. Leitch y I. J. Leitch, (2008), *Wild and agronomically important Agave species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy*, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 215-222. .
- Santner A., L. I. Calderon-Villalobos y M. Estelle, (2009), *Plant hormones is versatile chemical regulators of plant growth*, *Nat. Chem. Biol.*, 5: 301-307..

- Santner A. y M. Estelle, (2010), *The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling*, *Plant J.*, 61: 1029-1040. .
- Schellenbaum P., V. Mohler, G. Wenzel y B. Walter, (2008), *Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (Vitis vinifera L.)*, *BMC Plant Biology*, 8: 1-10,.
- Sims R. J., K. Nishioka y G. Reinberg, (1998), *Histone lysine methylation: a signature for chromatin function*, *Trends. Genet*, 19: 629-639.
- Smýkal L., L. Valledor, R. Rodríguez y M. Griga, (2007), *Assessment of genetic and epigenetic stability in long-term in vitro shoot culture of pea (Pisum sativum L.)*, *Plant Cell Reports*, 26: 1985-1998..
- Tran R. K., (2013), *DNA methylation profiling identifies CG methylation clutters in Arabidopsis thaliana genes*, *Curr. Biol*, 15: 154-159. .
- Valledor L., R. Hasbún, M. Meijón, J. L. Rodríguez, E. Santamaría, M. Viejo, M. Berdasco, I. Feito, M. F. Fraga, J. Cañal y R. Rodríguez, (2006), *Involvement of DNA methylation in tree development and micropropagation*, *Plan cell tiss. Organ Cult*, 91: 75-86..
- Vidal M. D. C. y E. De García, (2000), *Analysis of a Musa spp. somaclonal variant resistant to yellow Sigatoka*, *Plant Molecular Biology*, 18: 23-31..
- Vij S. P., A. Sood y K. K. Plaha, (1984), *Propagation Rhynchosstylis retusa B.L. (Orchidaceae) by direct of organogenesis from left segment cultures*, *Bot. GAZ.*, 210-214. .
- Wang Y., J. Wysocka, J. R. Perlin, L. Leonelli y C. D. Allis, (2004), *Linking covalent histone modifications to epigenetics: the rigidity and plasticity of the marks*, *Cold Spring Harbor Symp. Quiant.*, 69: 161-169..
- Xiangqian L., X. Mingliang, S. Schuyler y S. S. Korban, *DNA methylation profiles differ between field and in vitro grown leaves of apple*, *Plan Physiol.*, 1229-1234, (2002).

Xu M., X. Li y S. S. Korban, (2004), *DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (Rosa hybrida L.)*, *Theor Appl Genet*, 109: 899-910.

Zheng C. y J. J. Hayes, (2003), *Structures and interactions of the core histones tail domains*, *Biopolymers*, 68: 539-546.

CAPÍTULO II.

SELECCIÓN, PROPAGACIÓN Y TRATAMIENTOS CON AUXINAS

2.1. INTRODUCCIÓN.

El cultivo in vitro es una técnica que permite la propagación clonal de un gran número de plantas a partir de una sola planta, las ventajas que esto confiere es que sean plantas libres de patógenos, homogeneidad genética, la propagación de plantas con importancia agronómica para uso alimentario, con interés ornamental.

Dentro del cultivo in vitro es utilizada ampliamente la micropropagación que de igual manera ayuda a propagar plantas a gran escala en periodos relativamente cortos (Levitus), Agave spp es una de las plantas en donde se estandarizo el protocolo de micropropagación a partir de Rizomas por el Dr. Manuel L.Robert (Manuel Robert et al., 1987), la importancia agronómica que estas especies como ya se saben puede ser en el caso de Agave tequilana es una planta que se utiliza para la elaboración de bebidas alcohólicas, los sitios en donde predomina es en Guadalajara, México, Agave fourcroydes es utilizada hace aproximadamente 200 años para la elaboración de fibras en el estado de Yucatán misma especie que es endémica de esa región también se utiliza para la elaboración de algunos compuestos bioactivos esteroidales, Agave angustifolia es utilizada como planta ornamental en los últimos años se le ha dado el uso para la fabricación de bebidas alcohólicas esta especie se encuentra distribuida mayormente en el estado de Sonora, México, dentro del proceso de micropropagación se realiza la aplicación de auxinas al medio de cultivo con la finalidad de que se puedan facilitar los procesos de diferenciación celular y la multiplicación de las plantas, las auxinas en el medio de cultivo son importantes para que se pueda dar una respuesta positiva o negativa en dichos procesos.

2.2. MATERIAL Y MÉTODOS

El material in vitro con el que se realizó el experimento fue con las líneas clonales de Agave fourcroydes (P66) y Agave angustifolia (26s) proporcionadas por el laboratorio de micropropagación clonal perteneciente al Centro de Investigación Científica de Yucatán S.A. de C.V. (CICY), bajo el cargo del Dr. Manuel Robert Díaz.

Las cuales se multiplicaron para contar con el número suficiente de in vitro plantas para llevar a cabo el experimento. Una vez obtenidas las plantas homogéneas (2.0 -

2.5 cm), fueron sometidas por dos fases de adaptación que consiste en medio Murashige y Skoog (Murashige y Skoog, 1962) con un pH de 5.7, agar al 2% y sin reguladores durante 4 semanas cada ciclo en fotoperiodo de 16 h luz/ 8 de oscuridad. Al término del proceso de adaptación se tomaron 10 plantas ($n=10$) y se pusieron en medio MS (Murashige y Skoog, 1962), agar al 2%, y cada uno de los tratamientos con los que se trabajó que fueron 2,4-D, IBA, AIA y ANA a diferentes concentraciones 0.05, 0.125, 0.5 μM , y como testigo se utilizaron plantas sin auxinas. Los muestreos se realizaron al día cero, a los 3 y 21 días con y sin auxinas en ambas especies. Los parámetros que se evaluaron fueron peso en fresco y la altura de la planta (Fig. 2.1). Una vez evaluadas las plantas fenotípicamente, estas fueron congeladas con nitrógeno líquido y almacenadas a -80°C hasta su análisis.

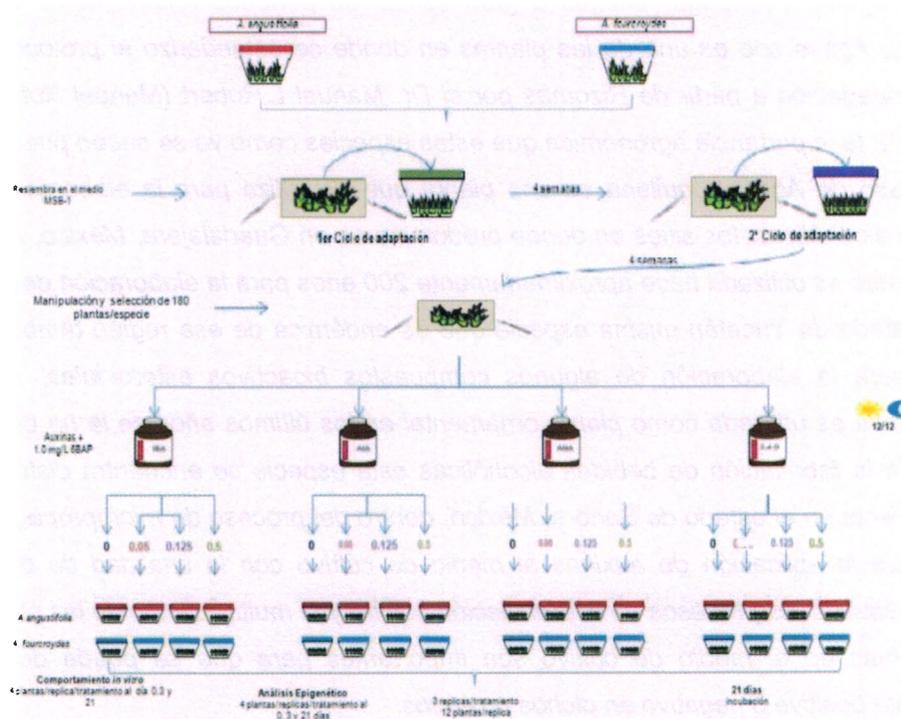


Figura 2.1.- Esquematización del diseño experimental durante el muestreo y análisis de las muestras.

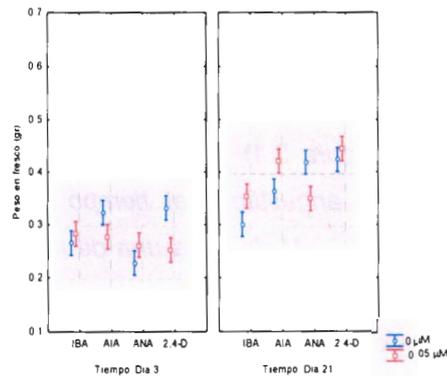
2.2. RESULTADOS.

La evaluación de peso fresco (Figura 3.1) y la altura (Figura 3.2) se realizó en las plantas de *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* al tiempo cero, 3 y 21 días a las concentraciones de 0.05, 0.125, 0.5 μM de cada una de las auxinas evaluadas y sin auxinas (testigo). En el día cero, al inicio del experimento y cuando las plantas no habían sido sometidas a las auxinas, se partió de un peso promedio de las plantas de *A. fourcroydes* que fue de 0.33 g mientras que en *A. angustifolia* fue de 0.25 g.

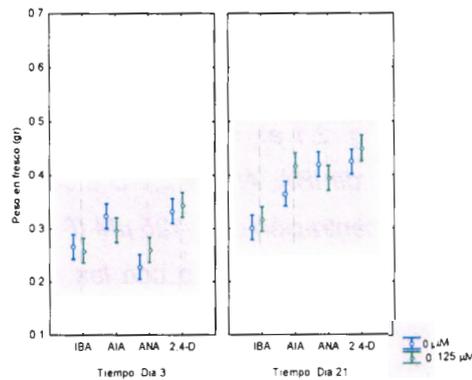
En *A. fourcroydes* no se encontró diferencias en los tratamientos a los 3 días; sin embargo se encontró una mejor respuesta a las auxinas en el día 21. En el día 21 y a una concentración de 0.05 μM (Fig. 2.1 a), se observó una ganancia en peso en las plantas que estaban en presencia de IBA, ANA y 2,4-D a comparación del testigo (sin auxinas). Por otro lado, a una concentración de 0.125 μM (Fig. 2.1 b), las plantas de *A. fourcroydes* obtuvieron mayor ganancia en peso con las auxinas IBA y AIA. A una concentración 0.5 μM (Fig. 2.1 c) se observó una mejor respuesta en las plantas en AIA y 2,4-D. El análisis estadístico, con una un 95% de confianza, el valor de $P=0.0993$ y $F=1.9638$, confirma las diferencias significativas encontradas entre los tratamientos en la última concentración utilizada.

En el caso de la altura (Fig. 2.2) se analizó de la misma manera que el peso fresco. Se partieron de plantas con un tamaño promedio en el día cero de 2.4 cm. Al igual que en el peso fresco, en la altura no se encontraron diferencias significativas en el día 3; sin embargo, se observaron diferencias muy marcadas entre los tratamientos a los 21 días. Por ejemplo, a una concentración de 0.05 μM hubo una mayor altura en IBA y AIA (Fig. 2.2 a); en 0.125 μM se obtuvo una mayor altura en IBA y AIA (Fig. 2.2 b); y en 0.5 μM hubo una mejor altura en ANA (Fig. 2.2 c).

a)



b)



c)

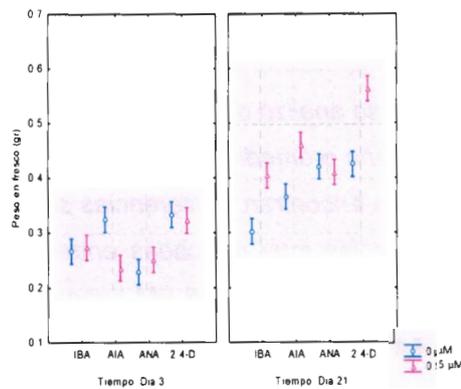
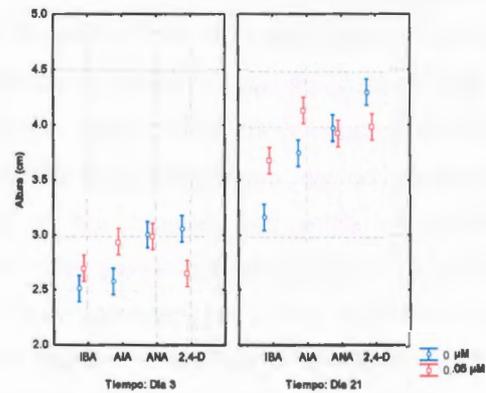
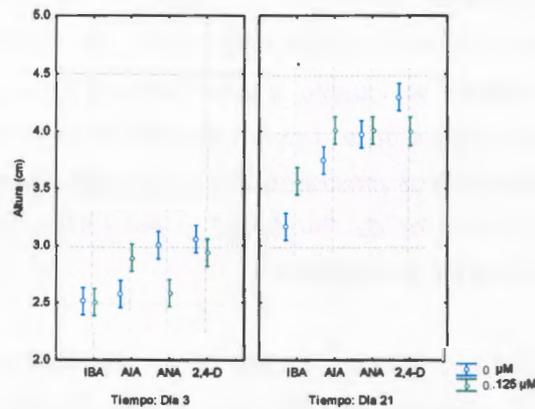


Figura 2.2.- Peso fresco en *Agave fourcroydes* a los 3 y 21 días en cada una de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D). a) Corresponde a la concentración de 0.05 μM que está representado por el color rojo en cada una de las auxinas IBA, AIA, ANA, y 2,4-D en comparación con el testigo (sin auxinas) representado por el color azul; b) Corresponde a la concentración de 0.125 μM que se representa con el color verde en cada uno de los tratamientos en comparación con el testigo que está representado por el color azul; c) Corresponde a la concentración de 0.5 μM que se representa con el color rosa en cada uno de los tratamientos en comparación con el testigo que está representado por el color azul.

a)



b)



c)

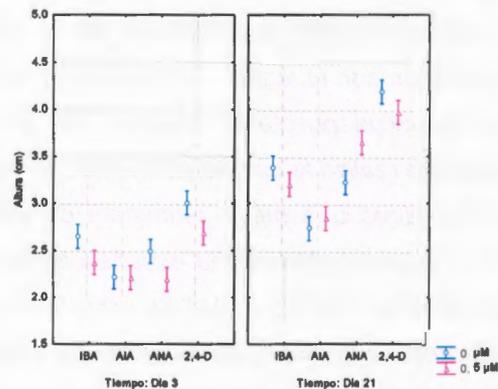


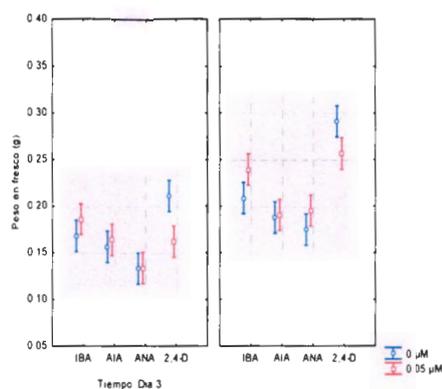
Figura 2.3.- Altura de *Agave fourcroydes* a los 3 y 21 días en cada una de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D). a) Corresponde a la concentración de 0.05 µM que está representado por el color rojo en cada una de las auxinas IBA, AIA, ANA, y 2,4-D en comparación con el testigo (sin auxinas) representado por el color azul; b) Corresponde a la concentración de 0.125 µM que se representa con el color verde en cada uno de los tratamientos en comparación con el testigo que está representado por el color azul; c) Corresponde a la concentración de 0.5 µM que se representa con el color rosa en cada uno de los tratamientos en comparación con el testigo que está representado por el color azul.

Para *A. angustifolia*, de igual manera que se realizó para *A. fourcroydes*, se analizó el peso fresco y la altura de las plantas a los cero, 3 y 21 días en presencia y ausencia de las auxinas IBA, AIA, ANA, y 2,4-D a las concentraciones de 0.05, 0.125 y 0.5 μM . Para el peso fresco (Fig. 2.3) se partió de plantas con un peso promedio de 0.350 g. Al igual de lo que se encontró en *A. fourcroydes* a los 3 días, *A. angustifolia* a los 3 días en los diferentes tratamientos no se encontraron diferencias significativas. Las diferencias que se observaron entre tratamientos fue a los 21 días; a una concentración 0.05 μM (Fig. 2.3 a) se observó una respuesta favorable en ganancia en peso en IBA y 2,4-D. Por otro lado, a una concentración de 0.125 μM (Fig. 2.3 b) se observaron diferencias significativas con respecto al testigo en IBA, AIA, ANA las cuales incrementaron el peso de las plantas en 50%. A la concentración más alta, 0.5 μM (Fig. 2.3 c), se observó que el peso fresco en IBA, ANA y 2,4-D era significativamente mayor que en la auxina natural AIA. En resumen, la auxina que mejores resultados presentó en cuanto a ganancia en peso en plantas de *A. angustifolia* fue IBA en cualquiera de las tres concentraciones evaluadas (0.05, 0.125 y 0.5 μM). Los análisis estadísticos mostraron que a una significancia de 0.05 con un 95% de confianza con un valor de $P=0.01522$ y $F= 1.8769$ hubieron diferencias significativas en el día 21 en los tratamientos.

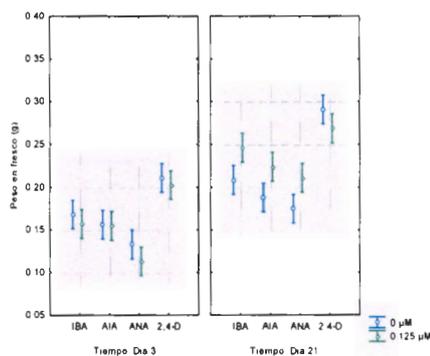
Para la evaluación de la altura (cm) en *A. angustifolia*, las plantas fueron medidas al tiempo cero, a los 3 y 21 días en todos los tratamientos (Fig. 2.4). Se encontró que para la concentración de 0.05 μM a los 21 días había una respuesta favorable mostrando diferencias estadísticamente significativas en la altura de las plantas tratadas con AIA en comparación con el testigo. Para una concentración 0.125 μM , en el día 21, se observó una mejor respuesta en altura en AIA en comparación con el testigo; sin embargo, cuando se realizó la comparación entre la misma concentración y las diferentes auxinas se observó una mejor respuesta en altura en 2,4-D. En la concentración de 0.5 μM se observó diferencias estadísticamente significativas a los 21 días con una ganancia en altura en IBA y AIA en comparación con el testigo. Por otro lado, cuando se realizaron las comparaciones entre las auxinas y sus diferentes concentraciones en cada uno de los días evaluados, no se observaron diferencias estadísticamente significativas. Para la altura de la planta, el mejor tratamiento se observó en 2,4-D en una concentración de 0.05 y 0.125 μM siendo estadísticamente significativa en una concentración de 0.125 μM ; en IBA se observó una ganancia en altura en una concentración de 0.125 y 0.5 μM observándose una mejor respuesta en 0.5 μM y en AIA también se observó una respuesta muy favorable en una

concentración de $0.5 \mu\text{M}$, se trabajó con una significancia de 0.05 lo que quiere decir que tiene un 95% de significancia el valor de $P=0.45520$ y $F= 1.0019$.

a)



b)



c)

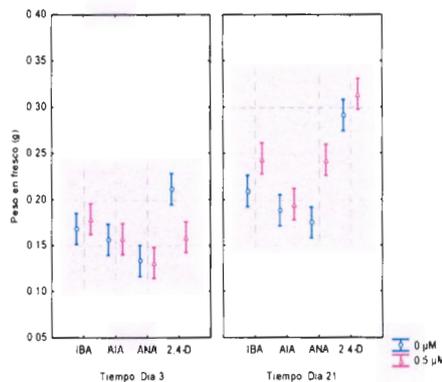
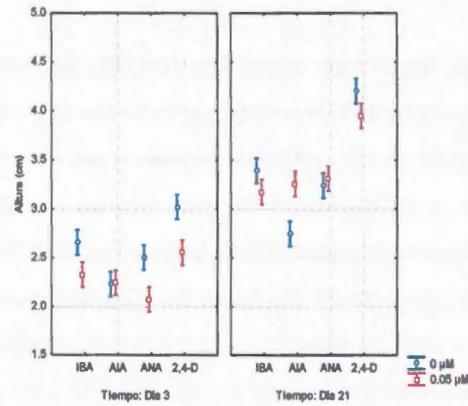
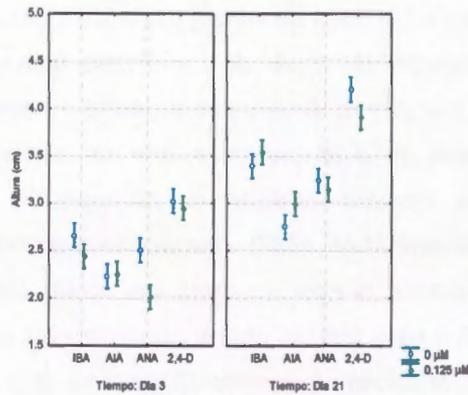


Figura 2.4.- Peso fresco en *Agave angustifolia* a los 3 y 21 días en cada una de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D). a) Corresponde a la concentración de 0.05 μM que está representado por el color rojo en cada una de las auxinas IBA, AIA, ANA, y 2,4-D en comparación con el testigo (sin auxinas) representado por el color azul; b) Corresponde a la concentración de 0.125 μM que se representa con el color verde en cada uno de los tratamientos en comparación con el testigo que está representado por el color azul; c) Corresponde a la concentración de 0.5 μM que se representa con el color rosa en cada uno de los tratamientos en comparación con el testigo que está representado por el color azul.

a)



b)



c)

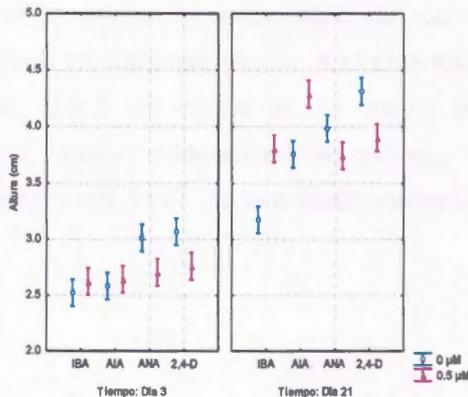


Figura 2.5.- Altura de *Agave angustifolia* los 3 y 21 días en cada una de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D). a) Corresponde a la concentración de $0.05 \mu\text{M}$ que está representado por el color rojo en cada una de las auxinas IBA, AIA, ANA, y 2,4-D en comparación con el testigo (sin auxinas) representado por el color azul; b) Corresponde a la concentración de $0.125 \mu\text{M}$ que se representa con el color verde en cada uno de los tratamientos en comparación con el testigo que está representado por el color azul; c) Corresponde a la concentración de $0.5 \mu\text{M}$ que se representa con el color rosa en cada uno de los tratamientos en comparación con el testigo que está representado por el color azul.

2.3. DISCUSIÓN.

La mejor ganancia en peso fresco de *Agave fourcroydes* fue en un curso temporal de 21 días en las concentraciones 0.125 y 0.5 μM con 2,4-D y AIA, en la altura de la planta en una concentración 0.125 μM fue similar y en el caso de 2,4-D en una concentración 0.5 μM era significativamente más alta en comparación con las otras auxinas, para el caso de *Agave angustifolia* se observó que la mejor ganancia en peso fresco fue en un curso temporal de 21 días con 2,4-D a una concentración de 0.125 y 0.5 μM , y en altura de la planta se observó una mejor altura en una concentración de 0.125 μM y para una concentración 0.5 μM no se observa una altura mejor pero si la formación de callo en los brotes, en otros protocolos de propagación de plantas monocotiledóneas como es en el caso de *Allium cepa* (cebolla) por vía organogénesis directa se utiliza una concentración 2 μM de 2,4-D para que se pueda aumentar la cantidad de número de brotes por explante (Kamastaityte, D. y Stanys, 2002) y una concentración de 4.52 μM para que se dé la generación de callo embriogénico y de esa manera realizar la propagación de esa planta por embriogénesis somática (Saker, M.M. 1997), otra planta monocotiledonia que también se propaga vía organogénesis directa es maíz en donde utilizan 1 μM de 2,4-D aplicado al medio de cultivo para que se pueda observar una buena regeneración de brotes durante el proceso de micropropagación (Shyamala, B. y R.H. Smith 1990), por lo que la concentración óptima que le es aplicada al medio del cultivo durante el proceso de multiplicación por vía organogénesis directa depende del tipo de planta que se desea propagar, por otro lado existen reportes en donde se relaciona que la inducción o formación de callos, por la acción del 2,4-D, origina la aparición de variaciones somaclonales que resultan indeseables cuando se pretende obtener una multiplicación clonal de individuos (García et al., 1992; Bai y Knott, 1993 cit. por Molina y García, 1998).

2.4. CONCLUSIÓN.

- ❖ La mejor concentración en las cuales se observó una buena ganancia tanto en peso fresco como en altura de la planta para las dos especies de *Agave spp* con las que se trabajó fue la de 0.125 μM tal y como fue reportado por Manuel L. Robert en el año de 1997.
- ❖ Los parámetros que se podrían evaluar para que se pueda observar mejor la respuesta de las plantas de *Agave spp* con las auxinas aplicadas al medio de

cultivo también pueden ser tasa de multiplicación, conteo de brotes por explante, y peso seco.

2.5. REFERENCIAS.

García, M.D. y M.C. Molina (1998). *Analysis of Genetic Variability in Longterm Callus Cultures and Regenerated Plants of Maize. Cytologia* 63: 183-190.

García-Mendoza A., (1995), *Riqueza y endemismos de la familia Agavaceae en México*, en: *Conservación de plantas en peligro de extinción: diferentes enfoques*, Anonymous, UNAM, México, 51-75.

García-Mendoza A., (2002), *Distribution of Agave (Agavaceae) in Mexico*, *Cactus and Succulent Journal*, 4: 177-188.

Molina, M.C. y M.D. García (1998). *Analysis of genetic variability in long-term callus cultures and regenerated plants of maize. Cytologia* 63: 183-190.

Mroginski L., P. Sansberro y E. Flashland, (2010), *Establecimiento de cultivos vegetales*, en: *Biotechnología y mejoramiento vegetal II*, (Levitus G., V. Echenique, C. Rubistein, E. Hopp y L. Mroginski, eds.), INTA, 17-24.

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

Robert M. L., J. L. Herrera, F. Contreras y K. N. Scorer, (2013), *In vitro propagation of Agave fourcoides Lem (henequen)*, *Plan Cell Tiss Organ Cult*, 37-48.

Robert M. L., L. K. Yoong, H. Lynda, F. L. Sánchez-Teyer, M. D. Bennett, A. R. Leitch y I. J. Leitch, (2008), *Wild and agronomically important Agave species (Asparagaceae) show proportional increases in chromosome number, genome size, and genetic markers with increasing ploidy*, *Botanical Journal of the Linnean Society*, 215-222.

Shyamala, B. y R.H. Smith (1990). *Regeneration in cereal tissue culture. Crop Science* 30: 1328-1337.

Zhong, H., C. Srinivasan y M.B. Sticklen (1992a). *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L) I. Differentiation of multiple shoot clumps and somatic embryos from shoot tip. *Planta* 187: 483-489.

Zhong, H., C. Srinivasan y M.B. Sticklen (1992b). *In vitro* morphogenesis of corn (*Zea mays* L) II. Differentiation of ear and tassel clusters from culture shoots apices and immature inflorescences. *Planta* 187: 490-497.

CAPÍTULO III.

DETERMINACION DEL PORCENTAJE DE METILACIÓN GLOBAL EN EL ADN DE AGAVE FOURCROYDES Y A. ANGUSTIFOLIA MEDIANTE CUANTIFICACION POR CROMATOGRAFÍA DE ALTA EFICIENCIA LIQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON LOS DIFERENTES TIPOS Y CONCENTRACIONES DE AUXINAS.

3.1. INTRODUCCIÓN

Para poder evaluar el porcentaje de metilación global del ADN, se realizo por medio de cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC) en in vitro plantas para cada una de las especies de Agave spp que se analizó.

La cromatografía liquida de alta eficiencia (HPLC) es una técnica que nos permite detectar de manera cuantitativa los componentes de un analito, se representa por dos fases móvil y estacionaria, la fase móvil consiste en el solvente que arrastra a la muestra atreves de la fase estacionaria que a su vez esta fase va a estar representada en un sólido o liquido fijo para que de ese manera se pueda realizar la separación del analito, la cromatografía de fase reversa que es la que se utilizó en este estudio se basa en la separación de compuestos en base a si polaridad debido a que la fase estacionaria se compone de partículas de sílice químicamente modificados con hidrocarburos saturados (C18), debido a esta característica se puede utilizar para la separación de aminoácidos y péptidos, por lo cual se los porcentajes de metilación global se evaluaron por medio de esta metodología en donde se determinó la 5 metil-desoxitosina (5mdC) en el ADN genómicos, por medio de la separación y cuantificación de nucleótidos en el HPLC.

3.2. MATERIAL Y MÉTODOS

3.2.1. EXTRACCIÓN DEL ADN GENÓMICO

Para la extracción del ADN genómico se utilizó la metodología reportada por Echevarría – Machado (Echevarría-Machado et al., 2005). La integridad del ADN se visualizó en geles de agarosa al 1.5% y la concentración y pureza fueron determinadas mediante espectrofotometría (Thermo Scientific Nano Drop™ 1000).

Para cada una de las condiciones que se evaluó, se extrajo el ADN por triplicado, partiendo de 0.5 g de diferentes muestras.

3.2.2. PORCENTAJE DE METILACION GLOBAL (HPLC).

Se determinó la cantidad de 5-metildesoxitocidina (5mdC), presente en el ADN genómico y mediante la cuantificación de nucleótidos presentes en el ADN, para ello se utilizó la técnica descrita por Maldonado-Santoyo (Maldonado-Santoyo et al., 2011). Para cada muestra y tratamiento, se partió de 5µg de ADN genómico disuelto en agua ultra pura, al cual se le adicionó 5µl de amortiguador 10X (200mM de ácido acético, 200mM de glicina, 50 mM de cloruro de magnesio, 5mM de acetato de Zinc y 2mM de cloruro de calcio a un pH=5.3). Seguidamente, se le adicionó 1µl (10 U) de ADNasa (D2821-Sigma) y 1 µl (10 U) nucleasa P1 (N8630-Sigma). Las muestra se incubaron a 37°C durante 16 h, al término las muestras fueron centrifugadas y congeladas a -20°C aproximadamente 20 min. Posteriormente, las muestras se llevaron a una temperatura de 100°C durante 5 min y se le adicionó 5µl de NaOH 100 mM, y 2 µl (2U) de fosfatasa alcalina (P4879-Sigma). Las muestras se incubaron durante 3 h y media a 37°C y se le adicionaron 100 µl de agua ultra pura y 50 µl de la fase móvil (amortiguador de fosfatos pH =4.1). Las muestras se centrifugaron a 18,000 X g por 10 min, y el sobrenadante se filtró a través de un filtro de 0.22 µm en unos insertos dentro de los viales para HPLC.

- **Condiciones cromatografías.**

Se inyectaron 50 µl de las muestras para cada una de las condiciones por triplicado en el HPLC (Aligent Series 1200®), a través de una columna de fase reversa Kromasil C18 (250 x 4.6 mmy 5µm tamaño de Phenomenex). Para determinar la absorbancia, se utilizó un detector de diodos a 286 nm. La separación de nucleótidos se logró con una mezcla de cuatro fases móviles: fase A, agua desionizada; fase B, Acetonitrilo; fase C, metanol; fase D, amortiguador de fosfatos (50mM de fosfato de amonio dibásico, 15mM acetato de amonio, pH=4.1; el pH fue ajustado con ácido fosfórico). El gradiente utilizado para la separación fue: 0 a 4 min, 80% A y 20% D; 4 a 11 min, 78% A, 2% C y 20% D; 11 a 15 min, 77% A, 3% C y 20%D; 15 a 15.8 min, 35% A, 20%B, 25% C y20%C; 15.8 A 16 min, 30%A, 25%B,25% C y20%D, con un total de flujo de 1

ml/min, el tiempo del programa de gradiente de fases móviles fue de 16 min, con un tiempo de estabilización de la columna de 5 min en 75%A y 25%D.

El porcentaje de metilación del ADN genómico se calculó tomando en cuenta el área bajo la curva de los cromatogramas (Figs. 2 y 3). Para calcular el porcentaje de metilación global se utilizó la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Metilación global} = \frac{[5\text{mdC}]}{[(5\text{mdC} + \text{dC})]} \times 100$$

5mdC= mUA 5 metil, 2- desoxitosina,

dC= mUA 2-desoxitosina.

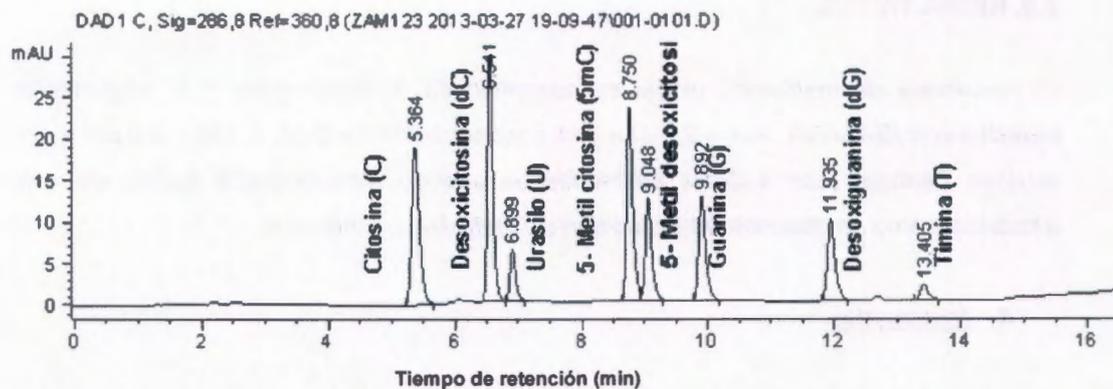


Figura 3.1.- Cromatograma del HPLC de una muestra estándar que muestra la separación de nucleósidos hidrolizados a una de onda de 286 nm.

Signal 1: DAD1 C, Sig=286,8 Ref=360,8

Peak #	RetTime [min]	Type	Width [min]	Area [mAU*s]	Height [mAU]	Area %
1	5.364	BB	0.1311	164.86194	19.02528	18.5331
dC → 2	6.541	BB	0.0910	181.63747	29.83847	20.4189
3	6.899	BB	0.0931	38.25547	6.27296	4.3005
4	8.750	BV	0.1010	158.46182	23.41615	17.8136
5mdC → 5	9.048	VB	0.1072	87.65359	12.29447	9.8537
6	9.892	BB	0.1141	95.75632	12.68163	10.7645
7	11.935	BB	0.1284	84.91860	9.86302	9.5462
8	13.405	BB	0.1311	16.93938	1.95531	1.9043
9	16.834	BB	0.0818	6.31055	1.15452	0.7094
10	18.731	BBA	0.2147	54.75941	3.42233	6.1558

Figura 3.2.- Cuantificación de la concentración de la 2 – desoxicitidina y 5-metil, 2-desoxicitidina mediante el área bajo la curva (mAU).

3.3. RESULTADOS.

El porcentaje de metilación global se cuantificó en *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* tratadas con IBA, ANA, AIA y 2,4-D a una concentración de 0.05, 0.125 y 0.5 μM y sin auxinas (testigo). Los análisis se realizaron usando cromatografía líquida de alta eficiencia como se describe en la sección de materiales y métodos.

A. fourcroydes

Al realizar la cuantificación de la metilación global se pudo observar una diferencia significativa entre el día 3 y 21. En el día 21 se observó una disminución en el porcentaje de metilación global aunque no de manera significativa ya que el valor de $p = 0.36583$ (Fig. 10.1 anexos), en las diferencias encontradas por concentración hay diferencias altas con un valor de $p = 0.00815$ (Fig.10.2 anexos) entre el testigo y las concentraciones 0.05, 0.125 y 0.5 μM ya que disminuye significativamente los porcentajes globales de metilación. Se observó que hay diferencias significativas principalmente en ANA y 2,4-D siendo 2,4-D quien presenta una mayor diferencia al reducir significativamente los porcentajes de metilación global del ADN en cada una de las concentraciones y días evaluados. En presencia de 2,4-D a una concentración de 0.5 μM se observó una disminución en los porcentajes de metilación global de manera considerable. A una concentración de 0.05 μM se encontró que la menor metilación

global fue en presencia de 2,4-D a los 3 días y el que obtuvo mayor metilación tanto a los 3 días como a los 21 fueron las plantas tratadas con IBA. Sin embargo, conforme la concentración de las auxinas aumentaba, el porcentaje de metilación aumentaba para AIA y ANA (Fig 3.1).

A. angustifolia

En esta especie también se encontraron diferencias significativas en 0.125 y 0.5 μM entre las diferentes auxinas. En el caso de 0.05 μM en el día 3 no se observaron cambios entre las auxinas. Sin embargo, en el día 21 las diferencias observadas fueron que las auxinas ANA y 2,4-D aumentan el porcentaje de metilación que IBA o AIA. Esto indica fuertemente que la respuesta en los porcentajes globales de metilación del ADN depende de la auxina utilizada, las diferencias entre las concentraciones y los días con el tratamiento. También son evidentes observando que para todas las concentraciones aumenta la metilación en relación con el testigo durante todo el curso temporal mantiene los porcentajes de metilación, las diferencias observadas son altas ya que tienen un valor de $p=0.00025$ (Fig. 10.8 anexos), las diferencias entre los reguladores y los días 3 y 21. También es evidente para AIA, ANA y 2,4-D ya que aumentan su porcentaje en la metilación global, en el caso de IBA se mantienen los porcentajes de metilación con un valor de $p=0.00134$ (Fig. 10.9), en IBA en las diferentes concentraciones utilizadas no presenta cambios en los porcentajes de metilación, para AIA se observan diferencias entre la concentración 0.125 μM aumentando los porcentajes de metilación del ADN en relación a sus demás concentraciones utilizadas, en el caso de ANA se hay diferencias entre la concentración 0.125 y 0.5 μM , no presentando diferencias para las demás concentraciones restantes y para el caso de 2,4-D se observa únicamente diferencias en la concentración 0.125 μM en relación a las demás concentraciones en donde no se observan diferencias significativas valor de $p=0.00163$ (Fig.10.10 anexos) y por último las diferencias encontradas en curso temporal, concentración y auxina son altas donde lo podemos observar que para la concentración de 0.05 μM ANA y 2,4-D aumentan los porcentajes de metilación global del día 3 al 21, de igual manera ocurre en 0.125 μM pero también aumentando los porcentajes de metilación global en AIA, para 0.5 μM también se muestran aumentados significativamente, en el caso de IBA en todas las concentraciones mantiene sus porcentajes de metilación global, en *Agave angustifolia* es donde se observan más cambios en los porcentajes de metilación global para todas las concentraciones estos cambios abarcan desde disminuir sus

porcentajes de metilación del ADN en el primer curso temporal tal y como se observa en AIA y 2,4-D en una concentración 0.5 μ M hasta la tendencia observable de aumentar los porcentajes de metilación en el día 21 el valor de $p= 0.00673$ (Fig. 3.2).

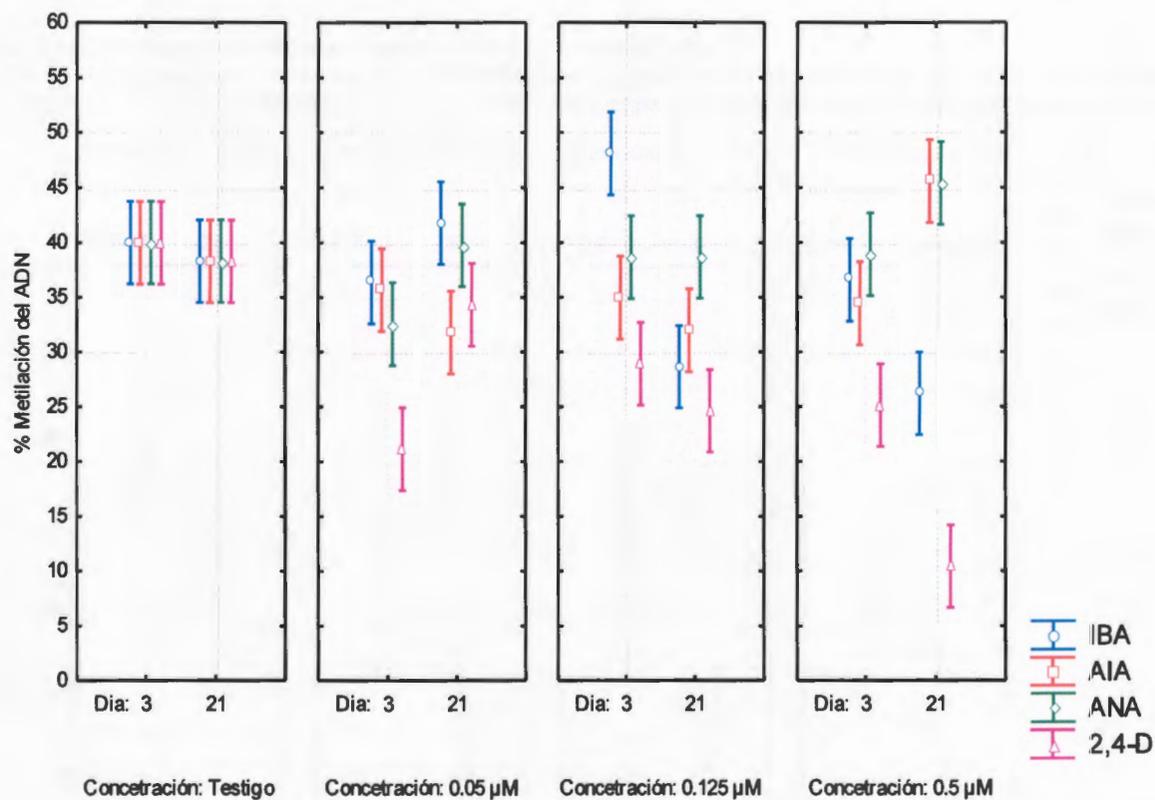


Figura 3 3.- Muestra el análisis que se realizó para mostrar los porcentajes de metilación global de *Agave fourcroydes* en cada uno de sus concentraciones y auxinas utilizadas encontrando en el eje de las X porcentaje de metilación en el de las y el curso temporal de 3 y 21 días, el color azul corresponde a IBA, el color rojo corresponde a AIA, el color verde corresponde a ANA y el rosa corresponde a 2,4-D.

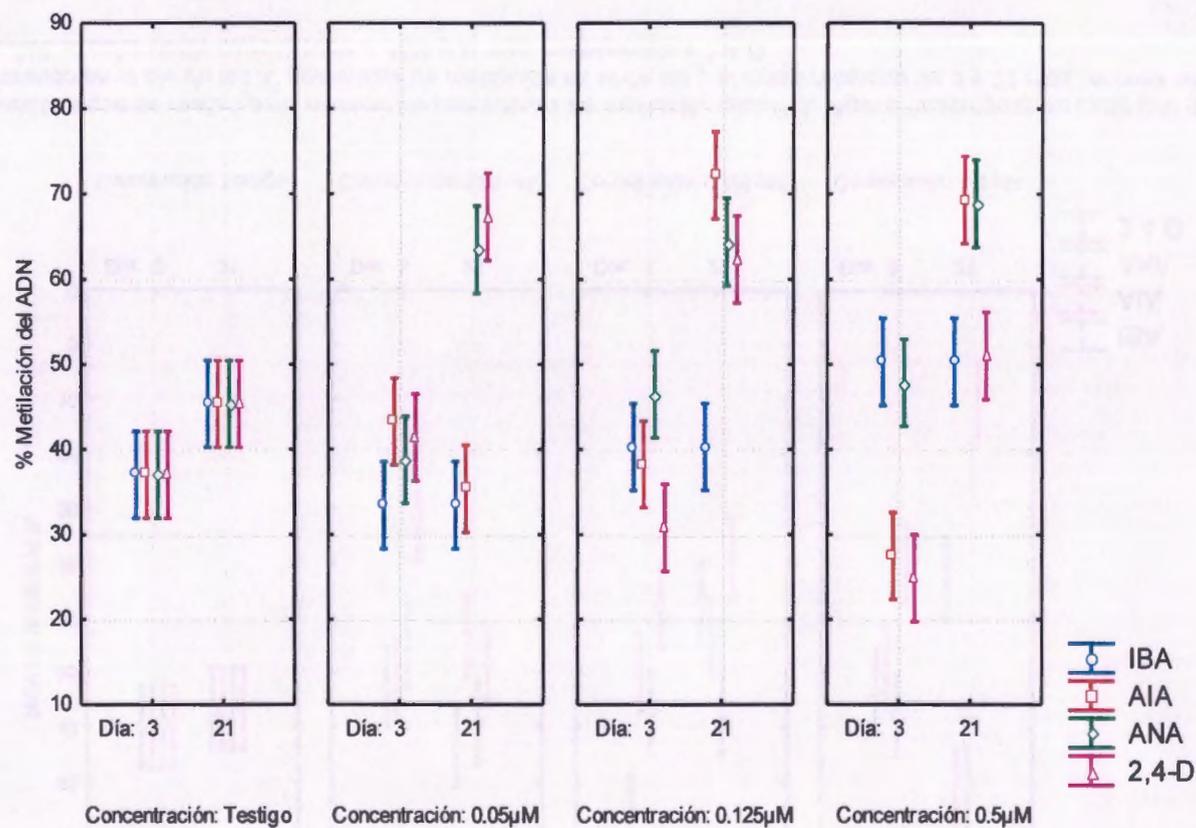


Figura 3.4.- Muestra el análisis que se realizó para mostrar los porcentajes de metilación global de *Agave angustifolia* en cada uno de sus concentraciones y auxinas utilizadas encontrando en el eje de las X porcentaje de metilación en el de las y el curso temporal de 3 y 21 días, el color azul corresponde a IBA, el color rojo corresponde a AIA, el color verde corresponde a ANA y el rosa corresponde a 2,4-D.

3.4. DISCUSIÓN.

*En el caso de la cuantificación de los porcentajes globales de metilación se observó que en el caso de *Agave fourcroydes* la disminución significativa de los porcentajes de metilación con 2,4-D en una concentración de 0.5 μM cuando realizar la comparación entre el curso temporal 3 y 21 también se observa esa disminución en la metilación así como también se encuentra reducida cuando lo comparas con el testigo utilizado y para *Agave angustifolia* se encontró un efecto contrario en el día 21 al estar aumentado significativamente el porcentaje de metilación para 0.125 y 0.5 μM con la auxina 2,4-D siendo más significativo en 0.125 μM , cuando se realizó la comparación entre el día 3 y 21 en la concentración 0.125 μM se observa el aumento en los porcentajes de metilación y lo mismo se observa cuando se realiza la comparación con el testigo, los reportes generados con respecto a la disminución de la metilación global existe uno realizado en *Acca sellowiana* (Fraga et al 2008) durante el proceso de embriogénesis somática de esta planta en cada uno de los estadios disminuye la metilación en los cursos temporales de 10, 30 y 45 ellos sugieren que esta reducción en la metilación del ADN se puede relacionar con el uso de 2,4-D en el proceso de embriogénesis, y relacionado con el aumento del porcentaje de metilación global ha sido elucidado por LoShiavo et al 1989 (LoShiavo et al., 1989) donde observa un comportamiento dosis dependiente aumenta la concentración de 2,4-D aumenta la metilación global, tanto la disminución como el aumento de las porcentajes de metilación se relacionan con variaciones en el fenotipo dentro del proceso de cultivo de tejidos denominado "variación somaclonal" lo cual se podría sugerir que si no se llega a un restablecimiento de la metilación durante ese proceso al ser una condición estable podría ser que se empiecen a observar variaciones de este tipo.*

3.5. CONCLUSIÓN

- ❖ *La respuesta en porcentajes de metilación global del ADN se observaron en el día 21 en una concentración de 0.5 μM para el caso de *Agave fourcroydes* y 0.125 μM para *Agave angustifolia* cuando le es aplicado 2,4-D al medio de cultivo.*
- ❖ *La respuesta entre especies en porcentajes globales de ADN fue diferente para cada una de las especies.*

3.6. REFERENCIAS.

- Echevarría-Machado I., L. Sánchez-Cach, C. Hernández-Zepeda, R. Rivera-Madrid y O. Moreno-Valenzuela, A simple and efficient method for isolation of DNA in high mucilaginous plant tissues, *Mol. Biotechnol.*, 31: 129-135, (2005).
- Maldonado-Santoyo M., C. Rodríguez Flores, A. López Torres, K. Wrobel y K. Wrobel, Global DNA methylation in earthworms: a candidate biomarker of epigenetic risks related to the presence of metals/metalloids in terrestrial environments, *Environ. Pollute*, 159: 2387-2392, (2011).
- Xiangqian L., X. Mingliang, S. Schuyler y S. S. Korban, DNA methylation profiles differ between field and in vitro grown leaves of apple, *Plan Physiol.*, 1229-1234, (2002).
- Xu M., X. Li y S. S. Korban, (2004), DNA-methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (*Rosa hybrida* L.), *Theor Appl Genet*, 109: 899-910.
- Schellenbaum P., V. Mohler, G. Wenzel y B. Walter, (2008), Variation in DNA methylation patterns of grapevine somaclones (*Vitis vinifera* L.), *BMC Plant Biology*, 8: 1-10.
- Park S., H. Murthy, D. Chakraborty y K. Paek, (2009), Detection of epigenetic variation in tissue-culture-derived plants of *Doritaenopsis* by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis., *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant*, 45: 104-108..
- Peraza-Echeverria S., V. A. Herrera-Valencia y A. James-Kay, (2001), Detection of DNA methylation changes in micropropagated plants using methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP), *Plant Science*, 161: 359-367.
- Li X., S. Krasnyanski y S. S. Korban, (2002), Somatic embryogenesis, secondary embryogenesis and shoot organogenesis in Rose, *Plan Physiol.*, 313-319..
- LoSchiavo F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli y M. Terzi, (1989), DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylating drugs, *Theor Appl Genet*, 177: 325-331.

CAPÍTULO IV.

PERFILES DE METILACIÓN POR MEDIO DE AMPLIFICACIÓN POLIMÓRFICA SENSIBLE A METILACIÓN (MSAP) EN AGAVE FOURCROYDES Y AGAVE ANGUSTIFOLIA EN DIFERENTES TIPOS Y CONCENTRACIONES DE AUXINAS.

4.1. INTRODUCCIÓN

Para evaluar los perfiles de metilación se utilizó la técnica de amplificación polimórfica sensible a metilación (MSAP) (Mingliang et al., 2000) que es una modificación de la técnica de amplificación de longitud de fragmentos polimórficos (AFLP) reportada por Vos (Vos et al., 1995). El desarrollo de MSAP se utiliza enzimas de restricción de tipo isoquisómeros lo que significa que reconocen el mismo sitio de corte y son sensibles a la metilación tanto interna (Hpa II) como externa (Msp I).

Al hacer la evaluación a nivel de eventos de metilación nos permite conocer de manera más fina que tipo de metilación se está llevando a cabo con cada uno de los tratamientos utilizados en este análisis.

4.2. MATERIAL Y MÉTODOS

Para el análisis de MSAP se partió de una mezcla de tres ADN genómicos por cada condición a la que fueron sometidas las plantas. Esta mezcla se le denominó bulk, el cual fue digerido por cada una de las combinaciones de las enzimas de restricción EcoR1/HpaII y EcoR1/MspII en un volumen total de 20 µl. La mezcla de digestión contenía 3 µl de la muestra (300 ng de ADN), 2 µl de amortiguador (1X) para cada una de las enzimas Msp I y Hpa II, 1 µl de cada una de las enzimas Msp I y Hpa II (2U), 0.5 µl de EcoR1 (0.5 U), y por último 13.5 µl de agua ultra pura. Las muestras se incubaron a 37°C durante 3 h, y fueron inactivadas a 80°C (Msp II) y 65°C (HpaII) por 20 min.

La reacción de ligación se llevó a cabo en un volumen final de 30 µl en donde 20 µl son el contenido del producto de digestión, 6 µl del amortiguador para la ligasa (1X), 1 µl adaptador Eco R1 (5 pmol), 1 µl de adaptador Hpa II/ MspI, 1 µl de la ligasa T4 (1U) y 1 µl de agua ultra pura y la mezcla se incubó 16°C durante 16 h.

La reacción de pre-amplificación se realizó en un volumen final de 20 μ l, en una mezcla que contenía 5 μ l de la dilución 1:5 (v:v) del producto de ligación, 2 μ l de amortiguador para PCR (10X), 0.6 μ l $MgCl_2$ (1.5 mM), 0.4 μ l dNTPs (0.2 mM), 1 μ l de cebador MH (1 pmol), 1 μ l de cebador Eco (1 pmol), 0.1 μ l de la ADN Tag polimerasa (0.5 U) y 9.9 μ L de agua. Las condiciones de la PCR fueron: 94 °C por 5 min, 94 °C por 30s, 20 ciclos de 56 °C por 60 s, 72 °C por 60 s seguido de una temperatura de extensión de 72 °C por 7 min. Los productos digeridos, ligados y pre-amplificados fueron verificados en un gel de agarosa al 1.5 % corridos a 80 volts durante 15 min.

La reacción de amplificación selectiva se realizó en 10 μ l de volumen final de una mezcla que contenía 5 μ l de la dilución 1:25 (v:v) del producto de la pre-amplificación, 1 μ l del amortiguador para PCR (1X), 0.3 μ l $MgCl_2$ (1.5 mM), 0.2 μ l dNTPs (0.2 mM), 2.25 μ l del cebador MH con tres nucleótidos selectivos (15 ng), 1 μ l del cebador EcoRI (2.5 mM) marcado con tres nucleótidos selectivos, 0.1 μ l de la ADN Tag polimerasa (0.5 U) y 0.15 μ l de agua. Es importante mencionar que cada cebador del tipo Eco RI fue marcado con un fluorocromo para poderlo detectar posteriormente mediante secuenciación. Para las reacciones de amplificación de la PCR se utilizaron ciclos bajo las siguientes condiciones: 94 °C por 5 min, 12 ciclos de touch-down de 94 °C por 45 s, 65 - 59 °C por 60 s (disminuye 0.5 °C por ciclo) y 72 °C por 60 s; 16 ciclos continuos de 94 °C por 45 s, 52 °C por 45 s y 72 °C por 30 s, seguido de una extensión a 72 °C por 7 min.

Posteriormente, se tomaron 25 μ l de SLS (Sample Loading Solution-GenomeLab™ N° 608082), se le adicionaron 0.25 μ l STD 400 [DNA Size Standard Kit-400 GenomeLab™ N° 608098], y 2 μ l de la muestra diluida (2 μ l del producto de la amplificación selectiva y 4 μ l de SLS formamida) más una gota de aceite para evitar que se evapore la muestra. Los fragmentos de restricción amplificados selectivamente fueron visualizados por medio de un secuenciador automático empleando iniciadores específicos EcoRI/Msp1y EcoR1/HpaI marcados con fluoroforos (ACA/CTA D4™ color azul) en cada combinación de cebadores y el estándar interno D1™ 400 Size Standard el análisis se realizó con un software denominado GeneMarker®.

Los datos crudos obtenidos como resultado de la detección de los fragmentos amplificados en el secuenciador fueron importados al programa GeneMarker™. Una vez importados, se aplicaron los filtros con el fin de eliminar errores de intensidad excesiva, corregir saturación, suavizar curvas de la gráfica, eliminar traslape de señales entre fluorocromos y ajustar la intensidad desplegada respecto a la escala

(Fig. 4). Así mismo, se revisó el patrón desplegado por el estándar interno en cada muestra, procurando que éste presentara un puntaje de correlación mínimo de 80 con respecto a la intensidad y tamaño de los fragmentos conocido, asegurando así la capacidad de comparación de los datos obtenidos en cuanto al tamaño de los fragmentos. Las muestras cuyos datos no cumplieron con el anterior requisito se eliminaron del análisis. Los criterios de detección automática de fragmentos incluyeron una intensidad de fluorescencia superior a 50 unidades y con un tamaño de fragmento entre 55 a 240 pares de bases posteriormente se genera una matriz binaria de 0 y 1 que nos permite identificar de manera más accesible la presencia (1) o ausencia (0) de fragmentos generados, los tipos de eventos de metilación que se observaron van a depender del tipo de corte (sitio de restricción) de la enzima *Msp I* solo es sensible (o es bloqueada) a la metilación externa 5'mCC-GG 3', *Hpa I* es sensible (o es bloqueada) a la metilación en cualquier isla metilada 5'mCC-GG 3', 5'CmC-GG 3', 5'mCmC-GG 3'. En el cuadro 2 se muestra los tipos de eventos de metilación de acuerdo con los sitios de corte de la enzima y en el cuadro 3 se muestran las secuencias de los adaptadores usados para el análisis.

Cuadro 2.- Tipos de enzimas que se utilizaron en el MSAP

<i>Msp I</i>	<i>Hpa I</i>	Tipo
+	+	Tipo 1: No metilado
+	-	Tipo 2: Metilación completa
-	+	Tipo 3: Hemi-Metilación (solo en mC y en la C)
-	-	Tipo 4: Hipermetiladas.

Cuadro 3.- Secuencias de adaptadores y cebadores utilizados en este estudio.

Adaptadores	Secuencia
<i>HpaII/MspI</i> - adaptador I	5'-CGACTCAGGACTCAT-3'
<i>HpaII/MspI</i> - adaptador II	5'-GACGATGAGTCCTGAGT-3'
<i>EcoRI</i> - adaptador I	5'-CTCGTAGACTGCGTACC-3'
<i>EcoRI</i> - adaptador II	5'-AATTGGTACGCAGTCTAC-3'
Cebador de pre-amplificación	
<i>HpaII/MspI</i> - pre	5'-GATGAGTCCTGAGTCGG-3'
<i>Eco</i> - pre	5'-GACTGCGTACCAATTCA-3'
<i>Eco</i> - pre	5'-GATGAGTCCTGAGTAAC-3'
M-pre	
Cebadores selectivos	
<i>HpaII/MspI</i> cebadores	
HM-CTA	5'-GATGAGTCCTGAGTCGGCTA-3'
<i>EcoRI</i> - cebadores	
E-ACA	5'-GACTGCGTACCAATTCACA-3'

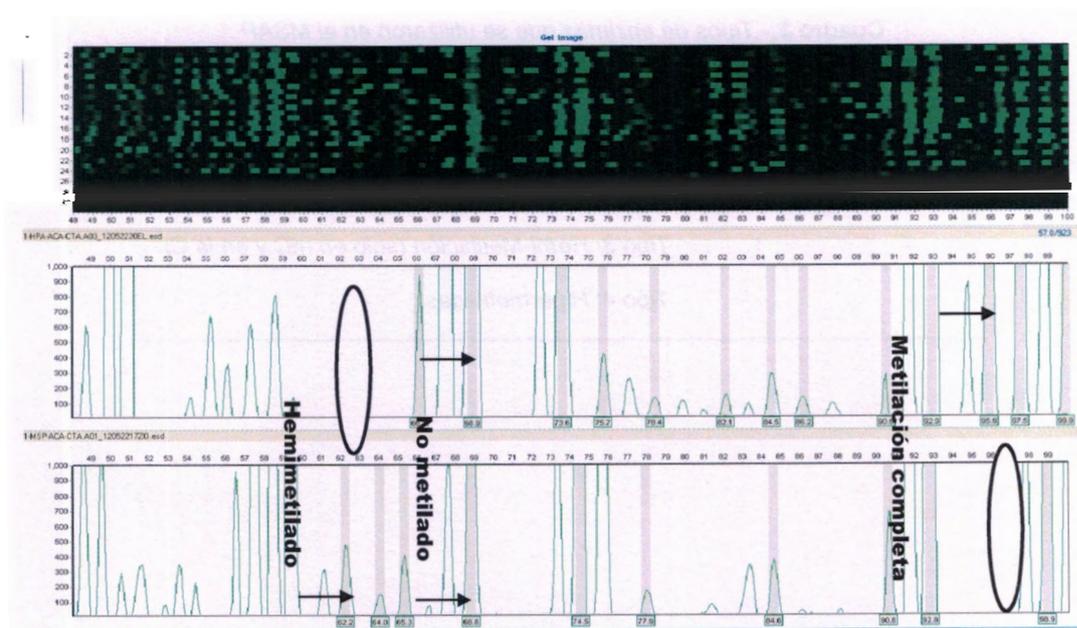


Figura 4.1.- Electroferograma completo generado por el secuenciador Beckman CQ800 y analizado en el software GeneMarker®

4.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICOS.

El análisis que se aplicó para conocer la distribución de los datos en una superficie fue un análisis de homogeneidad de varianza es de tipo multivariado, donde se evaluó patrones de disimilitud para conocer distribución en una superficie, como también se evalúa la similitud de los datos en función en este caso fue para todas las auxinas utilizadas por cada una de las especies utilizadas y posteriormente entre especies y cada uno de los reguladores, resaltando que este tipo de análisis multivariado se eligió debido a los datos que se obtuvieron de la matriz binaria que fueron datos por frecuencia.

4.4. RESULTADOS.

En el número de fragmentos obtenidos por especie en cada una de las concentraciones, días evaluados y auxinas para IBA (tabla 1), AIA (tabla 2), ANA (tabla 3), 2,4-D (tabla 4), los niveles de fragmentos obtenidos muestran cambios de ganancia y pérdida de sitios en las islas de metilación tanto en CG como en CHG en comparación con el control en el cual no se observan un patrón de metilación entre curso temporal y auxinas utilizadas el comportamiento es muy variado.

Agave fourcroydes

Para IBA (tabla 1) observamos que en el número de fragmentos obtenidos en los no metilados (NM), iniciamos con el testigo que presento 23 fragmentos obtenidos , en el día tres en la concentración de 0.05 μM se obtienen 24 fragmentos, para 0.125 μM se obtienen 17 y por ultimo para 0.5 μM se obtienen 39 en el día 21 se generan 27 fragmentos para 0.05 μM , 40 fragmentos para 0.125 μM , y 15 para 0.5 μM , para el tipo 2 metilación completa se obtienen 13 en el testigo, 38 fragmentos para 0.05 μM , 31 fragmentos para 0.125 μM , 64 fragmentos para 0.5 μM para el día 21 en 0.05 μM se obtienen 22 fragmentos, 19 fragmentos para 0.125 μM , 41 fragmentos para 0.5 μM en este tipo de sitio de metilación lo que podemos observar es que todas las concentraciones de auxinas utilizadas están aumentadas en menor o mayor proporción con respecto al control, para el tipo 3 hemimetiladas (HM), muestra que en el testigo se obtiene 28 fragmentos, para el día 3 se obtiene 21 fragmentos para 0.05 μM , 48 fragmentos para 0.125 μM , 42 fragmentos para 0.5 μM y por ultimo para el día 21 en 0.05 μM se obtiene 9 fragmentos, 10 fragmentos para 0.125 μM y 51 fragmentos

para 0.5 μM lo que se observa es que para él día 3 se encuentra ligeramente disminuido y después se aumenta de manera considerable lo que no sucede en un día 21 ya que se mantiene muy disminuido las primeras dos concentraciones y en la más alta concentración se observa aumentada.

Cuadro 4.- IBA en *Agave fourcroydes* muestra cada una de las concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μM) en el día 3 y día 21 en comparación con el control con cada uno de los eventos de metilación y el total de fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.

Agave Fourcroydes

Sitio de metilación	Patron de fragmentos			IBA Día 3			IBA Día 21			Total de Fragmentos
	Mspl	Hpal	Testigo	0.05 μM	0.125 μM	0.5 μM	0.05 μM	0.125 μM	0.5 μM	
<i>No metilado (NM)</i>										
Tipo 1	-	-	23	24	17	39	27	40	15	213
<i>Met. completa (MC)</i>										
Tipo 2	+	-	13	38	31	64	22	19	41	213
<i>Hemimetilado (HM)</i>										
Tipo 3	-	+	28	21	48	42	9	10	51	213
<i>Hipermetilado (HP)</i>										
Tipo 4	+	+	149	130	117	68	155	144	106	213

Para AIA (tabla 2) el número total de fragmentos obtenidos fue de 213 de ese total de fragmentos se generaron para el tipo de metilación 1 no metilado (NM) en el testigo 23 para el día 3 en una concentración de 0.05 μM se obtienen 42 fragmentos, 56 fragmentos para 0.125 μM , 44 fragmentos para 0.5 μM en el día 21 fueron 15 fragmentos para 0.05 μM , 33 fragmentos para 0.125 μM , 44 fragmentos para 0.5 μM , en el tipo 2 metilación completa (MC) en el testigo se obtienen 13 fragmentos en el día 3 en 0.05 μM se obtienen 67 fragmentos, 65 fragmentos para 0.125 μM , 52 fragmentos para 0.5 μM , para el día 21 se obtienen 54 fragmentos para 0.05 μM , 13 fragmentos para 0.125 μM , 15 fragmentos para 0.5 μM , para el tipo 3 hemimetilado (HM) se obtiene 28 fragmentos para el testigo, 39 fragmentos para 0.05 μM , 50 fragmentos para 0.125 μM , 32 fragmentos para 0.5 μM , en el día 21 se obtienen 59 fragmentos para 0.05 μM , 33 fragmentos para 0.125 μM y 36 fragmentos para 0.5 μM .

Cuadro 5.- AIA en *Agave fourcroydes* muestra cada una de las concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μM) en el día 3 y día 21 en comparación con el control con cada uno de los eventos de metilación y el total de fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos

Agave Fourcroydes										
Sitio de metilación	Patrón de fragmentos			AIA Día 3			AIA Día 21			Total de Fragmentos
	Mspl	Hpal	Testigo	0.05 μM	0.125 μM	0.5 μM	0.05 μM	0.125 μM	0.5 μM	
No metilado (NM)										
Tipo 1	-	-	23	42	56	44	15	33	44	213
Met. completa (MC)										
Tipo 2	+	-	13	67	65	52	54	13	15	213
Hemimetilado (HM)										
Tipo 3	-	+	28	39	50	32	59	33	36	213
Hipermetilado (HP)										
Tipo 4	+	+	149	65	42	85	85	134	118	213

Para ANA (tabla 3) de un número total de 213 fragmentos obtenidos para el tipo 1 o sitios no metilados observamos que para el testigo se obtienen 23 fragmentos, en el día 3 se generaron 34 fragmentos para 0.05 μM , 34 fragmentos para 0.125 μM , 15 fragmentos para 0.5 μM , en el día 21 se obtiene 15 fragmentos para 0.05 μM , 36 fragmentos para 0.125 μM , 24 fragmentos para 0.5 μM , para el tipo 2 metilación completa (MC) para el testigo se obtiene 13 fragmentos para el día 3 se obtienen 73 fragmentos para 0.05 μM , 34 fragmentos para 0.125 μM y 0.5 μM en el día 21 se obtienen 32 fragmentos para 0.05 μM y 0.125 μM y 36 fragmentos para 0.5 μM , en el tipo 3 hemimetilado (HM) en el testigo se obtienen 28 fragmentos para el día 3 en 0.05 μM se obtienen 45 fragmentos, 34 fragmentos para 0.125 μM , 45 fragmentos para 0.5 μM , para un día 21 se obtienen 43 fragmentos para 0.05 μM , 25 fragmentos para 0.124 μM , 49 fragmentos para 0.5 μM .

Cuadro 6.- ANA en *Agave fourcroydes* muestra cada una de las concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μM) en el día 3 y día 21 en comparación con el control con cada uno de los eventos de metilación y el total de fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos

Sitio de metilación	Patrón de fragmentos			ANA Día 3			ANA Día21			Total de Fragmentos
	MspI	HpaII	Testigo	0.05	0.125	0.5	0.05	0.125	0.5	
				μM	μM	μM	μM	μM	μM	
<i>No metilado (NM)</i>										
Tipo 1	-	-	23	34	34	15	15	36	24	213
<i>Metilación completa (MC)</i>										
Tipo 2	+	-	13	73	34	34	32	32	36	213
<i>Hemimetilado (HM)</i>										
Tipo 3	-	+	28	45	34	45	43	25	49	213
<i>Hipermetilado (HP)</i>										
Tipo 4	+	+	149	61	134	119	123	120	104	213

Para 2,4-D (tabla 4) se observa que el número total de fragmentos obtenidos fue de 213 fragmentos de las cuales los sitios no metilados para el testigo fue de 23 en un día 3 en 0.05 μM se obtuvieron 8 fragmentos, 19 y 16 fragmentos para 0.125 y 0.5 μM respectivamente, para el día 21 se obtuvieron 19, 17 y 37 fragmentos obtenidos para 0.05, 0.125 y 0.5 μM respectivamente, para el tipo 2 metilación completa para el testigo se obtienen 28 fragmentos, en un día 3 para 0.05 se obtienen 48 fragmentos, 41 y 50 fragmentos para 0.125 y 0.5 μM , en un día 21 se obtienen 38, 31 y 23 fragmentos para 0.05, 0.125 y 0.5 μM por lo que se puede observar que para cada una de las concentraciones aumenta en número de fragmentos generados en mayor o menor proporción en comparación con el testigo, para el tipo 3 hemimetiladas (HM) se obtienen para el testigo un número 28 fragmentos para el día 3 en una concentración de 0.05 μM se obtienen 46 fragmentos, se obtienen 46 y 49 fragmentos para 0.125 y 0.5 μM para un día 21 se obtienen 42, 48 y 20 fragmentos para 0.05, 0.125 y 0.5 μM respectivamente para los sitios hemimetilados (HM) se observa que en la mayoría de los casos en comparación con el control el número de fragmentos generados aumento con excepción de 0.5 μM .

Cuadro 7.- 2,4-D en *Agave fourcroydes* muestra cada una de las concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μM) en el día 3 y día 21 en comparación con el control con cada uno de los eventos de metilación y el total de fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.

<i>Agave Fourcroydes</i>										
Sitio de metilación	Patrón de fragmentos			2,4-D Día 3				2,4-D Día 21		Total de Fragmentos
	<i>Mspl</i>	<i>Hpal</i>	Control	0.05 μM	0.125 μM	0.5 μM	0.05 μM	0.125 μM	0.5 μM	
<i>No metilado (NM)</i>										
Tipo 1	-	-	23	8	19	16	19	17	37	213
<i>Metilación completa (MC)</i>										
Tipo 2	+	-	13	48	41	50	38	31	23	213
<i>Hemimetilado (HM)</i>										
Tipo 3	-	+	28	46	44	49	42	48	20	213
<i>Hipermetilado (HP)</i>										
Tipo 4	+	+	149	111	109	98	114	117	133	213

Quando se analiza la distribución y se realiza el porcentaje de metilación por concentración como se observa en la gráfica 4.2, 4.3 y 4.4, logramos observar que de igual manera los cambios en cada uno de los tratamientos es variable cambia en cada concentración, concentración y curso temporal lo que podemos decir al respecto que puede haber una gran actividad en las islas de metilación.

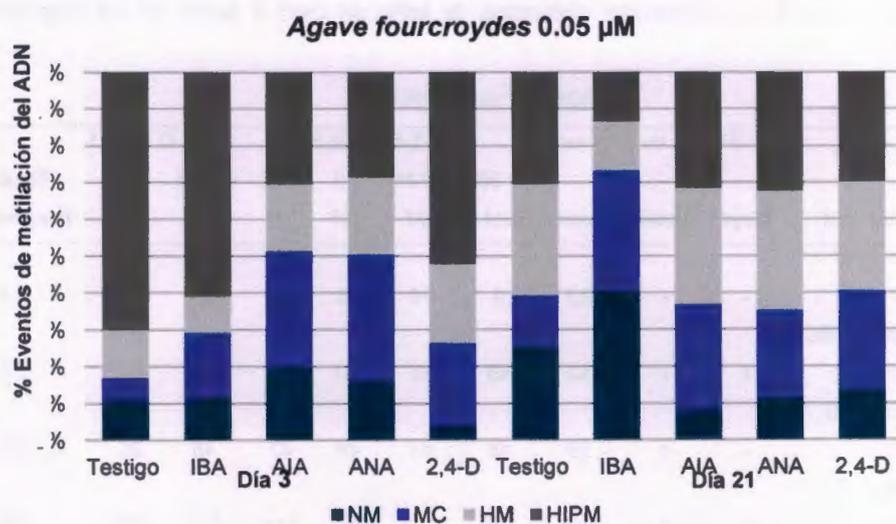


Figura 4.2.- Eventos de metilación del ADN en *Agave fourcroydes* a una concentración de 0.05 µM con cada uno de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D) en el día 3 y 21 el color azul corresponde a los sitios no metilados (NM – Tipo 1), el color morado a sitios de metilación completa (MC-Tipo 2), el color gris a los sitios de hemimetilados (HM- Tipo 3), y el color gris oscuro a los sitios hipermetilados (HIPM- Tipo 4).

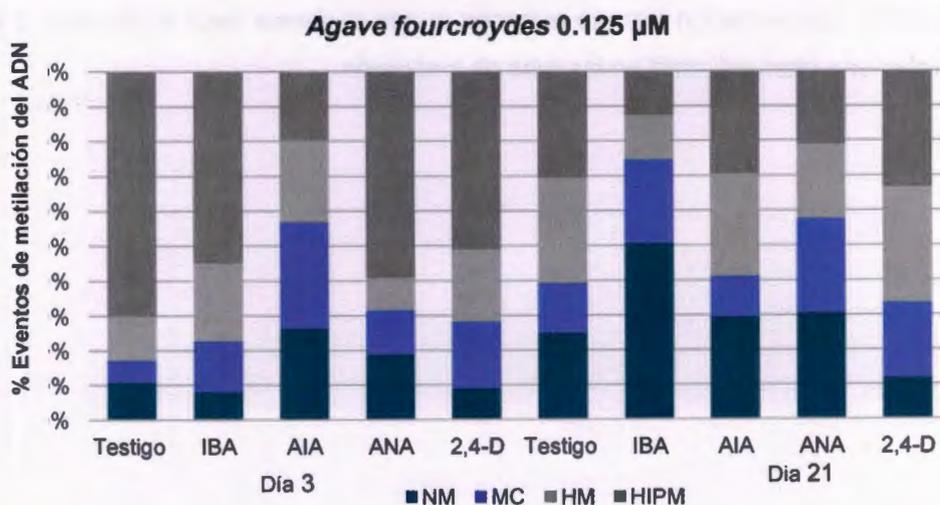


Figura 4.3.- Eventos de metilación del ADN en *Agave fourcroydes* a una concentración de 0.125 µM con cada uno de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D) en el día 3 y 21 el color azul corresponde a los sitios no metilados (NM – Tipo 1), el color morado a sitios de metilación completa (MC-Tipo 2), el color gris a los sitios de hemimetilados (HM- Tipo 3), y el color gris oscuro a los sitios hipermetilados (HIPM- Tipo 4).

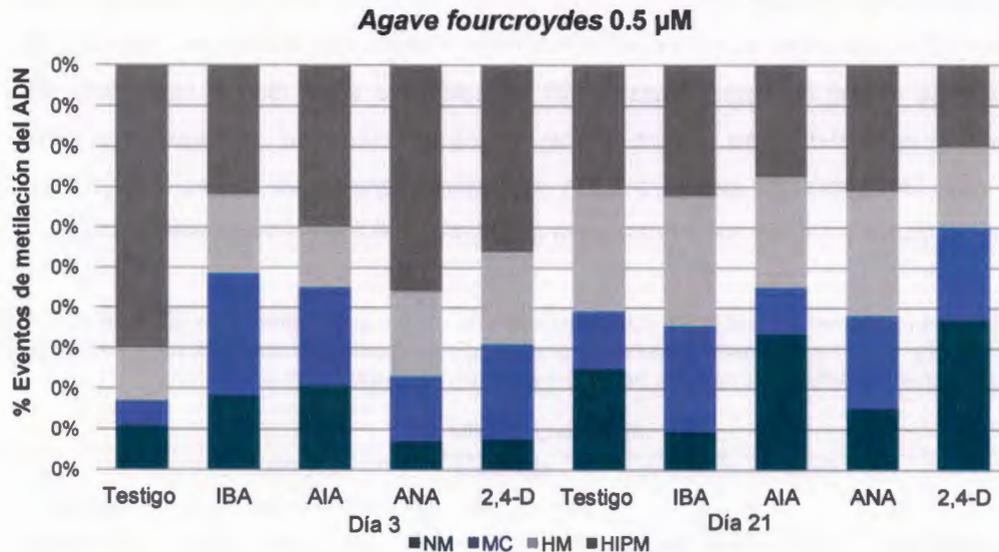


Figura 4.4.- Eventos de metilación del ADN en *Agave fourcroydes* a una concentración de 0.5 μ M con cada uno de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D) en el día 3 y 21 el color azul corresponde a los sitios no metilados (NM – Tipo 1), el color morado a sitios de metilación completa (MC-Tipo 2), el color gris a los sitios de hemimetilados (HM- Tipo 3), y el color gris oscuro a los sitios hipermetilados (HIPM- Tipo 4).

Agave angustifolia

En *Agave angustifolia* se muestran las tablas de cada una de las auxinas utilizadas (tabla 5), AIA (tabla 6), ANA (tabla 7), 2,4-D (tabla 8), con cada una de las concentraciones en el día 3 y 21 con el número total de fragmentos, , donde muestran a nivel de fragmentos obtenidos los cambios de ganancia y perdida de sitios en las islas de metilación tanto en CG como en CHG en comparación con el control no se observan un patrón de metilación entre curso temporal y auxinas utilizadas el comportamiento es muy variado

Para IBA (tabla 5) observamos que en el número de fragmentos totales obtenidos fue de 412 en las cuales en los sitios no metilados (NM), se inicia con el testigo que presento 23 fragmentos obtenidos , en el día tres en la concentración de 0.05 μ M se obtienen 14 fragmentos, para 0.125 μ M se obtienen 16 y por ultimo para 0.5 μ M se obtienen 6 en el día 21 se generan 23 fragmentos para 0.05 μ M, 23 fragmentos para 0.125 μ M, y 6 para 0.5 μ M, para los sitios no metilados podemos observar que para la concentración más alta el número de fragmentos es similar para el tipo 2 metilación completa se obtienen 13 en el testigo, 36 fragmentos para 0.05 μ M, 26 fragmentos para 0.125 μ M, 73 fragmentos para 0.5 μ M para el día 21 en 0.05 μ M se obtienen 49 fragmentos, 79 fragmentos para 0.125 μ M, 74 fragmentos para 0.5 μ M en este tipo de

sitio de metilación lo que podemos observar es que todas las concentraciones de auxinas utilizadas están aumentadas en menor o mayor proporción con respecto al control, para el tipo 3 hemimetiladas (HM), muestra que en el testigo se obtiene 28 fragmentos, para el día 3 se obtiene 36 fragmentos para 0.05 μM , 26 fragmentos para 0.125 μM , 73 fragmentos para 0.5 μM y por ultimo para el día 21 en 0.05 μM se obtiene 49 fragmentos, 60 fragmentos para 0.125 μM y 10 fragmentos para 0.5 μM .

Cuadro 8.- IBA en *Agave angustifolias* muestra cada una de las concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μM) en el día 3 y día 21 en comparación con el control con cada uno de los eventos de metilación y el total de fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.

<i>Agave angustifolia</i>										
Sitio de metilación	Patrón de fragmentos			IBA Día 3			IBA Día 21			Total de Fragmentos
	Mspl	Hpal	Control	0.05 μM	0.125 μM	0.5 μM	0.05 μM	0.125 μM	0.5 μM	
<i>No metilado (NM)</i>										
Tipo 1	-	-	23	14	16	6	23	23	6	412
<i>Met. completa (MC)</i>										
Tipo 2	+	-	13	36	26	73	49	79	74	412
<i>Hemimetilado (HM)</i>										
Tipo 3	-	+	28	17	23	17	49	60	10	412
<i>Hipermetilado (HP)</i>										
Tipo 4	+	+	149	345	347	316	291	250	322	412

Para AIA (tabla 5) el número total de fragmentos obtenidos fue de 412 de ese total de fragmentos se generaron para el tipo de metilación 1 no metilado (NM) en el testigo 23 para el día 3 en una concentración de 0.05 μM se obtienen 25 fragmentos, 38 fragmentos para 0.125 μM , 10 fragmentos para 0.5 μM en el día 21 fueron 6 fragmentos para 0.05 μM , 54 fragmentos para 0.125 μM , 31 fragmentos para 0.5 μM , en el tipo 2 metilación completa (MC) en el testigo se obtienen 13 fragmentos en el día 3 en 0.05 μM se obtienen 40 fragmentos, 35 fragmentos para 0.125 μM , 81 fragmentos para 0.5 μM , para el día 21 se obtienen 53 fragmentos para 0.05 μM , 17 fragmentos para 0.125 μM , 81 fragmentos para 0.5 μM , en este sitio de metilación podemos observar que todos se encuentran aumentados con respecto al testigo y que para 0.5 μM se aumenta el número de fragmentos obtenidos pero del día 3 al 21 se mantiene, para el tipo 3 hemimetilado (HM) se obtiene 28 fragmentos para el testigo, 45 fragmentos para 0.05 μM , 65 fragmentos para 0.125 μM , 6 fragmentos para 0.5 μM , en el día 21 se obtienen 26 fragmentos para 0.05 μM , 46 fragmentos para 0.125 μM y 55 fragmentos para 0.5 μM .

Cuadro 9.-AIA en *Agave angustifolia* muestra cada una de las concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μM) en el día 3 y día 21 en comparación con el control con cada uno de los eventos de metilación y el total de fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.

Agave angustifolia

Sitio de metilación	Patrón de fragmentos		AIA Día 3			AIA Día 21			Total de Fragmentos	
	Mspi	Hpal	Control	0.05 μM	0.125 μM	0.5 μM	0.05 μM	0.125 μM		0.5 μM
No metilado (NM)										
Tipo 1	-	-	23	25	38	10	6	54	31	412
Met. completa (MC)										
Tipo 2	+	-	13	40	35	81	53	17	81	412
Hemimetilado (HM)										
Tipo 3	-	+	28	45	65	6	26	46	55	412
Hipermetilado (HP)										
Tipo 4	+	+	149	302	274	315	327	295	245	412

Para ANA (tabla 7) de un número total de 412 fragmentos obtenidos para el tipo 1 o sitios no metilados observamos que para el testigo se obtienen 23 fragmentos, en el día 3 se generaron 19 fragmentos para 0.05 μM , 11 fragmentos para 0.125 μM , 25 fragmentos para 0.5 μM , en el día 21 se obtiene 39 fragmentos para 0.05 μM , 54 fragmentos para 0.125 μM , 31 fragmentos para 0.5 μM , para el tipo 2 metilación completa (MC) para el testigo se obtiene 13 fragmentos para el día 3 se obtienen 41 fragmentos para 0.05 μM , 24 y 19 fragmentos para 0.125 μM y 0.5 μM en el día 21 se obtienen 49 y 17 fragmentos para 0.05 μM y 0.125 μM y 81 fragmentos para 0.5 μM , en el tipo 3 hemimetilado (HM) en el testigo se obtienen 28 fragmentos para el día 3 en 0.05 μM se obtienen 57 fragmentos, 40 fragmentos para 0.125 μM , 56 fragmentos para 0.5 μM , para un día 21 se obtienen 52 fragmentos para 0.05 μM , 46 fragmentos para 0.124 μM , 55 fragmentos para 0.5 μM .

Cuadro 10.- ANA en *Agave angustifolia* muestra cada una de las concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μM) en el día 3 y día 21 en comparación con el control con cada uno de los eventos de metilación y el total de fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.

Agave angustifolia

Sitio de metilación	Patrón de fragmentos			ANA Día 3			ANA Día21			Total de Fragmentos
	MspI	HpaII	Control	0.05	0.125	0.5	0.05	0.125	0.5	
				μM	μM	μM	μM	μM	μM	
<i>No metilado (NM)</i>										
Tipo 1	-	-	23	19	11	25	35	54	31	412
<i>Metilación completa (MC)</i>										
Tipo 2	+	-	13	41	25	19	49	17	81	412
<i>Hemimetilado (HM)</i>										
Tipo 3	-	+	28	57	40	56	52	46	55	412
<i>Hipermetilado (HP)</i>										
Tipo 4	+	+	149	295	336	312	276	295	245	412

Para 2,4-D (tabla 4) se observa que el número total de fragmentos obtenidos fue de 412 fragmentos de las cuales los sitios no metilados para el testigo fue de 23 en un día 3 en 0.05 μM se obtuvieron 27 fragmentos, 5 y 40 fragmentos para 0.125 y 0.5 μM respectivamente, para el día 21 se obtuvieron 37, 25 y 31 fragmentos obtenidos para 0.05, 0.125 y 0.5 μM respectivamente, para el tipo 2 metilación completa para el testigo se obtienen 28 fragmentos, en un día 3 para 0.05 se obtienen 24 fragmentos, 11 y 41 fragmentos para 0.125 y 0.5 μM , en un día 21 se obtienen 63, 27 y 24 fragmentos para 0.05, 0.125 y 0.5 μM por lo que se puede observar que para la mayoría de las concentraciones aumenta en número de fragmentos generados en mayor o menor proporción en comparación con el testigo, para el tipo 3 hemimetiladas (HM) se obtienen para el testigo un número 28 fragmentos para el día 3 en una concentración de 0.05 μM se obtienen 31 fragmentos, se obtienen 59 y 43 fragmentos para 0.125 y 0.5 μM para un día 21 se obtienen 75, 43 y 14 fragmentos para 0.05, 0.125 y 0.5 μM respectivamente para los sitios hemimetilados (HM) se observa que en la mayoría de los casos en comparación con el control el número de fragmentos generados aumento con excepción de 0.5 μM .

Cuadro 11.- 2,4-D en *Agave angustifolia* muestra cada una de las concentraciones (0.05, 0.125, 0.5 μ M) en el día 3 y día 21 en comparación con el control con cada uno de los eventos de metilación y el total de fragmentos obtenidos, la tabla se creó a partir de los fragmentos obtenidos.

Agave angustifolia

Sitio de metilación	Patrón de fragmentos			2,4-D Día 3			2,4-D Día 21			Total de Fragmentos
	MspI	HpaII	Control	0.05 μ M	0.125 μ M	0.5 μ M	0.05 μ M	0.125 μ M	0.5 μ M	
No metilado (NM)										
Tipo 1	-	-	23	27	5	40	36	25	31	412
Metilación completa (MC)										
Tipo 2	+	-	13	24	11	41	63	27	24	412
Hemimetilado (HM)										
Tipo 3	-	+	28	31	59	43	75	43	14	412
Hipermetilado (HP)										
Tipo 4	+	+	149	330	337	288	238	318	344	412

Cuando se analiza la distribución y se realiza el porcentaje de metilación por concentración como se observa en la gráfica 4.5, 4.6 y 4.7, logramos observar que de igual manera los cambios en cada uno de los tratamientos es variable cambia en cada concentración, concentración y curso temporal lo que podemos decir al respecto que puede haber una gran actividad en las islas de metilación.

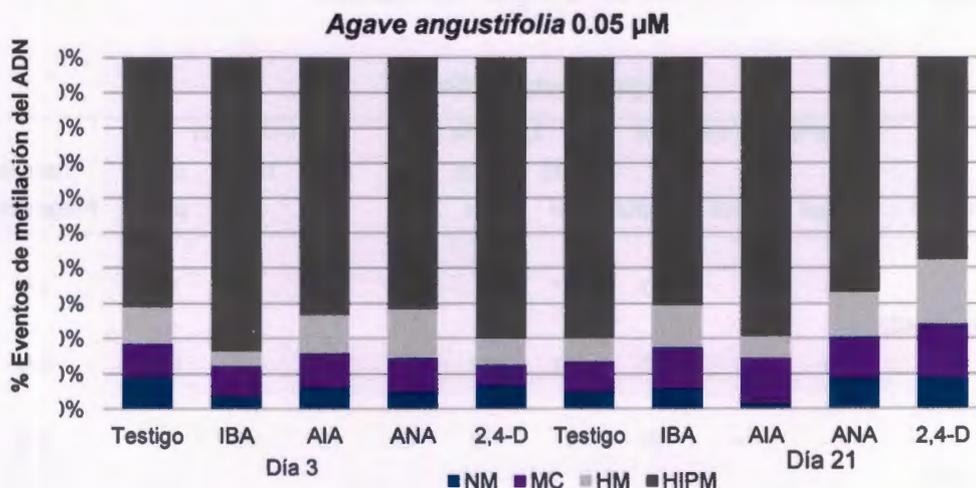


Figura 4.5.- Eventos de metilación del ADN en *Agave angustifolia* una concentración de 0.05 μ M con cada uno de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D) en el día 3 y 21 el color azul corresponde a los sitios no metilados (NM – Tipo 1), el color morado a sitios de metilación completa (MC-Tipo 2), el color gris a los sitios de hemimetilados (HM- Tipo 3), y el color gris oscuro a los sitios hipermetilados (HIPM- Tipo 4).

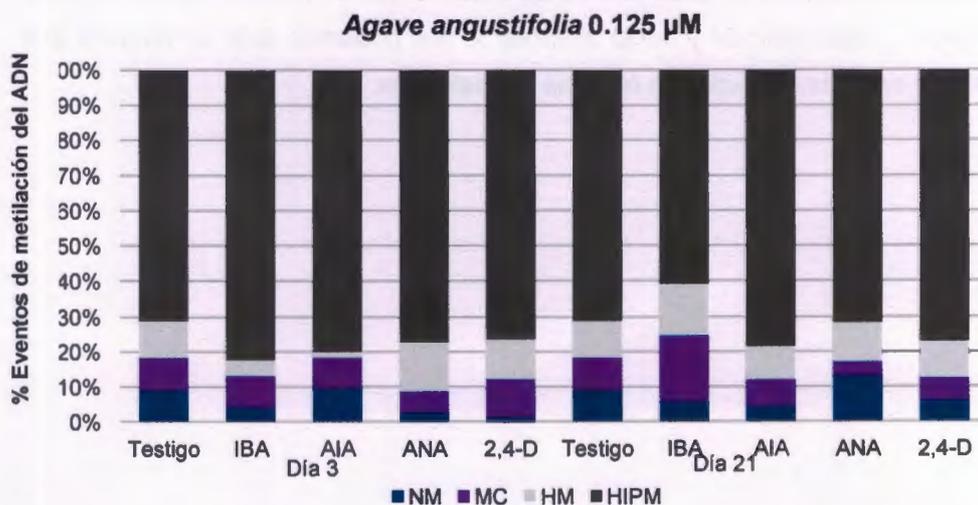


Figura 4.6.- Eventos de metilación del ADN en *Agave angustifolia* a una concentración de 0.125 μ M con cada uno de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D) en el día 3 y 21 el color azul corresponde a los sitios no metilados (NM – Tipo 1), el color morado a sitios de metilación completa (MC-Tipo 2), el color gris a los sitios de hemimetilados (HM- Tipo 3), y el color gris oscuro a los sitios hipermetilados (HIPM- Tipo 4).

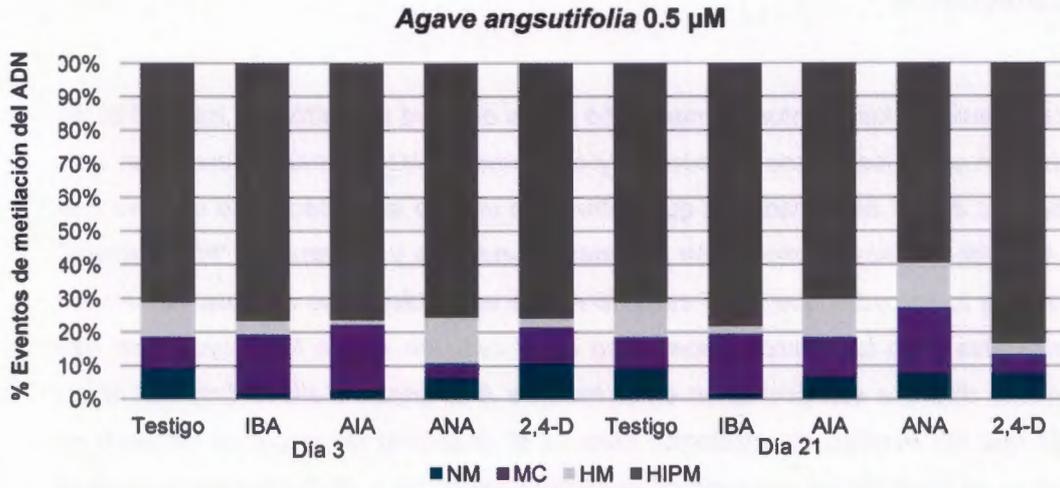


Figura 4.7.- Eventos de metilación del ADN en *Agave angustifolia* a una concentración de 0.5 μ M con cada uno de las auxinas utilizadas (IBA, AIA, ANA y 2,4-D) en el día 3 y 21 el color azul corresponde a los sitios no metilados (NM – Tipo 1), el color morado a sitios de metilación completa (MC-Tipo 2), el color gris a los sitios de hemimetilados (HM- Tipo 3), y el color gris obscuro a los sitios hipermetilados (HIPM- Tipo 4).

4.5. DISCUSIÓN.

Para el caso de los eventos de metilación no se observa un patrón en los perfiles de metilación entre los cursos temporales y cada una de las auxinas utilizadas en este trabajo, lo que sí es evidente es que entre cada una de las especies se observa que los tipos de eventos de metilación son más abundantes y ligeramente "homogéneos" en *Agave fourcroydes* que en el caso de *Agave angustifolia* que se observan menos abundantes y no tan homogéneos como en el caso de *Agave fourcroydes*, se han realizado diversos estudios como en el caso de *Arabidopsis thaliana* Smy Kal et al., 2007 que los eventos de metilación durante el desarrollo de la planta tampoco se observa un perfil en los patrones de metilación, en el caso otros estudios durante el proceso de organogénesis vía directa tenemos el caso de manzanal in vitro (Xiangqian et al., 2004), *Rosa Hybrida L.*(Minliang et al., 2004), *Clivia miniata* (lirio amarillo) (Qin-Mei et al., 2012) en donde tampoco se observa un patrón en los eventos de metilación pero sin embargo estos cambios en los eventos de metilación si son atribuidos al uso de 2,4-D adicionada al medio para la propagación de dichas especies, otro caso de no encontrar una un perfil en los eventos de metilación tenemos durante el proceso in vitro de palma aceitera en donde también se observa una hipometilación que es relacionada con la variación somaclonal que presenta esta planta durante este proceso.

4.6. CONCLUSIÓN.

- ❖ No se observó un patrón en los eventos de metilación pero se logró observar que los cambios en los eventos de metilación son más activos con el uso de 2,4-D tanto para *Agave fourcooydes* como *Agave angustifolia*.
- ❖ Los eventos de metilación fueron más abundantes en *Agave fourcroydes* que en *Agave angustifolia* donde probablemente sea por el número de fragmentos obtenidos en cada línea ya que los fragmentos totales de *Agave fourcroydes* fue de 213 y para *Agave angustifolia* fueron 412.

4.7. REFERENCIAS.

- Jaligot E., A. Rival y T. Belué, (2000a), *Somaclonal variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq) the DNA methylation hypothesis, Plant Cell Rep.*, 19: 684-690.
- Jaligot E., A. Rival, T. Beulé, S. Dussert y J. L. Verdeil, (2000b), *Somaclonal variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.): the DNA methylation hypothesis, Plant Cell Reports*, 19: 684-690.
- Jaligot E., T. Belué, F. C. Baurens, N. Billotte y A. Rival, (2004), *Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms (MSAP) associated with the "mantled" variant phenotype in oil (Elaeis guineensis Jacq.)*, *Genome*, 47: 224-228. .
- Kakutani T., M. Kato, T. Kinoshita y A. Miura, (2004), *Control of development and transposon movement by DNA methylation in Arabidopsis thaliana*, *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 69: 139-144.
- Mingliang X., L. Xiangqian y S. S. Korban, (2000), *AFLP-Based Detection of DNA methylation, Plant Molecular Biology reporter*, 18: 361-368,
- Minliang X., L. Xiangqian y S. Schuyler, (2004), *DNA methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (Rosa hybrida L.)*, *Thor Appl Genet.*, 109: 899-910.
- Qin-Mei W., W. Yu-Zhang, S. Li-Li, G. Feng-Zhan, S. Wei, H. Jing, G. Xiang y W. Li, (2012), *Direct and indirect organogenesis of Clivia miniata and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets*, *Plant Cell*, 31: 1283-1296.
- Smy Kal P., L. Valledor, R. Rodríguez y M. Griga, (2007), *Assessment of genetic and epigenetic stability in long - term in vitro shoot culture of pea (Pisum sativum)*, *Plant Cell Reports*, 1985-1998.
- Vos P., M. Bleeker, M. Reijans, T. Van de Lee, A. Frijters, J. Pot, J. Peleman y M. Kuiper, *AFLP: (1995). A new technique for DNA fingerprinting, Nucleic Acids*, 4407-4414,

Xiangqian L., X. Minliang y S. S. Korban, (2004), DNA methylation profiles differ between field and in vitro grown leaves of apple., J. Plant Physiology, 159: 1229-1234.

CAPÍTULO V

DISCUSION GENERAL.

Las plantas poseen alto grado de plasticidad la cual es una característica que está fuertemente influenciada por los factores bióticos y abióticos a los cuales están expuestas. Las plantas interaccionan con el medio ambiente que las rodea lo cual influye en su desarrollo debido a los estímulos que van a estar coordinados por la organización de la cromatina (Reyes - Rosa y Gruissem, 2002). Debido a una pronta respuesta ante esos estímulos, la planta modifica la expresión de sus genes mediante la metilación del ADN (Finnegan et al., 1996).

La metilación en las plantas se realiza de manera simétrica (CG, CHG) y asimétrica (CHH) y los dos fungen como mecanismos de control en la regulación. Sin embargo, cuando las metilaciones se realizan de manera simétrica en las islas CG y CHG, éstas pueden ser transmitidas durante los ciclos de replicación del ADN; y las metilaciones asimétricas muy raramente se conservan si los factores externos a la que fue sometida no perduran (Brid y Southern, 1978) pero son de igual manera cruciales para se pueda realizar una pronta respuesta en la expresión genética.

*La metilación del ADN tiene un papel esencial durante el desarrollo en donde se muestra la evidencia por varios autores que una disminución en la metilación del ADN o utilizando mutantes en *Arabidopsis thaliana* que reducen de manera considerable la metilación, se encuentran efectos pleiotrópicos en la morfología de la planta, transformaciones homeóticas en los órganos florales y alteraciones en el tiempo de floración (Burn et al., 1993);(Vongs et al., 1993);(Kakutani et al., 1995);(Finnegan et al., 1996; Ronemus et al., 1999). También en el desarrollo de las semillas, la metilación puede estar actuando como un control en el mecanismo de regulación en la expresión diferencial de genes maternos y paternos (Chaudhuri y Messing, 1994; Kermicle, 1978). La metilación también es importante durante el proceso de vernalización ya que se ha observado que éste proceso está mediado por una desmetilación en regiones promotoras en los genes que están involucrados en la floración (Burn et al., 1993).*

La metilación no sólo se ha visto en procesos normales de desarrollo, también se ha visto sus efectos en cultivos in vitro. Por ejemplo, en cultivos celulares de tabaco a

bajas temperaturas (Finnegan et al., 1998), provoca una regulación desmedida de elementos móviles, los cuales son frecuentemente silenciados por medio de metilación (Kakutani et al., 2004), y la activación de los mismos no siempre ocasiona un efecto negativo en la planta pues durante el proceso de división celular y en la gametogénesis los elementos móviles tienen información necesaria de la heredabilidad de sus parietales (Tanurdzic et al., 2008).

Dentro del cultivo *in vitro* ocurren una serie de eventos importantes y uno de ellos es el proceso de división celular para que se pueda generar tejido des-diferenciado. El uso de auxinas en el medio de cultivo permite favorecer la división celular, pero a su vez se les ha relacionado directamente con los cambios en la metilación global del ADN y en los eventos de metilación. Por ejemplo, los cambios en los eventos de metilación observados en diferentes cultivos *in vitro* como los manzana (Xiangqian et al., 2004) y Rosa Hybrida L. (Minliang et al., 2004). Por otro lado, Müller et al. 1990 (Brown et al., 1989; Brown et al., 1990; Brown et al., 1993; Müller et al., 1990) encontraron cambios en los perfiles de metilación que ocurrían con alta frecuencia en plantas de maíz regeneradas *in vitro*. Keappler y Philips (Keappler y Philips, 1993) realizando un estudio en cultivo *in vitro* de maíz observó que mantenían algunas metilaciones por varias generaciones, cambios en la metilación del ADN y ciertos patrones de metilación podían ser heredables.

Recientemente se le relacionó a los cambios en la metilación del ADN con el proceso de organogénesis tanto directa como indirecta de *Clivia miniata* (lirio amarillo) (Qin-Mei et al., 2012) en donde hacen mención que la variación somaclonal en una planta *in vitro* se puede generar por varios motivos: (a) por el tipo de explante inicial para la propagación, (b) por la fase del callo, (c) por el proceso de regeneración de la planta, (d) y por la acumulación de errores en la regulación genética en el tiempo. También varios autores (Benzion et al., 1984; Jaligot et al., 2000b; Kour et al., 2009; Smy Kal et al., 2007; Yang et al., 2007) proponen que los cambios en los eventos de metilación se relacionan con la naturaleza de donde obtienen el tejido para la propagación ya que si lo toman directamente de las plantas derivadas del meristemo obtienen menos variación en los eventos de metilación en comparación con los evaluados en los tejidos directamente obtenidos de callo donde se encuentran mayor número de alteraciones.

En *A. tequilana* se ha estudiado la implicación que tiene la expresión de transposones con los cambios genéticos y epigenéticos en plantas propagadas y se encontró que la relación entre la variabilidad genética y los patrones de metilación podrían favorecer la

activación de transposones (Díaz-Martínez et al., 2012). Dentro de la evidencia que se han documentado sobre el cultivo *in vitro*, las auxinas y los cambios en la metilación se puede sugerir que en las dos especies que se trabajó en esta tesis *A. fourcroydes* y *A. angustifolia* en condiciones a las que normalmente son propagadas, los niveles en la metilación global disminuían y aumentaban respectivamente debido a la concentración y tipo de auxinas. La disminución en la metilación del ADN por cuantificación de HPLC se han relacionada con el uso de las auxinas dentro del proceso de cultivo de tejidos, como fue en el caso de la hipometilación encontrada en palma aceitera por Jaligot et al 2000 (Jaligot et al., 2000a) el efecto de la disminución significativa en la metilación global del ADN observaron variación en el fenotipo, en el caso de *Agave fourcroydes* encontramos una disminución en la metilación dentro del curso temporal de 3 y 21 días aunque la disminución entre los tratamientos y concentraciones no fue de manera significativa para el caso de 2,4-D si se observa que en una concentración de 0.5 μM disminuye significativamente la metilación del ADN en donde esa reducción de la metilación global en diferentes cursos temporales también se observó en *Acca sellowiana* (Fraga et al 2008) durante el proceso de embriogénesis somática de esta planta en cada uno de los estadios disminuye la metilación en los cursos temporales de 10, 30 y 45 ellos sugieren que esta reducción en la metilación del ADN se puede relacionar con el uso de 2,4-D en el proceso de embriogénesis, pero también puede ser que esa disminución observada también se pueda atribuir a que se involucran también procesos de formación de tejidos lo cual también origina disminución en la metilación global (Valledor et al., 2010), en el diseño experimental que se desarrolló en esta investigación nos ayuda a descartar al hecho de que la reducción en la metilación global se deba a algún proceso tanto de desarrollo como de formación de tejidos debido a que se utilizó plantas de *Agave spp* en ausencia de auxinas en sus dos cursos temporales (3 y 21 días) y estos presentan una metilación global más alta que la cuantificada en 2,4-D en una concentración de 0.5 μM , por lo que se puede sugerir que la disminución en la metilación global del ADN si es una respuesta al uso de este regulador dentro del cultivo *in vitro* de *Agave fourcroydes*.

Muy probablemente puede ser que la disminución en los niveles de metilación puede estar ejerciendo un control sobre la regulación en el proceso de división celular, desarrollo de la planta y un control en los procesos de activación de genes implicados en el transporte de auxinas. Por otro lado los niveles en los eventos de metilación se observaron una disminución en un 50% de los sitios metilación completa (CG) y hemimetilados (CHG) y una ganancia de sitios no metilados lo cual se relaciona con los niveles bajos de metilación global. La metilación en los sitios CHG son llevadas a

cabo por la familia metiltransferasas CMT (CROMOMETHYLASES) cuando están presentes estas metiltransferasas indican la metilación en regiones heterocromáticas (Paro y Harte, 1996). En Maíz se llevó a cabo una inserción en el gen ZmMET2, que es un gen que codifica a la familia metiltransferasa CMT, y se determinó que esta mutación provocaba la reducción de la metilación en regiones centroméricas, ribosomales y en secuencias repetidas (Finnegan et al., 1996; Finnegan et al., 2000; Finnegan y Kovac, 2000). Por otro lado, las metiltransferasas MET1 son las responsables de metilar islas CG y se relacionan con el mantenimiento del sitio metilado (Pradhan et al., 1998) y con el mantenimiento de metilaciones en secuencias repetidas (Finnegan y Dennis, 1993), por lo que se puede sugerir que el silenciamiento de regiones repetidas pueda ser un mecanismo de respuesta para que se pueda ejercer un control sobre su regulación ya que si estas regiones, en particular transposones, se activarían generarían variabilidad genética tal y como se observó en *A. tequilana* (Díaz-Martínez et al., 2012).

En los resultados de *A. angustifolia* se observó que para el caso de ANA, los sitios de metilación completa en las islas CG aumentaron en un 8% y como ya se comentó éstas islas generalmente son metiladas por la MET1 que está involucrada en el mantenimiento de los sitios metilados en plantas.

Se conoce que en *A. tequilana*, las disminuciones en los niveles de metilación están relacionados con la activación de transposones (Díaz-Martínez et al., 2012) por lo que en otras especies de *Agave*, como las estudiadas en este trabajo, puede estar pasando lo mismo con la adición de 2,4-D.

El aumento de la metilación global cuantificado por HPLC ha sido elucidado por LoShiavo et al 1989 (LoShiavo et al., 1989) donde el relaciona el aumento de la metilación del ADN donde observa un comportamiento dosis dependiente aumenta la concentración de 2,4-D aumenta la metilación global, la evaluación también se realizó con otras auxinas utilizadas en cultivo de tejidos como ANA y AIA, mencionando que no tuvo cambios significativos en la metilación global del ADN en las diferentes concentraciones que utilizó, lo cual este experimento realizado por Lo Shiavo coincide con lo que se observa en *Agave angustifolia* cuando se encuentra la planta en con 2,4-D en sus diferentes concentraciones aumenta significativamente la metilación global, en relación a las demás auxinas utilizadas se observa aumento en la metilación global en ANA desde la primera concentración utilizada para AIA a partir de la 2 concentración utilizada, lo cual no coincide con lo observado en zanahoria por Lo

*Shiavo, a su vez hubo cambios en la metilación del ADN durante en AIA y 2,4-D en una concentración de 0.5 μ M en un día 3 se encuentra reducida de manera significativa la metilación y en un día 21 aumentada la metilación global de manera significativa, los cambios en la metilación global en función con las auxinas si pueden llegar a generar el cambio en la morfología en la planta como puede ser para el caso de *Doritaenopsis* (Park et al., 2009), *bananna* (Peraza-Echeverria et al., 2001), *palma aceitera* (Jaligot et al., 2004), pero en el caso de *Agave angustifolia* los cambios no son observables lo cual concuerda con lo postula Keappler et al 1998 (Keappler et al., 2000; Keappler y Phillips, 1993) donde sugiere que los cambios en la metilación del ADN se pueden generar en respuesta algún estrés pero no se asegura que estos cambios sean heredados a la siguiente generación y es menos probable que se herede si la condición a la que fue expuesta desaparece.*

*Debido al análisis de los resultados y la literatura reportada en la presente tesis se proponer el siguiente modelo de lo que pudiera estar pasando en el cultivo de *A. angustifolia* y *A. fourcroydes* en condiciones in vitro sometidas a diferentes tipos y concentraciones de auxinas.*

REFERENCIAS

- Benzion G., R. L. Phillips y H. W. Rines, (1984), Case histories of genetic variability in vitro: oats and maize, en: Cell culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 3. Plant regeneration and genetic variability, (Vasil I. K., ed.), Academic Press, Inc., Orlando, 435-448. .*
- Brid A. P. y E. M. Southern, (1978), Use of restriction enzymes to study eukaryotic DNA: The methylation pattern in ribosomal DNA from *Xenopus laevis*. J. Mol. Biol., 118: 49-60. .*
- Brown P. T. H., J. Kyojuka, Y. Sukekiyo, Y. Kimura, K. Shimamoto y H. Lörz, Molecular changes in protoplast-derived rice plants, Mol. Gen. Genet., 223: 324-328, (1990).*
- Brown P. T. H., F. D. Lange, E. Kranz y H. Lörz, (1993), Analysis of single protoplasts and regenerated plants by PCR and RAPD technology, Mol. Gen. Genet., 237: 311-317. .*

- Brown P. T. H., K. Yoneyama y H. Lörz, (1989), *An investigation into the role of 5-azacytidine in tissue culture*, *Theor. Appl. Genet.*, 78: 321-328. .
- Burn J. E., D. J. Bagnall, J. D. Metzger, E. S. Dennis y W. J. Peacock, (1993), *DNA methylation, vernalization, and the initiation of flowering*, *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 90: 287-291. .
- Chaudhuri S. y J. Messing, (1994), *Allele-specific parental imprinting of *dzr1* a posttranscriptional regulator of zein accumulation*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 91: 4867-4871. .
- Díaz-Martínez M., A. Nava-Cedillo, J. A. Guzmán-López, R. Escobar-Guzmán y J. Simpson, (2012), *Polymorphism and methylation patterns in *Agave tequilana* Weber var. "Azul" plants propagated asexually by three different methods*, *Plant Science*, 185-186: 321-330. .
- Finnegan E. J., R. K. Genger, K. Kovac, W. J. Peacock y E. S. Dennis, (1998), *DNA methylation and the promotion of flowering by vernalization*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 95: 5824-5829. .
- Finnegan E. J. y K. A. Kovac, (2000), *Plant DNA methylation*, *Plant Molecular Biology*, 43: 189-201.,.
- Finnegan E. J., W. J. Peacock y E. S. Dennis, (1996), *Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 278: 4035-4040.,.
- Finnegan E. J., W. J. Peacock y E. S. Dennis, (2000), *DNA methylation a key regulator of plant development and other processes*, *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 10: 217-223..
- Finnegan E. J. y E. S. Dennis, (1993), *Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana**, *Nucleic Acids*, 21: 2388. .
- Jaligot E., T. Belu , F. C. Baurens, N. Billotte y A. Rival, (2004), *Search for methylation-sensitive amplification polymorphisms (MSAP) associated with the "mantled" variant phenotype in oil (*Elaeis guineensis* Jacq.)*, *Genome*, 47: 224-228. .

- Jaligot E., A. Rival y T. Belué, (2000a), *Somaclonal variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq) the DNA methylation hypothesis, Plant Cell Rep.*, 19: 684-690.
- Jaligot E., A. Rival, T. Beulé, S. Dussert y J. L. Verdeil, (2000b), *Somaclonal variation in oil palm (Elaeis guineensis Jacq.): the DNA methylation hypothesis, Plant Cell Reports*, 19: 684-690. .
- Keappler S. M. y S. L. Philips, (1993), *Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize, Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 8773-8776. .
- Kakutani T., J. Jeddloh y E. J. Richards, (1995), *Characterization of an Arabidopsis thaliana DNA hypomethylation mutant, Nucleic Acids*, 23: 130-137. .
- Kakutani T., M. Kato, T. Kinoshita y A. Miura, (2004), *Control of development and transposon movement by DNA methylation in Arabidopsis thaliana, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.*, 69: 139-144. .
- Keappler S. M., H. F. Keappler y Y. Rhee, (2000), *Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants, Plant Molecular Biology*, 43: 179-188. .
- Keappler S. M. y R. L. Phillips, (1993), *Tissue culture- induced DNA methylation variation in maize, Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90: 8773-8776. .
- Kermicle J. L., (1978), *Imprinting of gene action in maize endosperm, In maize breeding and genetics*, 357-371. .
- Kour G., B. Kour, S. Kaul y M. Dhar, (2009), *Genetic and epigenetic instability of amplification-prone sequences of a novel B chromosome induced by tissue culture in Plantago lagopus L, Plant Cell Rep.*, 28: 1857-1867. .
- LoShiavo F., L. Pitto, G. Giuliano, G. Torti, V. Nuti-Ronchi, D. Marazziti, R. Vergara, S. Orselli y M. Terzi, (1989), *DNA methylation of embryogenic carrot cell cultures and its variations as caused by mutation, differentiation, hormones and hypomethylation drugs, Thor Appl Genet.*, 77: 325-331. .
- Minliang X., L. Xiangqian y S. Schuyler, (2004), *DNA methylation alterations and exchanges during in vitro cellular differentiation in rose (Rosa hybrida L.), Thor Appl Genet.*, 109: 899-910. .
- Müller E., P. T. H. Brown, S. Hartke y H. Lörz, (1990), *DNA variation in tissue-culture-derived rice plants, Theor. Appl. Genet.*, 80: 673-679. .

- Park S. Y., H. N. Murthy, D. Chakrabarthy y K. Y. Paek, (2009), *Detection of epigenetic variation in tissue- culture-derived plants of Doritaenopsis by methylation-sensitive amplification polymorphism (MSAP) analysis*, *In Vitro Cell Dev. Biol.*, 45: 104-108..
- Paro R. y P.J.Harte, (1996), *The role of polycomb group and trithorax group chromatin complexes in the maintenance of determinated cell states*, N.Y., pp 507-528..
- Peraza-Echeverria S., V. Herrera-Valencia y A. James-Kay, (2001), *Detection of DNA methylation changes in micropropagates banana plants using methylation.sensitive amplification polymorphism (MSAP)*, *Plant Science*, 161: 359-367..
- Pradhan S., M. Cummings, R. J. Roberts y R. L. P. Adams, (1998), *Isolation, characterization and baculovirus - mediated expression of the cDNA encoding cytosine DNA methyltransferase from Pisum sativum* , *Nucleic Acids*, 1214-1222. .
- Qin-Mei W., W. Yu-Zhang, S. Li-Li, G. Feng-Zhan, S. Wei, H. Jing, G. Xiang y W. Li, (2012), *Direct and indirect organogenesis of Clivia miniata and assessment of DNA methylation changes in various regenerated plantlets*, *Plant Cell*, 31: 1283-1296. .
- Reyes - Rosa J. C. y H. W. Gruissem, *Chromatin remodeling and memory factor regulators of plant development plant*, *Plnat Physiol.*, 3: 1090-1010, (2002).
- Ronemus M. J., M. Galbiati, C. Ticknor, J. Chen y S. L. Dellaporta, (1999), *Demethylation- induced development pleiotropy in Arabidopsis*, *Nat Genet*, 22: 94-97. .
- Smy Kal P., L. Valledor, R. Rodríguez y M. Griga, (2007), *Assessment of genetic and epigenetic stability in long - term in vitro shoot culture of pea (Pisum sativum)*, *Plant Cell Reports*, 1985-1998. .
- Tanurdzic M., M. W. Vaughn, H. Jiang, T. J. Lee, R. K. Slotkin, B. Sosinski, W. F. Thompson, R. W. Doerge y R. A. Martienssen, (2008), *Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture*, *Plos Biol.*, 6: e302.

Valledor L., M. Meijón, R. Hasbún, M. J. Cañal y R. Rodríguez, (2010), *Variations in DNA methylation, acetylated histone H4, and methylated histone H3 during Pinus radiata needle maturation in relation to the loss of in vitro organogenic capability*, *Journal of Plant Physiology*, 167: 351-357. .

Vongs A., T. Kakutani, R. Martienssen y J. Richards, (1993), *Arabidopsis thaliana DNA methylation deficient mutant*, *Science*, 260: 1926-1928. .

Xiangqian L., X. Minliang y S. S. Korban, (2004), *DNA methylation profiles differ between field and in vitro grown leaves of apple.*, *J. Plant Physiology*, 159: 1229-1234. .

Yang X., X. Guo, X. Zhang, Y. Nie y S. Jin, (2007), *Plant regeneration from Gossypium davidsonii protoplasts via somatic embryogenesis*, *Biol. Plant.*, 51: 533-537.

CAPITULO VI.

CONCLUSIONES.

Los resultados de peso fresco y la altura tanto para A. fourcroydes y A. angustifolia fueron diferentes entre especies y respondieron también de diferente forma bajo los tratamientos.

Los cambios en los porcentajes globales y eventos de metilación fueron muy variables por lo que se puede decir que la metilación del ADN es una pronta respuesta en la planta micropropagada para adaptarse mejor los diferentes tratamientos.

A. fourcroydes tuvo una mejor adaptación ya que en todos los tratamientos con auxinas los niveles de metilación se mantuvieron relativamente bajos. Esta disminución en los niveles de metilación puede estar relacionada con la expresión de genes relacionados a la señalización de auxinas. En el caso de A. angustifolia se observó un efecto totalmente contrario al de A. fourcroydes, es decir A. angustifolia tenía mayores niveles de metilación lo que indica una regulación diferente a la encontrada en la otra especie.

PERSPECTIVAS

- ✓ *Micropropagar plantas de Agave angustifolia una concentración alta (0.5 μ M) por varios ciclos de resiembra haciendo una toma de muestra por ciclo para ver de qué manera cambia la metilación por cada ciclo y si se presenta una variante derivada del proceso de micropragación realizarle estudios de variabilidad genética AFLP's para saber el origen de esa variación que sea por cambios genéticos o epigenéticos.*

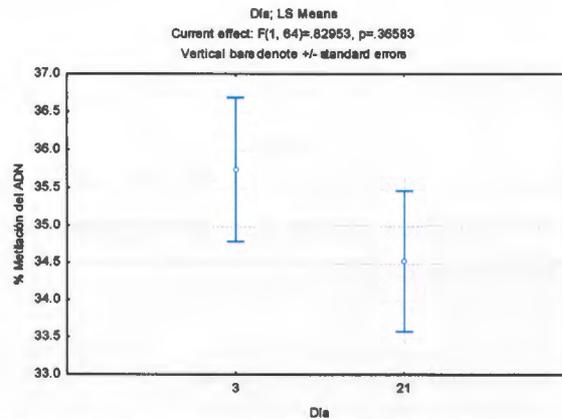
- ✓ *Analizar la señalización de auxinas en las dos especies de Agave. Esto puede ser mediante el estudio de los transportadores de auxinas como PIN y también con el análisis de los factores de transcripción involucrados en la regulación de las auxinas.*

- ✓ *Aislar los eventos únicos de metilación por medio de geles de acrilamida y hacer la identificación de estas secuencias únicas mediante clonación y secuenciación para utilizarlos como posibles marcadores relacionados a una condición in vitro específica.*

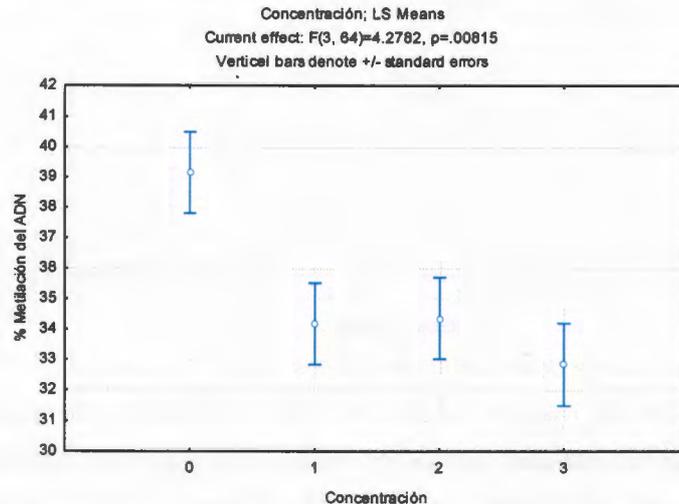
CAPITULO VII

ANEXOS

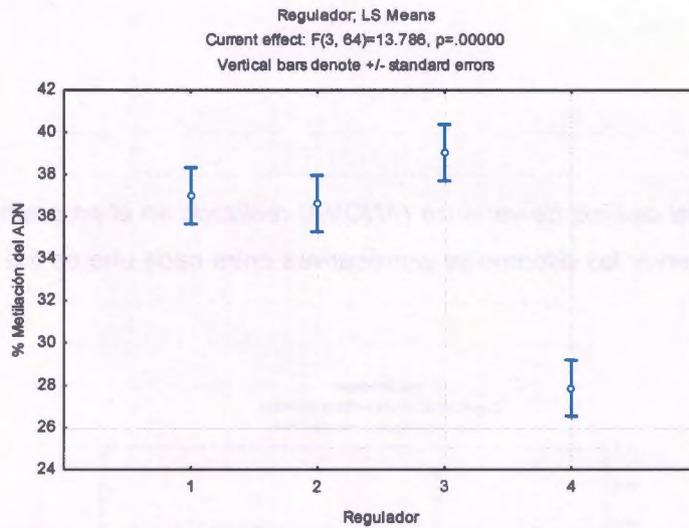
Figuras anexas del análisis de varianza (ANOVA) realizado en el programa Statistica 8 para poder observar las diferencias significativas entre cada uno de los parámetros evaluados.



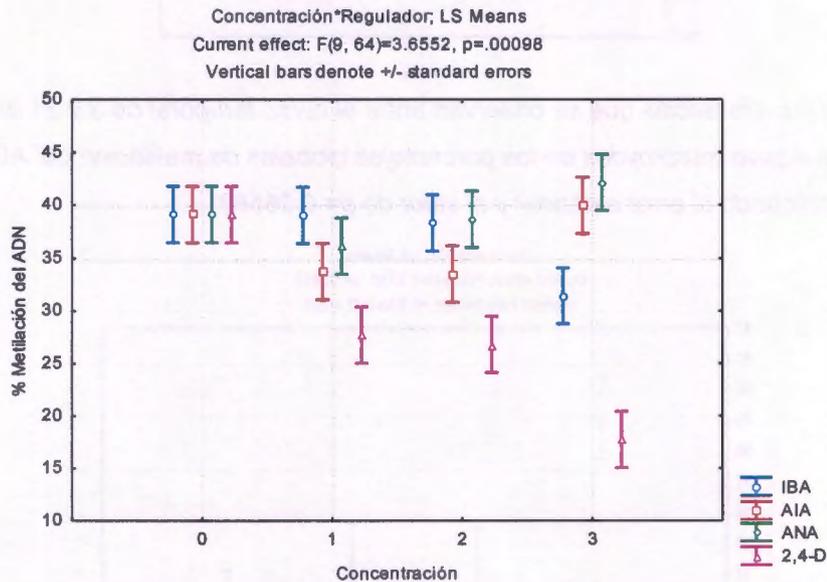
Representa las diferencias que se observan entre el curso temporal de 3 y 21 días (eje de las X) en *Agave fourcroydes* en los porcentajes globales de metilación del ADN (eje de las Y) graficando el error estándar y el valor de $p=0.36583$.



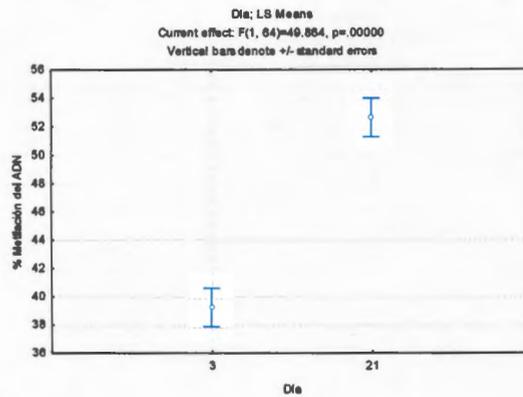
Diferencias observadas para cada una de las concentraciones donde 0 es el testigo, 1 es la concentración $0.05 \mu\text{M}$, 2 es la concentración $0.125 \mu\text{M}$, 3 es la concentración $0.5 \mu\text{M}$ (eje de las X) para *Agave fourcroydes* en relación a los porcentajes globales de metilación (eje de las Y) con un valor de $p=0.00815$.



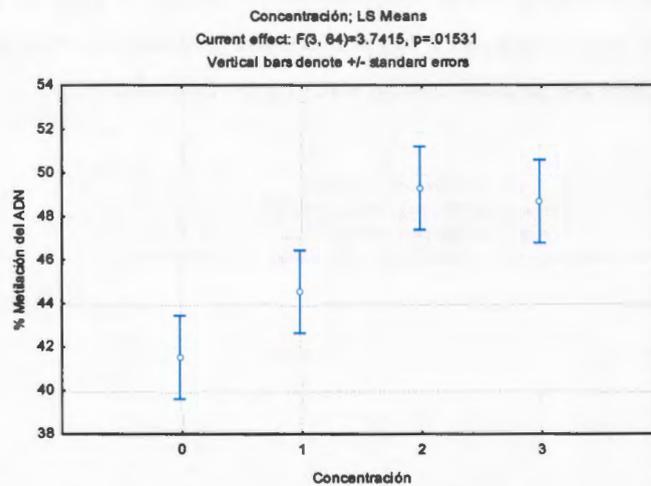
Diferencias entre las auxinas utilizadas donde 1 = IBA, 2 = AA, 3 = ANA y 4 = 2,4-D (eje de las X) en *Agave fourcroydes* con los porcentajes globales de metilación del ADN (eje de las Y) con un valor de $p > 0.05$.



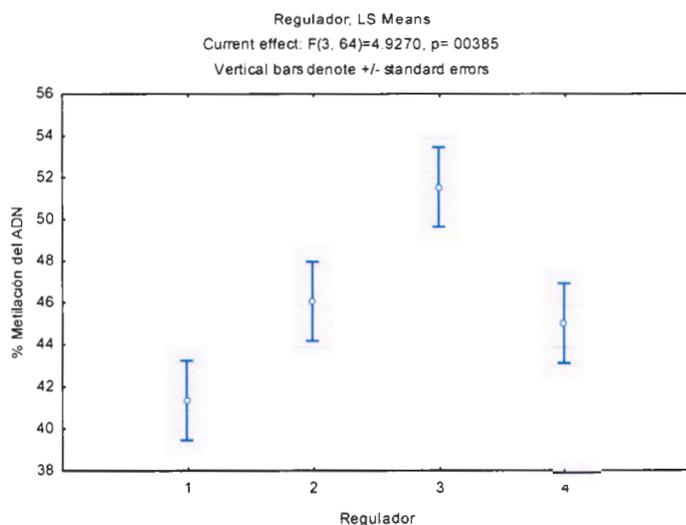
Diferencias entre cada una de las concentraciones donde 1 = Testigo, 2 = $0.05 \mu\text{M}$, 3 = $0.125 \mu\text{M}$, 4 = $0.05 \mu\text{M}$ (eje de las X), en *Agave fourcroydes* en donde en cada concentración se concentra cada una de las auxinas utilizadas representadas en cada uno de los colores azul (IBA), rojo (AIA), verde (ANA), rosa (2,4-D) en relación con sus porcentajes globales de metilación del ADN.



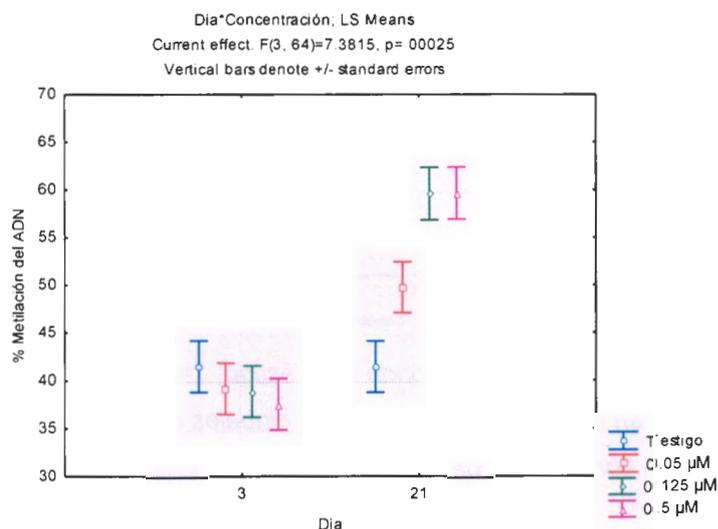
Diferencias entre los cursos temporales 3 y 21 (eje de las X) y los porcentajes globales de metilación (eje de las Y) con un valor mayor a en *Agave angustifolia* $p > 0.05$.



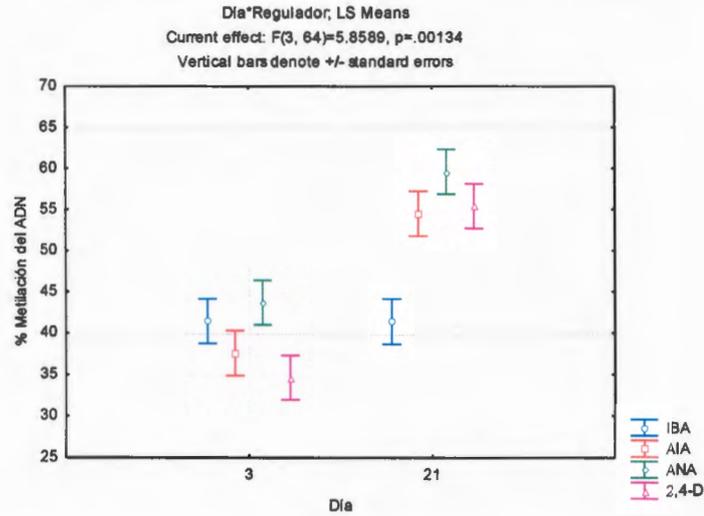
Diferencias entre las concentraciones donde 0 = Testigo, 1= $0.05 \mu\text{M}$, 2= $0.125 \mu\text{M}$, 3= $0.5 \mu\text{M}$ (eje de las X) en relación a los porcentajes globales de metilación (eje de las Y) en *Agave angustifolia* con un valor de $p=0.01531$.



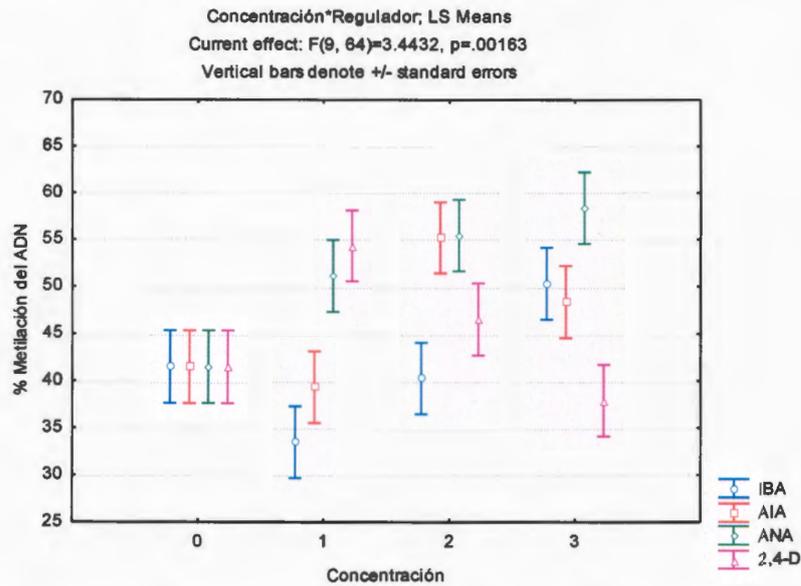
Diferencias entre cada una de las auxinas utilizadas donde 1= IBA, 2= AIA, 3= ANA, 4= 2,4-D (eje de las X) en relación a los porcentajes globales de metilación del ADN (eje de las Y) en *Agave angustifolia* con un valor de $p= 0.00385$.



Diferencias entre cada curso temporal día 3 y 21 (eje de las X) donde cada uno de los colores representa una concentración azul (testigo), rojo (0.05 µM), verde (0.125 µM), rosa (0.5 µM) En relación a los porcentajes globales de metilación del ADN (eje de las Y) en *Agave angustifolia* con un valor de $p= 0.00025$.



Diferencias entre el curso temporal día 3 y 21 (eje de las X) donde cada día está representado por cada auxina utilizada donde el color azul (IBA), rojo (AIA), verde (ANA), rosa (2,4-D), en relación a los porcentajes globales de metilación del ADN (eje de las Y) en *Agave angustifolia* con un valor de $p=0.00134$.



Diferencias entre la concentración donde 0=testigo, 1= 0.05 μM, 2= 0.125 μM, 3= 0.5 μM (eje de las X) donde en cada una concentración están cada una de las auxinas utilizadas azul (IBA), rojo (AIA), verde (ANA), rosa (2,4-D) en relación a los porcentajes de metilación global del ADN (eje de las Y) en *Agave angustifolia* con un valor de $p=0.00163$.

