



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

Cambios epigenéticos a nivel de metilación de ADN en  
secuencias repetidas durante la inducción y  
subcultivo de callos embriogénicos de maíz

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA**

**JOSÉ LUIS CONTRERAS GUERRA**



**MÉXICO, D.F.**

**2014**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profesor: Dr. Jorge Manuel Vázquez Ramos  
**VOCAL:** Profesor: Dr. J. Eleazar Martínez Barajas  
**SECRETARIO:** Profesor: Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova  
**1er. SUPLENTE:** Profesor: Dr. Francisco Javier Plasencia de la Parra  
**2° SUPLENTE:** Profesor: Dra. María Benita Leonor Fernández Salgado

**SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**LABORATORIO 103  
CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM**

**ASESOR DEL TEMA:**

---

DRA. TZVETANKA DIMITROVA DINKOVA

**SUSTENTANTE:**

---

JOSÉ LUIS CONTRERAS GUERRA

## ÍNDICE

1. Resumen	1
2. Introducción	2
3. Antecedentes	3
3.1. Embriogénesis somática	3
3.1.1. Cultivo de tejidos	4
3.1.2. Variación somaclonal	6
3.2. Metilación del DNA	9
3.2.1. Generalidades	9
3.2.2. Metiltransferasas de DNA	11
3.2.3. Remodelación de la arquitectura de la cromatina	11
3.2.4. Implicaciones de la metilación en el desarrollo y fenotipos	14
3.3. RNAs pequeños	15
3.3.1. Clases de RNAs pequeños	16
3.3.2. Biogénesis de siRNAs a partir de secuencias repetidas de DNA	16
3.3.3. Metilación de DNA dependiente de RNA (RdDM)	17
3.4. Secuencias repetidas y silenciamiento	20
3.4.1. Elementos transponibles (TEs)	21
3.4.1.1. Elementos de clase 1	22
3.4.1.2. Elementos de clase 2	24
3.5. Antecedentes directos	24
4. Justificación	28
5. Hipótesis	28
6. Objetivos	28
6.1. Objetivo general	28
6.2. Objetivos particulares	29
7. Materiales y métodos	29
7.1. Embriogénesis somática de maíz	29
7.1.1. Composición y preparación de los medios	29

7.1.2. Desinfección de maíz para inducción de callo embriogénico a partir de embrión inmaduro	30
7.1.3. Disección de los embriones e iniciación de los callos embriogénicos	31
7.1.4. Subcultivo y Proliferación en medio N6P	31
7.1.5. Embriones inmaduros de maíz	32
7.1.6. Callos embriogénicos de maíz	32
7.2. Extracción de DNA genómico vegetal	32
7.3. Determinación de patrones de corte de DNA sensibles a metilación (Southern blot).	34
7.3.1. Digestión de muestras y transferencia a membranas Hybond-NX™	36
7.3.2. Marcaje de sondas radiactivas e hibridación de membranas	37
8. Resultados	38
8.1. Patrones de metilación en secuencias repetidas de rDNA 5S	38
8.2. Patrones de metilación en transposones	44
9. Discusión	51
10. Conclusiones	62
11. Perspectivas	63
12. Bibliografía	64

## 1. RESUMEN

El cultivo de tejidos es una herramienta útil en distintas especies de plantas, ya sea para propagar, generar variabilidad genética y transformar plantas, o como modelo de estudio de embriogénesis. No obstante se ha visto que las plantas que son regeneradas no siempre tienen como resultado un fenotipo favorable. Estas variaciones pueden ser debidas a distintos factores, entre ellos el cambio epigenético.

Durante la inducción de callos embriogénicos de maíz ocurre un cambio en la proporción de RNAs pequeños asociados a secuencias repetidas, de las cuales se sabe tienen relación con la modificación de la metilación del DNA y con la expresión de las mismas. Por lo que este trabajo se propuso evaluar el cambio en los patrones de metilación en secuencias repetidas durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz.

Se observaron cambios en la metilación de secuencias repetidas como rDNA 5S donde principalmente se ve afectada la citosina en el contexto CHH en regiones de heterocromatina. Los mayores cambios ocurren justo al inicio de la inducción de callos embriogénicos de maíz, mientras que en cultivos prolongados la variación en la metilación de citosina en los tres distintos tipos de contextos es mínima. En cultivos de 16 meses se apreció una caída en la metilación en contexto CHH de la secuencia rDNA 5S.

Así mismo el proceso de desdiferenciación también afecta a retrotransposones LTR de la clase Copia y Gypsy durante la inducción y mantenimiento de callos embriogénicos de maíz en contexto de metilación CHH en donde este tipo de metilación va perdiéndose conforme se va estableciendo el subcultivo de callos embriogénicos. Este proceso probablemente es guiado por siRNAs asociados a secuencias repetidas de 24 nt.

## 2. INTRODUCCIÓN

México es centro de origen y diversidad del maíz, un cultivo de importancia global. Dentro de México, el maíz es un alimento básico que provee carbohidratos, conformando un elemento central de las dietas de consumidores urbanos y rurales. Adicionalmente, este cultivo tiene un gran valor cultural, representando el origen de la vida en muchas de las cosmologías de grupos indígenas de México y otros países de América Central. El maíz también tiene una importancia más allá de México ya que este es un alimento básico cultivado por agricultores pobres en África y Asia, y este también es un producto comercializado en los mercados mundiales, formando la base de las cadenas agro-industriales para productos de fécula y proteína. En el contexto de intereses recientes por los biocombustibles, se ha discutido que el maíz también puede ser un contribuyente potencial en la oferta de energía global. La diversidad de maíz en México ha afianzado los programas de mejoramiento, creando variedades de maíz de alto valor o adaptadas localmente que se cultivan mundialmente. Por lo tanto, entender cómo la diversidad de maíz es mantenida y circulada en México es de gran importancia para la agricultura a nivel mundial (FAO 2013).

De manera natural la embriogénesis en las plantas comienza con la fertilización. El crecimiento y la morfogénesis son procesos continuos mientras que el embrión sufre cambios en su tamaño y forma (Bai *et al* 2000). Sin embargo, además de la embriogénesis que ocurre *in vivo*, existe el cultivo celular *in vitro* de plantas (Fehér 2003). Las técnicas de cultivo de tejidos son de gran interés para la recolección, multiplicación y almacenamiento del germoplasma de las plantas (Engelman 2011). Particularmente la embriogénesis somática *in vitro* es útil para la clonación y propagación vegetativa de una planta dada, sirviendo además como modelo para el estudio de cambios moleculares, citológicos, fisiológicos y de eventos del desarrollo subyacente a la embriogénesis de las plantas (Fehér 2003).

En términos generales, el hecho de que un cultivo *in vitro* adquiriera la capacidad embriogénica se basa en gran medida en la desdiferenciación, un proceso en el que los perfiles de transcripción y traducción existentes son alterados con el fin de permitir que las células establezcan un nuevo programa basado principalmente en la proliferación celular. En particular, la cromatina cambia de una manera muy dinámica y continua a lo largo del desarrollo. Por lo cual se ha considerado que la remodelación de la cromatina se encuentra necesariamente relacionada con la diferenciación celular y el cambio del destino de la célula (Fehér 2003).

### 3. ANTECEDENTES

#### 3.1. Embriogénesis somática

Históricamente, los estudios de embriogénesis somática comienzan con el trabajo pionero de Michael Levine, quien reportó por primera vez la regeneración de embriones de zanahoria a partir del cultivo de tejido después de disminuir los niveles de auxinas con el que se indujo el cultivo *in vitro* (Levine 1947). Este trabajo fue posteriormente seguido por Steward y colaboradores, quienes reportaron que se originaban estructuras parecidas a embriones (embryo-like) a partir de cultivos celulares de zanahoria (Steward 1958).

Durante los últimos 40 años, las técnicas de propagación y embriogénesis somática, han sido desarrolladas extensamente y aplicadas a más de 1000 especies diferentes (Engelman 2011). La principal ventaja de este sistema *in vitro* es que las células embriogénicas son accesibles a la manipulación mediante diversas técnicas moleculares y celulares, en contraste con las células de los gametos y cigotos que se desarrollan dentro de los tejidos maternos (Fehér 2003).

La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual las células somáticas, es decir, células distintas de los gametos, cambian el destino de su desarrollo y se



destinan a una vía embriogénica que culmina en la formación de embriones somáticos. La embriogénesis somática se lleva a cabo con éxito mediante una selección apropiada del explante, medio, nutrientes y el control físico del ambiente del cultivo (Elhiti y Stasolla 2011).

### 3.1.1. Cultivo de tejidos

Cuando una especie vegetal es cultivada sobre un medio sintético, los explantes de los cuales se parte para iniciar el cultivo *in vitro* se van a desdiferenciar y proliferar en forma de células con la capacidad de generar embriones somáticos, a este acúmulo de células indiferenciadas se les denomina callos embriogénicos (Bai *et al* 2000). En muchas especies el explante de elección para la inducción de callos embriogénicos es el embrión cigótico inmaduro, que de acuerdo a Neumann se encuentra en lo alto del gradiente jerárquico de los tejidos que responden a embriogénesis (embrión>hipocótilo>pecíolo>lámina foliar>raíz). La inducción de callos usualmente se logra colocando los embriones en medio que contiene tanto auxinas como citoquininas o simplemente auxinas. El ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es la auxina más comúnmente empleada a pesar de que no se conoce con precisión su mecanismo de acción (Elhiti y Stasolla 2011).

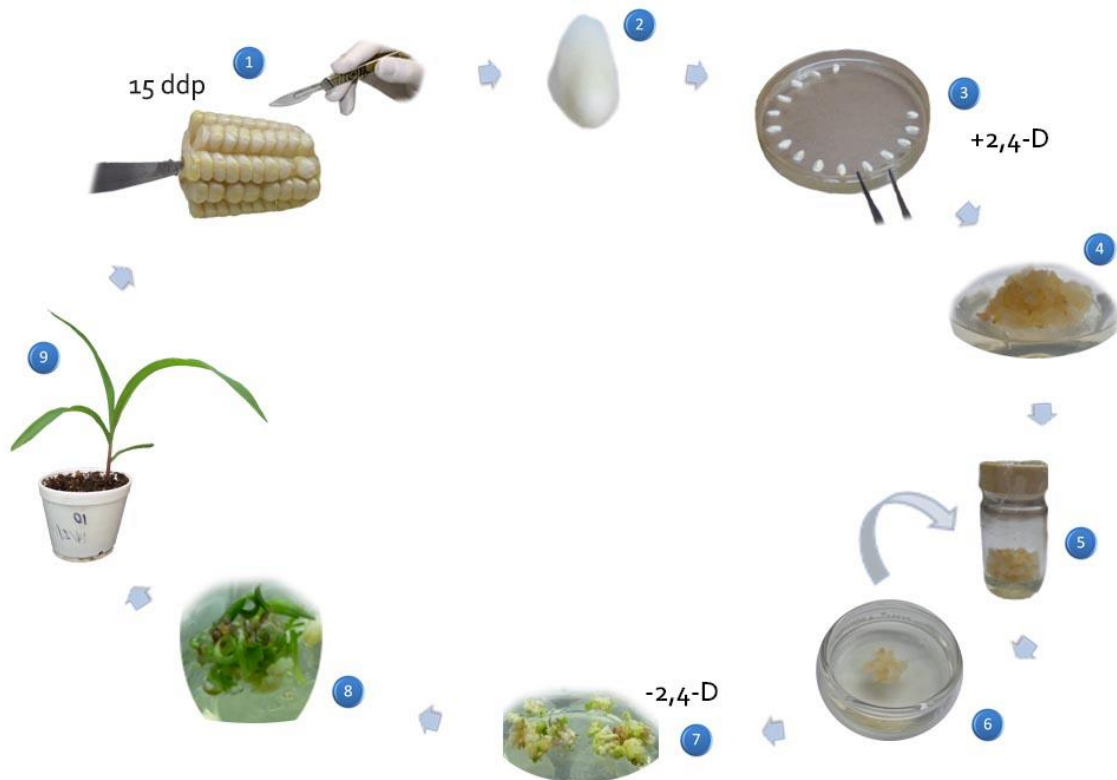
El cambio drástico del entorno celular, como puede ser la modificación de la cantidad de nutrientes, o el suministro de hormonas genera un efecto significativo de estrés. La respuesta a estas condiciones depende de dos parámetros: el nivel de estrés y el estado fisiológico de las células. Si el nivel del estrés excede la tolerancia celular, las células mueren. En contraste, bajos niveles de estrés incrementan el metabolismo e inducen mecanismos de adaptación (Lichtenthaler 1998). Sin embargo, el estrés no solo promueve la desdiferenciación, sino que también induce la formación de embriones somáticos (Fehér 2003).

El desarrollo embrionario *in vitro* generalmente es dividido en una fase de inducción, en la cual las células somáticas deben ser reprogramadas para dirigirse hacia un

nuevo destino, seguido de una fase de desarrollo caracterizado por el crecimiento del embrión (Elhiti y Stasolla 2011). Durante el proceso de desdiferenciación se requiere de la activación de la división celular para mantener el destino de las células indiferenciadas, así como para la diferenciación de los embriones (Fehér 2003).

Existe mucha información disponible en la literatura concerniente a esta fase tardía, tanto estudios estructurales, fisiológicos como moleculares de las diferentes fases del desarrollo embrionario. Sin embargo, la fase inductiva no ha sido investigada a detalle debido a que cuando se origina el callo embriogénico y es trasplantado a medio nuevo, no se puede diferenciar adecuadamente el explante de partida del callo generado debido al resultado de la transición de células somáticas a embriogénicas (Elhiti y Stasolla 2011).

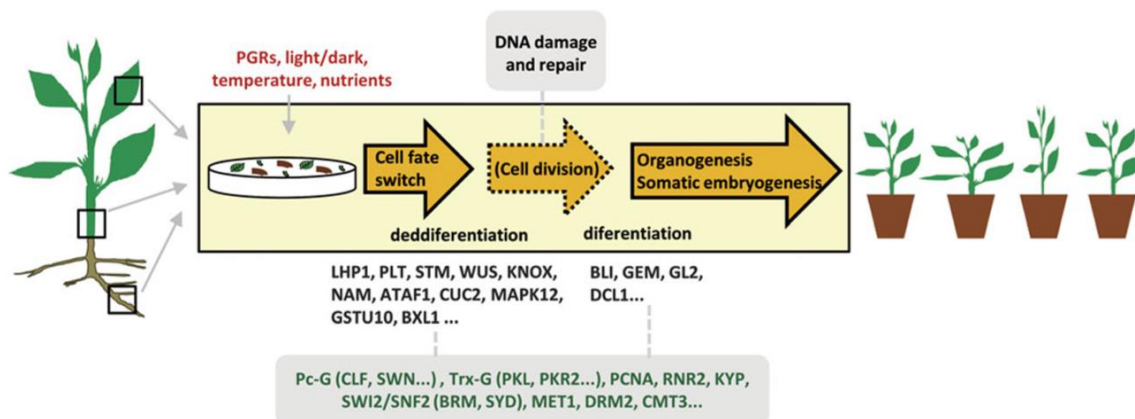
En el laboratorio, la producción de callos embriogénicos de maíz comienza con la disección de embriones inmaduros a partir de mazorcas obtenidas 15 días después de la polinización. Los embriones son colocados con el eje embrionario en contacto con un medio que contiene cinetina y 2,4-D para inducir la formación de masas proembriogénicas y posteriormente callos embriogénicos. Los callos son subcultivados cada tres semanas y las células que presentan oxidación son removidas. A partir de los 4-6 meses de subcultivo, en el momento que sea requerido, las plantas pueden ser regeneradas mediante el trasplante de los callos a un medio fresco en el cual se va eliminando gradualmente la cantidad de 2,4-D y cinetina en presencia de luz, hasta el eventual desarrollo de la planta (ver figuras 1 y 2) (Jiménez-Villalobos 2006).



**Figura 1. Ciclo de cultivo y regeneración in vitro en *Zea mays*.** (1) Obtención del explante (embrión inmaduro) 15 días después de la polinización. (2) Embrión inmaduro de maíz sin endospermo. (3) Sembrado de embriones inmaduros en medio de inducción adicionado con 2,4-D. (4) Generación de masas pro-embriogénicas. (5) Callos embriogénicos de maíz. (6) Mantenimiento "indefinido" por medio de subcultivo de callos embriogénicos. (7) Embriogénesis somática del subcultivo en medio de regeneración con remoción gradual de la concentración de 2,4-D. (8) Inicio de la regeneración de la planta. (9) Planta regenerada.

### 3.1.2. Variación somaclonal

La micropropagación *in vitro* también ha sido ampliamente empleada para la inducción de variación somaclonal como una herramienta para el mejoramiento de cultivos de plantas. La variación somaclonal es definida como la variación fenotípica de origen genético o epigenético que es manifestado entre las plantas regeneradas a partir de un cultivo *in vitro* (somaclonas), y que también es un fenómeno común en el cultivo de tejidos de plantas (Biswas *et al* 2009; Schaffer 1990).



**Figura 2. Regeneración de plantas *in vitro*.** La elección de diferentes tipos de tejido y condiciones de cultivo como los reguladores de crecimiento (PGRs), nutriente, luz/oscuridad, y temperatura, y la frecuencia de la división celular antes de la organogénesis o embriogénesis somática puede afectar la regeneración de las plantas. Tomado y adaptado de Miguel y Marum 2011.

Distintos estudios sugieren que las concentraciones de auxinas en el medio de cultivo y el número de veces que se subcultiva el tejido son factores importantes en la inducción de variación somaclonal en el sistema *in vitro*. La variación somaclonal tiene impactos negativos y positivos en el desarrollo de la planta. Entre los efectos positivos se incluye la variabilidad genética que contribuye a la expresión de resistencia a enfermedades o herbicidas, y tolerancia a estrés biótico o abiótico (Biswas *et al* 2009).

En 1977 Green describió que existen cambios en la morfología y cariotipo de plantas de maíz regeneradas a partir de callos embriogénicos; adicionalmente, examinó plantas de maíz regeneradas a partir de callos que permanecieron por 3 años en subcultivo, las cuales presentaron el síndrome de “abphyl” (filotaxia aberrante por su abreviatura en inglés). Estas plantas poseían el cromosoma 6 bivalente heteromórfico en paquinema y uno de los cromosomas 6 de cada una de las plantas había perdido un tercio de la parte distal del brazo largo. (Larkin y Scowcroft 1981).

Años después en otro experimento empleando plantas regeneradas a partir del cultivo de tejidos de 3 y 8 meses en subcultivo; se encontró que había una

frecuencia de 0.5 variantes somaclonales por cada planta regenerada a partir de callos de 3 meses, mientras que para los cultivos de 8 meses había una frecuencia 1.3 variantes por cada planta regenerada. De esta manera se demostró que la frecuencia de las variantes somaclonales regeneradas de maíz aumentan con el tiempo de subcultivo (Lee y Phillips 1987).

Los mecanismos por los que el genotipo de un explante puede resultar en una gran variedad de fenotipos en la progenie regenerada a partir un mismo cultivo *in vitro* siguen estando muy lejos de ser comprendidos. Con la información que se cuenta hasta la fecha se cree que la variación somaclonal es generada por cambios en el número de cromosomas o daño a los mismos, lo que puede ocurrir mediante recombinación, replicación tardía en regiones heterocromáticas, elementos transponibles (TEs), mutaciones puntuales en la secuencia de DNA o reordenamientos en los cromosomas. Se ha demostrado que la activación de retrotransposones en el cultivo de tejidos de *Oryza sativa* induce variación somaclonal (Biswas *et al* 2009; Miguel y Marum 2011). Así mismo, queda claro que la regulación epigenética juega un rol importante en este proceso.

Una de las definiciones más aceptadas del término epigenética es que abarca los cambios heredables mitóticos y/o meióticos en la función génica que no pueden ser explicados por cambios en la secuencia del DNA (Bird 2007).

Existe un número creciente de estudios que se enfocan en la investigación de la variación epigenética para evaluar la estabilidad de las plantas cultivadas *in vitro*, revelando inesperadamente una alta frecuencia de variaciones epigenéticas. Además, estos cultivos han sido empleados como un modelo experimental para el estudio de los mecanismos epigenéticos durante la desdiferenciación celular y la subsecuente reprogramación del desarrollo (Williams *et al* 2003; Avivi *et al* 2004; Koukalova *et al* 2005; Berdasco *et al* 2008). La variación epigenética *in vitro* refleja el proceso de adaptación de células a distintos ambientes, lo cual incluye la respuesta a señales o estímulos que puede activar switches en el programa de

desarrollo. No obstante, efectos no deseados involucrados dentro de estos ajustes adaptativos pueden comprometer la finalidad para la cual fueron cultivadas las células o tejidos de las plantas; y además pueden tener consecuencias a largo plazo (Miguel y Marum, 2011).

### 3.2. Metilación del DNA

La organización del DNA es afectada por cambios epigenéticos como la metilación de bases nitrogenadas, las modificaciones de histonas y la asociación con RNA interferencia (RNAi) (Henderson y Jacobsen 2007; Huettel *et al* 2006). La regulación de estos cambios influye en la regulación de la expresión génica mediante la modificación del acceso a la información genética subyacente, afectando finalmente los fenotipos (Riddle y Richards 2005; Zhang *et al* 2008).

La metilación del DNA es uno de los mecanismos epigenéticos mejor descritos del cual se sabe que juega un rol en la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X, el silenciamiento de transposones y otras secuencias repetidas de DNA, así como en la expresión de genes endógenos (Miguel y Marum 2011).

#### 3.2.1. Generalidades

La metilación del DNA involucra la modificación covalente del carbono en la posición 5 de ciertas citosinas que forman parte de la cadena de DNA (Briones y Muegge 2012) La metilación de citosinas es un sistema de modificación ancestral que se ha diversificado para cumplir diferentes funciones biológicas como los sistemas de restricción en bacteria y la regulación epigenética de la expresión de genes y la estructura del genoma en la mayoría de los eucariotas, en donde la metilación de citosinas trabaja en combinación con modificaciones de histonas (Goll y Bestor 2005).

En plantas, se han encontrado distintos patrones de metilación de DNA en el cuerpo de genes y elementos repetidos, restringiendo la expresión de elementos transponibles (TEs) que representan más del 50% del genoma de muchas plantas (Messing *et al* 2004). La metilación del cuerpo del gen es un mecanismo ampliamente conservado, que es anterior a la divergencia de los animales y las plantas alrededor de 1600 millones de años atrás, mientras que el control de TEs por metilación se ha retenido principalmente en plantas y vertebrados (Suzuki y Bird 2008). A diferencia de los animales, las plantas no tienen un grupo de células germinales separada de las células somáticas en donde los patrones de metilación son borrados y restablecidos. Por lo que los cambios epigenéticos inducidos en mutantes de la vía de metilación del DNA pueden ser heredados y mantenidos inclusive si la maquinaria de metilación del DNA es restablecida (Reinders *et al* 2009).

Los patrones de metilación del DNA son sensibles a efectos de estrés, y pueden contribuir a heredar la adaptación a estrés lo que correlaciona con cambios en la metilación del genoma. Sin embargo, estos efectos transgeneracionales no persisten necesariamente a la largo de todas las generaciones subsecuentes (Boyko *et al* 2010), e incluso los cambios trascendentes que son transmitidos a la siguiente generación pueden ser poderosos generadores de diversidad epigenética. Especialmente las poblaciones de plantas que viven en hábitats contrastantes han desarrollado una alta variabilidad epigenética sugiriendo que algunas especies usan este tipo de variación para adaptarse a diversos ambientes (Lira-Medeiros *et al* 2010). Las plantas han encontrado un balance entre mantener patrones epigenéticos estables para evitar efectos perjudiciales en la expresión de genes y la estructura del genoma y mantenerse lo suficientemente flexibles para inducir variación epigenética requerida para una rápida adaptación a nuevas condiciones ambientales. Es muy probable que los requerimientos necesarios para tener una metilación de DNA estable o flexible difieren para cada loci blanco (Meyer 2011).

### 3.2.2. Metiltransferasas de DNA

Dependiendo del contexto en el que se encuentre el residuo de la citosina dentro de la secuencia del DNA que va a ser metilado, se pueden definir tres tipos de metilación: CG, CHG o CHH; en donde de acuerdo a la nomenclatura IUPAC, H puede ser adenina (A), citosina (C) o timina (T). Todos estos contextos de metilación se encuentran presentes en plantas bajo el control de tres clases de metiltransferasas de DNA. La metilación de CG esta mediada por la metiltransferasa 1 (MET1), el homólogo de la metiltransferasa de DNA de mantenimiento en mamíferos (DNMT1). La metilación de CHH es controlada por dominios remodeladores de la metiltransferasa 2 (DRM2), el homólogo de la metiltransferasa de DNA *de novo* en mamíferos DNMT3, mientras que la cromometilasa 3 (CMT3) específica de plantas regula la metilación de CHG. Los patrones de metilación del DNA frecuentemente son el resultado de interacciones cooperativas o competitivas de las tres metiltransferasas de DNA y las vías de silenciamiento a las que contribuyen (Meyer 2011).

La metilación de DNA *de novo* es controlada predominantemente por DRM2 mediante la vía de metilación de DNA dirigida por RNA (RdDM) y la producción de RNAs cortos de interferencia (siRNAs) de 24 nucleótidos (Chan *et al* 2004).

### 3.2.3. Remodelación de la arquitectura de la cromatina

La cromatina es un complejo de DNA y proteínas que mantiene a los cromosomas dentro del núcleo de las células eucarióticas. El DNA nuclear no permanece en forma de cadenas lineares libres; sino que se encuentra altamente condensado y enrollado alrededor de histonas. El complejo nucleoproteico conformado por las histonas canónicas (H2A, H2B, H3 y H4) en conjunto con aproximadamente 147 pb de DNA, una histona de unión (H1) y otras proteínas distintas a las histonas es denominado nucleosoma. El arreglo de varios nucleosomas unidos uno al lado de otro en una fibra de alrededor de 10 nm recibe el nombre de collar de perlas. De



igual forma esta fibra de nucleosomas que a su vez es enrollada en una espiral de 30 nm es llamada solenioide; en donde proteínas adicionales sirven de apoyo en la estructura de la cromatina. La finalidad de la cromatina es la organización espacial del genoma, pues todo el DNA debe ser contenido dentro del núcleo de una célula (Jerabek y Heermann 2014; Fierz y Muir 2012; Nature glossary 2014).

La estructura de la cromatina es afectada de manera crítica por la interacción entre las diferentes modificaciones epigenéticas como metilación de citosinas en el DNA, acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación o sumoilación de las histonas asociadas al DNA, y la presencia de RNA pequeño de interferencia (siRNA) asociado a cromatina (Henderson y Jacobsen 2007). Una de las muchas convergencias de estas modificaciones es el “refuerzo” de la metilación de DNA que implica el reclutamiento de metilasas de DNA y modificadores de histonas. En *Arabidopsis* esto es mediado por proteínas de unión a metilcitosina que se unen a citosinas metiladas mediante un dominio “SET- or RING-associated” (SRA). Las proteínas “variant in methylation” (VIM) son proteínas con dominios SRA que regulan predominantemente la metilación en el contexto de dinucleótido CG, actuando cooperativamente y, en algunos casos, redundantemente. Con la asistencia de proteínas VIM, la metilación en CG es mantenida por la metilasa de DNA MET1, la cual tiene una alta afinidad por DNA hemimetilado. Se ha encontrado que en la triple mutante *vim1 vim2 vim3* en *Arabidopsis thaliana*, el fenotipo obtenido es semejante al de la mutante *met1*. Aunque las proteínas VIM controlan principalmente la metilación en contexto CG, también pueden influir en la metilación de CHG en ciertos loci (Woo *et al* 2008). Además, por lo menos algunos miembros de la familia VIM interactúan con núcleos de histonas y variantes de histonas locus específicas indicando que pueden actuar como una interfaz entre la metilación de DNA y la modificación de histonas (Woo y *et al* 2007). Especialmente para la metilación de loci en heterocromatina, se requiere del factor de remodelación de la cromatina “decrease in DNA methylation 1” (DDM1); el cual facilita el acceso de MET1 a su región blanco.

Por otro lado la metilación en un contexto CHG que es predominantemente |controlada por CMT3, se encuentra estrechamente asociada con la dimetilación de la lisina 9 en la histona H3 (H3K9me2) (Bernatavichute *et al* 2008). La localización de CMT3 en regiones de DNA blanco es asistida por tres proteínas con dominio SRA, el homólogo de SU(VAR)3-9, 4/kryptonite (SUVH4/KYP), SUVH5 y SUVH6, los cuales muestran efectos locus-específico para la metilación en CHG y la metilación de H3K9. Se ha encontrado que las proteínas SUVH4, SUVH5 y SUVH6 tienen una actividad de metilación específica para H3 *in vitro* y las triples mutantes *suvh4 suvh5 suvh6* pierden las marcas H3K9me y H3K9me2 en el locus blanco CHG (Ebbs y Bender 2006). Por otro lado SUVH4 y SUVH6 han mostrado la capacidad de unirse a sitios CHG metilados mediante sus dominios SRA. Esto estabiliza la marca H3K9me2 en regiones CHG metiladas, la cual a su vez se une al cromodominio de CMT3 como parte de un ciclo de refuerzo entre la metilación de H3K9 y la metilación de CHG (Johnson *et al* 2007). Adicionalmente el “auto-mantenimiento” de la metilación en CHH por DRM2 es también mediado por dos proteínas con dominios SRA, SUVH2 y SUVH9. SUVH2 se une a residuos de CG metilados, y SUVH9 se une a sitios CHH metilados facilitando el acceso de DRM2 hacia regiones metiladas. No está claro si esto incluye modificaciones histona específicas pues existen reportes en conflicto sobre la actividad de metiltransferasa de histonas de SUVH2 y SUVH9 (Naumann *et al* 2005).

La metilación del DNA es equilibrada por funciones de desmetilación de DNA mediada por DME (DEMETER), ROS1 (represor of silencing 1) y las proteínas DEMETER-like DML2 y DML3. Todas ellas forman parte de un grupo de glicosilasas de DNA inusualmente grandes (1100-2000 amino ácidos); las cuales remueven citosinas metiladas mediante la vía de reparación por escisión de bases. Las mutaciones en estas funciones de desmetilación inducen una hipermetilación del DNA locus-específico. En *Arabidopsis thaliana* la expresión de DME está restringida a dos células centrales del gametofito femenino y estabiliza la impronta genómica en el endospermo (Choi *et al* 2002). Además 179 loci son desmetilados activamente por enzimas DML (Penterman *et al* 2007), y muchos loci blanco de la vía RdDM

muestran metilación en CHG aumentada en mutantes de *ros*, lo cual es indicativo de un control dinámico de los patrones de metilación (Zhu *et al* 2007).

Aún no está claro cómo es que loci individuales se convierten en blancos para la desmetilación, pero los RNAs son posibles candidatos para guiar funciones de desmetilación hacia diferentes blancos. ROS3 es un regulador de la desmetilación que contiene un motivo de reconocimiento a RNA, se une a RNAs pequeños y co-localiza con ROS1 en loci discretos dispersados a lo largo del núcleo. Esto sugiere que ROS3 es parte del sistema de desmetilación dirigida por RNA que contrarresta la hipermetilación de DNA en *Arabidopsis thaliana* (Zheng *et al* 2008).

#### 3.2.4. Implicaciones de la metilación en el desarrollo y fenotipos

Algunos estudios han mostrado pérdida de la metilación dentro de un contexto CCGG en plantas regeneradas a partir de callos embriogénicos de maíz subcultivados por siete meses, la cual puede ser transmitida por lo menos a la progenie F1 (Kaeppeler y Phillips 1993). Se piensa que estos cambios epigenéticos inducidos por el cultivo de tejidos pueden resultar en la activación de ciertos loci quiescentes en regiones centroméricas generando cambios en los cromosomas, donde la ruptura de los cromosomas es más frecuente que los cambios en la ploidía (Kaeppeler *et al* 1998; Kaeppeler *et al* 2000).

Se ha demostrado que la metilación del DNA en un contexto CCGG varía en un 20% aproximadamente entre los distintos tejidos de maíz durante el crecimiento y a lo largo del desarrollo de la planta. Lu y colaboradores hacen notar que la metilación de citosinas en la secuencia 5'-CCGG-3' se encuentra distribuida en secuencias repetidas dentro de regiones codificantes y no codificantes. La metilación de la citosina interna en ambas cadenas de DNA parece ser la más común de todos los tipos de metilación en el genoma del maíz (Lu *et al* 2008).

Por otro lado se sabe que la exposición a auxinas incrementa los niveles de metilación del DNA, involucrada en silenciamiento de genes. Se ha sugerido que las alteraciones en la metilación ocurren durante el inicio de la embriogénesis somática. En zanahoria, la remoción de 2,4-D resulta en la rápida caída de la metilación del DNA y el patrón es revertido conforme se desarrollan los embriones. La regulación de los niveles de metilación por auxinas parece ser mediadas por S-adenosilmetionina (SAM) y S-adenosilcisteina (SAH). Como es descrito por von Aderkas y Bonga, la reducción de auxinas resulta en la reducción de la producción de etileno y el incremento de los niveles de SAM, favoreciendo así la proporción SAM/SAH que a su vez promueve la metilación del DNA (Elhiti y Stasolla 2011).

La variación en la metilación del DNA ha sido sugerida como un mecanismo subyacente al cultivo de tejidos induciendo mutagénesis debido a la alta frecuencia de variación fenotípica, la activación de elementos transponibles, eventos de ruptura de cromosomas y la alta frecuencia del cambio de secuencias (Phillips *et al* 1994).

### 3.3. RNAs pequeños

El silenciamiento por RNA es un mecanismo ampliamente conservado en la regulación de la expresión génica de los eucariontes. La principal vía de silenciamiento por RNA recae en los RNAs pequeños (20-30 nt de longitud) asociados con las proteínas de la familia Argonauta (Kim *et al* 2009). Los RNAs pequeños proveen de especificidad a la regulación mediante el apareamiento de bases con los ácidos nucleicos blanco usando RNAs cortos antisentido para inhibir la traducción o para degradar el RNA mensajero (mRNA) citoplásmico. En este mecanismo, las proteínas tipo Dicer generan los RNAs pequeños a partir de RNA de doble cadena (dsRNA) y las proteínas Argonauta unen a estas moléculas y ejercen su efecto mediante silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) (Kim *et al* 2010; Castel y Martienssen 2013).

### 3.3.1. Clases de RNAs pequeños

Existen tres clases de RNAs pequeños que pueden regular la expresión de genes mediante el apareamiento con transcritos en el citoplasma. Estos son: microRNAs (miRNAs), los cuales cuentan con una complementariedad total o parcial con sus mRNA blancos para inducir su degradación o represión traduccional; los small interfering RNAs (siRNAs), los cuales tienen una perfecta complementariedad con sus blancos y provocan la degradación del transcrito; y los PIWI-interacting RNAs (piRNAs), cuyos blancos son los transcritos de transposones en animales y células germinales (Castel y Martienssen 2013).

Además de su acción, los miRNA, siRNA, y piRNA, se distinguen por las distintas maneras de biogénesis. Los miRNAs y siRNAs son generados a partir de precursores de RNA de doble cadena por la endonucleasa Dicer, una RNasa tipo III que produce dúplex de RNA entre 19-24 nt dejando dos nucleótidos sin aparear en cada extremo 3' (overhangs). Los dúplex de RNAs pequeños posteriormente son separados con la ayuda de Argonauta para generar miRNAs o siRNAs de cadena sencilla. Los siRNAs son generados a partir de dsRNAs largos, los cuales generalmente dan lugar a múltiples especies de siRNAs a partir de ambas cadenas. Los miRNAs son derivados de precursores de RNA de cadena sencilla que forman estructuras tallo-asa. El miRNA y su miRNA\* en el dúplex son las especies más predominantes a partir de un precursor. Los piRNAs presuntamente se derivan de precursores de cadena sencilla de una manera independiente de Dicer (Chen 2009).

### 3.3.2. Biogénesis de siRNAs a partir de secuencias repetidas de DNA

En plantas, además de las RNA polimerasas I, II y III, han evolucionado otras dos polimerasas, Pol IV y Pol V (Saze *et al* 2012), las cuales se especializan en la biogénesis de siRNAs asociados a secuencias repetidas (ra-siRNAs) y participan en el mecanismo de metilación de DNA dependiente de RNA (RdDM). La composición de las subunidades de la Pol IV y Pol V indica que estas dos

polimerasas evolucionaron a partir de la Pol II. La Pol IV es responsable de la producción de más del 90% de los siRNAs endógenos los cuales tienden a originarse a partir de regiones centroméricas, peri-centroméricas, elementos transponibles y otras secuencias repetidas (Chen 2009).

Los ra-siRNAs son productos del procesamiento de dsRNAs que derivan de transcritos específicos de la Pol IV los cuales son copiados en dsRNA por la RNA polimerasa dependiente de RNA 2 (RDR2). Una pequeña porción de dsRNAs es producida por Pol II transcribiendo secuencias que contienen repetidos invertidos o superponiendo transcritos antagonistas. Los dsRNAs son procesados en siRNAs de 24 nt por una enzima Dicer-like DCL3 (ver figura 3). Una de las cadenas del siRNA se asocia con miembros de la familia de Argonauta 4, especialmente con AGO4, en un complejo efector que media la metilación de DNA y la formación de heterocromatina en las regiones blanco (sitio de donde se originó la transcripción por la Pol IV). Con ayuda de Pol V y RDR2 se amplifican las señales primarias de ra-siRNAs y se producen señales secundarias de ra-siRNAs que causan el esparcimiento de la metilación del DNA (Chan *et al* 2006).

Los RNAs no codificantes dependientes de Pol V que tienen modificaciones en el extremo 5' como trifosfato o una estructura Cap 7mG, carecen de una cola de poli A y se acumulan en varios loci blanco de RdDM. AGO4 puede interactuar con el dominio C-terminal de Pol V mediante el motivo WG/GW, sugiriendo que la función de Pol V es servir de andamiaje de RNA y/o reclutar el complejo siRNA-AGO4 hacia las regiones blanco de la metilación mediante complementariedad con las secuencias de los transcritos siRNA-Pol V (Saze *et al* 2012).

### 3.3.3. Metilación de DNA dependiente de RNA (RdDM)

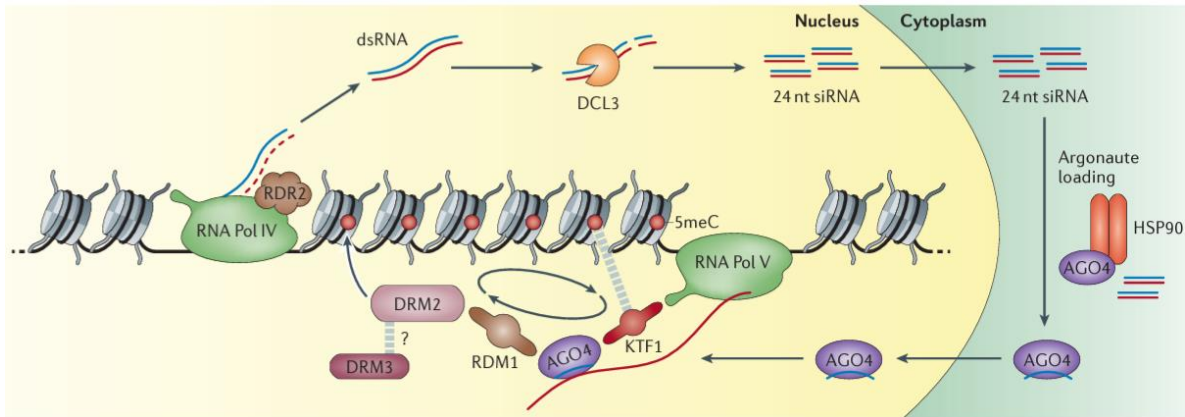
La vía de RdDM fue descrita por primera vez por Wassenegger y colaboradores en 1994 y se refería a un proceso de modificación de la cromatina basado en RNA de interferencia (RNAi) en el cual los siRNAs de 24 nt inducen metilación *de novo* de

citiosinas en todos los contextos de secuencia (CG, CHG y CHH) en regiones de DNA con secuencias complementarias a los siRNAs. En *Arabidopsis*, la vía de RdDM está involucrada en varios procesos biológicos, como lo son la respuesta a estrés biótico/abiótico y el desarrollo de la planta, incluyendo el mantenimiento del estado inerte de transposones y secuencias repetidas. El mecanismo molecular para RdDM involucra dos pasos: el primero, la biogénesis de siRNAs de 24 nt; y segundo, la conversión de las señales de los siRNAs en metilación *de novo* del DNA en las regiones blanco.

Para efectuar la metilación *de novo*, AGO4 es cargada con un siRNA efector mediante ayuda de HSP90, es importada dentro del núcleo y guiada por complementariedad del siRNA hacia los transcritos intergénicos no codificantes generados por la Pol V. Esto probablemente es asistido por la interacción directa proteína-proteína de la subunidad de la Pol V denominada NUCLEAR RNA POLYMERASE E1 (NRPE1) y el KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1 (KTF 1) que se encuentra asociado a la Pol V (figura 3). La unión entre AGO4 y KTF1 ocurre a través de una región con motivos reiterativos WG/GW en AGO4 y a los transcritos de andamiaje de la Pol V a través de su dominio de unión a RNA (He *et al* 2009). NRPE1, también contiene una región rica en GW/WG que se une a AGO4 asistiendo en el reclutamiento de AGO4-siRNA a su loci blanco (El-Shami *et al* 2007).

El silenciamiento co-transcripcional mediante RNAi e lleva a cabo mediante la metilación de citosinas *de novo* en el loci transcrito por la Pol V. En *Arabidopsis thaliana*, el proceso es catalizado por la metiltransferasa de DNA activa DRM2 en el loci que fue elegido como blanco de RdDM (figura 3) (Meyer 2011; Castel y Martienssen 2013). El proceso es facilitado por la interacción entre AGO4 y “regulator of RdDM”, RDM1, quien hace contacto con DRM2 y con citosinas ya metiladas para así establecer un asa de retroalimentación y promover la metilación hacia las regiones transcritas por la Pol IV (Gao *et al* 2010). Una metiltransferasa

de DNA inactiva, DRM3, quien es paróloga de DRM2 se requiere para RdDM pero se desconoce su rol en el proceso.



**Figura 3. Vía de metilación de DNA dependiente de RNA en *Arabidopsis thaliana*.** Tomado y adaptado de Castel, S. E. & Martienssen, R. A. 2013.

Dentro de la vía de RdDM, el reclutamiento de AGO4 a su locus blanco también puede producir siRNAs nuevos, si la actividad endonucleasa (tipo RNasa H) de AGO4 corta el transcrito locus-específico que se aparea con el siRNA cargado. Esto permite generar plantillas para RDR2 produciendo más dsRNA que sirvan como sustrato para el corte realizado por DCL3 y generar siRNAs secundarios que perpetúen la formación de heterocromatina. Por lo menos para algunos loci, la metilación y la formación de heterocromatina aumentan la capacidad de reclutar siRNAs, lo cual es indicativo de un efecto de auto-reforzamiento (Chan *et al* 2006).

La transcripción a partir de Pol II juega un rol importante en promover la síntesis de sustrato para generar siRNAs, ayudando al silenciamiento de genes, mediante el reclutamiento de complejos AGO4/siRNAs, y de Pol IV y Pol V en los diferentes loci heterocromáticos. Similar a Pol V, la Pol II interactúa con AGO mediante una región de motivos GW/WG. De esta manera, mientras que AGO4 y Pol V se asocian en centros de procesamiento peri-nucleolares, AGO4 y Pol II se asocian en el nucleoplasma (Zheng *et al* 2009).



### 3.4. Secuencias repetidas y silenciamiento

Una de las diferencias entre los genomas de plantas y los de mamíferos es el rango en su tamaño. Mientras que los genomas de mamíferos se encuentra entre 2 y 3 gigabases (Gb), los principales cultivos de plantas varían de 0.4 Gb en arroz a 16 Gb en trigo (Messing *et al* 2004).

Las secuencias de DNA repetidas comprenden del 20-50% del genoma de la mayoría de los animales y más del 50% del genoma de muchas plantas (Pearson y Morrow 1981). Estas secuencias han sido aisladas y caracterizadas en un gran número de plantas, las más ampliamente estudiadas son las especies de cultivo como el trigo, centeno y jitomate. Aunque algunas de estas secuencias han sido identificadas como codificantes para DNA ribosomal o tienen homología con retrotransposones, la función de la mayoría permanece desconocida. (Clark *et al* 1993).

Las secuencias repetidas de DNA caen dentro de dos categorías principales: las repetidas interdispersas, llamadas de esa forma debido a que son restos de transposones intercalados a lo largo del genoma y las secuencias repetidas en tándem (TRs), en donde cada unidad repetida está localizada una junta a la otra, reflejando su origen en las duplicaciones locales (Gemayel *et al* 2010). Las repetidas interdispersas son cuantitativamente la categoría más importante. El mapeo físico por hibridación *in situ* de las secuencias repetidas dentro de los cromosomas en plantas ha correlacionado su presencia con bloques de heterocromatina. Tradicionalmente, esta heterocromatina se ha asumido de naturaleza constitutiva y sin ninguna actividad transcripcional conocida (Clark *et al* 1993).

Los genes ribosomales 5S (5S rDNA) están altamente conservados tanto en animales como en plantas y están presentes en un alto número de copias en muchas especies, incluyendo algunas plantas. En la mayoría de los organismos

todo el volumen de 5S rDNA está organizado en arreglos en tándem encontrados en un pequeño número de locaciones cromosómicas (Campbell *et al* 1992).

#### 3.4.1. Elementos transponibles (TEs)

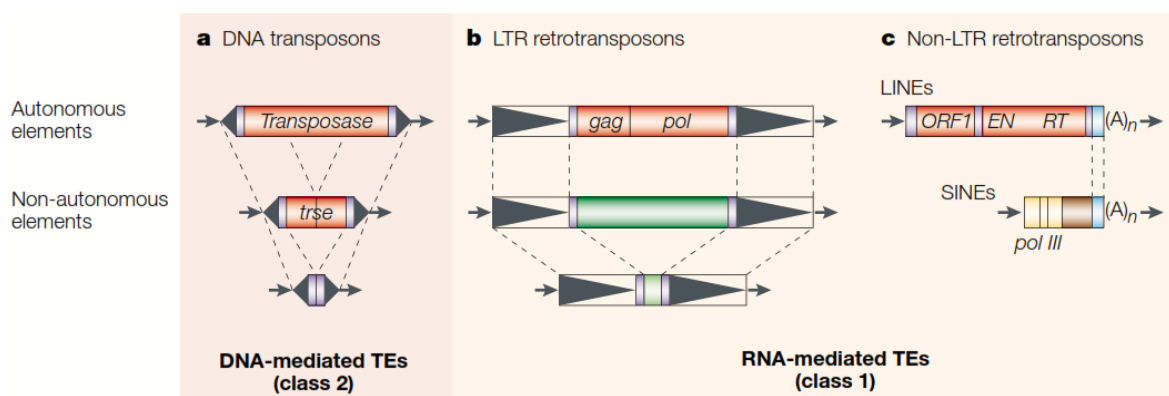
Los transposones o elementos transponibles (TEs) son secuencias de DNA que pueden moverse de una región a otra en el genoma o generar copias de ellos mismos. Comprenden por lo menos el 45% del genoma humano y del 50 al 80% del genoma de algunos pastos (Feschotte *et al* 2002).

Los TEs fueron descubiertos en maíz por Bárbara McClintok hace más de medio siglo como agentes genéticos responsables de la alteración en la pigmentación de algunos sectores en granos de maíz mutante (Feschotte *et al* 2002).

Los TEs de eucariontes están divididos en dos clases de acuerdo a su intermediario para la transposición: de RNA (clase 1) o DNA (clase 2). Para todos los elementos de la clase 1, el intermediario de transposición es el transcrito codificado (mRNA), y no el elemento en sí mismo (como los elementos de la clase 2). Cada grupo de TEs contiene elementos autónomos y no autónomos (figura 4). Los elementos autónomos tienen marcos de lectura abiertos (ORFs) que codifican a productos requeridos para la transposición. Los elementos no autónomos que son capaces de transponerse no tienen una región codificante significativa pero retienen las secuencias *cis* necesarias para la transposición. La integración de casi todos los TEs resulta en la duplicación de una secuencia genómica corta en el sitio de inserción. Estas duplicaciones del sitio blanco (flechas flanqueando el elemento) son variables en tamaño y/o secuencia entre las familias y superfamilias de TEs (Feschotte *et al* 2002). Se dan varios ejemplos en la Tabla 1.

### 3.4.1.1. Elementos de clase 1

Los elementos de clase 1 se pueden dividir en dos grupos de acuerdo a su mecanismo de transposición y estructura. Los retrotransposones LTR (Figura 4b) tienen repetidos terminales largos (LTR) en orientación directa (triángulos negros). Los elementos autónomos contienen por lo menos dos ORFs llamados *gag* y *pol*. El gen *gag* codifica para una proteína similar a la proteína de cápside viral y el gen *pol* codifica para una poliproteína que contiene actividades de proteasa, reverso transcriptasa, RNasa H y de integrasa. Los elementos no autónomos carecen de la mayoría o de todas las secuencias codificantes. La región interna (cajas verdes) puede variar en tamaño y no está relacionada con los ORFs de los elementos autónomos (Feschotte *et al* 2002).



**Figura 4. Esquema general de los elementos transponibles (TEs) de clase 1 y 2.** Tomado y adaptado de Feschotte *et al* 2002.

Los retrotransposones no-LTR (Figura 4c) se dividen en elementos nucleares interdispersos largos (LINEs) y elementos nucleares interdispersos cortos (SINEs). Las regiones codificantes incluyen: *ORF1*, una proteína similar a *gag*; *EN*, que es una endonucleasa y *RT*, una reverso transcriptasa. Tanto LINEs como SINEs terminan en una secuencia repetida simple, usualmente poli A. todos los SINEs descritos hasta ahora se caracterizan por tener un promotor interno de RNA *pol III* (delimitado por rayas negras) cerca del extremo 5'. La mitad interna del extremo 3'

de los SINEs es de un origen desconocido, pero la cola del extremo 3' de algunos SINEs comparte homología con la de LINEs presentes en el mismo genoma. Esto indica que los SINEs pudieron “parasitar” la maquinaria de transposición de una parte de los LINEs (Feschotte *et al* 2002).

Tabla 1. Ejemplo de elementos transponibles en plantas. Tomado y adaptado de Feschotte, C. et al 2002.

Class/subclass/ superfamily	Species	Autonomous member(s)	Non-autonomous member(s)	Copy number of the entire family*
<b>Class 1</b>				
<b>Non-LTR retrotransposons</b>				
LINEs; L1 clade	<i>Z. mays</i>	<i>Cin4</i>	–	50–100
	<i>L. speciosum</i>	<i>Del2<sup>+</sup></i>	–	250,000
	<i>A. thaliana</i>	<i>Tai1<sup>+</sup></i>	–	1–6
SINEs	<i>N. tabacum</i>	–	<i>TS</i>	50,000
	<i>B. napus</i>	–	<i>S1</i>	500
<b>LTR retrotransposons</b>				
<i>copia</i> -like	<i>N. tabacum</i>	<i>Tnt1A</i>	–	>100
	<i>N. tabacum</i>	<i>Tto1</i>	–	30 (300)
	<i>Hordeum</i> sp.	BARE-1	–	5,000–22,000
	<i>O. sativa</i>	<i>Tos17</i>	–	2–5 (30)
	<i>Z. mays</i>	<i>Hopscotch</i>	–	5–8
	<i>Z. mays</i>	<i>Opie-2<sup>+</sup></i>	–	100,000
	<i>Z. mays</i>	–	<i>BS1</i>	1–5
<i>gypsy</i> -like	<i>Z. mays</i>	<i>Magellan</i>	–	4–8
	<i>Z. mays</i>	<i>Huck-2<sup>+</sup></i>	–	200,000
	<i>O. sativa</i>	<i>RIRE2 ?</i>	<i>Dasheng</i>	1,200
	<i>A. thaliana</i>	<i>Athila 4<sup>+</sup></i>	–	22
	<i>A. thaliana</i>	<i>Athila 6<sup>+</sup></i>	–	11
	<i>A. thaliana</i>	<i>Ta3</i>	–	1
	<i>A. thaliana</i>	<i>Tar17</i>	–	2
<b>Class 2</b>				
<b>DNA transposons</b>				
<i>hAT</i>	<i>Z. mays</i>	<i>Ac</i>	<i>Ds</i>	50–100
CACTA	<i>Z. mays</i>	<i>Spm</i>	<i>dSpm</i>	50–100
	<i>A. thaliana</i>	<i>CAC1</i>	<i>CAC2</i>	4 (20)
<i>Mutator</i>	<i>Z. mays</i>	<i>MuDR</i>	<i>Mu1</i>	10–100
	<i>A. thaliana</i>	<i>AtMu1</i>	–	1 (4)
<i>PIF/Harbinger</i>	<i>Z. mays</i>	<i>PIFa</i>	<i>mPIF</i>	6,000
	Angiosperms	<i>PIF</i> -like	<i>Tourist</i> -like	Variable
<i>Tc1/mariner</i>	Angiosperms	<i>MLEs</i>	<i>Stowaway</i> -like	Variable

#### 3.4.1.2. Elementos de clase 2

Los transposones de DNA (Figura 4a) tienen un repetido terminal invertido (TIR; triángulos negros) y duplicaciones de los sitios blanco (flechas) de longitud conservada en las superfamilias. Los miembros de la familia no autónoma son usualmente derivados de un miembro de una familia autónoma mediante una delección interna (Feschotte *et al* 2002).

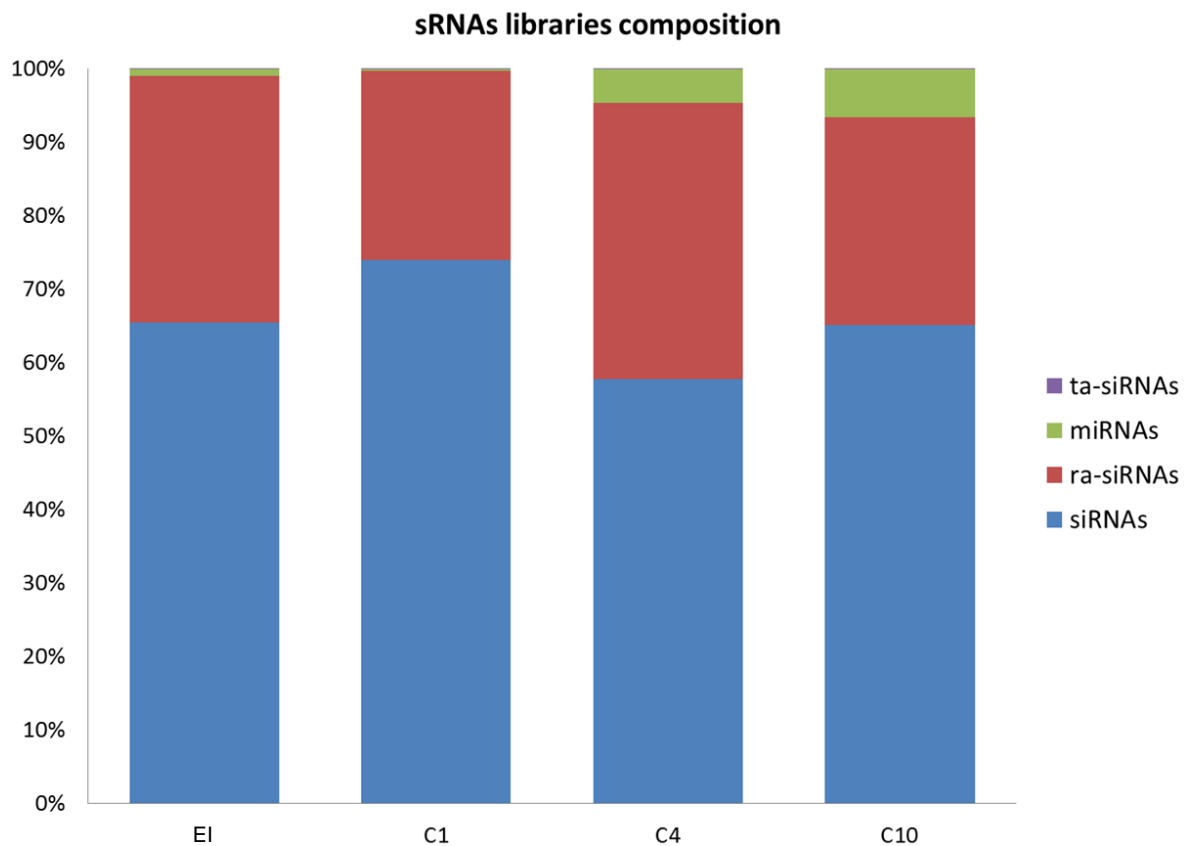
#### 3.5. Antecedentes directos

Trabajos realizados en el laboratorio sugirieron que la maquinaria de RNA interferente podría verse alterada durante el subcultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz, observándose expresión disminuida de varios miRNAs conservados y no correspondencia entre la fluctuación de miRNAs y los niveles de mRNAs blanco de estos en callos embriogénicos subcultivados por 18 meses o más (Dinkova y Alejandri-Ramírez 2014).

Dando seguimiento al fenómeno observado, se realizó la secuenciación masiva de cuatro bibliotecas de RNAs pequeños: de embriones inmaduros (EI), callos embriogénicos subcultivados por uno (C1), cuatro (C4), y diez meses (C10) para determinar cambios en la expresión de diferentes clases de sRNAs durante la inducción (EI-C1), establecimiento (C1-C4) y subcultivo prolongado (C4-C10). Las secuencias de RNA con un tamaño entre 18 y 27 nt se clasificaron como miRNAs reportados (miRbase versión 20), ra-siRNAs acorde a TIGR Maize repeat database ([http://maize.jcvi.org/repeat\\_db.shtml](http://maize.jcvi.org/repeat_db.shtml)) y otros siRNAs. En el caso de los ra-siRNAs se pudo observar un aumento de su proporción en el total de RNAs pequeños en C4 y una disminución en C10 (figura 5) (Alejandri-Ramírez 2014).

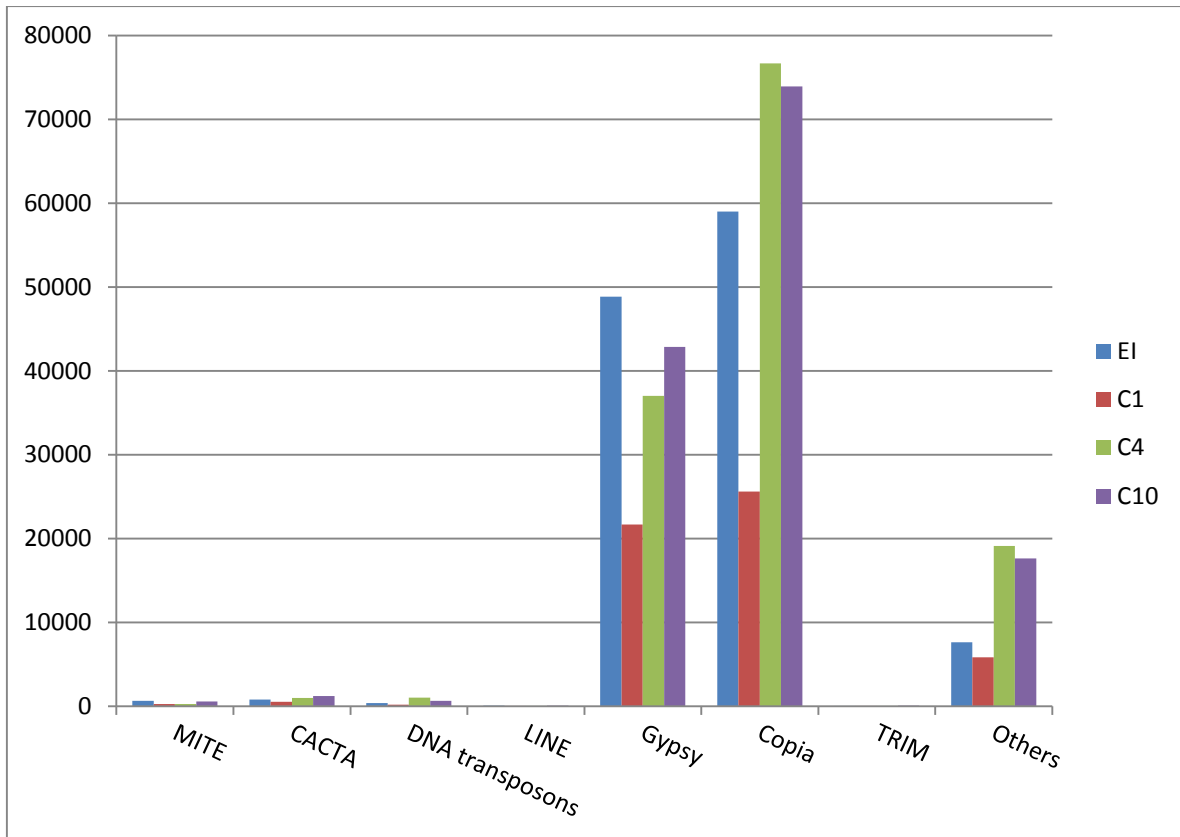
Las lecturas de ra-siRNAs correspondieron principalmente a las familias de retrotransposones de tipo Copia y Gypsy. El análisis de lecturas normalizadas por

millón, indicó que en los callos embriogénicos de 1 mes (inducción) ocurre una disminución drástica en los ra-siRNAs correspondientes a estas familias de retrotransposones (figura 6). Sin embargo, en callos de 4 y 10 meses de subcultivo se recupera el nivel de ra-siRNAs para Gypsy y los correspondientes a Copia incluso muestran niveles mayores en callos de 4 y 10 meses que en el explante (EI) de donde fueron originados los callos (Alejandri-Ramírez, N. D. 2014).



**Figura 5. Composición de sRNAs (% del total de sRNAs depurados y normalizados) en las bibliotecas de callos embriogénicos generadas a partir de embrión inmaduro (EI) y callos de 1, 4 y 10 meses de subcultivo de maíz.** Datos no publicados Alejandri-Ramírez 2014.

Así mismo al considerar sólo las secuencias de ra-siRNAs que mapean en las familias Gypsy y Copia, se observa que las lecturas dentro de las sub-familias de cada familia cambian su proporción diferencialmente a lo largo del proceso de inducción, establecimiento y subcultivo de callos embriogénicos.



**Figura 6. Lecturas (normalizadas por millón; ordenada) de ra-siRNAs que mapean en distintas familias de transposones (abscisa).** Datos no publicados Alejandri-Ramírez 2014.

Por ejemplo, dentro de Gypsy predominan los transposones Flip, Huck y Cinfu (figura 7), pero mientras que los sRNAs para Flip y Huck muestran niveles menores en los callos embriogénicos que en embrión inmaduro, para Cinfu se observan niveles mayores en los callos de 4 y 10 meses que en embrión inmaduro. En el caso de la familia Copia el transposón más predominante entre los ra-siRNAs es Ji seguido de Opie y Giepum (figura 8). En el caso de Ji, quien también es el retrotransposón más abundante a nivel de genoma de maíz, las lecturas de ra-siRNAs se incrementan en C4 y C10 respecto a EI, mientras que para Opie, los mayores niveles se encontraron en EI. Estos datos indican que la regulación de transposones podría ser diferencial y específica durante la embriogénesis somática de maíz probablemente debido al aumento de la proliferación celular, situación en la cual el DNA se podría encontrar expuesto a la acción de procesos no solo involucrados en la replicación sino también a procesos de movilización de TEs.

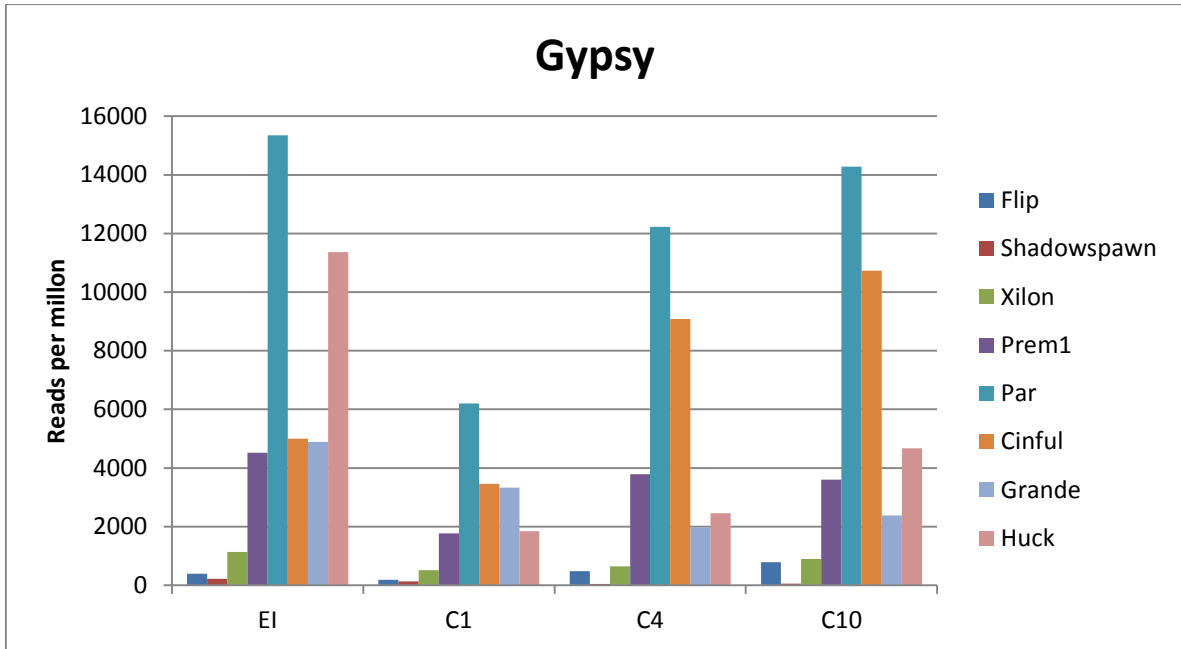


Figura 7. Distribución de ra-siRNAs que mapean en diferentes grupos de transposones de la familia Gypsy en las bibliotecas de EI, C1, C4 y C10. Datos no publicados Alejandri-Ramírez 2014.

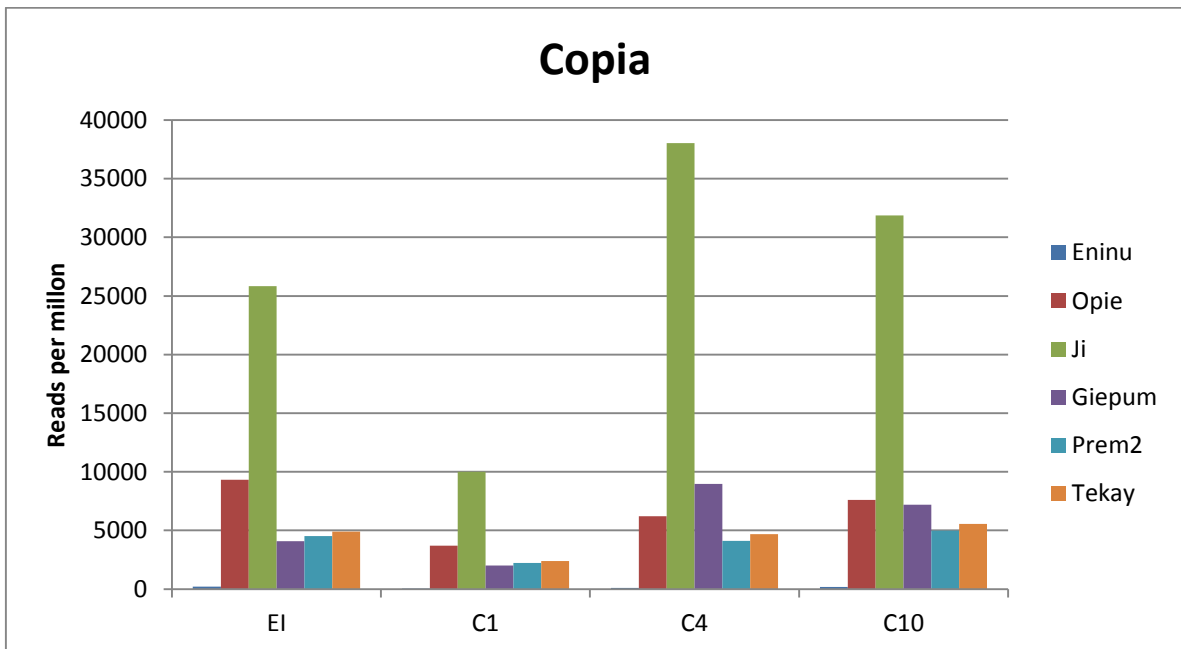


Figura 8. Distribución de ra-siRNAs que mapean en diferentes grupos de transposones de la familia Copia en las bibliotecas de EI, C1, C4 y C10. Datos no publicados Alejandri-Ramírez 2014.



#### 4. JUSTIFICACIÓN

El cultivo de callos embriogénicos de maíz es un modelo ampliamente usado en distintas áreas de investigación. Sin embargo, ya sea con fines de micropropagación, transformación o para obtener variantes somaclonales en la mayoría de las ocasiones se pasan por alto las alteraciones a nivel molecular que el cultivo celular está sufriendo por una exposición prolongada a hormonas. Esto vuelve de gran interés el establecimiento del momento en el cual se producen los cambios moleculares a nivel de metilación del DNA, activación/silenciamiento de transposones o reprogramación de la expresión genética en estos cultivos.

#### 5. HIPÓTESIS

Dado que la exposición prolongada a elevadas concentraciones de auxinas promueve la metilación de citosinas en el DNA y la presencia de RNAs pequeños asociados a ciertos transposones se incrementa durante el subcultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz, los patrones de metilación en secuencias repetidas y elementos transponibles se modificarán a lo largo de la inducción y mantenimiento de callos embriogénicos de maíz de la variedad Costeño.

#### 6. OBJETIVOS

##### 6.1. Objetivo general

Determinar los cambios en la metilación de secuencias repetidas y/o en elementos transponibles durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz.

## 6.2. Objetivos particulares

- Recolectar muestras de callos embriogénicos de maíz de las fases de inducción y mantenimiento (proliferación).
- Diseñar sondas para rDNA 5S como representativo de secuencias repetidas.
- Diseñar sondas para transposones pertenecientes a las familias Copia y Gypsy
- Realizar un análisis del patrón de corte en las secuencias de rDNA 5S y transposones con enzimas de restricción sensibles e insensibles a metilación de citosinas.
- Verificar cambios de metilación en contexto CG, CHG o CHH acorde a las enzimas de restricción empleadas.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1. Embriogénesis somática de maíz

Todas las recolecciones de callos embriogénicos de maíz (variedad Costeño) fueron proporcionados por el laboratorio de cultivo de tejidos del conjunto E de la Facultad de Química. Todas las soluciones necesarias para preparar los medios de cultivo se prepararon con agua estéril de acuerdo al protocolo interno del laboratorio de cultivo de tejidos como se describe a continuación:

#### Materiales

##### 7.1.1. Composición y preparación de los medios

- Medio de Iniciación (N6I)

Sales N6 (Chu *et al* 1975) y vitaminas del cocktail 20 (Loza-Rubio *et al* 2008), 2 mg/L de 2, ácido 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), adenina 10 mg/L, prolina 2.76 g/L,

caseína hidrolizada 200 mg/L, sacarosa 30 g/L y Gelzan™ (Sigma-Aldrich) 3.3 g/L. Durante la preparación del medio, antes de agregar el Gelzan™, se ajustó el pH a 5.7; posteriormente se vació el medio en un recipiente, se cubrió con aluminio y se esterilizó a 120°C por 18 min. Después de esterilizar, se dejó enfriar para posteriormente vaciar en cajas Petri (100X15 mm) en condiciones estériles dentro de una campana de flujo laminar. El medio se dejó solidificar y se guardó a 4°C hasta su uso.

- Medio de Proliferación (N6P)

Sales N6 (Chu *et al* 1975) y vitaminas del cocktail 20 (Loza-Rubio *et al* 2008), 2 mg/L de 2, ácido 4-diclorofenoxiacético (2, 4-D), Kinetina (6-Furfurilaminopurina) 0.1 mg/mL, adenina 10 mg/L, prolina 2.76 g/L, caseína hidrolizada 200 mg/L, sacarosa 30 g/L y Gelzan™ (Sigma-Aldrich) 3.3 g/L. Se ajustó el pH a 5.7 antes de agregar el Gelzan; se calentó suavemente para disolver el Gelzan™ y se vació el medio en frascos de aproximadamente 30 mL; se cubrió cada vaso con una tapa de polipropileno y se esterilizó a 120°C por 18 minutos. El medio se dejó solidificar y se guardó a 4°C hasta su uso.

Todos los medios fueron preparados justo antes de usarlos pudiendo ser almacenados hasta un máximo de tres semanas a 4°C.

#### 7.1.2. Desinfección de maíz para inducción de callo embriogénico a partir de embrión inmaduro.

##### Soluciones

- Solución de etanol al 70%
- Solución de cloro al 50% (A la solución se le adicionan 8 gotas de Microdyn (plata coloidal) y 3 gotas de Tween-20 o Triton X-100 por cada 250 mL de solución).
- Cefotaxima (1g / 4mL)

Nota: Todo el material de laboratorio usado debe ser esterilizado con anticipación.

Previo a la desinfección, se retiraron las hojas de las mazorcas y las mazorcas se fragmentaron en porciones de 6 a 8 cm dependiendo del tamaño total de la mazorca. En campana de flujo laminar (previamente limpiada con alcohol al 70%) se colocaron los fragmentos de mazorca en un recipiente y se agregó la solución de etanol al 70% agitando suavemente durante un minuto. Se decantó el etanol y se enjuagó con agua desionizada estéril. Posteriormente, se adicionó una solución de cloro al 50% y se agitó suavemente durante 15 minutos. Finalmente, se decantó la solución de cloro y se enjuagó 3 veces con abundante agua desionizada estéril.

#### 7.1.3. Disección de los embriones e iniciación de los callos embriogénicos

Con ayuda de una pinza de disección de 25 cm se colocó un fragmento de mazorca en un vidrio o caja Petri. Con bisturí se retiró en hilera una porción del grano (aproximadamente la cuarta parte del total del grano). Se extrajeron los embriones y se colocaron en una caja Petri, adicionando agua desionizada estéril y Cefotaxima (lo equivalente a 0.1U de una jeringa de insulina). Con pinzas, se colocaron los embriones en el medio N6I; 30 embriones por caja Petri. Al final, se envolvieron las cajas Petri con plástico y se almacenaron a  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$  en cámara de cultivo en oscuridad por 3 semanas (los cultivos deben observarse cada 3 o 4 días; si aparece alguna contaminación, los embriones no contaminados se rescatan y se colocan en una nueva caja con medio N6I).

#### 7.1.4. Subcultivo y Proliferación en medio N6P

Transcurridas 3 semanas, se observaron porciones de callos embriogénicos que crecen rápidamente, de color blanco a amarillo. Se seleccionaron pequeñas piezas de callos embriogénicos para ser subcultivados en el medio N6P, se colocaron formando cúmulos en el centro del frasco que contiene el medio. Se debe tener

cuidado al colocar las tapas de polipropileno para evitar contaminación, además de cubrirlas con plástico y mantener los callos bajo las condiciones de cultivo antes mencionadas. Se transfirieron los callos cada 3 semanas a un nuevo medio N6P, en cada subcultivo, se descartó cualquier parte del tejido que presentara oxidación (coloración café) y se seleccionaron solamente las partes amarillas o blancas del callo embriogénico sano.

## Material biológico

### 7.1.5. Embriones inmaduros de maíz

Se utilizaron embriones inmaduros de maíz (*Zea mays L.*) de la variedad Costeño. Las muestras se obtuvieron a partir de su extracción de mazorcas recolectadas quince días después de la polinización.

### 7.1.6. Callos embriogénicos de maíz

Se emplearon dos lotes independientes para el estudio paralelo de la fase de inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz. Para el estudio en la fase de inducción se utilizaron callos embriogénicos de maíz recolectados a los 1, 4, 5 y 7 meses de subcultivo obtenidos a partir del lote de embriones inmaduros de maíz mencionados arriba. Mientras que para la fase de mantenimiento se emplearon callos de 7, 10, 16 y 20 meses de subcultivo de un lote de callos embriogénicos ya establecidos.

## 7.2. Extracción de DNA genómico vegetal

### Materiales

Todas las soluciones empleadas fueron preparadas con agua desionizada y esterilizadas en autoclave a 120 °C durante 15 minutos, así como todo el material de vidrio, tubos y puntas para micropipetas. Cada una de las reacciones fueron

preparadas en tubos en hielo hasta su debida incubación a la temperatura requerida.

#### Soluciones y reactivos

- Tris-HCl 1M pH 8
- Ácido Etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5M pH 8
- NaCl 5M
- Buffer Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) pH 8  
140 mM Sorbitol  
220 mM Tris  
22 mM EDTA  
800 mM NaCl  
1% Sarcosil  
0.8% CTAB
- Acetato de sodio 3M pH 5.2
- Acetato de litio 4M
- Fenol pH 7.2
- TE Buffer  
10 mM Tris-HCl pH 8  
1 mM EDTA pH 8
- TBE 5x  
54 g Tris  
27.5 g Ácido Bórico  
3.72 g EDTA

#### Metodología

La extracción de DNA se realizó de acuerdo a la modificación del protocolo de Janice Keller. Se colocó 1 g de embrión inmaduro o callo embriogénico de cada tiempo de subcultivo de manera individual en un tubo Falcon de 50 mL con 7.5 mL de buffer CTAB para hacer un debris celular con la ayuda de Polytron en tres intervalos durante 1 minuto cada uno para cada muestra. Se incubó a 65°C durante

20 minutos con agitación constante (600 rpm) y enseguida se le añadieron 4 mL de cloroformo mezclando con agitación rotatoria durante 20 minutos. Se centrifugó a 3000 rpm durante 5 minutos a 4°C para posteriormente transferir la fase acuosa a un tubo Falcon nuevo, al cual se le añadieron 7 mL de isopropanol, se mezcló bien y se colocó en hielo durante 10 minutos. Se centrifugó a 7100 rpm durante 1 hora y se descartó el sobrenadante sin dejar secar. Se resuspendió la pastilla en 2 mL de TE homogenizando con la misma micropipeta. Se agregaron 4 mL de acetato de litio 4M y se dejó incubar por 20 minutos en hielo. Terminado esto se centrifugó a 7100 rpm durante 10 minutos y se transfirió el sobrenadante a un tubo Falcon nuevo. Se agregaron 16 mL de etanol anhidro y se colocó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó a 7100 rpm por 5 minutos descartando el sobrenadante sin dejar secar. Finalmente se resuspendió la pastilla (DNA) en 500 µL de TE y se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL con la misma punta. Se añadieron 100 µL de acetato de sodio 3M y 500 µL de fenol pH 7.2. Se mezcló con vortex y se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos. Se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo Eppendorf nuevo y se añadió una preparación de cloroformo/isoamilalcohol (58mL + 2mL) en una proporción volumen:volumen (sobrenadante:preparación) y se mezcló perfectamente con vortex. Se centrifugó a 10000 rpm por 5 minutos y se transfirió la fase acuosa (sobrenadante) a un tubo Eppendorf nuevo, al cual se le añadieron dos volúmenes de etanol por cada volumen de sobrenadante y se colocó a -20°C durante toda la noche. Al día siguiente se centrifugó a 10000 rpm durante 5 minutos descartándose el sobrenadante sin dejar secar y se resuspendió la pastilla en 100 o 200 µL de TE según fuera conveniente. Finalmente se cuantificó el DNA por espectrofotómetro UV-Vis NanoDrop 2000 y se corrió un gel de agarosa para confirmar integridad del DNA.

### 7.3. Determinación de patrones de corte de DNA sensibles a metilación (Southern blot).

#### Materiales

Se diseñaron sondas para una región de la secuencia del gen rDNA 5S como representativo de secuencias repetidas. Así mismo se diseñaron sondas para aquellos transposones en los que se mostraba un mayor cambio de lecturas de rasiRNAs a lo largo del subcultivo de callos embriogénicos de maíz.

Se realizó un análisis del patrón de corte en las secuencias de rDNA 5S y transposones con enzimas de restricción sensibles e insensibles a metilación de citosinas. Acorde a este análisis se emplearon las enzimas HpaII y MspI (isoesquizómeros) que reconocen la misma secuencia de DNA a cortar (5'-CCGG-3'), salvo que la HpaII se ve inhibida por metilación en la citosina interna y MspI no. Así mismo se emplearon las enzimas HhaI y McrBC; la primera reconoce la secuencia 5'-GCGC-3', y se ve inhibida si la citosina interna se encuentra metilada, mientras que la segunda enzima reconoce y corta un amplio rango de secuencias, 5'...A/G<sup>m</sup>C(N<sub>40-3000</sub>)A/G<sup>m</sup>C...3', donde se encuentre metilada cualquiera de las citosinas o ambas. De esta manera McrBC reconocería en general islas CpG metiladas y CHH, excepto en el contexto 5'-CCGG-3' donde la citosina interna se encuentre metilada.

#### Soluciones y reactivos

- HpaII
- MspI
- HhaI
- McrBC
- NdeI
- SSC 20X
  - 88.23 g Citrato de sodio
  - 175.32 g NaCl
  - Aforar a 1 L
- Buffer de prehibridación
  - 12 mL SSC 20X
  - 4 mL Denharts 50X



2 mL SDS 10%

22 mL agua desionizada estéril

200  $\mu$ L DNA esperma de salmón previamente puesto a ebullición 5 minutos

- Buffer de baja astringencia

50 mL SSC 20X

5 mL SDS 10%

445 mL agua desionizada

- Buffer de alta astringencia

3.75 mL SSC 20X

5 mL SDS 10%

491.25 mL agua desionizada

- SDS 10%

### 7.3.1. Digestión de muestras y transferencia a membranas Hybond-NX™

Una vez que se verificó la integridad del DNA aislado, se procedió a digerir 5  $\mu$ g de este con las distintas enzimas metilosensibles (HpaII, MspI, HhaI y McrBC), en un volumen final de 50  $\mu$ L añadiendo 50U/ $\mu$ L de cada enzima por cada reacción e incubando durante toda una noche (12-14 h) a 37°C.

Para verificar los cambios de metilación en contexto CG, CHG o CHH de la secuencias de transposones; se realizó la pre-digestión con NdeI a 37°C durante una hora para dejar más accesibles los sitios de corte de las enzimas metilosensibles. Una vez hecho esto se procedió a inactivar a NdeI a 65°C durante 20 minutos para la consecuente digestión del DNA con HpaII, MspI, HhaI y McrBC, en un volumen final de 50  $\mu$ L, añadiendo 50U/ $\mu$ L de cada enzima por cada reacción e incubando durante toda una noche (12-14 h) a 37°C.

Terminado el tiempo de digestión se procedió a cargar todo el volumen de reacción en un gel de agarosa al 2% preparado con buffer TBE 1X. La separación de los fragmentos de DNA se realizó en una cámara de electroforesis con buffer TBE 1X

a 60 V aproximadamente 6 h. después de transcurrido el tiempo de corrida se tomó una foto del gel para observar el avance y la digestión del DNA.

Posteriormente se preparó el gel para su transferencia empleando membranas Hybond-NX™ de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Finalmente, se realizó la transferencia entre 4-5 h. Pasado el tiempo de la transferencia se fijó el DNA exponiendo las membranas a 70000  $\mu\text{J}/\text{cm}^2$  de radiación UV.

### 7.3.2. Marcaje de sondas radiactivas e hibridación de membranas

El marcaje de todas las sondas se realizó con el kit de marcaje por cebadores al azar (Random Primers) de la marca Invitrogen™ empleando Desoxicitidina 5' Trifosfato-alfa-<sup>32</sup>P como marca radiactiva de acuerdo a como lo especifica el fabricante.

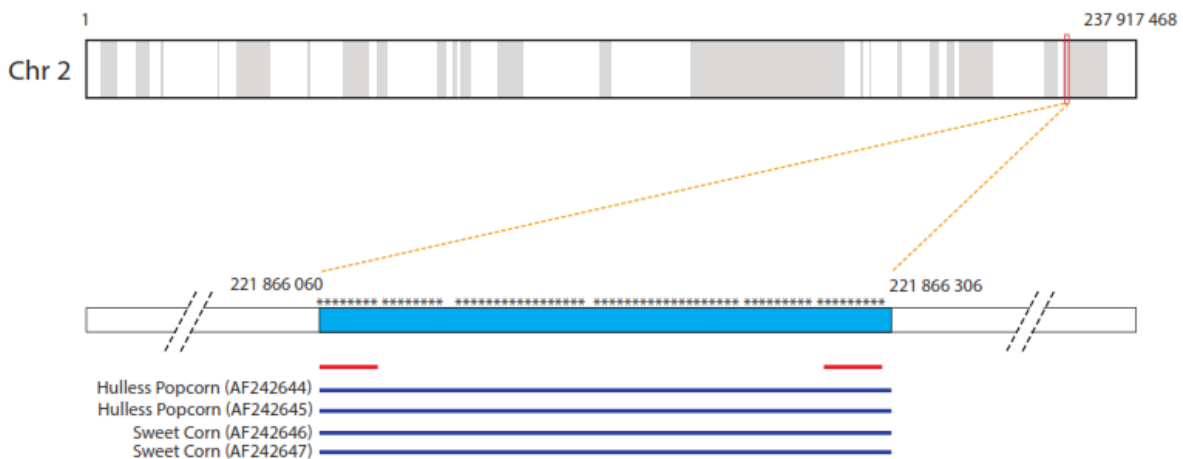
Por otro lado para cada membrana se llevó a cabo la prehibridación por al menos 1h en buffer de prehibridación. Terminado el tiempo de prehibridación se procedió a colocar la sonda recién marcada a ebullición durante 5 minutos y puesta enseguida en hielo para ser adicionada en el buffer de prehibridación dejando este proceso toda la noche a 65°C.

Una vez terminado el tiempo de hibridación se lavó la membrana con buffer de baja astringencia, realizando un lavado de 5 minutos y otro lavado de 30 minutos ambos a 65°C. Posteriormente se procedió a realizar un lavado con buffer alta astringencia de manera análoga efectuando un lavado de 5 minutos y otro lavado de 30 minutos ambos a 65 °C. Finalmente se retiró la membrana cuidando que esta quedara húmeda y se colocó en un cassette de exposición en el cual se expuso con una pantalla intensificadora para radioisótopos durante toda una noche, procesando la imagen al día siguiente en un equipo Phosphorimager Thyphon 7000.

## 8. RESULTADOS

### 8.1. Patrones de metilación en secuencias repetidas de rDNA 5S

El diseño de sondas para el gen rDNA 5S, como representativo de secuencias repetidas, fue realizado de acuerdo a las secuencias del gen reportadas por Pan *et al* (2000) en dos variedades comerciales de maíz (*Zea mays*). Las secuencias reportadas para las variedades Hulless Popcorn (AF242644, AF242645) y Sweet Corn (AF242646, AF242647) fueron alineadas con respecto al genoma del maíz (EnsemblPlants *Zea mays* versión 22) y se realizó el diseño de oligos en la región más conservada para obtener una sonda de 247 pb (figura 9).



**Figura 9. Esquema representativo de la región a amplificar de la secuencia del gen 5S rDNA (247 pb).** La banda azul claro representa una de las regiones dentro del genoma de maíz en el cual alinean las secuencias reportadas para el gen 5S rDNA (líneas azul marino); las líneas rojas representan la región conservada en donde se diseñaron los oligos. Los asteriscos indican los nucleótidos conservados entre diferentes copias del gen rDNA 5S.

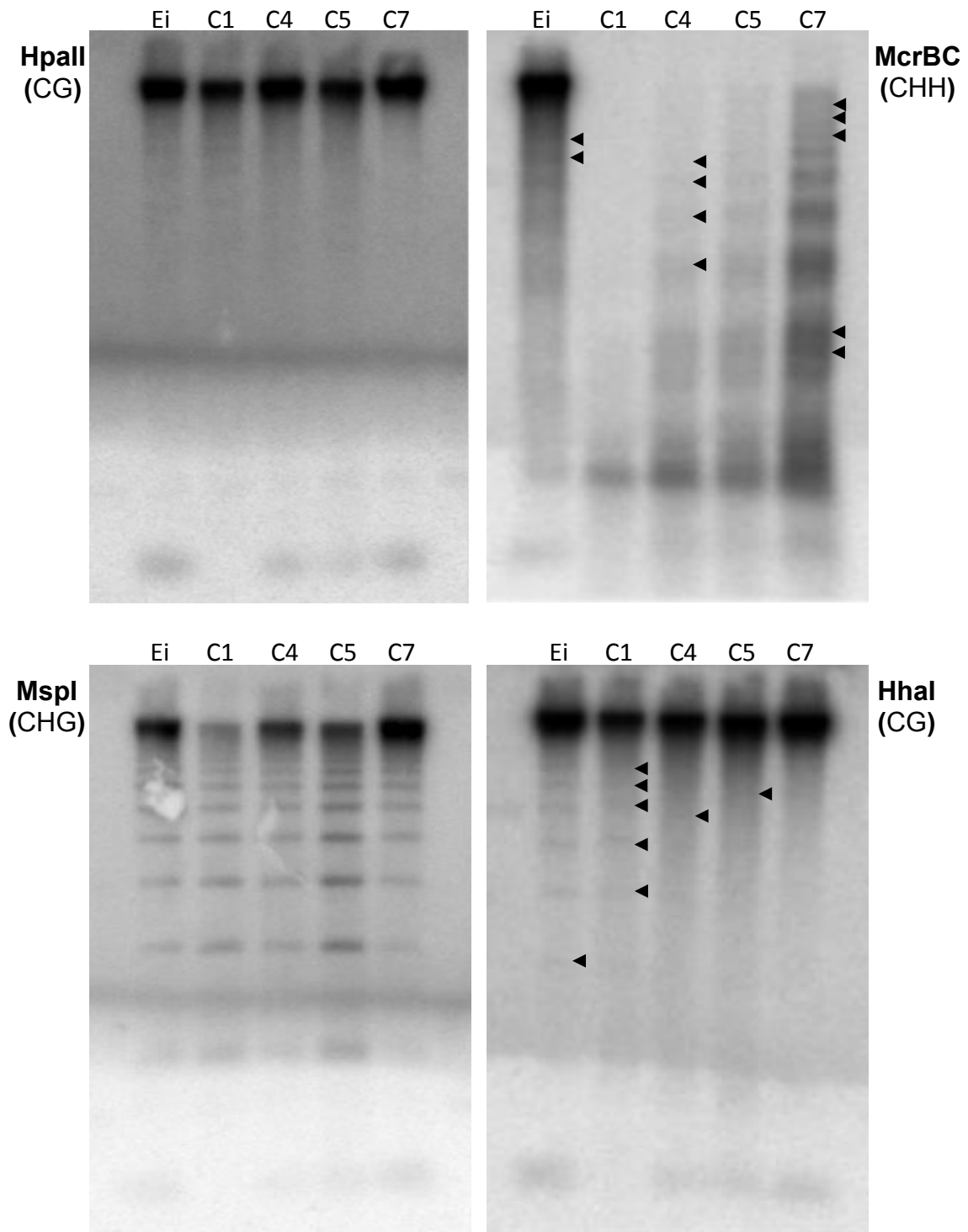
Con las sondas diseñadas se realizaron ensayos de Southern blot digiriendo el DNA obtenido de cada una de las etapas a estudiar para determinar el cambio en el patrón de metilación de cada secuencia repetida analizada. Primeramente se procedió a realizar la hibridación del lote de inducción que comprende: embrión inmaduro (Ei) y callos embriogénicos de maíz de 1, 4, 5 y 7 meses de subcultivo (C1, C4, C5 y C7). Al digerir estas muestras con el isoesquizómero metilosensible HpaII (tabla 2) se observó que en todas las muestras la sonda de rDNA 5S hibrida

con DNA de alto peso molecular representando poca digestión de la secuencia (figura 10). Esto indica que la metilación de la secuencia 5S en el contexto CG se mantiene elevada durante la inducción y establecimiento de los cultivos de callos embriogénicos de maíz y no se altera en gran medida por la presencia de la hormona 2,4-D que está induciendo la dediferenciación celular.

**Tabla 2. Sensibilidad a metilación y patrones de metilación de los isoesquizómeros HpaII y MspI.** Tomado y adaptado de Lu *et al* 2008.

Tipo	Estado de metilación		Digestión de enzimas de restricción	
			HpaII	MspI
Clase I	CCGG GGCC	<u>CCGG</u> <u>GGCC</u>	Activo	Activo
Clase II	<u>CCGG</u> GGCC		Activo	Inactivo
Clase III	CCGG GG <u>CC</u>		Inactivo	Activo
Clase IV	<u>CCGG</u> GG <u>CC</u>		Inactivo	Inactivo

No obstante, se pueden observar algunos cambios en bandas discretas que se encuentran presentes en embrión inmaduro y no así en callos de un mes de subcultivo. En la muestra C1 aparecen dos bandas de diferente tamaño con respecto a Ei indicando una modificación en el patrón de metilación CG (figura 10, triángulos negros, panel superior izquierdo). Consecutivamente, en C4 y C5 estas bandas desaparecen, sugiriendo la recuperación de la metilación en este contexto. También se observaron bandas de bajo peso molecular presentes tanto en embrión inmaduro como todos los tiempos de subcultivo del lote de inducción, apuntando a que el estado de metilación de la secuencia 5S en contexto CG cambia poco durante el proceso.



**Figura 10. Southern blot del DNA del lote de inducción digerido con distintas enzimas metilosensibles e hibridados con 5S.** HpaII y HhaI son enzimas de restricción sensibles a metilación en contexto CG, MspI es sensible a metilación en contexto CHG y McrBC corta DNA metilado en contexto CHH. Los triángulos negros señalan un cambio notable en el patrón de bando de cada tejido analizado.

Al observar el patrón de corte de MspI, isoesquizómero de HpaII insensible a la metilación en contexto CG (tabla 2), se notó un bandeo diferente al descrito arriba que permanece constante entre embrión inmaduro y todos los tiempos de subcultivo de los callos embriogénicos de maíz. Esta enzima es activa mientras las citosinas externas que se encuentran en la secuencia que reconoce, no se encuentren metiladas. De estos resultados se infiere que la secuencia de rDNA se encuentra metilada en contexto CG y que no hay un cambio en la metilación en contexto CHG durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos hasta los siete meses de propagación.

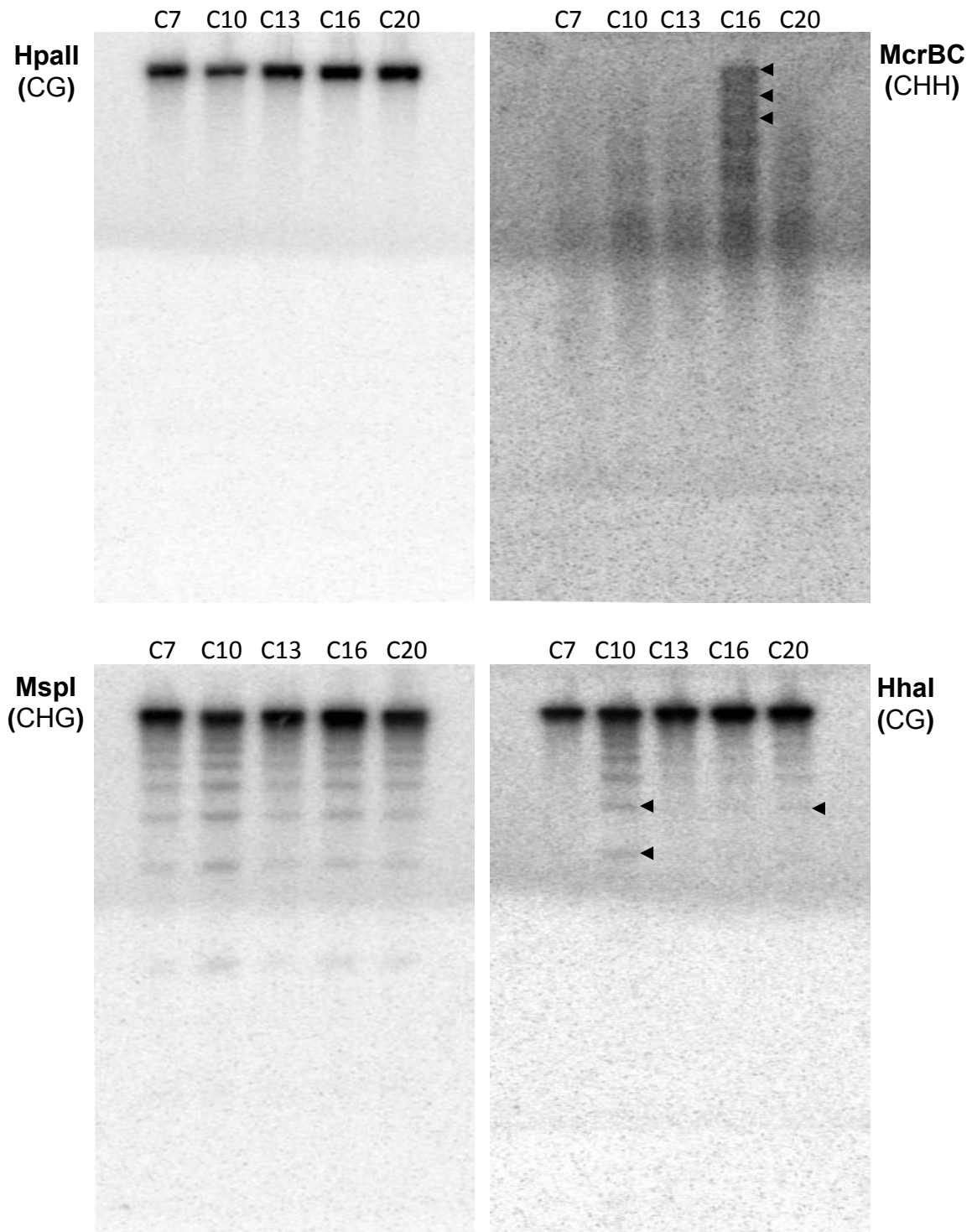
Para identificar cambios de metilación en general, islas CpG y metilaciones en contexto CHH se analizaron los patrones de digestión con McrBC (figura 10, panel superior derecho). De primera instancia se observa que la sonda del gen rDNA 5S hibrida principalmente con DNA no digerido en la muestra de embrión inmaduro y que la banda de alto peso molecular desaparecen en C1 y C4 (durante la inducción del callo embriogénico y a principios del establecimiento del callo proliferativo). Esto podría estar indicando que en el embrión inmaduro la secuencia de 5S no se encuentra en un contexto CHH por lo cual la enzima no corta este DNA. Sin embargo, la situación cambia drásticamente durante la inducción (C1), donde la sonda solo hibrida con DNA de bajo peso molecular indicando un elevado grado de metilación en esta secuencia. Este comportamiento se va atenuando conforme se establece el callo embriogénico proliferativo y en C7 ya se puede apreciar un bandeo más claro denotando una pérdida gradual en la metilación CHH en 5S.

Por último, en los patrones obtenidos con la enzima HhaI, se aprecia un bandeo bien definido en embrión inmaduro, y se van perdiendo bandas de bajo peso molecular conforme se va aumentando el tiempo de subcultivo hasta que estas dejan de percibirse en C7. Este comportamiento podría estar sugiriendo que la secuencia 5S en embrión inmaduro se encuentra desmetilada en contexto CGCG y conforme se da el paso de los subcultivos durante la etapa de inducción esta metilación va aumentando.

El análisis de metilación, utilizando las mismas enzimas durante el subcultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz que muestran una tasa elevada de proliferación, fue realizado con un lote diferente de maíz Costeño. Los resultados se muestran en la figura 11. En este caso, la hibridación con la sonda para el gen 5S en la digestión con HpaII solo mostró DNA no digerido. Esto sugiere que la secuencia se encuentra altamente metilada en un contexto CG ya que al ser comparado con el patrón de bandeo generado por MspI, si se observó un patrón similar al del lote de inducción. Acorde a los patrones de MspI en inducción y mantenimiento, también se puede inferir que aún a tiempos largos de mantenimiento del subcultivo no se generan cambios de la metilación en contexto CHG para el gen 5S.

Los patrones obtenidos con la enzima McrBC mostraron una hibridación muy pobre con la sonda 5S en las muestras de DNA del lote de propagación, por lo que se podría pensar que el DNA durante el subcultivo prolongado de los callos embriogénicos de maíz se encuentra altamente metilado en general, con excepción de la muestra C16, donde se puede apreciar un bandeo marcado en la zona de alto peso molecular. Este patrón indicaría una caída en la metilación en contexto CHH a los 16 meses de subcultivo en secuencias repetidas de rDNA 5S. Sin embargo, sería necesario confirmar la reproducibilidad de este fenómeno debido a que no podemos asegurar que éste sea un evento molecular reproducible en un lote de subcultivo distinto; pues los fenómenos de reordenamiento de la cromatina no son dirigidos ni homogéneos.

De igual manera en este mismo lote de propagación de callos embriogénicos de maíz, la enzima HhaI que nos ayuda a observar el cambio de la metilación en contexto CG, reveló cambios en C10 y C20, evidenciando que de C7 a C10 hay una pérdida importante de la metilación CG restableciéndose parcialmente en C13 y C16 para su posterior pérdida en menor medida en C20.

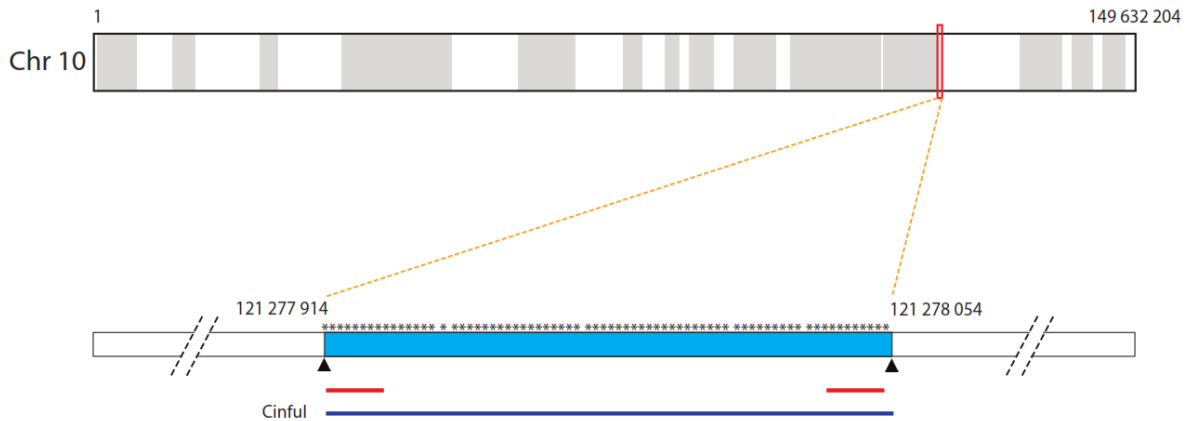


**Figura 11. Southern blot del DNA del lote de mantenimiento digerido con distintas enzimas metilosensibles e hibridados con 5S.** HpaII y HhaI son enzimas de restricción sensibles a metilación en contexto CG, MspI es sensible a metilación en contexto CHG y McrBC corta DNA metilado en contexto CHH. Los triángulos negros señalan un cambio notable en el patrón de bando de cada tejido analizado.



## 8.2. Patrones de metilación en transposones

Se diseñaron oligos para amplificar regiones que pudieran funcionar como sondas para algunos retrotransposones en los que los antecedentes indicaban presencia y cambios importantes de ra-siRNAs durante la inducción y subcultivo *in vitro* de callos embriogénicos de maíz (Figuras 7 y 8). Estos incluyeron a Ji de la familia Copia y Cinfu de la familia Gypsy. Para el diseño se utilizó la secuencia genómica reportada en bases de datos de secuencias repetidas (TIGR plant repeat database, Maize transposable element database y Zea Repeat Sequences). El fragmento utilizado como sonda se muestra en un esquema de cada transposición en la figura 12.



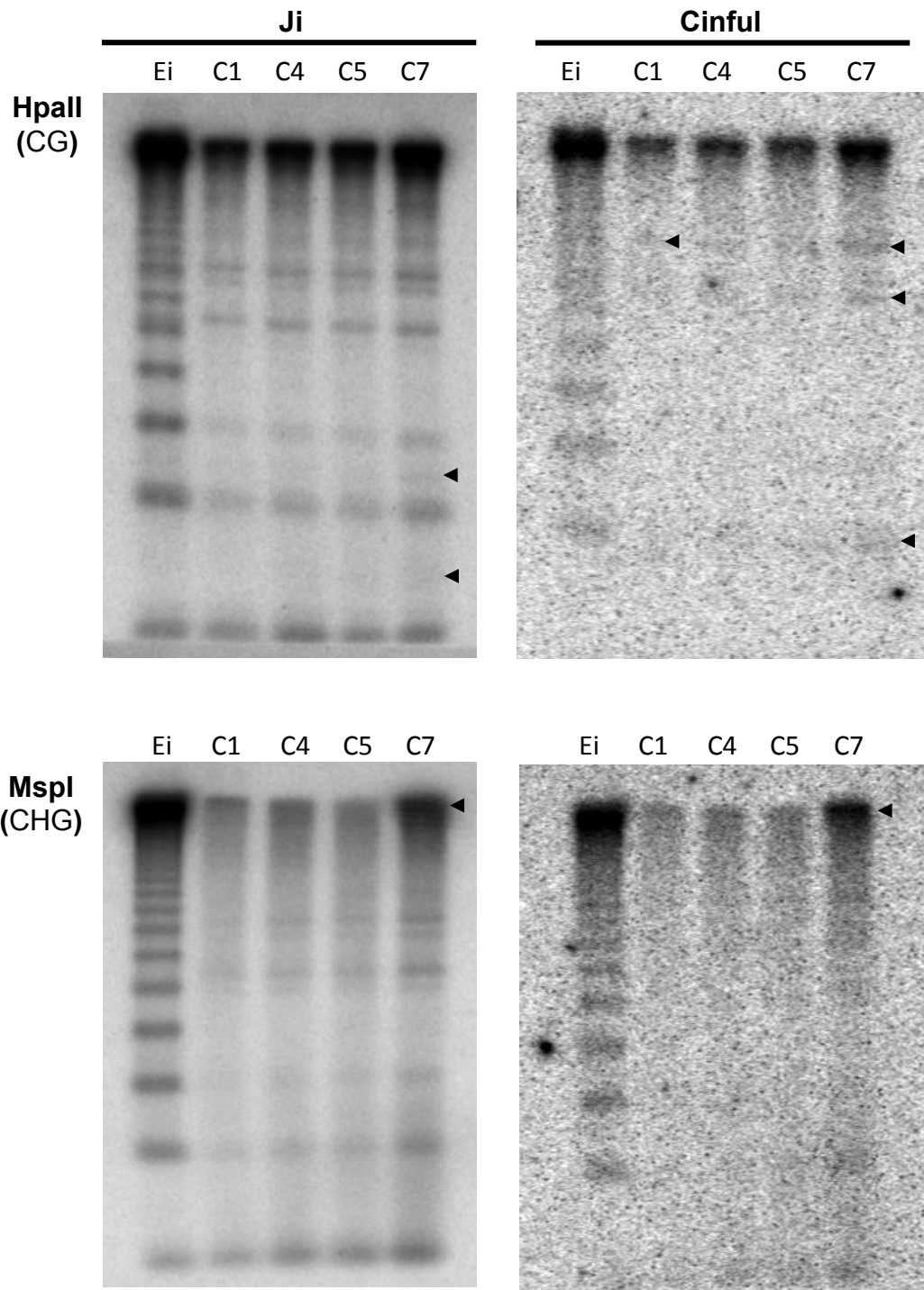
**Figura 12. Esquema representativo del alineamiento y diseño de oligos para el transposón Cinfu.** La banda azul claro representa una de las regiones dentro del genoma de maíz en el cual alinean las secuencias reportadas para Cinfu (línea azul marino); las líneas rojas representan la región conservada en donde se diseñaron los oligos. Los asteriscos indican los nucleótidos conservados entre diferentes copias de Cinfu.

Los retrotransposones Ji y Cinfu mostraron patrones de metilación muy diferentes entre embrión inmaduro y callos inducidos a partir de este (figuras 13 y 15). La digestión con ambos isoesquizómeros, tanto HpaII como MspI presentó mayores niveles de digestión en embrión inmaduro que en los callos (figura 13). Esto sugeriría que entre el explante y la inducción se presentan cambios en la metilación en contexto CCG (CHG) más que en el contexto CGG (CG), ya que ambas enzimas son sensibles a la metilación en la citosina externa, pero solo HpaII es sensible a la metilación de la citosina interna en el sitio de corte (5'-CCGG-3').

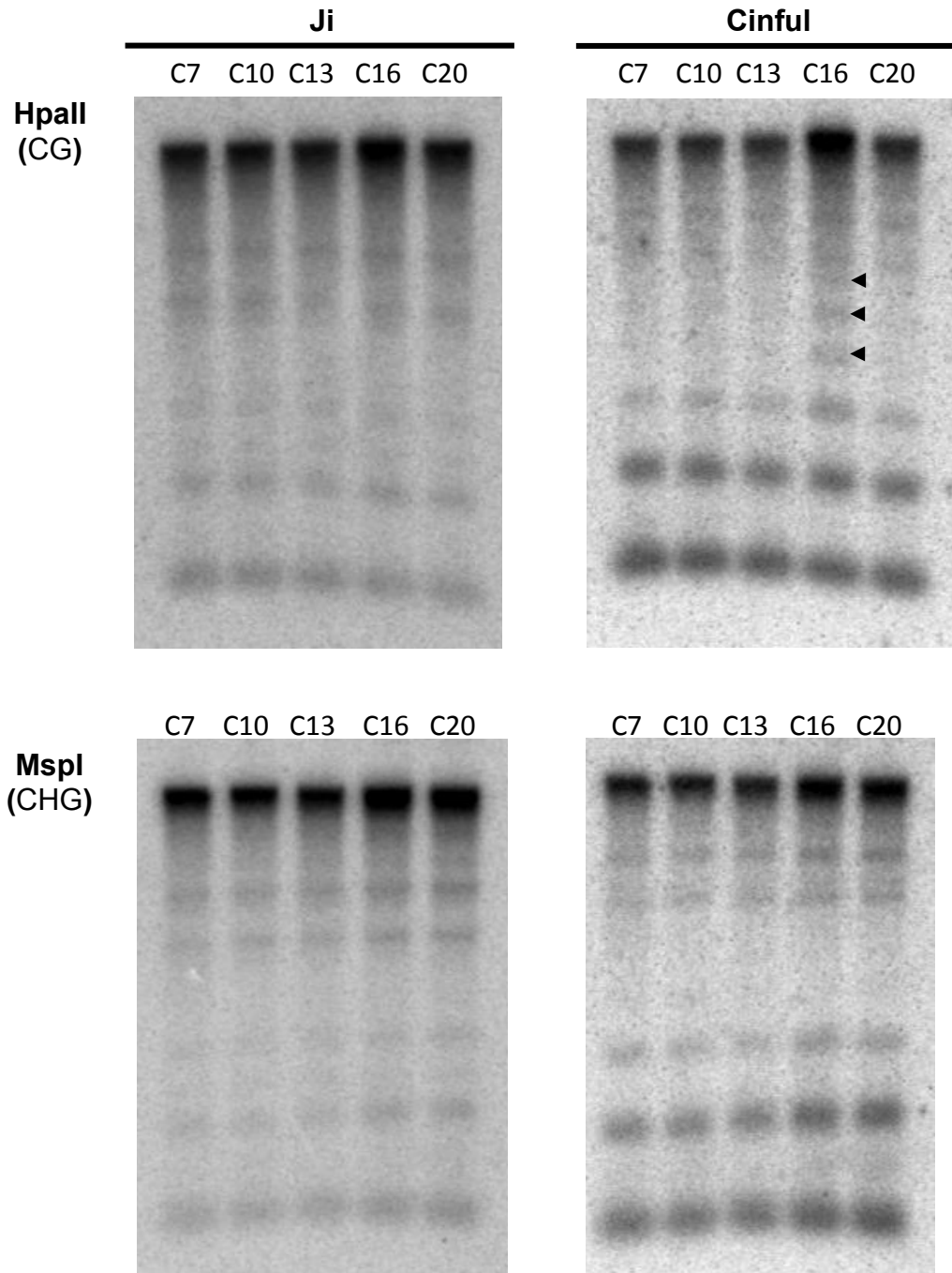
El patrón del transposon Ji establecido en C1 permanece casi sin cambios durante el resto de subcultivos en la fase de inducción-establecimiento, lo cual indica que la metilación en contexto CHG inducida durante la desdiferenciación se mantiene en el establecimiento del cultivo proliferativo (figura 13). Sin embargo, al llegar a C7 se comienzan a enriquecer dos bandas de bajo peso molecular en el patrón de HpaII que se encontraban ausentes o muy tenues en los cultivos anteriores por lo que se podría pensar que comienza a desmetilarse la secuencia de DNA pero no en los mismos sitios que en el embrión inmaduro, pues las bandas enriquecidas no corresponden a las observadas en el patrón de embrión inmaduro.

Por otro lado, para el transposón CinfuI sí se observan cambios claros entre los patrones de metilación adquiridos en C1 y los subcultivos posteriores (C4 a C7). Los triángulos negros indican bandas que son enriquecidas o que aparecen en los subcultivos C5 y C7. Esto estaría indicando un aumento en la metilación en contexto CHG ya que se observa un comportamiento similar entre las digestiones con HpaII y MspI. Sin embargo, para CinfuI, también se observan bandas que aparecen solo en el patrón de HpaII en C7 y no en el de MspI, sugiriendo que también hay cambios de la metilación en el contexto CG del transposón en el establecimiento del callo embriogénico proliferativo.

El análisis del transposón Ji con HpaII y MspI en el lote de propagación indicó que el patrón de bandeos no cambia a lo largo de los subcultivos prolongados (figura 14) por lo que se podría pensar que una vez establecida la metilación en los contextos CG y CHG, esta se mantiene. Para CinfuI, si bien se aprecia un comportamiento similar al de Ji, al emplear HpaII se detectó la presencia de tres bandas en C16 que se encuentran ausentes en los demás tiempos de subcultivo. Esto denotaría una baja en la metilación en contexto CG de CinfuI en los cultivos de 16 meses concomitante con la desmetilación en contexto CHH que se observó en la secuencia de rDNA 5S (figura 10).



**Figura 13. Southern blot del DNA del lote de inducción digerido con distintas enzimas metilosensibles e hibridados con sondas para los retrotransposones Ji y Ciful.** HpaII es una enzima de restricción sensible a metilación en contexto CG, mientras que MspI es sensible a metilación en contexto CHG. Los triángulos negros señalan un cambio notable en el patrón de bando de cada tejido analizado.



**Figura 14. Southern blot del DNA del lote de mantenimiento digerido con distintas enzimas metilosensibles e hibridados con sondas para los retrotransposones Ji y CinfuI.** HpaII es una enzima de restricción sensible a metilación en contexto CG, mientras que MspI es sensible a metilación en contexto CHG. Los triángulos negros señalan un cambio notable en el patrón de bando de cada tejido analizado.

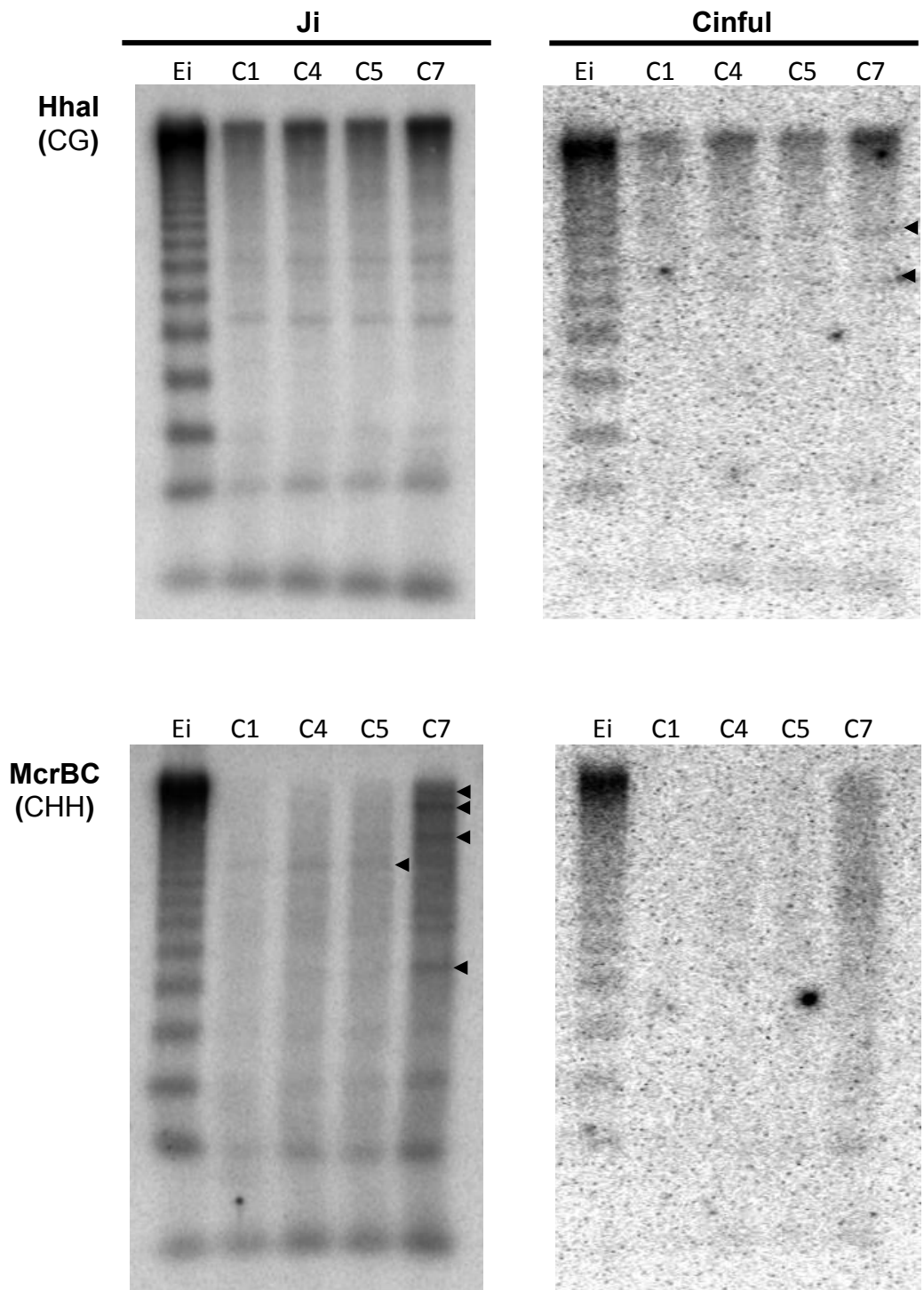
Otra posibilidad, dada la heterogeneidad de las muestras de callos que se toman para el análisis, podría ser la presencia de rearrreglos cromosomales en la muestra tomada a este tiempo de subcultivo. Por otra parte, el patrón de hibridación con

Cinful en DNA digerido con MspI mostró un patrón de bandeo constante a lo largo de los subcultivos de C7 hasta C20 sugiriendo que la metilación en contexto CHG no se ve afectada por el subcultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz.

Los patrones de bandeo generados por la enzima HhaI para Ji y Cinful en el DNA correspondiente al lote de inducción confirmaron los bajos niveles de metilación en contexto CG para embrión inmaduro, los cuales se pierden para establecer nuevos patrones de metilación durante la inducción y establecimiento de los callos embriogénicos (figura 15).

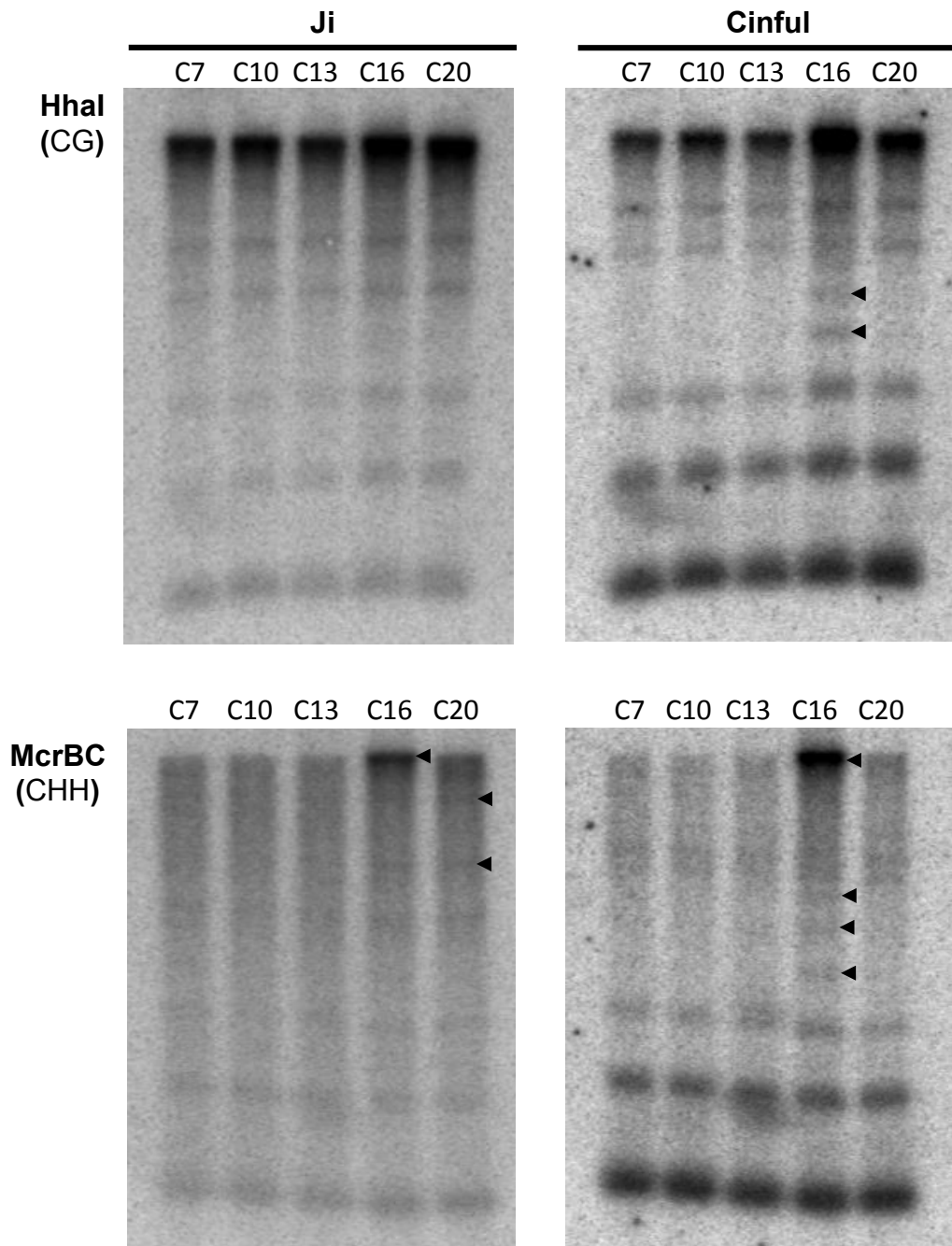
Por otra parte, al observar el patrón de bandeo en Ei adquirido al utilizar McrBC se puede apreciar que la mayor parte de la hibridación para Ji o Cinful ocurre en DNA no digerido, por lo que dentro del contexto CHH el DNA de este tejido se encuentra desmetilado. Lo contrario se observa en C1 y C4, donde el patrón de bandeo desplazado hacia fragmentos de bajo peso molecular denotaría que la enzima está siendo activa sobre DNA metilado. Este comportamiento cambia en el subcultivo C7, donde aparecen nuevamente bandas de alto peso molecular que se encontraban ausentes en C1 y C4, indicando cierta disminución de la metilación en CHH hacia el establecimiento de la propagación de callos embriogénicos.

Finalmente, los patrones de hibridación de Ji y Cinful para las digestiones realizadas con HhaI y McrBC confirman que ocurren pocos cambios en los niveles de metilación en contexto CG y CHH durante el mantenimiento prolongado de los subcultivos de callos embriogénicos de maíz (figura 16), excepto para la muestra de 16 meses de subcultivo. Interesantemente, al observar el patrón generado por McrBC en Ji para esta muestra se observa una hibridación muy marcada en DNA no digerido lo cual apoya los resultados anteriores que sugerían que en callos de 16 meses hay una pérdida de la metilación CHH. En este caso, se aprecian dos bandas (señaladas con triángulos negros) que se mantienen en la muestra de C20 apoyando que el cambio en este tipo de metilación podría ser algo independiente de la heterogeneidad inherente a las muestras.



**Figura 15. Southern blot del DNA del lote de inducción digerido con distintas enzimas metilosensibles e hibridados con sondas para los retrotransposones Ji y Cinfu.** HhaI es una enzima de restricción sensible a metilación en contexto CG, mientras que McrBC corta DNA metilado en contexto CHH. Los triángulos negros señalan un cambio notable en el patrón de bando de cada tejido analizado.

De manera similar en la hibridación con Cinfu1, tanto para la enzima Hha1 como para McrBC, la única etapa en donde se pueden ver cambios en el patrón de bandeo es en callos de 16 meses de subcultivo (figura 16).



**Figura 16. Southern blot del DNA del lote de mantenimiento digerido con distintas enzimas metilosensibles e hibridados con sondas para los retrotransposones Ji y Cinfu1.** Hha1 es una enzima de restricción sensible a metilación en contexto CG, mientras que McrBC corta DNA metilado en contexto CHH. Los triángulos negros señalan un cambio notable en el patrón de bando de cada tejido analizado.

## 9. DISCUSIÓN

En el estudio realizado observamos que durante la inducción de callos embriogénicos de maíz, el gen rDNA 5S presenta pocos cambios de la metilación dentro del contexto CG. Este tipo de metilación se mantiene elevada durante la inducción y establecimiento del cultivo de callos. Este comportamiento concuerda con el hecho de que en las plantas a diferencia de los animales (en donde la metilación en contexto CG es predominante), se puede dar metilación del DNA en tres contextos: metilación en sitios CG que se presenta en un nivel muy alto, CHG que se encuentra en un nivel medio y CHH que se encuentra en un nivel bajo (Feng *et al* 2010). Si bien la metilación CG se da comúnmente en la represión de genes codificantes para proteínas por la metiltransferasa 1 (MET1) (Meyer 2011), nuestros resultados apuntan a que esta metiltransferasa también se puede encontrar activa en secuencias repetidas, particularmente manteniendo la metilación CG del gen rDNA 5S.

A pesar de lo anterior, en nuestro estudio observamos que durante el paso de embrión inmaduro a callo de un mes existe una ligera caída de la metilación CG. En *Arabidopsis thaliana*, la metilación tanto en contexto CG como CHG está implicada en el silenciamiento específico del gen rDNA 5S para prevenir la producción de transcritos aberrantes en el locus de rDNA 5S (Douet y Tourmente 2007). Este fenómeno se observa tanto durante la inducción como en la fase de propagación de callos embriogénicos de maíz, donde el contexto de metilación CG permanece elevado y casi invariable después de la fase de inducción (panel superior derecho, figura 10) y es mantenido durante el proceso de propagación del cultivo de callos embriogénicos de maíz hasta por 20 meses (panel superior derecho, figura 11). Sin embargo, al realizar el ensayo con otra enzima sensible a la metilación CG, los ligeros cambios en la metilación observados durante el paso de embrión inmaduro a callo de un mes son más evidentes (panel inferior izquierdo, figura 10), en donde además se hace notoria la disminución de la metilación en callos de 10 meses, restableciéndose parcialmente en C13 y C16 para su posterior pérdida en menor



medida en C20 (panel inferior izquierdo, figura 11). Esto indicaría que la metilación CG es importante para la regulación del gen rDNA 5S durante la inducción y subcultivo prologado de callos embriogénicos en *Zea mays*, similar a lo observado en *Arabidopsis thaliana*.

Por otro lado, la secuencia rDNA 5S en contexto CHG permanece desmetilada y prácticamente constante a lo largo del proceso de inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz, muy probablemente debido a que la vía principal de silenciamiento en este proceso no está dada por la cromometilasa 3 (CMT3), la metiltransferasa específica de plantas encargada de regular la metilación en CHG (Meyer 2011) y no se afecta por la exposición a 2,4-D, pues el patrón de metilación es idéntico tanto en todos los tiempos de subcultivo de los callos embriogénicos como en embrión inmaduro. En un futuro esto podría ser confirmado mediante la identificación de CMT3 y la determinación de su actividad pues se sabe que en mutantes *cmt3* en *Arabidopsis thaliana* disminuye la metilación CHG del locus rDNA 5S y que al ser complementada la mutación se restablece la metilación con respecto a la planta silvestre (Du *et al* 2012). De igual manera sería interesante averiguar si el comportamiento observado se relaciona con las metiltransferasas de histonas SUVH4, SUVH5 y SUVH6 que actúan en conjunto con CMT3 para el control de la metilación CHG en las repetidas de rDNA 5S (Ebbs y Bender 2006).

El hecho de no haber observado cambios importantes en la metilación simétrica (CG/CHG) del gen rDNA 5S no implica que no tenga relevancia, pues en mutantes *met1-1* y *cmt3-7* en *Arabidopsis thaliana* se ha observado que una reducción de la metilación en contextos CG y CHG se asocia a la pérdida del silenciamiento en el gen 5S (Mathieu *et al* 2003; Vaillant *et al* 2007). Por otro lado, estudios en callos de tabaco en estado de inducción y proliferación demuestran que existe una disminución en la metilación en contexto CG y CHG de otros genes de rDNA como lo son 18S, 5.8S y 26S (Koukalova *et al* 2005).

En *Arabidopsis thaliana* se ha observado que para secuencias repetidas en tándem, como lo es el caso del gen rDNA 5S, la principal vía por la cual se da el silenciamiento es a través de RdDM generando la metilación *de novo* en sitios asimétricos CHH (Wassenegger 2000; Wassenegger 2005; Huettel 2006). Este tipo de metilación es controlada por dominios remodeladores de metiltransferasa 2 (DRM2) (Meyer 2011). El análisis en nuestro estudio indica que para el gen rDNA 5S la secuencia en contexto CHH se encuentra en gran medida desmetilada en embrión inmaduro, y hay un aumento abrupto en la metilación durante la inducción (C1 y C4) que se va atenuando conforme se establece el callo embriogénico proliferativo (C7). De manera interesante, durante esta etapa también se observan cambios en los niveles de ra-siRNAs (figura 5). Así mismo, en mutantes de la vía RdDM en *Arabidopsis thaliana*: *nrpd1* (subunidad de la Pol IV), *rdr2*, *drm2*, *ago4* o *dlc3*, se ha observado una reducción de la metilación CHH en la secuencia del gen 5S rDNA (Douet *et al* 2009). Todo esto sugiere que durante la inducción y el inicio del establecimiento de callos embriogénicos de maíz se producen cambios importantes en la vía RdDM repercutiendo en la biogénesis de ra-siRNAs y en el estado de metilación asociado a la vía.

En mutantes *met1* y *ddm1* de *Arabidopsis thaliana*, la metilación del DNA en contexto CHH aumenta pero no es suficiente para reprimir por completo la transcripción (Blevins 2009). El factor de transcripción KTF1 que se une a Pol V y funciona como proteína adaptadora para AGO4, es codificado por el gen RDM3 y en mutantes *rdm3-1* se ha observado que la metilación CHH es reducida en loci blancos de la vía RdDM incluyendo a rDNA 5S y transposones. Particularmente la metilación de rDNA 5S se reduce en la mutante *rdm3* en todos los contextos (CG, CHG y CHH), siendo este un efecto muy similar al observado en las mutantes *nrpd1* y *nrpe1* (He *et al* 2009). También se ha observado que la presencia de hipometilación simétrica (CG/CHG) e hipermetilación asimétrica (CHH) en el gen rDNA 5S de *Arabidopsis thaliana* tiene efectos diferenciales, dependiendo de la localización cromosómica. Un incremento de la metilación asimétrica tiene mayor impacto en unidades de rDNA 5S localizadas en regiones pericentroméricas,

mientras que la disminución de la metilación simétrica afectará a los genes rDNA 5S en regiones de eucromatina (Vaillant *et al* 2008). De este modo, al no encontrar una gran variación en contextos CG y CHG, pero sí cambios importantes en el contexto CHH, se podría sugerir que la secuencia rDNA 5S muestra cambios en la metilación en regiones de heterocromatina justo al inicio de la inducción de callos embriogénicos de maíz.

Desde que se comenzó a estudiar el fenómeno de la variación somaclonal se propuso que las variantes morfológicas observadas en plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro*, incrementaban en frecuencia en los cultivos prolongados y que a su vez estas variantes probablemente eran consecuencia de cambios epigenéticos debidos a la exposición a las hormonas exógenas presentes en el cultivo (Larkin y Scowcroft 1981). En nuestro estudio durante el subcultivo prolongado de los callos embriogénicos de maíz, existe una disminución en la metilación en contexto CHH a los 16 meses de subcultivo en secuencias repetidas de rDNA 5S con respecto al resto de los tiempos de subcultivo. Por lo cual, la presencia de la auxina 2,4-D no solo juega un papel importante en el proceso de inducción de callos embriogénicos de maíz, sino que también afecta la metilación en contexto CHH cuando se mantiene el subcultivo por más de un año (16 meses). La fluctuación en los niveles de metilación en contexto CHH podría estar asociada a cambios en la actividad de las enzimas de la vía RdDM provocando la reorganización de regiones heterocromáticas y resultando en la obtención de distintas variante somaclonales a partir de callos cultivados *in vitro*.

No escapa a nuestra atención el hecho de que existen otros mecanismos epigenéticos para la regulación de la expresión génica, pues en *Arabidopsis thaliana* la combinación de los patrones de metilación simétricos y asimétricos, actúan en conjunto con la modificación de histonas. Un ejemplo de ello es la desacetilación de histonas por HDA6 que ayuda a asegurar la correcta represión del gen 5S (Mathieu *et al* 2003). Este tipo de modificación no fue abordada en el presente estudio pero valdría la pena revisarla en el modelo de callos embriogénicos de maíz.

En estudios recientes se ha encontrado que la ausencia de la topoisomerasa de DNA *TOP1α* conlleva a la pérdida de la represión de varios loci blanco de la vía RdDM a través de la reducción de la metilación del DNA y/o disminución de los niveles de H3K9me2. También se ha encontrado que *TOP1α* es prescindible para la biogénesis de siRNAs mediante Pol IV, pero es requerida para la producción de transcritos largos no codificantes de RNA dependientes de Pol V, pues *TOP1α* promueve el reclutamiento de AGO4 a loci blancos de la vía RdDM. En las mutantes *nrpe1-11* y *top1α-2* hay una disminución de la metilación del DNA en contexto CG por lo que para este tipo de metilación es requerida la presencia de *TOP1α*, Pol IV y Pol V. Sin embargo, en la mutante *top1α-2* no se observaron cambios en la metilación CHH en repetidas 5S (Dinh *et al* 2014). Esto nos dice que a pesar de la gran cantidad de información que se tiene, aún existen partes del mecanismo de silenciamiento de la secuencia 5S que se desconocen en maíz.

Las mutaciones *met1*, *ddm1* y *cmt3* de *Arabidopsis* también se han asociado a la pérdida del silenciamiento de elementos transponibles (Lindroth *et al* 2001). De igual manera, como ya se planteó para el gen rDNA 5S, esta pérdida de marcas represivas puede ser debida a una respuesta al estrés generado por la exposición a 2,4-D.

En tabaco, una respuesta al estrés por infección se da de manera activa sobre el retrotransposon Copia-like *Tnt1*, dicho proceso es mediado a través del promotor LTR de *Tnt1*, el cual tiene regiones que son similares a genes de defensa a patógenos (Capy *et al* 2000). Inclusive entre cultivos de cebada silvestre que crecen en la misma región geográfica, el retrotransposon Copia-like *BARE-1*, muestra una diferencia en tres veces el número de copias de este transposón debido a ligeros cambios ambientales (Kalendar *et al* 2000). Es muy probable que el estrés generado por la auxina 2,4-D también repercuta principalmente en retrotransposones LTR de la clase Copia durante la inducción y mantenimiento de callos embriogénicos de maíz. En este estudio se observó que los retrotransposones Ji y Cinfu

(pertenecientes a las clases Copia y Gypsy, respectivamente), mostraron cambios en la metilación en contexto CHG, más que en contexto CG, entre embrión inmaduro y la inducción de callos embriogénicos. Este cambio fue más pronunciado para el retrotransposon Ji.

En plantas se sabe que la metilación no-CG se encuentra prácticamente ausente en genes pero es abundante en TEs (Zemach *et al* 2010). En el caso particular del cultivo de tejidos *in vitro*, una caída de la metilación en contexto CHG del retrotransposon Ji es inducida durante la desdiferenciación y se mantiene en el establecimiento del cultivo proliferativo (figura 13). Sin embargo, al llegar al establecimiento del callo embriogénico (C7) la metilación de la secuencia de DNA disminuye aún más. Esto sugiere que la respuesta a las condiciones de estrés puede ser diferencial entre periodos cortos y largos apoyando la idea de un reajuste en las maquinarias de silenciamiento de secuencias repetidas durante la inducción, establecimiento y proliferación de los callos embriogénicos. Este tipo de cambios ocurren cuando una población u organismo se enfrenta a un cambio ambiental de larga duración donde la variabilidad genética inducida por la actividad de TEs puede favorecer una adaptación más rápida (Capy *et al* 2000).

La metilación en contexto CHG del transposón Ji establecido en C1 permanece casi sin cambios durante el resto de subcultivos en la fase de inducción-establecimiento, (figura 13). Sin embargo, en el contexto de metilación CG al llegar a C7 comienza a desmetilarse la secuencia de DNA aunque no se recupera el patrón de metilación original correspondiente al explante del cual se partió (Ei). Con lo anterior se esperaría que la metiltransferasa CMT3 (contexto CHG) no participa en el proceso y el silenciamiento se da a través de la metilación por MET1 (contexto CG). Sin embargo, se ha observado que en mutantes *cmt3* de *Arabidopsis thaliana*, los retrotransposones de la familia Copia (*TA3/ATCOPIA44* y *ATCOPIA4/COPIA-LIKE23*) presentan una disminución de la metilación CHG aunada a la expresión de este tipo de transposones (Lindroth *et al* 2001; Tompa *et al* 2002; Lippman *et al* 2003). Por otra parte, en mutantes *met1* se pierde la metilación en CG pero no se

activan los transposones como en *cmt3* (Lippman *et al* 2003). De esta manera, nuevamente surge la necesidad de determinar la presencia y funcionalidad de las metiltransferasas de DNA involucradas en el silenciamiento de TEs durante la inducción y cultivo de callos embriogénicos de maíz. Por otra parte, es necesario determinar si los cambios observados en la metilación correlacionan con cambios en la expresión de los transposones analizados. El éxito del silenciamiento radica en la acción conjunta de distintas enzimas y vías de silenciamiento epigenético (Lisch 2009).

Para el transposón Cinful, después de la desmetilación observada durante la inducción, hay un aumento gradual en la metilación tanto en contexto CG como en CHG en subcultivos posteriores hasta llegar a C7. Interesantemente y contrario a lo observado para retrotransposones de la familia Copia, en *Arabidopsis thaliana* los transposones de clase Gypsy *ATALNTYS2* y *ATGP1* permanecen silenciados en mutantes *cmt3*, *met1* y *ddm1* (Lippman *et al* 2003). Este comportamiento diferencial entre los retrotransposones de las familias Copia y Gypsy recalca el hecho de que un solo tipo de metilación no es suficiente para silenciar un TE y que la ausencia de un tipo de metiltransferasa puede generar aumento de la metilación en otro tipo de contextos. Por ejemplo, mutantes de *met1* en *Arabidopsis thaliana* inducen hipermetilación en los contextos CHG y CHH de retrotransposones de la familia Gypsy (Stroud *et al*, 2013). De esta manera, un organismo responde a la pérdida de metilación de DNA en cierto contexto activando el silenciamiento por otra vía para garantizar la regulación de elementos repetidos. Esta situación pudiera estar sucediendo en el caso del transposón Cinful en C7 en caso de que se estuviera expresando, ya que se promueve la hipermetilación de TEs cuando estos son transcripcionalmente reactivados. Tal es el caso del retrotransposon LTR de la familia Gypsy *Athila* en *Arabidopsis thaliana* (Stroud *et al* 2013).

En el cultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz una vez establecida la metilación en los contextos CG y CHG, esta se mantiene a lo largo de los subcultivos en proliferación para el transposón Ji. Esto refuerza la idea de que una vez que se

inducen los callos embriogénicos no cambia la metilación de los transposones de clase Copia. Para Cinfu, si bien se aprecia un comportamiento similar al de Ji, existe una baja en la metilación en contexto CG en los cultivos de 16 meses concomitante con la desmetilación en contexto CHH que se observó en la secuencia de rDNA 5S (figura 10), mientras que la metilación en contexto CHG no se afecta. Este comportamiento concuerda con lo reportado en *Arabidopsis thaliana* donde los retrotransposones de la clase Gypsy no se ven afectados en mutantes *cmt3* (Lippman *et al*, 2003).

Por otra parte, para ambos transposones Ji y Cinfu el explante original mostró DNA desmetilado en contexto CHH, lo cual fue revertido durante el proceso de inducción en C1 y C4. En el subcultivo C7, hay cierta disminución de la metilación en CHH coincidente con el establecimiento de la proliferación de los callos embriogénicos. Como ya se mencionó anteriormente, la vía principal por la cual se lleva a cabo el silenciamiento de secuencias repetidas en este contexto es a través de la vía RdDM y la acción de la metiltransferasa RDR2. Sin embargo, recientemente se reportó para *Arabidopsis thaliana*, que cuando se afecta esta vía de silenciamiento, miRNAs que tienen como blanco a TEs asociados a AGO4 y otras enzimas pueden sustituir parcialmente el rol de los ra-siRNAs (Creasey *et al* 2014).

En maíz, el ortólogo de RDR2 se denomina MOP1. Las mutaciones *mop1* pueden resultar en la reactivación de transposones como *Mutator* y reducir en gran medida los niveles globales de siRNAs de 24 nt (Lisch 2009). De los retrotransposones que se expresan en *mop1*, los principales son los pertenecientes a las clases Copia y Gypsy. Dentro de la clase Copia las familias Ji y Opie se encuentran expresadas (Jia *et al* 2009). Esto implicaría que en embrión inmaduro, Ji podría encontrarse desmetilado y expresándose para promover una futura hipermetilación vía RdDM. La presencia de 2,4-D activa la metilación de este transposón pero con el transcurso de los subcultivos (C7) el proceso se revierte probablemente por cambios en la actividad de las vías de silenciamiento.

Por otro lado, en la mutante *mop1* los retrotransposones de las familias Flip y Huck de la clase Gypsy estaban expresados, mientras que las familias Cinfu-zeon y Prem1 se encontraban con niveles bajos de expresión (Jia *et al* 2009). Aunque la familia Cinfu-zeon es diferente a la familia Cinfu estudiada en el presente trabajo, estos datos sugieren que la expresión de distintas familias de retrotransposones está regulada por distintos mecanismos que involucran la metilación CHH (Stroud *et al* 2013).

La activación de transposones en el cultivo de tejidos de plantas es una fuente de variación epigenética (Kaepler *et al* 2000). Se ha observado la activación tanto de elementos de Clase I como de Clase II (Hirochika *et al* 1996; Jiang *et al* 2003; Peschke y Phillips 1991). La activación del retroelemento *Tos17* en cultivo de tejidos es transitorio; en plantas regeneradas y en su progenie, las copias transpuestas del elemento se metilan en gran medida y se inactivan durante el desarrollo de la planta (Cheng *et al* 2006).

Se ha propuesto que existe una relación entre el número de copias de TEs, el grado de incremento de copias nuevas a través de transposición y la eficiencia del silenciamiento de TEs mediante siRNAs. Si hay un número elevado de copias nuevas de TEs que son producidas en un solo evento, estas copias tendrán un alto grado de similitud entre sus secuencias debido a que el grado de divergencia molecular entre copias está en función del tiempo. Mientras que los siRNAs que son generados a partir de las copias recientemente transpuestas, podrán silenciar otras copias en el genoma (Hollister *et al* 2011).

Mediante análisis bioinformático, se ha encontrado que en maíz el número promedio de ESTs correspondientes a TEs LTR Gypsy-like (Gypsy) es más de tres veces mayor que cualquier otra clase de TE, seguidos de los retrotransposones LTR Copia-like (Copia) y CACTA. Los valores dentro de cada clase de TE varía para cada familia. La predominancia de los elementos Gypsy no es resultado de una alta presencia en bases de datos de ESTs de una o varias familias, ya que en general



la mayor parte de las familias de Gypsy tienen un alto nivel de transcripción comparado con otras familias. Sin embargo, el número de copias de cada familia de TEs no correlaciona con los números de ESTs reportados (Vicient C. 2010).

Finalmente, en los cultivos prolongados se observó un cambio particular en la metilación de secuencias repetidas para la muestra de 16 meses de subcultivo. Si bien la pérdida de metilación CHH podría ser el resultado de cambios en la actividad de los mecanismos ya discutidos, también podría deberse a la función de otro tipo de proteínas involucradas indirectamente en las vías de silenciamiento. En este sentido, la pérdida de *TOP1α* en *Arabidopsis thaliana* resultó en la de-represión de loci blancos de RdDM, particularmente del transposon de clase Gypsy *AtGP1* (Dinh *et al*, 2014).

Otro ejemplo que apoya esta idea es un estudio que encontró que el retrotransposon LTR de la familia Gypsy, *Athila6* en plantas silvestres de *Arabidopsis* mostraba altos niveles de metilación CG (93.9%), niveles intermedios de metilación CHG (54.7%), y niveles bajos de metilación CHH (15.9%). Curiosamente, este retrotransposon se encontraba transcripcionalmente activo en mutantes *ddm1*, donde la metilación CG se reducía y la metilación CHH se incrementaba en más de 4 veces comparado con las plantas silvestres (Nuthikattu *et al* 2013).

En publicaciones recientes han demostrado que la metilación del DNA *de novo* puede darse también mediante siRNAs de 21 nt. En este caso, el silenciamiento de TEs ocurre de manera independiente de Pol IV-RdDM, utilizando siRNAs de 21-22 nt que dependen de RDR6 y DCL2 en *Arabidopsis*. Se demostró que esta vía alternativa puede metilar y mantener el silenciamiento del retrotransposon LTR *AtCopia18A* y de la familia AtREP1 helitron (Pontier *et al* 2012).

En otro estudio, siRNAs de tres tipos de tamaños (21, 22 y 24 nt) mostraron estar enriquecidos en regiones heterocromáticas donde se encuentran agrupados transposones. Las distintas clases de tamaños de siRNAs parecen estar

preferencialmente asociados con los diferentes tipos de repetidas. Los siRNAs de 24 nt se encuentran asociados con mayor frecuencia a repetidas interdispersas, mientras que los siRNAs de 21 y 22 nt se encuentran mayoritariamente con repetidas invertidas (Zhang *et al* 2007). Esto hace necesario diferenciar los tamaños de RNAs pequeños asociados a repetidas en nuestro estudio, pues dada la evidencia previa no se descarta que este mecanismo tenga una participación importante en la regulación de retrotransposones de clase Copia.

Un trabajo realizado con suspensiones celulares inmortalizadas de *Arabidopsis thaliana* encontró que los siRNAs de 24 nt mostraban un decremento en las suspensiones. Los siRNAs específicos para TEs que perdían marcas de heterocromatina y se volvían transcripcionalmente activos en suspensiones celulares (*Athila*, *AtCopia*, *AtMu* y elementos *Helitron*) mostraron un mayor cambio en la frecuencia relativa de 24 a 21 nt. En contraste, los siRNAs específicos para TEs que no perdían marcas de heterocromatina y permanecían silenciados en suspensiones celulares (*Atlantys*, *AtGP* y *AtENSPM*) retenían la distribución del tamaño de siRNAs encontrados en callos y en hoja (Tanurdzic *et al* 2008). Esto sugeriría que en cultivos celulares los retrotransposones de clase Copia pierden el silenciamiento de manera importante debido a cambios en la vía RdDM, mientras que los retrotransposones de clase Gypsy no se afectan. Sin embargo, en nuestro modelo la pérdida de metilación se da tanto en transposones de clase Gypsy como Copia, por lo cual será necesario profundizar en la regulación de marcas represivas y en la activación de TEs durante el subcultivo de callos embriogénicos de maíz.

## 10. CONCLUSIONES

1) Durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz, la metilación en contextos CG y CHG no varía en las secuencias repetidas de rDNA 5S. Sin embargo, se induce la metilación en contexto CHH en regiones de heterocromatina durante la inducción de callos embriogénicos de maíz.

2) En cultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz, se mantienen los patrones de metilación en los tres distintos tipos de contextos (CG, CHG y CHH) en secuencias repetidas como rDNA 5S. Se observó una caída transitoria en la metilación en el contexto CHH en cultivos de 16 meses.

3) La inducción de callos embriogénicos a partir de embrión inmaduro de maíz en presencia de la auxina 2,4-D incrementa de manera importante la metilación de retrotransposones LTR de la clase Copia y Gypsy. Una vez establecido el cultivo de los callos embriogénicos existe poco cambio aparente de la metilación en contexto CHG, pero en el contexto CG se produce una desmetilación a los 7 meses de subcultivo, siendo el cambio más pronunciado para el retrotransposon Ji de la clase Copia.

4) Durante los subcultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz, los retrotransposones Ji y Cinfu mantienen patrones de metilación diferentes a los observados en el explante original (embrión inmaduro). Cinfu (de la clase Gypsy), mostró caída transitoria de la metilación en contexto CG y CHH, pero no en CHG, en el subcultivo de 16 meses.

## 11.PERSPECTIVAS

Determinar si el proceso observado en cada uno de los ensayos de Southern blot es reproducible y no debido a la heterogeneidad de la muestra.

Evaluar el estado de expresión de cada una de las secuencias estudiadas en el presente trabajo para determinar si la pérdida de la metilación es concomitante con el aumento de la actividad transcripcional.

Determinar la presencia de los ortólogos de las metiltransferasas MET1 y CMT3, así como de RDR2 en maíz y la funcionalidad de cada una de ellas en todos los tiempos de cultivo de callos embriogénicos de maíz.

Determinar si la frecuencia de siRNAs de 21, 22 y 24 nt para cada secuencia repetida es variable durante la inducción, establecimiento y proliferación de callos embriogénicos de maíz y su correlación con los cambios de metilación observados en este trabajo.

## 12. BIBLIOGRAFÍA

Alejandri-Ramírez N. Regulación de la expresión genética mediada por RNAs pequeños en callos embriogénicos de maíz. 2014 Tesis doctoral en proceso, UNAM.

Avivi Y., Morad V., Ben-Meir H., *et al.* Reorganization of specific chromosomal domains and activation of silent genes in plant cells acquiring pluripotentiality. *Developmental Dynamics* 2004; 230: 12-22.

Bai S., Chen L., Yund M., *et al.* Mechanisms of Plant Embryo Development. *Current topics in developmental biology* 2000; 50: 61-88.

Berdasco M., Alcázar R., García-Ortiz M. V., *et al.* Promoter DNA hypermethylation and gene repression in undifferentiated *Arabidopsis* cells. *PLoS ONE* 2008; 3: e3306.

Bernatavichute, Y.V., Zhang, X., Cokus, S., *et al.* Genome-wide association of histone H3 lysine nine methylation with CHG DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* 2008; 3: e3156.

Bird A. Perceptions of epigenetics. *Nature* 2007; 447: 396-398.

Biswas M., Dutt M., Roy U. K., *et al.* Development and evaluation of in vitro somaclonal variation in strawberry for improved horticultural traits. *Scientia Horticulturae* 2009; 122: 409-416.

Blevins T., Pontes O., Pikaard C., *et al.* Heterochromatic siRNAs and DDM1 Independently Silence Aberrant 5S rDNA Transcripts in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 2009; 4: e5932.

Boyko A., Blevins T., Yao Y., *et al.* Transgenerational Adaptation of *Arabidops* is to Stress Requires DNA Methylation and the Function of Dicer-Like Proteins. PLoS ONE 2010; 5: e9514.

Briones V. y Muegge K. The ghosts in the machine: DNA methylation and the mystery of differentiation. Biochimica et biophysica acta 2012; 1819: 757-762.

Campell B.R., Song Y., Posch T. E., *et al.* Sequence and organization of 5S ribosomal RNA-encoding genes of *Arabidopsis thaliana*. Gene 1992; 112: 225-228.

Capy, P., Gasperi, G., Biemont, C. *et al.* Stress and transposable elements: co-evolution or useful parasites? Heredity 2000; 85: 101-106.

Castel S. y Martienssen R. RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. Nature reviews. Genetics 2013; 14: 100-112.

Chan, S., Zilberman, D., Xie, Z., *et al.* RNA silencing genes control de novo DNA methylation. Science 2004; 303: 1336.

Chan, S., Zhang, X., Bernatavichute, Y. V., *et al.* Two- step recruitment of RNA-directed DNA methylation to tandem repeats. PLoS Biology 2006; 4: e363.

Chen X. Small RNAs and Their Roles in Plant Development. The Annual Review of Cell and Developmental Biology 2009; 35: 21-44.

Cheng C., Daigen M. y Hirochika H. Epigenetic regulation of the rice retrotransposon Tos17. Mol. Genet. Genomics 2006; 276:378-390.

Choi Y., Gehring M., Johnson L., *et al.* DEMETER, a DNA Glycosylase Domain Protein, Is Required for Endosperm Gene Imprinting and Seed Viability in *Arabidopsis*. Cell 2002; 110: 33-42.

Clark M. S., Parker, J. S. y Ainsworth, C. C. Repeated DNA and heterochromatin structure in *Rumex acetosa*. *Heredity* 1993; 70: 527-536.

Creasey K. M., Zhai J., Borges F., *et al.* miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*. *Nature* 2014; 508: 411-415.

Dinh T., Gao L., Liu X., *et al.* DNA Topoisomerase 1 $\alpha$  Promotes Transcriptional Silencing of Transposable Elements through DNA Methylation and Histone Lysine 9 Dimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 2014; 10: e1004446.

Dinkova T. D. and Alejandri-Ramírez N. R. MicroRNA expression and regulation during plant somatic embryogenesis. *In: Alvarez-Venegas et al. (Eds.) Epigenetics in Plants of Agronomic Importance: Fundamentals and Applications* 2014; DOI 10.1007/978-3-319-07971-4\_7, © Springer International Publishing Switzerland.

Douet J. y Tourmente S. Transcription of the 5S rRNA heterochromatic genes is epigenetically controlled in *Arabidopsis thaliana* and *Xenopus laevis*. *Heredity* 2007; 99: 5-13.

Douet J., Tutois S. y Tourmente S. A Pol V–Mediated Silencing, Independent of RNA–Directed DNA Methylation, Applies to 5S rDNA. *PLoS Genetics* 2009; 5: e1000690.

Du J., Zhong X., Bernatavichute Y., *et al.* Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell* 2012; 151: 167-180.

Ebbs M.L. y Bender, J. Locus-specific control of DNA methylation by the *Arabidopsis* SUVH5 histone methyltransferase. *Plant Cell* 2006; 18: 1166-1176.

Elhiti M. y Stasolla C. The use of zygotic embryos as explants for in vitro propagation: An overview. *In: Thorpe y Yeung (Eds.) Plant Embryo Culture and Protocols: Methods in Molecular Biology* 2011; DOI 10.1007/978-1-61737-988-8\_17 © Springer Science+Business Media, LLC.

El-Shami, M. Pontier D., Lamhy S., *et al.* Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved argonaute-binding platforms in RNAi-related components. *Genes & Development* 2007; 21, 2539-2544.

Engelman F. Cryopreservation of embryos: An overview. *In: Thorpe y Yeung (Eds.) Plant Embryo Culture and Protocols: Methods in Molecular Biology* 2011; DOI 10.1007/978-1-61737-988-8\_13 © Springer Science+Business Media, LLC.

FAO (Organización de las Naciones Unidas para Alimentación y la Agricultura) Proyectos (Versión en español). Markets, Seeds and Diversity. Semillas, Diversidad y Desarrollo (En línea). Fecha de consulta: 11-junio-2013.

<http://www.fao.org/economic/esa/seed2d/projects2/marketsseedsdiversity/casestudies/mexico/es/>

Fehér A., Pasternak T. y Dudits, D. Transition of somatic plant cells to an embryogenic state. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 2003; 74: 201-228.

Feng S., Cokus S., Zhang X., *et al.* Conservation and divergence of methylation patterning in plants and animals. *PNAS* 2010; 107: 8689-8694.

Feschotte C., Jiang N. y Wessler S. R. Plant transposable elements: where genetics meets genomics. *Nature reviews. Genetics* 2002; 3: 329-341.

Fierz B. y Muir T. W. Chromatin as an expansive canvas for chemical biology. *Nature Chemical Biology* 2012; 8: 417-427.



Gao Z., Liu H., Daxinger L., *et al.* An RNA polymerase II- and AGO4-associated protein acts in RNA-directed DNA methylation. *Nature* 2010; 465: 106-109.

Gemayel R., Vincens M., Legendre M., *et al.* Variable tandem repeats accelerate evolution of coding and regulatory sequences. *Annual review of genetics* 2010; 44: 445-477.

Goll, M. G. y Bestor, T. H. Eukaryotic cytosine methyltransferases. *Ann. Rev. Biochem* 2005; 74: 481-514.

He X., Chen T. y Zhu J. An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an argonaute 4- and RNA-binding protein. *Cell* 2009; 137: 498-508.

Henderson I. R. y Jacobsen S. E. Epigenetic inheritance in plants. *Nature* 2007; 447: 418-424.

Hirochika H., Sugimoto K., Otsuki Y., *et al.* Retrotransposons of rice involved in mutations induced by tissue culture. *PNAS* 1996; 93: 7783-7788.

Hollister J., Smith L., Guo Y., *et al.* Transposable elements and small RNAs contribute to gene expression divergence between *Arabidopsis thaliana* and *Arabidopsis lyrata*. *PNAS* 2011; 108: 2322-2327

Huetzel B., Kanno T., Daxinger L., *et al.* Endogenous targets of RNA-directed DNA methylation and Pol IV in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* 2006; 25: 2828-2836.

Jerabek H. y Heermann D. How Chromatin Looping and Nuclear Envelope Attachment Affect Genome Organization in Eukaryotic Cell Nuclei. *International Review of Cell and Molecular Biology* 2014; 307: 351-381.

Johnson L. M., Bostick M., Zhang X., *et al.* The SRA methyl-cytosine-binding domain links DNA and histone methylation. *Current Biology* 2007; 17: 379-384.

Jia Y., Lisch D., Ohtsu K., *et al.* Loss of RNA-dependent RNA polymerase 2 (RDR2) function causes widespread and unexpected changes in the expression of transposons, genes, and 24-nt small RNAs. *PLoS Genetics* 2009; 5: e1000737.

Jiang N., Bao Z., Zhang X., *et al.* An active DNA transposon family in rice. *Nature* 2003; 421: 163-167.

Jiménez-Villalobos, M. De J. Transformación genética de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays L.*) con el gen de la glicoproteína G del virus de rabia. 2006 Tesis para obtener el título de biólogo, UNAM.

Kaeppler S. M., Kaeppler H. F. y Rhee Y. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. *Plant molecular biology* 2000; 43: 179-188.

Kaeppler S. M., Phillips R. L. y Olhoft P. Molecular basis of heritable tissue culture-induced variation in plants. *In*: Jain, Brar y Ahloowalia (Eds.) *Somaclonal Variation and Induced Mutations in Crop Improvement*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht 1998; 465-484.

Kaeppler S. M. y Phillips R. L. Tissue culture-induced DNA methylation variation in maize. *PNAS* 1993; 90: 8773-8776.

Kalendar R., *et al.* Genome evolution of wild barley (*Hordeum spontaneum*) by BARE-1 retrotransposon dynamics in response to sharp microclimatic divergence. *PNAS* 2000; 97: 6603-6607.

Kim V. N., Han J. y Siomi M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 2009; 10: 126-139.

Kim Y., Heo I. y Kim V. N. Modifications of Small RNAs and Their Associated Proteins Young-Kook. *Cell* 2010; 143: 703-709.

Koukalova B., Fojtova M., Lim K. Y., *et al.* Dedifferentiation of tobacco cells is associated with ribosomal RNA gene hypomethylation, increased transcription, and chromatin alterations. *Plant Physiology* 2005; 139: 275-286.

Larkin, P. J. y Scowcroft W. R. Somaclonal Variation - a Novel Source of Variability from Cell Cultures for Plant Improvement. *Theoretical and Applied Genetics* 1981; 60: 197-214.

Lee, M. y Philips R. L. Genetic variability in progeny of regenerated maize plants. *Genome* 1987; 29: 344-355.

Levine, M. Differentiation of carrot root tissue grown in vitro. *Bulletin of the torrey botanical club* 1947; 74: 321-328.

Lichtenthaler H. K. The Stress Concept in Plants: An Introduction. *Annals New York Academy of Sciences* 1998; 851: 187-198.

Lindroth A., Cao X., Jackson J., *et al.* Requirement of CHROMOMETHYLASE 3 for maintenance of CpXpG methylation. *Science* 2001; 292: 2077-2080.

Lippman Z., May B., Yordan C., *et al.* Distinct Mechanisms Determine Transposon Inheritance and Methylation via Small Interfering RNA and Histone Modification. *PLoS Biology* 2003; 1: 400-428.

Lira-Medeiros C., Parisod C., Fernandes R., *et al.* Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment. *PLoS ONE* 2010; 5: e10326.

Lisch, D. Epigenetic regulation of transposable elements in plants. Annual review of plant biology 2009; 60: 43-66.

Lu Y., Rong T. y Cao M. Analysis of DNA methylation in different maize tissues. Journal of Genetics and Genomics. 2008. 35, 41-48.

Mathieu O., Jasencakova Z., Vaillant I., *et al.* Changes in 5S rDNA chromatin organization and transcription during heterochromatin establishment in Arabidopsis. The Plant Cell 2003; 15: 2929-2939.

Messing J., Bharti A., Karlowski W., *et al.* Sequence composition and genome organization of maize. PNAS 2004; 101: 14349-14354.

Meyer P. DNA methylation systems and targets in plants. FEBS letters 2011; 585: 2008-2015.

Miguel C. y Marum L. An epigenetic view of plant cells cultured in vitro: somaclonal variation and beyond. Journal of Experimental Botany 2011; 62: 3713-3725.

Nature glossary. Chromatin (En línea). Fecha de consulta: 09-febrero-2014.  
<http://www.nature.com/scitable/definition/chromatin-182>

Naumann K., Fischer A., Hofmann I. *et al.* Pivotal role of AtSUVH2 in heterochromatic histone methylation and gene silencing in Arabidopsis. The EMBO Journal 2005. 24, 1418–1429.

Nuthikattu S., McCue A., Panda K., *et al.* The initiation of epigenetic silencing of active transposable elements is triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. Plant Physiology 2013; 162: 116-131

Pan Y. B., Burner D. M. y Legendre, B. L. An assessment of the phylogenetic relationship among sugarcane and related taxa based on the nucleotide sequence of 5S rRNA intergenic spacers. *Genetica* 2000; 108: 285-295.

Pearson W. R. y Morrow J. F. Discrete-length repeated sequences in eukaryotic genomes. *PNAS* 1981; 78: 4016-4020.

Penterman J., Zilberman D., Huh J. H., *et al.* DNA demethylation in the *Arabidopsis* genome. *PNAS* 2007; 104: 6752-6757.

Peschke V. M. y Phillips R. L. Activation of the maize transposable element *Suppressor-mutator (Spm)* in tissue culture. *Theoretical and Applied Genetics* 1991; 81: 90-97.

Phillips R. L., Kaeppler S. M. y Olhoft P. Genetic instability of plant tissue cultures: breakdown of normal controls. *PNAS* 1994; 91: 5222-5226.

Pontier D., Picart C., Roudier F., *et al.* NERD, a plant-specific GW protein, defines an additional RNAi-dependent chromatin-based pathway in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 2012; 48: 121-132.

Reinders J., Wulff B., Mirouze M., *et al.* Compromised stability of DNA methylation and transposon immobilization in mosaic *Arabidopsis* epigenomes. *Genes & Development* 2009; 23: 939-950.

Riddle N. C. y Richards E. J. Genetic variation in epigenetic inheritance of ribosomal RNA gene methylation in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 2005; 41: 524-532.

Saze H., Tsugane K., Kanno T., *et al.* DNA Methylation in Plants: Relationship to Small RNAs and Histone Modifications, and Functions in Transposon Inactivation. *Plant & Cell Physiology* 2012; 53: 766-784.

Schaffer W. Terminology associated with cell, tissue and organ culture, molecular biology and molecular genetics. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* 1990; 26: 97-101.

Steward F., Mapes M. y Mears K. Growth and Organized Development of Cultured Cells. *American Journal of Botany* 1958; 45: 705-708.

Stroud H., Greenberg M. V. C., Feng S., *et al.* Comprehensive analysis of silencing mutants reveals complex regulation of the *Arabidopsis* methylome. *Cell* 2013; 152: 352-364.

Suzuki M. M. y Bird A. DNA methylation landscapes: provocative insights from epigenomics. *Nature Reviews Genetics* 2008; 9: 465-476.

Tanurdzic M., Vaughn, M., Jiang H., *et al.* Epigenomic consequences of immortalized plant cell suspension culture. *PLoS Biology* 2008; 6: 2880-2895.

Tompa R., McCallum J., Delrow J., *et al.* Genome-wide profiling of DNA methylation reveals transposon targets of CHROMOMETHYLASE 3. *Current Biology* 2002; 12: 65-68.

Vaillant I., Tutois S., Cuvillier C., *et al.* Regulation of *Arabidopsis thaliana* 5S rRNA Genes. *Plant Cell Physiology* 2007; 48: 745-752.

Vaillant I., Tutois S., Jasencakova Z., *et al.* Hypomethylation and hypermethylation of the tandem repetitive 5S rRNA genes in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 2008; 54: 299-309.

Vicient C. Transcriptional activity of transposable elements in maize. *BMC Genomics* 2010; 11: 601.

Wassenegger M. RNA-directed DNA methylation. *Plant Molecular Biology* 2000; 43, 203-220.

Wassenegger M. The role of the RNAi machinery in heterochromatin formation. *Cell* 2005; 122: 13-16.

Williams L., Zhao J., Morozova N., *et al.* Chromatin reorganization accompanying cellular dedifferentiation is associated with modifications of histone H3, redistribution of HP1, and activation of E2F-target genes. *Developmental Dynamics* 2003; 228: 113-120.

Woo H. R., Dittmer T. A. y Richards E. J. Three SRA-domain methylcytosine-binding proteins cooperate to maintain global CpG methylation and epigenetic silencing in *Arabidopsis*. *PLoS Genetics* 2008; 4: e1000156.

Woo H. R., Pontes O., Pikaard, C. *et al.* VIM1, a methylcytosine-binding protein required for centromeric heterochromatinization. *Genes & Development* 2007; 21: 267-277.

Zemach A., McDaniel I., Silva, P., *et al.* Genome-wide evolutionary analysis of eukaryotic DNA methylation. *Science* 2010; 328: 916-919.

Zhang X., Henderson I., Lu C., *et al.* Role of RNA polymerase IV in plant small RNA metabolism. *PNAS* 2007; 104: 4536-4541

Zhang X., Shiu S., Cal A., *et al.* Global analysis of genetic, epigenetic and transcriptional polymorphisms in *Arabidopsis thaliana* using whole genome tiling arrays. *PLoS Genetics* 2008; 4: e1000032.

Zheng B., Wang Z., Li S., *et al.* Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA- directed transcriptional gene silencing in *Arabidopsis*. *Genes & Development* 2009; 23: 2850-2860.

Zheng X., Pontes O., Zhu J., *et al.* ROS3 is an RNA-binding protein required for DNA demethylation in *Arabidopsis*. *Nature* 2008; 455: 1259-1262.

Zhu J., Kapoor A., Sridhar V. V., *et al.* The DNA Glycosylase/Lyase ROS1 Functions in Pruning DNA Methylation Patterns in *Arabidopsis*. *Current Biology* 2007; 17: 54-59.