



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Metilación en regiones promotoras de genes clave durante el
proceso de embriogénesis somática y su efecto en la transcripción
en *Zea mays L.***

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

MIGUEL GANDI VALDÉS DÁVILA



**DIRECTOR DE TESIS:
DRA. ESTELA SÁNCHEZ QUINTANAR
2015**

Ciudad Universitaria, D. F.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

1. Datos del alumno
Apellido paterno
Apellido materno
Nombre(s)
Teléfono
Universidad Nacional
Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Carrera
Número de cuenta

1. Datos del alumno
Valdés
Dávila
Miguel Gandi
15 17 26 07
Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias
Biología
305180005

2. Datos del tutor
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

2. Datos del tutor
Dr.
Estela
Sánchez
Quintanar

3. Datos del sinodal 1
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

3. Datos del sinodal 1
Dr.
Eleazar
Martínez
Barajas

4. Datos del sinodal 2
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

4. Datos del sinodal 2
Dr.
Víctor Manuel
Chávez
Ávila

5. Datos del sinodal 3
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

5. Datos del sinodal 3
Dr.
Claudia Andrea
Segal
Kischinevzky

6. Datos del sinodal 4
Grado
Nombre(s)
Apellido paterno
Apellido materno

6. Datos del sinodal 4
Dr.
Sobeida
Sánchez
Nieto

7. Datos del trabajo escrito.
Título

Número de páginas
Año

7. Datos del trabajo escrito
Metilación en regiones promotoras de genes clave durante el proceso de
embriogénesis somática y su efecto en la transcripción en *Zea mays*
60 p
2015

DEDICATORIA

A mis padres María de Jesús Dávila Pérez y Miguel Ángel Valdés Hernández por brindarme su paciencia y su gran amor.

Agradecimientos.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, a la que debo mi formación académica.

A la doctora Estela Sánchez Quintanar por abrirme las puertas de su laboratorio.

A la doctora Verónica Garrocho Villegas por el asesoramiento técnico en la realización de esta tesis.

Al Dr. Eleazar Martínez Barajas, al Dr. Víctor Manuel Chávez Ávila, a la Dra. Claudia Andrea Segal Kischinevzky y a la Dra. Sobeida Sánchez Nieto, por las valiosas aportaciones que hicieron a este documento.

Al Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Química, Departamento de Bioquímica y en especial a María Teresa Jesús Olivera por proporcionarme los medios de cultivo y material biológico.

A la Unidad de Secuenciación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

Al CONACyT por el financiamiento del proyecto #101327.

Al programa de becas de ayudante de investigador nacional nivel III del CONACyT.

A los miembros del laboratorio 103 por hacer mi estancia más alegre.

A mi esposa María Daniela Torres Rodríguez por su cariño, apoyo y amor incondicional.

A mis hermanos José Luis Sánchez, Héctor Sánchez y Fabiola Valdés por todas las ocasiones que me hicieron reír, por todo lo que me han consentido, por estar siempre que los necesito y simplemente porque los quiero.

Al Sr. Gabriel Torres Rodríguez, a la Sra. María Beda Rodríguez, a Gabriela Torres y Enrique Torres por dejarme ser parte de su familia.

A mis amigos Juan Melchor, Cesar Lemus, Issac Salazar y a Moisés por hacerme perder el tiempo y hacerme ver las cosas de un modo alternativo.

RESUMEN.....	8
1. INTRODUCCIÓN.....	10
2. ANTECEDENTES.....	13
2.1. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS EN PLANTAS.....	13
2.2. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS EN MAÍZ (<i>Zea mays.</i>).....	13
2.3. TRANSFORMACIÓN DE DNA CON BISULFITO DE SODIO.....	14
2.4. MAÍZ COMO MODELO BIOLÓGICO EN ESTUDIOS MOLECULARES.....	15
2.5. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN PLANTAS.....	15
2.6. CONTROL EPIGENÉTICO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	15
2.7. CONTROL GENÉTICO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.....	16
2.8. HORMONAS INVOLUCRADAS CON LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i>	17
2.9. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN MAÍZ (<i>Zea mays</i> L.)	18
3. JUSTIFICACIÓN.....	19
4. HIPÓTESIS.....	20
5. OBJETIVO GENERAL.....	20
5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.....	20
6. DISEÑO EXPERIMENTAL	21
Para alcanzar los objetivos del trabajo se siguió el diseño experimental que se muestra a continuación.....	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS.....	22
7.1. Generación y mantenimiento de callos E y NE.	22
7.1.1. Obtención de callos en regeneración.....	22
7.2. Extracción de RNA total de callos de maíz en diferentes condiciones de diferenciación. 23	
7.3. Análisis de la expresión de los mensajeros de <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i> por RT-PCR semi-cuantitativa.	24
DESARROLLO EXPERIMENTAL <i>IN SILICO</i>	26
7.4. Selección de regiones promotoras para los genes <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i> y diseño de oligonucleótidos.....	26
7.5. Diseño de oligonucleótidos para los genes <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i>	26
7.6. Extracción de DNA genómico de callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración.	27
7.7. Conversión de DNA genómico con bisulfito de sodio.....	27
7.8. Amplificación de los fragmentos de las regiones promotoras.....	28
7.9. Purificación y secuenciación de los fragmentos obtenidos.	30
8. RESULTADOS.....	31

8.1	Cuantificación de los niveles de expresión del mRNA de los genes <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i> de callos de maíz en condiciones de cultivo de proliferación y de regeneración.....	31
8.1.	Selección de las regiones promotoras para los genes <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i>	33
8.2.	Diseño de oligonucleótidos para las regiones promotoras de los genes <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i> .	36
8.3.	Amplificación de los fragmentos de las regiones promotoras de los genes <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i> para el análisis de la metilación específica por el método del bisulfito.....	38
8.4.	Cuantificación de los niveles de metilación en fragmentos de las regiones promotoras de <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i> de callos en diferentes estados de proliferación y regeneración.....	40
9.	DISCUSIÓN.....	46
9.1.	Selección de las regiones promotoras de los genes <i>aic1</i> , <i>vp1</i> y <i>wus</i>	46
9.2.	Correlación entre los niveles de metilación y de transcripción de los genes <i>aic1</i>	46
9.3.	Correlación entre los niveles de metilación y de transcripción del gen <i>vp1</i>	48
9.4.	Correlación entre los niveles de metilación y de transcripción del gen <i>wus</i>	49
11.	LITERATURA CITADA.....	54
12.	ANEXOS.....	59

ABREVIATURAS

5mC: metilación en el carbono 5 de la citosina.
Aic1. Auxin import carrier 1.
ABA: abscisic acid.
BBM1: baby boom.
BLAST: Basic Local Alignment Search Tool
CUC2: cup-shaped cotyledon2
DEPC: diethylpyrocarbonate
E: callo embriogénico.
GA: gibberellic acid.
H3K9me2: dimetilación en la histona 3 lisina 9.
H4K5ac: acetilación en la histona 4 lisina 5.
H3K27: histona 3 lisina 27.
HAC1: histone acetyltransferase
JMJ14: desmetilasas H3K4.
KYP: histone methyl-transferase H3K9.
LBD: lateral organ boundaries domain
LEC1: leafy cotyledon.
MET1: methyl transferase.
MS: medio de maduración.
N6i: medio de inducción.
N6p: medio de proliferación.
NaI: yoduro de sodio.
NE: callo no embriogénico.
NER: callo no embriogénico en regeneración.
PIN: pin-formed
PcG: polycomb group
PCR: Polymerase Chain Reaction
PEPC: Phosphoenolpyruvate carboxykinase
PTL: pletora
PKL: PICKLE (factores remodeladores de la cromatina)
QC: quiescent center.
RAM: root apical meristem.
RT-PCR: Reverse transcription polymerase chain reaction
SAM: Shoot apical meristem
SCR: scarecrow
SERK: somatic embryogenesis receptor kinase
siRNAs: small interfering RNAs
STM: shoot meristem less
TBE: Tris Borate EDTA
TE: Tris EDTA
Vp1: viviparous 1.
Wus: wuschel.
WOX4: wuschel-related homeobox4.
ZmIGF: *Zea mays* Insulin Growth Factor.
TOR: Target of Rapamicin.

RESUMEN.

La embriogénesis somática en maíz es un proceso capaz de generar embriones a partir de células somáticas. Sin embargo en los organismos vegetales, para que dicho proceso pueda regenerar una planta completamente funcional, se tiene que partir de células somáticas de tejidos inmaduros, que producen callos embriogénicos (en el caso del maíz es una limitante debido a que hay dependencia de los ciclos anuales y bianuales para obtener los tejidos inmaduros), ya que cuando se induce el proceso de embriogénesis somática en tejidos maduros de maíz da como resultado la formación de callo no embriogénico (NE) que es incapaz de regenerar tallos, hojas y raíces.

Existen señales moleculares que promueven la diferenciación o pluripotencia de las células vegetales, como en el caso de los callos en cultivo *in vitro*. La metilación es una modificación epigenética que se encuentra a nivel de las histonas y el DNA, la cual representa una forma alterna de regulación de la expresión génica en plantas. Dicha modificación se lleva a cabo en zonas con alto contenido de CG, zonas que se encuentran abundantemente en las regiones promotoras de los genes, y se ha reportado que la metilación de los sitios CpG está correlacionada con el silenciamiento de la expresión génica. También se ha observado que la metilación en las citosinas del DNA se lleva a cabo dentro de diversos contextos de secuencia. Por ejemplo los contextos simétricos están representados por CG y CHG, mientras que el contexto asimétrico está representado por CHH (donde H= A, T o C).

En el presente estudio se analizaron tres genes involucrados en procesos tempranos del desarrollo en plantas durante la formación de callo y la diferenciación a embrión somático: el gen *aic1* que codifica para un transportador de auxinas, promueve el crecimiento celular y el gravitropismo positivo en raíz; el gen *vp1* codifica para un factor de transcripción que se une directamente a ABA participando en la maduración del embrión; y el gen *wus* que codifica para un factor de transcripción que se une directamente al DNA para regular el número de células madre en el meristemo apical del tallo.

Posteriormente, se evaluó la actividad transcripcional de callos de diferente tipo, considerando el tejido del cual se originaron y las condiciones de cultivo a las que estuvieron sometidos. En medio de proliferación: callos embriogénicos obtenidos de embriones inmaduros (14-18 días después de la polinización) (E) y no embriogénicos

obtenidos de embriones de semilla quiescente (NE). Estos callos se probaron en medio de regeneración: embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER). Se encontraron diferencias en los niveles de expresión en los genes *aic1*, *vp1* y *wus* en diferentes tipos de callos y condiciones de cultivo.

Asimismo se analizaron las diferencias en los niveles de expresión de los genes antes mencionados; para tal efecto se desarrolló un análisis *in silico* para encontrar sus regiones promotoras y generar oligonucleótidos sensibles a metilación. Se evaluó el grado de metilación de estos genes y se correlacionó con sus niveles de expresión en los callos de maíz. Los resultados demostraron metilación en el contexto CHH de las citosinas en los fragmentos de las regiones promotoras de los genes *aic1* y *wus*, mientras que el fragmento de la región promotora del gen *vp1* no presentó metilación. Los resultados indican asimismo que la metilación modula negativamente los niveles de expresión en las regiones promotoras de *aic1* en los callos E y NE, así como de *wus* en los callos E, NE y NER. Se concluye que los niveles de metilación en algunas regiones promotoras de *wus* y *aic1* regulan negativamente los niveles de expresión de estos genes, afectando el proceso de regeneración en callos de maíz.

1. INTRODUCCIÓN.

Las plantas a través de la evolución, han generado varios tipos de estrategias de supervivencia para crecer bajo condiciones naturales severas. La regeneración de tejidos se relaciona con la reparación de tejidos y órganos, así como con la formación de nuevas de plantas (Gordon *et al.*, 2009). La pluripotencialidad de las plantas depende de la capacidad de los meristemos para generar células madre a lo largo de su ciclo de vida.

Se utilizan los callos que son una población de células no-diferenciadas pluripotentes para regenerar diferentes tipos de órganos de una planta (Xu & Huang, 2014). La embriogénesis somática es un proceso que ocurre naturalmente en las plantas, que puede generarse en el laboratorio por cultivo de tejidos *in vitro* la cual es una herramienta de micropropagación en la biotecnología. En maíz se producen dos tipos de callos, el **embriogénico (E)** proveniente de embriones inmaduros y el **callo no embriogénico (NE)** generado de embriones de semillas quiescentes (Garrocho *et al.*, 2012).

La epigenética es una capa adicional de la regulación de la expresión génica a través de la metilación del DNA e histonas. Sin embargo, también existen otras formas de impactar en la regulación de la expresión génica y es por medio de los microRNAs (mirRNAs). Los cuales son capaces de dirigir el silenciamiento transcripcional por la metilación de genes blanco, así como, la degradación de RNAs de doble cadena (Law & Jacobsen, 2010; Lewin *et al.*, 2010).

Se ha demostrado que el control epigenético es fundamental en los procesos de desarrollo en animales y plantas, ya que los patrones de metilación en el DNA e histonas cambian de una etapa a otra durante los estadios iniciales de desarrollo y se modifican en la maduración de los organismos (Law & Jacobsen, 2010). La regulación epigenética no sólo es importante para generar tipos celulares diferenciados durante el desarrollo de las plantas, también lo es para mantener la estabilidad de sus respectivos perfiles de expresión génica (Calvanese *et al.*, 2012). Si bien los procesos epigenéticos son esenciales en el desarrollo normal, también se ha demostrado que, si se alteran, pueden conducir a fenotipos anormales y enfermedades, específicamente cáncer en animales y efectos pleiotrópicos en plantas (Rival *et al.*, 2010).

A este respecto es importante mencionar que la metilación del DNA ocurre en todos los organismos, prioritariamente en organismos eucariontes (Law & Jacobsen, 2010). Se ha evidenciado que la metilación en organismos eucariontes tiene una función básica

relacionada con la regulación de la expresión génica (Lewin *et al.*, 2010). La metilación del DNA está relacionada con el silenciamiento del cromosoma X (Lewin *et al.*, 2010), la regulación del ciclo celular (Law & Jacobsen, 2010), así como con el desarrollo embrionario (Lister *et al.*, 2009). La metilación del DNA consiste en la adición de un grupo metilo en el carbono cinco del anillo pirimídico de las citosinas del DNA, a través de la enzima metiltransferasa (Solís *et al.*, 2013). La metilación del DNA en plantas, de forma semejante a animales, ocurre predominantemente en transposones, elementos de DNA repetitivo, cercano a las regiones promotoras de los genes, en densas agrupaciones llamadas islas CpG en diferentes etapas del desarrollo (Law & Jacobsen, 2010; Zhang *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2009).

El transporte de auxinas está altamente regulado en la célula, *aic1* es un gen que codifica para un transportador membranal y es un regulador de entrada de auxinas a las células (Tsuda *et al.*, 2011). Por otra parte el ácido abscísico (ABA) regula negativamente la germinación de la semilla. Se ha demostrado que se une directamente al factor de transcripción *vp1* (McCarty *et al.*, 1991). Por último el factor de transcripción *wus* regula la población de células madre en el meristemo (Weigel & Jürgens, 2002), no se ha demostrado que esté directamente regulado por algún tipo de hormona, sin embargo se ha evidenciado que los genes *vp1* y *wus* están controlados epigenéticamente en *Arabidopsis thaliana* (Zhang *et al.*, 2011) (Li *et al.*, 2011). La funcionalidad de los genes *aic1*, *vp1* y *wus*, así como la relación que guardan con las hormonas vegetales tiene gran relevancia. A nivel celular las auxinas regulan la división y expansión celular.

Trabajos preliminares en el grupo de investigación mostraron que, la actividad transcripcional de los callos embriogénicos (E) y no embriogénicos (NE) en *Zea mays*, evaluada por análisis de microarreglos, presenta diferencias en la expresión de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* (Garrocho *et al.*, 2015). Dado que estos genes presentan una gran relevancia en los procesos de desarrollo y diferenciación celular se decidió estudiar si existe control epigenético a nivel de la metilación del DNA de las citosinas en las regiones promotoras de estos genes, cercana al sitio de inicio de la transcripción.

En este trabajo se postula que durante la diferenciación del callo E de maíz la expresión de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* es favorecida. Por el contrario, dicha expresión es regulada negativamente por metilación en las regiones promotoras en dichos genes, en callo NE.

El objetivo de este trabajo es comprender los mecanismos moleculares que regulan la expresión de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* en callos E y NE, a fin de entender la regulación de los procesos de diferenciación que ocurren durante la embriogénesis somática.

2. ANTECEDENTES.

2.1. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS EN PLANTAS.

Se ha demostrado que la dimetilación en la histona 3 lisina 9 (H3K9me₂) y la metilación en el carbono 5 de la citosina (5mC) son marcadores de represión transcripcional (Braszewska *et al.*, 2013). Recientemente se reportó que en la planta de cebada (*Hordeum vulgare*), usando técnicas de inmunofijación con el fin de dilucidar las modificaciones epigenéticas en el meristemo apical de raíz de la cebada, encontraron que la punta de las raíces laterales contenían niveles más altos de H3K9me₂ y 5mC que el resto de la planta. Por otra parte, los tejidos vasculares presentaron los niveles más altos de acetilación en la histona 4 lisina 5 (H4K5ac); lo cual quiere decir que mientras la expresión de los genes de raíz permanecieron reprimidos, los genes de tejidos vasculares estuvieron activados durante la formación de plántulas de cebada (Braszewska *et al.*, 2013; Morel *et al.*, 2014). Un estudio reciente en *Coffea canephora* evidenció que la dimetilación en las histonas H3K9 y H3K27 cambia conforme se va desarrollando el embrión. La expresión del gen *leafy cotyledon (lec1)* y *baby boom (bbm1)* se produce después de la inducción de la embriogénesis somática, mientras que *wuschel-related homeobox4 (wox4)* disminuye su expresión durante la maduración del embrión. En este mismo estudio realizaron un experimento de inmunoprecipitación para averiguar si los genes *lec1*, *bbm1* y *wox4* son regulados epigenéticamente, encontrando que *wox4* es regulado negativamente por H3K9me₂, mientras que *lec1* y *bbm1* son regulados negativamente por H3K27me₃ (Nic *et al.*, 2013).

2.2. ESTUDIOS EPIGENÉTICOS EN MAÍZ (*Zea mays*.)

En maíz se han estudiado los cambios epigenéticos en diversos tejidos y órganos como: embriones (Meyer *et al.*, 2007; Jahnke *et al.*, 2010), endospermos (Jahnke *et al.*, 2010), espigas (Guo *et al.*, 2006), hojas (Auger *et al.*, 2005), meristemos (Uzarowska *et al.*, 2007), tallos (Swanson *et al.*, 2006; Stupar *et al.*, 2008) y raíces (Hoecker *et al.*, 2008; Paschold *et al.*, 2010). En ellos se encontró que la metilación del DNA es un marcador epigenético represivo, el cual mantiene la estabilidad del genoma, suprimiendo la actividad de transposones y otras secuencias repetitivas. Además se han estudiado poblaciones de siRNAs asociadas al silenciamiento de transposones en diferentes tejidos en maíz (Barber *et al.*, 2012). También se ha determinado que la metilación del DNA está asociada con la expresión de genes en el endospermo de híbridos de maíz. En un trabajo reciente (Waters

et al., 2011), se identificaron 100 genes putativos en endospermo de maíz, de los cuales 54 eran de origen materno y 46 de origen paterno. Posteriormente se evaluaron los niveles de metilación en el DNA de dichos genes y se encontró que eran bajos y que mostraban expresión específica de endospermo. Estos datos indican que es necesario determinar las variaciones epigenéticas en plantas a nivel del DNA y conocer qué relación guardan con los niveles de expresión en diversos tejidos, órganos y etapas del desarrollo, a fin de modificarlos en un futuro para generar un fenotipo deseado.

Asimismo, He y colaboradores (*He et al.*, 2013) en un nuevo estudio, han atribuido un papel a la metilación del DNA, el cual consiste en la regulación de la expresión génica. En dicho artículo los autores generaron híbridos recíprocos de las líneas B73 y Mol 17, posteriormente analizaron transcripcionalmente diversos órganos y los asociaron con las metilaciones presentes en el genoma del maíz. Ellos demuestran, a nivel global, que la metilación del DNA en el cuerpo del gen correlaciona con la represión transcripcional del mismo.

2.3. TRANSFORMACIÓN DE DNA CON BISULFITO DE SODIO.

La metilación en el carbono 5 de las citosinas del DNA es una modificación epigenética conservada que influye en la actividad de regiones promotoras, frecuentemente correlacionada con el silenciamiento transcripcional en organismos eucariontes (Law & Jacobsen, 2010). La metilación de regiones promotoras en el DNA es un acontecimiento regulatorio, reversible e inducido por modificaciones postraduccionales de las histonas. La metilación de una isla CpG impide la activación de una región promotora (Lewin *et al.*, 2010). Sin embargo, para llegar a identificar las metilaciones en citosinas, primero se debe amplificar la zona de interés con oligonucleótidos sensibles a metilación a través de una PCR anidada, después secuenciar y por último comparar la secuencia de DNA no convertida contra la secuencia de DNA convertida. El DNA convertido es aquel que se obtuvo de tratar el DNA con bisulfito de sodio, en donde las citosinas que sufrieron la reacción de desaminación y se convirtieron en uracilos, se observarán como timinas en el cromatograma, mientras que las citosinas que no se desaminaron porque la metilación las protegió de la reacción, se mostrarán en el cromatograma como citosinas (Henderson *et al.*, 2010). La transformación de DNA con bisulfito de sodio es una técnica que permite conocer la metilación específica del DNA.

2.4. MAÍZ COMO MODELO BIOLÓGICO EN ESTUDIOS MOLECULARES.

Zea mays L. ha servido como un organismo modelo con el propósito de dilucidar aspectos moleculares de regulación en plantas monocotiledóneas y, dado su extraordinario nivel de diversidad genotípica, ayuda a los investigadores a comprender eventos biológicos como evolución, recombinación, transposición, heterosis, impresión genómica y fenómenos epigenéticos. Además el maíz tiene una gran importancia como planta domesticada y cultivada como fuente de alimento en México, su centro de origen (Strable & Scanlon 2009; Law & Jacobsen, 2010).

2.5. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN PLANTAS.

La embriogénesis somática es un proceso que se caracteriza por la desdiferenciación de células somáticas a células pluripotentes, que son las responsables de mantener la capacidad de regeneración en las primeras etapas de desarrollo de una planta. La embriogénesis somática aplicada como técnica biotecnológica es ampliamente usada y se caracteriza por llevar a cabo procesos complejos relacionados con la expresión coordinada de genes con base en la influencia de hormonas, estrés, nutrientes y señales ambientales (Yang & Zhang, 2010). Los primeros ensayos reportados de embriogénesis somática fueron realizados en zanahoria (Steward *et al.*, 1958), cuando Skoog & Miller un año antes ya habían formulado un medio de cultivo eficiente para la inducción de callos (Skoog & Miller, 1957). Posteriormente se reportó la embriogénesis somática de maíz (Lu *et al.*, 1982), arroz (Siriwardana & Nabors, 1983), trigo (De Buyser J *et al.*, 1992) y *Arabidopsis thaliana* (Mordhorst *et al.*, 1998). También se ha reportado dicho proceso a partir de hoja en *Coffea canephora* (Nic *et al.*, 2013), o a partir de embriones cigóticos inmaduros de *Pinus pinaster* y *Pinus abies* (Vega *et al.*, 2013).

2.6. CONTROL EPIGENÉTICO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Las vías epigenéticas Polycomb group (PcG) y PICKLE (PKL) son críticas para retener características somáticas durante el desarrollo post-embrionario de *Arabidopsis thaliana* a través de la represión de genes específicos de embrión (Xu y Huang, 2014). En maíz también se han descrito estas vías epigenéticas que previenen la expresión ectópica de genes de embrión en células somáticas. Mutaciones en estas vías pueden resultar en embriogénesis somática (Bouyer *et al.*, 2011). En *Arabidopsis* los perfiles de expresión génica durante el proceso de formación de callos a partir de explantes de hoja están caracterizados por la regulación positiva de genes de respuesta a auxinas, regulación

negativa de algunos genes de hojas y regulación positiva de múltiples genes de raíz (He *et al.*, 2012). Estos cambios en los perfiles de expresión génica son consistentes con las hipótesis actuales que consideran el callo como un grupo de células de meristemo de raíz (Sena *et al.*, 2009).

2.7. CONTROL GENÉTICO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

Entre los genes que funcionan como marcadores moleculares de embriogénesis somática se encuentra el gen *atserk1* (*somatic embryogenesis receptor kinase 1*). Dicho gen está altamente expresado durante el proceso de embriogénesis somática y se ha observado la presencia de genes homólogos a *atserk1* en una amplia variedad de plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas. El gen *serk1* es una cinasa transmembranal que incrementa la capacidad del meristemo apical para formar embriones somáticos en *Arabidopsis thaliana* (Santos & Aragao, 2009).

Otros genes que participan de manera importante en el proceso de embriogénesis somática son *lec* (*leafy cotyledon*) y codifican para factores de transcripción. Estos genes son expresados exclusivamente en embriones. La sobreexpresión de los genes de la familia LEC da como resultado características embrionarias en tejidos somáticos o la formación de embriones somáticos (Baybrook and Harada, 2008; Xu and Huang, 2014).

Los genes *lbd* (*lateral organ boundaries domain*) juegan papeles importantes durante la formación de callo en maíz. En *Arabidopsis thaliana*, proporcionan una asociación molecular entre la señalización de auxinas y el establecimiento del destino de células de raíz (Fan *et al.*, 2012). *lbd 16, 17, 18* y *29* son genes clave en la formación de raíz lateral y críticos en la formación de callos (Berckmans *et al.*, 2011; Fan *et al.*, 2012 & Lee *et al.*, 2013). Es así que la sobreexpresión de los genes *lbd* resultaron en la formación de callos sin necesidad de añadir auxinas de manera exógena (Fan *et al.*, 2012).

Por otra parte, los genes involucrados en la formación del tallo en muchas plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas son *wuschel* (*wus*), *cup-shaped cotyledon2* (*cuc2*) y *shootmeristemless* (*stm*) (Xu & Huang, 2014). Un análisis de expresión génica usando técnicas de fluorescencia en tiempo real reveló los patrones de expresión de diversos genes clave durante la formación de tallos a partir de callos en un medio de inducción específico. Las distribuciones de *wus* y *cuc2* parecen ser esenciales para las células progenitoras de tallo, ya que *cuc2* se expresó en el tallo progenitor, el cual fue rodeado por células que expresaban *wus*. La proliferación del tallo progenitor condujo al patrón

radial de pro-meristemo de tallo formado nuevamente, acompañado por la expresión STM en la región circundante (Gordon *et al.*, 2007).

Por último, los genes relacionados con la formación de raíz a partir de callos se han estudiado poco, pero en dos experimentos en *Arabidopsis thaliana* en los cuales eliminaron el centro quiescente (QC) de raíz (Xu *et al.*, 2006) y el meristemo apical de raíz (RAM) (Sena *et al.*, 2009), respectivamente, resultaron en la formación de un QC y por lo tanto en la regeneración, a través de la acumulación de altos niveles de auxinas en la región de la raíz. Estos resultados llevaron a Xu y colaboradores en el 2006 a sugerir que los altos niveles de auxinas activan la expresión de los genes *plethora (ptl)* y *scarecrow (scr)*, promoviendo que las células adyacentes al QC se conviertan en células del QC, por medio de la reorganización de los genes *pin-formed (pin)* familia de transportadores de auxinas, y el incremento de la expresión del gen *wox5*.

2.8. HORMONAS INVOLUCRADAS CON LA EXPRESIÓN DE LOS GENES *aic1*, *vp1* y *wus*.

Las fitohormonas están implicadas en múltiples mecanismos que regulan diferentes actividades en la historia de vida de una planta. Las auxinas por ejemplo, a nivel de organismo, son capaces de regular diversos aspectos del desarrollo de las plantas como la generación de la raíz y tallo, dominancia apical, filotaxia, iniciación de la hoja y el desarrollo de foto y gravitropismo (Calderon *et al.*, 2010).

El gen *aic1* codifica para un transportador de membrana y un regulador de entrada de auxinas a las células, que además media el consumo apolar de auxinas en las células de raíces laterales. La pérdida de la función del gen *aic1* resulta en el crecimiento de raíz no gravitrópico (Tsuda *et al.*, 2011).

El gen *vp1 (viviparous 1)* codifica para un factor de transcripción central en la maduración de la semilla en maíz. El gen mutado *Vp1* produce sensibilidad reducida a ABA y no permite la maduración normal de la semilla (Zhang *et al.*, 2011). *vp1* funge como activador/represor dependiendo del contexto de la región promotora (McCarty *et al.*, 1991). Recientemente se demostró que semillas de maíz en germinación tratadas con ABA inducen la expresión de *vp1* y la acetilación selectiva de la histona asociada a la región promotora de *vp1*. Este último hecho sugiere que los procesos involucrados en la regulación de la germinación de la semilla son dirigidos a través de ABA pero también por

medio de mecanismos epigenéticos que ocurren en la región promotora del gen *vp1* (Zhang *et al.*, 2011).

El gen *wus* (*wuschel*) codifica para un factor de transcripción con un dominio que se une directamente al DNA, expresado en células del centro organizador de las células madre (Yadav *et al.*, 2011), por lo tanto participa activamente en el mantenimiento de tales células, los procesos de desarrollo floral (óvulo y anteras) y la formación de órganos (Weigel & Jurgens, 2002; Van der Graaff *et al.*, 2009). Estudios recientes indican que la mutante del gen *Met1* alteró de manera positiva la tasa de regeneración del tallo en *Arabidopsis thaliana* respecto al tipo silvestre, además que la metilación del DNA en regiones promotoras del gene *wus* controla sus niveles de transcripción en *Arabidopsis thaliana* y, junto con las modificaciones epigenéticas a nivel de las histonas, participan activamente en los procesos de regeneración del tallo (Li *et al.*, 2011). También se evidenció que la sobre-expresión del gen *wus* de *Arabidopsis thaliana* incrementa la embriogénesis somática en tejidos cultivados *in vitro* de algodón (*Gossypium hirsutum* L.), promoviendo la formación de callo y de tallo (Bouchabké *et al.*, 2013).

2.9. EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN MAÍZ (*Zea mays* L.)

Las células somáticas de las que se originan los callos de maíz pueden ser de diferentes órganos o tejidos de la planta. En el laboratorio se ha desarrollado una técnica en la que los embriones de semillas inmaduras son cultivados en un medio de inducción y semanas después generan callo (E) (Garrocho *et al.*, 2012). Los callos se cultivan en un medio de proliferación, en condiciones de oscuridad y se encuentran en crecimiento celular, posteriormente se siembran en un medio de maduración, en condiciones de iluminación y producen callos embriogénicos en regeneración (ER) observándose diferenciación en tallo, hoja y raíz. Por el contrario, los embriones de semillas maduras, igualmente cultivados en medio de inducción, semanas después generan callo (NE). Los callos NE se siembran en un medio de proliferación, en condiciones de oscuridad y también pasan por el proceso de crecimiento celular (aunque el crecimiento en este callo es menor respecto al callo E) (Garrocho *et al.*, 2012). Sin embargo, el callo NE al ser cultivado en un medio de maduración y germinación y condiciones de iluminación (NER), es incapaz de generar una planta completa, caracterizándose solo por formar raíz incipiente. Todo el proceso está descrito detalladamente en la figura 1.

3. JUSTIFICACIÓN.

El maíz es uno de los cultivos de cereal más importantes, la producción mundial en el 2012 fue de 839 millones de toneladas, seguida del trigo con 653 millones de toneladas y del arroz con 465 millones de toneladas (Pechanova *et al.*, 2010). La producción del maíz es por tanto muy importante debido a su demanda a nivel mundial.

Según datos del INEGI en 2012, México pagó al exterior 2 mil 878 millones de dólares para importar maíz. El valor de estas importaciones se cuadruplicó con respecto a las importaciones de hace una década, que fueron de 644.3 millones de dólares (INEGI, 2012). Estas cifras son alarmantes si se toma en cuenta que el maíz tiene una gran importancia alimenticia, comercial y cultural para México.

De aquí que en el presente trabajo, se pretenda conocer algunos de los mecanismos moleculares y de regulación que participan en la formación de una planta completa por embriogénesis somática.

En la actualidad se tiene conocimiento acerca de los mecanismos epigenéticos involucrados en procesos de diferenciación celular (Zuo *et al.*, 2002), sin embargo se sabe poco del impacto en las regiones promotoras de la regulación por mecanismos epigenéticos de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* durante la diferenciación celular del maíz. Dilucidar estos procesos contribuiría a entender uno de los mecanismos alternos para la regulación de la expresión génica de *aic1*, *vp1* y *wus* y su papel en los procesos del desarrollo de las plantas de maíz a partir de embriones somáticos. Evaluar la metilación en las regiones promotoras de estos tres genes en callos en condiciones de proliferación y de regeneración, permitirá conocer si hay una correlación entre los niveles de transcripción de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* y los niveles de metilación de sus respectivas regiones promotoras y por lo tanto si participan en control epigenético en este modelo. En un futuro y con el conocimiento que se genere con este tipo de estudios, se podría aplicar el proceso de embriogénesis somática para producir maíz a gran escala sin importar la época del año.

4. HIPÓTESIS.

Si durante la diferenciación del callo E de maíz la expresión de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* es favorecida. Entonces dicha expresión es regulada negativamente por metilación en las regiones promotoras de algunos de estos genes, en callos NE.

5. OBJETIVO GENERAL.

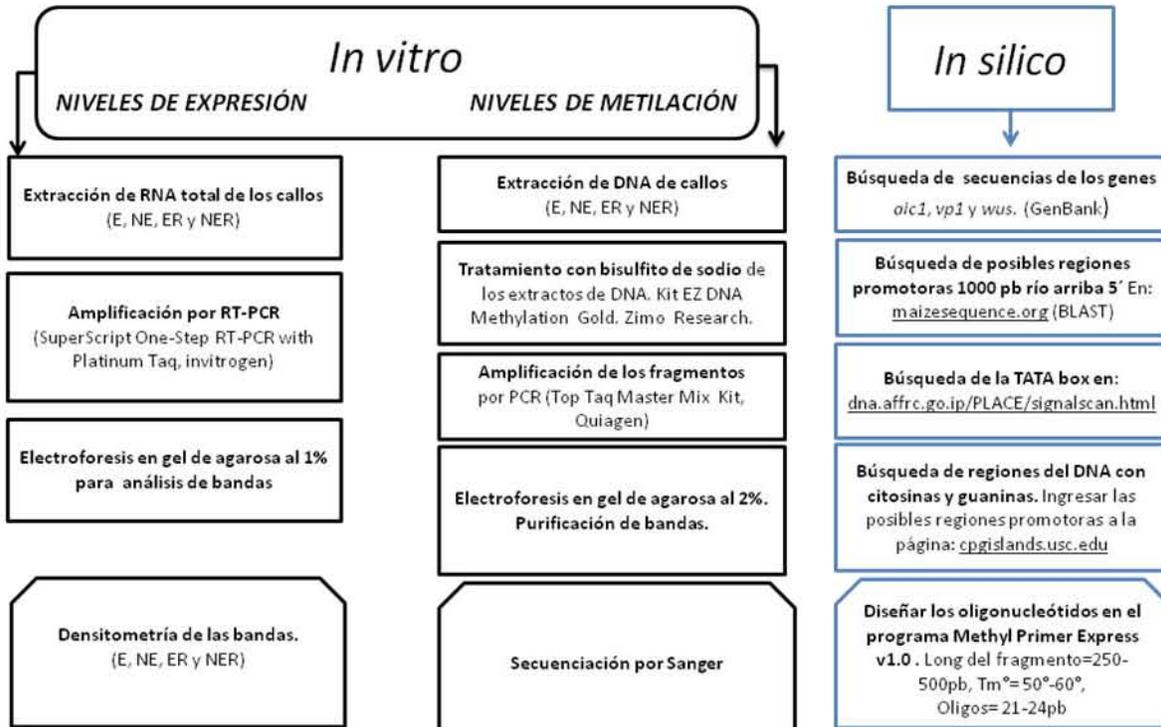
Correlacionar el grado de metilación específica de las regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus*, en diferentes tipos de callos de maíz en condiciones de proliferación (E y NE), y regeneración (ER y NER) con los niveles de expresión de dichos genes.

5.1. OBJETIVOS PARTICULARES.

1. Evaluar los niveles de expresión de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* en callos de maíz en condiciones de cultivo de proliferación y de regeneración (E, NE, ER y NER).
2. Identificar la región promotora y seleccionar la zona enriquecida con sitios CpG para evaluar la metilación.
3. Diseñar oligonucleótidos *in silico* para amplificar las regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* de DNA genómico tratado con bisulfito de sodio.
4. Secuenciar los fragmentos de las regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* en los callos de maíz en condiciones de cultivo de proliferación y de regeneración (E, NE, ER y NER) a partir de DNA genómico tratado con bisulfito de sodio.
5. Identificar el estado de metilación de las citosinas de los fragmentos de las regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* en los callos de maíz.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL

Para alcanzar los objetivos del trabajo se siguió el diseño experimental que se muestra a continuación.



7. MATERIALES Y MÉTODOS.

DESARROLLO EXPERIMENTAL *IN VITRO*

7.1. Generación y mantenimiento de callos E y NE.

Los callos E y NE, así como los medios de cultivo fueron proporcionados por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM. Los callos E y NE se obtuvieron según se describe a continuación y de acuerdo al esquema en la figura 1.

Los callos E se obtuvieron de semillas inmaduras de 14 a 18 días después de la polinización extraídas de mazorcas de plantas de maíz, las cuales se sometieron a lavados con cloro al 1%, benomil al 4% y alcohol etílico al 70%. En campana de flujo laminar, se les quitó el endospermo para obtener el eje embrionario y el escutelo y se sembraron 5 ejes embrionarios, en un frasco que contenía medio de inducción N6i (2, 4-D 6mg/L, Sacarosa 3%) (Garrocho *et al.*, 2012).

Los callos NE se obtuvieron de semillas maduras, las cuales se sometieron a las mismas condiciones de limpieza y se sembraron en el mismo medio. Los callos fueron cultivados en condiciones de oscuridad a temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por un periodo de 3 semanas y resiembras cada 3 a 4 semanas en medio fresco.

Después de 3 semanas los embriones de semillas de los callos E y NE desarrollaron masa celular blanca. Los callos E y NE se crecieron en un medio de proliferación N6p (2, 4-D 4mg/L, BAP 0.1mg/L y sacarosa 3%) en condiciones de oscuridad y temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 4 semanas.

7.1.1. Obtención de callos en regeneración

Tres semanas después los callos E y NE fueron sembrados del medio N6p a medio de maduración MS (sacarosa 3%). En esta etapa todos los callos fueron sometidos a fotoperiodo de 16 h luz, 8 h de oscuridad y temperatura de $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. A estos callos se les denomina callos en regeneración. Las características distintivas en esta etapa son que los callos embriogénicos en regeneración (**ER**) lograron enverdecerse y diferenciarse en tallo, hoja y raíz, mientras que los callos no embriogénicos en regeneración (**NER**) generaron una masa celular con aspecto blanquecino y solo fueron capaces de generar algunas raíces incipientes.

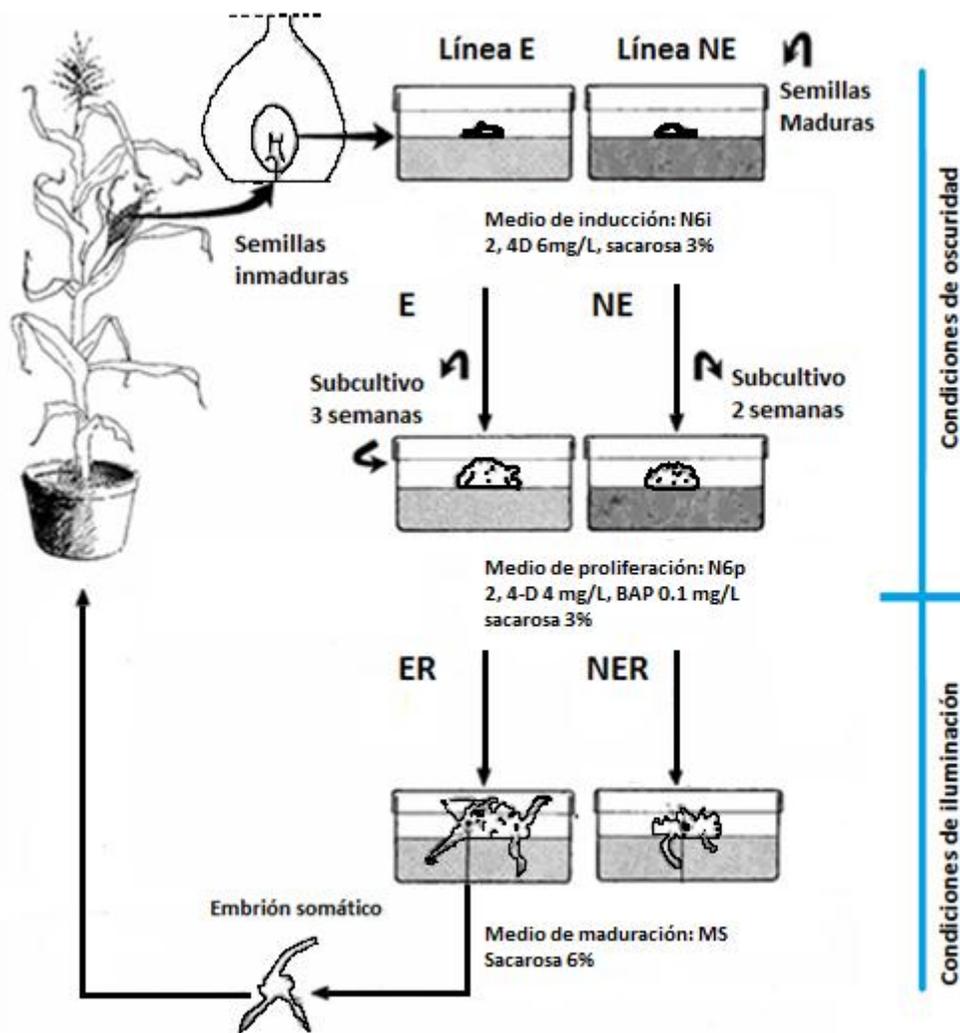


Figura 1. Inducción, proliferación y regeneración de callos embriogénicos. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER). 2, 4-D: ácido 2, 4-Diclorofenoxiacético. BAP: Benzil Amino Purina.

7.2. Extracción de RNA total de callos de maíz en diferentes condiciones de diferenciación.

La extracción de RNA por TRIZOL consiste en el empleo de un buffer que contiene tiocianato de guanidinio el cual es un agente caotrópico y desnaturalizante de proteínas, que altera negativamente la actividad de las RNAsas presentes en la muestra. Por otra parte la mezcla de fenol pH 4.3 y el cloroformo causan un fraccionamiento del RNA en fase acuosa, del DNA en la interfase y de las proteínas en la fase orgánica. Posteriormente el RNA es precipitado con isopropanol y colectado por centrifugación (Chomczynski & Sacchi; 1987). Se extrajo RNA total de los callos E, ER, NE y NER por el método antes mencionado, de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Se homogenizaron 50 mg de callo molido con nitrógeno líquido en un microtubo de polipropileno, se añadió 1 mL de TRIZOL, agitándose con la mano 3 ó 4 veces y se incubó 5 min a T° ambiente.

Posteriormente se agregaron 200 μL de cloroformo a la mezcla TRIZOL con RNA, se agitó con la mano vigorosamente por 15 segundos, se incubó 3 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 12,000 x g por 15 min. A continuación se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se agregaron 400 μL de alcohol isopropílico a -20°C y se incubó 10 min a temperatura ambiente. Después se centrifugó el tubo a 12,000 x g por 10 min a 4°C , se eliminó el sobrenadante, se añadió un 1 mL de etanol al 75% con el fin de lavar la pastilla en el vortéx y se centrifugó a 7,500 x g por 5 min a 4°C . Se realizó un lavado adicional con etanol al 75% y por último, se eliminó el etanol con una punta fina, se dejó destapado el tubo 1 ó 2 min frente al mechero para que se evaporaran los restos de etanol y se resuspendió el botón en 50 μL de agua libre de nucleasas. La pureza del RNA se evaluó en espectrofotómetro al medir la absorbancia de las muestras a 260 y 280 nm, dicha relación nos indicó si hubo contaminación y tuvo una proporción de 2.0 a 2.2, la integridad del RNA se evaluó en un gel de agarosa al 1.2%, en una cámara de electroforesis a 80 V y por último el RNA se almacenó a -70°C .

7.3. Análisis de la expresión de los mensajeros de *aic1*, *vp1* y *wus* por RT-PCR semi-cuantitativa.

La reacción de PCR (Polymerase Chain Reaction) es una herramienta que permite la amplificación de secuencias de DNA específicas a partir de una diminuta cantidad de DNA. La amplificación del DNA por dicha técnica se divide en tres pasos. Primero el DNA se desnaturaliza con temperaturas entre 93 y 96°C , después se alinean los oligonucleótidos con el DNA a una temperatura entre 55°C y 65°C . Por último los oligonucleótidos se extienden a lo largo de la secuencia blanco ocupando una DNA polimerasa termostable, dNTPs y Mg^{2+} , lo que genera la duplicación del DNA blanco inicial. La técnica de RT-PCR se basa en usar RNA como templado, el cual se retro transcribirá con la enzima RT (Retro Transcriptasa) para generar cDNA. Posteriormente se amplificará el cDNA con la enzima DNA polimerasa y de esta manera se miden los niveles de expresión de los RNA mensajeros.

Para evaluar los niveles de expresión de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* se realizaron varias reacciones por RT-PCR con RNA total. Primero se normalizaron las concentraciones de RNA total a 100ng/ μL de las muestras correspondientes a callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración. Posteriormente se realizaron reacciones de RT-PCR y se analizaron en electroforesis en gel de agarosa al 1%, con bromuro de etidio

1% y con buffer de corrida TBE (Tris 0.45 M, Ácido bórico 4.45 M y EDTA 5 mM) 1x se corrieron a 90V por 40 min. Por último se realizó un análisis densitométrico con el programa ImageJ para determinar los niveles de expresión de los mensajeros *aic1*, *vp1* y *wus*. Los componentes de las reacciones de RT-PCR de cada gen se muestran en la tabla 1 y las condiciones de amplificación de las reacciones de RT-PCR para cada gen se muestran en la tabla 2.

Tabla 1. Componentes de la reacción RT-PCR para *aic1*, *vp1* y *wus*.

GEN	(B) REGIÓN CODIFICANTE		
	aic1	vp1	wus
COMPONENTES			
2X REAX MIX	dNTPs 1.6 mM, MgSO ₄ 3.2 mM		
RNA	100ng/μL		
RV	0.5 μM	0.5 μM	0.4 μM
FW	0.5 μM	0.5 μM	0.4 μM
RT/Taq Pol	20 U/ 2 U		
MgSO₄	0.25 mM		0.05 mM

Tabla 2. Condiciones de amplificación del termociclador para obtener los transcritos *aic1*, *vp1* y *wus*.

Condiciones	
Gen	RT-PCR
aic1	50°C 30' 94°C 2' 94°C 45'} 59°C 30"} 72°C 1' 72°C 10' 30 ciclos
vp1	45°C 30' 94°C 2' 94°C 45'} 64°C 30"} 71°C 1' 71°C 10' 30 ciclos
wus	55°C 30' 94°C 2' 94°C 1'} 58°C 1"} 72°C 1' 72°C 10' 38 ciclos

DESARROLLO EXPERIMENTAL *IN SILICO*.

7.4. Selección de regiones promotoras para los genes *aic1*, *vp1* y *wus* y diseño de oligonucleótidos.

Para seleccionar las regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus*, se tomaron las secuencias anotadas en el GenBank, después se buscaron las regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* en [maizesequence](#), en seguida en el programa PLACE se buscaron las secuencias consenso TATA box dentro de las regiones promotoras, posteriormente en la página “CpG island searcher” se buscaron los sitios con el mayor contenido de guaninas y citosinas. Por último se diseñaron los oligonucleótidos en el programa Methyl Primer Express.

7.5. Diseño de oligonucleótidos para los genes *aic1*, *vp1* y *wus*.

Las secuencias de cDNA de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* de *Zea mays* se ingresaron en el programa Primer-BLAST, para diseñar los oligonucleótidos. Ya dentro del programa se aplicaron los siguientes criterios: que los oligonucleótidos para los 3 genes debían tener tamaños de 19 a 21 pb y temperaturas de fusión entre 57°C y 63°C. El programa generó un reporte general de los oligonucleótidos, del cual sólo se seleccionaron los que se muestran en la tabla 3. Además se realizó un BLAST a cada uno de los oligonucleótidos con el fin de asegurar que sólo reconocieran a sus secuencias blanco como sugieren varios autores (Zhang *et al*, 2000; Morgulis *et al*, 2008).

Tabla 3. Características generales de los oligonucleótidos.

Gene	Oligo	Long	Tm°C	Secuencia	Producto PCR
<i>aic1</i>	Fw	19	69.2	5'CCCCGTTGCTGAGGCTTTC 3'	500 pb
	Rv	19	64.7	5'AGCCGGTCGTTGACGTAGT 3'	
<i>vp1</i>	Fw	20	64.6	5'CTTTGTCGTCGTGCCTCTCT 3'	223 pb
	Rv	20	66.0	5'GGAGTTGGACGAGAAGGTGG 3'	
<i>wus</i>	Fw	21	60.8	5'CAGGACTACATGGGCGTGATG 3'	500 pb
	Rv	20	59.3	5'GGTCAGTTGGTCACTAGCCA 3'	

DESARROLLO EXPERIMENTAL *IN VITRO*.

7.6. Extracción de DNA genómico de callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración.

Se extrajo DNA genómico de los callos E, NE, ER y NER por el método del dióxido de silicio (Li *et al.*, 2010). Se colocaron en un microtubo de 1.5µL 50 mg de callo previamente molido en nitrógeno líquido. Después se adicionaron 200 µL de solución de resuspensión (**Solución A, anexo 1**) y se homogenizó en el vórtex. Posteriormente se adicionaron 70 µL de SDS 10% (**Solución F, anexo 1**) y después de que se invirtió el tubo varias veces, se incubó a 70°C por 10 min, después se le añadieron 250 µL de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (**Solución G, anexo 1**) y se homogenizó la mezcla en el vórtex vigorosamente por 30 s. A continuación se centrifugó el tubo a 4°C a 16,000 x g por 5 min y se transfirió la fase acuosa (superior) a un microtubo nuevo que contenía 500 µL de la solución de NaI 6M (**Solución D, anexo 1**) y se mezcló por inversión. Después se adicionaron 20 µL de dióxido de silicio y se dejó reposar el tubo a temperatura ambiente por 25 min, se centrifugó a 16,000 x g por 10 s hasta obtener una pastilla en la matriz, eliminando el sobrenadante con micropipeta, después se lavó la matriz por resuspensión con 1 mL de solución de lavado (**Solución E, anexo 1**) y se homogenizó en el vórtex. Se realizó un lavado adicional y se centrifugó a 16,000 x g por 10 s hasta obtener una pastilla en la matriz y se eliminó el sobrenadante usando micropipeta. A continuación se adicionaron 40 µL de buffer TE (Tris-Cl 10mM pH=8, EDTA 0.1 mM) estéril para resuspender en el vórtex brevemente y se colocó el microtubo a 70°C por 2 min. Por último se centrifugó el microtubo a 16,000 x g por 2 min y se transfirieron 36-38 µL de sobrenadante que contenían el DNA genómico a un microtubo nuevo. La pureza y concentración del DNA de cada muestra fue cuantificada en el espectrofotómetro a absorbancias de 260 nm y 280 nm, la pureza de las muestras de DNA en este trabajo entraron en el rango de proporciones entre 1.8 a 2.0 lo que indicó que tenía bajo nivel de proteínas, mientras que la integridad de las muestras de DNA fue evaluada por electroforesis a 80 V, en gel de agarosa al 1% y por último el DNA fue almacenado a -20°C (Li & Sheen, 2010).

7.7. Conversión de DNA genómico con bisulfito de sodio.

La conversión de DNA genómico con bisulfito de sodio involucra tres etapas. La primera de ellas es la sulfatación, la cual se caracteriza por la adición de bisulfito al doble enlace 5-6 de la citosina. La segunda etapa consiste en la desaminación hidrolítica en la citosina sulfatada y su conversión a uracilo sulfatado. La tercera etapa involucra la eliminación del

trioxido de azufre del anillo de pirimidina con hidróxido de sodio y la obtención de citosinas convertidas a uracilos (Patterson et al, 2011). La conversión de DNA con bisulfito de sodio únicamente se lleva a cabo en las citosinas no metiladas, mientras que en las citosinas metiladas, no ocurre la reacción de desaminación porque son protegidas por el grupo metilo. Por lo tanto el método de conversión con bisulfito de sodio, diferencia las citosinas metiladas de las citosinas no metiladas.

El DNA genómico de los 4 callos obtenidos con la purificación anterior, se trató con el kit EZ DNA Methylation-Gold (Zymo Research). Se adicionaron 130 μL del **CT Conversion Reagent** a 20 μL de la muestra de DNA en un tubo de PCR y se mezcló la muestra pipeteando de arriba hacia abajo, después se centrifugó ligeramente. Posteriormente se colocó el tubo de PCR con la muestra en un termociclador y se implementaron las siguientes condiciones: 94°C por 10 min, 94°C por 1 min, 60°C por 45 s, 45°C por 30 s y 30°C por 30 s y como extensión final 94°C por 2 min. A continuación se adicionaron 600 μL de **M-Binding Buffer** a la columna **Zymo-Spin** y se colocó la columna en un tubo colector proporcionado por el fabricante. Se cargó la muestra que salió del termociclador dentro de la columna **Zymo-Spin** y que contenía el **M-Binding Buffer**, se cerró la tapa y se mezcló por inversión la columna cinco veces. Se centrifugó a 10, 000 x g por 30 s y se desechó el líquido. Después se añadieron 100 μL de **M-Wash Buffer** a la columna. Se centrifugó a 10, 000 x g por 30 s. Enseguida se agregaron 200 μL de **M-Desulphonation Buffer** a la columna y se dejó reposar a temperatura ambiente por 20 min y después de la incubación se centrifugó a 10, 000 x g por 30 s. A continuación se adicionaron 200 μL de **M-Wash Buffer** a la columna. Se centrifugó a 10, 000 x g por 30 s, se adicionaron otros 200 μL de **M-Wash Buffer** y se centrifugó 30 s más. Después se colocó la columna dentro de un microtubo de 1.5 mL, se adicionaron 10 μL de **M-Elution Buffer** directamente a la matriz de la columna. Por último se centrifugó por 30 s a 10, 000 x g para obtener el DNA convertido (Henderson *et al.*, 2010; Patterson *et al.*, 2011). Se sometieron al tratamiento de transformación 2000 ng de DNA por callo. El DNA convertido se almacenó a -20°C para usarse en los próximos 10 días. Se usó 1 μL por cada amplificación.

7.8. Amplificación de los fragmentos de las regiones promotoras.

Una vez convertidas las muestras de DNA de los diferentes callos de maíz se sometieron a amplificación con las concentraciones de los componentes mostradas en la tabla 4 y con los oligonucleótidos diseñados en el Methyl Primer Express v1.0 resumidos en la tabla 6.

Se emplearon las condiciones de amplificación que se describen en la tabla 5. Finalmente se sometieron los productos de PCR a electroforesis en gel de agarosa al 2%, bromuro de etidio al 1%, con buffer de corrida TBE (Tris 0.45 M, Ácido bórico 4.45 M y EDTA 5 mM) 1X y corridas a 90 V.

Tabla 4. Componentes de PCR para DNA transformado con bisulfito de sodio. El oligonucleótido antisentido es representado por Rv y el oligonucleótido sentido por Fw.

	REGIÓN PROMOTORA
COMPONENTES	
TOP TAQ BUFFER 10X	1 μ L
dNTPs	0.2 mM
Rv	0.5 μ M
Fw	0.5 μ M
DNA Polimerasa	2.5 U/ μ L
DNA genómico	500ng/ μ L
SOL. Q	2 μ L

Tabla 5. Condiciones de amplificación para obtener los fragmentos de las regiones promotoras.

Condiciones													
Gen	PCR Región Promotora												
<i>aic1</i>	<table style="border: none;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">94°C 4'</td> <td rowspan="4" style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> <td rowspan="4" style="vertical-align: middle;"><i>45 ciclos</i></td> </tr> <tr> <td>94°C 30"</td> </tr> <tr> <td>52°C 30"</td> </tr> <tr> <td>72°C 45"</td> </tr> <tr> <td>72°C 10'</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	94°C 4'	}	<i>45 ciclos</i>	94°C 30"	52°C 30"	72°C 45"	72°C 10'					
94°C 4'	}	<i>45 ciclos</i>											
94°C 30"													
52°C 30"													
72°C 45"													
72°C 10'													
<i>vp1</i>	<table style="border: none;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">94°C 4'</td> <td rowspan="4" style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> <td rowspan="4" style="vertical-align: middle;"><i>45 ciclos</i></td> </tr> <tr> <td>94°C 30"</td> </tr> <tr> <td>52°C 30"</td> </tr> <tr> <td>72°C 45"</td> </tr> <tr> <td>72°C 10'</td> <td></td> <td></td> </tr> </table>	94°C 4'	}	<i>45 ciclos</i>	94°C 30"	52°C 30"	72°C 45"	72°C 10'					
94°C 4'	}	<i>45 ciclos</i>											
94°C 30"													
52°C 30"													
72°C 45"													
72°C 10'													
<i>wus</i>	<table style="border: none;"> <tr> <td style="padding-right: 10px;">94°C 5'</td> <td rowspan="4" style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> <td rowspan="4" style="vertical-align: middle;"><i>20 ciclos</i></td> </tr> <tr> <td>94°C 30"</td> </tr> <tr> <td>45°C 30"</td> </tr> <tr> <td>72°C 1'</td> </tr> <tr> <td style="padding-right: 10px;">94°C 30"</td> <td rowspan="4" style="font-size: 3em; vertical-align: middle;">}</td> <td rowspan="4" style="vertical-align: middle;"><i>30 ciclos</i></td> </tr> <tr> <td>50°C 30"</td> </tr> <tr> <td>72°C 45"</td> </tr> <tr> <td>60°C 10'</td> </tr> </table>	94°C 5'	}	<i>20 ciclos</i>	94°C 30"	45°C 30"	72°C 1'	94°C 30"	}	<i>30 ciclos</i>	50°C 30"	72°C 45"	60°C 10'
94°C 5'	}	<i>20 ciclos</i>											
94°C 30"													
45°C 30"													
72°C 1'													
94°C 30"	}	<i>30 ciclos</i>											
50°C 30"													
72°C 45"													
60°C 10'													

Tabla 6. Características Generales de los oligonucleótidos. Oligonucleótidos seleccionados del reporte global generado a partir del software Methyl Primer Express

v1.0 para amplificar las regiones promotoras correspondientes a los genes aic1, vp1 y wus.

Gene	Oligo	Long	Tm°	Secuencia	Producto PCR
aic1	Fw	23	53.5	5' AAAAAGGTGATGTGTATGTATAT 3'	457 pb
	Rv	23	54.1	5' CAACCAACTAACATAAAAAAAC 3'	
vp1	Fw	22	53.9	5' AAGTTTTTAAATAGAAGGGTTT 3'	502 pb
	Rv	21	53.5	5' AACCCACTTTATCATAAAAAT 3'	
wus	Fw	23	56.5	5' GAYGATGGATTAGATTATTTTTT 3'	359 pb
	Rv	24	56.8	5' ACCTTCCTAAACTCCTATAATCTC 3'	

7.9. Purificación y secuenciación de los fragmentos obtenidos.

Los productos de amplificación fueron cortados del gel. Se le adicionaron 500 µl de la solución de NaI 6M (**Solución D**, ver anexo 1) y se mezcló por inversión. Después se adicionaron 80 µL de la matriz de silicio y se dejó reposar el tubo a temperatura ambiente por 25 min, se centrifugó la matriz a 16,000 x g por 10 s, eliminando el sobrenadante con micropipeta, se lavó la matriz por resuspensión con 1 mL de solución de lavado (**Solución E**) y se homogenizó en el vórtex. Se realizó un lavado adicional y se centrifugó la matriz a 16,000 x g por 10 s y se eliminó el sobrenadante usando micropipeta. A continuación se adicionaron 40 µL de agua estéril para resuspender el botón en el vórtex y se colocó el microtubo a 70°C por 2 min. Por último se centrifugó el microtubo a 16,000 x g por 2 min, se transfirieron 15 µL de sobrenadante que contenían el DNA genómico a un microtubo nuevo (Li & Sheen, 2010). Y se mandó a secuenciar por el método de Sanger a la unidad de secuenciación del Instituto de Fisiología Celular.

8. RESULTADOS.

8.1 Cuantificación de los niveles de expresión del mRNA de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* de callos de maíz en condiciones de cultivo de proliferación y de regeneración.

Para cuantificar los niveles de expresión de los transcritos de *aic1*, *vp1* y *wus*, primero se normalizaron las concentraciones de RNA total de todas las muestras como se aprecia en la figura 2. Se observa la misma cantidad RNA y la integridad del mismo.

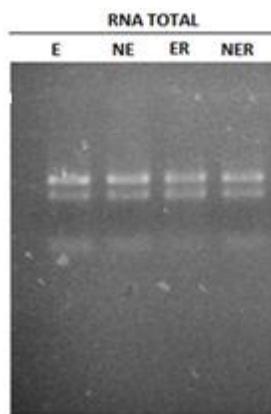


Figura 2. Normalización de RNA total de callos de maíz en diferentes de condiciones de proliferación y regeneración. La concentración de RNA total fue de 100 ng/ μ L y se cargaron 4 μ L en el gel. El RNA total fue tratado previamente con DNAsa y repurificado con fenol-cloroformo. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER).

Como se puede apreciar en las figuras 3a, 4a y 5a se desarrollaron RT-PCR's de punto final para los genes *aic1*, *vp1* y *wus* en callos en proliferación y regeneración. Los pesos moleculares observados en la figuras corresponden a los esperados (tabla 3). Posteriormente se midió la intensidad relativa de las bandas de los callos en diferentes estados de proliferación y regeneración con el programa Image J, las cuales están representadas en las figuras 3b, 4b y 5b. Se encontró que los callos en proliferación E y NE presentaban los niveles de expresión del gen *aic1* más altos que los callos en regeneración ER y NER (figura 3). Por otra parte se encontró que los callos E y ER presentaron los niveles de expresión del gen *vp1* más altos mientras que los callos NE y NER presentaron los niveles de expresión del gen *vp1* más bajos (figura 4). También se encontró que los callos E y ER tuvieron los niveles de expresión del gen *wus* más altos mientras que los callos NE y NER eran bajos (figura 5).

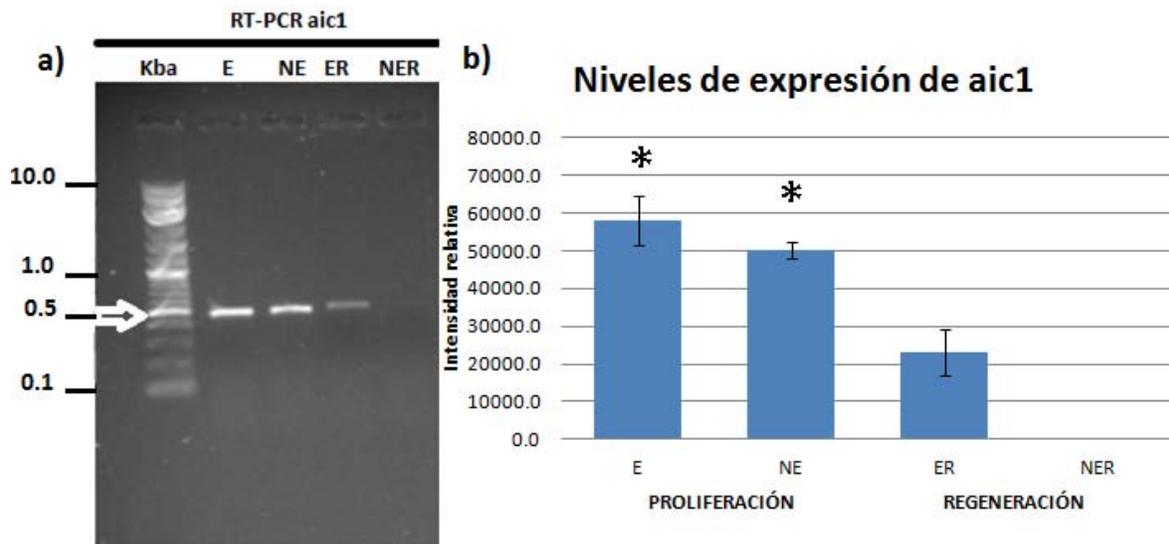


Figura 3. Niveles de expresión de *aic1* en callos de maíz. **a)** Bandas de 500 pb del gen *auxin import carrier1*, amplificadas por la retro-transcripción (RT-PCR) del RNA de callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER). **b)** Densitometría que muestra los niveles de expresión del gen *aic1* en callos de maíz en condiciones de proliferación y regeneración. En la gráfica se observa la cantidad relativa del transcrito para el gen *aic1* las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos negros sobre cada una de las barras indican correlación con los niveles de metilación en fragmentos de regiones promotoras del gen *aic1*.

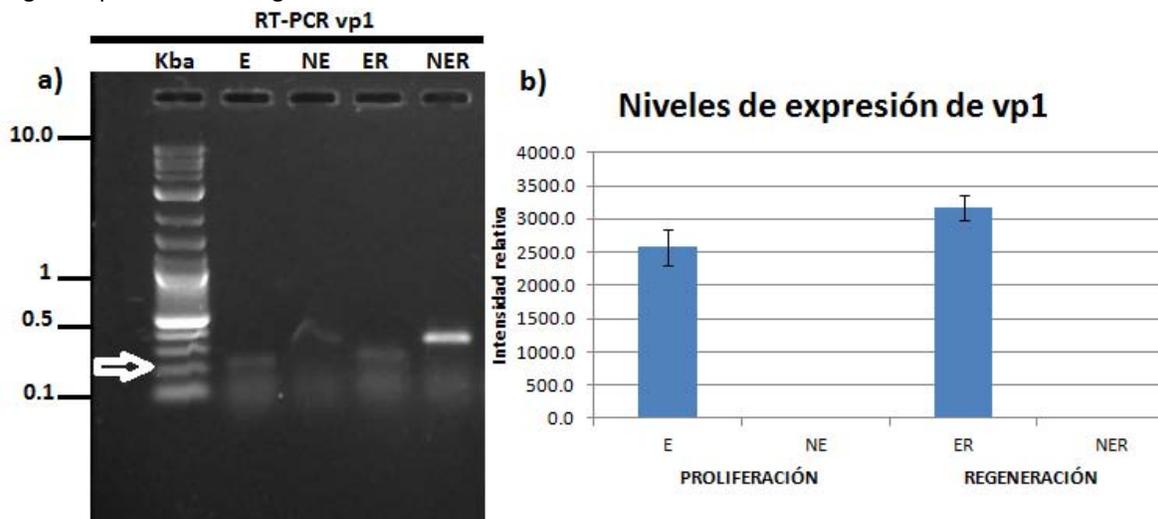


Figura 4. Transcrito *vp1* en callos de maíz. **a)** Bandas de 223 pb del gen *viviparous1*, amplificadas por la retro-transcripción (RT-PCR) del RNA de callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER). **b)** Densitometría que muestra los niveles de expresión del gen *vp1* en callos de maíz en condiciones de proliferación y regeneración. En la gráfica se observa la cantidad relativa del transcrito para el gen *vp1* las barras indican la desviación estándar.

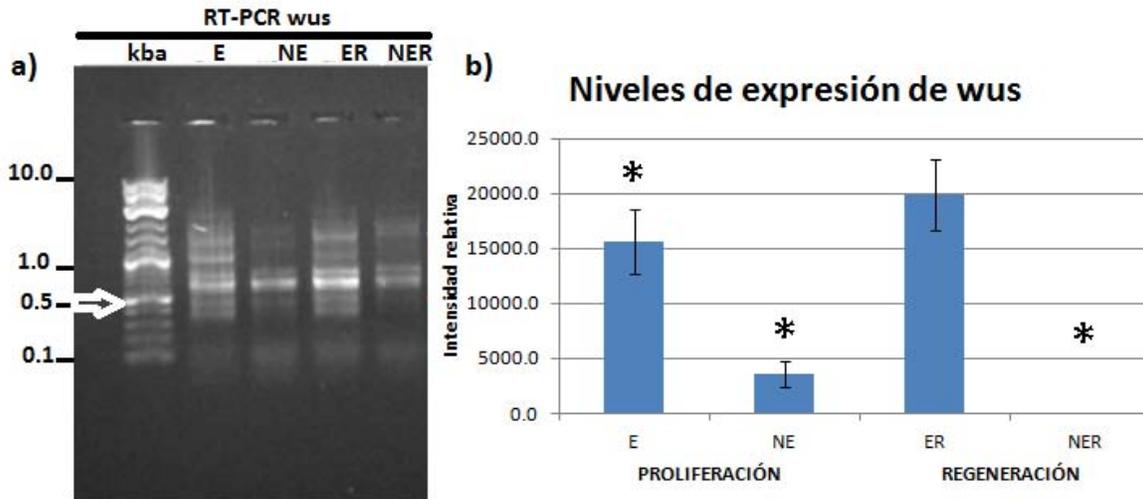


Figura 5. Transcrito *wus* en callos de maíz. **a)** Bandas de 500 pb del gen *wuschel* señalada, amplificadas por la retro-transcripción (RT-PCR) del RNA de callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER). **b)** Densitometría que muestra los niveles de expresión del gen *wus* en callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración. En la gráfica se observa la cantidad relativa del transcrito para el gen *wus* las barras indican la desviación estándar. Los asteriscos negros sobre cada una de las barras indican correlación con los niveles de metilación en fragmentos de regiones promotoras del gen *wus*.

8.1. Selección de las regiones promotoras para los genes *aic1*, *vp1* y *wus*.

Las secuencias de DNA de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* para *Zea mays* se encontraron en el portal GenBank, se alinearon en la base de datos [maizesequence](#) para localizar sus posibles regiones promotoras tomando 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción.

Con el programa PLACE, que es una base de datos de elementos de DNA regulatorios que actúan en *cis* en plantas vasculares, se buscó la caja TATA y el DEP (elemento promotor en flujo descendente) en las secuencias de DNA de las regiones promotoras de los 3 genes (*aic1*, *vp1* y *wus*) (Figura 6), después se ingresaron las posibles regiones promotoras en el programa CpG island searcher con el fin de encontrar las regiones de DNA con el mayor contenido de guaninas y citosinas.

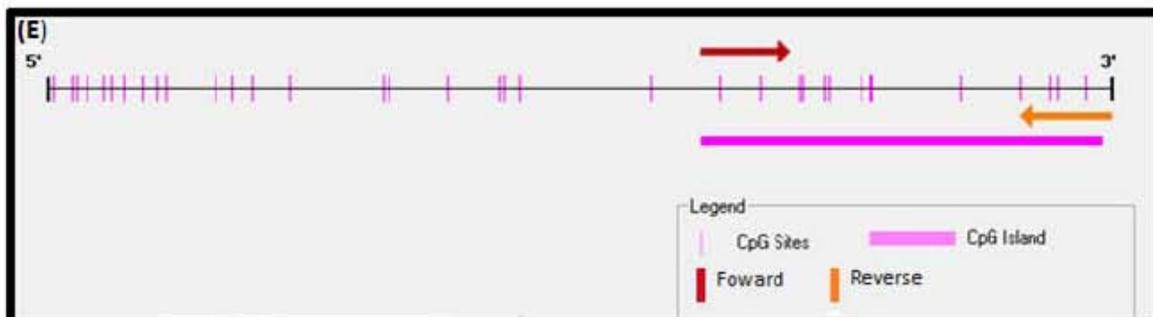
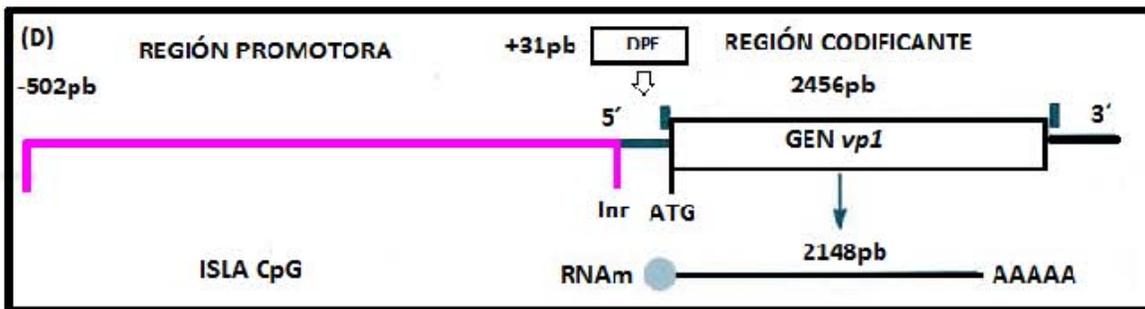
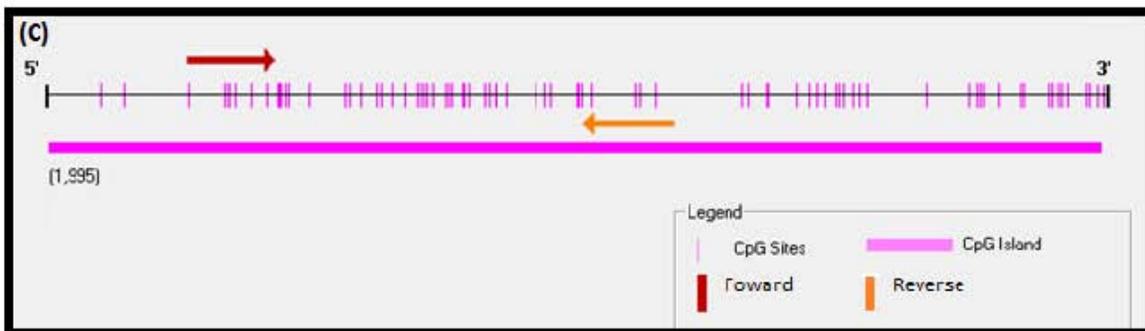
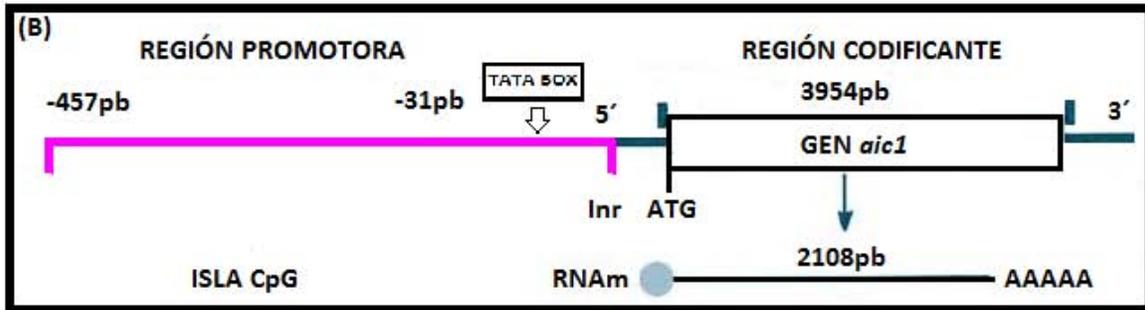
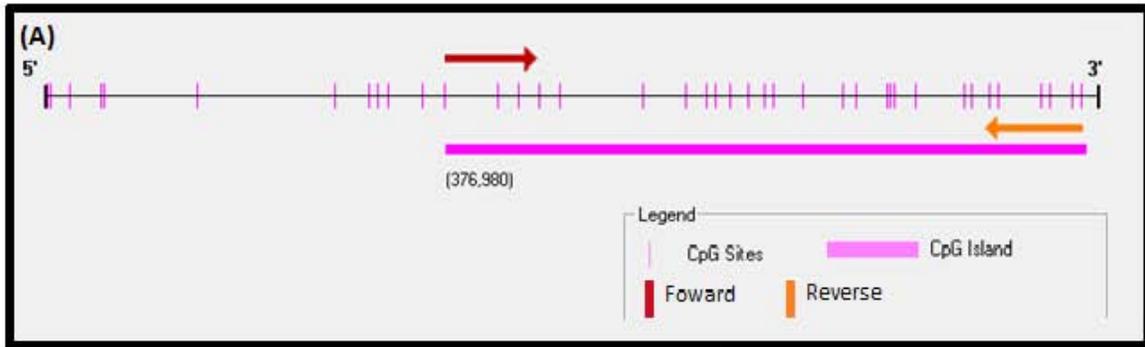
En la figura 6 se observan las características seleccionadas de las posibles regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus*. En la figura 6(A) se puede ver la secuencia del gen *aic1* que dentro de los 1000 pb río arriba del sitio de inicio de la traducción (ATG remarcado en amarillo), presenta la TATA box a -31pb (sombreado en verde), el sitio de inicio de la transcripción o Inr (sombreado en negro) y el sitio de reconocimiento de los oligonucleótidos (en letras rojas 5' a 3' y en letras anaranjadas 3' a 5'). En la figura 6(B) se

puede apreciar la secuencia del gen *vp1* el inicio de la traducción, ATG, se marcó en amarillo, la presencia del elemento promotor en flujo descendente o DEP a +31pb (sombreado negro) y el sitio de reconocimiento de los oligonucleótidos (en letras rojas 5´a 3´ y en letras anaranjadas 3´a 5´). En la figura 6(C) se puede observar la secuencia del gen *wus* nuevamente se presenta el sitio de inicio de la traducción, ATG marcado en amarillo, la presencia del DEP a +32pb (sombreado en negro) y el sitio de reconocimiento de los oligonucleótidos (en letras rojas 5´a 3´ y en letras anaranjadas 3´a 5´). Con el programa Methyl Primer Express se diseñaron oligonucleótidos para amplificar y purificar las regiones promotoras y así poder medir los niveles de metilación.

(A) Región promotora del gen *aicl1*.

```

aicl1      CCGCGATGAGAATATGGGTTGCGTTGGAGGTGAGCAGAATTTTAGGCTGGCGCGGCTAC 60
aicl1      ATTTGATAACAAAAGAAAAAAGAATGGAAGCTTGATCTAGCTTGTGTAGAATAATGCA 120
aicl1      ATAATGCAAGGATTATTTGCACGTTGCCCCACAACATAATTATATATACAGAGAAAAGAAA 180
aicl1      CATTTTTCAATATAACATATATTCTTGTTCAGTTGTGTCTTCCATCCAAAATATGTA 240
aicl1      AATGGTATATGTGATAAAAAACATGCAAGGGACGATGTGAGGAGAAGATCCAAGCCATGGA 300
aicl1      ACACGCATCCAAACGGACAAACACGTTTCAGTTGGATCTTTTAGAGACATCACTCGAGTGAT 360
aicl1      GCACATACTTTCCCGGCCCAAAGAAAAA AAAAAGGTGATGTGCATGCATACATGCATTG 420
FW         AAAAAGGTGATGTGTATGTATAT 23
          ***** **
aicl1      CCCCCGGCCCACTTAGGGCTTGTTCGGTTATTTCCAATCCATACGGATTAGAGGGGATTG 480
aicl1      ATACCGGATTGGAGGGGATTTGACTTACTGGAGATTGAAACCCCTCAATCCCCCTCAAT 540
aicl1      CCATATGGATTGGGGTAGAACCGAACAAGCCCTTATAATGTGTCCAGGCAGAACACTTTC 600
aicl1      TTCGTATGCTCTAGCAATGCACCGCTGCTCCGTCCTTGCTTTCCACGGGATTTTTCACCAC 660
aicl1      GTCTTTTGATCACCCGCTCCTTTCGTTTGCTTTCTTGAACCCAAATAGGATCGAGTAATA 720
          Inr
aicl1      CTATATATTAATGATAAAATAAAGAGAGGCGGGTAGCAGCCACGTACAGTACAGCCCCAG 780
          -31          +1
aicl1      CCCCAGAGGCCCGCGGCCCGGCATGAAAAGAAAGGACCGCTGGGTTTCTTTATGCCCCAG 840
RV         GTTTTTTTATGTTTTAG 16
          **** *
aicl1      CTGCTGGAGTGCTGTCTCCCCCGGGACATCGCCTCTCCATATATACGACACCCCGCT 900
RV         TTGTTG 22
          ** **
aicl1      CCCCCCTGCAATGCACACAACACCAGTAAGCAAGCACCGCCAGCACGCACAAGCAGGCAA 960
aicl1      AGCTCTCGACCATCGCTCTGAGGGATTAATG +235
  
```

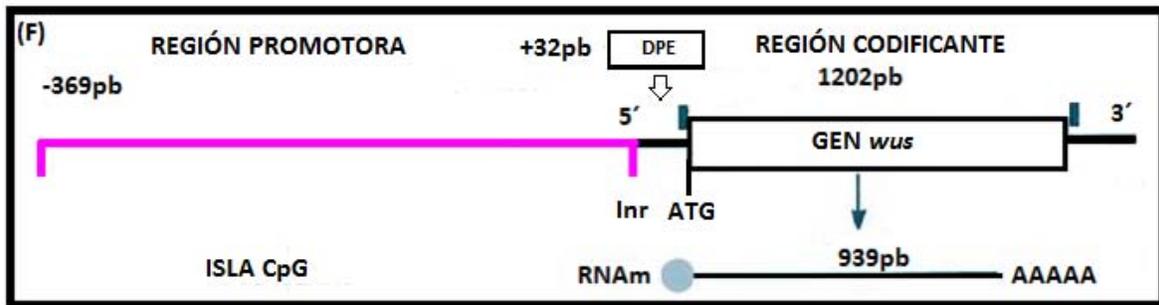


Figura 7. Regiones promotoras de los genes de interés en *Zea mays*. (A), (C) y (E) Regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* mostradas respectivamente y obtenidas *in silico* del programa Methyl Primer Express v1.0. En la parte superior se muestra la región promotora de aproximadamente 900 pb río arriba del sitio de inicio de la transcripción (Inr). Las líneas verticales rosas que atraviesan dicha región son los sitios CG. La línea horizontal rosa representa la isla CpG, la cual está próxima al ATG. (B), (D) y (F) Representan las regiones promotoras de *aic1*, *vp1* y *wus* con el cuerpo del gen. También se observa el elemento de inicio de la transcripción (Inr), así como, el elemento promotor en flujo descendente (DEP).

8.3. Amplificación de los fragmentos de las regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* para el análisis de la metilación específica por el método del bisulfito.

Para obtener los fragmentos de las regiones promotoras se transformó DNA con bisulfito de sodio de callos en diferentes estados en proliferación y regeneración, se desarrollaron amplificaciones con PCR semi-anidada. Como se puede ver en la figura 8, se amplificaron los fragmentos de las regiones promotoras del gen *aic1*, los productos de PCR de los callos en proliferación (E y NE) fueron de 457pb, mientras que los productos de PCR de los callos en regeneración (ER y NER) fueron de 300pb y 250pb, respectivamente. Los productos de PCR de *aic1* que no correspondieron a los descritos en la tabla 6 se mandaron a secuenciar con el fin de obtener información parcial de sus niveles de metilación. También se amplificaron los fragmentos de las regiones promotoras del gen *vp1* y como se puede ver en la figura 9, se obtuvieron productos de PCR de 502pb que corresponden a los esperados. Por último se amplificaron los fragmentos de las regiones promotoras del gen *wus* y como se puede apreciar en la figura 10 el peso molecular del producto de PCR coincidió con el esperado y fue de 369pb. Se puede concluir de las figuras 8, 9 y 10 que el DNA sí fue eficientemente transformado con bisulfito de sodio porque se obtuvo un amplicón con oligonucleótidos específicos, sensibles a metilación y diseñados para reconocer DNA modificado con bisulfito de sodio.

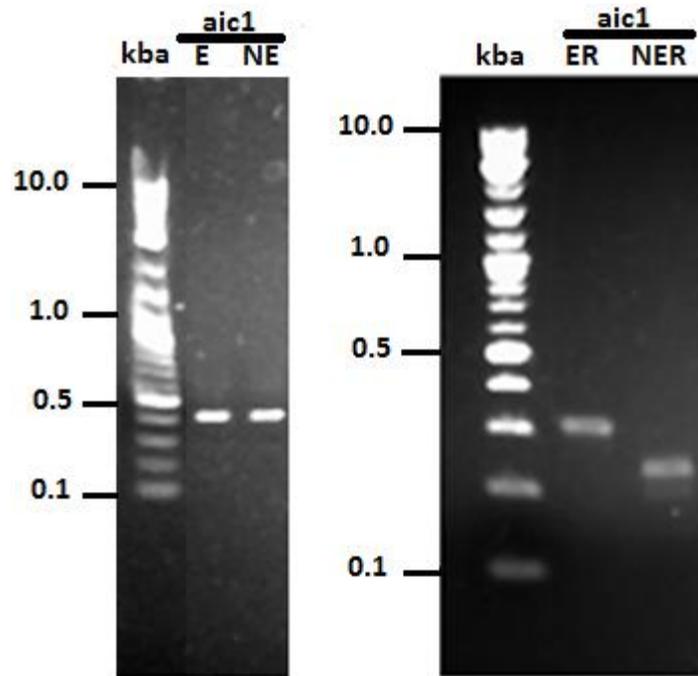


Figura 8. PCR del fragmento de la región promotora del gen *aic1*. Bandas que corresponden a los fragmentos de las regiones promotoras del gen *aic1*, obtenidas por amplificación de DNA transformado con bisulfito de sodio, de los callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER).

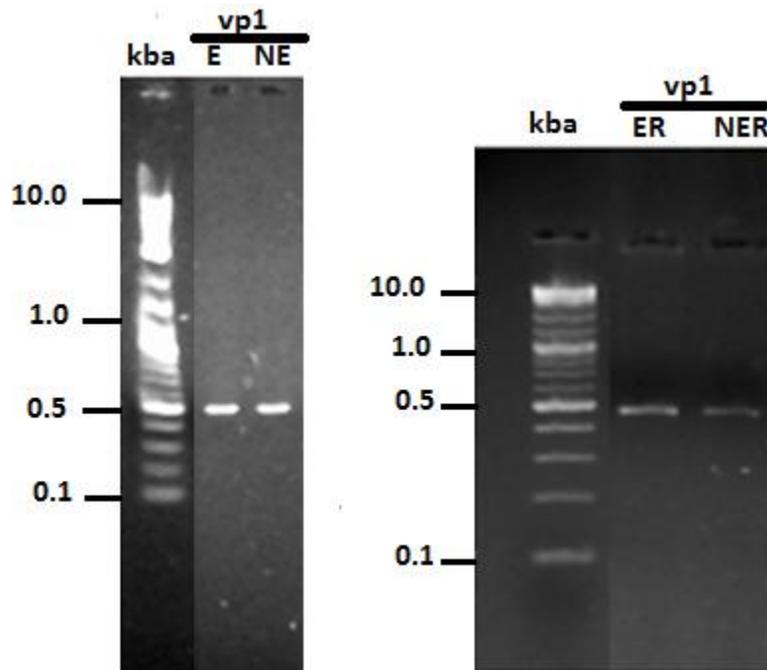


Figura 9. PCR del fragmento de la región promotora del gen *vp1*. Bandas de 502 pb correspondientes a los fragmentos de las regiones promotoras del gen *vp1*, obtenidas por amplificación de DNA transformado con bisulfito de sodio, de los callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER).

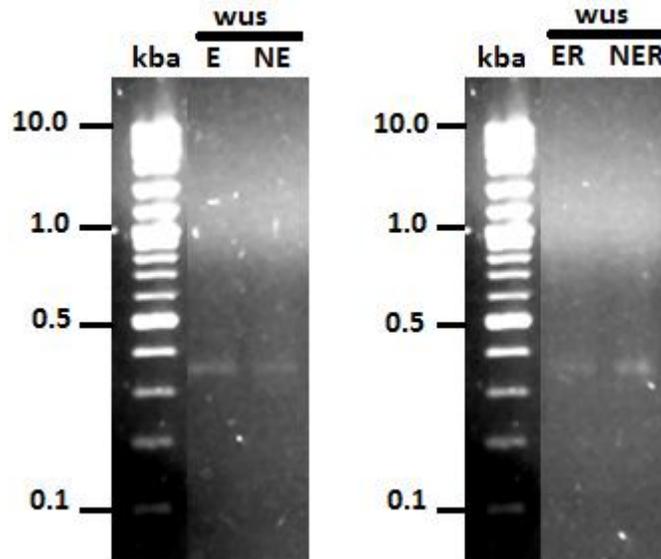


Figura 10. PCR del fragmento de la región promotora del gen *wus*. Bandas de 359 pb correspondientes a los fragmentos de las regiones promotoras del gen *wus*, obtenidas por amplificación de DNA transformado con bisulfito de sodio de callos de maíz en diferentes condiciones de proliferación y regeneración. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER).

8.4. Cuantificación de los niveles de metilación en fragmentos de las regiones promotoras de *aic1*, *vp1* y *wus* de callos en diferentes estados de proliferación y regeneración.

Con el fin de cuantificar los niveles de metilación, los fragmentos de las regiones promotoras se secuenciaron por método de Sanger y se muestran en las figuras 8, 9 y 10. Las citosinas metiladas permanecen intactas en el cromatograma, mientras que las citosinas no metiladas se desaminan a uracilos, los cuales finalmente se aprecian como timinas en la figura 11. De esta manera se pudieron identificar las citosinas metiladas de las no metiladas. En las figuras 12, 13 y 14 se pueden observar los alineamientos generados en el programa ClustalW2 entre los fragmentos de las regiones promotoras transformadas con bisulfito y los fragmentos de las regiones promotoras sin el tratamiento de los genes *aic1*, *vp1* y *wus*. El número de citosinas en cada secuencia transformada con bisulfito de sodio de las regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus* están representadas en las figuras 15, 16 y 17. En dichas figuras se puede ver que los niveles de metilación son bajos o nulos en fragmentos de las regiones promotoras como *aic1* (figura 15) y *vp1* (figura 16), por otra parte se observan con un mayor grado de metilación los fragmentos de las regiones promotoras de *wus* (figura 17).

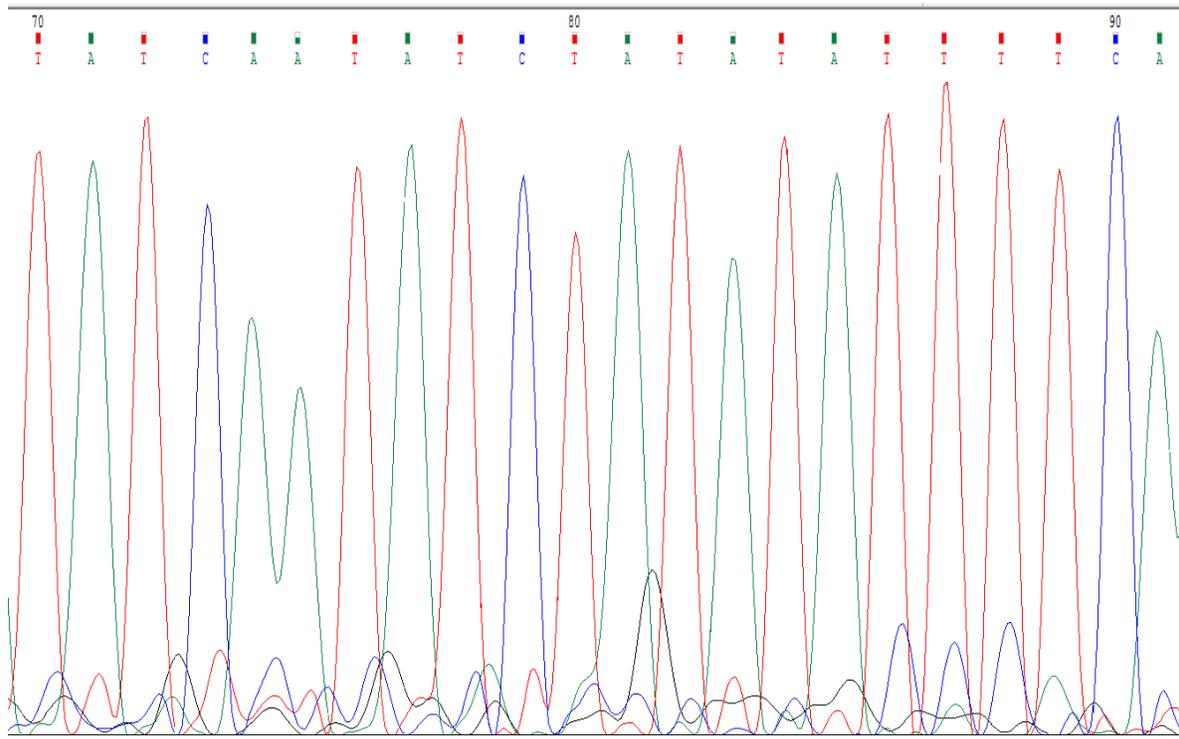


Figura 11. Cromatograma de una secuencia transformada con bisulfito de sodio. Región promotora del gen *wus* en callo ER tratada con bisulfito de sodio. Se pueden apreciar las citosinas metiladas en azul y las no metiladas en rojo.

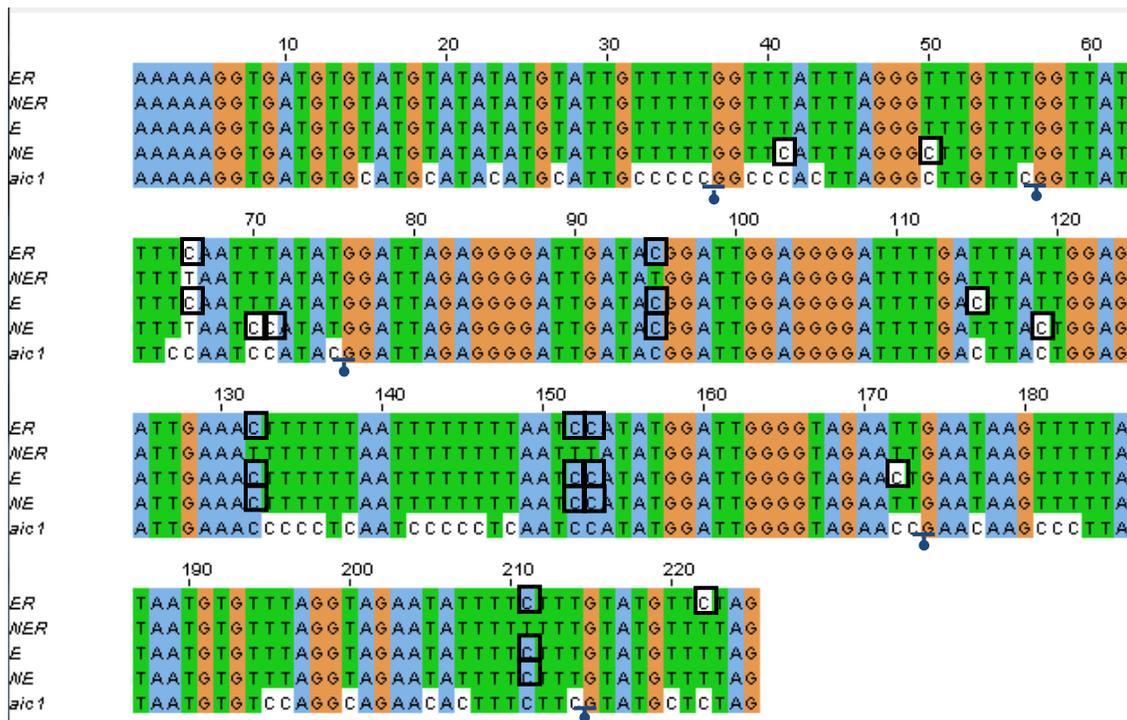


Figura 12. Alineamiento global entre regiones promotoras del gen *aic1* transformadas con bisulfito de sodio. La secuencia etiquetada como *aic1* corresponde a su región promotora sin transformar con bisulfito de sodio, mientras que las demás etiquetas corresponden a las secuencias de las regiones promotoras del gen *aic1* pero transformadas con bisulfito de sodio. Los cuadros negros indican las citosinas metiladas y las rayas horizontales con puntos azules representan los sitios CG en el fragmento de la región promotora del gen *aic1*. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER).

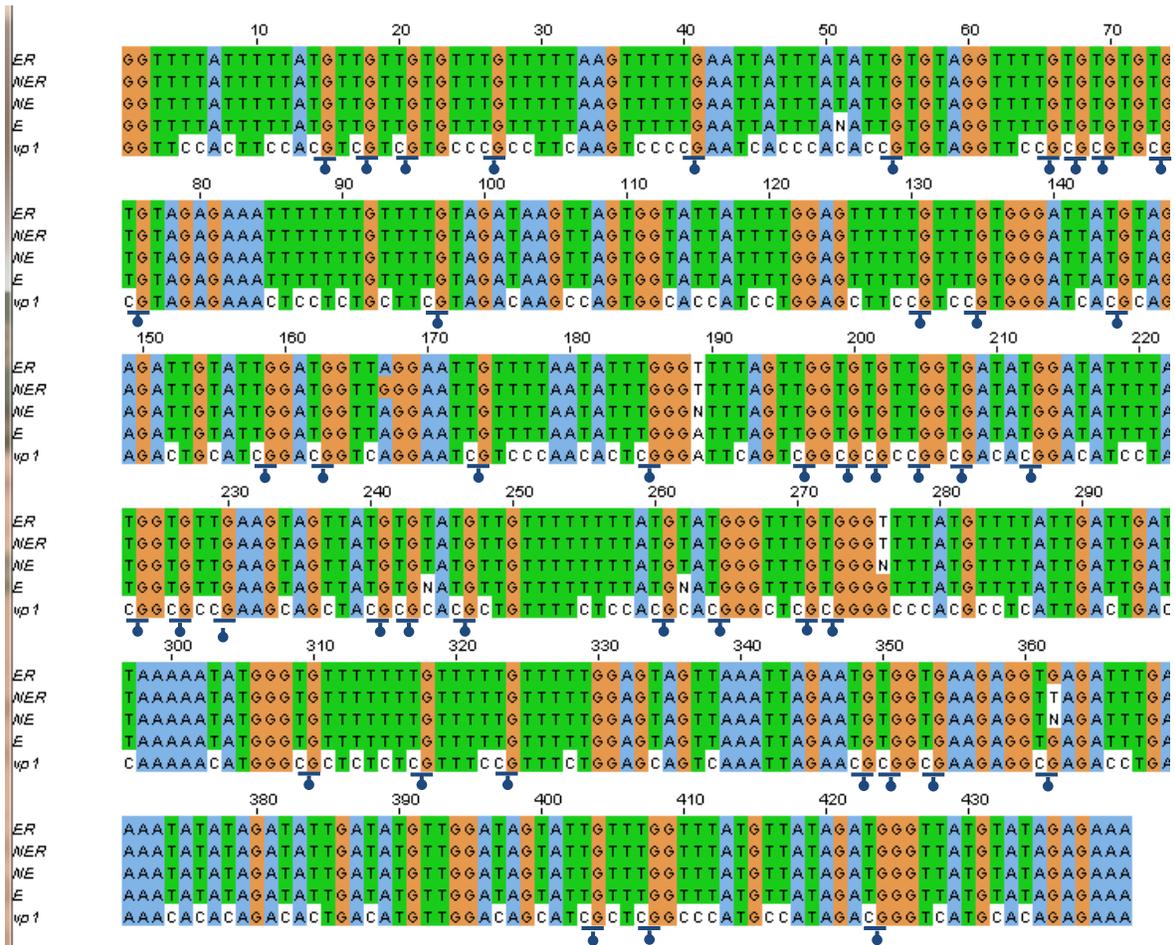


Figura 13. Alineamiento global entre regiones promotoras del gen *vp1* transformadas con bisulfito de sodio. La secuencia etiquetada como *vp1* corresponde a su región promotora sin transformar con bisulfito de sodio, mientras que las demás etiquetas corresponden a las secuencias de las regiones promotoras del gen *vp1* pero transformadas con bisulfito de sodio. Las rayas horizontales con puntos azules representan los sitios CG en el fragmento de la región promotora del gen *vp1*. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER).

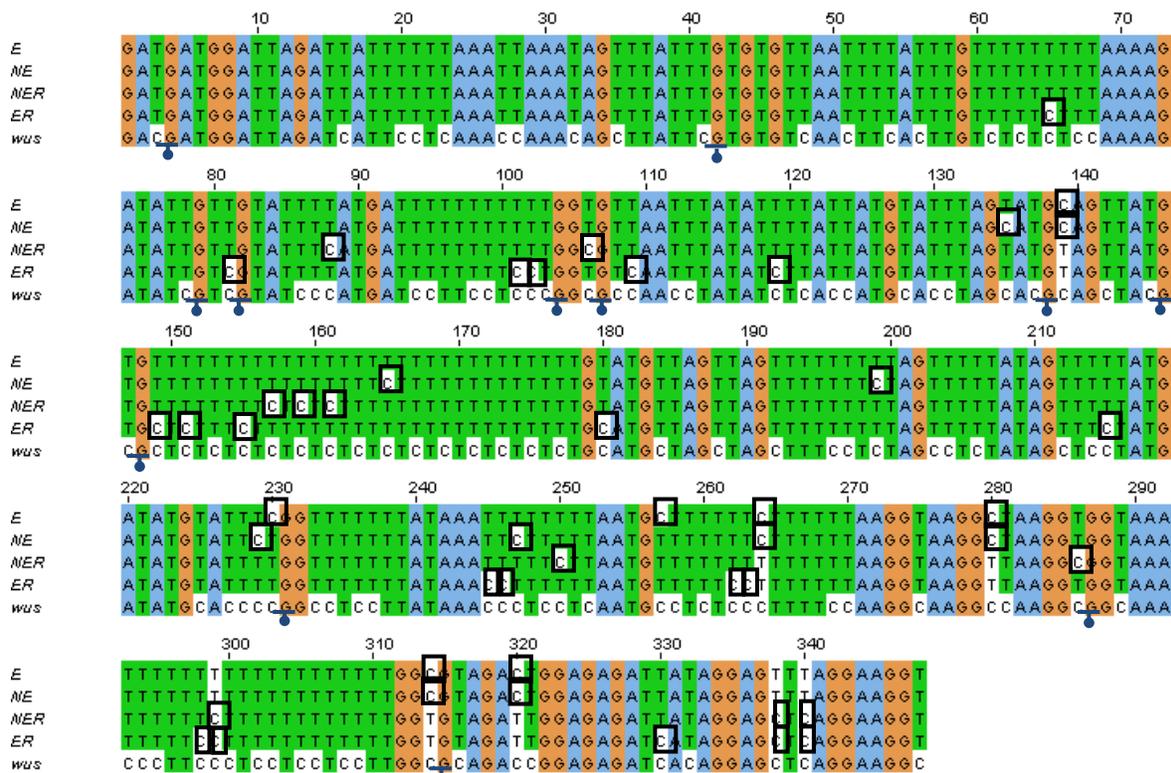


Figura 14. Alineamiento global entre regiones promotoras del gen *wus* transformadas con bisulfito de sodio. La secuencia etiquetada como *wus* corresponde a su región promotora sin transformar con bisulfito de sodio, mientras que las demás etiquetas corresponden a las secuencias de las regiones promotoras del gen *wus* pero transformadas con bisulfito de sodio. Los cuadros negros indican las citosinas metiladas y las rayas horizontales con puntos azules representan los sitios CG en el fragmento de la región promotora del gen *wus*. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER).

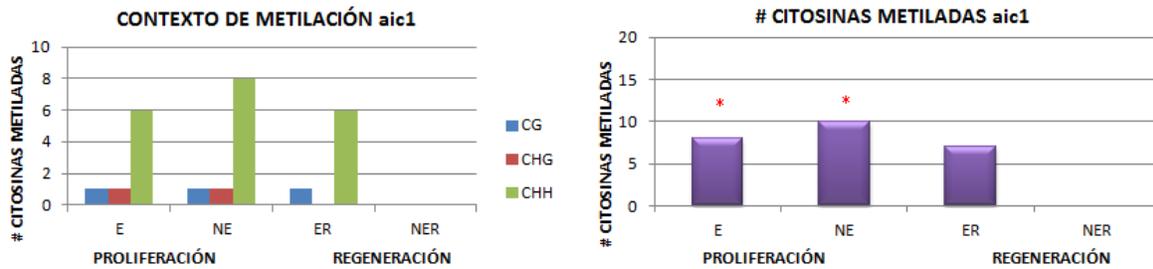


Figura 15. Niveles de metilación en la región promotora de *aic1*. En el eje vertical está representado el número de citosinas metiladas, mientras que el eje horizontal son los diferentes estados de proliferación y regeneración en que se encuentran los callos de maíz. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER). Los asteriscos rojos sobre cada una de las barras indican correlación con los niveles de expresión del gen *aic1*. La metilación en el contexto CG está representada en azul, mientras que la metilación en el contexto CHG está representada en rojo y la metilación en el contexto CHH está representada en verde, donde H= A, T o C.

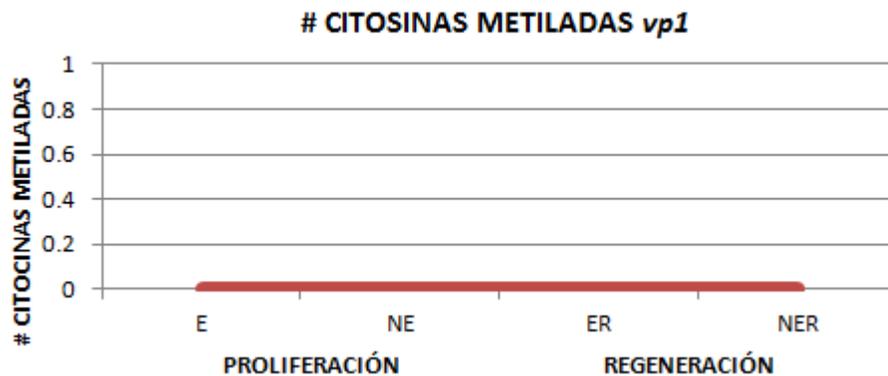


Figura 16. Niveles de metilación en región promotora de *vp1*. En el eje vertical está representado el número de citosinas metiladas, mientras que el eje horizontal son los diferentes estados de proliferación y regeneración en que se encuentran los callos de maíz. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER).

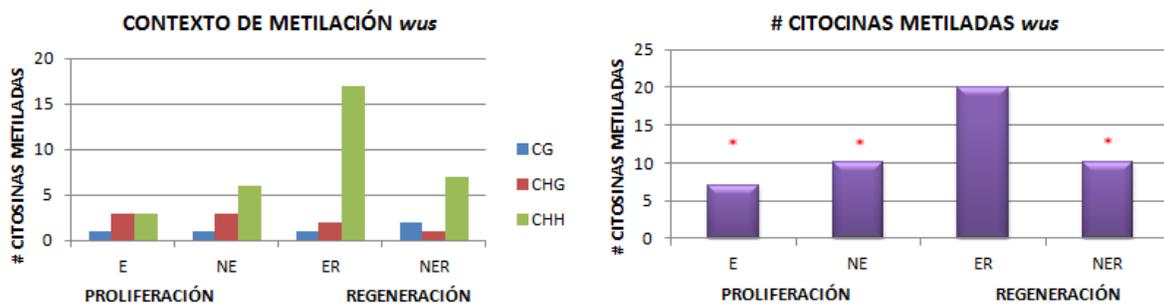


Figura 17. Niveles de metilación en región promotora de *wus*. En el eje vertical está representado el número de citosinas metiladas, mientras que el eje horizontal son los diferentes estados de proliferación y regeneración en que se encuentran los callos de maíz. Callo embriogénico (E), no embriogénico (NE), embriogénico en regeneración (ER) y no embriogénico en regeneración (NER). Los asteriscos rojos sobre cada una de las barras indican correlación con los niveles de expresión del gen *wus*. La metilación en el contexto CG está representada en azul, mientras que la metilación en el contexto CHG está representada en rojo y la metilación en el contexto CHH está representada en verde, donde H= A, T o C.

9. DISCUSIÓN

9.1. Selección de las regiones promotoras de los genes *aic1*, *vp1* y *wus*.

Se ha reportado que la hipermetilación de las regiones promotoras de algunos genes está correlacionada con la represión de expresión génica en células de mamíferos (Calvanese *et al.*, 2012). Tomando como base lo anterior, se buscaron las regiones promotoras de *aic1*, *vp1* y *wus*, a través de tres filtros de búsqueda en diferentes bases de datos. El primer filtro fue elegir una región del DNA río arriba del sitio de inicio de la traducción, el segundo filtro fue que dicha región tuviera la secuencia consenso TATA box o el DEP y el tercer filtro fue buscar si la posible región promotora estaba enriquecida con islas CpG y en caso de que fuera así, seleccionar la que estuviera más cercana al cuerpo del gen (figura 6, tabla 6 y figura 7).

Fue difícil hacer coincidir los tres filtros de búsqueda por dos razones. La primera fue que el programa Methyl Primer Express arrojó oligonucleótidos que no cubrían la caja tata de algunas regiones promotoras como las de *vp1* y la segunda fue que el producto de PCR fue de peso molecular diferente al esperado, tal como se puede observar en los fragmentos de las regiones promotoras de *aic1* de callos en regeneración de la figura 8. Sin embargo esto no impidió obtener información parcial del grado de metilación de los fragmentos de regiones promotoras de callos en regeneración (ER y NER) de *aic1*.

9.2. Correlación entre los niveles de metilación y de transcripción de los genes *aic1*.

Cuando se analizaron los niveles de expresión del mensajero de *aic1* se encontró que para los callos en proliferación E y NE los niveles fueron los más altos respecto a los callos ER y NER (figura 3). Recientemente se reportó que las auxinas están involucradas en la cascada de señalización de la vía TOR, la cual promueve el crecimiento celular en plantas (Bögge *et al.*, 2013) (Schepetilnikov *et al.*, 2013). Al inicio de este estudio usamos un medio con auxinas para promover el crecimiento celular de los callos en fase de proliferación y en concordancia con nuestros datos, los niveles de expresión del mensajero de *aic1* incrementaron en los callos (E y NE) en proliferación celular (figura 3).

Posteriormente a los callos en proliferación se les eliminaron las auxinas en la etapa de regeneración (medio MS sin auxinas) y como se observa en el callo ER los niveles de expresión de *aic1* bajan notoriamente (Figura 3), lo que quiere decir que en la etapa de

regeneración, las células dejan de crecer para diferenciarse, por otra parte en el callo NER no se observa la presencia del transcrito *aic1* (figura 3), esto era de esperarse ya que *aic1* está involucrado en el gravitropismo de raíz y el callo NER está deprovisto de raíz.

Como se ha mencionado anteriormente, en este trabajo se evaluaron 4 callos, dos en proliferación (E y NE) y otros dos en regeneración (ER y NER) con el fin de analizar los niveles de metilación en regiones promotoras de *aic1* y así correlacionarlo con sus niveles de transcripción en el cuerpo del gen. En la figura 12 se encontró que la región promotora de *aic1* tiene un bajo porcentaje de metilación (8 y 10 citosinas metiladas) en callos en proliferación (E y NE), mientras que en los callos en regeneración ER y NER bajan aún más los niveles de metilación (7 y 0 citosinas metiladas, respectivamente). La región promotora del gen que codifica para fosfoenol piruvato carboxilasa (PEPC) en plantas de maíz, presenta cuatro citosinas metiladas, las cuales se correlacionan negativamente con la expresión de dicho gen a nivel de transcrito. Cuando las hojas se someten a iluminación continua, baja el nivel de metilación de las citosinas y el gen de la PEPC se expresa, contrario a cuando se tratan las hojas a oscuridad (Tolley *et al.*, 2012). Sin lugar a dudas la correlación entre los niveles de metilación y los de transcripción era clara, sin embargo se encontró que existía una región dentro del promotor que era capaz de regular los niveles de expresión del gen PEPC (Tolley *et al.*, 2012), por lo tanto había una correlación, aunque ésta no se podía explicar. En el caso del gen *aic1* presenta más metilaciones en sus regiones promotoras en proliferación que en el estudio antes mencionado, sin embargo en esta investigación sólo desarrollamos una sola secuenciación por bisulfito, por lo que es complicado asegurar que las metilaciones que presentan nuestras secuencias de DNA sean reguladas o reguladoras de la expresión génica, pues tendríamos que secuenciar una región más grande o toda la región promotora para tener conclusiones claras. Dichas metilaciones se convierten en posibles puntos de regulación de la expresión génica en *cis*. En este estudio se encontró correlación entre la metilación de citosinas y la expresión del transcrito de *aic1* en los callos en proliferación E y NE. Cuando el callo E registró niveles de expresión del gen *aic1* altos, éste presentó 8 metilaciones en su región promotora sin embargo cuando el callo NE registró niveles de expresión de *aic1* bajos, aumentaron a 10 las metilaciones en su región promotora (figuras 3 y 15). Los callos en regeneración no mostraron ningún tipo de correlación entre los niveles de expresión del gen *aic1* y los de metilación en regiones promotoras de dicho gen (figuras 3 y 15).

En resumen, lo que aporta este estudio al conocimiento actual de *aic1* en maíz fueron los niveles de expresión del transcrito *aic1* durante la embriogénesis somática. Los niveles de expresión de *aic1* incrementaron durante las etapas de proliferación y disminuyeron durante las etapas de regeneración. También se demostró que *aic1* no se expresa en el callo NER y esto es concordante con la incapacidad de este callo para generar raíz (figura 3). Por último los resultados de este trabajo nos aproximaron a conocer el grado de metilación en los fragmentos de las regiones promotoras más cercanas al cuerpo del gen *aic1* en cuatro etapas diferentes de la embriogénesis somática (figura 12) y se encontró que no existió correlación entre los niveles de expresión (figura 3) y metilación (figura 15) entre los transcritos y sus regiones promotoras en callos en regeneración ER y NER, pero sí en los callos en proliferación E y NE (figuras 3 y 15).

9.3. Correlación entre los niveles de metilación y de transcripción del gen *vp1*.

Cuando se evaluaron los niveles de expresión del gen *vp1*, se encontró que sólo para los callos E y ER se observaban los niveles más altos de expresión, mientras que para los dos callos restantes (NE y NER) no se observó la presencia del transcrito de *vp1* (figura 4). Curiosamente los callos NE y NER son los que no logran diferenciarse completamente, lo que sugiere que el gen *vp1* es un factor de transcripción importante no solo en germinación de la semilla y en la maduración del embrión (Durantini *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2011; Suzuki *et al.*, 2014), sino también en el progreso a embrión somático. Se ha mostrado en embriogénesis cigótica que la región promotora de este gen está acetilada, la cual promovió que los niveles de expresión del mensajero de *vp1* se mantuvieran hasta 48 h después de la imbibición, retardando así la germinación de la semilla (Zhang *et al.*, 2011). Como parte de una explicación especulativa a los resultados de la figura 4, se proponen los siguientes antecedentes: se ha evidenciado que los factores epigenéticos PcG y PKL participan activamente en la embriogénesis somática, reprimiendo la expresión de genes que son de embrión (Xu & Huang, 2014). La expresión ectópica de los genes *lec1* (*leaf cotyledon 1*) y *fus3* (*fusca3*) resulta en tejidos con rasgos embrionarios (Lotan *et al.*, 1998; Harding *et al.*, 2003). Los genes *lec1* y *fus3* son reprimidos por el factor epigenético PcG durante la embriogénesis somática tardía (Zhang *et al.*, 2007); lo que da pie a pensar que los callos E y ER de este estudio tienen mayores niveles de expresión de *vp1*, porque el factor epigenético PcG reprimió la expresión de genes de etapas embrionarias tempranas (*fus3* y *lec1*) a nivel de las histonas H3K27me3 (Zhang *et al.*, 2007). Es posible

que la expresión del gen *vp1* promovió que los callos se diferenciaron y generarán embriones somáticos. Esta hipótesis es consistente con los niveles de ABA en callos embriogénicos de caña de azúcar, en los cuales se ha demostrado que la concentración es de 87.1 pmol/g de tejido seco, mientras que en callos no embriogénicos su concentración es de 0.5pmol/g de tejido seco (López, 1996; Linacero *et al*, 2010). En el caso de los callos NE y NER, se hace la inferencia que tienen niveles bajos de ABA porque tienen niveles bajos de expresión de *vp1* (factor de transcripción al que se une directamente ABA); puede ser que los callos NE y NER están manteniendo la expresión de genes de etapas embrionarias tempranas como *lec1* y *fus3*, dejando que persistan algunos rasgos embrionarios a pesar de bajar los niveles de auxinas en el medio MS en regeneración. Como consecuencia, no expresa el gen *vp1* durante la embriogénesis somática, no pueden promover la maduración del embrión y por lo tanto no pueden entrar al programa de diferenciación completamente. Por otra parte, no se encontraron metilaciones en regiones promotoras del gen *vp1*. Suponemos que la regulación epigenética en el DNA se sitúa río arriba del sitio evaluado en este trabajo, o puede que la regulación epigenética se sitúa a nivel de las histonas como se ha reportado para embriogénesis somática en *Arabidopsis* (Zhang *et al.*, 2007) y la embriogénesis cigótica en maíz (Zhang *et al.*, 2011).

En resumen, lo que aporta este trabajo al conocimiento actual de *vp1* en maíz, son los niveles de expresión de dicho gen durante la embriogénesis somática. Los niveles de expresión del gen *vp1* incrementan únicamente en los callos E y ER, mientras que en los callos NE y NER no se observó la presencia de dicho transcrito (figura 4). Por último no se encontraron metilaciones en los fragmentos de las regiones promotoras (figura 13 y 16) y no se encontró correlación con los niveles de expresión del transcrito *vp1* en diferentes estados de proliferación y regeneración.

9.4. Correlación entre los niveles de metilación y de transcripción del gen *wus*.

El gen *wuschel* (*wus*) participa activamente en la asa de retroalimentación negativa en conjunto con el gen *clavata* (*clv3*). Es por esta vía de retroalimentación que son mantenidas las células madre y su proliferación en el meristemo. El gen *wus* codifica un factor de transcripción que es expresado en una población central de células madre dentro del meristemo. De tal manera que si hay un exceso de células madre esto conduce a un exceso de *clv3*, el cual provoca una reducción en la expresión de *wus*, disminuyendo el número de células madre. Si por el contrario hay pocas células madre en el meristemo,

los niveles de expresión de *clv3* disminuyen y por lo tanto incrementan los de *wus*, el cual a su vez incrementa el número de células madre. Por lo tanto, *clv3* es un regulador negativo del mantenimiento de células madre en el meristemo, mientras que *wus* es un regulador positivo.

Se ha reportado que *wus* promueve la transición de una etapa vegetativa a una de embrión, manteniendo la identidad de células madres embrionarias y generando la formación de callo (Zuo *et al.*, 2002; Bouchabke'-Cousa *et al.*, 2012; Nic *et al.*, 2013). En ese mismo sentido, se ha encontrado que los miembros de la familia *wuschel/wox* están involucrados en la polaridad del embrión, así como en el establecimiento y mantenimiento del meristemo (Zhang *et al.*, 2010). También la transcripción del gen *wus* es promovida por auxinas (Su *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2011) y citocininas (Gordon *et al.*, 2007) en callos E de *Arabidopsis thaliana*. Además, en *Ocotea catharinensis* se ha demostrado que el gen *wus* se expresa durante etapas tempranas de la embriogénesis somática (Santa-Catarina *et al.*, 2011). En nuestro estudio el callo E pertenece al inicio de la embriogénesis somática y fue crecido en un medio de proliferación que contenía auxinas y citocininas, lo que explica que dicho callo tenga niveles altos en la expresión del gen *wus* (figura 5).

Por otra parte en el callo NE se encontraron valores muy bajos para el transcrito de *wus* a pesar de contener auxinas y citocininas en el medio de proliferación. Fenotípicamente, el callo NE mostraba baja tasa de crecimiento, lo que sugiere dos cosas: que el callo NE no es capaz de corregir su crecimiento deficiente a través de las auxinas y citocininas y que dichas hormonas no pueden incrementar los niveles de expresión de *wus* en el callo NE. Por lo tanto las citocininas y las auxinas no fueron capaces de activar la expresión del gen *wus* en callos NE pero sí en callos E (figura 5).

Por otra parte se evaluó la metilación en fragmentos de regiones promotoras de *wus* en callos en proliferación y se encontró que el callo E presentaba 7 metilaciones y el callo NE contaba con 10 metilaciones (figura 14). En este trabajo se observó que a medida que los niveles de expresión del gen *wus* aumentan en callos E (figura 5), el número de citosinas metiladas disminuyen (figura 17). Un fenómeno semejante ocurre en el callo NE, en el cual se observa que los niveles de expresión disminuyen (figura 5) cuando el número de citosinas metiladas incrementan a 10 en regiones promotoras del gen *wus* (figura 14) lo que concuerda con los datos reportados en *Arabidopsis thaliana* (Li *et al.*, 2011).

Se ha evidenciado que a nivel molecular la formación del callo ER de *Arabidopsis thaliana* se asoció con la presencia de *lec1* y de *wus*, mientras que la maduración del embrión somático se asoció únicamente con la presencia del gen *wus* (Zuo *et al.*, 2002). También se ha reportado que la sobre-expresión de *wus* en explantes de raíces provocó la diferenciación ectópica de tallos (Gallois *et al.*, 2004). En *Arabidopsis thaliana* se generaron mutantes para el gen *Wus*, de los cuales el 95% perdieron su capacidad para regenerar tallo *in vitro* respecto al control (Gordon *et al.*, 2007). Parece ser que la expresión de *wus* en callos puede ser requerida para promover la identidad de células progenitoras de meristemo de tallo, así como, el desarrollo del tallo. Además se ha demostrado recientemente que la sobre-expresión del gen *wus* de *Arabidopsis thaliana* en callos de plantas de algodón resultó en diferenciación en embriones somáticos pero con anomalías (como estructuras asociadas a hoja), las cuales se explican por la expresión constitutiva del gen (Bouchabke'-Cousa *et al.*, 2012). De tal manera que sí se necesita la presencia de *wus* en el callo durante la etapa de diferenciación, pero esta expresión debe ser controlada durante la embriogénesis tardía.

El callo ER fue el que tuvo mayores niveles de expresión de *wus* a pesar de haber sido crecido en medio sin auxinas y sin citocininas (figura 5), y fue el único capaz de generar un embrión somático, lo que concuerda con reportes anteriores (Bouchabke'-Cousa *et al.*, 2012; Zuo *et al.*, 2002). El callo NER comprende niveles muy bajos de expresión de *wus* (figura 5) y es por eso que quizá no se diferencie, ya que necesitan una concentración más elevada de *wus* para inducir la regeneración del tallo (Gallois *et al.*, 2004) y otros órganos como hoja y raíz. La capacidad de *wus* para estimular organogénesis y/o embriogénesis somática parece ser dependiente del contexto celular, de hormonas exógenas así como el origen del callo.

Respecto a las metilaciones presentes en los fragmentos de las regiones promotoras de los callos en regeneración, se encontró que el callo ER tenía 21 metilaciones, mientras que el callo NER contaba con 10 (figura 14). Por lo tanto sólo se encontró correlación entre las citosinas metiladas y el silenciamiento génico en el callo NER, pues a medida que los niveles de expresión de *wus* disminuyeron, los niveles de metilación en su región promotora incrementaron (figura 5 y figura 17). No se encontró correlación entre los niveles de expresión y los de metilación en los callos ER, lo que representa un acontecimiento interesante, dado que el callo ER es el que tiene mayores niveles de

expresión de *wus* a la vez que tiene los niveles más altos de metilación en su región promotora. Para tener una visión más clara y certera de la regulación epigenética de la región promotora del gen *wus*, se tiene que evaluar río arriba de la región evaluada y a nivel de las histonas.

En resumen, lo que aporta este estudio al conocimiento actual del gen *wus* en maíz, son los niveles de expresión de dicho gen durante la embriogénesis somática; incrementaron sus niveles de expresión únicamente en callos que formaron embriones somáticos (figura 5). Por otra parte, nuestros datos indican que existe una correlación entre la metilación en fragmentos de las regiones promotoras de *wus* y la regulación negativa en los niveles de expresión del gen *wus* en los callos E, NE y NER (figura 17 y figura 5). Por otra parte, no se encontró correlación entre los niveles de expresión y metilación en callos ER (figura 17 y figura 5).

10. CONCLUSIONES

- Se demostraron los patrones de expresión de los transcritos de *aic1*, *vp1* y *wus* durante la embriogénesis somática de maíz y cómo afecta a la regeneración.
- Los niveles de expresión de *aic1* se incrementaron durante las etapas en proliferación y disminuyeron durante las etapas de regeneración del callo.
- Durante la diferenciación del callo de maíz a embrión somático hay expresión de los genes *aic1*, *vp1* y *wus*.
- Los resultados de este trabajo nos aproximaron a conocer el grado de metilación en fragmentos de las regiones promotoras más cercanas al cuerpo del gen *aic1* en cuatro etapas diferentes de la embriogénesis somática y se encontró que no existió correlación entre los niveles de expresión y metilación en los callos ER y NER. Pero sí se encontró correlación entre los niveles de expresión y metilación en los callos E y NE.
- Los niveles de expresión del gen *vp1* incrementaron sólo en el callo E y ER.
- No se encontraron metilaciones en los fragmentos de las regiones promotoras y no se encontró correlación entre los niveles de expresión del transcrito *vp1* y los niveles de metilación del fragmento de la región promotora de dicho gen durante las cuatro etapas de la embriogénesis somática.
- Los callos E y ER fueron los que mostraron mayores niveles de expresión de *wus* y fueron los únicos capaces de generar un embrión somático.
- No se encontró correlación entre los niveles de expresión de *wus* y la metilación en callos ER. Sin embargo se encontró correlación entre los niveles de expresión y los de metilación en los callos E, NE y NER.
- Hay regulación epigenética por medio de las metilaciones en citosinas de los fragmentos de las regiones promotoras de los genes *aic1* y *wus* los cuales afectan el proceso de regeneración en callos de maíz, sin embargo no se encontró evidencia de regulación epigenética a nivel del DNA en los fragmentos de las regiones promotoras del gen *vp1*. No obstante pueda existir un tipo de regulación epigenética río arriba de los sitios evaluados y a nivel de las histonas que puedan explicar los fenotipos reportados en este trabajo.

11. LITERATURA CITADA.

Barber WT, Zhang W, Win H, Varala KK, Dorweiler JE, Hudson ME & Moose SP. (2012). Repeat associated small RNAs vary among parents and following hybridization in maize. PNAS. 109 (26) 10444-10449.

Baybrook SA & Harada JJ. (2008). LECs go crazy in embryo development. Trends in Plant Science Vol. 13 issue 12, pages 624-630. Cell Press.

Berckmans B, Vassileva V, Schmid SPC, Maes S, Parizot B, Naramoto S, Magyar Z, Alvim Kamei CL, Koncz C, Bögre L, Persiau G, De Jaeger G, Friml J, Simon R, Beeckman T & De Veylder L. (2011). Auxin-Dependent Cell Cycle Reactivation through Transcriptional Regulation of *Arabidopsis E2Fa* by Lateral Organ Boundary Proteins. *The Plant Cell*, 23(10), 3671–3683.

Boom R, Sol C., Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM & Noordaa van der J. (1990). Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol*, 28:495-503.

Bögre L, Henriques R & Magyar Z. (2013). TOR tour to auxin. *EMBO J* 32, 1069-1071.

Bouchabké-Coussa O, Obelliane M, Linderme D, Montes E, Maia-Grondard A, Vilaine F and Pannetier C. (2013). Wuschel overexpression promotes somatic embryogenesis and induces organogenesis in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) tissues cultured in vitro. *Plant Cell Rep* 32: 675-686

Bouyer D, Roudier F, Heese M, Andersen ED, Gey D. & Nowack MK. (2011). Polycomb repressive complex 2 controls the embryo-to-seedling phase transition. *PLoS Genetics*, 7, e1002014.

Boyle, J. S., Lew, A. M. (1995). An inexpensive alternative to glassmilk for DNA purification. *Trends Genet*, 11(8).

Braszewska-Zalewska AJ, Wolny EA, Smialek L & Hasterok R (2013). Tissue-Specific Epigenetic Modifications in Root Apical Meristem Cells of *Hordeum vulgare*. *PLoS ONE* 8(7): e69204. doi:10.1371/journal.pone.0069204

Calderon Villalobos LI, Tan X, Zheng N & Estelle M. (2010). Auxin perception: structural insights. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2:a005546.

Calvanese V, Fernández AF, Urdinguio RG, Suárez-Alvarez B, Mangas C, Pérez-García V, Bueno C, Montes R, Ramos-Mejía V, Martínez Cambor P, Ferrero C, Assenov Y, Bock C, Menendez P, Carrera AC, Lopez-Larrea C & Fraga MF. (2012). A promoter DNA demethylation landscape of human hematopoietic differentiation. *Nucleic Acids Research*, 40(1), 116–131.

Chomczynski P & Sacchi N. (1987). Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal. Biochem.* 162, 156.

CpG Island searcher. 2012. cpgislands.usc.edu. 01/Ago/2012

De Buyser J, Marcotte, J. L. & Henry Y. (1992). Genetic analysis of in vitro wheat somatic embryogenesis. *Euphytica* 63: 265-270.

Durantini D, Giulini A, Malgioglio A, Pilu R, Tuberosa R, Sanguineti C & Gavazzi G. (2008). Vivipary as a tool to analyze late embryogenic events in maize. *Heredity* 101, 465-470.

Fan M, Xu C, Xu K & Hu Y. (2012). LATERAL ORGAN BOUNDARIES DOMAIN transcription factors direct callus formation in *Arabidopsis* regeneration. *Cell Research*, 22(7), 1169–1180.

Gallois JL, Nora FR, Mizukami Y, Sablowski R (2004) WUSCHEL induces shoot stem cell activity and developmental plasticity in the root meristem. *Genes Dev* 18(4):375–380.

Garrocho-Villegas V, Jesús-Olivera MT & Sánchez-Quintanar MT. (2012). Maize somatic embryogenesis: recent features to improve plant regeneration. *Methods Mol Biol* 877: 173-182

Genbank. (2012). <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>. Fecha de consulta 01/Ago/2012.

Gordon SP, Heisler MG, Reddy GV, Ohno C, Das P, & Meyerowitz EM. (2007). Pattern formation during de novo assembly of the *Arabidopsis* shoot meristem. *Development*, 134, 3539–3548.

Gordon SP, Chickarmane VS, Ohno C & Meyerowitz EM. (2009). Multiple feedback loops through cytokinin signaling control stem cell number within the *Arabidopsis* shoot meristem. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106, 16529–16534.

Guo M, Rupe MA, Yang X, Crasta O, Zinselmeier C, Smith OS & Bowen B. (2006). Genome-wide transcript analysis of maize hybrids: allelic additive gene expression and yield heterosis. *Theor Appl Genet.* 113:831–845.

Harding EW, Tang W, Nichols KW, Fernandez DE & Perry SE. (2003). Expression and maintenance of embryogenic potential is enhanced through constitutive expression of AGAMOUS-Like 15. *Plant Physiol* 133(2): 653-63.

He G, Chen B, Wang X, Li X, Li J, He H, Yang M, Lu L, Qi Y, Wang X & Wang-Deng X. (2013). Conservation and divergence of transcriptomic and epigenomic variation in maize hybrids. *Genome Biology*, 14(6), R57.

He C, Chen X, Huang H, & Xu L. (2012). Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured *Arabidopsis* tissues. *PLoS Genetics*, 8, e1002911.

Henderson IR, Chan SR, Cao X, Johnson L & Jacobsen SE. (2010). Accurate sodium bisulfite sequencing in plants. *Epigenetics* 5:1, 47-49.

Hoecker N, Keller B, Muthreich N, Chollet D, Descombes P, Piepho HP & Hochholdinger F. (2008). Comparison of maize (*Zea mays* L.) F1-hybrid and parental inbred line primary root transcriptomes suggests organ-specific patterns of nonadditive gene expression and conserved expression trends. *Genetics*. 179:1275–1283.

Hu J, Mitchum MG, Barnaby N, Ayele BT, Ogawa M, Nam E, Lai WC, Hanada A, Alonso JM, Ecker JR, Swain SM, Yamaguchi S, Kamiya Y & Sun T. (2008). Potential Sites of Bioactive Gibberellin Production during Reproductive Growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 20(2), 320–336.

INEGI. 2012. Anuario estadístico del comercio exterior de los Estados Unidos Mexicanos 2011. Importación endógenas. (http://www.inegi.org.mx/prod_serv/contenidos/espanol/bvinegi/productos/continuas/economicas/exterior/2011/md/anu_md_1.pdf). Fecha de consulta: 10/Jun/2013.

Jahnke S, Sarholz B, Thiemann A, Kuhr V, Gutierrez-Marcos JF, Geiger HH, Piepho HP & Scholten S. (2010). Heterosis in early seed development: a comparative study of F1 embryo and endosperm tissues 6 days after fertilization. *Theor Appl Genet* 120:389–400.

Law JA & Jacobsen SE. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* 2010 March ; 11(3): 204–220.

Lee HW, Kim MJ, Kim NY, Lee SH & Kim J. (2012). LBD18 acts as a transcriptional activator that directly binds to the EXPANSIN14 promoter in promoting lateral root emergence of *Arabidopsis*. *Plant J.* 73, (2):212-224.

Lewin B. (2010) *Genes X*. Mc Graw Hill. ISBN 10: 970-10-6685-5.

Li, J. F., Li, L. and Sheen, J. (2010). Protocol: a rapid and economical procedure for purification of plasmid or plant DNA with diverse applications in plant biology. *Plant Methods*, 6(1): 1-8.

- Lin Xu & Hai Huang. (2014) Genetic and Epigenetic Controls of Plant Regeneration. Current Topics in Developmental Biology, Volume 108
- Linacero R, López-Bilbao MG & Vázquez AM. (2001) Expression of different abscisic acid-responsive genes during somatic embryogenesis in sugarcane (*Saccharum officinarum*). *Protoplasma* 217(4): 199-204.
- Lister R, Pelizzola M, Downen RH, Hawkins RD, Hon G, Tonti-Filippini J, Nery JR, Lee L, Ye Z, Ren B & Ecker JR. (2009) Human DNA methylomes at base resolution show widespread epigenomic differences. *Nature* 462: 315-322
- Li W, Liu H, Cheng ZJ, Su YH, Han HN, et al. (2011) DNA Methylation and Histone Modifications Regulate *De Novo* Shoot Regeneration in *Arabidopsis* by Modulating *WUSCHEL* Expression and Auxin Signaling. *PLoS Genet* 7(8): e1002243.
- Lotan T, Ohto M, Yee KM, West Ma, Lo R, Kwong RW, Yamagishi K, Fischer RL, Golberg RB & Harada JJ. (1998). *Arabidopsis* LEAFY COTYLEDON1 is sufficient to induce embryo development in vegetative cells. *Cell* 93(7): 1195-205.
- Lu C, Vasil IK, Ozias-Akins P. (1982). Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor Appl Genet.* 62(2):109-12.
- López Bilbao MG. (1996). Estudio de la expresión génica durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Tesis doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Facultad de Ciencias Biológicas, Departamento de Genética.
- Meyer S, Pospisil H & Scholten S. (2007). Heterosis associated gene expression in maize embryos 6 days after fertilization exhibits additive, dominant and overdominant pattern. *Plant Mol Biol* 63:381–391.
- McCarty DR, Hattori T, Carson CB, Vasil V, Lazar M & Vasil IK. (1991). The viviparous-1 developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 66, 895-905.
- Mordhorst AP, Voerman KJ, Hartog MV, Meijer EA, Went JV, Koornneef M & de Vries SC. (1998). Somatic Embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* Is Facilitated by Mutations in Genes Repressing Meristematic Cell Divisions. *Genetics* 149: 549–563.
- Morel A, Teyssier C, Trontin JF, Eliášová K, Pešek, Beaufourd M, Morabito D, Boizot N, Le Mette´ C, Belal-Bessai L, Reymond I, Harvengt L, Cadene M, Corbineau F, Vágner M, Label P, and Lelu-Walter MA. (2014). Early molecular events involved in *Pinus pinaster* Ait. somatic embryo development under reduced water availability: transcriptomic and proteomic analyses. *Scandinavian Plant Physiology Society*, ISSN 0031-9317.
- Morgulis A, Coulouris G, Raytselis Y, Madden TL, Agarwala R & Schäffer AA. (2008). Database Indexing for Production MegaBLAST Searches, *Bioinformatics* 24: 1757-1764.
- Nic-Can GI, López-Torres A, Barredo-Pool F, Wrobel K, Loyola-Vargas VM, et al. (2013) New Insights into Somatic Embryogenesis: LEAFY COTYLEDON1, BABY BOOM1 and WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN4 Are Epigenetically Regulated in *Coffea canephora*. *PLoS ONE* 8(8): e72160.
- Paschold A, Marcon C, Hoecker N & Hochholdinger F. (2010). Molecular dissection of heterosis manifestation during early maize root development. *Theor Appl Genet.* 120:383–388.
- Patterson K, Molloy L, Qu W, & Clark S. (2011). DNA Methylation: Bisulphite Modification and Analysis. *Journal of Visualized Experiments : JoVE*, (56), 3170.
- Pechanova O, Pechan T, Ozkan S, McCarthy FM, Williams WP & Luthe DS. (2010). Proteome profile of the developing maize (*Zea mays* L.) rachis. *Proteomics* (16): 3051-5.

PLACE. 2012. dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html. 01/Ago/2012

Rival A, Beulé T, Aberlenc-Bertossi F, Tregear J and Jaligot E. (2010). Plant Epigenetics: From Genomes to Epigenomes. *Not. Bot. Hort. Agrobot. Cluj* 38 (2), Special Issue, 09-15.

Santa-Catarina C, Ricon de Olivera R, Cutri C, Floh EIS & Dornelas MC. (2011). WUSCHEL-related genes are expressed during somatic embryogenesis of the basal angiosperm *Ocotea catharinensis* Mez. (Lauraceae). *Trees* 26:493-501.

Santos MO & Aragao FJL. (2009). Role of SERK genes in plant environmental response. *Plant Signaling & Behavior* 4:12.

Schepetilnikov M, Dimitriva M, Mancera-Martínez E, Geldreich A, Keller M and Ryabova LA. (2013). TOR and S6K1 promote translation reinitiation of uORF-containing mRNAs via phosphorylation of eIF3h. *EMBO J* 32:1087-1102.

Sena G & Birnbaum KD. (2010). Built to rebuild: In search of organizing principles in plant regeneration. *Current Opinion in Genetics & Development* 20, 460–465.

Siriwardana S and Nabors MW. (1983). Tryptophan Enhancement of Somatic Embryogenesis in Rice. *Plant Physiol.* 73(1): 142–146.

Skoog F & Miller CO. (1957). Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 11, 118–130.

Solís MT, Chakrabarti N, Corredor E, Cortés-Eslava J, Rodríguez-Serrano M, Biggiogera M, Risueño MC, S Testillano P. (2013). Epigenetic Changes Accompany Developmental Programmed Cell Death In Tapetum Cells. *Plant Cell Physiol* 55 (1): 16-29.

Steward FC, Mapbs MO & Mears K. (1958). Growth and organized development of culture cells. II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. *American Journal of Botany*, 45, 705–708.

Strable J & Scanlon M J. (2009). Maize (*Zea mays*): a model organism for basic and applied research in plant biology. *Cold Spring Harb. Protoc.* 10, pdb.emo132.

Stupar RM, Gardiner JM, Oldre AG, Haun WJ, Chandler VL & Springer NM. (2008). Gene expression analyses in maize inbreds and hybrids with varying levels of heterosis. *BMC Plant Biol.* 8:33.

Su YH, Zhao XY, Liu YB, Zhang CL, O'Neill SD, Zhang XS (2009) Auxin-induced WUS expression is essential for embryonic stem cell renewal during somatic embryogenesis in *Arabidopsis*. *Plant J* 59:448–460.

Suzuki M, Wu S, Li Q & McCarty DR. (2014). Distinct functions of COAR and B3 domains of maize VP1 in induction of ectopic gene expression and plant developmental phenotypes in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 85(1-2): 179-191.

Swanson-Wagner RA, Jia Y, DeCook R, Borsuk LA, Nettleton D & Schnable PS. (2006). All possible modes of gene action are observed in a global comparison of gene expression in a maize F1 hybrid and its inbred parents. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:6805–6810.

Tolley BJ, Woodfield H, Wanchana S, Bruskiwich R & Hibberd JM. (2012). Light-regulated and cell-specific methylation of the maize *PEPC* promoter. *Journal of Experimental Botany* 63(3), 1381–1390.

Tsuda E, Yang H, Nishimura T, Uehara Y, Sakai T, Furutani M, Koshiba T, Hirose M, Nozaki H, Murphy AS, Hayashi K. (2011). Alkoxy-auxins are selective inhibitors of auxin transport mediated by PIN, ABCB, and AUX1 transporters. *J. Biol Chem*; 286(3):2354-64.

Uzarowska A, Keller B, Piepho HP, Schwarz G, Ingvarsdén C, Wenzel G & Lubberstedt T. (2007). Comparative expression profiling in meristems of inbred-hybrid triplets of maize based on morphological investigations of heterosis for plant height. *Plant Mol Biol.* 63:21–34.

Vega-Bartol JJ, Santos RR, Simões M & Miguel MC. (2013). Normalizing gene expression by quantitative PCR during somatic embryogenesis in two representative conifer species: *Pinus pinaster* and *Picea abies*. *Plant Cell Rep* 32:715–729

Van der Graaff E, Laux T and Rensing S. A. (2009). The Wus homeobox-containing (WOX) protein family. *Genome Biol.* 10 (12): 248

Wang X, Elling AA, Li X, Li N, Peng Z, He G, Sun H, Qi Y, Liu XS, Deng XW. (2009). Genome-wide and organ-specific landscapes of epigenetic modifications and their relationships to mRNA and small RNA transcriptomes in maize. *Plant Cell* 21:1053-1069.

Waters AJ, Makarevitch I, Eichten SR, Swanson-Wagner RA, Yeh CT, Xu W, Schnable PS, Vaughn MW, Gehring M & Springer NM. (2011). Parent-of-origin effects on gene expression and DNA methylation in the maize endosperm. *Plant Cell* 23:4221-4233.

Weigel D and Jürgens. (2002). Stem cells that make stems. *Nature* Vol. 415.

Wu Zheng., Xueyan Zhang., Zuoren Yang., Jiahe Wu., Fenglian Li, Lanling Duan, Chuanliang Liu, Lili Lu, Chaojun Zhang, Fuguang Li. (2014) AtWuschel Promotes Formation of the Embryogenic Callus in *Gossypium hirsutum*. *Plos One*, Vol 9, issue 1.

Xu L and Huang H. (2014). Genetic and epigenetic control of plant regeneration. *Current Topics in Developmental Biology*, Vol. 108.

Xu J, Hofhuis H, Heidstra R, Sauer M, Friml J & Scheres B. (2006) A molecular framework for plant regeneration. *Science* 311 (5759): 385-8.

Yadav RK, Perales M, Gruel J, Girke T, Jönsson H, Reddy GV. (2011) WUSCHEL protein movement mediates stem cell homeostasis in the *Arabidopsis* shoot apex. *Genes Dev* 25:2025-30.

Yang XY & Zhang XL. (2010). Regulation of somatic embryogenesis in higher plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 29: 36–57.

Zhang L, Qiu Z, Hu Y, Yang F, Yan S, Zhao L, Li B, He S, Huang M, Li J (2011). ABA treatment of germinating maize seeds induces VP1 gene expression and selective promoter-associated histone acetylation. *Physiol Plant* 143:287–296

Zhang X, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, Ecker JR. (2006). Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 126:1189-1201.

Zhang X, Clarenz O, Cokus S, Bernatavichute YV, Pellegrini M, Goodrich J & Jacobsen SE. (2007). Whole-genome analysis of histone H3 lysine 27 trimethylation in *Arabidopsis*. *PLoS Biol* 5(5):e129.

Zhang X, Zong J, Liu J, Yin J, Zhang D. (2010) Genome-wide analysis of WOX gene family in rice, sorghum, maize, *Arabidopsis* and poplar. *J Integr Plant Biol.* 52(11):1016-26.

Zheng Zhang, Scott Schwartz, Lukas Wagner, and Webb Miller. (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J Comput Biol* 7(1-2):203-14.

Zuo J, Niu QW, Frujis G and Chua NH. (2002). The WUSCHEL gene promotes vegetative-to-embryonic transition in *Arabidopsis*. *The plant Journal* 30(3), 349-359

12. ANEXOS.

Anexo 1.

ANEXO 1. Soluciones utilizadas en extracción de DNA genómico y separación de bandas en gel de agarosa por el método del dióxido de silicio.

Solución	Composición de la Solución	Almacenaje
Solución A (Solución de resuspensión)	Tris-HCl 50mM pH= 7.5, EDTA 10 mM	4°C
Solución D (Solución caotrópica)	NaI 6M	4°C
Solución E (Solución de lavado)	Etanol 50% , Tris-HCl 10mM pH= 7.5, NaCl 100mM, EDTA 1mM	-20° C
Solución F	SDS 10% fenol:cloroformo:alcohol isoamílico	Temp amb.
Solución G	(25 : 24 : 1, v/ v)	4°C