



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de la metilación de DNA asociada a RNAs pequeños en la regulación de elementos transponibles durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays L.*)

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Q.F.B. José Luis Contreras Guerra

TUTOR PRINCIPAL

Dra. Tzvetanka Dimitrova Dinkova

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dra. Ma De La Paz Sánchez Jiménez

Instituto de Ecología, UNAM

Dra. Alejandra Alicia Covarrubias Robles

Instituto de Biotecnología, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO. OCTUBRE, 2018



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Agradecimientos Financieros:

Para la realización de este trabajo, se agradece el apoyo financiero del proyecto PAPIIT IN 211215 y PAIP 5000-9118.

Así mismo se agradece al proyecto de infraestructura CONACYT 252001 por el financiamiento de los equipos de uso común en el Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Al Programa de Apoyo a los Estudios del Posgrado (PAEP) por financiar la asistencia al simposio "RNA Silencing in Plants" en Keystone, Colorado, Estados Unidos.

También se agradece por la Beca CONACYT # 549656 otorgada durante la realización de los estudios de Maestría en el programa de Ciencias Bioquímicas.

Agradecimientos de apoyo técnico:

Se agradece al laboratorio de Cultivo de Tejidos del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química, UNAM, en particular a la M. en C. María Teresa de Jesús Olivera Flores y a Araceli Arandal Martínez.

Se agradece el uso del equipo de PCR tiempo real de la Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y la Industria (USAII) de la Facultad de Química, UNAM y la asesoría técnica del Biol. Jorge Herrera Díaz.

Resumen

En muchas especies de plantas la metilación del DNA es frecuentemente considerada como punto clave en el silenciamiento tanto de genes como de elementos transponibles (TEs) y otras secuencias repetidas. Este fenómeno se ha estudiado ampliamente en distintos modelos y bajo diversas condiciones. En cultivos celulares de plantas se han observado variaciones en la metilación del DNA y se han asociado con el efecto de variación somaclonal en plantas regeneradas a partir de cultivos *in vitro* prolongados. Se considera que este fenómeno puede deberse en parte a la desregulación de TEs durante el proceso, sin embargo, no se sabe en qué punto del subcultivo ocurren la mayor parte de los cambios y el mecanismo por el cual se lleva a cabo.

En el presente trabajo se determinaron los niveles de metilación de determinados retrotransposones pertenecientes a las clases Copia y Gypsy en dos genotipos de maíz, la variedad VS-535 y el híbrido H-565. Se observó un comportamiento opuesto entre estas variedades para la metilación de la mayoría de los TEs durante la etapa de inducción de callos embriogénicos. Sin embargo, en los cultivos prolongados ambos fondos genéticos presentaron poca variación de la metilación en estos TEs. Sorprendentemente los cambios observados en la metilación del DNA no pudieron ser asociados con la abundancia de RNAs pequeños de 22 o 24 nt, y se encontró que un siRNA de 21 nt abundante, derivado de la familia Ji presentó una acumulación contrastante con respecto a la metilación de la secuencia del transposon.

Por otra parte, se determinó que la transcripción de retrotransposones no depende de las variedades de maíz empleadas y que contrario a lo esperado, durante la inducción de callos embriogénicos de maíz disminuye la expresión de ciertos TEs analizados, mientras que en cultivos prolongados la expresión parece depender de la clase de TE más que del estado de la metilación del DNA.

Abstract

In many plant species the DNA methylation is often considered to be a key in both, genes and transposable elements (TEs) or other repeated sequences silencing. This phenomenon has been studied widely in different plant models and under diverse conditions. Variations in DNA methylation have been observed in plant cell cultures, and have been associated with somaclonal variation in regenerated plants from long term *in vitro* cultures. It is thought that this phenomenon is related to TEs deregulation, however, it is not known yet at which subculture point do most of the changes occur and the mechanism responsible for this.

In the present work we determined the methylation levels of some families within the Copia and Gypsy retrotransposon classes in two maize genotypes, the VS-535 variety and the H-565 hybrid. The methylation status showed opposite behaviors between varieties in overall TEs methylation, though, during longterm cultures both genotypes showed a tendency towards methylation variations in the TEs sequences studied. Surprisingly, the observed changes in DNA methylation could not be associated with the abundance of 22/24-nt small RNAs, but an abundant 21-nt siRNA generated from Ji family accumulated to contrasting levels when compared to the methylation level in the retrotransposon.

On the other hand, we found that transcription does not depend on the maize varieties used in the study, and opposite to what was expected, it decreased during the induction of maize embryogenic callus. Expression of these TEs during long term subcultures apparently depends on the TE class and does not necessarily keep a relationship with DNA methylation.

ÍNDICE

1. Introducción

1.1. Regulación epigenética

1.2. Transposones

1.2.1. Clasificación de elementos transponibles (TE)

1.2.2. Relevancia de los TEs

1.2.3. Mecanismo de silenciamiento de TEs

1.3. Embriogénesis somática de maíz

1.3.1. Variación somaclonal

2. Antecedentes

2.1. Antecedentes directos

3. Hipótesis

4. Objetivo

4.1. Objetivos particulares

5. Diseño experimental

5.1. Selección de elementos transponibles (TE) a ser analizados, secuencias consenso y diseño de oligonucleótidos

5.2. Análisis de la expresión de cada TE seleccionado en embrión inmaduro y callos de 1, 4, 6, 10, 15 y 18 meses mediante RT-PCR

5.2.1. Aislamiento de RNA

5.2.2. Tratamiento con DNasa

5.2.3. Ensayos de RT-PCR cuantitativo en un solo paso

- 5.3. Análisis de la metilación de regiones específicas en los TEs seleccionados mediante ensayo de McrBC-PCR con DNA genómico
 - 5.3.1. Extracción de DNA
 - 5.3.2. Digestión con McrBC
 - 5.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)
 - 5.3.4. Resolución de fragmentos de PCR y densitometría de las bandas
- 5.4. Evaluación de la presencia de siRNAs originados de los TEs seleccionados
 - 5.4.1. Electroforesis y transferencia de RNAs pequeños
 - 5.4.2. Marcaje de la sonda, hibridación y exposición
- 6. Resultados
 - 6.1. Determinación del estado de metilación de la secuencia de cada TE
 - 6.2. Perfiles de expresión transcripcional de TEs por RT-PCR
 - 6.3. Evaluación de abundancia de ra-siRNAs asociados a TEs durante distintos tiempos de subcultivo de callos embriogénicos de maíz
- 7. Discusión
- 8. Conclusiones
- 9. Perspectivas
- 10. Anexos
- 11. Referencias

1. INTRODUCCIÓN

Las plantas a diferencia de otros organismos no tienen la capacidad de migrar de un ambiente a otro. Por lo cual guardan una relación muy estrecha con el medio que las rodea obligándolas a desarrollar mecanismos de adaptación a las diferentes condiciones de vida a las que son sometidas. Estas adaptaciones pueden llevarse a cabo en primera instancia a través de mecanismos fisiológicos, sin embargo, en casos severos donde los cambios en el medio ambiente son más drásticos y la adaptación fisiológica no es efectiva, surge la necesidad de emplear mecanismos a nivel molecular que modifiquen la expresión y estructura del DNA, logrando contener los efectos nocivos generados por el medio ambiente.

Los elementos transponibles (TEs) pueden actuar a nivel molecular afectando de manera favorable la expresión génica durante un evento de estrés ambiental. No obstante, debido al tipo de mecanismo por el cual actúan, los TEs presentan un riesgo al insertarse en genes o zonas regulatorias no deseadas generando un resultado negativo en el organismo.

Esta dualidad positiva/negativa que presentan los TEs obliga a las plantas a desarrollar mecanismos de regulación para evitar efectos nocivos. La regulación epigenética es uno de los mecanismos más estudiados y vinculado con las plantas debido a la influencia que tiene por el medio ambiente y a su naturaleza reversible, por lo que resulta una vía interesante por la cual se pueda llevar a cabo la regulación de TEs durante eventos desfavorables para las plantas.

1.1. Regulación epigenética

La cromatina es un complejo de DNA y proteínas que mantiene organizados a los cromosomas dentro del núcleo de las células eucarióticas [Jerabek y Heermann 2014; Fierz y Muir 2012; Nature glossary 2014]. La organización del DNA es afectada por cambios epigenéticos como la metilación de bases nitrogenadas, las modificaciones de histonas y la asociación con RNAs no codificantes (ncRNA por sus siglas en inglés) [Henderson y Jacobsen 2007; Huettel *et al* 2007] (Figura 1).

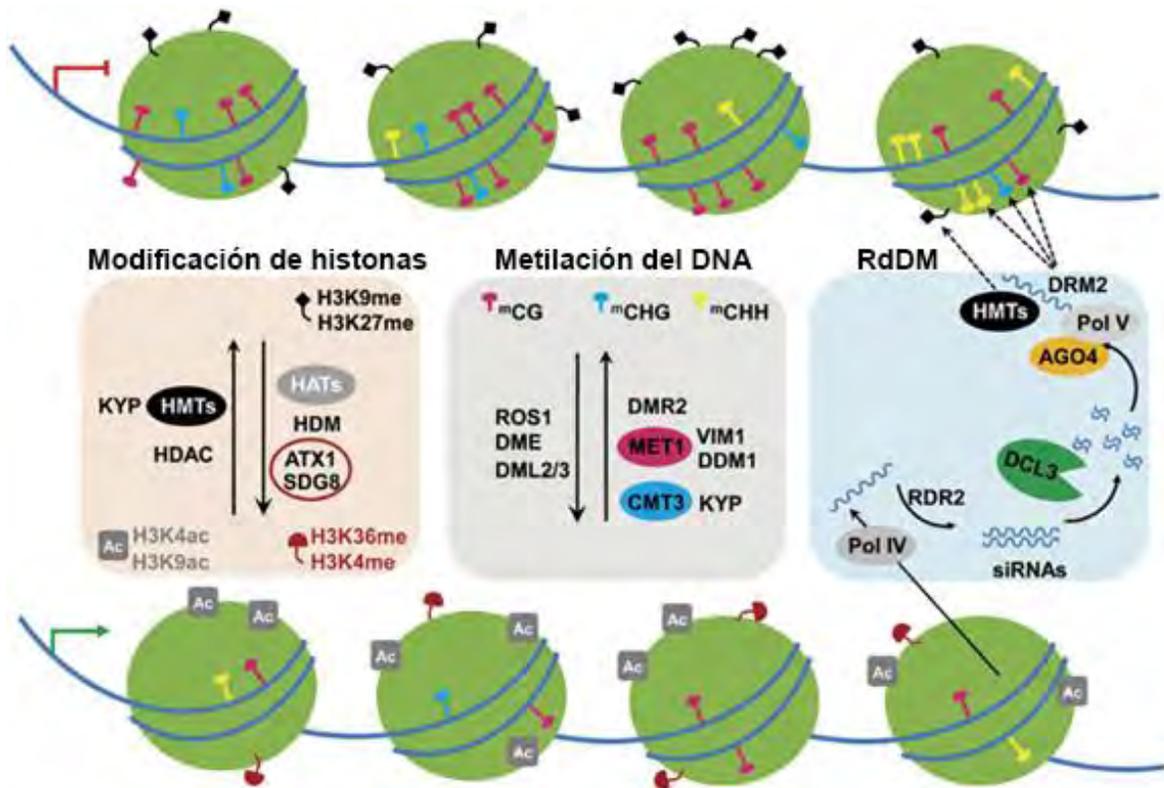


Figura 1. Ilustración esquemática de los cambios de la estructura de la cromatina mediante metilación del DNA, modificación de histonas y RNAs de interferencia. El silenciamiento de genes es asociado con la metilación del DNA mediante las DNA metiltransferasas de mantenimiento y *de novo*. La metilación en contexto CG (^mCG) es mantenida por MET1 y a la vez controlada por VIM1 y el remodelador de la cromatina DDM1. La metilación CHG (^mCHG) es generada por CMT3 y por HMT KYP, adicionalmente puede ser controlada por CMT3 y DRM2. La metilación CHH (^mCHH) es generada mediante la vía RdDM y la metilación del DNA *de novo* en todos estos contextos es generalmente establecida por DRM2. Adicionalmente, la heterocromatina es asociada con la metilación de histonas en H3K9 y H3K27 mediante HMTs. En contraste, la acetilación de histonas en H3K4 y H3K9 mediante HATs y la metilación en H3K4 y H3K36 por HMTs (ATX1 y SDG8), así como la desmetilación del DNA mediante las glicosilasas/liasas ROS1, DME, DML2 y DML3 pueden activar la transcripción génica. Los TEs se mantienen silenciados mediante la vía RdDM involucrando la formación de transcritos por Pol IV que son convertidos en dsRNAs mediante RDR2 y cortados por DCL3 en siRNAs de 24 nt de longitud. Los siRNAs antisentido son cargados en AGO4, quien en conjunto con el siRNA guía a otra RNA polimerasa, Pol V, hacia regiones homólogas de DNA donde las citosinas serán metiladas en todos los contextos mediante DRM2. AGO4, ARGONAUTE 4; ATX1, ARABIDOPSIS TRITHORAX-LIKE PROTEIN 1; CMT3, CHROMOMETHYLASE 3; DCL3, DICER-LIKE 3; DDM1, DECREASE IN DNA METHYLATION 1; DME, DEMETER; DML2/3, DEMETER-LIKE 2/3; DRM2, DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2; HAT, acetiltransferasa de histonas; HDAC, deacetilasa de histonas; HDM, demetilasa de histonas; HMT, metiltransferasa de histonas. KYP, KRYPTONITE; MET1, DNA METHYLTRANSFERASE 1; RDR2, RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2; ROS1, REPRESSOR OF SILENCING 1; SDG8, SET DOMAIN GROUP 8; VIM1, VARIANT IN METHYLATION 1 [Tomado de Miguel y Marum 2011].

Los cambios en la estructura de la cromatina son dinámicos e influyen en la transcripción de genes mediante la modificación del acceso de factores de transcripción, afectando finalmente el fenotipo de los organismos [Berger 2007; Riddle y Richards 2005; Zhang *et al* 2008]. Se ha postulado que la modificación de

la cromatina responde a diversos estímulos endógenos y exógenos incluyendo el estrés, infección por patógenos, temperatura, luz y hormonas [Chen y Tian 2007; Anzola *et al* 2010].

La metilación del DNA es uno de los mecanismos epigenéticos mejor descritos en la literatura, juega un rol en la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X, en la expresión de genes, así como el silenciamiento de transposones y otras secuencias repetidas de DNA [Miguel y Marum 2011]. Las plantas presentan un nivel importante en la metilación del DNA dentro de los organismos eucariontes, probablemente debido a la necesidad de un control más eficiente de TEs, o por la necesidad de una regulación epigenética adicional para controlar el desarrollo de distintos tipos celulares [Miguel y Marum 2011].

Los extremos N-terminales de las histonas pueden ser modificadas covalentemente mediante acetilación, metilación, fosforilación, sumoilación, carbonilación y glucosilación [Kouzarides 2007]. El conjunto de combinaciones que pueden presentar estas modificaciones (código de histonas) juega un rol esencial en la regulación de cambios dinámicos en la estructura de la cromatina, influyendo en la expresión génica [Berger 2007]. Por ejemplo, la hiperacetilación de residuos de lisina en histonas es generalmente asociada con la activación de la expresión génica, mientras que la hipoacetilación se relaciona con la represión de genes [Hebbes *et al* 1988; Zhang *et al* 2015]; la metilación de la lisina 4 de la histona H3 (H3K4) se encuentra asociada con regiones transcripcionalmente activas, mientras que la metilación de H3K9 se relaciona con la represión transcripcional [Shilatifard 2006; Li *et al* 2007] (Figura 1). La identificación de este tipo de modificaciones en diversas especies de plantas modelo, provee de información importante para entender como los epigenomas de las plantas responden al desarrollo o retos ambientales.

Otro tipo de elementos relacionados con la regulación epigenética son los RNAs pequeños, pues no solo actúan a nivel post-transcripcional mediante la degradación específica de un transcrito por medio de la complementariedad de secuencia y/o la

represión traduccional [Chen 2009], sino que también pueden tener un efecto en la metilación del DNA y la modificación de histonas como lo es en la vía de metilación de DNA dependiente de RNA (RdDM por sus siglas en inglés, ver figura 1) [Wassenegger 2005; Huettel *et al* 2007]. Estos eventos pueden llevar a modificaciones de la cromatina que eventualmente resultan en el silenciamiento transcripcional y la formación de heterocromatina [Bayne *et al* 2007]. El desentramar todas las interacciones entre la metilación del DNA, modificaciones de histonas y las vías de RNAs pequeños en el establecimiento de programas epigenéticos específicos durante el desarrollo y la respuesta ambiental es esencial para entender el comportamiento de las células de las plantas.

1.2. Transposones

Los transposones o elementos transponibles (TEs) son secuencias de DNA que pueden moverse de una región genómica a otra, escindiéndose o generando copias de ellos mismos [Feschotte *et al* 2002]. Fueron descubiertos hace más de medio siglo en el maíz por Barbara McClintock, quien los definió como agentes genéticos responsables de la alteración en la pigmentación de algunos sectores en granos de maíz mutante [Feschotte *et al* 2002]. El número total de copias de TEs presentes en el genoma de las plantas comprende un rango muy amplio, desde unos cuantos cientos de copias (e.g. *Arabidopsis thaliana* con cerca del 14% de su genoma), hasta cientos de miles de copias, como en el caso de *Zea mays* que comprenden alrededor del 84% de su genoma [Schnable *et al* 2009; Kejnovsky *et al* 2012].

Determinar la relevancia del número de secuencias repetidas presentes en el genoma de un organismo resulta una tarea complicada. Muchas veces, el mal llamado DNA “basura” (“junk” en inglés), ha impulsado la necesidad de definir términos que ayuden a la comprensión de este tipo de secuencias. La paradoja del valor C, es un término derivado para describir la falta de correlación entre la complejidad morfológica y el contenido total de DNA nuclear. Esta paradoja fue resuelta en parte gracias al descubrimiento de que los genomas de organismos eucariontes albergan poblaciones grandes y dinámicas de secuencias repetidas,

principalmente TEs [Kejnovsky *et al* 2012]. A su vez, la evolución no tendría lugar en ausencia de variación. En plantas, como en la mayoría de los eucariontes, los TEs son por mucho las partes más variables y dinámicas del genoma. La expansión y contracción en el número de TEs puede resultar en diferencias dramáticas sobre la arquitectura general de los genomas de las plantas [Bennetzen *et al* 2005]. En adición a estos efectos sobre la arquitectura de los genomas, la actividad de los TEs puede generar una amplia gama de cambios en la expresión génica y función celular, desde efectos sutiles hasta la reorganización de vías regulatorias y la evolución de genes enteros [Yao *et al* 2001].

Aunque muchos transposones son inactivados por mutaciones en su secuencia del DNA, las plantas enfrentan el reto de mantener las copias de TEs silenciados. Generalmente esto se logra mediante modificaciones epigenéticas, particularmente la metilación del DNA [Ichiyangi 2013]. Sin embargo, este suceso no es tan simple debido a que los cambios epigenéticos responden a cambios ambientales, durante la fase de desarrollo y meiosis [Ito 2013].

1.2.1. Clasificación de elementos transponibles (TE)

Los TEs de eucariontes se pueden clasificar de acuerdo al requerimiento de un intermediario de RNA para poder transponerse. Estos elementos que requieren el paso de reverso transcripción reciben el nombre de retrotransposones o elementos de tipo I. A su vez, estos pueden ser divididos en dos tipos, acorde a la presencia o ausencia de secuencias LTRs (long terminal repeats). Los retrotransposones contienen la información de por lo menos dos genes llamados *gag* y *pol*. El gen *gag* codifica para una proteína “capsid-like” y el gen *pol* codifica para una poliproteína que tiene actividad de proteasa, reverso transcriptasa, RNasa H y de integrasa (Figura 2) [Feschotte *et al* 2002].

En plantas, los elementos de tipo I son los más comunes y constituyen la mayor parte de muchos genomas. Los retrotransposones tienen un mecanismo de transposición replicativa, por lo que el número de copias incrementa después de cada transposición con el potencial de expandir los genomas [Slotkin y Martienssen

2007]. De manera general siguen un mecanismo de “copiado y pegado” en el cual el mRNA es transcrito a partir de la secuencia del retrotransposon por la RNA polimerasa II (RNA Pol II) para después ser convertido en cDNA mediante reverso transcripción y posteriormente ser insertado por una integrasa en una nueva posición en el genoma [Lisch 2013].

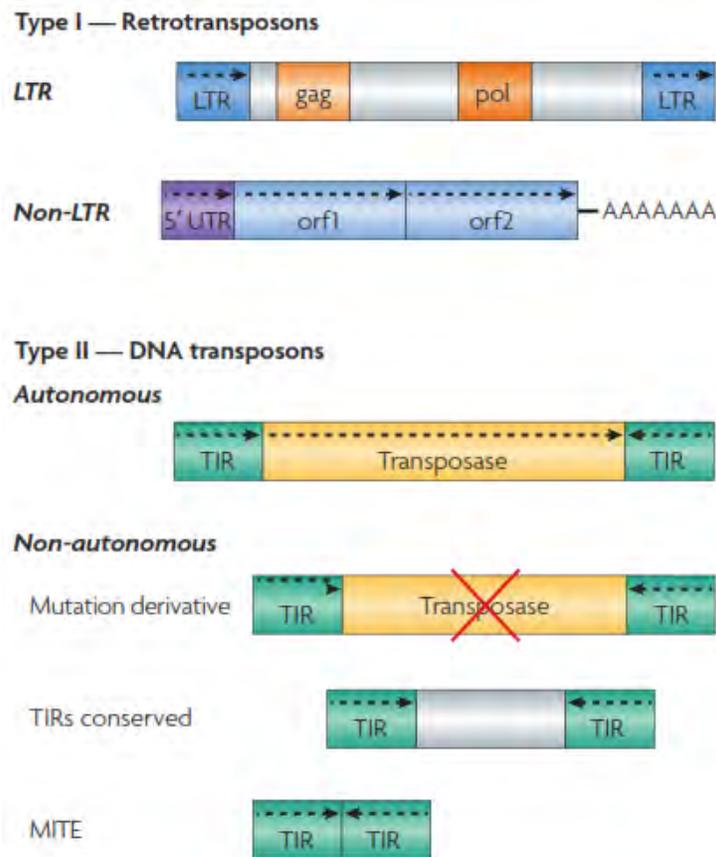


Figura 2. Tipos y estructuras generales de elementos transponibles de acuerdo a sus requerimientos de transposición. Los TEs pueden ser clasificados en elementos tipo I y II, los primeros (Retrotransposones) utilizan un intermediario de RNA para realizar su transposición; mientras que los segundos (Transposones de DNA) se transponen mediante un mecanismo de corte y pegado. Los retrotransposones LTR como su nombre lo dice se encuentran flanqueados por secuencias repetidas terminales largas (LTRs por sus siglas en inglés) además dentro de su marco de lectura se encuentran secuencias codificantes para proteínas gag y pol. La primera es una proteína capsid-like mientras que pol es una poliproteína con actividad de proteasa, reverso transcriptasa, RNasa H y de integrasa. Los transposones de DNA por su parte se encuentran flanqueados por secuencias repetidas terminales invertidas (TIRs por sus siglas en inglés). Los elementos transponibles de repetidos invertidos en miniatura (MITEs por sus siglas en inglés) son elementos de clase II no autónomos que solo contienen las secuencias mínimas necesarias para la transposición en presencia de elementos autónomos. Tomado de Slotkin y Martienssen 2007.

Los TEs tipo II, son conocidos como transposones de DNA y no requieren de un intermediario de RNA para moverse en el genoma. Estos elementos se transponen mediante un mecanismo de “corte y pegado”, pues codifican para una proteína denominada transposasa que reconoce secuencias TIRs (terminal inverted repeats) que flanquean al TE, escindiendo al TE fuera de la posición “donadora” para su posterior integración en un nuevo sitio aceptor [Lisch 2013]. El espacio vacío que es dejado en la posición donadora puede ser reparado sin tener que reemplazar el elemento perdido durante un mecanismo de transposición de corte y pegado (Figura 2) [Slotkin y Martienssen 2007].

Los TEs también se pueden clasificar mediante su “autosuficiencia”. Tanto las familias de retrotransposones como de transposones de DNA tienen elementos autónomos y no autónomos. Los elementos autónomos codifican todas las proteínas necesarias para la transposición, mientras que los elementos no autónomos requieren de la presencia de las enzimas codificadas por elementos autónomos activos para que se pueda dar su transposición [Lisch 2013]. Frecuentemente los elementos no autónomos surgen como producto de la mutación de los miembros de las familias de elementos autónomos, pero algunas veces tienen poca similitud de secuencia con su contraparte autónoma (Figura 2) [Slotkin y Martienssen 2007]. Los elementos no autónomos más comunes en el genoma de las plantas son los elementos transponibles de repetidos invertidos en miniatura (MITEs por sus siglas en inglés) [Lisch 2013].

La mayoría de los TEs no están activos para la transposición, que es frecuentemente debido a mutaciones y deleciones que eliminan la capacidad de transposición. Por otra parte, algunos transposones autónomos permanecen intactos pero silenciados en el genoma. Para combatir el efecto latente y potencialmente dañino de los transposones activos, el genoma ha evolucionado mecanismos de “defensa” epigenética para suprimir su actividad [Slotkin y Martienssen 2007].

Actualmente se tiene una mayor comprensión de muchas de las vías en las que los TEs influyen en la función y evolución de genes y genomas, y consecuentemente, en los organismos que los contienen. En particular, la genómica ha revelado que a pesar de que una pequeña fracción de TEs se encuentran transcripcionalmente activos, la mayoría de los genomas eucarióticos, y en especial el genoma de plantas, se encuentran llenas de una gran cantidad de familias de TEs aparentemente inactivadas [Feschotte *et al* 2002].

1.2.2. Relevancia de los TEs

La presencia de TEs puede alterar la expresión de genes adyacentes a los sitios de inserción, generar una pérdida de función al insertarse en los exones de dichos genes y adquirir secuencias de genes del huésped e insertarse en nuevas regiones genómicas. Dado su elevado número de copias, los TEs contribuyen a rearrreglos cromosomales mediante recombinación (cambios genéticos); así como también, alterando los patrones de metilación mediante la producción de RNAs de interferencia a partir de regiones activas (cambios epigenéticos) [Feschotte *et al* 2002; Bennetzen 2005; Morgante *et al* 2007; Weil y Martienssen 2008; Slotkin *et al* 2012].

En las plantas, los TEs juegan un papel importante durante el desarrollo. Por ejemplo, las células de la línea germinal surgen tardíamente en el desarrollo a partir de células troncales somáticas (a diferencia de los animales en donde la línea germinal se especifica tempranamente en el desarrollo), etapa en donde los transposones normalmente estarían silenciados. En general, las marcas de silenciamiento que se encuentran presentes durante el desarrollo deben ser posteriormente borradas en la cromatina de la línea germinal lo que es requisito para la totipotencialidad del embrión y para que la descendencia no esté influenciada por la historia de vida de los progenitores. Sin embargo, hay elementos genéticos cuyo estado epigenético muestra herencia transgeneracional [Schmitz *et al* 2011; Heard y Martienssen 2014].

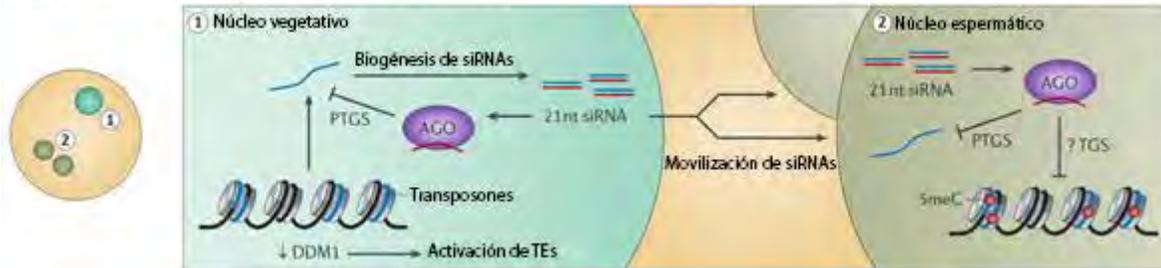
Muchos de los TEs se encuentran localizados en regiones pericentroméricas y en “knobs” heterocromáticos en el genoma de maíz [Baucom *et al* 2009; Ananiev *et al* 1998], aunque también existen muchas inserciones de TEs dispersas entre los genes de maíz [Swigonova *et al* 2005; Fu y Dooner 2002]. La variación alélica debida a la presencia de inserciones de TEs en regiones cercanas a genes es sumamente alta [Fu y Dooner 2002; Wang y Dooner 2006] lo cual crea un gran potencial de generar diferencias alélicas. En maíz los retrotransposones tipo LTR predominan sobre el resto de los TEs [Kejnovsky *et al* 2012] conformando más del 75% del genoma de maíz [Schnable *et al* 2009; Ma 2013], esto convierte a los retrotransposones tipo LTR en elementos de interés.

En células somáticas, tanto la vía de RdDM como las metiltransferasas de DNA mantienen a los transposones silenciados; sin embargo, en las células germinales el patrón de silenciamiento cambia acorde a su función para la siguiente generación. Durante la reproducción de plantas, en el gametofito masculino se generan tres núcleos por mitosis posterior a la meiosis (figura 3a). Hay dos núcleos espermáticos y un núcleo vegetativo. El remodelador de la heterocromatina DDM1 que es un regulador maestro de transposones es regulado a la baja en el núcleo vegetativo de apoyo, llevando a la transcripción de transposones y la producción de RNAs pequeños de 21 nt que son antisentido para estos transposones (figura 3a). Estos siRNAs son capaces de difundir sistémicamente e inducir silenciamiento génico en células aledañas [Castel y Martienssen 2013]. Recientemente se ha encontrado que estos siRNAs de 21 nt llegan a los núcleos espermáticos y ahí son capaces de silenciar la expresión regiones homólogas de transposones [Martínez *et al* 2016]. Cabe mencionar que solo los núcleos espermáticos son utilizados en la fertilización del ovocito, por lo que es muy interesante el papel que desempeña el núcleo vegetativo en el proceso de reproducción.

Con respecto a la metilación del DNA, la línea germinal masculina de *A. thaliana* retiene una metilación asimétrica a niveles similares a los de células somáticas, pero especialmente muestra una reducción en los niveles de metilación asimétrica en un

subgrupo de retrotransposones que posteriormente son remetilados durante el desarrollo del embrión [Castel y Martienssen 2013].

A.- Silenciamiento de TEs en el gametofito masculino de *A. thaliana*



B.- Silenciamiento de TEs en el gametofito femenino de *A. thaliana*

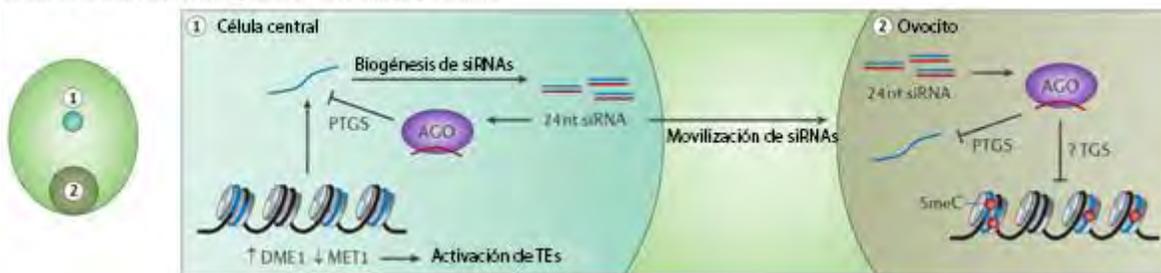


Figura 3. Silenciamiento de transposones mediante RNA interferente en la línea germinal de plantas. A.- En el núcleo vegetativo del gametofito masculino de *A. thaliana*, la expresión de DDM1 es reprimida, lo cual permite que los TEs sean expresados. Los transcritos de los TEs estimulan la biogénesis de siRNAs de 21 nt los cuales se pueden movilizar y dirigir el silenciamiento génico postraducciona (PTGS) en los núcleos espermáticos. Los siRNAs también pueden tener un efecto sobre TEs dirigiendo o inhibiendo modificaciones epigenéticas. B.- En la célula central del gametofito femenino de *A. thaliana*, MET1 se encuentra regulada a la baja, mientras que DEMETER se encuentra expresada, causando la pérdida de metilación de citosinas y dejando expuestos a los TEs para su transcripción. Esto activa la vía RdDM y produce siRNAs de 24 nt que pueden ser transportados al ovocito para llevar a cabo el silenciamiento mediante AGO9. Tomado de Castel y Martienssen 2013.

En el gametofito femenino, la metilación de mantenimiento por la metiltransferasa de DNA MET1 (también conocida como DMT1) se encuentra reprimida, mientras que la DNA glicosilasa DEMETER, que remueve la metilación de las citosinas, esta expresada en la célula central diploide (la cual posteriormente se convertirá en el endospermo “extra embrionario”) (figura 3b). Esto conlleva a la desmetilación global de citosinas en el endospermo acompañado del incremento de la producción de siRNAs de 24 nt, llevando a la hipermetilación no-CG en determinados sitios blanco, los cuales son principalmente retroelementos. Estos siRNAs de 24 nt se encuentran

cargados en argonauta 9 (AGO9) formando un complejo de silenciamiento inducido por RNA (RISC por sus siglas en inglés) en la célula central y actúan de manera autónoma para controlar la especificación funcional de la megaspora [Castel y Martienssen 2013].

Los RNAs pequeños y TEs también se encuentran asociados a cambios epigenéticos en cultivos de células inmortalizadas. En *Arabidopsis thaliana*, siRNAs que son generados a partir de TEs que han perdido marcas de heterocromatina (*Athila*, *AtCopia*, *AtMu* y elementos *Helitron*) muestran una preferencia por la longitud de 21 nt en suspensiones celulares en comparación a hoja y callos embriogénicos donde se ven favorecidos los siRNAs de 24 nt. En contraste, los siRNAs generados a partir de TEs que no pierden marcas de heterocromatina y permanecen silenciados (*Atlantys*, *AtGP* y *AtENSPM*), retienen la distribución del tamaño de siRNAs de 24 nt en suspensiones celulares, callos y en hoja [Tanurdzic *et al* 2008]. En estudios recientes se ha confirmado que el estado de activación de los transposones es relevante para determinar la vía de RdDM y tamaños de los siRNAs que estarán actuando para promover la metilación de DNA en sus secuencias [Sigman y Slotkin 2016].

Algunas clases de TEs han mostrado ser transcripcionalmente activos en respuesta a un ambiente de estrés. Entre los retrotransposones de la clase Copia, Tnt1 es activo en tabaco bajo condiciones de estrés biótico y abiótico [Grandbastien *et al* 2005; Beguiristain *et al* 2001]; ONSN tiene una respuesta al estrés por calor en *Arabidopsis thaliana* [Ito *et al* 2011; Cavrak *et al* 2014]; mientras que en arroz Tos17 se encuentra transcripcionalmente activo en cultivos celulares debido al estrés hormonal [Hirochika 1997].

En conjunto, la localización de TEs junto con la elevada abundancia de retrotransposones LTR en el genoma de maíz, pueden llegar a generar cambios genéticos y epigenéticos durante las etapas de embriogénesis y desarrollo. Modificando los patrones de silenciamiento tanto en células somáticas como células

germinales, y a su vez posteriormente sufrir cambios en la expresión de TEs en cultivos celulares.

1.2.3. Mecanismo de silenciamiento de TEs

La metilación de DNA *de novo* es el mecanismo epigenético predominante para la represión de secuencias repetidas y TEs. Este mecanismo involucra la acción de la metiltransferasa DRM2 a través de la vía RdDM y la producción de RNAs pequeños de interferencia (siRNAs) de 24 nucleótidos [Chan *et al* 2006]. En *Arabidopsis*, esta vía de RdDM está involucrada en varios procesos biológicos, como lo son la respuesta a estrés biótico/abiótico y el desarrollo de la planta, en adición al mantenimiento del estado inerte de transposones y secuencias repetidas en células somáticas [Saze *et al* 2012]. Los patrones de metilación del DNA son sensibles a efectos de estrés, sus cambios pueden contribuir al establecimiento de marcas epigenéticas que informen a la descendencia de la posibilidad de ambientes desfavorables y de esta manera heredar una adaptación al estrés a generaciones futuras. [Bilichak y Kovalchuk 2016]. Sin embargo, los efectos transgeneracionales no persisten necesariamente a lo largo de todas las generaciones subsecuentes [Boyko *et al* 2010].

Se ha propuesto que en los gametofitos masculino y femenino de *Arabidopsis thaliana*, el movimiento de sRNA sigue a una reprogramación en el epigenoma como resultado de la reactivación transcripcional de TEs en células aledañas de la línea germinal, [Slotkin *et al* 2009; Olmedo-Monfil *et al* 2010]. Estos mecanismos dirigidos por sRNA pueden servir de protección transgeneracional contra la actividad de los TEs durante la meiosis y la reprogramación epigenómica en la línea germinal [Slotkin *et al* 2009; Olmedo-Monfil *et al* 2010], o en la semilla después de la fertilización [Mosher *et al* 2009].

La vía de RdDM canónica para el silenciamiento de TEs involucra la biogénesis de siRNAs de 24 nt denominados ra-siRNAs (repeat-associated small interfering RNAs). Esta vía es la mejor descrita y frecuentemente es denominada Pol IV-RdDM, debido a que requiere del reclutamiento de la RNA polimerasa IV (Pol IV) en sitios

de inicio de la transcripción (TSS) de secuencias repetidas y TEs con cierto grado de metilación mediante la interacción con SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOGUE 1 (SHH1), el cual se une a los residuos de H3K9me2 y H3K4 desmetilada mediante un dominio Tudor-like en tándem [Law *et al* 2013]. Una vez que Pol IV es reclutada, transcribe RNAs de cadena sencilla (ssRNA) de aproximadamente 42 nt en sus *loci* blanco [Law y Jacobsen 2010; Zhai *et al* 2015]. Pol IV interactúa físicamente con la RDR2 para catalizar la síntesis de la cadena complementaria de ssRNA dando como resultado un RNA de cadena doble (dsRNA) [Haag *et al* 2012; Law *et al* 2011]. De alguna manera el remodelador de la cromatina CLASSY 1 (CLSY1) interviene en algún punto de estos pasos para facilitar el paso de Pol IV a lo largo del locus [Law *et al* 2011; Smith *et al* 2007]. DCL3 procesa dsRNAs para generar siRNAs en forma de dúplex de 24 nt que son metilados en los grupos 3'-OH por HUA ENHANCER 1 (HEN1) para conferirle estabilidad [Ji y Chen 2012]. Este siRNA de 24 nt se exporta al citoplasma en donde solo una de las cadenas del dúplex es cargada en una proteína AGO4 que una vez que es cargado regresa al núcleo (Figura 4) [Law y Jacobsen 2010; Wierzbicki *et al* 2012; Kim y Zilberman 2014; Matzke y Mosher 2014].

El reclutamiento de Pol V a sus secuencias blanco, es auxiliado por SUVH2, SUVH9 y SUVR2, las cuales son metiltransferasas de histonas pertenecientes a la familia SU(VAR)3-9. SUVH2 y SUVH9 son incapaces de catalizar la metilación de histonas, pero pueden unirse a DNA metilado a través de su dominio SRA (“SET and RING-associated”) y así proveer de la plataforma de interacción con Pol V [Johnson *et al* 2014]. La transcripción de Pol V y su asociación con la cromatina es facilitada por el complejo DDR [Zhong *et al* 2012]. Este complejo comprende el remodelador de la cromatina DEFECTIVE IN RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (DRD1) [Eun 2012]; DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3 (DMS3); y RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1 (RDM1) [Gao *et al* 2010].

Pol V recluta AGO4 mediante la región “AGO hook” en el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor NUCLEAR RNA POLYMERASE E1 (NRPE1), que interactúa con KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1 (KTF1;

también conocido como SPT5L) [Huang *et al* 2009]. Durante la transcripción realizada por Pol V, el complejo AGO4-siRNA se une al transcrito naciente de Pol V mediante apareamiento de bases y recluta a DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2 (DRM2) que cataliza la metilación *de novo* de citosinas en un contexto CHH [Axtell 2013; Castel y Martienssen 2013].

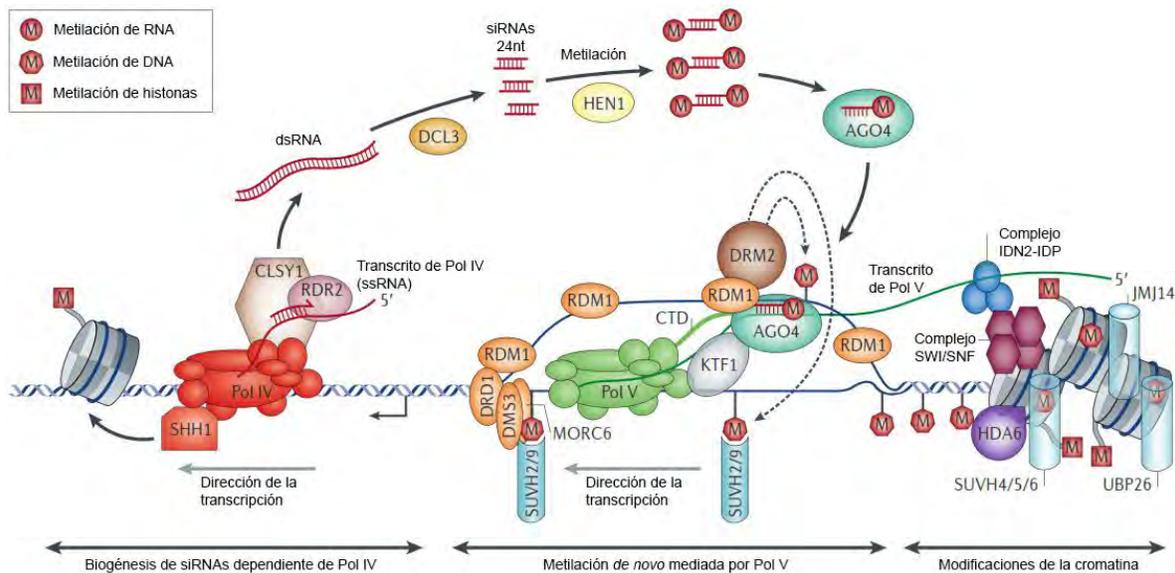


Figura 4. Vía de metilación del DNA dependiente de RNA en *Arabidopsis thaliana*. Probablemente Pol IV es reclutado por SHH1, Pol IV trabaja en conjunto con RDR2 auxiliado por CLSY1 generando dsRNA que es procesado por DCL3 para generar siRNAs de 24 nt, de estos dúplex son metilados por HEN1 y se carga una de las cadenas en AGO4 para asociarse con el transcrito de Pol V, reclutando DRM2 y otras proteínas asociadas metilando el DNA. El complejo IDN2-IDP estabiliza la unión entre siRNAs y los transcritos de Pol V y facilitan la vía RdDM por su interacción con el complejo SWI/SNF. Pol, RNA polimerasa; SHH1, SAWADEE HOMEODOMAIN HOMOLOG 1; ssRNA, RNA de cadena sencilla; CLSY1, remodelador de la cromatina CLASSY 1; RDR2, RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2; dsRNA, transcritos de cadena doble; DCL3, nucleasa DICER-LIKE 3; AGO4, proteína ARGONAUTE 4; HEN1, HUA ENHANCER 1; DRM2, proteína DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2; KTF1, KOW DOMAIN-CONTAINING TRANSCRIPTION FACTOR 1; RDM1, ; DRD1, RNA-DIRECTED DNA METHYLATION 1; DMS3, DEFECTIVE IN MERISTEM SILENCING 3; SUVH2/9, ; metiltransferasas de histonas pertenecientes a la familia SU(VAR)3-9. Tomado de Matzke y Mosher 2014.

INVOLVED IN DE NOVO 2 (IDN2) es una proteína de unión a dsRNA que se relaciona con SUPRESOR OF GENE SILENCING (SGS3) y está involucrado en el silenciamiento génico postraduccional (PTGS) [Ausin *et al* 2012]. IDN2 forma un

complejo con dos parálogos parcialmente redundantes, IDP1 e IDP2 [Zhang *et al* 2012]. El complejo IDN2-IDP puede estabilizar el apareamiento de bases entre siRNAs y los RNAs generados por Pol V [Ausin *et al* 2012; Finke *et al* 2012], y facilitan la vía RdDM mediante la alteración del posicionamiento del nucleosoma a través de interacciones con el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF [Zhu *et al* 2013] (Figura 4).

Recientemente se ha encontrado que hay vías adicionales de RdDM para silenciar TEs en *Arabidopsis* independientes de la vía Pol IV-RdDM. Estas vías no dependen de Pol IV sino de la acción de la RNA polimerasa dependiente de RNA 6 (RDR6) y la proteína Dicer-Like 3 (DCL3), por lo que han sido llamadas RDR6-RdDM y DCL3-RdDM respectivamente [Panda *et al* 2016]. La relevancia de estas vías parece depender del estado transcripcional de los TEs a través de la RNA Pol II y contribuyen a la metilación en contexto CHH, la cual es la principal forma de metilación de los TEs en plantas.

1.3. Embriogénesis somática de maíz

Una variante de la embriogénesis que ocurre de manera natural en las plantas es la embriogénesis somática. Este proceso alterno en el desarrollo consiste en que las células somáticas cambien su programa y se destinan a una vía embriogénica que culmina en la formación de embriones somáticos. La embriogénesis somática se lleva a cabo con éxito mediante una selección apropiada del explante, hormonas vegetales, nutrientes y el control abiótico del ambiente del cultivo. En muchas especies el explante de elección para la inducción de callos embriogénicos es el embrión cigótico inmaduro, que de acuerdo a Neumann se encuentra en lo alto del gradiente jerárquico de los tejidos que responden a embriogénesis (embrión>hipocótilo>peciolo>lámina foliar>raíz) [Elhiti y Stasolla 2011].

La inducción de embriones somáticos a partir de células de plantas diferenciadas es un fenómeno ampliamente estudiado y al mismo tiempo, probablemente es el menos comprendido. Pues no se sabe con exactitud cómo ni por qué las células de plantas diferenciadas adquieren de nuevo la capacidad de totipotencialidad, y por

qué este fenómeno se encuentra restringido a cierto tipo de genotipos, explantes o células [Fehér 2015].

Las técnicas de cultivo de tejidos son de gran interés para la recolección, multiplicación y almacenamiento del germoplasma de las plantas [Engelman 2011]. Desde los años 70s se utilizan como una herramienta para la “micropropagación” de plantas, así como modelo de estudio para comprender aspectos básicos del desarrollo de los embriones de plantas [Elhiti y Stasolla 2011].

El desarrollo embrionario *in vitro* generalmente se divide en una fase de inducción, en la cual las células somáticas deben ser reprogramadas para dirigirse hacia un nuevo destino, seguido de una fase de desarrollo caracterizado por el crecimiento del embrión. Existe mucha información disponible en la literatura concerniente a esta fase tardía, como estudios estructurales, fisiológicos y moleculares de las diferentes fases del desarrollo embrionario para ciertas especies de plantas. Sin embargo, la fase inductiva no ha sido investigada a detalle debido a las dificultades en la identificación de células dentro del explante durante la transición de células somáticas a embriogénicas [Elhiti y Stasolla 2011].

La producción de callos embriogénicos de maíz comienza con la disección de embriones inmaduros a partir de mazorcas obtenidas 15 días después de la polinización. Los embriones son colocados con el eje embrionario en contacto con medio que contiene cinetina y ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en ausencia de luz, lo cual induce la formación de masas proembriogénicas y posteriormente callos embriogénicos (figura 5).

Los callos embriogénicos se subcultivan cada tres semanas en medio fresco y los tejidos que presentan oxidación son removidos. Una vez que se ha establecido la proliferación del callo embriogénico (4-6 subcultivos), en el momento que sea requerido las plantas pueden ser regeneradas mediante el trasplante de los callos en medio fresco eliminando gradualmente la cantidad de hormonas y colocándolas en presencia de luz para el eventual desarrollo de la planta (figura 5) [Jiménez-Villalobos 2006].

Hace un poco más de dos décadas que se reconoció que el estrés celular es importante en el cambio del destino celular, terminando en la formación de embriones somáticos a partir de células diferenciadas y la embriogénesis somática fue propuesta como una respuesta al estrés del desarrollo [Dudits *et al* 1991]. Hoy en día este punto de vista es ampliamente aceptado a pesar de que los mecanismos por los que se llevan a cabo siguen sin ser conocidos [Fehér 2015].

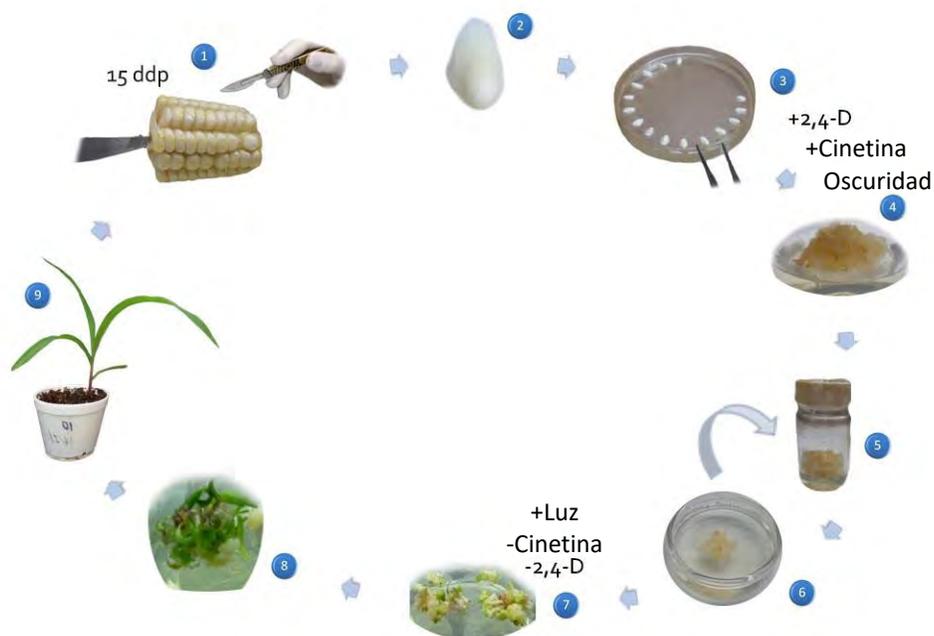


Figura 5. Ciclo de cultivo y regeneración in vitro en *Zea mays*. (1) Obtención del explante (embrión inmaduro) 15 días después de la polinización. (2) Embrión inmaduro de maíz sin endospermo. (3) Sembrado de embriones inmaduros en medio de inducción adicionado con 2,4-D. (4) Generación de masas pro-embriogénicas.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

De acuerdo al modelo aceptado, las condiciones de inducción resultan en la desdiferenciación de células somáticas de plantas seguida de la readquisición de la totipotencialidad. En este estado totipotente, las células son capaces de percibir señales de desarrollo apropiadas que dan lugar a la embriogénesis, que a partir de ese momento procede autónomamente bajo condiciones permisivas *in planta* o *in*

in vitro. No obstante, existe evidencia indicando que este punto de vista es demasiado generalizado y deben existir distintas vías que den lugar a la embriogénesis somática [Fehér 2015].

1.3.1. Variación somaclonal

El fenómeno de la variación somaclonal ha sido reconocido en el cultivo de tejidos de plantas por décadas y en sus inicios se consideraba como una técnica [Skirvin 1978; Gautheret 1983]. La variación somaclonal puede ser definida como la variación resultante entre plantas regeneradas a partir de un cultivo *in vitro*, fenómeno que es muy común en el cultivo de tejidos de plantas. La variación somaclonal también puede ser definida como los cambios generados durante las divisiones mitóticas de células somáticas en el cultivo de tejidos de plantas, derivando en la variación de distintas clonas individuales (Figura 6) [Rodríguez-Enriquez *et al* 2011].

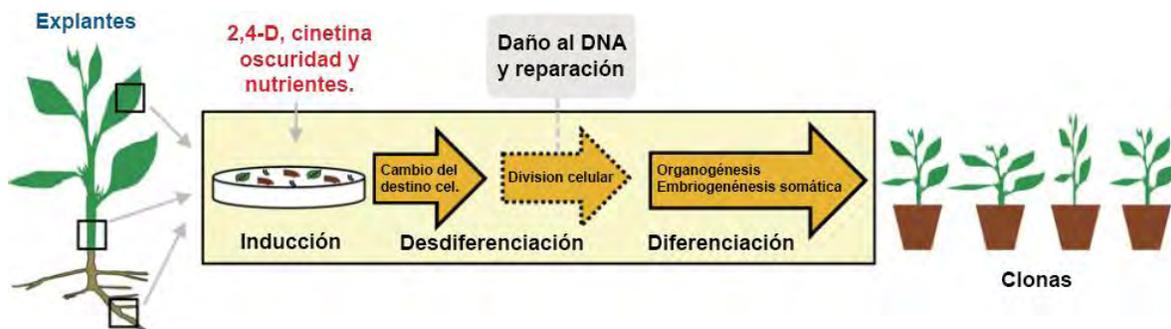


Figura 6. Representación esquemática del proceso de variación somaclonal. La inducción del cultivo de tejidos parte de células somáticas de explantes adecuados que son sometidos a condiciones de crecimiento con 2,4-D, cinetina, oscuridad y nutrientes específicos. Estas condiciones cambian el destino celular induciendo la desdiferenciación, una vez establecido el cultivo celular existe la posibilidad de daño al DNA durante las divisiones celulares repercutiendo en la diferenciación celular durante la regeneración de plantas, ya sea por organogénesis o embriogénesis somática. Dando como resultado final la generación de distintas clonas de la planta original de la cual se tomaron los explantes de partida. Adaptado de Miguel y Marum 2011.

La variación somaclonal puede ser generada por cambios en el número de cromosomas, daño a los cromosomas o por cambios en la metilación del DNA y estado de la cromatina. El daño de los cromosomas puede ocurrir mediante

recombinación, replicación tardía en regiones heterocromáticas, transposición de TEs, mutaciones puntuales o reordenamientos en los cromosomas [Biswas *et al* 2009]. Se ha demostrado que la activación de retrotransposones en el cultivo de tejidos de *Oryza sativa* induce variación somaclonal [Hirochika *et al* 1996].

La variación somaclonal puede manifestarse como dos tipos de eventos: somáticos o meióticos. La variación somática estable induce fenotipos como la adaptación de cultivos y la variación fisiológica observada entre las plantas regeneradas. Este tipo de variación frecuentemente no se transfiere a las generaciones subsecuentes por lo que el principal uso para las plantas regeneradas es la rápida propagación de árboles o plantas de ornato. La variación meiótica heredable es de importancia en situaciones donde el producto final del cultivo de tejidos es propagado y vendido como semilla. Los mecanismos que producen las variaciones somáticas y meióticas contribuyen a la disminución del vigor y la capacidad de regeneración de los cultivos con el paso del tiempo [Kaepler *et al* 2000].

Estudios previos sugieren que las concentraciones de auxinas en el medio de cultivo y el número de veces que se subcultiva son factores importantes en la inducción de variación somaclonal en el sistema *in vitro*. La variación somaclonal tiene impactos negativos y positivos en el desarrollo de la planta. Esto resulta en la producción de variabilidad genética la cual lleva a la expresión de características como resistencia a enfermedades, herbicidas y tolerancia a estrés biótico o abiótico [Mohan 2001]. Por otro lado, también existen análisis genéticos de variantes somaclonales en maíz, arroz y tabaco en las que se han identificado inserciones de transposones [Biswas *et al* 2009].

Se ha observado en cultivos celulares (callos) de *Oryza sativa* que la activación de retrotransposones de la clase Copia induce variación somaclonal [Hirochika *et al* 1996]. Posiblemente la respuesta de los TEs al estrés hormonal puede ocurrir mediante uno o dos mecanismos. En el primero, el estrés puede activar directamente a los TEs y su actividad mutagénica. Y el segundo, el estrés puede

inhibir los mecanismos de silenciamiento génico en el genoma, resultando indirectamente en la reactivación de TEs [Slotkin y Martienssen 2007].

Los cambios epigenéticos en la variación somaclonal pueden involucrar mecanismos del silenciamiento o activación génica que no son debidos a alteraciones cromosomales o a un cambio en la secuencia del DNA [Kaepler *et al* 2000]. Existen trabajos que han implicado la participación de reguladores epigenéticos como la metilación del DNA en determinar la susceptibilidad a la variación somaclonal *in vitro*. En *Sorghum bicolor*, la reducción y mala coordinación de la expresión de metiltransferasas de DNA y 5-metilcitosin glucosilasas en líneas endogámicas durante y después del cultivo de tejidos parece ser el factor principal en la generación de inestabilidad genética y epigenética del genoma [Zhang *et al* 2009].

2. ANTECEDENTES

En 1977 Green describió que existen cambios en la morfología y cariotipo de plantas de maíz regeneradas a partir de callos embriogénicos; adicionalmente, examinó plantas de maíz regeneradas a partir de callos que permanecieron por 3 años en subcultivo, las cuales presentaron la pérdida de un tercio de la parte distal del brazo largo del cromosoma 6. [Larkin y Scowcroft 1981].

Las condiciones de cultivo *in vitro* representan una combinación inusual de factores de estrés a los cuales las células de plantas se enfrentan. Entre las que se encuentran el estrés oxidante como resultado del daño mecánico generado durante la escisión del tejido de explante, la presencia de reguladores de crecimiento en plantas (PGRs por sus siglas en inglés), las bajas o altas concentraciones de sal en solución y las bajas o altas intensidades de luz. La suma total de estos factores de estrés durante la inducción *in vitro* de la embriogénesis somática puede resultar en cambios en la organización de la cromatina. Se cree que una reorganización de la cromatina prolongada causa la “liberación accidental” de programa embriogénico, que posteriormente podría ser reprimido por un mecanismo de silenciamiento génico mediado por el complejo remodelador de la cromatina SWI/SNF [Li *et al* 2002; Fehér 2005].

La desmetilación del DNA puede ocurrir con una alta frecuencia y ser una causa importante de la variación inducida por el cultivo de tejidos. Kaeppler y Phillips analizaron los cambios, herencia y frecuencia de la metilación del DNA en plantas de maíz regeneradas a partir de callos embriogénicos de siete meses de subcultivo; en donde se da la pérdida de la metilación en un contexto CCGG en clonas genómicas y que este patrón de desmetilación puede ser transmitido por lo menos a la progenie de F1 [Kaeppler y Phillips 1993].

Así mismo en *Arabidopsis thaliana*, las mutantes de *ddm1* (DECREASE IN DNA METHYLATION) presentan una disminución de la metilación de DNA asociada a la activación de retrotransposones de la clase Gypsy (*ATGP3*) y elementos de la clase Copia (*ATCOPIA13*, *ATCOPIA21* y *ATCOPIA93*). La activación de *ATGP3* se

atribuye a la pérdida de la metilación del DNA en contextos CG y CHG, pues *ATGP3* pierde el silenciamiento transcripcional en dobles mutantes de *MET1* y *CMT3*, pero no así en las mutantes individuales de cada una de estas metiltransferasas [Tsukahara *et al* 2009].

Un efecto similar se observa en el núcleo vegetativo del polen de *Arabidopsis thaliana*, pues la disminución de la expresión de DDM1 lleva a la pérdida de la metilación del DNA y la reactivación transcripcional de algunos TEs, entre ellos los retrotransposones *AtGP1*, *Atlantys2*, *AtCopia48*, *Athyla2* [Slotkin *et al* 2009]. Para la mayoría de los TEs cuando son reactivados epigenéticamente en polen y en mutantes de *ddm1*, existe una disminución de siRNAs de 24 nt y un concomitante aumento de siRNAs de 21 nt. Sin embargo, para la familia *AtGP1* perteneciente a la clase de retrotransposones tipo Gypsy, los niveles de siRNAs de 24 nt se mantienen tanto en polen como en la mutante *ddm1* a pesar de la reactivación de *AtGP1*; en contraste, *Athyla2* al encontrarse activo muestra un incremento de siRNAs de 21 nt y una disminución de siRNAs de 24 nt [Slotkin *et al* 2009].

Pero la activación de retrotransposones en maíz pareciera ser un proceso aún más complejo, en el meristemo del brote (SAM por sus siglas en inglés), las mutantes de *mop1* (ortólogo de RDR2 en maíz), se muestra una desregulación diferencial dentro de una misma clase de retrotransposones. Dentro de la clase Copia, las familias Ji y Opie se encuentran regulados a la alta, mientras que las familias Giepum y Wiwa se encuentran regulados a la baja. Por lo que respecta a la clase Gypsy, las familias Flip y Huck se encuentran reguladas a la alta, en contraste Ciful-zeon y Prem1 se encuentran regulados a la baja [Jia *et al* 2009].

Además, esta variación en la expresión de retrotransposones varía también con el tipo de tejido en el cual se encuentra presente. Un análisis de bases de datos de ESTs (Expressed sequence tags) de transposones en donde se estima la tasa de transcripción relativa de distintas clases de TEs en diferentes tejidos de maíz, muestra que en general predominan los TE-ESTs correspondientes a los retrotransposones LTR gypsy-like (Gypsy), seguidos de los retrotransposones LTR

copia-like (Copia) y CACTA. Sin embargo, el número de copias y el nivel de transcripción de cada clase de TEs no muestran ninguna relación. Mientras que el nivel de expresión particular de cada una de las familias de TEs en distintos tejidos y condiciones, varía entre y dentro de cada una de las clases, en donde en muchas de las familias de TEs se muestran niveles bajos de expresión en comparación a otras como Giepum, Flip, Prem1 y Shadowspawn que se expresaban especialmente en cultivos celulares [Vicient 2010].

Estudios más recientes en maíz han mostrado que bajo condiciones de estrés abiótico (salino, calor, frío, radiación UV) existe un aumento de la expresión de TEs específicos. Además, la expresión de una clase o familia en particular de TE depende del tipo de estrés bajo el cual se encuentre la planta, de manera general, las clases de TEs activadas en respuesta a estrés incluyen las principales clases de TEs: transposones de DNA, retrotransposones tipo LTR de la clase Gypsy, retrotransposones tipo LTR de la clase Copia, otros retrotransposones desconocidos y elementos LINE [Makarevitch *et al* 2015].

Los cambios en metilación del DNA y remodelamiento de la cromatina en cultivos celulares son comúnmente asociados a la activación de retroelementos en distintos modelos de plantas. Sin embargo, la relación que guardan con RNAs de interferencia no ha sido explorada de la misma manera, a pesar de que existe evidencia de la desregulación en la biogénesis de RNAs de 21 y 24 nt concomitante a la pérdida del silenciamiento de TEs y su activación transcripcional.

2.1. Antecedentes directos

En el laboratorio de trabajo se realizó la secuenciación masiva de RNA para determinar los perfiles de expresión cualitativos y cuantitativos de las diferentes poblaciones de RNAs pequeños durante la inducción y subcultivos a diferentes tiempos en callos embriogénicos de maíz. En este trabajo se generaron cuatro bibliotecas de RNAs pequeños: de embriones inmaduros de 15 días después de la polinización (EI), callos embriogénicos subcultivados por uno (C1), cuatro (C4), y diez meses (C10). De las lecturas generadas se analizaron las secuencias de RNA

con un tamaño entre 18 y 27 nt las cuales fueron clasificadas de acuerdo al tipo de RNA, como miRNAs reportados, RNAs pequeños interferentes derivados de TEs (ra-siRNAs), de mRNAs (mRNA-siRNAs) y otros RNAs pequeños interferentes (otros siRNAs). En el caso de los ra-siRNAs se consideraron como tales si las secuencias se encontraban en la base de datos “Maize TE database” (<https://omictools.com/maize-transposable-element-database-tool>).

En ese estudio, la presencia de ra-siRNAs se mantenía a niveles similares entre el explante E1 y los callos embriogénicos de maíz de diferentes tiempos de subcultivo, se observó que el tamaño y secuencias de las cuales eran originados los ra-siRNAs presentaba importantes cambios durante la etapa de inducción y establecimiento de los callos embriogénicos de maíz [Alejandri-Ramírez *et al* 2018]. Siendo los ra-siRNAs más abundantes aquellos generados a partir de TEs de las clases Copia y Gypsy con un tamaño de 22 y 24 nt [Alejandri-Ramírez *et al* 2018].

La variación de siRNAs de 24 nt sugería que la metilación del DNA también podría verse afectada en callos embriogénicos de maíz. Por lo que en un estudio consecuente del laboratorio se propuso observar cómo se encontraban los patrones de metilación de las secuencias de algunos TEs que presentaron niveles elevados de ra-siRNAs en callos embriogénicos de maíz. El problema se abordó mediante ensayos de Southern blot, empleando DNA genómico de callos embriogénicos de maíz de tiempos de subcultivo prolongados. El DNA fue digerido con distintas enzimas metilosensibles, y probado con sondas diseñadas a partir las familias de transposones Ji y Cinfu, las cuales pertenecen a las clases Copia y Gypsy respectivamente [Tesis: Contreras-Guerra 2014].

Los patrones de hibridación de Ji y Cinfu para las digestiones realizadas con McrBC confirmaban que ocurren cambios en los niveles de metilación en contexto CHH durante la inducción de callos embriogénicos de maíz (Figura 7), observándose un aumento de la metilación del DNA (mayores niveles de digestión con McrBC), metilación que gradualmente se pierde en subcultivos posteriores (señalado con triángulos negros). En contraste, la metilación del DNA en cultivos prolongados (de

diez a veinte meses de subcultivo) no variaba de manera importante entre un subcultivo y otro [Tesis: Contreras-Guerra 2014].

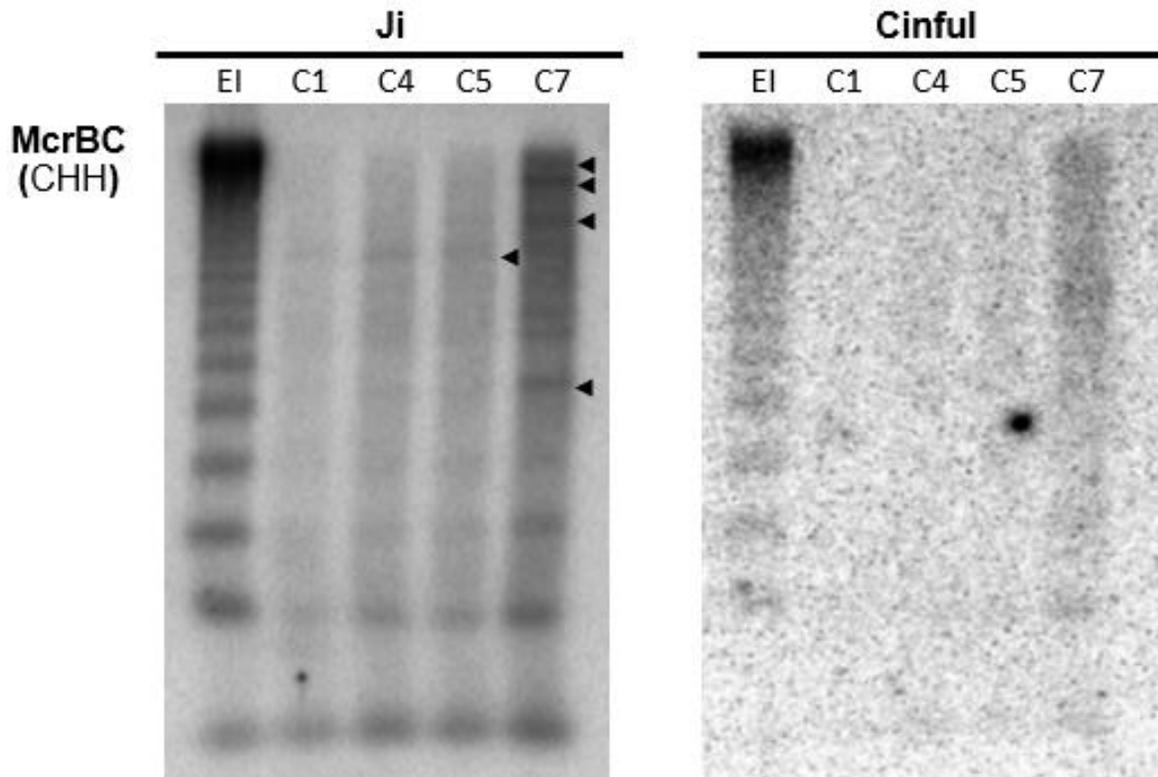


Figura 7. Southern blot del DNA del lote de inducción digerido con McrBC e hibridados con sondas para los retrotransposones Ji y Cinful. McrBC corta DNA metilado en contexto CHH. Los triángulos negros señalan un cambio notable en el patrón de bando de cada tejido analizado. EI: embrión inmaduro; C1, C4, C5, C6: callos embriogénicos subcultivados durante 1, 4, 5 y 6 meses respectivamente.

El estrés al que se encuentran sometidos los cultivos celulares y particularmente los callos embriogénicos de maíz, tiene un efecto en el momento que se da inicio el proceso de inducción y a lo largo del tiempo con el aumento del número de subcultivos. Sin embargo, resulta interesante determinar si los cambios en la acumulación de RNAs pequeños asociados a repetidas tienen una influencia directa en la metilación y posteriormente en la regulación de la expresión de ciertos retrotransposones. Una regulación de suma importancia para el organismo debido al potencial mutagénico de este tipo de secuencias, ya que su expresión descontrolada podría generar la incorporación de secuencias no deseadas en el

genoma resultando en un efecto nocivo como la pérdida de función de algún gen importante.

Acorde a estos antecedentes, se propuso como hipótesis de trabajo para este proyecto lo siguiente:

3. HIPÓTESIS

Durante la inducción y el subcultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz ocurren modificaciones en la expresión de transposones y cambios en la metilación de la secuencia de DNA de estos transposones, lo cual está asociado con cambios en los niveles en ra-siRNAs

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Determinar la relación entre cambios en ra-siRNAs con la metilación y expresión de TEs durante la inducción y subcultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz.

4.2. Objetivos particulares

- 4.2.1. Obtención de muestras de embrión inmaduro y callos embriogénicos de maíz de 1, 4, 6, 10, 15 y 18 meses.
- 4.2.2. Selección de candidatos de TEs que muestren una expresión reportada en bases de datos y diseñar oligonucleótidos para la amplificación por PCR de cada una de los candidatos.
- 4.2.3. Determinar el estado de metilación de las secuencias de los TEs candidatos para cada tiempo de subcultivo mediante McrBC-PCR.
- 4.2.4. Determinar si existe expresión diferencial de TEs a distintos tiempos de subcultivo de CE por RT-PCR.
- 4.2.5. Corroborar la presencia de ra-siRNAs por Northern blot para cada TE candidato y sus cambios en distintos tiempos de subcultivo.

5. DISEÑO EXPERIMENTAL

5.1. Selección de elementos transponibles (TE) a ser analizados, secuencias consenso y diseño de oligonucleótidos.

La selección de candidatos se realizó en base a tres parámetros: la abundancia de RNAs pequeños presentes durante la inducción de callos embriogénicos de maíz VS-535 “Tuxpeño” que mapean en las familias de TEs de clase Gypsy y Copia [Alejandri-Ramírez *et al* 2018]; la expresión reportada para TEs de estas familias mediante el análisis de ESTs en bases de datos y el número de copias de TEs en el genoma de maíz [Vicient 2010].

Las bibliotecas empleadas para el análisis fueron secuenciadas utilizando tecnología Illumina, de las cuales se removieron adaptadores y otras secuencias contaminantes para dejar lecturas limpias de RNAs pequeños únicos y estos fueron mapeados en el genoma de maíz B73 disponible (AGPv4.32) empleando el software Bowtie [Alejandri-Ramírez *et al* 2018].

Este trabajo previo analizó lecturas de un rango de 18 a 27 nt de longitud, obteniendo 3 798 445, 8 393 542, 879 841 y 18 337 728 lecturas totales para E1, C1, C4 y C10 respectivamente. De las cuales los RNAs de 21, 22 y 24 nt de longitud resultaron ser los más abundantes en todas las bibliotecas [Alejandri-Ramírez *et al* 2018].

De las cuatro bibliotecas de sRNAs obtenidas para cada estadio de la inducción de callos embriogénicos de maíz, se eligieron aquellos TEs en los que las lecturas de RNAs pequeños se encontraban a niveles elevados (clases Copia y Gypsy, ver figura 8) y que a su vez presentaran cambios en el número de lecturas entre las distintas bibliotecas de E1, C1, C4 y C10 que representan etapas de inducción y establecimiento de los callos embriogénicos de maíz.

Ambas clases tienen un comportamiento similar en la variación de abundancia de sRNAs entre subcultivos, aunque en distinta magnitud, pues hay un descenso en el número de lecturas en C1 y una posterior recuperación en subcultivos posteriores respecto al explante de partida (Embrión Inmaduro). Estos cambios sugieren que el reajuste de ra-siRNAs de las clases Gypsy y Copia podría tener alguna relevancia durante la inducción y el subcultivo de callos embriogénicos de maíz.

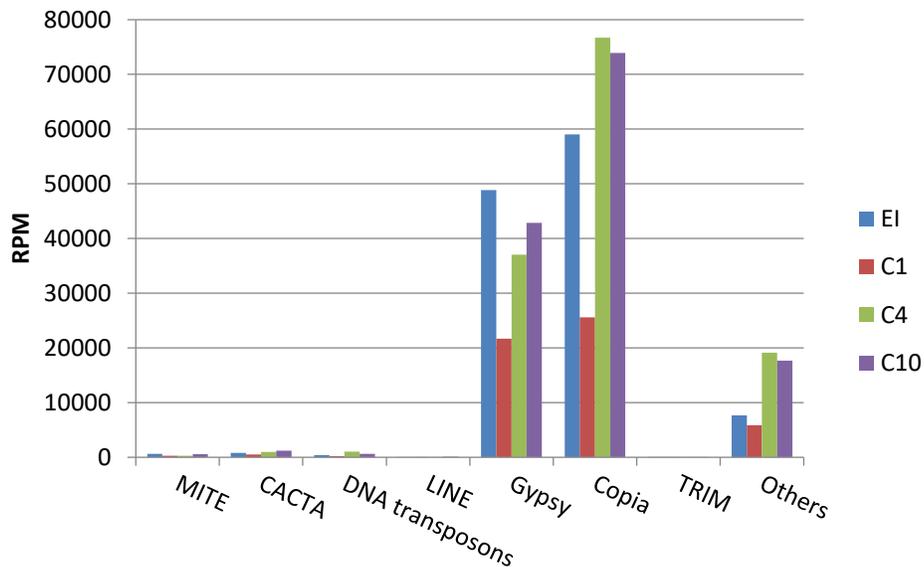


Figura 8. Abundancia de ra-siRNAs que mapean en distintas familias de transposones. Los datos de secuenciación masiva en paralelo muestran que dentro las cuatro bibliotecas generadas para la fase de inducción de callos embriogénicos de maíz, las clases de retrotransposones más abundantes son Gypsy y Copia. Las cuales muestran un comportamiento similar en la distribución de la abundancia de sRNAs a lo largo del proceso de inducción. EI: embrión inmaduro; C1, C4 y C10: callos embriogénicos de 1, 4 y 10 meses de subcultivo respectivamente. RPM: acrónimo en inglés para “lecturas normalizadas por millón”.

La expresión de elementos transponibles se encuentra poco explorada en cultivos celulares de maíz, sin embargo, en el trabajo de Vicient (2010) se recopila la información obtenida en base a ESTs (Expressed Sequence Tags) hasta la fecha. En cultivos celulares, la mayor parte de familias de TEs presentan niveles bajos de expresión, no obstante, los niveles de mayor expresión son para los retrotransposones Giepum, Eninu y Opie por parte de la clase Copia y Flip, Prem1 y Shadowspawn de la clase Gypsy, mientras que Xilon y Cinfu se encuentran expresados en menor medida [Vicient, 2010].

Por otro lado, al considerar el número de copias de retrotransposones LTR en el genoma de maíz, encontramos que dentro de la clase Copia, Ji y Opie resultan ser los más abundantes. Mientras que en la clase Gypsy predominan los transposones Huck y Zeon; y en menor grado, pero de igual manera abundantes están Cinfu y Prem [Vicient, 2010].

Teniendo en cuenta todo lo anterior en conjunto, se propuso a los retrotransposones Ji y Giepum (Copia), así como a Cinfu y Huck (Gypsy) como buenos candidatos para analizar la relación entre niveles de siRNAs, metilación de DNA y transcripción del TE por la RNA polimerasa II. Para obtener una secuencia consenso de DNA de cada TE se realizó el alineamiento de las secuencias que se tienen reportadas para cada uno de los candidatos. Esto se realizó mediante el programa computacional MUSCLE (Multiple Sequence Alignment with High Accuracy and High Throughput, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) el cual nos muestra las regiones conservadas en todas las secuencias analizadas.

Posteriormente para realizar la búsqueda de la secuencia de los transcritos de cada TE a estudiar, se efectuó un BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&PAGE_TYPE=BlastSearch&LINK_LOC=blasthome) en bases de datos de EST (Expressed Sequence Tag) limitando la búsqueda a cultivos celulares y embriones inmaduros de maíz. Este ensayo partió de la región de DNA conservada que fue obtenida anteriormente y de la colección de secuencias de EST obtenidas se realizó un nuevo alineamiento con MUSCLE para determinar una secuencia conservada de cada transcrito dado que se desea trabajar sobre el cambio en la expresión de RNA mensajero.

Finalmente, sobre estas secuencias consenso de ESTs de cada TE candidato se procedió a diseñar cebadores para un ensayo posterior de RT-PCR considerando que la región a amplificar fuera única para cada transposon y no cayera dentro las regiones LTRs debido a que se corría el peligro de que esta región fuera compartida entre varios transposones con LTRs (Figura 9). El diseño de cebadores fue

efectuado mediante el programa en línea Primer3Plus (<http://primer3plus.com/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>) y la colección de los mismos se condensa en la tabla 1.

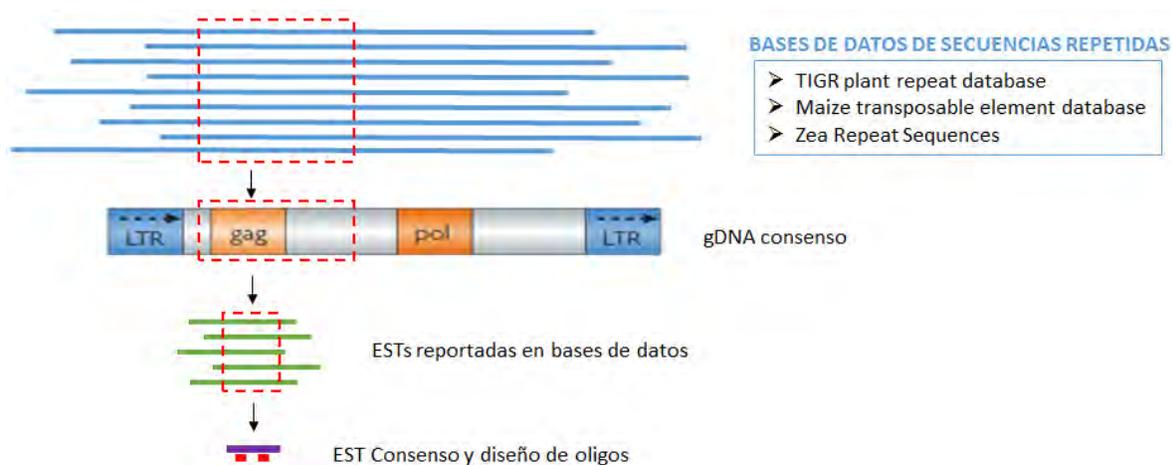


Figura 9. Esquema del proceso de selección de secuencias consenso para cada transposon candidato. Las líneas en color azul representan el alineamiento de la colección de secuencias de DNA para un transposon en específico obtenidas de bases de datos de secuencias repetidas y sobre las cuales se obtuvo una secuencia de DNA genómico (gDNA) consenso. Las líneas verdes representan la colección de secuencias de cDNA obtenidas en bases de datos de ESTs (Expressed Sequence Tag) a partir de la secuencia consenso de gDNA. La línea en morado representa la secuencia consenso final obtenida del alineamiento de las ESTs y sobre la cual se diseñaron cebadores específicos para el transposon en cuestión tanto para los ensayos de McrBC como RT-qPCR (rectángulos rojos).

Tabla 1. Secuencia de cebadores empleados para amplificar la región específica para cada subfamilia de TEs así como del gen ribosomal 18S.

LTR Retrotransposon	Oligo Forward (5'-3')	Oligo Reversa (5'-3')	Amplicón (pb)
Ji	GTGATGACAAGAAGGGGAGAAG	TTGGTGACGGCGATGTTTG	149
Giepum	ATGGTGGTGGTGAAGAGAAGTC	ACCGACGTGGAATCATCAAG	97
Cinful	GGCCTTCAGACAAATGCAAGAG	ATGGTAATCTTGCCCAGTGC	74
Huck	ACGGAAGTGAGGTACGAGATC	AAGTCCACGGTGTACCACTTC	100
18S	TCCTATTGTGTTGGCCTTCGG	TCCTTGGCAAATGCTTTCCG	131

5.2. Análisis de la expresión de cada TE seleccionado en embrión inmaduro y callos de 1, 4, 6, 10, 15 y 18 meses mediante RT-PCR

5.2.1. Aislamiento de RNA

La extracción de RNA se llevó a cabo de dos maneras distintas de acuerdo a la calidad del RNA requerido para cada técnica. Para los ensayos de RT-PCR cuantitativo en un solo paso se requerían pequeñas cantidades de RNA íntegro y de calidad, por lo que se empleó el kit de extracción Quick-RNA™ MiniPrep (Zymo Research) de acuerdo a las instrucciones del proveedor partiendo de 0.25 g de tejido y recuperando el RNA purificado en 35 µL de agua tratada con DEPC.

Para evaluación de la presencia de siRNAs originados de los TEs seleccionados se requerían grandes cantidades de RNA total, por lo que la purificación se realizó empleando TRIzol® Reagent (Invitrogen, Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del proveedor partiendo de 0.5 g de tejido e incluyendo un paso de purificación adicional con fenol/cloroformo posterior a la separación de la fase acuosa de la fase orgánica y previo a la precipitación con isopropanol. El pellet obtenido al finalizar el protocolo fue resuspendido de 25 µL.

Una vez terminadas las extracciones se verificó la integridad del RNA mediante un gel de agarosa al 1% con buffer TBE (ver Anexo 1) y fue cuantificado por Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

5.2.2. Tratamiento con DNasa

El RNA aislado fue tratado con DNasa I siguiendo las indicaciones del fabricante de acuerdo al inserto del producto “DNase I, RNase-free” (Thermo Scientific). Adicionalmente la reacción fue suplementada con la enzima de restricción PvuII con la finalidad de garantizar la remoción total del DNA contaminante. De tal manera que por cada 1 µg de RNA la reacción se llevaría a cabo de acuerdo a como se desglosa en la tabla 2 durante 90 minutos a 37°C sin agitación.

Tabla 2. Componentes de reacción para eliminar DNA contaminante en 1 µg de RNA con “DNase I, RNase-free” (Thermo Scientific). DEPC, Diethylpyrocarbonate. cbp, cuanto baste para.

RNA	1 µg
Buffer de reacción 10x (con MgCl ₂)	1 µL
“DNase I, RNase-free”	1 µL (1 U)
PvuII	1 µL (1 U)
Agua tratada con DEPC	cbp 10 µL

Una vez terminado el proceso de eliminación de DNA contaminante se procedió a purificar el RNA mediante el kit RNA Clean & Concentrator™-5 (Biorad) de acuerdo a las indicaciones del inserto.

5.2.3. Ensayos de RT-PCR cuantitativo en un solo paso

Se determinó la expresión de TEs en tiempo real mediante el sistema SuperScript™ III Platinum™ One-Step qRT-PCR Kit (Invitrogen). Este tipo de sistema lleva a cabo la síntesis de cDNA y la PCR en un solo tubo de reacción permitiendo la detección con mayor sensibilidad.

Se prepararon mezclas de reacción de acuerdo a las recomendaciones del proveedor en un volumen final de 10 µL para cada reacción individual. Tanto para Giepum como para Cinfu se emplearon concentraciones de 150 y 50 nM de cebadores “forward” y “reverse” respectivamente; mientras que para el gen “house-keeping” 18S se utilizó una concentración de 50 nM para ambos cebadores. Todas las reacciones partieron de 18 ng de RNA de cada una de las muestras analizadas salvo aquellas que prescindían de ácidos nucleicos (controles NTC).

El programa empleado para llevar a cabo el proceso de reverso transcripción y la consecutiva amplificación por PCR es la misma indicada por el inserto empleando el equipo 7500 Real-Time PCR System de la marca Applied Biosystems y el Software del mismo nombre versión v2.0.6.

5.3. Análisis de la metilación de regiones específicas en los TEs seleccionados mediante ensayo de McrBC-PCR con DNA genómico

5.3.1. Extracción de DNA

Se purificó DNA genómico de todas las muestras de tejido a estudiar partiendo de aproximadamente 0.2 g de embriones inmaduros y 0.5 g de callos embriogénicos de maíz. Las muestras fueron congeladas con nitrógeno líquido y pulverizadas por separado con mortero y pistilo.

El tejido pulverizado de cada muestra fue transferido a un tubo eppendorf de 2.0 mL sin rebasar la marca de 0.5 mL y se le añadió 1.0 mL de buffer de lisis (NaCl 350 mM, Tris 10 mM, EDTA 50 mM, Urea 7 M, Sarcosyl 2%, pH 7.6), se mezcló bien por vortex a máxima velocidad.

Los tubos fueron colocados en un termomixer incubándolos a 37°C a 200 rpm durante 1 minuto. Enseguida se les añadió un volumen igual de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) y se volvió a incubar durante 1 minuto adicional bajo las mismas condiciones.

Se centrifugó a 12000 g durante 5 minutos y se separó la fase acuosa (sin tocar la interfase) en un tubo eppendorf nuevo de 1.5 mL. A cada tubo se le añadió un volumen igual de isopropanol y se centrifugó a 1000 g. Se decantó el sobrenadante y se lavó el pellet dos veces con etanol al 70%. El pellet fue resuspendido en 50 µL de agua estéril.

Una vez terminadas las extracciones se verificó la integridad del DNA mediante un gel de agarosa al 1% con buffer TBE (ver Anexo 2) y fue cuantificado por Nanodrop 2000 (Thermo Scientific).

5.3.2. Digestión con McrBC

La enzima McrBC es una endonucleasa que corta DNA que contiene metilcitosinas (5-metilcitosina o 5-hidroximetilcitosina) en una o en ambas cadenas sin afectar al

DNA carente de estas marcas. Reconoce el sitio 5'...Pu^mC(N₄₀₋₃₀₀₀)Pu^mC...3' donde Pu se refiere a una purina (guanina o adenina). Los sitios de reconocimiento pueden estar separados hasta por 3 kb, pero la óptima separación es de 55-103 pares de bases.

Se empleó 1 µg de DNA de cada una de las muestras obtenidas y se digirieron con 20 unidades de la enzima McrBC (New England Biolabs) en un volumen final de 20 µL de acuerdo a las especificaciones del proveedor. Todas las reacciones se incubaron a 37°C durante 60 minutos de manera simultánea y consecutivamente se inactivó la enzima por calor a 65°C durante 20 minutos.

5.3.3. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La PCR efectuada se llevó a cabo partiendo de 25 ng de gDNA o DNA previamente digerido con McrBC. Cada reacción de 10 µL fue preparada en agua estéril a una concentración final de Taq Buffer 1X, MgCl₂ 4 mM, dNTPs 0.5 mM, 0.5 µM para ambos cebadores "forward" y "reverse" (ver Tabla 1) y 1U de Taq DNA Polymerase (Thermo Scientific). El programa empleado se muestra en la Figura 10, el cual fue sometido a 22 ciclos de reacción para los retrotransposones Ji y Cinful; 26 ciclos para Giepum y 29 ciclos para Huck.

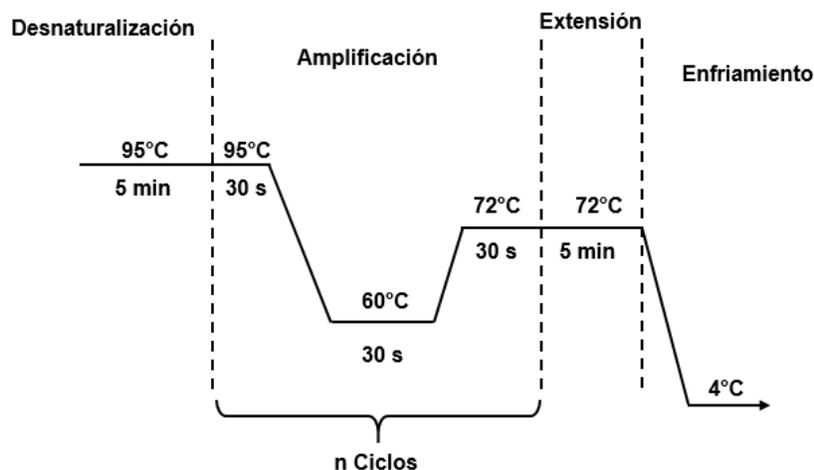


Figura 10. Programa de PCR punto final empleado para la amplificación de los TEs estudiados. Las temperaturas y los tiempos señalados en el esquema se ocuparon para todos los TEs, variando solo el número de ciclos entre un transposon y otro. Ji y Cinful se sometieron a 22 ciclos de reacción, mientras que Giepum y Huck se sometieron a 26 y 29 ciclos respectivamente.

5.3.4. Resolución de fragmentos de PCR y densitometría de las bandas

Se preparó un gel de agarosa al 2% con buffer TBE 1X en el cual se cargaron las PCRs obtenidas con buffer de carga a base de Xilencianol y se corrieron las muestras a 80 V durante 30 minutos. Una vez terminado el tiempo de corrida, se capturó una fotografía del gel con el fotodocumentador Chemi-Doc™ MP System (Biorad) en formato "Image Lab Image Document" (.scn).

Las imágenes fueron sometidas a una densitometría con el programa Image Lab 4.1, detectando la banda de cada fragmento amplificado a la altura del tamaño de pares de bases esperado. Para un TE en particular, el tamaño del área seleccionada del amplicón fue el mismo para todas las muestras analizadas (e. g. EI, C1, C4, etc.) tratadas con McrBC y no tratadas, así como también para la selección del fondo.

La cuantificación de la intensidad de los fragmentos de PCR se determinó mediante la herramienta de Volumen sustrayendo el fondo de manera global. La determinación del estado de metilación se llevó a cabo mediante el cociente del volumen (intensidad) del gDNA íntegro entre el volumen registrado en el DNA digerido con McrBC. De tal manera que la disminución de la metilación del DNA disminuye la actividad de McrBC dando como resultado la disminución de este cociente, mientras que el aumento de la metilación del DNA aumenta la actividad de la enzima y por ende también el cociente efectuado.

El ensayo realizado permitió evaluar los niveles de metilación del DNA en cualquiera de los contextos que se reportan para plantas para una región específica de cada familia de TE seleccionada. La evaluación del grado de metilación de cada una de estas regiones se llevó a cabo mediante un análisis semi-cuantitativo de PCR en base a la actividad de corte de la enzima metilo-sensible McrBC (solo digiere en presencia de citosina metilada). Los valores de metilación relativa obtenidos por el cociente de las cantidades de amplicón generado con DNA genómico entre el amplificado con DNA tratado con McrBC (gDNA/McrBC), indican que si el valor es cercano a *uno* denota la ausencia de metilación, mientras que si es mayor a *uno*

indica presencia de metilación, puesto que la actividad de McrBC genera una menor cantidad de amplicón y su vez aumenta el valor del cociente.

Los ensayos de McrBC-PCR se realizaron por triplicado para cada uno de los TEs candidatos en todos los lotes de inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño y Costeño. La cuantificación de la cantidad de amplicón se realizó por densitometría empleando el software Image Lab 4.1, los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba post hoc HSD Tukey con diferencias significativas en el nivel 0.05 ($p < 0.05$).

5.4. Evaluación de la presencia de siRNAs originados de los TEs seleccionados

5.4.1. Electroforesis y transferencia de RNAs pequeños

Partiendo de RNA total extraído de cada una de las muestras estudiadas, se desnaturalizaron a ebullición 10 μ g de RNA en buffer de carga FDE (Formamida desionizada con azul de bromofenol). Las muestras fueron cargadas en un gel de poliacrilamida al 15% (20:1 acrilamida-bisacrilamida/urea 8M/TBE 1X) y corridas a 20 mA durante 1 hora. Como marcador de peso molecular se usaron 0.2 μ L de microRNA marker (New England Biolabs). Una vez resuelto el gel se transfirió el RNA a una membrana de nylon Hybond NX (GE Healthcare Life Sciences) empleando un equipo de transferencia semi seca Bio-Rad y TBE 0.5X como buffer de transferencia durante 35 minutos a 100 mA. El RNA transferido se fijó a la membrana mediante radiación UV utilizando un crosslinker dando dos pulsos de 70000 μ J/cm². Las membranas se tiñeron con azul de metileno para analizar la calidad de la transferencia y una vez verificado esto las membranas se lavaron con agua destilada para remover el exceso de azul de metileno.

5.4.2. Marcaje de la sonda, hibridación y exposición

Se emplearon sondas para sRNAs que mapean en distintos retrotransposones (ver Resultados, Tablas 4 y 5) y una sonda adicional con la secuencia 5'-TACCCTCCACTACCACTCCGT-3' que detecta un sRNA de 21 nt denominado

Zma_ji-siR1, que presentó una abundancia muy elevada en los callos embriogénicos de maíz acorde a datos previos de secuenciación masiva en paralelo [Alejandri-Ramírez *et al* 2018]. El marcaje de cada una de las sondas se llevó a cabo empleando ³²P-ATP y siguiendo el protocolo de Life Technologies™ “Protocol for 5' End Labeling RNA”.

Cada membrana fue pre-hibridada 30 minutos con 10 mL de “ULTRAhyb®-Oligo Hybridization Buffer” a 42°C. Transcurrido este tiempo se agregó la sonda marcada (aproximadamente 10 pmol) y se dejó hibridando a 42°C durante toda la noche (10 horas).

Se recuperó la sonda y se lavó la membrana dos veces con 20 mL de solución de lavado (SSC 2x, SDS 1%) durante 15 minutos. La membrana hibridada se colocó en un cassette de exposición con una pantalla de exposición durante toda la noche y se reveló la pantalla en un equipo “Typhoon 8600 Variable mode Imager” y el software “Scanner Control”. Posteriormente se realizó un análisis de densitometría de las bandas obtenidas con el software Quantity One, normalizando la densitometría de acuerdo a la señal del rRNA 5S. La abundancia relativa fue comparada en base a los callos embriogénicos de 6 meses de subcultivo tomándose como valor de 1.

6. RESULTADOS

Se recolectaron muestras de embriones inmaduros, así como de callos embriogénicos de maíz con diferentes tiempos de subcultivo de lotes con dos fondos genéticos diferentes: la variedad mejorada VS-535 de la raza Tuxpeño y la variedad híbrida H-565, conocida como “Costeño” resultado de la cruce de diferentes variedades de la raza Tuxpeño (Tabla 3).

Tabla 3. Inventario de muestras empleadas de callos embriogénicos y embriones inmaduros de maíz.

	Lote	E1	C1	C4	C6	C10	C15	C18
H-565	1							
VS-535	2							
H-565	3			X				

Los distintos tonos del color naranja denotan dos lotes independientes de embriones y/o callos embriogénicos obtenidos a partir de la variedad H-565 de maíz “Costeño”. En cambio, el color azul representa un solo lote de maíz VS-535 “Tuxpeño” que pudo seguirse en todas las etapas de subcultivo. La “X” en las muestras de callos embriogénicos de cuatro meses del lote 3 se refiere a que el tejido obtenido resultó inadecuado para la obtención de ácidos nucleicos en varios intentos de extracción.

Tuxpeño es una variedad mejorada de polinización libre (entre hermanos) de origen mexicano [Gómez *et al* 2003]; mientras que Costeño se trata de un híbrido trilineal generado a partir de tres líneas endogámicas obtenidas de un ancestro de Tuxpeño [Gómez-Montiel *et al* 2013]. Estas variedades han sido ampliamente caracterizadas a nivel agronómico y de productividad, pero poco se conoce de sus características a nivel molecular. Un dato importante, es que ambas variedades muestran buen potencial embriogénico en cultivo de tejidos *in vitro*, por lo que en México han sido utilizadas a nivel de laboratorio para la transformación de maíz [Garrocho-Villegas *et al* 2012].

6.1. Determinación del estado de metilación de la secuencia de cada TE

Durante la etapa de inducción de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño (E1 a C1), no se observaron cambios inmediatos en la metilación de la región analizada para cualquiera de los TEs (Figura 11). Esto podría deberse a la acción tardía de la maquinaria de metilación como una causa de la reprogramación general inducida por la auxina 2,4-D y su efecto de estrés que se ha reportado ser relevante en la regulación de transposones como respuesta de las plantas [Cavrak *et al* 2014].

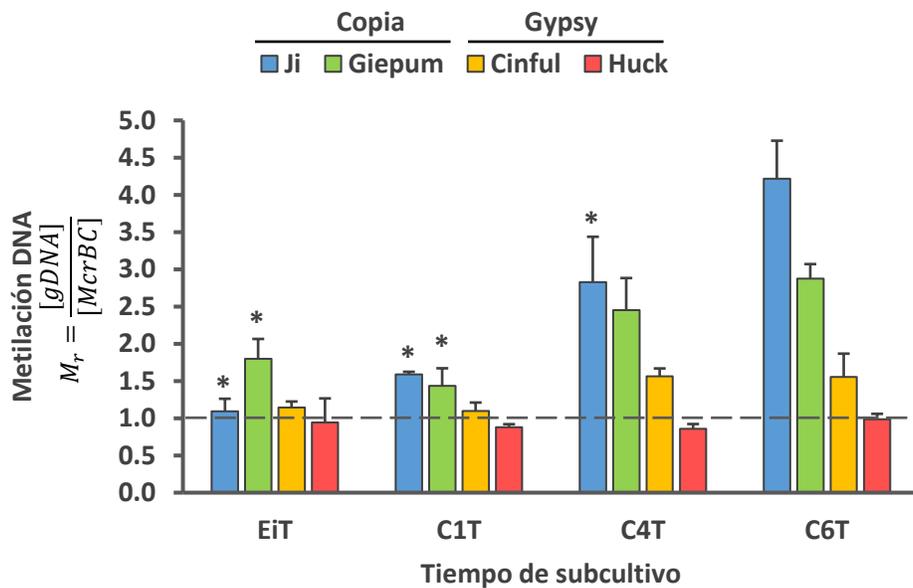


Figura 11. Grado de metilación de citosina en cualquier contexto de regiones particulares de TEs durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. La metilación del DNA incrementa de manera significativa aparentemente solo para los TEs pertenecientes a la clase Copia, de los cuales el retrotransposon Ji muestra un aumento más pronunciado. La línea transversal punteada señala ausencia de metilación en la región de DNA; mientras que el cruce por encima de esta línea indica un aumento en la metilación. E1: embrión inmaduro; C1, C4, C6: callos embriogénicos subcultivados durante 1, 4 y 6 meses respectivamente. T: maíz Tuxpeño. Para cada uno de los transposones, el asterisco representa una diferencia significativa (HSD Tukey, $p < 0.05$) del valor de la media de C6T respecto al resto de los subcultivos.

Después de la inducción inicial y durante los subcultivos de establecimiento de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño (C1-C4 y C4-C6), se observa que los retrotransposones correspondientes a la clase Copia, es decir, Ji y Giepum muestran un aumento gradual de la metilación del DNA conforme se incrementa el

tiempo del subcultivo (aunque no en cultivos prolongados, ver Figura 12), siendo este cambio más pronunciado en Ji. En cambio, los retrotransposones Cinfu y Huck pertenecientes a la clase Gypsy; no muestran un cambio aparente con respecto al tejido de explante (Figura 11). Estos resultados sugieren que los cambios de metilación en el DNA dependen del tipo de transposon y podrían estar influenciados por su número de copias, pues los retrotransposones de la clase Copia son más abundantes que los de la clase Gypsy.

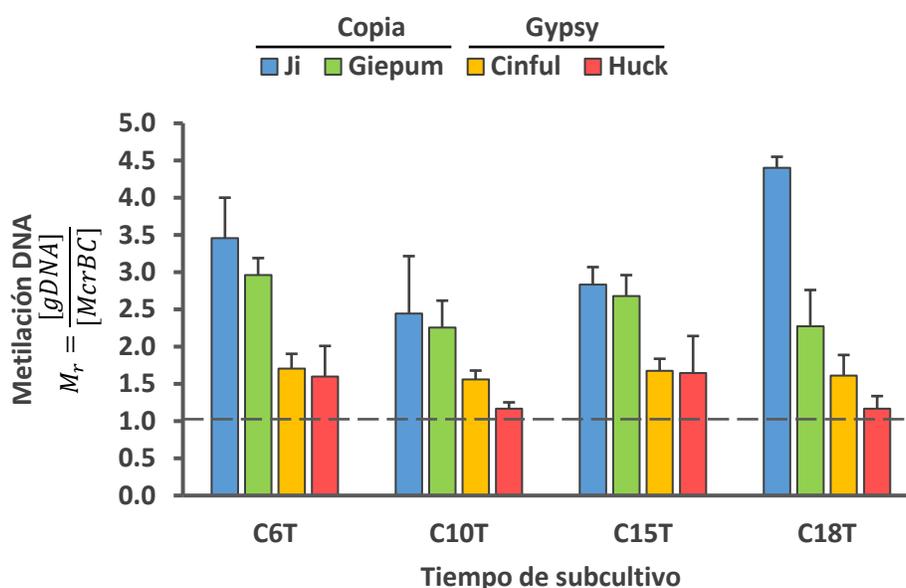


Figura 12. Grado de metilación de citosina en cualquier contexto de regiones particulares de TEs durante distintas etapas de propagación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. La metilación de las secuencias de los retroelementos estudiados parece no cambiar entre subcultivos prolongados, pues el análisis estadístico realizado para cada uno de los transposones no mostró una diferencia significativa del valor de la media de C6T respecto al resto de los subcultivos. La línea transversal punteada señala ausencia de metilación en la región de DNA; mientras que el cruce por encima de esta línea indica un aumento en la metilación. C6, C10, C15, C18: callos embriogénicos subcultivados durante 6, 10, 15 y 18 meses respectivamente. T: maíz Tuxpeño.

Al darle seguimiento al subcultivo prolongado de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño, de nuevo pudimos observar dos comportamientos dependientes del tipo de la clase del retrotransposon. Los TEs de la clase Gypsy mantuvieron una metilación del DNA baja o casi nula tanto para Cinfu como para Huck sin tener un cambio aparente a lo largo del tiempo (Figura 12).

En contraste, los retrotransposones estudiados de la clase Copia presentaron una mayor metilación con respecto a la clase Gypsy. El retrotransposon de la familia Ji presentó la mayor fluctuación en metilación entre un subcultivo y otro, mientras que Giepum no muestra una diferencia significativa entre subcultivos (Figura 12).

El análisis realizado en este trabajo fue dependiente de los lotes de callos embriogénicos manejados en el laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Química, por lo que en las réplicas de tiempos de subcultivo no fue posible utilizar nuevamente la variedad VS-535 "Tuxpeño". Tanto en inducción, como en propagación se analizó la variedad H-565 "Costeño" que es un híbrido derivado de diferentes variedades de Tuxpeño. Tuvimos que enfrentarnos a determinadas características inherentes al nuevo sistema de estudio; como lo fue la baja tasa de inducción del cultivo *in vitro* y la baja supervivencia de callos embriogénicos en estadios posteriores. Particularmente durante la fase de inducción, no se pudo aislar ningún tipo de ácido nucleico de la muestra C4C, muy probablemente debido al estado de la muestra.

Independientemente de las adversidades con muestras de Costeño, observamos que en el explante de origen (embrión inmaduro), la metilación del DNA se encuentra elevada en la mayoría de los retrotransposones estudiados; además, nuevamente fue notable que los mayores cambios de metilación ocurrieron para los TEs Ji y Giepum pertenecientes a la clase Copia (Figuras 13 y 14).

Dentro de la clase Copia, Ji presentó mayor metilación en comparación con Giepum, mientras que ambos tienen la misma tendencia a disminuir su metilación conforme se incrementa el tiempo de subcultivo. Por otro lado, dentro de la clase Gypsy, Cinful mostró un grado de metilación ligeramente mayor respecto a Huck, pero no presentó diferencias respecto a subcultivos posteriores (Figura 13).

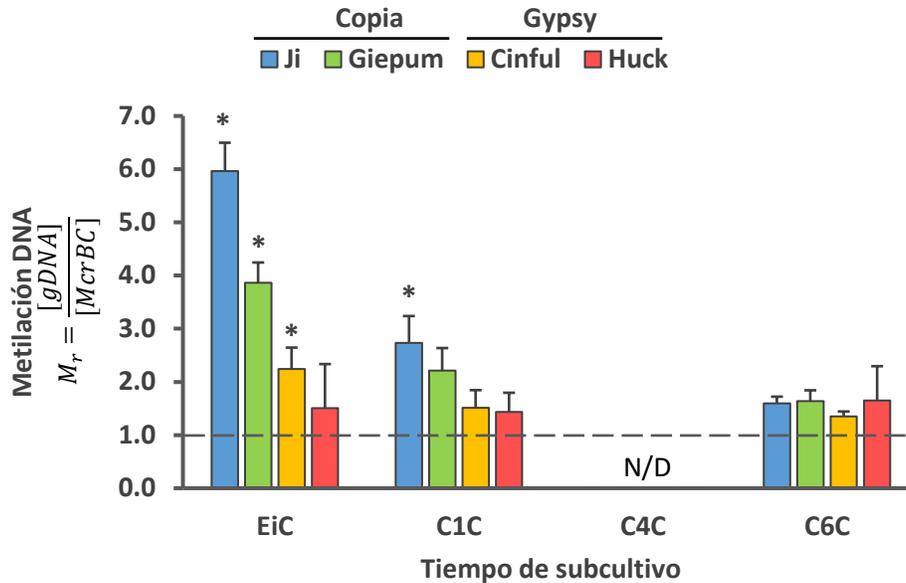


Figura 13. Grado de metilación de citosina en cualquier contexto de regiones particulares de TEs durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz Costeño. La metilación de TEs disminuye durante el proceso de inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño, principalmente para los miembros de la clase Copia. La línea transversal punteada señala ausencia de metilación en la región de DNA; mientras que el cruce por encima de esta línea indica un aumento en la metilación. La nomenclatura de muestras es igual a la Figura 11. C: maíz Costeño. La muestra C4C tiene una anotación de no determinado (N/D) debido a que no se obtuvieron valores para esta etapa. Para cada uno de los transposones, el asterisco representa una diferencia significativa (HSD Tukey, $p < 0.05$) del valor de la media de C6C respecto al resto de los subcultivos.

Las diferencias observadas entre Tuxpeño y Costeño respecto al comportamiento de la metilación en Ji y Cinful durante la fase de inducción de callos embriogénicos de maíz podría deberse al estado inicial de metilación del explante y tener un efecto sobre la plasticidad de las células somáticas en la respuesta a oscuridad y altas concentraciones de auxinas explicando en parte por qué el híbrido Costeño es muy variable en la generación de callos embriogénicos de maíz y estos son propensos a la oxidación y muerte en subcultivos posteriores.

El lote de propagación de callos embriogénicos de maíz Costeño (Figura 14), a diferencia de la variedad Tuxpeño, fue independiente del lote de inducción. Se puede apreciar que salvo para el retrotransposon Ji, la metilación de los retrotransposones restantes no cambia conforme transcurre el tiempo entre subcultivos sin importar el tipo de clase a la que pertenecen. Mientras que los

cambios en la metilación de Ji son más pronunciados e inestables entre cultivos (Figura 14).

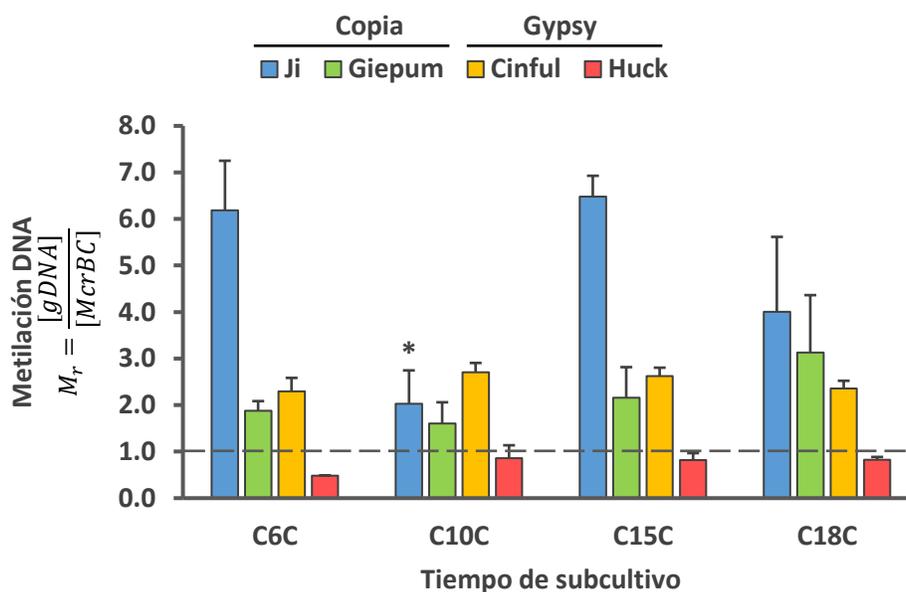


Figura 14. Grado de metilación de citosina en cualquier contexto de regiones particulares de TEs durante distintas etapas de propagación de callos embriogénicos de maíz Costeño. La metilación de la mayoría de las secuencias de retrotransposones se mantiene invariable a lo largo de los subcultivos prolongados, sin embargo, para la familia Ji existe una abrupta caída en su metilación en C10C, la cual posteriormente es restablecida en C15C. La línea transversal punteada señala ausencia de metilación en la región de DNA; mientras que el cruce por encima de esta línea indica un aumento en la metilación. La nomenclatura de nuestras es igual a la Figura 12. C: maíz Costeño. Para cada uno de los transposones, el asterisco representa una diferencia significativa (HSD Tukey, $p < 0.05$) del valor de la media de C6C respecto al resto de los subcultivos.

6.2. Perfiles de expresión transcripcional de TEs por RT-PCR

Con la finalidad de saber si el estado de metilación de una región específica de TEs tiene un efecto sobre su expresión mediante transcripción por la RNA polimerasa II, se realizó la cuantificación del transcrito correspondiente a la secuencia de DNA evaluada en los perfiles de metilación. Para ello se llevaron a cabo ensayos de PCR en tiempo real de cDNA de cada transposon candidato y normalizando por el transcrito constitutivo rRNA 18S.

De los TEs candidatos que se tenían contemplados, no se pudieron obtener datos cuantitativos para Ji y Huck en el presente estudio. Esto fue debido a que los cebadores diseñados para estos TEs no fueron adecuados para diferenciar las curvas de disociación de los amplicones y los controles sin templado (NTCs). Se probaron al menos dos pares de cebadores para Ji sin éxito y el diseño de nuevas opciones no figuraba como una solución viable debido a que es difícil encontrar una secuencia exclusiva para esta familia de TEs que a la vez cumpliera con los requisitos necesarios para el ensayo. Por otro lado, Huck se descartó debido a que en ensayos semi-cuantitativos previos se determinó que este retrotransposon no se expresa en ninguna etapa del cultivo de callos embriogénicos.

Para llevar a cabo la comparación entre muestras dentro del análisis realizado se tomó como referencia la muestra de 6 meses de subcultivo (C6) que se considera como callo embriogénico establecido. En el caso de los lotes de subcultivo de maíz Costeño, independientes uno del otro, el subcultivo de 6 meses corresponde a muestras diferentes para cada caso. Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) seguido de una prueba post hoc HSD Tukey con diferencias significativas en el nivel 0.05 ($p < 0.05$).

Al analizar la fase de inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño, se observó que los retrotransposones Giepum y Cinful se expresan en el explante de inicio a altos niveles (Figura 15B), siendo Giepum (Copia) el que se expresa en mayor medida en relación a Cinful (Gypsy). También es notorio que durante la inducción inicial (C1T) esta expresión disminuye de manera importante y se mantiene a estos niveles durante el establecimiento del callo embriogénico (Figura 15B). Este comportamiento es congruente con el incremento observado en los perfiles de metilación de estos TEs durante las etapas C1T y C4T (Figura 15A, Figura 11).

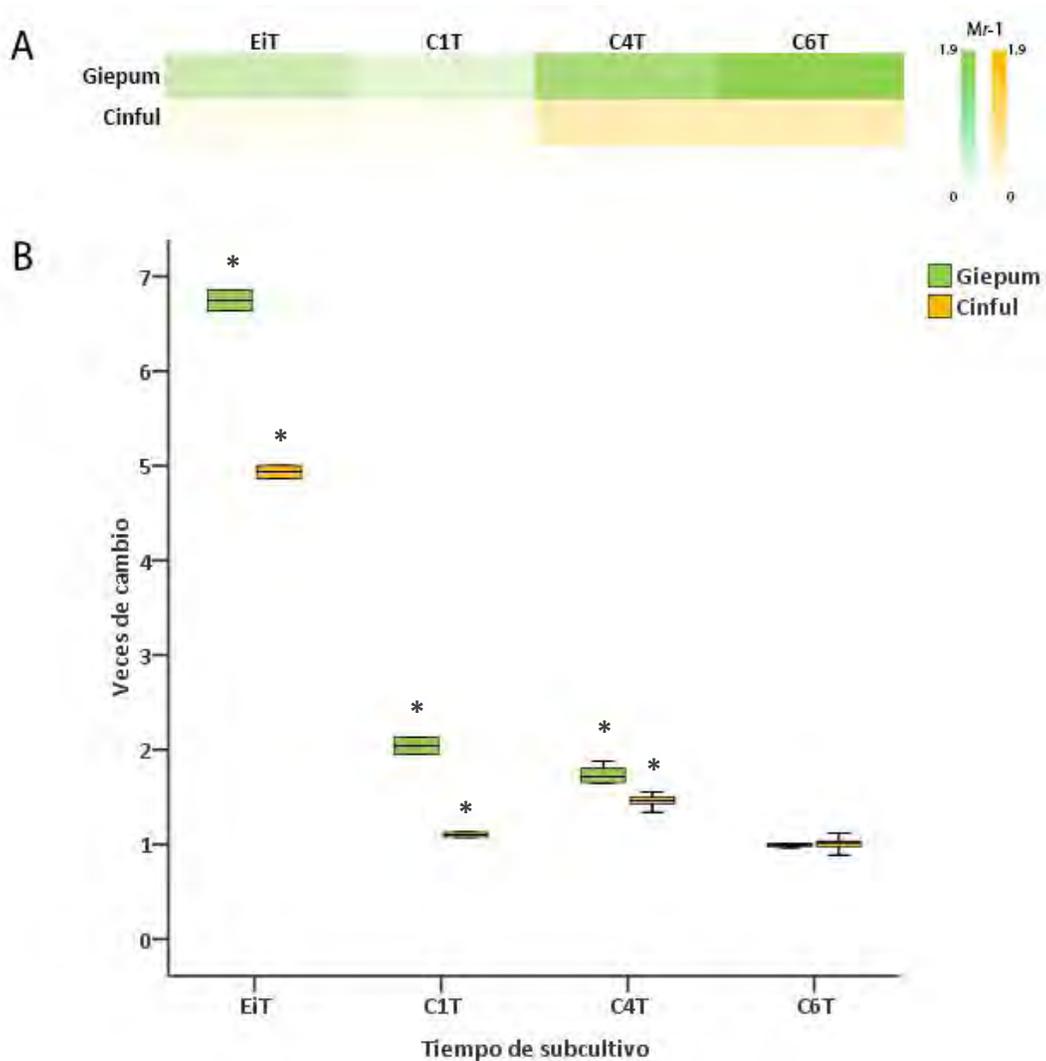


Figura 15. Perfil de represión-expresión de TEs durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. [A] Heat map que recopila los valores de metilación de Giepum y Cinful (Figura 11). La intensidad de cada color representa el grado de metilación de la secuencia de Giepum (verde) y Cinful (amarillo). **[B]** Perfil de expresión que muestra la comparación relativa de las veces de cambio entre muestras respecto a C6. La tendencia general de aumentar los niveles de metilación del DNA a lo largo del proceso de inducción corresponde con la consecuente disminución de la expresión de TEs. Para cada uno de los transposones, el asterisco representa una diferencia significativa (HSD Tukey, $p < 0.05$) del valor de la media de C6T respecto al resto de los subcultivos. Ei: embrión inmaduro; C1, C4, C6: callos embriogénicos subcultivados durante 1, 4 y 6 meses respectivamente. T: maíz Tuxpeño.

Durante el subcultivo de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño a tiempos prolongados, se observó que el patrón de expresión de Giepum y Cinful difiere al registrado durante la fase de inducción. Una vez establecido el cultivo *in vitro* (C6T), los transcritos del retrotransposon Cinful no presentaron cambios importantes a lo largo de los subcultivos hasta un tiempo de 18 meses. En contraste, Giepum

presentó un aumento significativo en su expresión en C10T y continuó incrementándose en los subcultivos posteriores. El comportamiento sugiere que en cultivos muy prolongados la expresión es dependiente de la clase del TE (Figura 16B).

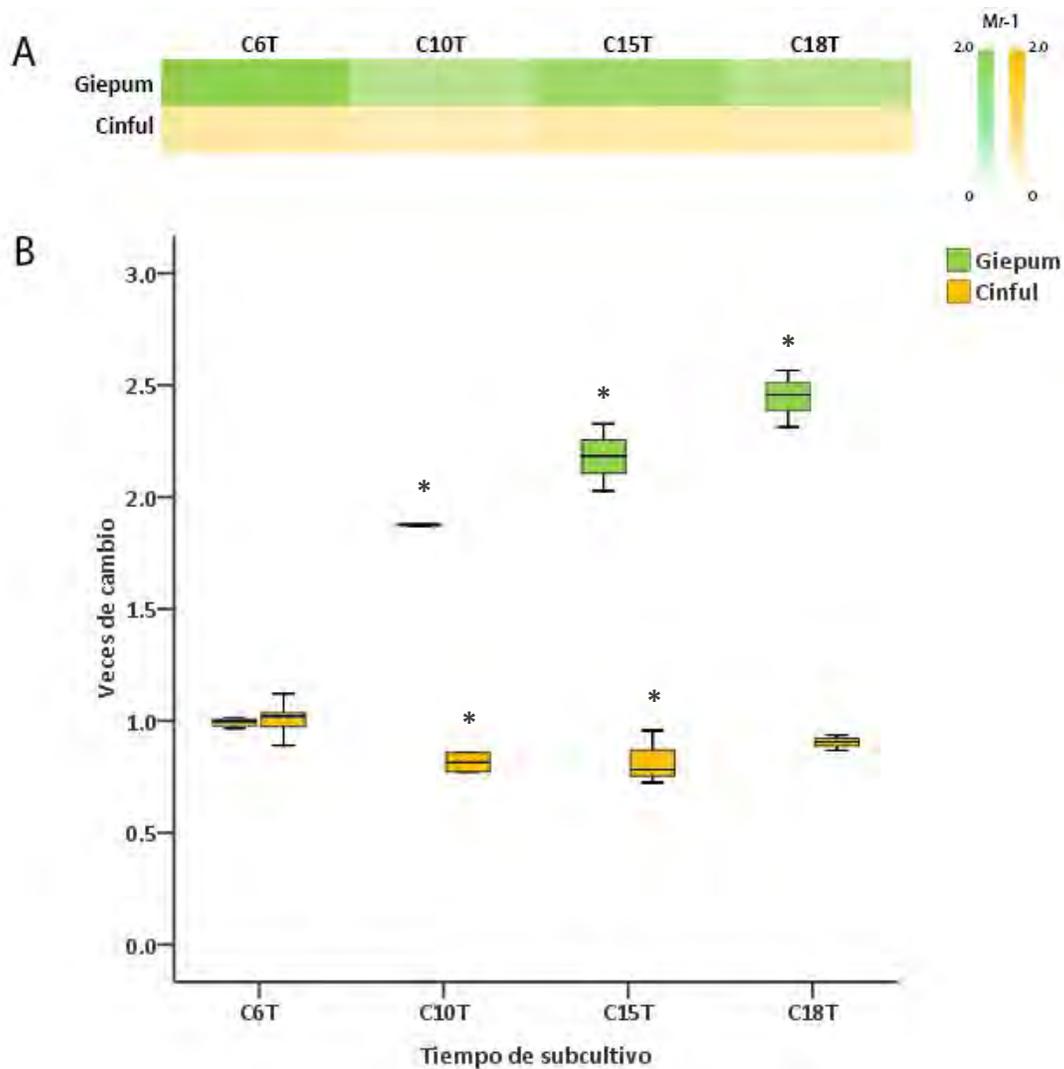


Figura 16. Perfil de represión-expresión de TEs durante la propagación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. [A] Heat map que recopila los valores de metilación de Giepum y Cinful (Figura 12). La intensidad de cada color representa el grado de metilación de la secuencia de Giepum (verde) y Cinful (amarillo). **[B]** Perfil de expresión que muestra la comparación relativa de las veces de cambio entre muestras respecto a C6. Giepum aumenta su expresión a lo largo del proceso de subcultivo a pesar de no mostrar cambios significativos en la metilación de su secuencia; mientras que Cinful mantiene niveles bajos de expresión y metilación de su secuencia. Para cada uno de los transposones, el asterisco representa una diferencia significativa (HSD Tukey, $p < 0.05$) del valor de la media de C6T respecto al resto de los subcultivos. C6, C10, C15, C18: callos embriogénicos subcultivados durante 6, 10, 15 y 18 meses respectivamente. T: maíz Tuxpeño.

Respecto a los lotes independientes de callos embriogénicos de maíz híbrido Costeño, se tuvieron ciertas limitantes para realizar los ensayos de qPCR. Como ya se había mencionado anteriormente, el lote de inducción presentó dificultades para extraer ácidos nucleicos, obteniéndose RNA a concentraciones muy bajas e inclusive no se pudo lograr la purificación adecuada para la etapa C4C.

Se realizaron varias extracciones de RNA en este lote lográndose dos cuantificaciones por qRT-PCR en la fase de inducción que presentaron la misma tendencia, pero con distinta magnitud (Figura 17B y Anexo 12). Estas cuantificaciones independientes se realizaron sólo por duplicado, de manera que no se sometieron al análisis estadístico como fue realizado con el resto de los lotes de callos embriogénicos.

De forma similar a lo observado en maíz Tuxpeño, ambos TEs presentaron disminución en su expresión durante la inducción inicial de callos embriogénicos. Aunque no se puede comparar la etapa C4C respecto a la anterior (C1C) y la siguiente (C6C), hay pocas diferencias entre los niveles de expresión observados en C1C y C6C, sugiriendo que los niveles de expresión cambian poco durante el establecimiento del cultivo *in vitro*. Además, es notable que a pesar de tratarse de otro fondo genético, el transposon Giepum mantiene una expresión mayor a la presentada por Ciful (Figura 17B).

El comportamiento descrito arriba, también se observa en una segunda réplica del ensayo con extracciones de RNA independientes (ver Anexo 12). La diferencia en la magnitud de las veces de cambio relativas podría deberse a la mayor heterogeneidad inherente al cultivo de callos embriogénicos de maíz Costeño, sobre todo durante la fase de inducción y establecimiento del cultivo. Esto podría también explicar en parte, la dificultad que presentaron estas muestras para extraer ácidos nucleicos.

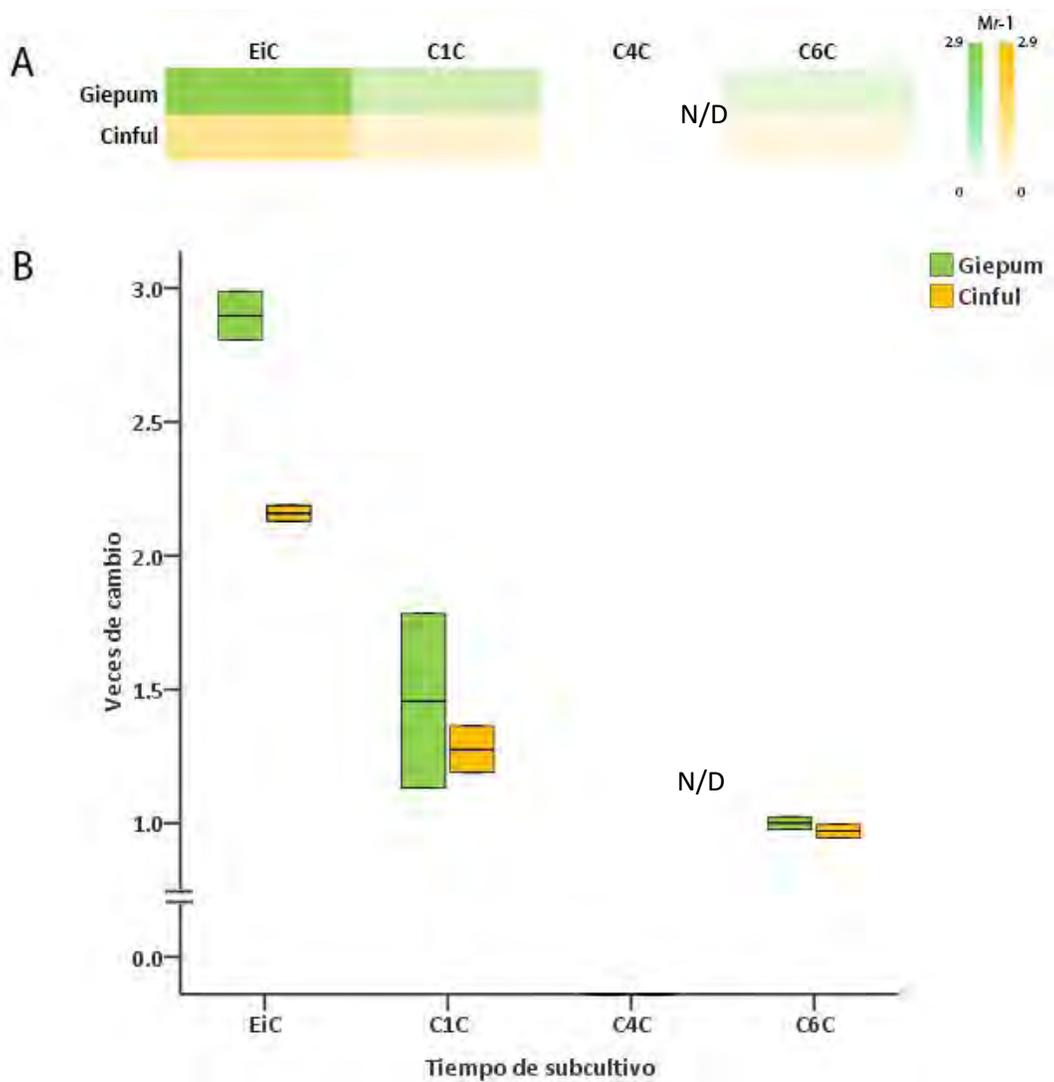


Figura 17. Perfil de represión-expresión de TEs durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño. [A] Heat map que recopila los valores de metilación de Giepum y Cinfu (Figura 13). La intensidad de cada color representa el grado de metilación de la secuencia de Giepum (verde) y Cinfu (amarillo). **[B]** Perfil de expresión que muestra la comparación relativa de las veces de cambio entre muestras respecto a C6. Los TEs muestran una paradójica disminución de la metilación de su secuencia a la vez que disminuye su expresión a lo largo de la fase de inducción. La muestra C4C tiene una anotación de no determinado (N/D) debido a que no se obtuvieron valores para esta etapa. No se realizó el análisis estadístico para este experimento debido a que no se logró tener el número de réplicas necesarias. E1: embrión inmaduro; C1, C4, C6: callos embriogénicos subcultivados durante 1, 4 y 6 meses respectivamente. C: maíz Costeño.

Por otro lado, en el lote de propagación de callos embriogénicos de maíz Costeño, la expresión de Giepum y Cinfu mostró patrones distintos a los observados para maíz Tuxpeño (Figura 18B). El retrotransposon Giepum presentó disminución en su expresión en C10C respecto a C6C y posteriormente incrementó los niveles de

transcrito en cultivos prolongados (C15C y C18C). En cambio, Cinful disminuyó su expresión en C10C manteniendo niveles menores de expresión hasta los 18 meses de subcultivo (C18C).

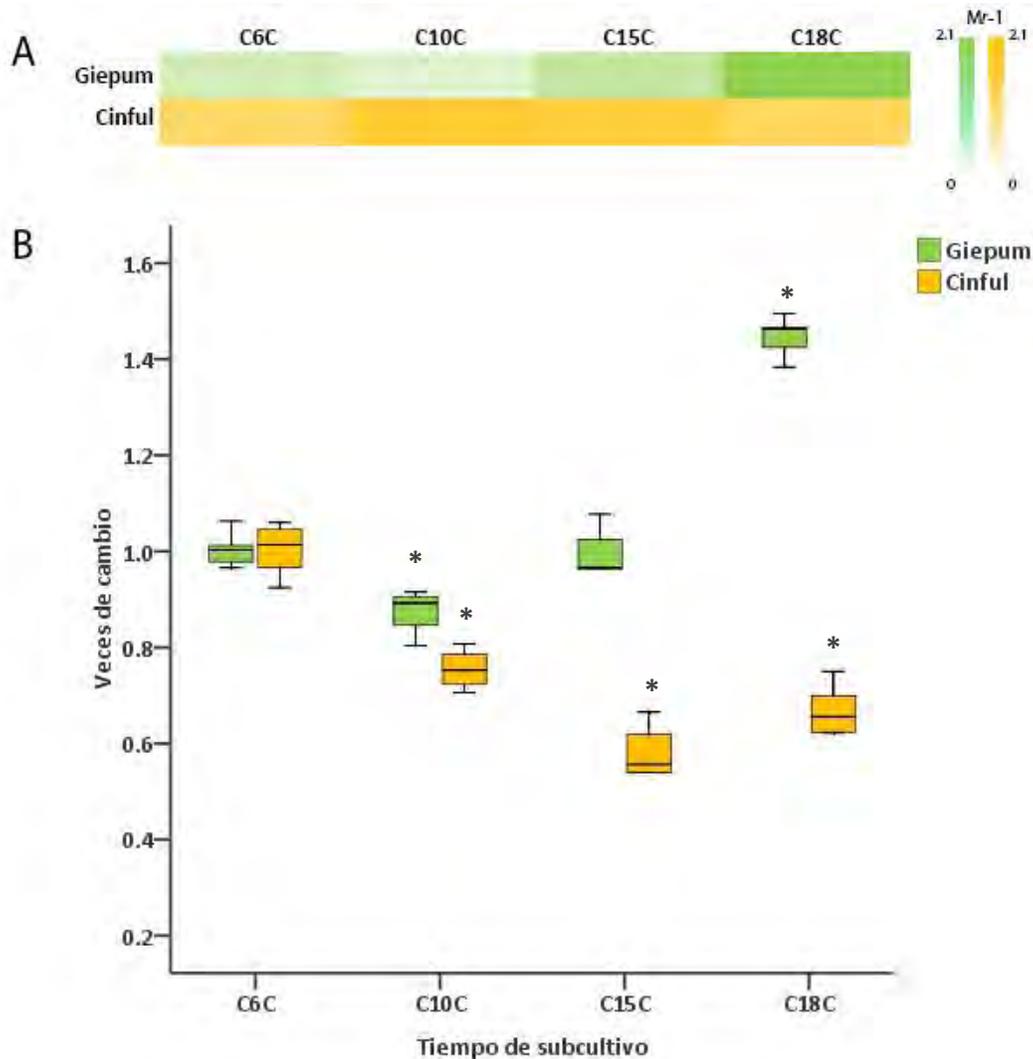


Figura 18. Perfil de represión-expresión de TEs durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño. [A] Heat map que recopila los valores de metilación de Giepum y Cinful (Figura 14). La intensidad de cada color representa el grado de metilación de la secuencia de Giepum (verde) y Cinful (amarillo). **[B]** Perfil de expresión que muestra la comparación relativa de las veces de cambio entre muestras respecto a C6. En cultivos prolongados la expresión de TEs varía dependiendo de la clase del transposon a pesar que se observen cambios significativos en la metilación de su secuencia. Para cada uno de los transposones, el asterisco representa una diferencia significativa (HSD Tukey, $p < 0.05$) del valor de la media de C6C respecto al resto de los subcultivos. C6, C10, C15, C18: callos embriogénicos subcultivados durante 6, 10, 15 y 18 meses respectivamente. E: embrión inmaduro; C1, C4, C6: callos embriogénicos subcultivados durante 1, 4 y 6 meses respectivamente. C: maíz Costeño

Los resultados no mostraron cambios significativos en la metilación del DNA en ninguna etapa de subcultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz Costeño. Este comportamiento no explica el aumento y la disminución en la expresión de Giepum y Cinfu1 respectivamente, sin embargo, la aparente ausencia de cambios en la metilación del DNA durante esta fase, podría tener un origen en la variabilidad de los datos obtenidos, reflejada en la desviación estándar (Figura 14), por lo que es necesario aumentar el número de réplicas, particularmente en este apartado, pues la heterogeneidad de la muestra puede influir en esta variabilidad. Por otra parte, debido a que la forma en que cambia la expresión de Giepum y Cinfu1 es muy discreta; cabe la posibilidad de que el maíz Costeño requiera mayor tiempo para que se dé el establecimiento del subcultivo.

6.3. Evaluación de abundancia de ra-siRNAs asociados a TEs durante distintos tiempos de subcultivo de callos embriogénicos de maíz

Uno de los objetivos propuestos fue determinar si los niveles de RNAs pequeños asociados a secuencias repetidas (ra-siRNAs) que mapean en los transposones en estudio muestran una correlación con cambios en la metilación y expresión de estas secuencias durante la embriogénesis somática de maíz. A partir de trabajos previos se contaba con datos sobre ra-siRNAs que mapean en los TEs estudiados durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño [Alejandri-Ramírez *et al*/2018]. La selección de sondas para evaluar los niveles de ra-siRNAs que mapean en TEs de la clase Copia (Ji y Giepum) y Gypsy (Cinfu1 y Huck) se basó en la existencia de cambios en su abundancia y tamaño a partir de las lecturas normalizadas en bibliotecas de RNAs pequeños obtenidas a partir de embrión inmaduro (EI), callos de 1 mes (C1), 4 meses (C4) y 10 meses (C10). A partir de este análisis se obtuvieron varios candidatos de 22 y 24 nt para cada uno de los TEs (Tablas 4 y 5).

Tabla 4. Colección de ra-siRNAs propuestos para ser empleados como sondas en retrotransposones de la clase Copia en base al cambio en número de lecturas normalizadas por millón entre distintas bibliotecas. El: embrión inmaduro; C1, C4, C10: callos embriogénicos subcultivados durante 1, 4 y 10 meses respectivamente. Las secuencias resaltadas en negrita señalan el ra-siRNA sobre el cual se diseñó sonda de prueba. 1: Zma_ji-siR2, 2: Zma_ji-siR3, 3: Zma_giepum-siR4, 4: Zma_giepum-siR5.

Familia	Longitud del ra-siRNA	Secuencia	Lecturas normalizadas por millón			
			EI	C1	C4	C10
Ji	22 nt	AAGTCAGTTATCGTCGTTTTGC	3	71	117	382
		TTGATGATCGCGAGCAGTTTTGC	8	162	158	1016
		TAGGATTTGCTTGAAAACGTGC ¹	23	248	295	5852
	24 nt	AGAATGTTGCACAGGATTGTTGGC	4	26	1	1502
		AAGGTAAATCTGTAGATCAAAAGC ²	0	39	3	1472
		AATGAAGATAGTCTAAGTGTAGCA	0	19	2	645
Giepum	22 nt	TTGCTTATGATTGACTGTGTGT ³	7	0	93	24
		TCGAGATGTCAATGATTGGTGA	6	12	41	148
		TGCAAGAACAATGATTGATGAG	8	0	27	12
	24 nt	AGATACCTGACCGGATTAGTAGGC ⁴	0	14	0	547
		ATAAGAACTCGAAGCGACGGCTAA	0	43	0	394
		AGATAAGAACTCGAAGCGACGGCT	3	52	0	340

Tabla 5. Colección de ra-siRNAs propuestos para ser empleados como sondas en retrotransposones de la clase Gypsy en base al cambio en número de lecturas normalizadas por millón entre distintas bibliotecas. El: embrión inmaduro; C1, C4, C10: callos embriogénicos subcultivados durante 1, 4 y 10 meses respectivamente. Las secuencias resaltadas en negrita señalan el ra-siRNA sobre el cual se diseñó sonda de prueba. 5: Zma_cinful-siR6, 6: Zma_cinful-siR7, 7: Zma_huck-siR8, 8: Zma_huck-siR9.

Familia	Longitud del ra-siRNA	Secuencia	Lecturas normalizadas por millón			
			EI	C1	C4	C10
Cinful	22 nt	TATGTTATGGATTGCTTTTGAG ⁵	10	8	58	98
		TTGGTCGTGGTACTCTCAATGC	4	5	23	64
		TGTTGACCTTGATATTGTTGTG	5	0	19	15
	24 nt	ATACAGATTGAAGGATATGGACGG ⁶	0	43	2	843
		AATACTATGAATTAAGAACAAGGC	0	96	1	819
		AGTGCTATGAATTAAGAACAAGGC	0	31	0	316
Huck	22 nt	AGTCACATCGGGGACTGGTTGC ⁷	6	3	15	81
		GTTCGAATGCGACGTGGAGTGC	1	2	4	28
		TTTGGTGATACCCTGAGTAGGC	3	7	4	43
	24 nt	AAAGGATACGAAATCGAACGACGC ⁸	0	21	1	340
		AGTAGACTGGCCTCTGAACGGGCA	0	17	0	195
		AGTCCTCGTCGTCGAGGCTGCGGC	3	35	0	194

Previo al análisis mostrado en las Tablas 4 y 5, se diseñaron sondas para los ra-siRNAs más abundantes en las bibliotecas de RNAs pequeños (del orden de decenas de miles de lecturas). Estas sondas fueron generadas sin tomar en cuenta el tamaño de 22/24 nt de longitud [Alejandri-Ramírez *et al* 2018] y se tomó una al azar para realizar la estandarización de la técnica de Northern blot de RNAs pequeños. A pesar de que la sonda seleccionada que detecta el sRNA de 21 nt Zma_ji-siR1 (correspondiente al retrotransposon Ji), mostró un resultado positivo con las muestras de prueba (Anexo 12); no se obtuvieron datos del ensayo de las sondas de estudio en las Tablas 4 y 5. Para descartar la posibilidad de que los RNAs pequeños de 22 y 24 nt no se detectaron por problemas técnicos en la metodología, se hibridaron las membranas con la sonda de estandarización para Zma_ji-siR1 (Figuras 19B y 20B).

La cuantificación de la acumulación del RNA pequeño Zma_ji-siR1 en cada uno de los subcultivos de callos embriogénicos Tuxpeño y Costeño se realizó mediante la densitometría de los Northern blots obtenidos para cada lote con el software Quantity One 4.6.6 (Basic). En donde la intensidad de la banda de Zma_ji-siR1 fue normalizada respecto al RNA ribosomal 5S en todos los casos.

Zma_ji-siR1 es un siRNA de 21 nt derivado la región LTR de la familia de retrotransposones Ji, y al igual que la metilación de este TE presenta comportamientos distintos para Tuxpeño y Costeño. En el fondo Tuxpeño se observaron altos niveles de Zma_ji-siR1 en el explante de partida EIT, sin embargo, el ra-siRNA disminuye fuertemente en C1T (Figuras 19B y 19C). Esta disminución abrupta durante la fase de inducción es seguida del aumento discreto de Zma_ji-siR1 en C4T, manteniéndose solo hasta que entra en lo que ya es considerado el establecimiento de la fase de propagación en 6 meses (Figuras 19B y 19C). Sorprendentemente en subcultivos posteriores dentro de la fase de propagación Zma_ji-siR1 es fluctuante, pues tiene una disminución continua hasta subcultivos de 15 meses y posteriormente su abundancia se incrementa a los 18 meses.

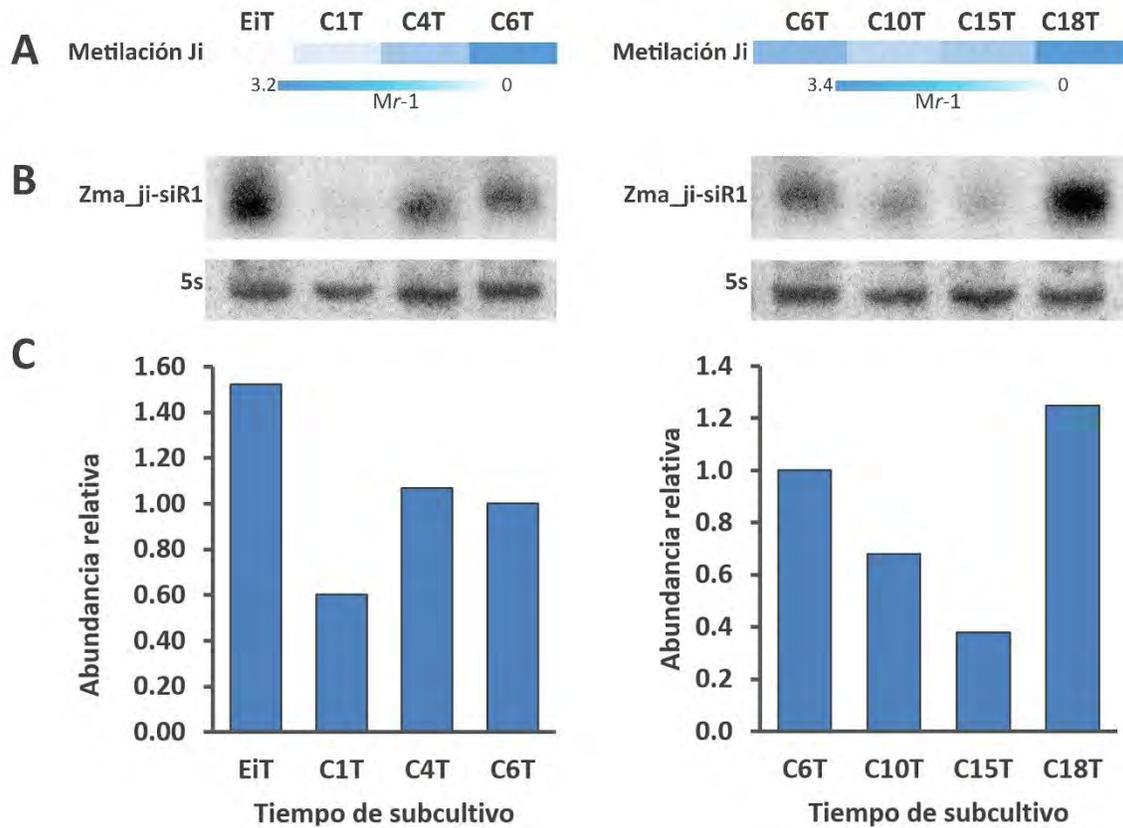


Figura 19. Comparación de los niveles de metilación del retrotransposon Ji respecto a la abundancia relativa del RNA pequeño Zma_ji-siR1 durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. [A] Heat map que recopila los valores de metilación de Ji (Figuras 11 y 12). La intensidad del color representa el grado de metilación del DNA. **[B]** Northern blot de la sonda Zma_ji-siR1 y el RNA ribosomal 5S. **[C]** Abundancia relativa de Zma_ji-siR1 normalizada respecto al RNA ribosomal 5S. Zma_ji-siR1 se encuentra fuertemente acumulado en EiT en ausencia de la metilación de Ji y disminuye al aumentar la metilación del DNA al inicio de la inducción de callos embriogénicos, aunque incrementa su abundancia en subcultivos posteriores y se mantiene fluctuante sin una correlación aparente con la metilación de la secuencia de Ji. No se realizó el análisis estadístico de la abundancia de Zma_ji-siR1 debido a que no se logró tener el número de réplicas necesarias. El: embrión inmaduro; C1, C4, C6, C10, C15, C18: callos embriogénicos subcultivados durante 1, 4, 6, 10, 15 y 18 meses respectivamente. T: maíz Tuxpeño.

Aún más sorprendente resultó que para Costeño la respuesta de acumulación de Zma_ji-siR1 fue contraria a Tuxpeño en la inducción de EIC a C1C (Figura 20). Durante la inducción la abundancia relativa de Zma_ji-siR1 en embrión inmaduro (EIC) es menor respecto a la observada en callos de 1 mes de subcultivo en donde aumenta vertiginosamente, aunque los niveles del ra-siRNA disminuyen de nuevo en C6C (Figura 20).

En subcultivos prolongados el contraste con Tuxpeño es aún más notorio, pues los niveles de Zma_ji-siR1 aumentan gradualmente en C10C y C15C respecto al subcultivos de callos embriogénicos de 6 meses. Y posteriormente disminuye la acumulación de Zma_ji-siR1 en callos de 18 meses de subcultivo (Figura 20).

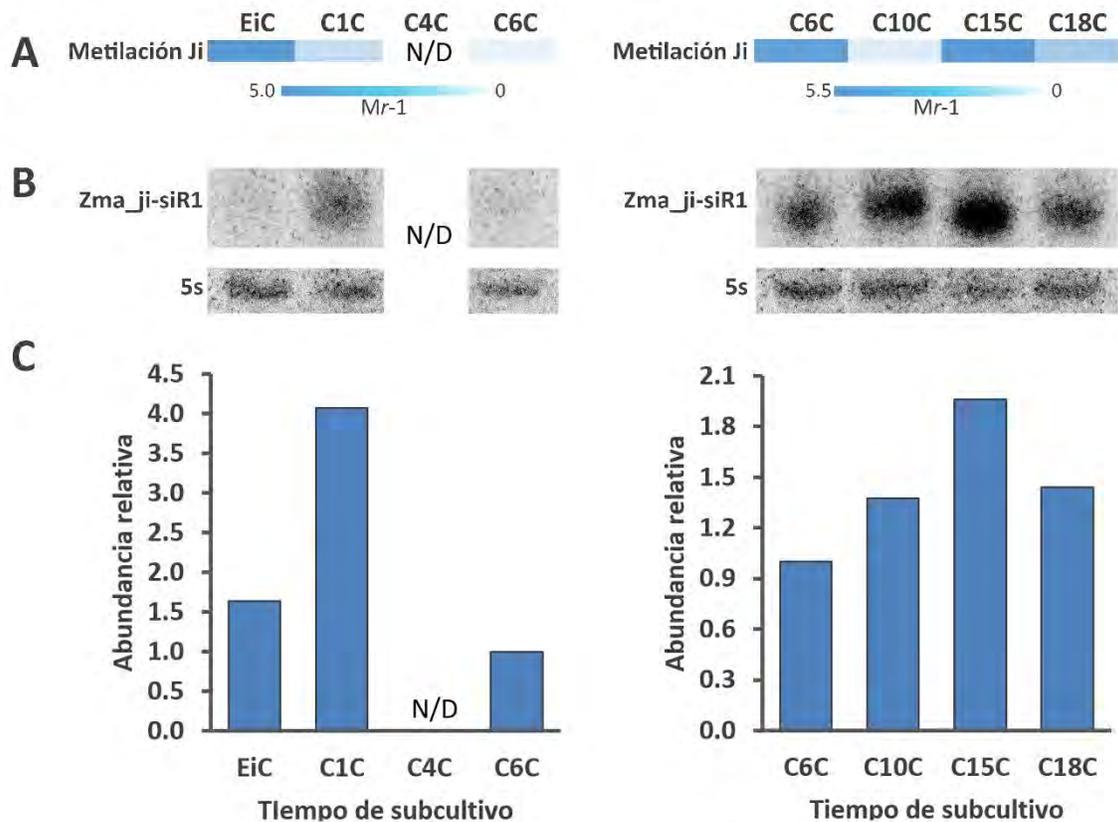


Figura 20. Comparación de los niveles de metilación del retrotransposon Ji respecto a la abundancia relativa del RNA pequeño Zma_ji-siR1 durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz Costeño. [A] Heat map que recopila los valores de metilación de Ji (Figuras 13 y 14). La intensidad del color representa el grado de metilación del DNA. **[B]** Northern blot de la sonda Zma_ji-siR1 y el RNA ribosomal 5S. **[C]** Abundancia relativa de Zma_ji-siR1 normalizada respecto al RNA ribosomal 5S. Zma_ji-siR1 se encuentra ausente en EiC a la vez que Ji muestra altos niveles de metilación, los cuales disminuyen al acumularse Zma_ji-siR1 al entrar a la inducción de callos embriogénicos de maíz. Durante la etapa de propagación, la metilación del DNA y la acumulación de Zma_ji-siR1 se muestran variantes sin conservar una relación aparente. No se realizó el análisis estadístico de la abundancia de Zma_ji-siR1 debido a que no se logró tener el número de réplicas necesarias. La nomenclatura de nuestras es igual a la Figura 19. C: maíz Costeño. La muestra C4C tiene una anotación de no determinado (N/D) debido a que no se obtuvieron valores para esta etapa.

La diferencia en la acumulación inicial de Zma_ji-siR1 en los explantes de partida (EI), tanto de maíz Costeño como Tuxpeño, podrían tener una influencia en la

abundancia del mismo ra-siRNA en los subcultivos posteriores, lo cual probablemente sea resultado de la diferencia inherente a cada lote. Por otro lado, podría existir un posible desfase del establecimiento debido a una mayor oxidación y menor tolerancia al estrés impuesto por oscuridad y altas concentraciones de auxinas en callos embriogénicos de maíz Costeño.

En el Anexo 15 se evidencia la presencia de precursores de mayor tamaño de Zma_ji-siR1. La influencia que puedan tener estos precursores y la manera en la que estén siendo regulados no fue el objetivo del presente estudio, pero es de interés debido a que la acumulación es distinta entre lotes de maíz Tuxpeño y Costeño (Anexos 15 y 16).

7. DISCUSIÓN

El uso y cruce de distintos tipos de híbridos y variedades de maíz es parte del proceso de mejoramiento realizado por agrónomos para obtener características favorables en la siembra y producción de cultivos de maíz [Gómez-Montiel *et al* 2003, 2013]. Sin embargo, el mejoramiento de la productividad no sólo se encuentra limitado al campo, pues en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de Química se han seleccionado distintas variedades e híbridos de maíz para mejorar la inducción y rendimiento en la generación de callos embriogénicos de maíz.

Durante la generación de callos embriogénicos de maíz Costeño y Tuxpeño se tienen perfectamente caracterizadas las etapas de inducción y propagación debido a las características morfológicas que adquieren tanto el híbrido como la variedad durante estas etapas. Sin embargo, a pesar de compartir las mismas etapas en común, se desconoce si los mecanismos fisiológicos y moleculares por los que se someten los cultivos difieren entre Costeño y Tuxpeño. Diferencias observadas en los transcriptomas, epigenomas y acumulación de RNAs pequeños entre variedades e híbridos en *Arabidopsis thaliana*, arroz y maíz [He *et al* 2010; Groszmann *et al* 2011; Waters *et al* 2011; Chodavarapu *et al* 2012; Greaves *et al*

2012; Shen *et al* 2012], sugieren que VS-353 y H-565 podrían pasar por estas diferencias moleculares.

Una de las diferencias moleculares más notables fue la acumulación de RNAs pequeños. En plantas los siRNAs de 21 y 22 nt participan en el silenciamiento génico postranscripcional (PTGS) mientras que los siRNAs de 24 nt participan en el silenciamiento génico transcripcional (TGS) mediante la vía Pol IV-RdDM teniendo como blanco TEs y otras secuencias repetidas [Slotkin y Martienssen 2007]. Aunque de manera canónica se esperaba una acumulación preferencial de siRNAs de 24 nt, la ausencia de estas especies y la detección de siRNAs de 21 nt podrían explicarse analizando vías alternas de metilación del DNA. Estudios recientes han propuesto una vía de metilación del DNA dirigida por RNA que actúa independientemente de la maquinaria de Pol IV-RdDM. En *Arabidopsis thaliana* esta vía parece actuar sólo para ciertos transposones e incluye siRNAs de 21 a 22 nt dependientes de RDR6 y DCL2 para guiar la metilación y mantener el silenciamiento del retrotransposon *AtCopia18A* [Pontier *et al* 2012]. Además, esta vía de metilación del DNA dependiente de RDR6 es capaz de funcionar en la ausencia de Pol IV, sugiriendo que opera en siRNAs derivados de transcritos de Pol II [Nuthikattu *et al* 2013].

En los gametofitos de plantas los TEs se desmetilan mediante la regulación a la baja del remodelador de la cromatina DDM1 [Castel y Martienssen 2013], permitiendo la activación y transcripción de TEs cuyas secuencias presentan niveles bajos de metilación en los contextos CG y CHG [Lu *et al* 2015]. Este proceso es revertido de manera normal después de la fertilización cuando se culmina la formación del embrión maduro [Heard y Martienssen 2014]. Tomando en cuenta los resultados de los retrotransposones Ji, Giepum y Ciful, creemos que la etapa de embrión inmaduro en maíz Tuxpeño provee de retrotransposones desmetilados y transcripcionalmente activos que son capaces de producir siRNAs de 21 nt mediante la vía de metilación RDR6-RdDM (Figura 21A). La ausencia de siRNAs de 24 nt podría deberse a la abundante presencia de mRNA que favorece la acción de

RDR6-RdDM, desplazando la maquinaria de Pol IV-RdDM o que ésta se encuentre actuando de manera tardía en las etapas más avanzadas del embrión.

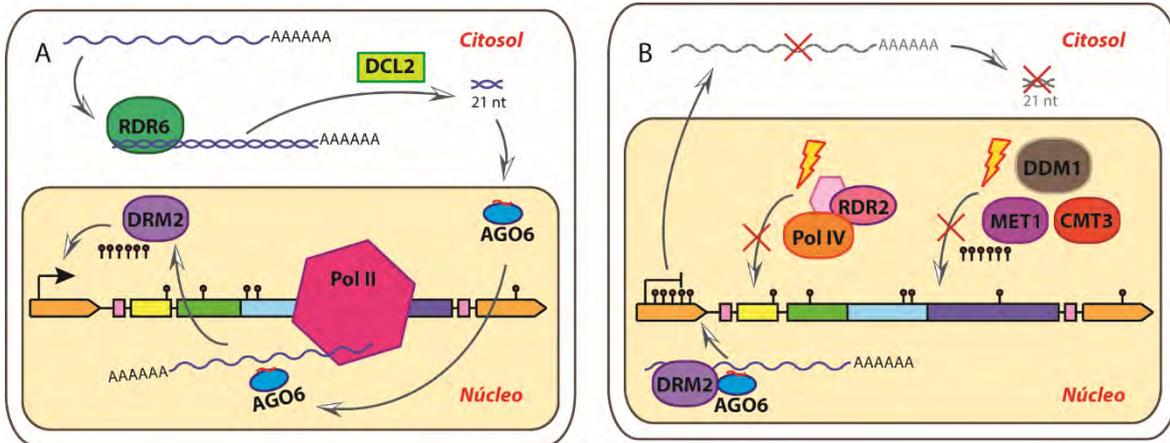


Figura 21. Esquema propuesto de las vías de metilación que intervienen en la transcripción de los retrotransposones Ji, Giepum y Cinful durante el proceso de inducción de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. A. En embrión inmaduro vía RDR6-RdDM utiliza el mRNA del retrotransposon como templado para sintetizar la cadena complementaria de RNA, esta cadena es procesada por DCL2 cortando la doble cadena para formar dúplex de 21 nt de longitud. El siRNA de 21 nt complementario al mRNA es cargado en AGO6 que en conjunto con el mRNA de reciente creación recluta la DRM2 que cataliza la metilación *de novo* en la región de la cual fue generado, dando seguimiento al proceso normal de maduración del embrión; **B.** Los siRNAs de 21 nt (rezagados) provenientes de la maduración del embrión dan inicio a la metilación de la región LTR que contiene al promotor del transposon, disminuyendo su transcripción y por consiguiente la acumulación de siRNAs de 21 nt al inicio de la inducción. El choque hormonal podría afectar el funcionamiento de la vía Pol IV-RdDM, así como la maquinaria de mantenimiento de la metilación (DDM1, Met1, CMT3) dando como resultado la disminución de la metilación del cuerpo del retrotransposon. DRM2. RDR6, RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 6; DCL2, DICER-LIKE 2; AGO6, ARGONAUTE 6; Pol II, RNA polimerasa II; DRM2, DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2; Pol IV, RNA polimerasa IV; RDR2, RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2; CMT3, CHROMOMETHYLASE 3; DDM1, DECREASE IN DNA METHYLATION 1; MET1, DNA METHYLTRANSFERASE 1.

Una vez que da comienzo la inducción de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño, la metilación de retrotransposones disminuye en C1T debido al estrés hormonal [Grandbastien *et al* 2005; Beguiristain *et al* 2001; Cavrak *et al* 2014], no obstante, de manera contraria a lo esperado también se registra la disminución tanto de la transcripción de retrotransposones como de la abundancia de siRNAs de 21nt. La disminución de la transcripción podría deberse a que una vez que se ha puesto en marcha la etapa de inducción, la maquinaria de RDR6-RdDM ya se encontraba

previamente activa en el embrión inmaduro dejando una cantidad considerable de siRNAs de 21 nt “rezagados”, que son encargados de guiar la metilación y disminuir la transcripción de la región de la cual fueron originados (Figura 21B).

Este razonamiento implica la existencia de dos regiones dentro del mismo retrotransposon que son diferencialmente susceptibles a la metilación. Creemos que la región que pudimos analizar y que comprende el cuerpo del retrotransposon excluyendo las secuencias LTR (ver Diseño experimental), es propensa a la desmetilación por la acción del estrés hormonal; mientras que el extremo 5'-LTR se trata de una región susceptible a ser metilada y es responsable de la disminución de la transcripción. Lo cual es congruente con el hecho que el siRNA de 21 nt Zma_ji-siR1 sea originada a partir del extremo 5'-LTR.

Una vez superado el choque de estrés hormonal en C1T, el efecto inhibitorio de los siRNAs “rezagados” comienza a diluirse con la división celular o se ve afectado por la acción de glicosilasas y liasas como DME1, ROS1 o DML2/3. Por lo que la región 5'-LTR comienza a perder metilación aumentando ligeramente nivel de transcripción de los retrotransposones de la clase Copia (Figura 22A). Este proceso es suficiente para aumentar los niveles de siRNAs de 21 nt que no solo terminan en la metilación de 5'-LTR disminuyendo la transcripción en C6T, sino que también permiten la metilación del cuerpo del retrotransposon probablemente mediante la acción de la vía Pol IV-RdDM y el subsecuente reclutamiento de proteínas de mantenimiento de la metilación como DDM1, MET1 y CMT3 (Figura 22A). Extendiendo la metilación hacia el cuerpo del retrotransposon una vez que el tejido se ajusta a las condiciones de cultivo *in vitro* [Panda *et al* 2016].

Así mismo se ha observado que estudios previos del laboratorio, la acumulación de la mayoría de siRNAs de 24 nt derivados de los retrotransposones de las clases Copia y Gypsy no presentan cambios importantes de manera inmediata entre el explante de partida (EI) y los callos embriogénicos recién inducidos [Alejandri-Ramírez *et al* 2018], etapas en las que no observamos una metilación importante en el cuerpo de los retrotransposos. Pero durante el establecimiento del estado

proliferativo (C4) se observa una marcada reducción de las lecturas de 24 nt y un aumento en las de 22 nt [Alejandri-Ramírez *et al* 2018] donde justamente aumenta el estado de metilación del cuerpo de los retrotransposones. Lo cual sugiere que cada una de las vías de RdDM planteadas tienen una preferencia específica para cada región del retrotransposon y que tal vez podría estar determinada por el tipo de contexto en que se da la metilación.

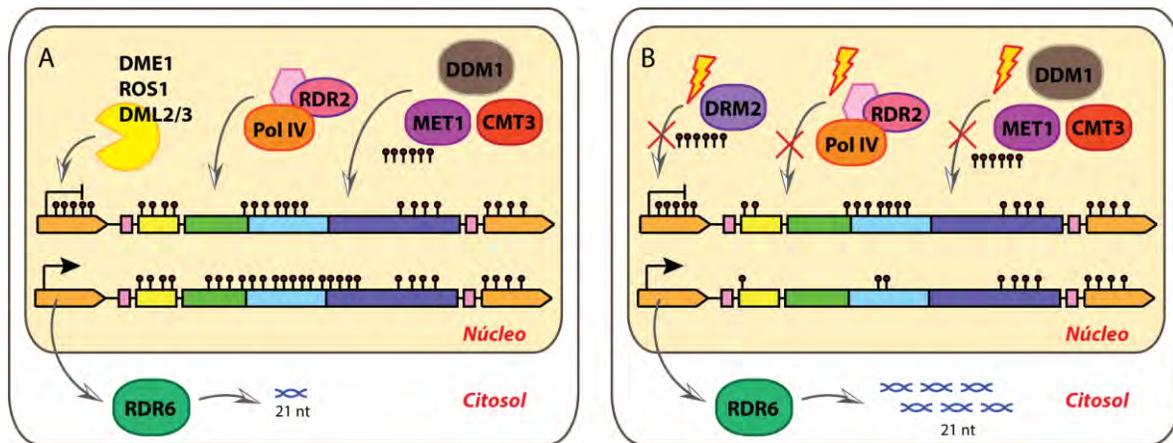


Figura 22. Esquema propuesto de las vías de metilación que intervienen en la transcripción de los retrotransposones Ji y Giepum durante cultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. **A.** En cultivos subsiguientes a C6T la metilación tiende a diluirse con la división celular o por la acción de DME1, ROS1 y/o DML2/3. Fugándose transcritos del retrotransposon que dan origen a siRNAs de 21 nt que promueven la metilación mediante la vía Pol IV-RdDM, así como toda la maquinaria de mantenimiento; **B.** En cultivos prolongados el estrés hormonal a largo plazo genera fluctuaciones en la metilación general del retrotransposon debido al funcionamiento inadecuado de la maquinaria de las vías Pol IV-RdDM y RDR6-RdDM, resultando en el incremento gradual de siRNAs de 21 nt debido a la fuga de transcripción por una mala metilación, logrando una acumulación importante sólo hasta que el transcrito alcanza niveles muy elevados. RDR6, RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 6; DCL2, DICER-LIKE 2; AGO6, ARGONAUTE 6; Pol II, RNA polimerasa II; DRM2, DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 2; Pol IV, RNA polimerasa IV; RDR2, RNA-DEPENDENT RNA POLYMERASE 2; CMT3, CHROMOMETHYLASE 3; DDM1, DECREASE IN DNA METHYLATION 1; MET1, DNA METHYLTRANSFERASE 1; DME1, DEMETER 1; ROS1, REPRESSOR OF SILENCING 1; DML2/3, DEMETER-LIKE 2/3.

En los cultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño el comportamiento de los retrotransposones de la clase Copia y Gypsy varía entre ellos a diferencia de lo observado en la etapa de inducción. La clase Copia muestra fluctuaciones en la metilación del cuerpo del retrotransposon probablemente como resultado del estrés hormonal sostenido a largo plazo, lo cual interfiere con el

mantenimiento de la metilación del DNA mediado por DDM1, MET1 y/o CMT3. Así mismo también interfiere con la metilación en 5'-LTR dando lugar al incremento gradual de la expresión de retrotransposones Copia, que a pesar de ser capaces de dar pie a la biogénesis de siRNAs de 21 nt no logran tener una acumulación importante debido a la interferencia hormonal que probablemente a este punto también comienza a afectar la adecuada función de RDR6 o DCL2. Es sólo hasta que se presentan niveles elevados de mRNA que se puede observar una acumulación importante de siRNAs de 21 nt (Figura 22B).

Dentro esta misma etapa los retrotransposones de la clase Gypsy se comportan de una manera menos variable. Pues presentan una baja o nula tasa de transcripción que no cambia a lo largo de los subcultivos prolongados, probablemente se deba una alta metilación de la región 5'-LTR, ya que la metilación en el cuerpo de Cinfu es baja y tampoco cambia en el transcurso del tiempo. Esta estabilidad podría tener un origen en la localización de este tipo de retroelementos, debido a que los TEs de la clase Gypsy se presentan con mayor frecuencia en regiones heterocromáticas pobres en genes [Schnable *et al* 2009], una región sumamente compacta en donde su ubicación no es favorecida para la actividad de la RNA pol II. La vía que mejor se ajusta para el control de este tipo de elementos es Pol IV-RdDM, pues datos de secuenciación masiva muestran la acumulación de siRNAs de 24 nt derivados de la secuencia de Huck en subcultivos prolongados [Alejandri-Ramírez *et al* 2018; Barber *et al* 2012].

Por otro lado, en maíz Costeño los embriones inmaduros presentan una elevada metilación en el cuerpo de la mayoría de los retrotransposones analizados, difiriendo por mucho de lo observado en maíz Tuxpeño. Esta diferencia podría deberse en parte a la influencia del tipo de fondo genético o epigenético en estas variedades de maíz, es decir, al emplear un híbrido (Costeño) o una variedad mejorada (Tuxpeño) el estado epigenético en el que se encuentra el genoma podría estar determinando la respuesta de la hormona en el proceso de inducción de callos embriogénicos de maíz, siendo una posible causa por la que en ocasiones se obtienen lotes con baja proliferación o una pobre respuesta embriogénica en explantes de maíz Costeño.

Este tipo de variaciones también han sido descritas en arroz, donde el estado de la metilación del DNA en regiones relacionadas a TEs no solo cambia entre variedades endogámicas sino también entre híbridos y sus variedades progenitoras; variando no solo en el grado de metilación, sino también el tipo de contexto en el cual se lleva a cabo la metilación del DNA. Pues la variedad de arroz japónica presenta una mayor metilación del DNA en contextos CG y CHG, mientras que la variedad de arroz índica presenta mayor metilación en contexto CHH [He *et al* 2011; Chodavarapu *et al* 2012]. Costeño al ser un híbrido obtenido de tres líneas endogámicas de Tuxpeño, podría estar generando la diferencia en el estado de metilación en los embriones inmaduros de maíz Tuxpeño y Costeño.

En la línea endogámica B73, los embriones de maíz presentan un alto grado de metilación en secuencias de TEs [Wang *et al* 2015]. Lo cual es consistente con nuestros resultados en maíz Costeño, que al tener ascendencia endogámica es de esperarse que se comporte de una manera similar. Además, entre los TEs que presentan una mayor metilación en embriones de B73, se encuentran los retrotransposones de la clase Copia y en menor medida los retrotransposones de la clase Gypsy [Wang *et al* 2015].

La endogamia podría estar induciendo un desfase de tiempo en el proceso de maduración de los embriones de maíz Costeño, resultando en la metilación prematura del cuerpo de los retrotransposones. Sin embargo, consideramos que los retrotransposones también son regulados mediante la metilación del extremo 5'-LTR, pues la metilación del cuerpo del retrotransposon tampoco parece afectar su expresión en embrión inmaduro, mientras que el estrés hormonal durante la fase de inducción disminuye la metilación en el cuerpo de los retrotransposones induciendo el incremento de siRNAs de 21 nt al igual que en cultivos de suspensiones celulares de *Arabidopsis thaliana*, en donde la desmetilación y activación transcripcional de *AtCopia* y *Athila* (retrotransposones pertenecientes a las clases Copia y Gypsy respectivamente) muestran una preferencia por la acumulación de siRNAs de 21 nt generados a partir de estos TEs [Tanurdzic *et al* 2008]. El aumento de siRNAs de 21 nt en C1C podría tener un origen en los transcritos de los retrotransposones

provenientes del embrión mediante la vía RDR6-RdDM induciendo la metilación gradual del extremo 5'-LTR y disminuyendo la transcripción hasta C6C.

Durante la proliferación de callos embriogénicos de maíz Costeño, la metilación fluctúa, a pesar de que los niveles de Zma_{ji}-siR1 son elevados. Es posible que en este fondo genético la exposición prolongada a 2,4-D afecte otros mecanismos de mantenimiento de la metilación del DNA. En cultivos celulares de *Arabidopsis thaliana*, las metiltransferasas de DNA (entre otros componentes epigenéticos) se encuentran reguladas a la alta en cultivos celulares a pesar de los cambios en la metilación del DNA, indicando una pérdida de la direccionalidad en la vía de silenciamiento, más que el efecto *per se* debido a la activación de TEs. En este contexto, se ha propuesto que el aumento de siRNAs de 21 nt y su asociación con los miembros de la familia de genes de AGO2 puede estar asociada con la pérdida de la direccionalidad [Tanurdzic 2008].

Cabe mencionar que de forma general la expresión de Giepum fue mayor a la registrada por Cinful en todos los perfiles de expresión. Este comportamiento podría deberse a que en maíz las familias de retrotransposones LTR poseen una distribución familia-específica no uniforme a lo largo de los cromosomas. Los elementos tipo Copia (Giepum) están presentes en mayor proporción en regiones eucromáticas ricas en genes, mientras que los elementos tipo Gypsy (Cinful) se presentan en regiones heterocromáticas pobres en genes [Baucom *et al* 2009; Schnable *et al* 2009]. Esto refuerza la idea que el efecto inhibitorio de la metilación de TEs depende de la región en donde se esté llevando a cabo, pues Giepum al encontrarse en una región con mayor actividad transcripcional es susceptible a encontrarse activo a pesar de presentar metilación en el cuerpo del gen, pues solo la metilación alrededor de TSS parece ser relevante, mientras que la metilación en regiones intrónicas, muchas veces representadas por TEs, no afecta la transcripción [Li *et al* 2015; Niederhuth *et al* 2016].

Este enfoque explicaría el aumento constante de la transcripción de Giepum durante fase de propagación tanto para maíz Tuxpeño como Costeño, debido a que en

cultivos celulares de arroz se ha reportado la actividad transcripcional de Tos17 (retrotransposon de la clase Copia) e inclusive incrementa su número de copias en cultivos celulares prolongados [Hirochika 1997]. De igual manera también se observó un comportamiento similar en el perfil de expresión semi-cuantitativo del retrotransposon Ji (clase Copia), en donde se aprecia un aumento en su expresión a lo largo subcultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz Costeño (ver Anexo 11), apoyando la idea de que la actividad transcripcional de los TEs depende de la clase del retrotransposon y que a su vez es derivado de su localización en el genoma.

8. CONCLUSIONES

Los niveles de metilación de TEs difieren para embriones inmaduros de distintos fondos genéticos de maíz, así como en su tendencia de cambios durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos.

Durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz los principales cambios en la metilación del DNA se dan en secuencias de TEs de la clase Copia, principalmente en los elementos pertenecientes a la familia Ji; mientras que los elementos de la clase Gypsy no presentan cambios aparentes. En cultivos de maíz Tuxpeño la metilación aumenta gradualmente al entrar en la fase de inducción, por el contrario, la metilación en maíz Costeño disminuye drásticamente durante esta misma etapa a lo cual podría estar asociado la influencia del carácter híbrido de este tipo de fondo genético.

Los TEs de las familias Ji y Giepum (clase COPIA) presentan incrementos en los niveles de metilación durante la inducción y establecimiento de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño VS-535 que posteriormente se mantienen con algunas fluctuaciones en los subcultivos prolongados hasta 18 meses.

Los TEs de las familias Ciful y Huck (clase GYPSY) presentan niveles bajos de metilación durante la inducción y subcultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño VS-535.

En embriones inmaduros y durante la fase de inducción de callos embriogénicos de maíz, el siRNA de 21 nt Zma_ji-siR1 derivado del retrotransposon Ji, muestra una acumulación contrastante con respecto a la metilación de su secuencia, sugiriendo que esta especie de siRNAs actúa cuando los niveles de metilación en TEs son bajos para contribuir a su incremento.

En cultivos prolongados de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño el siRNA de 21 nt Zma_ji-siR1 derivado del retrotransposon Ji disminuye y los niveles de metilación

de DNA observados son altos, lo que sugiere la acción de otras especies de siRNAs en estas etapas de subcultivo.

La transcripción de retrotransposones de las familias Giepum y Ciful conservan la misma tendencia entre genotipos, durante la fase de inducción de callos embriogénicos de maíz, disminuyendo su expresión de manera independiente al estado de metilación del DNA.

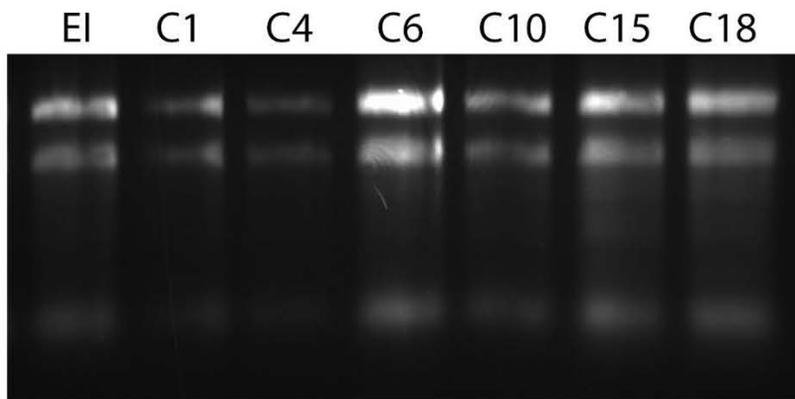
En cultivos prolongados, la transcripción de Giepum aumenta conforme se incrementa el número de subcultivos, mientras que Ciful no varía su expresión. En ambos casos, no se observa correlación entre la expresión del TE y sus niveles de metilación, sugiriendo cierta relevancia de la abundancia del TE y su ubicación en el genoma de maíz para la regulación de su expresión.

9. PERSPECTIVAS

- Identificar nuevos candidatos de siRNAs de 24 nt que tengan un comportamiento similar al observando en cultivos celulares previamente estudiados durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño.
- Verificar la presencia y el correcto funcionamiento de los componentes conocidos de la vía Pol IV-RdDM por medio de inmunoprecipitaciones y/o ensayos de western blot durante el subcultivo de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño.
- Determinar si también existe una acumulación diferencial de siRNAs de 21 nt derivados de los retrotransposones Ciful, Giepum y Huck durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño.
- Discernir el tipo de contexto en el cual se lleva a cabo la metilación del DNA mediante conversión por bisulfito de sodio para determinar el tipo de vía que se está llevando a cabo preferencialmente en la fase de inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño.

10. ANEXOS

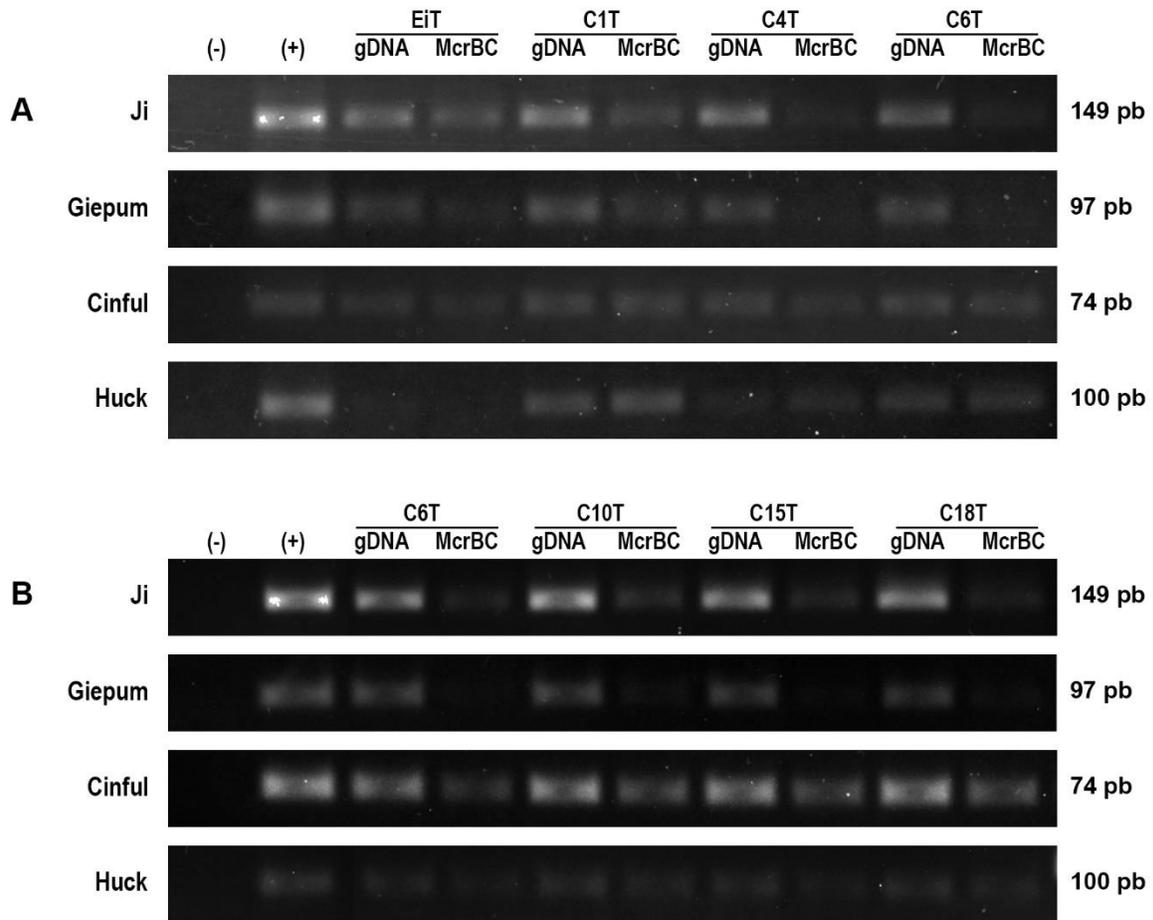
Anexo 1. Integridad de RNAs. Muestras de RNA extraído de las etapas de inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño.



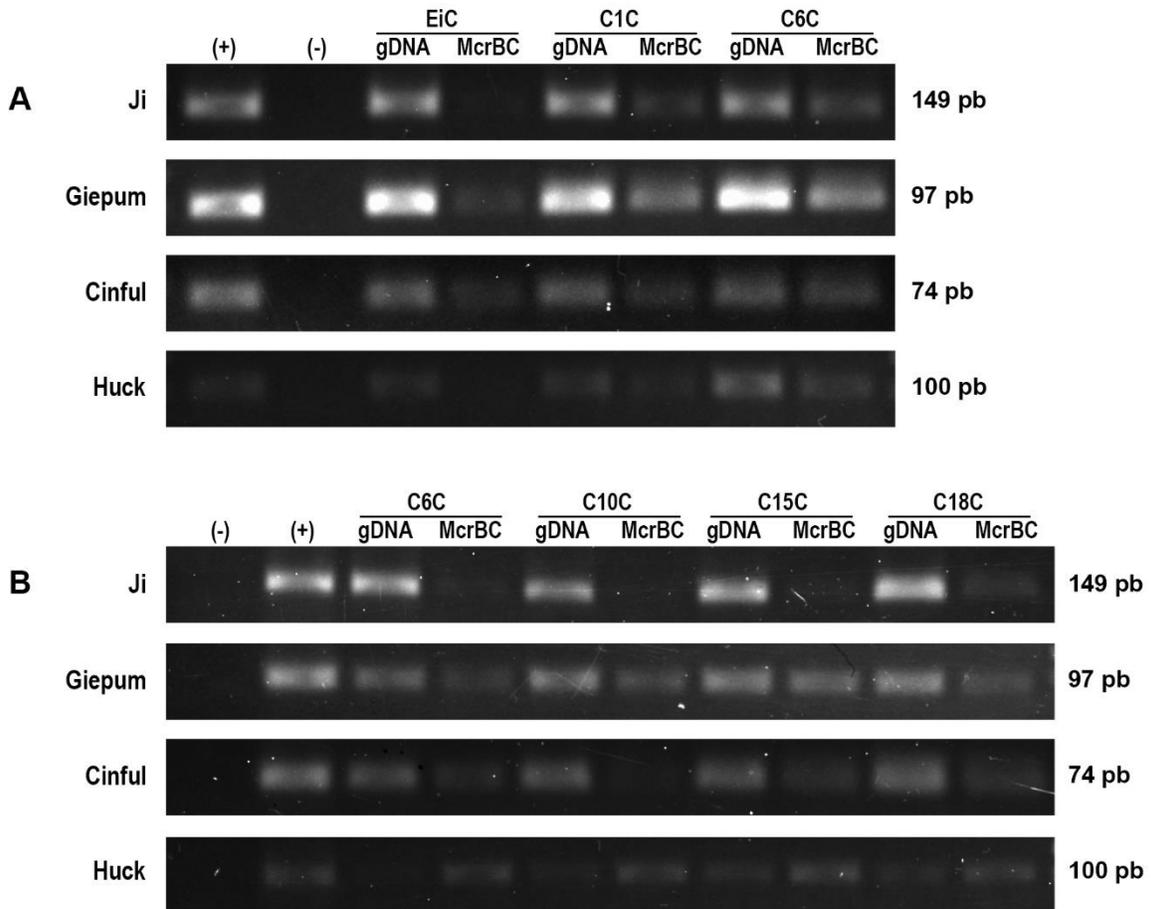
Anexo 2. Integridad de DNAs. Muestras de DNA extraído de las etapas de inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño.



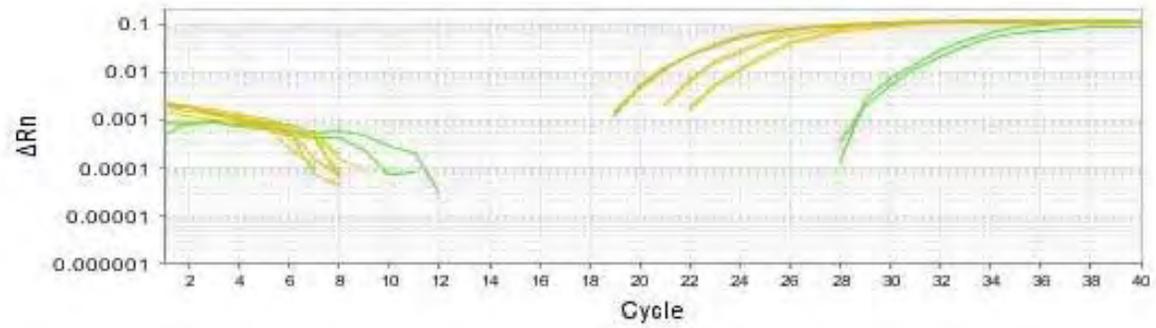
Anexo 3. Ensayo de McrBC-PCR de los retrotransposones de estudio durante la induccion y propagacion de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. Los fragmentos de PCR fueron generados partiendo de oligos específicos para Ji, Giepum, Ciful y Huck; así como de DNA integro (gDNA) y DNA digerido con la endonucleasa McrBC (McrBC) para cada una de las etapas de subcultivo. El panel A muestra la fase de induccion: EIT, C1T, C4T y C6T, mientras que el panel B muestra la fase de propagacion: C6T, C10T, C15T y C18T.



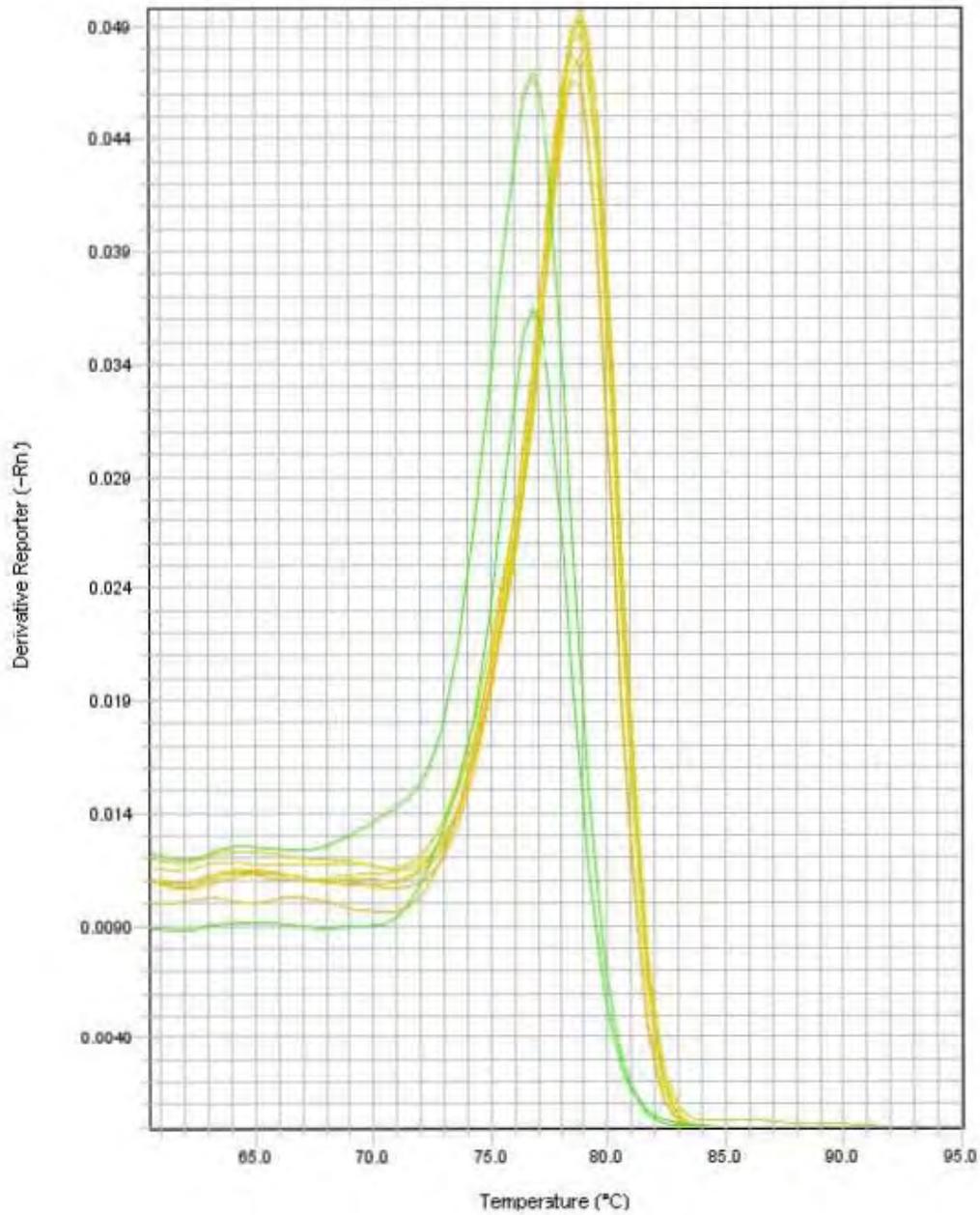
Anexo 4. Ensayo de McrBC-PCR de los retrotransposones de estudio durante la induccion y propagacion de callos embriogénicos de maíz Costeño. Los fragmentos de PCR fueron generados partiendo de oligos específicos para Ji, Giepum, Ciful y Huck; así como de DNA integro (gDNA) y DNA digerido con la endonucleasa McrBC (McrBC) para cada una de las etapas de subcultivo. El panel A muestra la fase de induccion: EIC, C1C, y C6C, mientras que el panel B muestra la fase de propagacion: C6C, C10C, C15C y C18C.



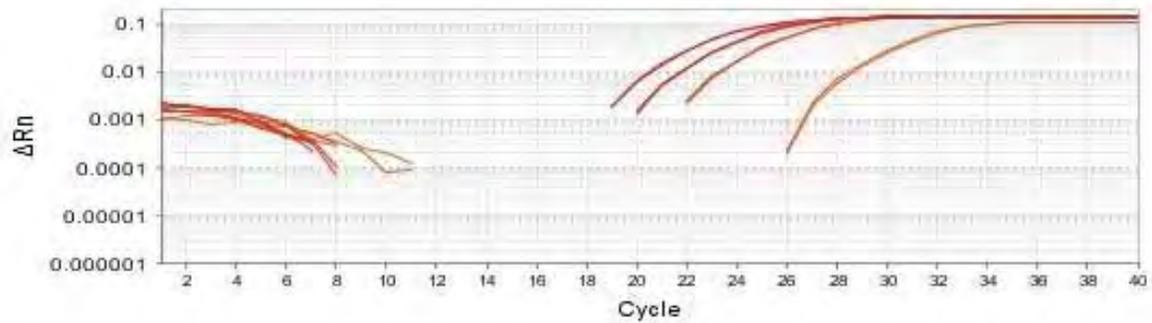
Anexo 5. Curva de amplificación de Cinful por PCR en tiempo real durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño. Las curvas en color amarillo corresponden a las etapas de EIC, C1C y C6C, mientras que las curvas en color verde representan a los NTC.



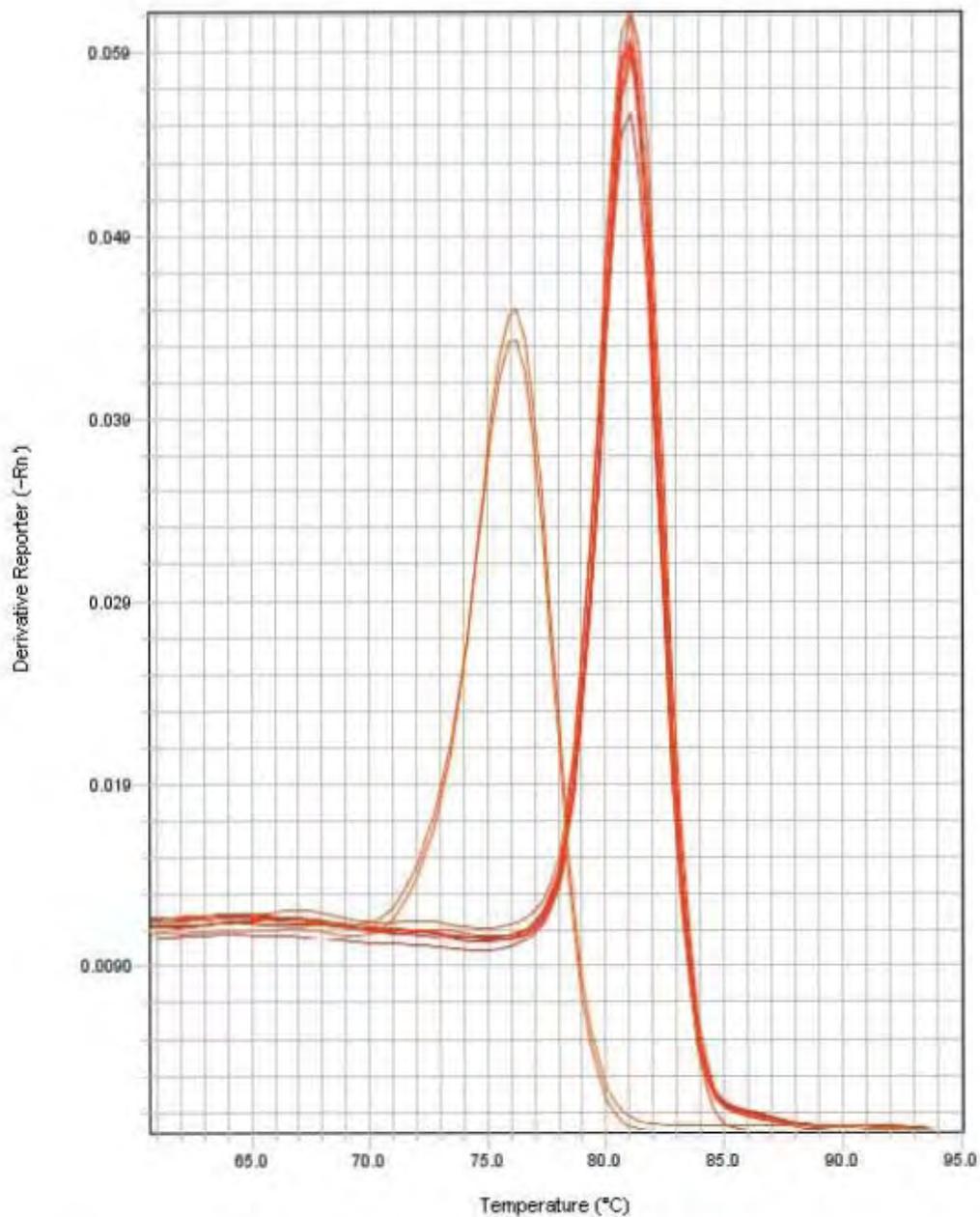
Anexo 6. Curva de disociación de Cinful por PCR en tiempo real durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño. Las curvas en color amarillo corresponden a las etapas de EIC, C1C y C6C, mientras que las curvas en color verde representan a los NTC.



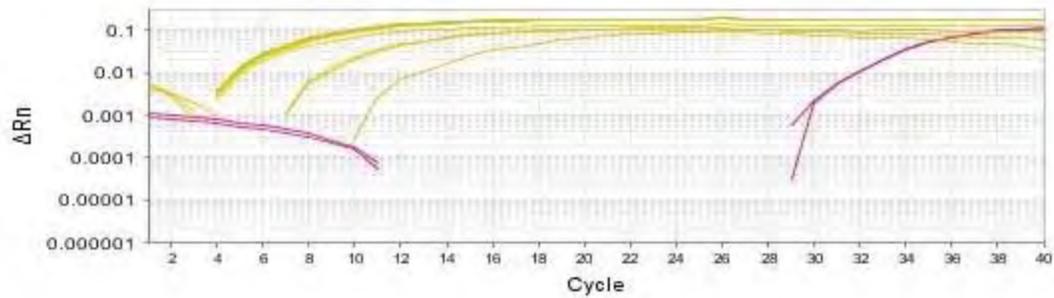
Anexo 7. Curva de amplificación de Giepum por PCR en tiempo real durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño. Las curvas en color rojo corresponden a las etapas de EIC, C1C y C6C, mientras que las curvas en color naranja representan a los NTC.



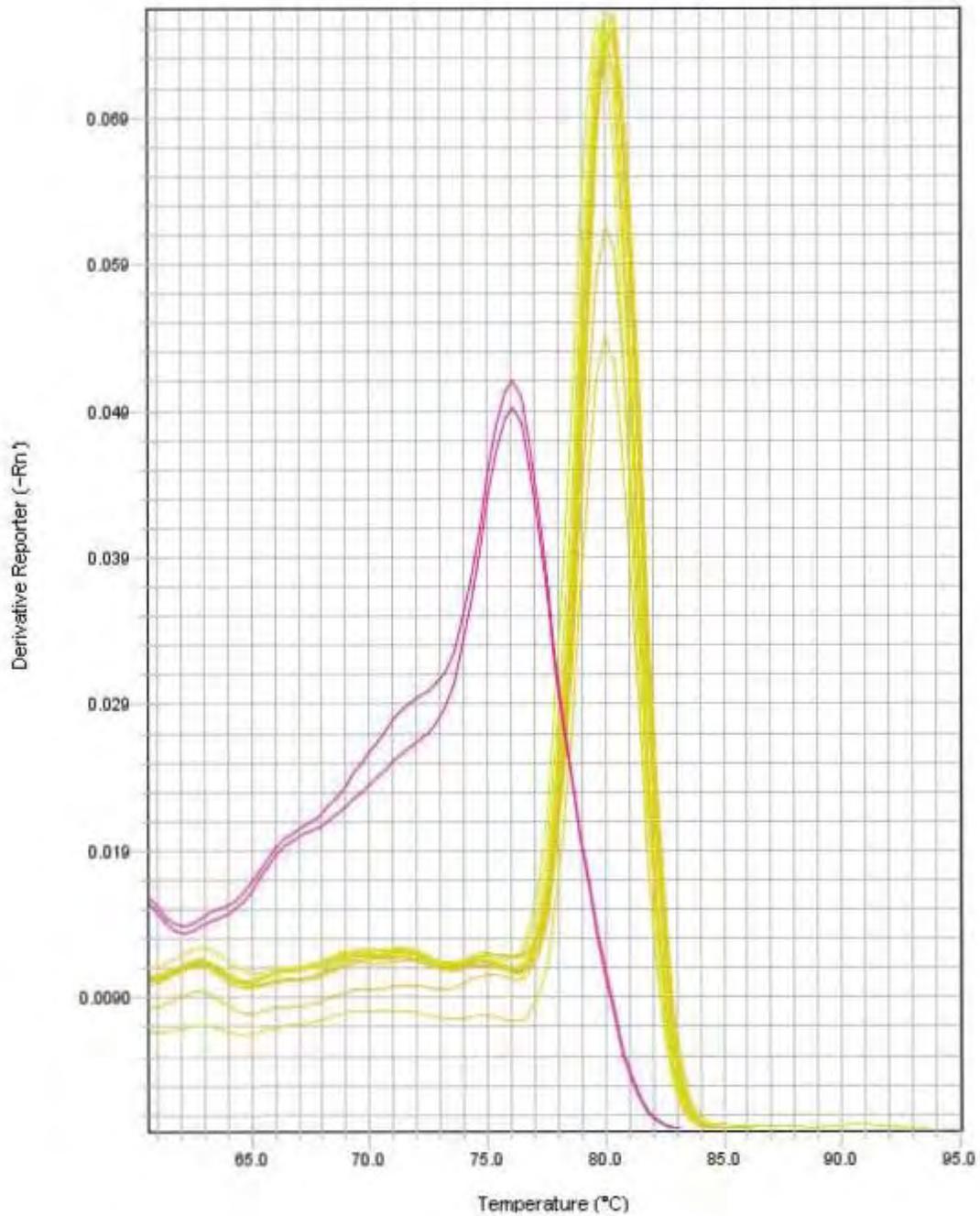
Anexo 8. Curva de disociación de Giepum por PCR en tiempo real durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño. Las curvas en color rojo corresponden a las etapas de EIC, C1C y C6C, mientras que las curvas en color naranja representan a los NTC.



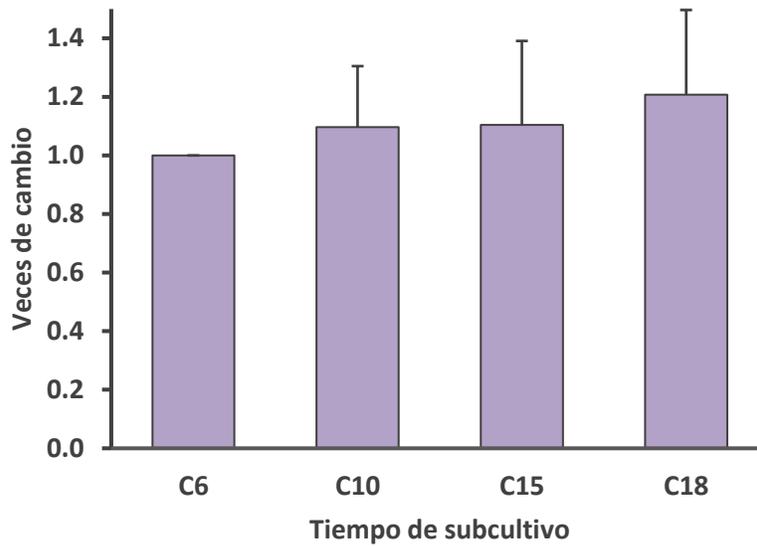
Anexo 9. Curva de amplificación de 18S por PCR en tiempo real durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño. Las curvas en color amarillo corresponden a las etapas de EIC, C1C y C6C, mientras que las curvas en color rosado representan a los NTC.



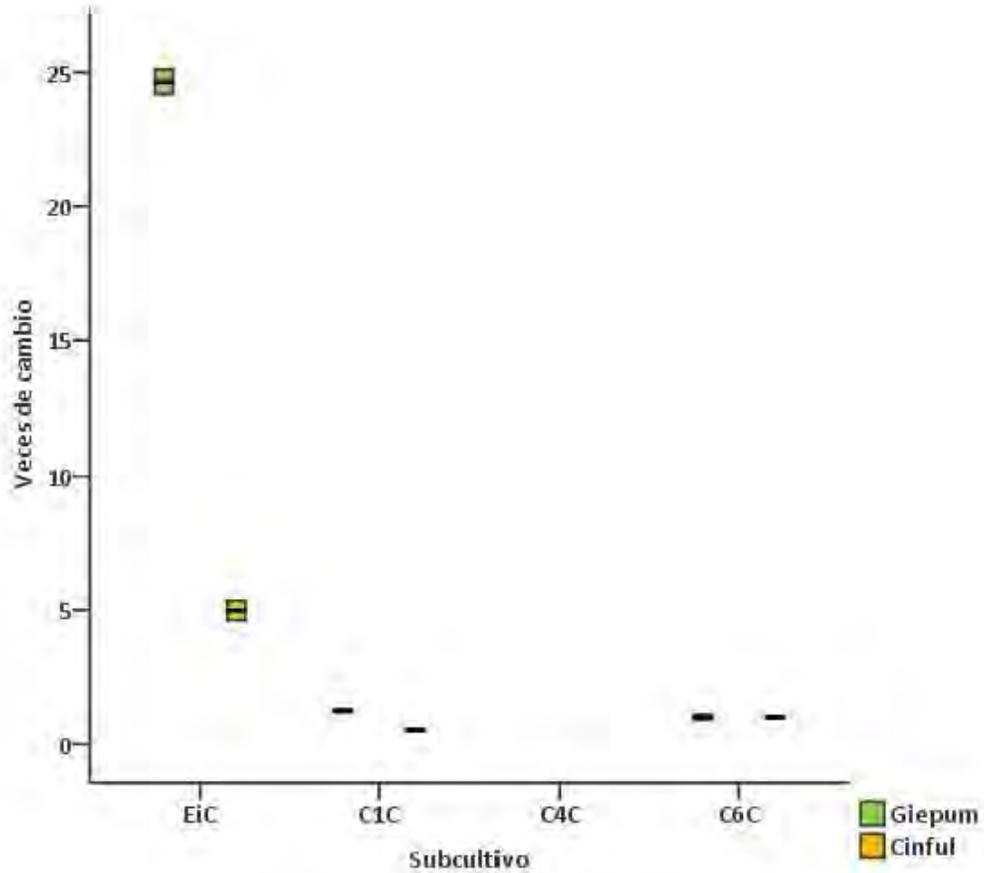
Anexo 10. Curva de disociación de 18S por PCR en tiempo real durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño. Las curvas en color amarillo corresponden a las etapas de EIC, C1C y C6C, mientras que las curvas en color rosado representan a los NTC.



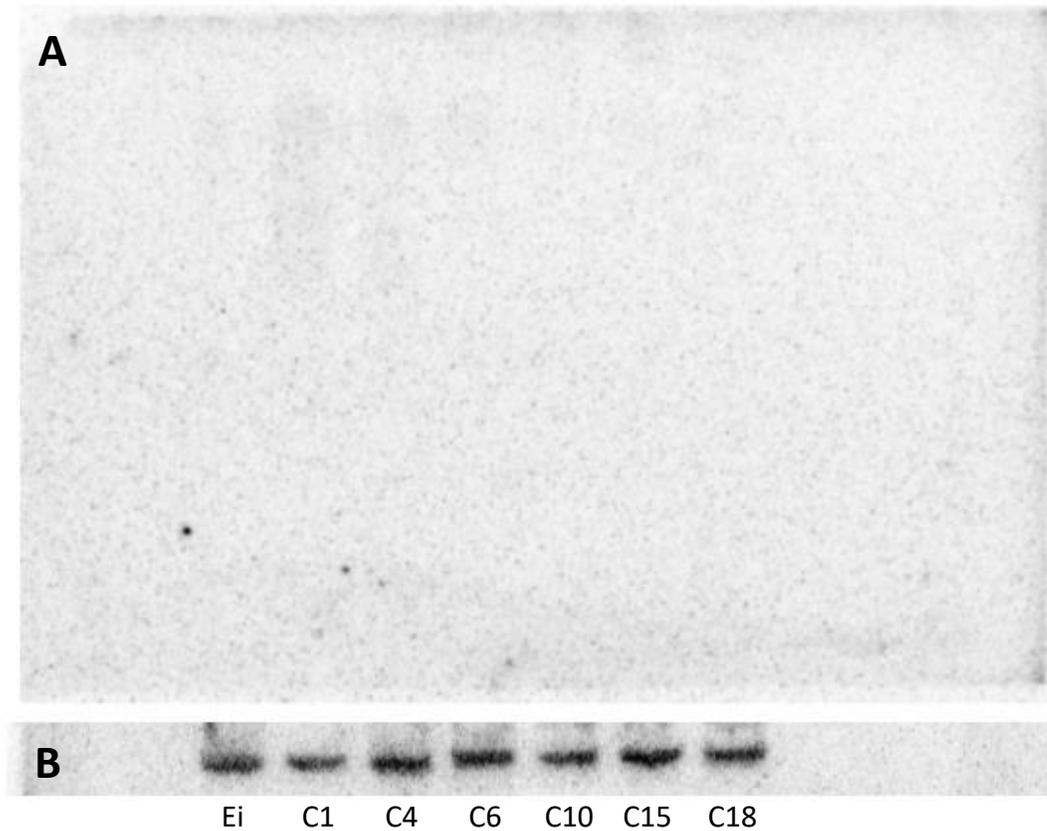
Anexo 11. Perfil de expresión semi-cuantitativo del retrotransposon Ji durante la fase de propagación de callos embriogénicos de maíz Costeño. Se muestra la comparación relativa de las veces de cambio entre muestras respecto a C6. C6, C10, C15, C18: callos embriogénicos subcultivados durante 6, 10, 15 y 18 meses respectivamente.



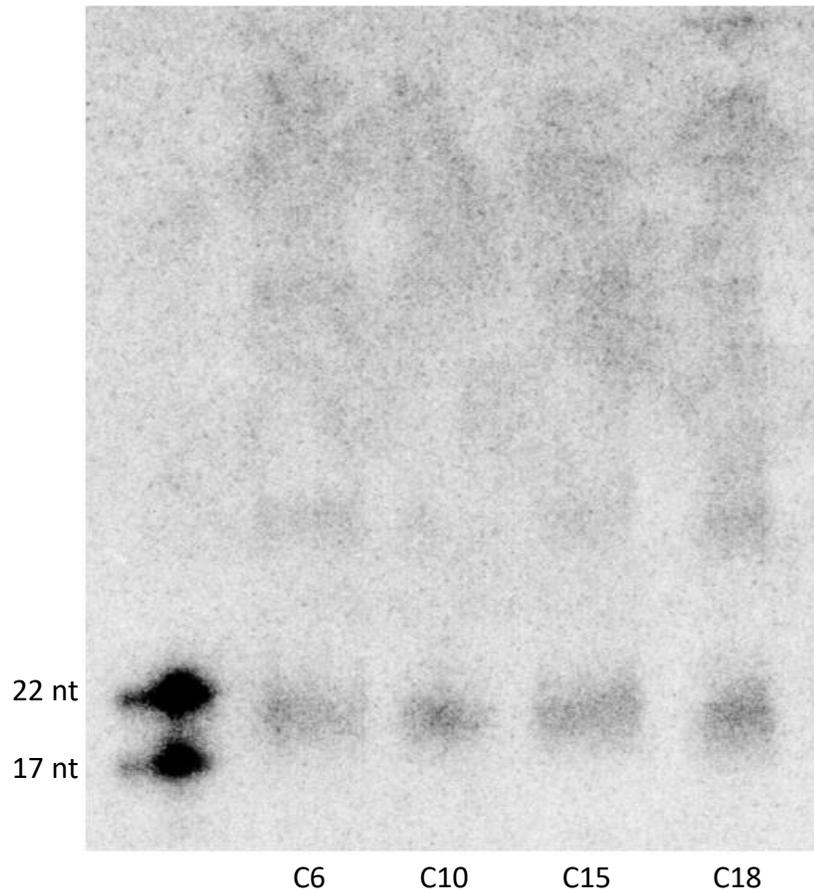
Anexo 12. Perfil de expresión de TEs durante la inducción de callos embriogénicos de maíz Costeño (segunda réplica). Muestra la comparación relativa de las veces de cambio entre muestras respecto a C6. Ei: embrión inmaduro; C1, C4, C6: callos embriogénicos subcultivados durante 1, 4 y 6 meses respectivamente. C: maíz Costeño. La muestra C4C tiene una anotación de no determinado (N/D) debido a que no se obtuvieron valores para esta etapa.



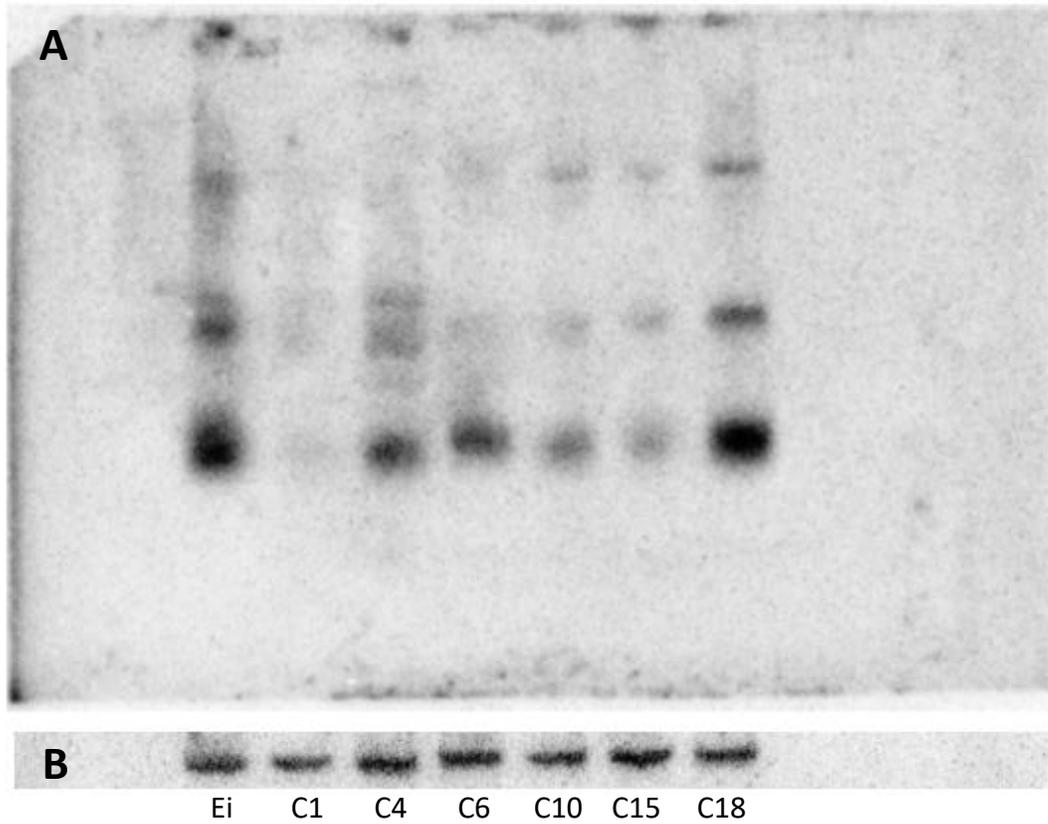
Anexo 13. Northern blot de Zma_ji-siR3 durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. El panel A muestra la hibridación de la sonda de 24 nt de un siRNA generado a partir del retrotransposon Ji (Zma_ji-siR3). La membrana contiene RNA de distintos estadios de inducción (Ei, C1, C4, C6) y propagación (C6, C10, C15, C18) de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. En el panel B se muestra la hibridación del gen ribosomal 5S como normalizador y control de carga.



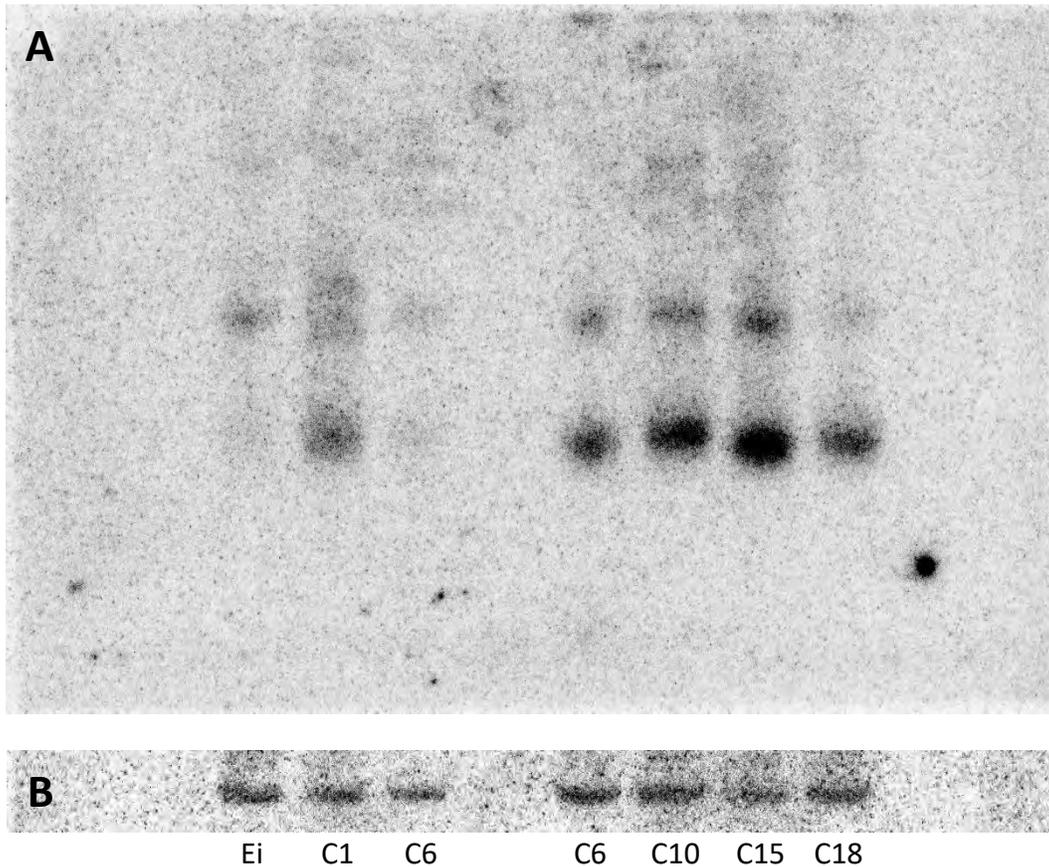
Anexo 14. Northern blot de Zma_ji-siR1 durante la propagación de callos embriogénicos de maíz Costeño. Hibridación de la sonda de 21 nt de un siRNA generado a partir del retrotransposon Ji (Zma_ji-siR1). La membrana contiene RNA de distintos estadios de propagación (C6, C10, C15, C18) de callos embriogénicos de maíz Costeño. El marcador de RNA demuestra el tamaño de 21 nt de Zma_ji-siR1.



Anexo 15. Northern blot de Zma_ji-siR1 durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. El panel A muestra la hibridación de la sonda de 21 nt de un siRNA generado a partir del retrotransposon Ji (Zma_ji-siR1). La membrana contiene RNA de distintos estadios de inducción (Ei, C1, C4, C6) y propagación (C6, C10, C15, C18) de callos embriogénicos de maíz Tuxpeño. En el panel B se muestra la hibridación del gen ribosomal 5S como normalizador y control de carga.



Anexo 16. Northern blot de Zma_ji-siR1 durante la inducción y propagación de callos embriogénicos de maíz Costeño. El panel A muestra la hibridación de la sonda de 21 nt de un siRNA generado a partir del retrotransposon Ji (Zma_ji-siR1). La membrana contiene RNA de distintos estadios de inducción (Ei, C1, C6) y propagación (C6, C10, C15, C18) de callos embriogénicos de maíz Costeño. En el panel B se muestra la hibridación del gen ribosomal 5S como normalizador y control de carga.



11. REFERENCIAS

Alejandri-Ramírez, N., Chávez-Hernández E., Contreras-Guerra J., et al. Small RNA differential expression and regulation in Tuxpeño maize embryogenic callus induction and establishment. *Plant Physiology and Biochemistry* 2018; 122: 78-89.

Anzola J., Sieberer T., Ortbauer M., et al. Putative Arabidopsis transcriptional adaptor protein (PROPORZ1) is required to modulate histone acetylation in response to auxin. *PNAS* 2010; 107:10308-10313.

Ananiev E., Phillips R. y Rines H. Complex structure of knob DNA on maize chromosome 9. Retrotransposon invasion into heterochromatin. *Genetics* 1998; 149: 2025-2037.

Ausin I., Greenberg M., Simanshu D., et al. INVOLVED IN DE NOVO 2-containing complex involved in RNA-directed DNA methylation in Arabidopsis. *PNAS* 2012; 109: 8374-8381.

Axtell M. Classification and Comparison of Small RNAs from Plants. *Annual Reviews Plant Biology* 2013; 64: 137-159.

Bayne E., White S., Kagansky A., et al. Stc1: a critical link between RNAi and chromatin modification required for heterochromatin integrity. *Cell* 2007; 140: 666-677.

Barber W., Zhang W., Win H., et al. Repeat associated small RNAs vary among parents and following hybridization in maize *PNAS* 2012; 109: 10444-10449.

Baubec T., Colombo D., Wirbelauer C., et al. Genomic profiling of DNA methyltransferases reveals a role for DNMT3B in genic methylation. *Nature* 2015; 520: 234-237.

Baucom R., Estill J., Chaparro C., et al. Exceptional diversity, non-random distribution, and rapid evolution of retroelements in the B73 maize genome. *PLoS Genetics* 2009; 5: e1000732.

Berger S. The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 2007; 447: 407-412.

Bilichak A. y Kovalchuk I. Transgenerational response to stress in plants and its application for breeding. *Journal of Experimental Botany* 2016; 67: 2081-2092.

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

Boyko A., Blevins T., Yao Y., et al. Transgenerational Adaptation of *Arabidopsis* to Stress Requires DNA Methylation and the Function of Dicer-Like Proteins. *PLoS ONE* 2010; 5: 995-998.

Beguiristain T., Grandbastien, M. A., Puigdomènech P., et al. Three Tnt1 subfamilies show different stress-associated patterns of expression in tobacco. Consequences for retrotransposon control and evolution in plants. *Plant Physiology* 2001; 127: 212-221.

Bennett M. y Leitch I. Nuclear DNA amounts in angiosperms: progress, problems and prospects. *Annals of Botany* 2005; 95: 45-90.

Bennetzen J. Transposable elements, gene creation and genome rearrangement in flowering plants. *Current Opinion in Genetics Development* 2005; 15: 621-627.

Bennetzen J., Ma J. y Devos K. Mechanisms of recent genome size variation in flowering plants. *Ann. Bot.* 2005; 95: 127-132.

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

Cavrak V., Lettner N., Jamge S., et al. How a retrotransposon exploits the plant's heat stress response for its activation. *PLoS Genetics* 2014; 10: e1004115.

Chan S., Zhang X., Bernatavichute Y., et al. Two-Step Recruitment of RNA-Directed DNA Methylation to Tandem Repeats. *PLoS Biology* 2006; 4: 1923-1933.

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

Chen Z. y Tian L. Roles of dynamic and reversible histone acetylation in plant development and polyploidy. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1769: 295-307.

Chodavarapu R., Feng S., Ding B., et al. Transcriptome and methylome interactions in rice hybrids. *PNAS* 2012; 109: 12040-12045.

Colomé-Tatché M., Cortijo S., Wardenaar R., et al. Features of the Arabidopsis recombination landscape resulting from the combined loss of sequence variation and DNA methylation. *PNAS* 2012; 109: 16240-16245.

Contreras-Guerra, J. L. Cambios epigenéticos a nivel de metilación de ADN en secuencias repetidas durante la inducción y subcultivo de callos embriogénicos de maíz. 2014 Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo, UNAM.

Dudits D., Bögre L. y Györgyey J. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic cells in vitro, *Journal of Cell Science* 1991; 484: 475-484.

Engelman F. Cryopreservation of embryos: An overview. *Methods Biol Mol* 2011; 710: 155-184.

Elhiti M. y Stasolla C. The use of zygotic embryos as explants for in vitro propagation: An overview. *Methods Biol Mol* 2011; 710: 229-255.

Eun C., Lorkovic Z., Sasaki T., et al. Use of forward genetic screens to identify genes required for RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology 2012; 77: 195-204.

Fehér A. Somatic embryogenesis — Stress-induced remodeling of plant cell fate. *Biochimica et Biophysica Acta* 2015; 1849: 385-402.

Fehér A. Why somatic plant cells start to form embryos? *En: Mujid A. y Samaj J.* (Eds) *Somatic Embryogenesis, Volume 2: Plant Cell Monographs.* Springer; Berlin 2005.

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

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

Finke A., Kuhlmann M. y Mette M. IDN2 has a role downstream of siRNA formation in RNA-directed DNA methylation. *Epigenetics* 2012; 7: 950-960.

Fu H. y Dooner H. Intraspecific violation of genetic colinearity and its implications in maize. *PNAS* 2002; 99: 9573-9578.

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

Gautheret R. J. Plant tissue culture: a history. *Bot. Mag.* 1983; 96: 393-410.

Gómez-Montiel N., Sierra-Macías M., Cantú-Almaguer M., et al. V-537C y V-538C, nuevas variedades de maíz con alta calidad de proteína para el trópico mexicano. *Revista Fitotecnia Mexicana* 2003; 26: 213-214.

Gómez-Montiel N., Cantú-Almaguer M., Sierra-Macías M., et al. H-565: Nueva alternativa de maíz para el trópico bajo de México. Instituto Nacional de

Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias. Centro de Investigación Regional Pacífico Sur. Campo Experimental Iguala. Folleto Técnico N° 19 Iguala de la Independencia, Guerrero. México 2013. 54p.

Grandbastien M. A., Audeon C., Bonnivard E., et al. Stress activation and genomic impact of Tnt1 retrotransposons in Solanaceae. *Cytogenetic Genome Research* 2005; 110: 229-241.

Garrocho-Villegas V., Jesús-Olvera M. y Sánchez-Quintanar E. Maize Somatic Embryogenesis: Recent Features to Improve Plant Regeneration. *Plant Cell Culture Protocols, Methods in Molecular Biology* 2012; 877: 173-182.

Greaves I., Groszmann M., Ying H., et al. Trans- chromosomal methylation in Arabidopsis hybrids. *PNAS* 2012; 109: 3570-3575.

Groszmann M., Greaves I., Albertyn Z., et al. Changes in 24-nt siRNA levels in Arabidopsis hybrids suggest an epigenetic contribution to hybrid vigor. *PNAS* 2011; 108: 2617-2622.

Haag J., Ream T., Marasco M., et al. *In vitro* transcription activities of Pol IV, Pol V, and RDR2 reveal coupling of Pol IV and RDR2 for dsRNA synthesis in plant RNA silencing. *Molecular Cell* 2012; 48: 811-818.

He G., Zhu X., Elling A., et al. Global epigenetic and transcriptional trends among two rice subspecies and their reciprocal hybrids. *Plant Cell* 2010; 22: 17-33.

He X., Chen T. y Zhu J. Regulation and function of DNA methylation in plants and animals. *Cell Research* 2011; 21: 442-465.

Heard E. y Martienssen R. Transgenerational Epigenetic Inheritance: myths and mechanisms. *Cell* 2014; 157: 95-109.

Hebbes T., Thorne A. y Cranerobinson C. A direct link between core histone acetylation and transcriptionally active chromatin. *EMBO Journal* 1988, 7: 1395-1402.

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

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

Hirochika H. Retrotransposons of rice: their regulation and use for genome analysis. *Plant Molecular Biology* 1997; 35: 231-240.

Huang L., Jones A., Searle I., et al. An atypical RNA polymerase involved in RNA silencing shares small subunits with RNA polymerase II. *Nature Structural and Molecular Biology* 2009; 16: 91-93.

Huetzel B., Kanno T., Daxinger L. et al. RNA-directed DNA methylation mediated by DRD1 and Pol IVb: a versatile pathway for transcriptional gene silencing in plants. *Biochimica et Biophysica Acta* 2007; 1769: 358-374.

Ichiyonagi K. Epigenetic regulation of transcription and possible functions of mammalian short interspersed elements, SINEs. *Genes Genet. Syst.* 2013; 88: 19-29.

Ito H. Small RNAs and regulation of transposons in plants. *Genes Genet. Syst.* 2013; 88: 3-7.

Ito H., Gaubert H., Bucher E., et al. An siRNA pathway prevents transgenerational retrotransposition in plants subjected to stress. *Nature* 2011; 472: 115-119.

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

Ji L. y Chen X. Regulation of small RNA stability: methylation and beyond. *Cell Research* 2012; 22: 624-636.

Jia Y., Lisch D., Ohtsu K., et al. Loss of RNA-Dependent RNA Polymerase 2 (RDR2) Function Causes Widespread and Unexpected Changes in the Expression of Transposons, Genes, and 24-nt Small RNAs. *PLoS Genetics* 2009; 5: e1000737.

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

Johnson L., Du J., Hale C., et al. SRA- and SET-domain-containing proteins link RNA polymerase V occupancy to DNA methylation. *Nature* 2014; 507: 124-128.

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

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

Kejnovsky E., Hawkins J. y Feschotte C. Plant Transposable Elements: Biology and Evolution. *En: Wendel J. F. (Eds) Plant Genome Diversity, Volume 1: Plant genomes, their residents, and their evolutionary dynamics.* Springer, Wien, New York 2012.

Kim M. y Zilberman D. DNA methylation as a system of plant genomic immunity. *Trends in Plant Science* 2014; 19: 320-326.

Kouzarides T. Chromatin modifications and their function. *Cell* 2007; 128: 693-705.

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

- Law J., Du J., Hale C., et al.** Polymerase IV occupancy at RNA-directed DNA methylation sites requires SHH1. *Nature* 2013; 498: 385-389.
- Law J. y Jacobsen S.** Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 2010; 11: 204-220.
- Law J., Vashisht A., Wohlschlegel J. A. et al.** SHH1, a homeodomain protein required for DNA methylation, as well as RDR2, RDM4, and chromatin remodeling factors, associate with RNA polymerase IV. *PLoS Genetics* 2011; 7: e1002195.
- Leljak-Levanic D., Bauer N., Mihaljevic S. et al.** Changes in DNA methylation during somatic embryogenesis in *Cucurbita pepo L.* *Plant Cell Reports* 2004; 23: 120-127.
- Li B., Carey M. y Workman J.** The role of chromatin during transcription. *Cell* 2007; 128: 707-719.
- Li G., Hall T. y Holmes-Davis R.** Plant chromatin: development and gene control. *BioEssays* 2002; 24: 234-243.
- Li Q., Gent J., Zynda G., et al.** RNA-directed DNA methylation enforces boundaries between heterochromatin and euchromatin in the maize genome. *PNAS* 2015; 112: 14728-14733.
- Lisch D.** How important are transposon for plant evolution? *Nature Reviews Genetics* 2013; 14: 49-61.
- Lu X., Wang W., Ren W., et al.** Genome-wide epigenetic regulation of gene transcription in maize seeds. *PLoS ONE* 2015; 10: e0139582.
- Ma J.** Retrotransposons. *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, 2nd edition 2013; 6: 208-210.

Makarevitch I., Waters A., West P., et al. Transposable Elements Contribute to Activation of Maize Genes in Response to Abiotic Stress. *PloS Genetics* 2015; 11: e1004915.

Martínez G., Panda K., Köhler C., et al. Silencing in sperm cells is directed by RNA movement from the surrounding nurse cell. *Nature Plants* 2016; 4: 16030.

Matzke M. y Mosher R. RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nature Rev Genet* 2014; 15: 394-408.

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

Mohan J. Tissue culture-derived variation in crop improvement. *Euphytica* 2001; 118: 153-166.

Morgante M., De Paoli E. y Radovic S. Transposable elements and the plant pan-genomes. *Current Opinion Plant Biology* 2007; 10: 149-155.

Mosher R., Melnyk C., Kelly K., et al. Uniparental expression of Pol IV-dependent siRNAs in developing endosperm of *Arabidopsis*. *Nature* 2009; 460: 283-286.

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

Niederhuth C., Bewick A., Ji L., et al. Widespread natural variation of DNA methylation within angiosperms. *Genome Biology* 2016; 17; 1-19.

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

Olmedo-Monfil V., Durán-Figueroa N., Arteaga-Vázquez M. et al. Control of female gamete formation by a small RNA pathway in *Arabidopsis*. *Nature* 2010; 464: 628-632.

Panda K., Ji L., Neumann D., et al. Full-length autonomous transposable elements are preferentially targeted by expression-dependent forms of RNA-directed DNA methylation. *Genome Biology* 2016; 17: 1-19.

Paterson A., Bowers J., Buggmann R., et al. The Sorghum bicolor genome and the diversification of grasses. *Nature* 2009; 457: 551-556.

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

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

Rodriguez-Enriquez J., Dickinson H. y Grant-Downton R. MicroRNA misregulation: an overlooked factor generating somaclonal variation? *Trends in plant science* 2011; 16: 242-248.

Saze H., Tsugane K., Kanno T., et al. DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant and Cell Physiology* 2012; 53: 766-784.

Schnable P., Ware D., Fulton R., et al. The B73 Maize Genome: Complexity, Diversity, and Dynamics. *Science* 2009; 326: 1112-1115.

Schmitz R., Schultz M., Lewsey M., et al. Transgenerational Epigenetic Instability Is a Source of Novel Methylation Variants. *Science* 2011; 334: 369-373.

Shen H., He H., Li J., et al. Genome-wide analysis of DNA methylation and gene expression changes in two Arabidopsis ecotypes and their reciprocal hybrids. *Plant Cell* 2012; 24: 875-892.

Shilatifard A. Chromatin modifications by methylation and ubiquitination: implications in the regulation of gene expression. *Annual Review of Biochemistry* 2006; 75: 243-269.

Sigman M. y Slotkin R. The First Rule of Plant Transposable Element Silencing: Location, Location, Location. *The Plant Cell* 2016; 28: 304-313.

Skirvin R. Natural and induced variation in tissue culture. *Euphytica* 1978; 27: 241-266.

Slotkin R., Nuthikattu S. y Jiang N. The impact of transposable elements on gene and genome evolution. *En: Wendel J. F. (Eds) Plant Genome Diversity, Volume 1: Plant genomes, their residents, and their evolutionary dynamics.* Springer, Wien, New York 2012.

Slotkin R. y Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nature* 2007; 8: 272-285.

Slotkin R., Vaughn M., Tanurdzic M., et al. Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 2009; 136: 461-472.

Smith L., Pontes O., Searle I., et al. An SNF2 protein associated with nuclear RNA silencing and the spread of a silencing signal between cells in Arabidopsis. *Plant Cell* 2007; 19: 1507-152.

Swigonova Z., Bennetzen J. L. y Messing J. Structure and evolution of the r/b chromosomal regions in rice, maize and sorghum. *Genetics* 2005; 169: 891-906.

Tan M. Analysis of DNA methylation of maize in response to osmotic and salt stress based on methylation-sensitive amplified polymorphism. *Plant Physiology and Biochemistry* 2010; 48: 21-26.

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

Tsukahara S., Kobayashi A., Kawabe A., et al. Bursts of retrotransposition reproduced in Arabidopsis. *Nature* 2009; 461: 423-426.

Vicient C. Transcriptional activity of transposable elements in maize. *BMC Genomics* 2010; 11: 1-10.

Yao J., Dong Y. y Morris B. Parthenocarpic apple fruit production conferred by transposon insertion mutations in a MADS-box transcription factor. *PNAS* 2001; 98: 1306-1311.

Wang P., Xia H. Zhang Y., et al. Genome-wide high-resolution mapping of DNA methylation identifies epigenetic variation across embryo and endosperm in Maize (*Zea mays*). *BMC Genomics* 2015; 16: 14.

Wang Q. y Dooner H. Remarkable variation in maize genome structure inferred from haplotype diversity at the bz locus. *PNAS* 2006; 103: 17644-17649.

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

Waters A., Makarevitch I., Eichten S., et al. Parent-of-origin effects on gene expression and DNA methylation in the maize endosperm. *Plant Cell* 2011; 23: 4221-4233.

Weil C. y Martienssen R. Epigenetic interactions between transposons and genes: lessons from plants. *Current Opinion in Genetic and Development* 2008; 18: 188-192.

Wierzbicki A., Cocklin R., Mayampurath A., et al. Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. *Genes and Development* 2012; 26: 1825-1836.

Xiao W., Custard K., Brown R., et al. DNA methylation is critical for *Arabidopsis* embryogenesis and seed viability. *Plant Cell* 2006; 18: 805-814.

Zemach A., McDaniel I., Silva P., et al. Genome-Wide Evolutionary Analysis of Eukaryotic DNA Methylation. *Science* 2010; 328: 916-919.

Zhai J., Bischof S., Wang H., et al. A one precursor one siRNA model for pol IV-dependent siRNA biogenesis. *Cell* 2015; 163: 445-455.

Zhang C., Ning Y., Zhang S., et al. IDN2 and its paralogs form a complex required for RNA-directed DNA methylation. *PLoS Genetics* 2012; 8: e1002693.

Zhang M., Xu C., Yan H., et al. Limited tissue culture-induced mutations and linked epigenetic modifications in F hybrids of sorghum pure lines are accompanied by increased transcription of DNA methyltransferases and 5-methylcytosine glycosylases. *The Plant Journal* 2009; 57: 666-679.

Zhang W., Garcia N., Feng Y. et al. Genome-wide histone acetylation correlates with active transcription in maize. *Genomics* 2015; 106: 214-220.

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

Zhang X., Yazaki J., Sundaresan A., et al. Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 2006; 126: 1189-1201.

Zhong X., Hale C., Law J., et al. DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nature Struct. Mol. Biol.* 2012; 19: 870-875.

Zhu Y., Rowley M., Bohmdorfer G., et al. SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Molecular Cell* 2013; 49: 298-309.