
ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I	3
ANTECEDENTES.....	3
1.1. VARIACIÓN SOMACLONAL.....	3
1.2. EL ALBINISMO EN PLANTAS	4
1.3. EPIGENÉTICA.....	5
1.4. METILACIÓN DE ADN EN PLANTAS.....	6
1.4.1 Metiltransferasas en la metilación <i>de novo</i>	10
1.4.2 Metiltransferasas en la metilación de mantenimiento	11
1.6. GÉNERO AGAVE.....	13
1.7 AGAVE ANGUSTIFOLIA HAW.	14
1.8 JUSTIFICACIÓN.....	17
1.9 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
1.10 HIPÓTESIS	19
1.11 OBJETIVO GENERAL.....	20
1.12 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	20
1.13 DISEÑO EXPERIMENTAL.....	21
CAPÍTULO II	23

IDENTIFICACIÓN DE SECUENCIAS DE GENES DE METILTRANSFERASAS DE ADN EN <i>A. ANGUSTIFOLIA</i> HAW.....	23
2.1. INTRODUCCIÓN	23
2.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
2.2.1. Ensamble de transcriptoma.....	25
2.2.2. Análisis de expresión de genes diferencialmente expresados.....	27
2.2.3. Identificación de genes de metiltransferasas de ADN en el transcriptoma	27
2.2.4. Identificación de dominios conservados de metiltransferasas de ADN en el transcriptoma ensamblado.....	28
2.2.5. Árbol filogenético de proteínas de metiltransferasas de ADN	28
2.3. RESULTADOS	29
2.3.1. Análisis de calidad de lecturas de secuenciación del transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.....	29
2.3.2. Distribución de longitud de transcritos y obtención de unigenes del transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.....	30
2.3.3. Anotación funcional de genes identificados en el transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.....	31
2.3.4. Mapeo de lecturas de secuenciación del transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.....	32
2.3.5. Búsqueda de identidad de secuencias del transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw. con el algoritmo BLAST del NCBI	32
2.3.6. Identificación de dominios conservados en secuencias de genes de metiltransferasas de ADN.....	33
2.3.7. Análisis filogenético de las secuencias identificadas en el transcriptoma.....	35

CAPÍTULO III.....	37
ANÁLISIS DE EXPRESIÓN DE GENES DE METILTRANSFERASAS DE ADN	37
3.1. INTRODUCCIÓN	37
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	38
3.2.1. Diseño de cebadores	38
3.2.2. Condiciones de cultivo y características de las plántulas	39
3.2.3. Extracción de ARN	39
3.2.4. Síntesis de ADNc.....	40
3.2.5. PCR punto final.....	40
3.2.6. Determinación del nivel de expresión por densitometría de genes de metiltransferasas de ADN de <i>A. angustifolia</i> Haw.	40
3.2.7. Elección de genes de metiltransferasas de ADN para analizar por RT-qPCR	41
3.2.8. Análisis de expresión de metiltransferasas a partir del reporte del transcriptoma	41
3.2.9. Medición de niveles de expresión de metiltransferasas de ADN por RT-qPCR	41
3.3. RESULTADOS	42
3.3.1. Determinación del nivel de expresión por densitometría de genes de metiltransferasas de ADN de <i>A. angustifolia</i> Haw.	42
3.3.2. Niveles de expresión de genes de metiltransferasas de ADN reportados en el transcriptoma <i>A. angustifolia</i> Haw.....	45
3.3.3. Análisis de expresión de genes que codifican para metiltransferasas de ADN por RT-qPCR	46

CAPITULO IV	49
DISCUSIÓN, CONCLUSIONES GENERALES Y PERSPECTIVAS	49
4.1. DISCUSIÓN GENERAL	49
4.1.1. Identificación de dominios conservados y construcción de árbol filogenético	49
4.1.2. Nivel de expresión de genes que codifican para enzimas metiltransferasas de ADN	50
4.2 CONCLUSIONES GENERALES	53
4.3 PERSPECTIVAS	54
BIBLIOGRAFÍA	55

LISTADO DE FIGURAS

Figura 1. 1 Mecanismo de metilación del ADN	8
Figura 1. 2 Metilación de ADN de novo y de mantenimiento	9
Figura 1. 3 Dominios conservados de genes de metiltransferasas de ADN en <i>A. thaliana</i>	10
Figura 1. 4 Diseño experimental del presente trabajo.....	21
Figura 1. 5 Flujo de trabajo seguido por la empresa Novogene para el ensamble y análisis de transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	24
Figura 2. 1 Dominios conservados en secuencias de aminoácidos de metiltransferasas de la familia DRM.	34
Figura 2. 2 Dominios conservados en secuencias de aminoácidos de metiltransferasas de la familia Met.	34
Figura 2. 3 Dominios conservados en secuencias de aminoácidos de metiltransferasas de la familia CMT.....	35
Figura 2. 4 Árbol filogenético de proteínas de MTasas de ADN..	36
Figura 3. 1 Gel de electroforesis para genes de MTasas de ADN identificados en el transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	44
Figura 3. 2 Análisis densitométrico de genes de MTasas de ADN identificados en el transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	44
Figura 3. 3 Niveles de expresión de transcritos expresados deferencialmente reportados en el ensamble de transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	45
Figura 3. 5 Expresión relativa de los transcritos que codifican para metiltransferasas de ADN de <i>A. angustifolia</i> Haw	¡Error! Marcador no definido.

LISTADO DE TABLAS

Tabla 2. 1 Resultados de calidad de secuenciación del transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	30
Tabla 2. 2 Número total de transcritos y unigenes identificados en el transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	30
Tabla 2. 3 Datos estadísticos del ensamble de transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	31
Tabla 2. 4 Unigenes anotados del transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	31
Tabla 2. 5 Lecturas mapeadas al ensamble de novo del transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	32
Tabla 2. 6 Resultados de búsquedas de similitud por BLAST de secuencias de metiltransferasas de ADN identificadas en el transcriptoma de <i>A. angustifolia</i> Haw.	33
Tabla 2. 7 Dominios identificados en proteínas de MT-asas de ADN de <i>A. angustifolia</i> Haw.	73

ABREVIATURAS

2,4-D	Ácido 2,4 diclorofenoxiacético
5mC	Metilación en el carbono 5' de la citosina
6-BA	6-bencilaminopurina
A	Fenotipo albino
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AFLP	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados
AGO 3	Complejo ARGONAUTA 3
AGO 4	Complejo ARGONAUTA 4
AGO 6	Complejo ARGONAUTA 6
ARN	Ácido ribonucleico
ARNip	ARN pequeño de interferencia
ARNm	ARN mensajero
AV	Región albina del tejido variegado
BAH	Dominio de homología bromo adyacente
BCP	1-bromo-3-cloropropano
BLAST	Herramienta de búsqueda por alineamiento básico local
C ₃	Metabolismo C ₃
C ₄	Metabolismo C ₄
ADNc	ADN complementario
CAM	Metabolismo ácido de las crasuláceas
CD	Cromodominio
CMT	CROMOMETILTRANSFERASA
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio
DCL3	ENDONUCLEASA DICER-LIKE 3
DMT	Dominio metilasa de ADN
Dnmt 1	ADN-METILTRANSFERASA 1
DRM	METILTRANSFERASAS DE DOMINIOS REARREGLADOS
FPKM	Fragmentos por millón de kilobases
G	Fenotipo verde

GC	Porcentaje de guaninas-citosinas
Go	Ontología de genes
GV	Región verde del tejido variegado
H1	Histona 1
H3	Histona 3
H3K9	Lisina de la histona 3
H3K9me2	Dimetilación de la lisina nueva en la histona 3
HA	Tejido de hoja albina
HEN1	Enhancer HUA 1
HG	Tejido de hoja verde
HMM	Modelos ocultos de Markov
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HV	Tejido de fenotipo variegado
KEGG	Enciclopedia de genes y genomas de Kyoto
KNO3	Nitrato de potasio
KO	Ontología de KEGG
KOG	Grupos ortólogos de proteínas de eucariotas
KYP	Enzima KRYPTONITA
MA	Tejido meristemático de plántulas con fenotipo albino
MET1	METILTRANSFERASA DE ADN 1
MG	Tejido meristemático de plántulas con fenotipo verde
mi-ARN	Micro ARN
Mtasas-ADN	Metiltransferasas de ADN
N50	Parámetro de calidad de ensamble N50
N90	Parámetro de calidad de ensamble N90
NaCl	Cloruro de sodio
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio
Nr	Base de datos de secuencias no redundantes del NCBI
Nt	Base de datos de nucleótidos del NCBI

PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Pfam	Base de datos de familias y dominios de proteínas
PGDD	Base de datos de duplicación de genomas de plantas
POL IV	Polimerasa de ARN IV
POL V	Polimerasa de ARN V
PVP	Polivinilpolipirrolidona
Q20	Valor Q20 del puntaje de Phred
Q30	Valor Q30 del puntaje de Phred
RAPD	Amplificación aleatoria del ADN polimórfico
RdDM	Metilación de ADN dirigida por ARN
RDR2	Polimerasa dependiente de ARN 2
RFD	Dominio de replicación de foci
RFLP	Polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción
RT-qPCR	PCR en tiempo real
SAH	S-adenosil-L-homocisteína
SAM	S-adenosil-L-metionina
SSR	Secuencias simples repetidas
SUV4	Supresor de variegación 3-9 homologo 4
Tm	Temperatura de alineamiento
V	Fenotipo variegado
VS	Variación somaclonal

RESUMEN

Durante la micropropagación de plantas es posible observar variación fenotípica entre la planta madre y sus hijas, a esta variación se le conoce como variación somaclonal (VS). Este fenómeno puede ser causado por factores genéticos que se describen como cambios en la secuencia del ADN, o por factores epigenéticos en los que participan mecanismos de regulación en los genes que no cambian la secuencia del ADN. En la micropropagación de *Agave angustifolia* Haw. se detectó una VS, en la cual a partir de plántulas verdes emergieron plántulas variegadas y albinas. El albinismo en las plantas es un evento que ocurre de manera poco frecuente en la naturaleza y del cual se sabe poco acerca de su origen molecular, es por esta razón que las variantes somaclonales de *A. angustifolia* Haw. son un modelo de estudio interesante para explorar el albinismo. En estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio se encontró una similitud genética mayor al 97% entre las variantes somaclonales de *A. angustifolia* Haw., este hallazgo sugiere que la VS se puede explicar con base a mecanismos epigenéticos. La metilación del ADN es un mecanismo epigenético que sucede cuando las enzimas llamadas metiltransferasas de ADN (mtsas-ADN) transfieren un grupo metilo a la citosina de la cadena del ADN provocando el silenciamiento o disminución de la expresión de los genes. Por lo tanto, la VS de *A. angustifolia* Haw. se podría explicar al detectar cambios en la expresión de genes que codifican para mtsas-ADN entre los fenotipos, debido a que estas estarían regulando genes involucrados en procesos como la biogénesis y desarrollo de los cloroplastos. En el estudio descrito a continuación se utilizaron herramientas bioinformáticas para encontrar secuencias de genes que codifican para mtsas-ADN en el transcriptoma de *A. angustifolia* Haw. y para identificar los dominios conservados que permiten llevar a cabo la función de estos genes. Posteriormente se construyó un árbol filogenético para corroborar la identidad de los genes utilizando las secuencias encontradas en el transcriptoma de *A. angustifolia* Haw. y las secuencias de 15 especies de plantas diferentes. Por último, se seleccionaron algunos genes de mtsas-ADN para analizar su expresión con la técnica de PCR en tiempo real. El análisis reveló una disminución en la expresión de dichos genes en los fenotipos variegado y albino, esta característica podría indicar que existen cambios en la regulación de otros genes que pudieran estar provocando la aparición de los nuevos fenotipos.

ABSTRACT

During plants propagation it is possible to observe phenotypic variation between mother plant and the generated new shoots; this variation is known as somaclonal variation (VS). This phenomenon can occur by genetic factors, which are described as changes on DNA sequence, or by epigenetic factors, where regulation mechanisms of genes participate and do not change the DNA sequence. In *Agave angustifolia* Haw. micropropagation VS was detected, in which variegated and albino shoots were emerged from the green plantlets. Plants albinism is a rare event in nature and less is known about its molecular origin. For this reason, *A. angustifolia* Haw. somaclonal variants are an interesting study model to explore albinism. In previous investigations done in our lab there was found a genetic similitude greater than 97% between *A. angustifolia* Haw. somaclonal variants. This finding suggests that this VS can be explained by epigenetic mechanism. DNA methylation is an epigenetic mechanism, which occurs when enzymes known as DNA methyltransferases (DNA-mtases) transfer a methyl group to the cytosines in the DNA chain causing decrease or silencing of genes expression. Therefore, the VS of *A. angustifolia* Haw. could be explained by detecting changes in DNA-mtases coding genes among the phenotypes, because they would be regulating genes involved in process like biogenesis and chloroplast development. In the study described below there were used bioinformatic tools in order to find gene sequences coding for DNA-mtases in the *A. angustifolia* Haw. transcriptome, and also to find the conserved domains, which allow these genes to develop their function. Also, a phylogenetic tree was built in order to corroborate the gene's identity by using the sequences found in *A. angustifolia* Haw. transcriptome and sequences from 15 different plant species. Finally, there were chosen some DNA-mtases genes to analyze their expression using real time PCR technique. This analysis revealed a decreased in some DNA-mtases coding genes in variegated and albino phenotypes. This could indicate that there are changes in the regulation of other genes that could be triggering the emergence of new phenotypes.
